

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MİDE KANSERİNDE P53, GSTM1 VE GSTZ1 GENLERİNİN PROTEİN
EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ

ZUHAL DANIŞMAN

HAZİRAN 2018

Biyoloji Anabilim Dalında Zuhâl DANİ MAN tarafından hazırlanan “M DE KANSER NDE P53, GSTM1 VE GSTZ1 ZOZ MLER N N PROTE N EKSPRESYONLARININ NCELENMES ” adlı Yüksek Lisans Tezinin anabilim dalı standartlarına uygun oldu unu onaylıyorum.

Prof. Dr. İhami TÜZÜN

Anabilim Dalı Ba kanı

Bu tezi okudu umu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdi ini onaylıyorum.

Prof. Dr. Serpil O UZTÜZÜN

Danı man

Jüri Üyeleri:

Ba kan : Prof. Dr. Nursel GÜL

Üye : Prof. Dr. Nazife Y İT KAYHAN

Üye (Danı man) : Prof. Dr. Serpil O UZTÜZÜN

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

Prof. Dr. Mustafa Y İTO LU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

MİDE KANSERİNDE P53, GSTM1 VE GSTZ1 ZETA GİTİMLERİNİN PROTEİN EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ

DANIŞMAN, Zühal

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Serpil ÖZTÜZÜN

Haziran 2018, 41 sayfa

Bu çalışmada, 32 normal ve mide adenokanserli dokuda Glutasyon S-Transferaz izozimlerinden mu (GSTM1) ve zeta (GSTZ1) ayrıca p53'in protein ekspresyonları immünohistokimyasal metodla karılaştırılmıştır. GST ekspresyonu ve p53 arasındaki ilişki Mann Whitney-U testi ile ve klinik parametrelerle ilişki için spearman correlation rank testi ile bakılmıştır. Normal mide ve adenokanserli mide dokularında GSTM1, GSTZ1 ve p53 ekspresyonları karılaştırıldığında mide adenokanserli dokulardaki protein ekspresyonunun yüksek olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). GSTM1, GSTZ1 ve p53 ile klinik parametreler (yaş, cinsiyet) arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır ($p > 0,05$). GSTZ1 izoziminin az diferansiye, orta diferansiye ve iyi diferansiye kolon adenokanserli dokularında da istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar bulunmuştur ($p < 0,05$). İyi diferansiye kolon tümör hastalarında GSTZ1 ekspresyonu normal dokuya göre daha fazla bulunmuştur ($p < 0,05$).

Anahtar kelimeler: Mide Adenokarsinomu, Glutasyon S-transferaz, p53, immünohistokimya

ABSTRACT

INVESTIGATION OF P53, GSTM1 AND GSTZ1 ISOENZYME EXPRESSIONS IN GASTRIC ADENOCARCINOMA

DANI MAN, Zuhal

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M. Sc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Serpil O UZTÜZÜN

June 2018, 41 pages

In this study we investigated the immunohistochemical staining characteristics S-of glutathione s-transferase mu (GSTM1), zeta (GSTZ1), p53 in gastric tumor and surrounding tumor free (normal) gastric tissues from 32 patients. For immunohistochemical studiends, tissues were obtained from 32 patients with gastric adenocarcinoma. Tumor and control tissues of patients were compared according to their staining intensity. Relationships between p53 and GST expressions in gastric adenocarcinoma tissue were examined by the Mann Whitney-U test and the clinicopathological data were examined by the spearman correlation rank test. GSTZ1, GSTM1 and p53 expressions in gastric cancer cells were significantly higher than those in gastric normal epithelial cells ($p < 0.05$) In gastric cancer patients the higher expressions of GSTM1, GSTZ1, and p53 proteins in tumor than nomal gastric tissues could be important in gastric cancer progressions and development. There was no statistical relationship between p53, GSTM1 and GSTZ1 isoenzyme expressions and the clinicopathological data (age, gender) ($p > 0.05$). There was a statistically significant differences between GST isoenzymes expressions and tumor differentiation status. In good differentiated gastric

adenocarcinoma patients, GSTZ1 expression was stronger than normal tissue ($p < 0.05$).

Key Words: Gastric adenocarcinoma, Glutathione-S-transferase, p53, Immunohistochemistry



TE EKKÜR

Bu çalı mada beni yönlendiren, destekleyen ve tecrübeleriyle bana yol gösteren de erli hocam Prof. Dr. Serpil O UZTÜZÜN'e te ekkür ederim. Çalı malarımın deneysel a amalarında doku kazanımı ve immunohistokimyasal sonuçlarımın de erlendirilmesinde bana yardımcı olan Keçiören E itim ve Ara tırma Hastanesi Patoloji Uzmanı Doç. Dr. Gülçin GÜLER M EK'e te ekkür ederim. Tezin belli a amalarında yardımlarını gördü üm Dr. Arzu KAYA KOÇDO AN'a te ekkür ederim. Tez çalı mam boyunca sa ladıkları imkanlardan dolayı Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Ara tırma Laboratuvarları Müdürlü ü'ne te ekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tezimin ba langıcından sonuna kadar hiçbir deste ini esirgemeyen aileme te ekkür ederim.

Ç NDEK LER D Z N

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TE EKKÜR	iv
Ç NDEK LER D Z N	v
Ç ZELGELER D Z N	vii
EK LLER D Z N	viii
1.G R	1
1.1. Kanser.....	1
1.2. Mide Tümörleri ve sınıflandırılması	5
1.2.1. Adenokarsinomlar.....	6
1.3. Mide Adenokarsinomunun Mikroskopik Özellikleri	6
1.3.1. Epitelyal Elemanlar ve düzeyleri.....	6
1.3.2. Stromal Durumlar	6
1.4. Mide Kanseri Etyolojisi ve Patogenez	7
1.4.1. Cinsiyet, Ya ve Lokalizasyon.....	7
1.4.2. Genetik.....	8
1.4.3. Sosyoekonomik durum	8
1.4.4. Diyet.....	8
1.4.5. Sigara Kullanımı	8
1.4.6. Meslek.....	9
1.4.7. Radyasyon.....	9
1.4.8. <i>Helicobacter pylori</i> gastriti	9
1.4.9. Toksik Maddelerin Metabolizması	9
1.4.10. Glutasyon-S-Transferaz	10
1.4.11. Glutasyon-S-Transferazların Sınıflandırılması	12
1.4.11.1. Mü Sınıfı Glutasyon-S-Transferazlar	13
1.4.11.2. Zeta Sınıfı Glutasyon-S-Transferazlar.....	13
1.4.12. Kemoterapide ilaç Direnci ve Glutasyon-S-Transferaz li kisi	14
1.4.13. p53 ve mide kanseri	14

1.4.14. Çalışmanın Amacı.....	15
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
2.1. Materyal.....	16
2.1.1. Materyalin Temini ve Hazırlanması.....	16
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	17
2.1.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması.....	17
2.1.3. Kullanılan Cihazlar.....	18
2.2. Kullanılan Metot.....	18
2.2.1. İmmünohistokimya Yöntemi.....	18
3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	21
3.1. GST izozimleri ve p53'ün Mide Kanserindeki Normal ve Tümörlü Dokularda Protein ifadelerinin Sonuçları.....	21
3.1.1. GSTM1 izozimlerinin Mide Kanserindeki Normal ve Tümörlü Dokulardaki ifadesi.....	21
3.1.2. GSTZ1 izozimlerinin Mide Kanserindeki Normal ve Tümörlü Dokulardaki ifadesi.....	22
3.1.3. p53'ün Mide Kanserindeki Normal ve Tümörlü Dokulardaki ifadesi.....	24
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	26
KAYNAKLAR.....	33

Ç ZELGELER D Z N

Ç ZELGE

Sayfa

1.1. Dünya Sa lık Örgütü (WHO) bölgesi veya geli mi lik düzeyine göre her iki cinsiyet için tahmini ve öngörülen tüm kanser vaka ve ölüm sayıları (milyon cinsinden).....	3
1.2. Mide Tümörleri	5
2. 1. Hastalara ait klinik parametreler.....	16
3.1. GSTM1 zozimlerinin Mide Kanserindeki Normal ve Tümörlü Dokulardaki fadesi.....	21
3.2. GSTZ1 zozimlerinin Mide Kanserindeki Normal ve Tümörlü Dokulardaki fadesi.....	23
3.3. p53'ün Mide Kanserindeki Normal ve Tümörlü Dokulardaki fadesi.....	24

EK LLER D Z N

EK L

Sayfa

1.1. Kadınlarda En Sık Görülen Kanserlerin Toplam Sayısı ve Yüzde Da ılımları...	4
1.2. Erkeklerde En Sık Görülen Kanserlerin Toplam Sayısı ve Yüzde Da ılımları...	4
1.3. GST enzimlerinin katalizledi i ksenobiyotik mekanizması	12
3.1. Mide normal dokuları ve mide adenokarsinomlu dokularda immunohistokimyasal GSTM1 proteini.....	22
3.2. Mide normal dokuları ve mide adenokarsinomlu dokularda immunohistokimyasal GSTZ1 proteini.....	23
3.3. Mide normal dokuları ve mide adenokarsinomlu dokularda immunohistokimyasal p53 proteini.....	25

1. G R

1.1. Kanser

Kanser, bazı etkilerle de i ikli e u ramı hücrelerin, vücudun bir organ veya dokusunda kontrolsüz ve düzensiz bir ekilde ço alması ile karakterize edilen bir hastalıktır [1]. Bu hastalık kendini göstermesi, geli imi ve sonuçları açısından bir hastadan di erine çok de i ken olan karma ık bir olgudur. Aynı heterojenlik ve çe itlilik hücrenel ve moleküler düzeyde de kendini gösterir. Kanser, hücrelerin a ırı ve zamansız ço almalarına, immün sistemin gözetiminden kaçmalarına ve sonuç olarak da uzaktaki dokuları da istila ederek metastazlar olu turmalarına yol açan metabolik ve davranı sal de i iklikler geçirdikleri, çok basamaklı bir süreçtir [2].

Dünya Sa lık Örgütü raporuna göre; kanserler, dünya çapında yılda 7,6 milyon ölümden sorumludur ve bu ölümlerin yakla ık 736.000'i mide kanserinden kaynaklanmaktadır. Ülkemizde ise; mide kanseri bayanlarda meme kanseri ve erkeklerde akci er kanserinden sonra ikinci sıklıkta görülen kanser türüdür. Türkiye'de yapılan bir çalı mada mide kanseri tanı alma ya ı ortalama 57 ya ve kadın erkek oranı 1/2 bulunmu tur. Bölgelerin kar ıla tırılması ile ülkemizin do u bölgesinde kanser tanısı alan hastaların sosyoekonomik durumu batı bölgesine göre daha dü ük bulunmu tur [3].

Pek çok kanser hücresi kanser tipine ba lı olarak moleküler ve biyokimyasal özelliklere sahiptir. Bu özellikler, büyümeyi inhibe eden sinyallere duyarsızlık, apoptozisten kaçınması, büyüme sinyallerine kar ı kendi kendine yetmesi, sınırsız kopyalanma potansiyeli, angiogenizin sürdürülmesi, doku invazyonu ve metastazı kapsamaktadır [4].

Hücreler do ar, geli ir ve ölürler. Bu olay genetik bir kontrol altındadır. Bu kontrolün, kalkması ile dengenin bozulması sonucu, ya çok sayıda olu maları ya da olu an hücrelerin ölmemeleri sonucu ço alan hücreler tümör dokusunu olu turur.

Hücrelerdeki bu olayların gelişmesine neden olan birçok kanser yapıcı (kanserojen) madde vardır [5].

Kanser aynı zamanda neoplazma olarak adlandırılan tümörleri oluşturan anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesi olarak da tanımlanmaktadır. Kişilerde tümör bulunmaktadır. Bunlar; vücutta yayılan yani metastaz özelliğine sahip malign (kötü huylu) tümörler ve vücutta yayılmayan benign (iyi huylu) tümörlerdir [6].

Kansere neden olan etmenleri sınıflandıracak olursak karsinojenler; fiziksel karsinojenler (güneş ışınları, UV, radyasyon vb.), kimyasal karsinojenler (polisiklik aromatik hidrokarbonlar, nitrozaminler, asbest, radon, alkol, sigara vb.) ve biyolojik karsinojenler (virüsler, hormonal bozukluklar, ailesel genetik yatkınlık, mutasyonlar, onkogenler vb.) üç ana grupta toplamak mümkündür. Bu etkilere maruziyet sonucu kanser; başlama (initiation), gelişme (promotion) ve ilerleme (progresyon) olmak üzere üç aşamada gerçekleşir [7].

Dünya genelinde farklı toplumlar farklı kanser türleriyle farklı oranlarda karşılaşır ve bu oranlar zamanla değişim gösterir. Yaygın biçimde insanlarda görülen kanserlerin % 80'e varan bir oranının, hatta belki % 90'ının, beslenme, sosyal ve kültürel alışkanlıklar da dâhil olmak üzere yaşam tarzı boyutlarını da içerecek biçimde tanımlandığı çevresel etkenlerden kaynaklandığına inanılmaktadır. Küresel kanser yükü geçtiğimiz 30 yılda iki kattan fazla artmıştır. 2008'de 12 milyon yeni kanser vakasının teşhis edildiği, kanserden kaynaklanan 7 milyon ölümün gerçekleştiği ve kanserli 25 milyon kişinin halen hayatta olduğu tahmin edilmektedir.

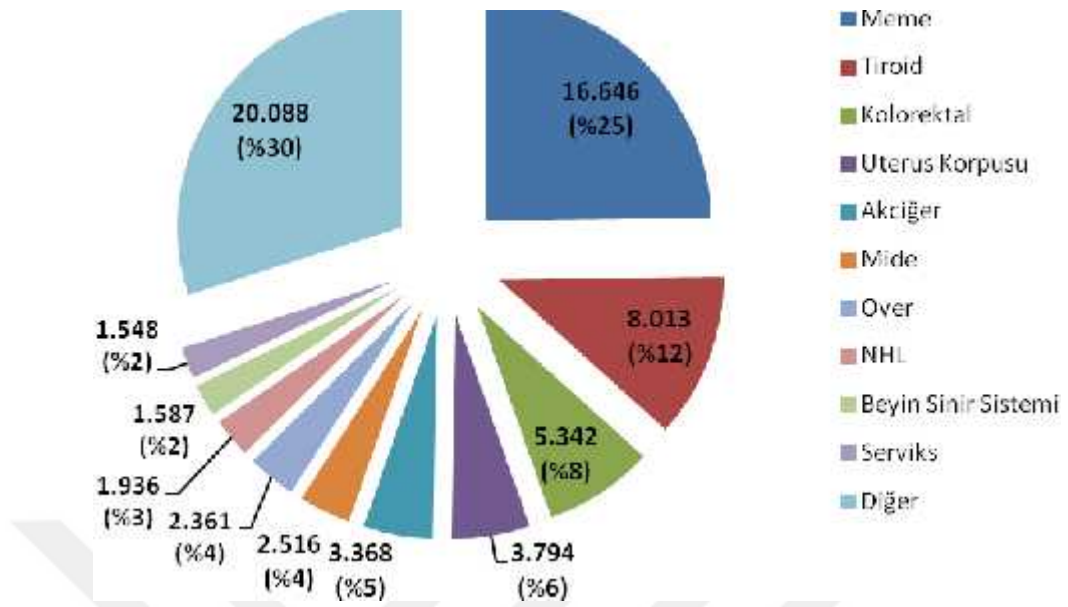
Dünya nüfusunun devam eden artışı ve yaşlanması kanser yükü üzerinde de büyük değişimlere yol açacaktır. 2030'a gelindiğinde 27 milyon kanser vakası, kanserden kaynaklanan yılda 17 milyon ölüm ve son beş yıl içinde kanser tanısı konmuş 75 milyon kişinin rakamlarına ulaşacağı kestirilmektedir. Her iki cinsiyet için tahmini ve öngörülen tüm kanser vaka ve ölüm sayıları Çizelge 1'de verilmiştir [8].

Çizelge 1.1. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) bölgesi veya gelişmişlik düzeyine göre her iki cinsiyet için tahmini ve öngörülen tüm kanser vaka ve ölüm sayıları (milyon cinsinden) [9]

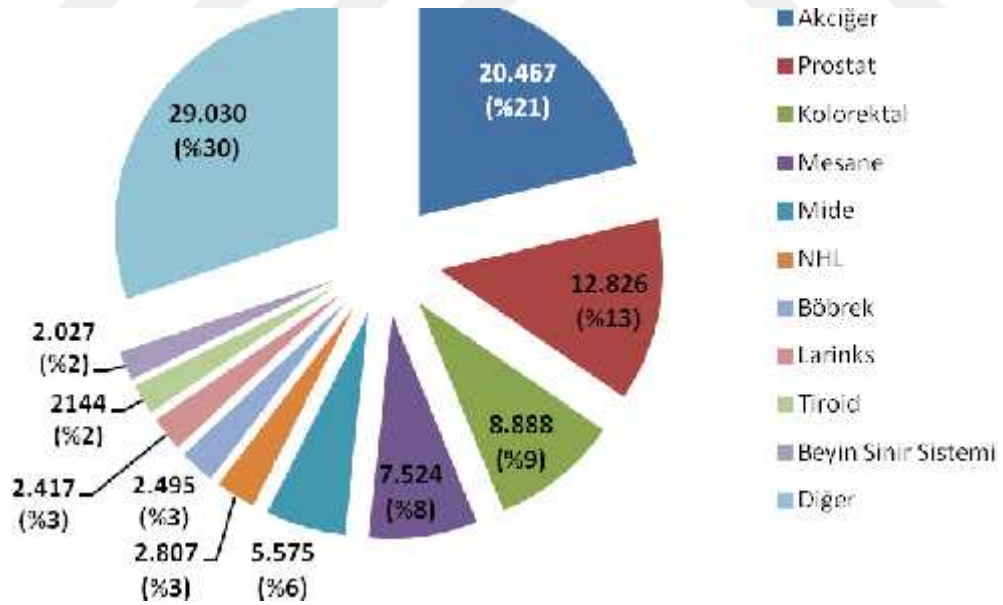
Bölge	2008		2030*		2030**	
	Vakalar	Ölümler	Vakalar	Ölümler	Vakalar	Ölümler
Dünya	12,4	7,6	20,0	12,9	26,4	17,0
Afrika	0,7	0,5	1,2	0,9	1,6	1,3
Avrupa	3,4	1,8	4,1	2,6	5,5	3,4
Doğu Akdeniz	0,5	0,3	0,9	0,6	1,2	0,9
Pan Amerika	2,6	1,3	4,8	2,3	6,4	3,1
Asya	1,6	1,1	2,8	1,9	3,7	2,6
Batı Pasifik	3,7	2,6	6,1	4,4	8,1	5,9

*: 2008'deki oranlarda bir değişim olmazsa; **: Yıllık % 1'lik oran artışı olursa.

Türkiye'de ise erkeklerde akciğer, mesane ve mide kanserleri, kadınlarda ise meme kanseri ve kolorektal kanserler daha sıklıkla izlenmektedir. Türkiye İstatistik Yıllığı 2015 verilerine göre, cinsiyete göre toplam kanser insidansı 2009 yılında; yüz bin nüfusta kadınlarda 173 iken, erkeklerde 270'dir [9]. Kadınlarda ve erkeklere en sık görülen kanserlerin toplam sayısı ve yüzde dağılımları Ekil 1.1 ve Ekil 1.2'de verilmiştir [9].



ekil 1.1. Kadınlarda En Sık Görülen Kanserlerin Toplam Sayısı ve Yüzde Dağılımları [9].



ekil 1.2. Erkeklerde En Sık Görülen Kanserlerin Toplam Sayısı ve Yüzde Dağılımları [9].

1.2. Mide Tümörleri ve sınıflandırılması

Mide tümörleri malign ya da benign ve bunlar histopatolojik özelliklerine göre sınıflanabilir (Çizelge 2) [10]. Mide malign tümörlerinin yaklaşık %90 kadarı adenokarsinomlardır. Non-Hodgkin lenfomalar ve leiomyosarkomlar geri kalan %10'luk dilimi oluşturur [11,12].

Çizelge 1.2. Mide Tümörleri [10]

EP TELYAL TÜMÖRLER	EP TELYAL OLMAYAN TÜMÖRLER
intraepitelyal Neoplazi-Adenom	Leiomyom
Karsinom	Schwannom
Adenokarsinom gastrointestinal tip, Diffüz tip	Granüler hücreli tümör
Papiller adenokarsinom	Leiomyosarkom
Tubuler adenokarsinom	Glomus tümör
Müsinöz adenokarsinom	Gastrointestinal stromal tümör
Taşıyıcı hücreli karsinom	Kaposi sarkom
Adenoskuamöz karsinom	Dilleri
Skvamöz hücreli karsinom	Malign lenfomalar:
Küçük hücreli karsinom	Marjinal zon B hücreli lenfoma
İnfiltratif karsinom	Mantle hücreli lenfoma
Karsinoid tümör (iyi diferansiye endokrin neoplazm)	Diffüz büyük B hücreli lenfoma

1.2.1. Adenokarsinomlar

Lauren sınıflamasına göre Adenokarsinomlar histolojik olarak 2 gruba ayrılır: 1- intestinal tip (diferansiyasyon): gland benzeri tubüler yapılar oluşturan, kohezyiv neoplastik hücrelerden oluşur ve genellikle ülser meydana getirir. 2-diffüz tip (indiferansiyasyon): hücre kohezyonu yoktur, mide duvarı belirgin bir kitle oluşturur ve kalınlaşır [11, 12]. Mide kanserlerini intestinal ve diffüz olarak sınıflamak epidemiyoloji, etiyoloji, patogenez ve klinik davranış bakımından farklılıklar göstermesi açısından önemlidir. Bu sınıflama aynı zamanda cerrahi yöntemi de etkiler, özellikle tümörün rezeksiyonu gerektiğinde cerrahi sınırlarda güvenlik sınırını belirlemek için gereklidir [12]. intestinal tip erkeklerde ve daha yaşlı gruplarda daha sıklıkla görülürken, diffüz karsinomlar ise genç yaş gruplarında daha sıklıkla görülür. Kadın ve erkekte görülme oranı eşittir [11].

1.3. Mide Adenokarsinomunun Mikroskopik Özellikleri

1.3.1. Epitelyal Elemanlar ve düzeyleri

Mide adenokarsinomları tabii yüzük hücreli karsinom hariç olmak üzere yapısal olarak iyi, orta ve az differansiyasyon olmak üzere üç gruba ayrılır. Tümörün differansiyasyon derecesi bez yapılarını taklit edebilme derecesi ile orantılıdır. İyi differansiyasyonlu tümörler büyük ölçüde bez yapıları içerir. Orta derecede differansiyasyonlu tümörlerde düzensiz bezler ve kribriiform yapılar bulunur. Az differansiyasyonlu tümörler, çok az miktarda bez benzeri yapı oluştururlar da daha çok tümör kordonları veya tek hücre infiltrasyonları meydana getirir. Differansiyasyon kötüleştiğinde atipik mitoz oranı artmaktadır [13].

1.3.2. Stromal Durumlar

Mide adenokarsinomlarında dört farklı stromal durum görülür. Bunlar; desmoplazi, stromal eozinofili, lenfositik infiltrat ve granümatöz yanıttır [13].

1.4. Mide Kanseri Etyolojisi ve Patogenez

Mide kanseri farklı epidemiyolojik ve prognostik özellikler gösteren iki ayrı patolojik duruma ayrılmaktadır. Intestinal tip adı verilen ilk durum, primer olarak midenin distal bölümünü tutan ve intestinal bezlere benzeyen tübüler yapılardan oluşur ve kitlesel tümörlerle kendini gösterir. Epidemiyolojik olarak intestinal tip kanser, çevresel ve diyetel faktörlerle belirgin şekilde ilişkilidir. Bu tip, mide kanseri yönünden yüksek riskli bölgelerde görülen başlıca mide kanseri türü olup, progresif multifokal atrofik gastrit ve intestinal metaplazi süreçlerinden geçerek ortaya çıkmaktadır. Yaşlı bireylerde ve sosyoekonomik düzeyi düşük populasyonlarda daha sıklıkla görülür. Erkek/kadın oranı 2/1'dir [14,15]. Diffüz tip kanser ise glandüler ya da düktüler yapıolu turmaksızın birbirlerinden ayrı duran, çoklu üsümsüze maligen hücre tabakalarından oluşur. Diffüz tip kanser, intestinal tipin tersine midenin proksimalinde yerleşimi göstermektedir [14]. Bu tip dünyanın hemen her yerinde aynı sıklıkta bulunup, çevresel faktörlerden belirgin bir etkilenme gözlenmeyen aile içi bir dağılım göstermektedir. Intestinal tipe göre daha genç yaşta ortaya çıkan diffüz tip kanserde yaş ortalaması 48 olarak tanımlanmıştır [16]. Kadınlarla erkekler arasında bu tip kansere yakalanma oranı birbirine yakın olup kadınlarda hafifçe daha sıklıkla görülmektedir.

1.4.1. Cinsiyet, Yaş ve Lokalizasyon

Mide kanseri, 50–70 yaşları arasında sık görülmeyle beraber gençlerde ve orta yaşlı erişkinlerde de görülebilir [17]. Mide kanseri insidansı ve ölüm hızı yaşla birlikte artar. Genç ve orta yaşlı erişkinlerde, erkek/kadın oranı yaklaşık 1 veya daha az iken, bu oran 60 yaşında 2,5 ve daha fazladır [18,19]. Bu oran yaş ilerledikçe tekrar düşer. Hastalık çocukluk ve ergen çağında çok nadirdir [20].

1.4.2. Genetik

Mide kanser riski, kan grubu A olan kişilerde diğer kan gruplarına sahip kişilere göre daha yüksektir. Bu durum özellikle diffüz tip için geçerlidir [21].

1.4.3. Sosyoekonomik durum

Midede kanser gelişme riski, düşük sosyoekonomik ülkelerde gelişmiş ülkelere göre yaklaşık iki katı daha fazladır [11].

1.4.4. Diyet

Beslenme ile mide kanseri arasında direkt ve önemli bir ilişki vardır. Bazı gıda piirme ve saklama yöntemleri mide karsinomun yüksek riski ile yakından ilişkilidir. Soğutmanın olmaması; korunmuş, tütülenmiş, konserve ve tuzlanmış gıdaların bol tüketimi gastrik kanser riskini artırır. Aynı şekilde gıdalarla fazla nitrat alımı ve taze meyve- sebzelerin yokluğu kanser riskini arttırmaktadır. Tam aksine yeşil, lifli sebzelerin alımı ve vitamin C, vitamin E, beta karoten ve selenyum içeren turuncgillerin tüketiminin antioksidan özelliklerinden dolayı gastrik kanser riskini azalttı ifade edilmektedir [11, 22].

1.4.5. Sigara Kullanımı

Sigara kullanımı ile ilgili veriler çelişkilidir. Bazı araştırmacılar sigaranın mide kanserini arttırdığını ve bunun doza bağlı olduğunu belirtirken, bazı araştırmacılar ise dozla ilgisi olmadığını ifade etmişlerdir. Yine bazı araştırmacılar da sigara ile mide kanseri arasında ilişki olmadığını ifade etmektedirler [11].

1.4.6. Meslek

Mide karsinomu insidensi bazı meslek ve i kollarında fazladır. Bu i kolları metal endüstrisi, boya, maden, kömür, tekstil, seramik, kimya, lastik ve petrol sanayisi gibi i lerde çalı an i çilerin mideleri, asbest, poliaromatik hidrokarbon ve nitroz komponentleri gibi kanserojenlere maruz kalmakta ve kanserojenler etkisi ile bu ki ilerinin midelerinde kanser geli mektedir [23].

1.4.7. Radyasyon

Radyasyonun mide kanseri olu turma etkisi oldu u dü ünülmektedir. Hodgkin hastalı ı nedeniyle radyoterapi alan çocuklarda 12-14 yıl sonra mide kanseri geli mi tir [24].

1.4.8. *Helicobacter pylori* gastriti

*Helicobacter pylori*nin özellikle intestinal tip mide kanseri geli iminde karsinojen bir bakteri oldu unu kabul edilmi tir [25]. *H. pylori* ta ıyanlarda mide kanseri 3-6 misli daha fazla olmaktadır. *H. pylori* gastrik asit salgılanmasını arttırarak gastrit ve ülsere neden olan bir bakteridir. Sonuçta hücre DNA'sında genomik hasar meydana gelmekte ve zamanla mide kanseri geli mektedir [26].

1.4.9. Toksik Maddelerin Metabolizması

Kentle me ve hızlı endrüstrile me ile insan ve di er canlılar her geçen gün artan sayıda “ksenobiyotik” adı verilen birçok kimyasal maddeye maruz kalmaktadırlar. Ksenobiyotiklerin ço u lipofiliktir ve kolaylıkla bulundu u ortamda absorbe edilirler. Çe itli yollarla organizmaya giren lipofilik kimyasal maddeler (kemoterapatik ilaçlar, çevresel karsinojenler ve endojen moleküller v.b.) enzimlerin katalitik etkisi ile kimyasal reaksiyonlara girer ve daha polar ve hidrofilik

metabolitlere dönü türülürler. Bir ksenobiyoti in canlı organizmada u radı ı bu kimyasal de i imlerin tümüne biyotransformasyon denir. Biyotransformasyon sonucu olu an ürünler safra ve böbreklerden daha kolay atılır. Ksenobiyotikler, biyotransformasyon ile de i ik etki gösteren metabolitlere dönü ür ve sonra da konjugasyon reaksiyonları ile inaktif hale gelerek vücuttan atılır. Genel olarak ksenobiyotik veya metabolitlerinin bu son mekanizma ile biyotransformasyonları sonucu toksisitesi azalıyor veya ortadan kalkıyorsa bu olaya “detoksifikasyon” denir; bazı durumlarda ise kimyasal maddenin biyotransformasyonu ile çok aktif ara metabolitler olu abilir. Bu reaktif ara ürünlerin olu masına “toksikasyon (toksik maddelerin etkisini arttırması)” veya “biyoaktivasyon” denir. Daha polar metabolitlerin olu masını sa ladı ından ksenobiyotiklerin organizmadan uzakla tırılması önem arz etmektedir [27].

Ksenobiyotiklerin metabolizması iki fazlı bir i lemdir: Faz I reaksiyonları daha çok karaci erde, mikrozomal enzimler tarafından katalizlenir. Az sayıda olmakla birlikte böbrek, akci er, ba ırsak, testis, deri, plasenta, adrenal bezde de Faz I reaksiyonu gerçeikle ebilir. Faz I reaksiyonu ile lipitte çözünen ksenobiyotikler daha polar hale geçerler [28].

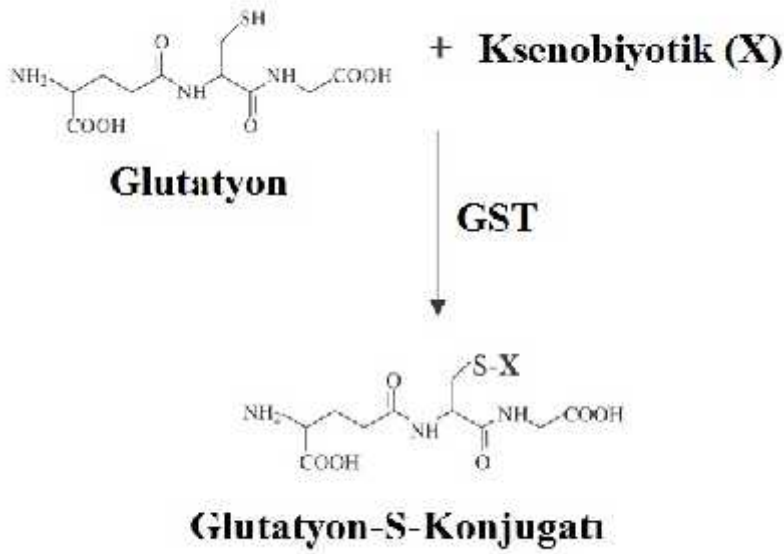
Faz II reaksiyonları ise birçok sitozolik enzim tarafından yürütülen konjugasyon reaksiyonlarıdır. Faz II reaksiyonları ile ili kili en az 5 tip reaksiyon vardır. Bunlar; glukuronik asitle konjugasyon, sülfat konjugasyonu, glutatyon ile konjugasyon, asetilasyon ve metilasyondur. Birinci fazda olu an polar metabolitler, ikinci faz reaksiyonları ile glukronik asit, glutatyon, sülfat gibi endojen maddelerle konjugasyona u rayıp vücuttan atılırlar. Birinci fazda olu an polar metabolitler, endojen maddelerle birle erek inaktif ekilde eliminasyona u rlarlar [27, 29].

1.4.10. Glutatyon-S-Transferaz

Glutatyon; hücrenin radyasyon, oksijen radikalleri, endojen toksinler ve ksenobiyotiklerin zararlı etkilerinden korunmasında önemli rol oynar. Tüm memeli

hücrelerinde bulunan Glutasyon bir disülfid grubuna sahiptir ve bu serbest disülfid grubu aracılığı ile oksidan molekülleri indirgeyerek, protein, lipid ve DNA'yı oksidasyondan korur [30]. Glutasyon ile Faz I enzimlerince oluşturulan reaktif türler konjugasyona girer ve sonuçta hücre makromolekülleri (DNA, RNA, protein) ile bağlanması engellenerek hücre hasarı önlenir [31]. GSH Peroksidaz tarafından katalizlenen bu reaksiyonla UV ve çeşitli kimyasallar aracılığı ile oluşan hidroperoksitler indirgenirken, glutasyon oksitlenir (GSSG). GSH'nin fonksiyonunun sürekliliği okside glutasyonun rejenerasyonuna bağlıdır. GSSG, GSH- Redüktaz tarafından katalizlenen ve kofakör olarak nikotinamid adenin dinükleotid fosfatın (NADPH) kullanıldığı reaksiyonla indirgenerek yeniden aktif hale geçer [32]. Glutasyon genelde GSH olarak kısaltılır; SH, sistenin sülfidril grubuna işaret eder ve molekülün alıverişi yapan kısmıdır. Glutasyon ile ksenobiyotiklerin reaksiyonlarını katalizleyen enzimlere "Glutasyon-S-Transferazlar", kısaca "GST" denir [33].

GST; kemoterapik ajanların, reaktif oksijen moleküllerinin ve çevresel karsinojenleri içeren ksenobiyotiklerin metabolizmasından sorumlu Faz II detoksifikasyon enzim ailesidir. GST, çeşitli elektrofilik bileşikler ile glutasyon arasındaki reaksiyonları katalizler. GST aktif metabolitlerin glutasyon ile konjugasyonunu gerçekleştirerek DNA'yı alkilasyondan korur. Glutasyon-s-transferazlar elektrofilik ksenobiyotikleri inaktive ederek vücuttan atılmak üzere konjugasyonunu sağlayan dimerik enzimlerdir. Glutasyon nükleofilik sülfidril grubu ile bileşiklere bağlanarak organizmayı reaktif kimyasal bileşiklere karşı korur [34]. Çoğu dokularda mevcut olan tripeptid yapısındaki glutasyon ksenobiyotiklere bağlandıktan sonra daha ileri bir biyotransformasyonla karaciğer ve böbreklerde bulunan mikrozomal - glutamiltranspeptidaz ve sisteinilglisinaz enzimleri yardımı ile peptid bağları açılır. Peptid (amid) bağlarının hidrolizi sonucu sadece sistein kalır, sistenin mikrozomal asetilasyonu ile merkaptürik asit konjugatı oluşturur [35]. Bu reaksiyon ekil 1.3.'de gösterilmiştir.



ekil 1. 3. GST enzimlerinin katalizledi i ksenobiyotik metabolizması [35]

1.4.11. Glutatyon -S- Transferazların Sınıflandırılması

GST enzimleri birçok alt sınıflara ayrılmı tır. Her bir sınıf birçok gen ve enzimden olu ur. GST enzimlerinin büyük bir kısmı hücrenin sitoplazmasında çözünmü olarak bulunur [36]. Bir kısmı ise endoplazmik retikulum (mikrozomal) lokalize olmu tur. Sitozolik GST aktivitesinin mikrozomal aktiviteye göre 5 ile 40 kat daha fazla oldu u saptanmı tır [27].

nsan sitozolik GST enzimleri substrat spesifikliklerine, immünolojik özelliklerine, izoelektrik noktalarına ve aminoasit dizilerinin benzerliklerine göre sınıflandırılmı lardır [36]. Yapılan sınıflandırmaya göre GST'ler mü (GST μ , GSTM), alfa (GST , GSTA), pi (GST , GSTP), teta (GST , GSTT), kappa (GST κ , GSTK), zeta (GSTZ), sigma (GST , GSTS) ve omega (GST , GSTO) olmak üzere sekiz sınıfa ayrılmı tır [36].

1.4.11.1. Mü Sınıfı Glutasyon S-Transferazlar

GSTM gen ailesi, 1981'de Board tarafından karaciğer ve eritrositlerden tanımlanmıştır [37]. GSTM gen ailesi, 1. kromozom (1p13.3) üzerinde 20 kb uzunluğunda ve 5 tane gen bölgesinden meydana gelmektedir. GSTM gen ailesi, 5'-GSTM4-GSTM2-GSTM1-GSTM5-GSTM3-3' şeklinde oluşur [38].

GSTM1 izoenzimleri baskın olarak karaciğerde, az miktarda ise akciğerde ekspresyon edilir; GSTM3 akciğer dokusundaki önemli bir izoenzimdir [39]. Ekspresyonları dokular arasında değişim gösterir. En yaygın ekspresyon edilen GSTM1'dir ve kemik, kalp, beyin, böbrek, over, akciğer, paratiroid ve uterus gibi organlarda bulunur. GSTM2 daha çok iskelet kasında, GSTM3 ise kaslara ilave olarak akciğer, beyin ve testiste bulunur. GSTM4 insan lenfoblastoid hücrelerinde, GSTM5 ise beyinde ekspresyon edilir [40,41].

1.4.11.2. Zeta Sınıfı Glutasyon S-Transferazlar

GSTZ gen ailesi Board ve ark. tarafından 1997'de bitkilerden insanlara kadar uzanan geni bir alanda tanımlanmıştır [42]. GSTZ sınıf genleri 14. kromozom (14q24.3) üzerindedir. GSTZ 10.9 kb geniştir ve 9 eksona sahiptir [43]. Ayrıca maleylasetoasetat izomeraz olarak da bilinen insan GSTZ1'i, tirozin metabolizmasının son bir önceki adımı olan glutasyon bağlı maleylasetoasetat'ın fumarilasetoasetat'a izomerizasyonunu katalizler [43].

GSTZ1 ayrıca dikloroasetik asit içeren alfa haloasitlerin çoğunluğunun biyolojik transformasyonlarını da katalizlemektedir [44, 45]. GSTZ1'in başta karaciğer olmak üzere beyin ve iskelet kasında ekspresyonları tespit edilmiştir [42].

1.4.12. Kemoterapide İlaç Direnci ve Glutasyon-S-Transferaz ile İlişkisi

Tümör hücrelerine anti-kanserojenin girmesiyle birlikte hücre içinde Glutasyon düzeyinde ve GST enziminin ifadesinde artış olmaktadır [46]. GSH hücre içinde en bol bulunan protein yapısında olmayan ve tiyol grubu içeren bir tripeptiddir [33]. Bu bileşik GST enziminin substratı olarak görev yapmaktadır. Enzim, GSH yardımıyla ksenobiyotiklerin protein yapısındaki çözümlenmesi için pompalar yardımıyla dışarı atılmasına neden olmaktadır. Artan GST aktivitesi ile birlikte ilacın hücre içinde uzun süre kalması bu nedenle zorlanmaktadır. GST enzimi ile birlikte bu dışarı pompalama proteinlerinin [MultiDrug Resistance Proteins (MRPs)] ifadesinde de artış gözlenmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, tümör hücrelerinde GSH'nin yüksek düzeylere ulaşmasının ve GST'nin artışı ekspresyonunun MRP gelişimi ile paralel geliştiği yönündedir [47, 48]. Çoklu ilaç direnci proteini ailesi olan ve ksenobiyotiklerin taşınmasında görevli ATP-bağımlı taşıyıcı protein, ABC proteinleri (ATP Binding Cassette Super family Transporters), P-glikoprotein (Pgp), çoklu-ilaç direnci ilişkili protein 1 (MRP1 veya ABCC1), gibi proteinlerdir ve büyük bir kısmının MRP fenotipine sahip oldukları saptanmıştır [49]. MRPs GSH ve GSH konjugantlarının transportuyla onkolojik ajanların hücreden atılmalarına aracılık etmektedir [50]. MRPs ve insan GSTs arasındaki sinerjizmi gösteren literatürde birçok örnek mevcuttur [46,51].

1.4.13. p53 ve mide kanseri

17. kromozomun p kolunda yerleşen p53 tümör supresör geni (17p13.1), 53 Kd ağırlığında 393 aminoasitlik bir nükleer fosfoproteini kodlar [52]. p53 tümör supresör geni kanser araştırmalarında çok sayıda incelenmiştir. Gastrik hücre dizileri ve erken gastrik kanserlerde olduğu gibi ilerlemiş gastrik kanserlerde de kromozom 17p üzerinde heterozigosite kaybı (LOH) ve p53 gen mutasyonu sıklıkla gözlenmektedir. Yapılan çalışmalarla p53 genindeki değişikliklerin gastrik karsinogenezin erken evresinde gözlemlendiği ortaya çıkarılmıştır [53]. Kromozom 17p'deki LOH'un gastrik karsinomada yaygın olduğu ve % 60 oranında erken evrede

ortaya çıktı ı önceden yapılan birçok çalı mada ifade edilmi tir. laveten, p53 geninde allel kaybı olan ço u tümörün aynı lokusunda bulunan di er p53 allelinde nokta mutasyonları tespit edilmi tir [54]. Mide karsinomunda p53 genindeki nokta mutasyonlarının ço unlu u G veya C bazında görölmektedir ve mide karsinomunda tespit edilen p53 mutasyonlarının en sık rastlananı GC→AT transisyonudur [55]. Mide karsinomunda p53 mutasyonlarının spektrumu kanserin moleküler patogenezi ve etiyojisi hakkında ipuçları sa lar. p53 anormalilerinin belirlenmesi diagnostik, prognostik ve terapötik imkânlar sa layabilir [52].

1.4.14. Çalı manın Amacı

GST izozimleri ve P53'ün mide kanserinde önemli oldu u görölmektedir. Bu tez çalı masında kimyasalların vücuttan elimine edilmesinde büyük ölçüde rolü olan II. Faz Reaksiyonlarından Glutatyon S-Transferaz enziminin sitozolik GSTZ1, GSTM1 ve p53'ün immunohistokimyasal yöntemle mide kanserinde protein ekspresyonlarına bakılmı tir. Elde edilen sonuçların ya , cinsiyet, tümör grade arasındaki istatistiksel ili kilerinin ara tırılması amaçlanmaktadır. Ayrıca bulgularımız klinik parametrelerle olan ili kilere bakılarak hastalı ın gidi atı hakkında kullanılabilirli i de erlendirilecektir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Materyal Temini ve Hazırlanması

Çalışma kapsamında Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu tarafından alınan etik kurul onayı doğrultusunda, yine Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesinden Patoloji servisinden alınan 32 mide kanserli ve normal perifer dokularda araştırıldıkları yöntemlere göre immunohistokimyasal analizler yapılmıştır. Tüm hastaların yaşı, cinsiyet, tümör evre ve dereceleri kaydedilmiştir. Buna göre hastaların 10'u kadın, 22'si erkektir ve yaş ortalaması $67,8 \pm 10,9$ 'dir. Hastalara ait bazı klinik parametreler Çizelge 2.1'de verilmiştir. Bu verilere göre önce dokular GSTZ1, GSTM1 ve p53 antikolları ile ayrı ayrı immunohistokimyasal yöntemle boyanmıştır ve sonuçlar kaydedilmiştir.

Çizelge 2.1. Hastalara ait klinik parametreler

PARAMETRE		MİDE ADENOKARSINOMU	
		N	%
		32	100
TÜMÖR	AZ DERİNLİKTE	12	37,5
	ORTA DERİNLİKTE	10	31,25
	YÜZELERİNDEN	10	31,25
YAŞ		67,8±10,9	
CİNSİYET	KADIN	10	31,25
	ERKEK	22	68,75
TÜMÖR GRADE	I	10	31,25
	II	10	31,25
	III	12	37,5

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Primer Antikor (GSTZ1, GSTM1, p53)
- 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)

2.1.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

I. H₂O₂ Blokajı Çözeltisi Hazırlanması: 30 ml %30' luk H₂O₂ üzerine 470 ml metanol ilâve edilerek hazırlandı.

II. Antijen Retrieval Çözeltisinin Hazırlanması (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 Hazırlanması: 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.)

2.1.3. Kullanılan Cihazlar

- Etüv
- -20°C'lık derin dondurucu ve buzdolabı
- pH-metre
- Vortex
- Düdüklü tencere
- Isıtıcı
- Hassas terazi
- I ışık mikroskobu
- Foto raf makinesi

2.2. Kullanılan Metot

2.2.1. İmmünohistokimya Yöntemi

I. Basamak, Dokuların Deparafinizasyonu

- 1) Etüvde 70°C'da 1 saat bekletildi.
- 2) Isınmış ksilolde yarım saat bekletildi.
- 3) Etüvden çıkarıldıktan sonra soğuma işlemi için oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
- 4) %90'lık alkolde 1 dakika
- 5) %70'lik alkolde 1 dakika
- 6) %50'lik alkolde 1 dakika
- 7) Distile suda 1-2 dakika bekletildi.

II. Basamak

- 1) H₂O₂ blokajı ile endojen peroksidaz aktivasyonunun inhibisyonu için solusyonda 10 dakika bekletildi.
- 2) Çe me suyunda 5 dakika bekletildi.
- 3) Antijen Retrieval Solusyonu içinde düdüklü tencerede 3 dakika kaynatıldı.
- 4) Non spesifik boyanma inhibisyonu için "Protein Block Solution" 10 dakika uygulandı.
- 5) Primer antikor uygulandı (60 dakika)
- 6) TBS ile 3 defa yıkama yapıldı ve her yıkama 5 dakika bekletildi.
- 7) Sekonder antikor uygulandı (15 dakika)
- 8) TBS ile yıkandı (3x5 dakika)
- 9) Streptavidin-peroksidaz kompleksi uygulandı (20 dakika)
- 10) TBS ile yıkandı (3x5 dakika)
- 11) 10 dakika DAB uygulandı.
- 12) 1 dakika distile suda bekletildi.

III. Basamak: Hematoksilen Boyaması

- 1) Hematoksilende 1 dakika
- 2) Distile suda 1 dakika
- 3) %50'lik alkolde 1 dakika
- 4) %70'lik alkolde 1 dakika
- 5) %90'lık alkolde 1 dakika
- 6) Absolü alkol-ksilolde 1 dakika
- 7) Ksilolde 10 dakika

Poly-L-lysin kaplı lamlara alınan doku kesitleri deparafinizasyon i leminden sonra immunohistokimya (IHC) yöntemi ile GSTZ1 (1:500), GSTM1 (1:100) ve

p53 (1:300) antikoru bölüm 2.2.1.'de ayrıntılı olarak açıklanan şekilde göre boyandı. IHC uygulanan preparatlar ışık mikroskopunda boyanma şiddetine bakılarak değerlendirme yapıldı ve foto rafları çekildi. Değerlendirme boyanma şiddeti için; boyanma olmaması durumu (0), hafif boyanma (+1), orta şiddette boyanma (+2), şiddetli boyanma (+3) şeklinde de değerlendirme yapıldı.



3. ARA TIRMA BULGULARI

3.1. GST izozimleri ve p53'ün Mide Kanserindeki Normal ve Tümörlü Dokularda Protein fadelerinin Sonuçları

3.1.1. GSTM1 zozimlerinin Mide Kanserindeki Normal ve Tümörlü Dokulardaki fadesi

Mide Adenokanserli dokularda GSTM1 izozimlerinin ekspresyonlarının immünohistokimya sonuçlarına baktığımızda; GSTM1 izoziminin metastatik dokularda 17 hastada (%53), normal dokularda 7 hastada (%21) protein ifadesinin olduğu ve metastatik dokularda normal dokulara oranla fazla ekspresyonun (yaklaşık 2,52 kat) gerçekleştiği görüldü (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. GSTM1 zozimlerinin Mide Kanserindeki Normal ve Tümörlü Dokulardaki fadesi

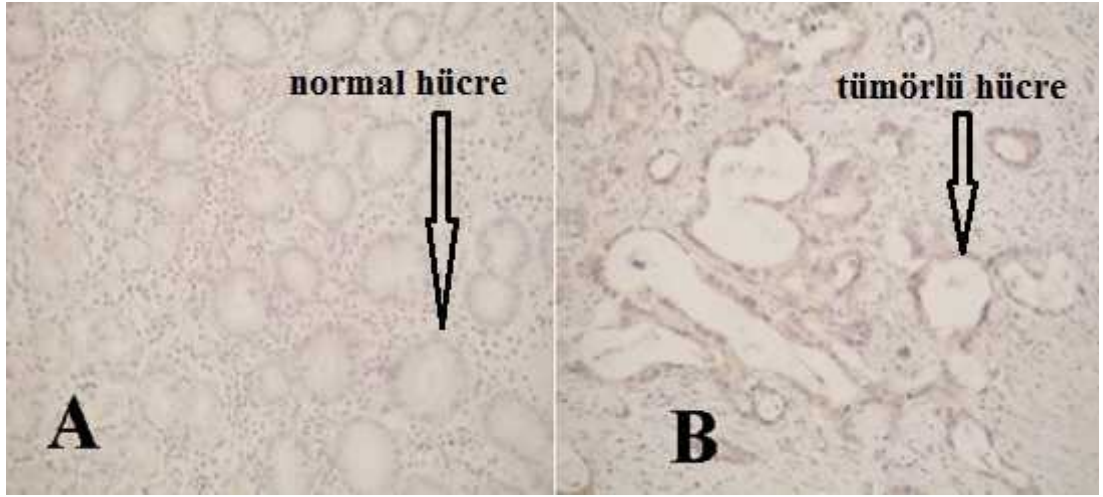
Doku Tipi	GSTM1
Tümör (n=32)	0,53±0,10 ^a (0-2) ^b
Normal (n=32)	0,21±0,07 (0-1)
T/N* P value**	2,52 0,0484

Boyanma skorları, aynı hastalara ait normal mide adenokarsinomlu ve normal hücrelerin boyanma şiddetine göre hesaplanmıştır. Buna göre 0; protein ifadesi görülmeyen, 1; hafif şiddette protein ifadesi, 2; orta şiddette protein ifadesi ve 3; şiddetli protein ifadesi şeklinde derecelendirilmiştir. Normal ve Tümörlü dokular arasındaki protein ifadelerin farklılıkları Mann-Whitney U Test ile %95'lik güvenilirlik düzeyinde incelenmiştir.

** P değeri 0,05' den küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmektedir.

*: Tümörlü / Normal oranı

a: ortalama değer±standart hata, b: minimum ve maksimum boyanma şiddeti



ekil 3.1. Mide normal dokuları ve mide adenokarsinomlu dokularda immunohistokimyasal GSTM1 proteini (A: Mide normal dokuda +1 iddetinde GSTM1 proteinin ifadesi, 200X, B: Mide Adenokarsinomlu dokuda +2 iddetinde GSTM1 protein ifadesi 200X,)

3.1.2. GSTZ1 zozimlerinin Mide Kanserindeki Normal ve Tümörlü Dokulardaki fadesi

Mide Adenokanserli dokularda GSTZ1 izozimlerinin ekspresyonlarının immünohistokimya sonuçlarına baktı ımızda; GSTZ1 izoziminin metastatik dokularda %1.56, normal dokularda ise %1.21 oranında protein ifadesinin oldu u ve metastatik dokularda normal dokulara oranla çok az miktarda fazla ekspresyonun gerçeikle ti i görüldü (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. GSTZ1 zozimlerinin Mide Kanserindeki Normal ve Tümörlü Dokulardaki fadesi

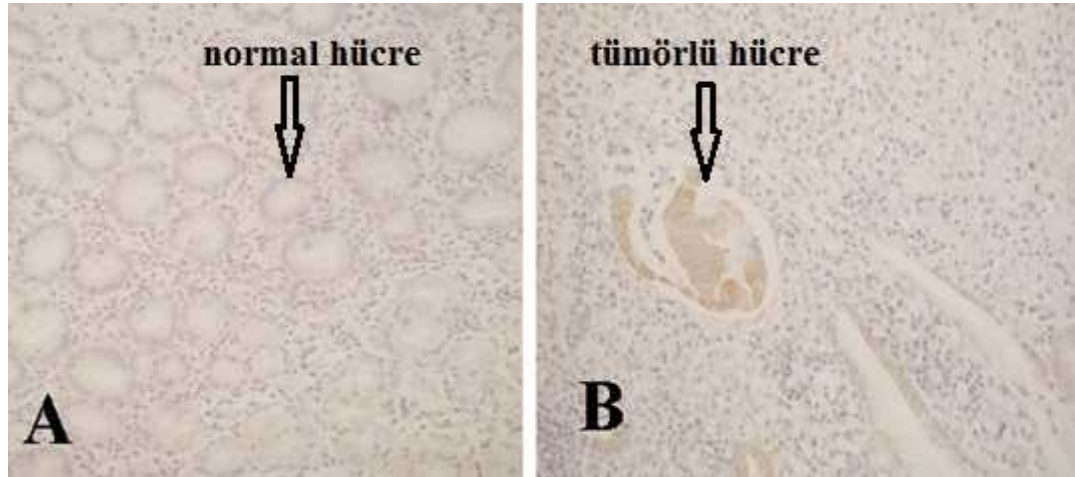
Doku Tipi	GSTZ1
Tümör (n=32)	1,56±0,18 (0-3)
Normal (n=32)	1,21±0,08 (0-2)
T/N* P value**	1,28 0,1014

Boyanma skorları, aynı hastalara ait normal mide adenokarsinomlu ve normal hücrelerin boyanma iddetine göre hesaplanmıştır. Buna göre 0; protein ifadesi görülmeyen, 1; hafif iddette protein ifadesi, 2; orta iddette protein ifadesi ve 3; iddetli protein ifadesi ekinde derecelendirilmiştir. Normal ve Tümörlü dokular arasındaki protein ifadelerin farklılıkları Mann-Whitney U Test ile %95'lik güvenilirlik düzeyinde incelenmiştir.

** P değeri 0,05'den küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmektedir.

*: Tümörlü / Normal oranı,

a: ortalama değer±standart hata, b: minimum ve maksimum boyanma iddeti



ekil 3.2. Mide normal dokuları ve mide adenokarsinomlu dokularda immunohistokimyasal GSTZ1 proteini (A: Mide normal dokuda +2 iddetinde GSTZ1 proteinin ifadesi, 200X, B: Mide Adenokarsinomlu dokuda +3 iddetinde GSTZ1 protein ifadesi 200X,)

3.1.3. p53'ün Mide Kanserinde Normal ve Tümörlü Dokulardaki İfadesi

Mide Adenokanserli dokularda p53 ekspresyonlarının immünohistokimya sonuçlarına baktığımızda; p53'ün metastatik dokularda %1.81, normal dokularda ise % 0.43 oranında protein ifadesinin olduğu ve metastatik dokularda normal dokulara oranla fazla miktarda ekspresyonun gerçekleştiği görüldü (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. p53'ün Mide Kanserindeki Normal ve Tümörlü Dokulardaki İfadesi

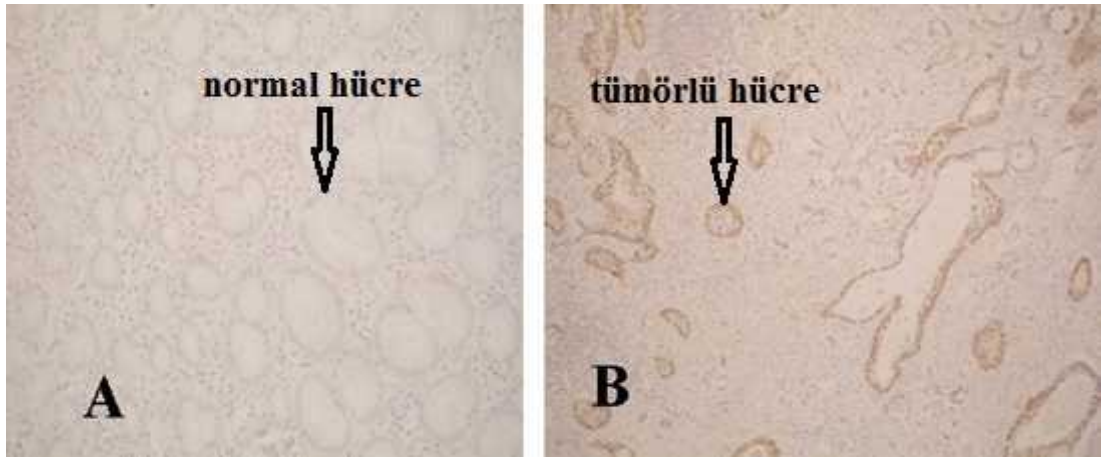
Doku Tipi	p53
Tümör (n=32)	1,81±0,17 (0-3)
Normal (n=32)	0,43±0,08 (0-1)
T/N* P value**	4,2 0,0000

Boyanma skorları, aynı hastalara ait normal mide adenokarsinomlu ve normal hücrelerin boyanma şiddetine göre hesaplanmıştır. Buna göre 0; protein ifadesi görülmeyen, 1; hafif şiddette protein ifadesi, 2; orta şiddette protein ifadesi ve 3; şiddetli protein ifadesi şeklinde derecelendirilmiştir. Normal ve Tümörlü dokular arasındaki protein ifadelerin farklılıkları Mann-Whitney U Test ile %95'lik güvenilirlik düzeyinde incelenmiştir.

** P değeri 0,05'den küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmektedir.

*: Tümörlü / Normal oranı

a: ortalama değer±standart hata, b: minimum ve maksimum boyanma şiddeti



ekil 3.3. Mide normal dokuları ve mide adenokarsinomlu dokularda immunohistokimyasal p53 proteini (A: Mide normal dokuda +1 iddetinde p53 proteinin ifadesi, 200X, B: Mide Adenokarsinomlu dokuda +3 iddetinde p53 protein ifadesi 200X,)

4. TARTI MA VE SONUÇ

Kanser, dünya genelinde ani ölümlerden sonra insan hayatını etkileyen nedenlerin başında yer almaktadır. Gelişen teknoloji ve bilimsel çalışmalarında her ne kadar bu insan hayatını olumsuz şekilde etkileyen hastalılara çareler aranıyor da henüz günümüz bilim ve teknolojisi bu konuda yetersiz kalmaktadır. Bunun başlıca sebebi; bu hastalının oluşumunda moleküler karmaşanın iyi derecede aydınlatılamıyor olmasıdır. Fiziksel, kimyasal ve biyolojik karsinojenler gibi çevresel faktörlere maruziyet ve kanser oluşumunda görevli genlerin (onkogenlerin) aktivasyonunun yanı sıra, bu genlerin inhibisyonunu sağlayan tümör suppressör genlerin inaktivasyonu gibi başlıca nedenler kanser mekanizmasında aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Tedaviye yönelik bu araştırmalar arttıkça gelinen noktada her defasında yapılan ve bulunan bir etyolojik faktör, tedaviden ziyade bu hastalının komplike yapısını aydınlatmakta ve hedefe ulaşmayı zorlaştırmaktadır. Kanser mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik çalışmalarda, özellikle moleküler düzeyde hedef genler ve proteinler üzerine yapılan çalışmalardan ziyade, hücrenin, esasında farklı seviyeler için ürettiği gen ve proteinlerinin de bu hastalının mekanizmasında görev aldığı artık bilinmektedir. Özellikle detoksifikasyon ve ilaç metabolizmasında, hücre içi immunité gibi doğrudan kanser oluşumunda görev almayan ancak yapısal bozulmalar sonucunda da kansere yol açan gen ve proteinler ile bunların metabolizması da kanser oluşum nedenleri arasında gösterilmektedir.

Mide kanseri Avrupada görülme sıklığı akciğer, prostat, kolorektal ve mesane kanseri ardından en çok görülen 5. Kanser türüdür [56]. Her yıl Avrupa'da 193 bin yeni vaka görülmektedir [57]. Bunların %23'ü malignant neoplazma alanında tespit edilmektedir [58]. Bu değerler baz alındığında mide kanserinin Avrupa'da cinsiyet odaklı oransal dağılımı erkek:kadın;1.6:1'dir [57]. Mide kanseri İngiltere'de her 5 yılda %5 artışı göstermektedir [59]. Ülkemizde her iki cinsiyet için ölüm oranında bir düşüş gözlenmektedir; ancak yeni vaka oranı cinsiyet bazında %3-5 oranında artmaktadır [60]. Dünya genelinde erkeklerde 34.1/100000 ve kadınlarda 6.1/100000 görülür. Bu oranlar Türkiye'yi de içeren Avrupa odaklı verilerde artmaktadır.

Ülkemizde ise Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Dairesi tarafından bildirilen verilere göre 2004-2006 yılları arası erkek/kadın mide kanseri olgu sayısı 2460/1318 rölatif frekans %5.9/4.8 görülme hızı %14.6/7.8 erkeklerde gastrointestinal sistem kanserleri beinci sırada gelmektedir. Kadınlarda ise gastrointestinal sistem kanserleri; meme, ürogenital sistem kanserlerinden sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Yine bu verilere göre gastrointestinal sistem kanserleri içinde mide kanserleri birinci sıradadır. Mide kanseri kanseri olumunda da diğer kanserlerde olduğu gibi karsinojen maddelerin hücre genetik materyalini mutasyona uğratması sonucu çoklu hücre defektleri görülür ve kanserli hücre olumu gerçekleşir. Diğer kanser türlerinden farklı olarak mide kanserini tetikleyen unsurlardan birisi *h.pilori*'dir. *Helicobacter pylori*, karsinojen olduğu saptanan ilk bakteri olup dünya nüfusunun yarısından fazlasında midede kolonize olan bir patojendir. Gastrit ve gastrik ülser, duodenal ülser, kanser, primer gastrik B-hücreli lenfoma (MALT lenfoma) gibi gastritle ilişkili hastalıkların en önemli nedenidir [61]. *Helicobacter pylori* suşlarının çoğu inflamasyon ve klinik ile ilişkili kesin olarak gösterilmiş bazı sitokinler salgırlar. VacA (vacuolating cytotoxin), Cag-PAI (Cytotoxin associated gene pathogenicity Island) ve IceA gibi virülansla ilgili patojenite adacıklarına sahip oldukları belirlenmiştir [61,62]. Hem duodenal ülser hem de mide kanserinde Cag+'li inin riski artırıcı faktör olduğu bilinmektedir [61,62]. *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun tedavisi ülser iyileşmesi ve gastrik kanser gelişim riskinin azalmasıyla sonuçlanmaktadır [61].

Çevresel faktörlerden başlıca özellikle çalı maya konu olan enzimlerde görülen metabolik enzim polimorfizmleri kanserlerin moleküler patogeneğinde sorumludur. Ailesel yatkınlı a neden olan genetik defektler, özellikle kanserojenlerin aktivasyonunda ve detoksifikasyonunda rol alan enzimlerden sorumlu genlerde ortaya çıkmaktadır. Bu konu ile ilgili olarak GSTM1, GSTT1 ve GSTP1 enzimlerinin gen polimorfizmlerinin incelendiği pek çok çalı ma bu durumu kanıtlamaktadır [63]. Bunların yanı sıra hücrede DNA tamir enzimlerinde görülen polimorfizmler, p53 gen mutasyonları mide kanserlerinin olumunun diğer moleküler patogenizini olumturur.

Karsinojenik etkilerden hücrenin korunmasında detoksifikasyon mekanizmalarının büyük önemi vardır. Detoksifikasyon (biotransformasyon), ksenebiyotikler (toksik maddeler, metabolitler, epoksidler) gibi zararlı maddelerin çözümlenmesi için enzim ya da moleküller yardımı ile zararsız hale getirilerek vücuttan dışarı atılımını sağlayan mekanizmalardır. Bu mekanizmalarda görev alan enzimler ya da moleküller de bu hayati süreci desteklemektedirler. Glutatyon S-Transferaz enzim ailesi, detoksifikasyon metabolizmasında, ksenebiyotiklerin zararlı etkilerini zararsız hale getirerek vücuttan eliminasyonunu sağlayan Faz II reaksiyonlarını oluşturan bir enzim sistemini oluşturur. Aynı zamanda ilaç metabolizmasında ve hücre içi oksidatif hasarın giderilmesinde önemli görevleri bulunan Faz II reaksiyonlarını katalizleyen GST enzimleri, reaktif ara ürünlerin detoksifikasyonunu sağlayarak hücrenin kanser, nekroz, doku hasarı, hücre ve DNA hasarı gibi etkilerden korunmasını sağlar.

Bu bilgiler ışığında literatürde, kanser olumunda, gerek normal hücre içi antioksan aktivite, gerek ilaç metabolizmasında ilaç dirençliliği, gerek detoksifikasyon metabolizması gibi çeşitli çalışmalarda bu enzim ailesinin rolleri açıklanmıştır. Ne yazık ki GST mu ve zeta izozimlerinin kanser olumundaki rolleri tam olarak çalışılmamıştır.

Yapılan tez çalışmasında, mide kanserinin olumunda ve gidiyatında büyük bir rol oynayan glutatyon-S-transferaz (GSTs) mu ve zeta izozimlerinin dağılımları immünohistokimya metoduyla çalışılmıştır. GSTM1 ve GSTZ1 izozimlerinin benign ve karsinom hücrelerindeki dağılımları tespit edilmiş ve kanser biyolojisindeki rolü ve klinikte kullanılması değerlendirilmiştir. Ayrıca GST mu ve zeta izozimlerinin benign ve karsinom hücrelerindeki dağılımlarıyla hastaya ait klinik parametreleri (yaş, cinsiyet, tümör evre ve derecesi) istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

2005 yılında yapılan bir çalışmada gastrik kanser ile ilgili hipermetilasyonu olan genler araştırılmıştır. hMLH1 (humanmutL homolog) MGMT, GSTP1 genlerinin hipermetilasyonu gastrik kanserli hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı oranda daha sık olarak saptanmıştır. Bu çalışmada mide kanserli hastalarda GSTP1

saptanma oranı %7'dir. Yine ilginç olarak hipermetile genlerin kadınlarda erkeklere göre daha sık olduğu saptanmıştır [64].

Lieshout ve arkadaşları 1999 yılında yaptıkları çalışmada GSTA ve GSTP izozimlerini immunohistokimyasal metotla çalıştı ve normal gastrointestinal dokusunda (epitelinde) negatif ve %75'e kadar pozitiflik, Barrett epitelinde %75 ile %100 arasında, adenocarcinoma %25 ile %100 arasında, skuamöz hücreli karsinomda %27 ile %91 arasında ekspresyon göstermiştir [65].

Ada ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları çalışmalarında GSTO1 izoziminin immunohistokimya yöntemiyle insan normal dokularda da ilimlerine bakmışlardır. Karaciğerde, makrofajlarda, glia hücrelerinde, meme miyoepitel hücrelerinde kolon nöroendokrin, hepatosit, safra, pankreas epitelinde, tiroid foliküler ve C- hücrelerinde ekspresyon olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgular GSTO1'in bu dokularda fonksiyonunun olduğunu göstermiştir [66].

Oztüzün ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları çalışmada tiroid 15 Foliküler Adenokarsinom, 16 Tiroid Papiller Karsinom (TPK) ve 27 Nodüler Hiperplazili(NH) hastanın GSTO1 ve GSTK1 protein ekspresyonlarını immunohistokimyasal olarak incelemiştir. NH'lı hastaların %81.48, FA'lı hastaların %80 ve TPK'lı hastaların %60'unda GSTO1'in eksprese olduklarını ve GSTK1 izoziminin ise NH'lı hastaların %48,14'ünde, FA'lı hastaların %60'unda ve TPK'lı hastaların %87,5'inde eksprese olduğunu göstermişlerdir. GSTO1 izoziminin TPK'lı hastaların dokularında, FA'lı hastalara oranla 1,91 ($p=0,0023<0,05$); NH'lı hastalara oranla 2,1 kat ($p=0,0003<0,05$) daha fazla eksprese olduğu; GSTK1 izoziminin TPK'lı hastaların dokularında, FA'lı hastalara oranla 2,08 ($p=0,011<0,05$); NH'lı hastalara oranla 3,73 kat ($p=0,0002<0,05$) daha fazla eksprese olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulduklarını bildirmiştir [67].

2013 yılında Moran ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada gastrointestinal kanserlerinden 40 mide adenokarsinomlu ve kolonda adenokarsinoma dokularda II. Faz enzimlerinden enzimlerinin; GSTP1 ve GSTT1 izoenzimlerinin

immunohistokimyasal yöntemle protein ekspresyonlarına bakılmıştır. Bu hastaların %77,5'inde GSTP1, %95'inde GSTT1 izozimlerinin tümörlü ve normal dokularının birinde ve ya her ikisinde eksprese olduğu gözlemlenmiştir. Tümörlü ve normal dokularda GST izozimlerinin ekspresyon farklılıkları incelenmiştir; Mide Adenokarsinomlu hastaların tümörlü dokularında normal dokularına oranla GSTP1 ve GSTT1 izozimlerinin daha fazla eksprese olduğu ($p=0,048; 0,0006<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca 47 kolon kanserli hastalarda %97,87'sinde GSTP1 ve %87,23'ünde GSTT1 izozimlerinin tümörlü ve normal dokularının birinde ve ya her ikisinde de eksprese olduğu görülmüştür. Ayrıca Kolon Adenokarsinomlu hastaların dokularında izozimlerin tamamının tümörlü dokularda normal dokulara oranla ekspresyonlarının daha fazla olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,00; 0,00<0,05$). Hasta dokularında izozimlerin ekspresyon dereceleri ile hastaların cinsiyeti arasında yapılan ilişki analizine göre kolon kanserli hastalarda GSTP1 izoziminin kadınlarda erkeklerden daha fazla eksprese olurken ($p=0,02<0,05$); GSTP1 izoziminin ekspresyonu ile hastaların sigara içim sayıları arasında pozitif yönde %37'lik düşük düzeyde ilişki olduğu görülmüştür ($p=0,011, r=0,367$) [68].

Ali-Osman ve arkadaşlarının 1997 yılında yaptığı bir çalışmada GSTP1 promotor hipermetilasyonu ve ekspresyon inaktivasyonu prostat kanseri, hepatoselüler karsinom ve mide karsinomunda saptanabilmektedir [69].

Mide kanserlerinde hipermetilasyonu saptanan genler mevcuttur ancak GSTP1 ile yapılan çalışma sayısı çok sınırlıdır. Lee ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptığı çalışmada mide kanserli hastalarda DAP-kinaz, E-kadherin, GSTP1, p15 ve p16 genlerinin promotor metilasyonu araştırılmıştır. Sırasıyla %70,3; %75,9; %18,5; %68,5; %66,7 olarak saptanmıştır. Kontrol grubunda gen metilasyonu saptanmamıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında DNA hipermetilasyonu hastaların serumunda tekrarlanmıştır, GSTP1 pozitif grubun serumda saptanma oranı %80 gibi yüksek oranda bulunmuştur. Kontrol grubu serumunda ise DNA metilasyonu saptanmamıştır [70].

2005 yılında Hong ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada gastrik kanser ile ilgili hipermetilasyonu olan genler araştırılmıştır. hMLH1 (humanmutL homolog) MGMT, GSTP1 genlerinin hipermetilasyonu gastrik kanserli hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı oranda daha sık olarak saptanmıştır. Bu çalışmada mide kanserli hastalarda GSTP1 saptanma oranı %7'dir. Yine ilginç olarak hipermetile genlerin kadınlarda erkeklere göre daha sık olduğu saptanmıştır [71].

İmrek ve arkadaşlarının 2018'de yaptıkları insan gastrik tümörü ve tümör olmayan dokulardaki CYP ve GST izozimlerinin ekspresyonları çalışmasında, 40 gastrik kanser hastasında, tümürlü ve tümör periferinde bulunan normal dokularında sitokrom P450 1A1 (CYP1A1), CYPB1, CYP2E1 ve glutatyon S-transferaz P1 (GSTP1), GSTT1, GSTO1, GSTK1 izozimlerinin immünohistokimyasal boyanma özellikleri araştırılmıştır. Gastrik kanserli dokularda CYP1B1, GSTT1, GSTO1 ve GSTK1 ekspresyonlarının normal dokulara oranla daha fazla olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Fakat, CYP1A1, CYP2E1 ve GSTP1 ekspresyonlarının normal dokulara oranla daha az olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Çalışılan CYP ve GST izozimlerinin ekspresyonları ile yaş ve cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p > 0,05$). Gastrik adenokarsinomlu hastalarda, CYP1B1, GSTO1, GSTT1 ve GSTK1 protein ekspresyonları tümürlü dokuda, normal gastrik dokulardan daha yüksek olduğu ifade edilmiştir [72].

Yapılan bu tez çalışmasında 32 mide adenokanserli hastanın GSTM1 ve GSTZ1 izozimlerinin ve p53 ekspresyonları değerlendirilmiştir. Mide adenokanserli dokularında, GSTM1, GSTZ1 izozimlerinin ve p53 ekspresyonları normal dokulara oranla daha fazla olduğu bulunmuştur ($p=0,0008; 0,0000 < 0,05$); ($p=0,0000, 0,0000 < 0,05$). Literatüre bakıldığında mide kanserlerinde GSTZ1'in protein ekspresyonlarıyla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. İlk defa bu çalışmada mide kanserlerinde GSTZ1'in protein ekspresyonları gösterilmiştir.

Mide kanserinin gelişmesi ve ortaya çıkması için literatürde ortaya çıkan ya ortalaması bizim gruplarımız için de geçerliliğini korumaktadır. Bu da mide

kanserinin ayrıklı olarak ileri ya larda ortaya çıkan bir hastalık oldu u hipotezini de devam ettirmektedir.

Yapılan bu tez çalı masında kullanılan dokular kemoterapi almamı hastalara aittir. GST izozimlerinden M1 ve Z1'in mide kanserlerinin olu umundaki rolü bu çalı mayla ilk defa ortaya konmu tur. Bu izozimlerin substratları ve kanser ilaçlarının öncü maddeleri kar ıla tırılmalı ve substratlarla öncü maddelerin e le mesi durumunda kar ıla ılan ilacın verilmemesi çünkü verilen ilaca kar ı hücrelerin bu enzimler sayesinde bir direnç gösterece i dü ünülmektedir. Ayrıca elimizde yeterli hasta sayısı olmadı ından klinik parametreler ve hasta prognozları hakkında net bilgiye ula ılamadı ından bu izozimlerin di er kanser e itlerinde de daha fazla hasta grubuyla çalı ılması ve hasta klinik parametreleriyle kar ıla tırılarak hastalı ın prognozuna katkıda bulunulması gerekti i dü ünülmektedir.

GSTM1 ve GSTZ1 izoziminlerinin mide kanserinin olu umundaki önemi bu çalı mayla ilk olarak ortaya konmu tur. Fakat bu izozimlerin di er kanser e itlerinde de daha fazla hasta grubuyla çalı ılması ve hasta klinik parametreleriyle kar ıla tırılarak hastalı ın prognozuna katkıda bulunması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Stewart B.W., Kleihues P., World Cancer Report. 11-21. International Agency For Research On Cancer Publications, 2003.
- [2] Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F., & Williams, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 13(1), 19-50. 1996.
- [3] Alacalı, M. Mide kanseri, mide kanseri taramaları ve mide kanserinden korunma. *Ankara Medical Journal*, 12(4), 195-198. 2012.
- [4] Hanahan, D., and Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *cell*, 100(1), 57-70. 2000.
- [5] Vardar, A., Kanserin Tanımı, Belirtileri ve Çe itleri. *Avrasya Hospital Sa lık Dergisi Kanser Özel Sayısı*, 53, 34-35. 2015.
- [6] Ogden, J. *Health psychology*. McGraw-Hill Education (UK). 2012.
- [7] P. Boyle, and B. Levin (Eds.). *Dünya kanser raporu 2008*. Uluslararası Kanser Ara tırma Kurumu. (2008).
- [8] Tuncer, M. T.C. Sa lık Bakanlı ı Kanserle Sava Dairesi Ba kanlı ı Ulusal Kanser Programı. 2009.
- [9] Köse, M. The Ministry of Health of Turkey Health Statistics Yearbook 2015. Edited by Berrak Basara, Cemil Guler, and Gokalp Yentur. Ankara: Ministry of Health. 2016.

- [10] Fenoglio-Preiser C, Carneiro F, Correa P, Gulford P, Lambert R, Megraud F. Gastric Carcinoma. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System, World Health Organization Classification of Tumours, Edited by Stanley R. Hamilton, Lauri A. Aaltonen. chapter:3, 37–66. 2000.
- [11] Kelley J.R., Duggan J. M. Gastric cancer epidemiology and risk factors, *Journal of Clinical Epidemiology*, 56, 1–9. 2003.
- [12] Christian T.K., Stadtlander H., Waterbor J.W. Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer. *Carcinogenesis*; 20(12), 2195–2207. 1999.
- [13] Owen D.A. Alimentary Canal and associated Organs, the Stomach. Carter D., Greenson J.K., Oberman H.A., Reuter V., Stoler M.H., Emills S., eds. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology, Philadelphia, USA: Lippincott Williams Wilkins, p.1435-1475. 2004.
- [14] Crawford J.M. Gastric carcinoma. in: Cotran RS, Kumar V. Collins T, eds. *Cotran: Robbins pathologic basis of disease*. 6. th ed. WB Saunders: Philadelphia, 798-802. 1999.
- [15] Fuchs C.S., Mayer R.J. Gastric carcinoma. *N Eng J Med*. 333, 32- 41. 1995.
- [16] Correa P. Clinical implications of recent development in gastric cancer pathology and epidemiology. *Semin Oncol* 12, 2-10. 1985.
- [17] Grabiec J., Quen D. Carcinoma of the stomach in young persons. *Cancer*. 56, 388-396. 1985.
- [18] Tso, P. L., Bringaze, W. L., Dauterive, A. H., and Correa, P. Gastric carcinoma in the young. *Cancer*, 59(7), 1362-1365. 1987.

- [19] Radi, M. J., Fenoglio-Preiser, C. M., Bartow, S. A., Key, C. R., & Pathak, D. R. Gastric carcinoma in the young: a clinicopathological and immunohistochemical study. *American Journal of Gastroenterology*, 81(9), 747-756. 1986.
- [20] Davies, J. M. Mortality trends for stomach cancer in England and Wales. *British journal of cancer*, 44(6), 879. 1981.
- [21] Landis, S. H., Murray, T., Bolden, S., and Wingo, P. A. Cancer statistics, 1999. *CA: A cancer Journal for Clinicians*, 49(1), 8-31. 1999.
- [22] You, W. C., Zhang, L., Gail, M. H., Chang, Y. S., Liu, W. D., Ma, J. L., and Blaser, M. J. Gastric dysplasia and gastric cancer: Helicobacter pylori, serum vitamin C, and other risk factors. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(19), 1607-1612. 2000.
- [23] Allum, W. H., Powell, D. J., McConkey, C. C., & Fielding, J. W. L. Gastric cancer: A 25 - year review. *British journal of surgery*, 76(6), 535-540. 1989.
- [24] Tarbell, N. J., Mauch, P., Gelber, R. D., & Weinstein, H. J. Sex differences in risk of second malignant tumours after Hodgkin's disease in childhood. *The Lancet*, 341(8858), 1428-1432. 1993.
- [25] Neubauer, A., Thiede, C., Alpen, B., Ritter, M., Neubauer, B., Ehniger, G., ... & Stolte, M. Cure of Helicobacter pylori infection and duration of remission of low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(18), 1350-1355. 1997.
- [26] Wagner, S., Beil, W., Westermann, J., Logan, R. P., Bock, C. T., Trautwein, C., ... & Manns, M. P. Regulation of gastric epithelial cell growth by Helicobacter pylori: offence for a major role of apoptosis. *Gastroenterology*, 113(6), 1836-1847. 1997.

- [27] Vural, N. Toksikoloji. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, 73, 381. 2005.
- [28] Guengerich, F. P. Characterization of human microsomal cytochrome P-450 enzymes. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 29(1), 241-264. 1989.
- [29] Caldwell, J. Conjugation reactions in foreign-compound metabolism: definition, consequences, and species variations. *Drug metabolism reviews*, 13(5), 745-777. 1982.
- [30] Cengiz, M., Hacıhanefiöglu, S., & Cenani, A. Glutathione and related enzymes in rat liver treated with methyl nitrosourea. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 7(4), 341-346. 1996.
- [31] Boar, P., Coggan, M., Johnston, P., Ross, V., Suzuki, T., & Webb, G. Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: A complex of gene families. *Pharmacology & therapeutics*, 48(3), 357-369. 1990.
- [32] Halliwell, B. Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. *Nutrition reviews*, 57(4), 104-113. 1999.
- [33] Hayes, J. D., & Pulford, D. J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part II. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 30(6), 521-600. 1995.
- [34] Commandeur J.N.M, Stijntjes G.J, Vermeulen N.P.E. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. *Phar Rev*, 47, 271-330. 1995.
- [35] Whalen R, Boyer T.D. Human Glutathione S-Transferases. *Sem Liver Dis*, 18 (4), 345-358. 1998.

- [36] Mannervik, B., & Widersten, M. Human glutathione transferases: classification, tissue distribution, structure, and functional properties. *Advances in drug metabolism in man*, 407-459. 1995.
- [37] Board, P. G. Biochemical genetics of glutathione-S-transferase in man. *American journal of human genetics*, 33(1), 36. 1981.
- [38] Hayes, J. D., & Strange, R. C. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*, 61(3), 154-166. 2000.
- [39] Di Pietro, G., Magno, L. A. V., & Rios-Santos, F. Glutathione S-transferases: an overview in cancer research. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 6(2), 153-170. 2010.
- [40] Takahashi, Y., Campbell, E. A., Hirata, Y., Takayama, T., & Listowsky, I. A basis for differentiating among the multiple human Mu-glutathione S-transferases and molecular cloning of brain GSTM5. *Journal of Biological Chemistry*, 268(12), 8893-8898. 1993.
- [41] Strange, R. C., Spiteri, M. A., Ramachandran, S., & Fryer, A. A. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 482(1), 21-26. 2001.
- [42] Board, G. P., Baker, T. R., Chelvanayagam, G., & Jermini, S. L.. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. *Biochemical Journal*, 328(3), 929-935. 1997.
- [43] Karaka -Çelik, S., Aras, N., & Ate , C. Glutathione S-Transferase Z1 (GSTZ1) Gene Polymorphism in Gastric Cancer: A Preliminary Study in a Turkish Population. *Laboratory medicine*, 45(1), 37-42. 2014.

- [44] Lantum, H. B., Baggs, R. B., Krenitsky, D. M., Board, P. G., & Anders, M. W. Immunohistochemical localization and activity of glutathione transferase zeta (GSTZ1-1) in rat tissues. *Drug Metabolism and Disposition*, 30(6), 616-625. 2002.
- [45] Tzeng, H. F., Blackburn, A. C., Board, P. G., & Anders, M. W. Polymorphism- and species-dependent inactivation of glutathione transferase zeta by dichloroacetate. *Chemical research in toxicology*, 13(4), 231-236. 2000.
- [46] Sau, A., Tregno, F. P., Valentino, F., Federici, G., & Caccuri, A. M. Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Archives of biochemistry and biophysics*, 500(2), 116-122. 2010.
- [47] Townsend, D. M., & Tew, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22(47), 7369. 2003.
- [48] Liu, J., Chen, H., Miller, D. S., Saavedra, J. E., Keefer, L. K., Johnson, D. R., ... & Waalkes, M. P. Overexpression of glutathione S-transferase II and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic. *Molecular pharmacology*, 60(2), 302-309. 2001.
- [49] Szakács, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C., & Gottesman, M. M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature reviews Drug discovery*, 5(3), 219. 2006.
- [50] Morrow, C. S., Peclak-Scott, C., Bishwokarma, B., Kute, T. E., Smitherman, P. K., & Townsend, A. J. Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1) mediates resistance to mitoxantrone via glutathione-dependent drug efflux. *Molecular pharmacology*, 69(4), 1499-1505. 2006.
- [51] Depeille, P., Cuq, P., Mary, S., Passagne, I., Evrard, A., Cupissol, D., & Vian, L. 2004. Glutathione S-transferase M1 and multidrug resistance protein 1 act in

synergy to protect melanoma cells from vincristine effects. *Molecular pharmacology*, 65(4), 897-905.

[52] Buchman, V. L., Chumakov, P. M., Ninkina, N. N., Samarina, O. P., & Georgiev, G. P. A variation in the structure of the protein-coding region of the human p53 gene. *Gene*, 70(2), 245-252. 1988.

[53] Karaman, A. Mide kanserinde p53 tümör supresör geninin rolü. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 23(1), 67-73. 2003.

[54] Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., & Harris, C. C. p53 mutations in human cancers, *Science*. 253(5015): 49–53.1991.

[55] Renault, B., Van Den Broek, M., Fodde, R., Wijnen, J., Pellegata, N. S., Amadori, D., ... & Ranzani, G. N. Base transitions are the most frequent genetic changes at p53 in gastric cancer. *Cancer research*, 53(11), 2614-2617. 1993.

[56] Ferlay, J., Bray, F., Sankila, R., & Parkin, D. M. Cancer incidence, mortality and prevalence in the European Union. *European Network of Cancer Registries*. 1999.

[57] Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0. Lyon: IARC Press, IARC Cancer Base No. 5; 2001

[58] Catalano, V., Labianca, R., Beretta, G. D., Gatta, G., de Braud, F., & Van Cutsem, E. Gastric cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*, 54(3), 209-241. 2005.

[59] Coleman MP, Babb P, Daniecki P, et al. Cancer survival trends in England and Wales 1971–1995: deprivation and NHS region. *Studies in medical and population subjects*, vol. 61. London: The Stationary Office; 1999.

- [60] Ferretti S, Gafa L. Upper gastrointestinal tract cancers: oesophagus, stomach, liver, gallbladder and biliary ducts, pancreas. *Epidemiol Prev*; 28 (2), 34–42. 2004.
- [61] Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet*; 306 (7924), 58–60. 1975.
- [62] Sant, M., Aareleid, T., Berrino, F., Bielska Lasota, M., Carli, P. M., Faivre, J., ... & Möller, T. Eurocare-3: survival of cancer patients diagnosed 1990–94—results and commentary. *Annals of oncology*, 14(5), 61-118. 2003.
- [63] Gottschling, S., Schnabel, P. A., Herth, J.F., and Herpel, E. Are we missing the target? – Cancer Stem Cells And Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer, *Cancer Genomics & Proteomics* 9(5), 275-286, 2012.
- [64] Nan, H. M., Song, Y. J., Yun, H. Y., Park, J. S., & Kim, H. Effects of dietary intake and genetic factors on hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 11(25), 3834. 2005.
- [65] Lieshout, E. M., Haelst, U. J., Wobbes, T., & Peters, W. H. Immunohistochemical Localization of Glutathione S-Transferase and in Human Esophageal Squamous Epithelium, Barrett's Epithelium and Carcinoma. *Cancer Science*, 90(5), 530-535. 1999.
- [66] Ada, Tugba Guzide, et al. "Association between Glutathione S-Transferase Omega 1 A140D Polymorphism in the Turkish Population and Susceptibility to Non-Small Cell Lung Cancer." *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 64(2), 61-67. 2013.
- [67] O uztüzün, S., Kilic, M., Simsek, G.G., Moran, B., Akdemir, Y., Bulu, H., Yazici Gokbulut, Z. Tiroid Papillar Karsinom, Foliküler Adenom, Nodüller Hiperplazide GSTO1 ve GSTK1 Ekspresyonları. 25. Ulusal Biyokimya Kongresi, 3 - 6 Eylül 2013, zmir [25th National Biochemistry Congress, Izmir / Turkey], *Turk J Biochem.*, 38 (Suppl. 1); P-133, 2013.

[68] Moran, B., Oztüzün, S., Kılıç, M., İmrek, G.G., Bulut, H., Kologlu K.D., Göl, S., Akdemir, Y., Ayaz, A., Gürbüz, N., Kaya Koçdoğan, A. Mide ve Kolon Kanserli Dokularda CYP ve GST zozimlerinin Ekspresyonlarının İncelenmesi. 25. Ulusal Biyokimya Kongresi, 3 - 6 Eylül 2013, İzmir [25th National Biochemistry Congress, Izmir / Turkey], Turk J Biochem., 38 (Suppl. 1); P-135, 2013.

[69] Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, et al. Molecular cloning, characterization, and expression in Escherichia coli of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. J Biol Chem.; 272(15), 10004-12. 1997.

[70] Lee, T. L., Leung, W. K., Chan, M. W., Ng, E. K., Tong, J. H., Lo, K. W., ... & To, K. F.. Detection of gene promoter hypermethylation in the tumor and serum of patients with gastric carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 8(6), 1761-1766. 2002.

[71] 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.

[72] Simsek, G. G., Oguztuzun, S., Bozer, B., Kilic, M., Kocdogan, A. K., Kaygin, P., ... & Bulus, H. Expressions of CYP and GST Isoenzymes in Human Gastric Tumor and Non-Tumor Tissues. *International Journal of Hematology and Oncology*, 28(1), 036-044. 2018.