

T.C.  
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

NORMAL VE KANSERLİ LARENKS  
DOKULARINDA GST İZOZİMLERİNİN VE P53 TÜMÖR  
BELİRLEYİCİSİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL  
LOKALİZASYONLARI VE PROGNOSTİK FAKTÖRLERLE  
KARŞILAŞTIRILMASI

NURDAN GÜRBÜZ

OCAK 2008

Fen Bilimleri Enstitü Müdürünün onayı.

.....

Doç. Dr. Burak BİRGÖREN

Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak Biyoloji Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Bu tezi okuduğumuzu ve Yüksek Lisans tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarız.

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Mesude İŞCAN

Yrd. Doç. Dr. Ayten ÇELEBİ

Yrd. Doç. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN

## ÖZET

### NORMAL VE KANSERLİ LARENKS DOKULARINDA GST İZOZİMLERİNİN VE P53 TÜMÖR BELİRLEYİCİSİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL LOKALİZASYONLARI VE PROGNOZİK FAKTÖRLERLE KARŞILAŞTIRILMASI

GÜRBÜZ, Nurdan

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN

OCAK 2008, 65 sayfa

48 adet larenks skuamöz hücreli kanser vakasında, glutatyon-S-transferaz (GST) alfa(A), GST pi(P), GST mü(M4), GST teta(T1) ve P53'ün immünohistokimyasal bulguları değerlendirildi. Bu hastalara ait normal ve tümörlü dokular boyanma şiddeti ve boyanma yüzdesine göre karşılaştırıldığında; GSTA ekspresyonunun normal hücrelerde tümörlü hücrelere göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu, GSTP ve P53'ün ise, tümörlü hücrelerde normal hücrelere göre daha fazla eksprese edildiği görülmüştür. GSTM4 ve GSTT1, normal hücrelerde tümörlü hücrelere göre daha fazla eksprese edilmesine rağmen istatistiksel olarak güvenilirliği düşüktür. Bu bulgulara göre GSTA, GSTP, GSTT1 ve P53 larenks kanserinde diagnostik açıdan önemlidir. GST izozimleri ve P53 immünohistokimya sonuçları, klinik parametrelerle karşılaştırıldığında; GSTA ekspresyonunun kötü diferensiyel larenks tümörlerde yükseldiği, fakat GSTM4 ve GSTT1 ekspresyonlarının azaldığı bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Larenks kanser, GSTA, GSTP, GSTM4, GSTT1, P53, immünohistokimya

## ABSTRACT

### IMMUNOHISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF GST İZOENZYMES AND TUMOR MARKER P53 IN LARYNX TISSUE FROM NORMAL AND CARCINOMA: CORRELATIONS WITH THE PROGNOSTIC FACTORS

GÜRBÜZ, Nurdan

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M.Sc. Thesis

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Serpil Oğuztüzün

January 2008, 65 pages

Glutathione-S-transferase (GST) alpha(A), GST pi(P), GST mu(M4), GST theta(T1) and P53 immunohistochemical staining results were evaluated in 48 larynx squamous cell carcinoma cases. When the normal and tumor tissue of these cases were compared according to their staining intensity and percentage of positive staining, GSTA expression in normal cells was significantly higher than tumor cells, and GSTP and P53 expressions were higher in tumor cells. GSTM4 and GSTT1 expressions were higher in normal cells, however, their statistical significance was low. According to these results, GSTA, GSTP, GSTT1 and P53 were important in the diagnosis of larynx carcinoma. When the immunohistochemical results of GST isoenzymes and P53 were correlated with the clinical parameters, GSTA expression was increased in poorly differentiated larynx tumor, but GSTM4 and GSTT1 expressions were decreased.

**Key words:** Larynx cancer, GSTA, GSTP, GSTM4, GSTT1, P53,  
immunohistochemistry

## TEŐEKKÖR

Bu tezin hazırlanmasında, orataya çıkmasında değerli katkılarını esirgemeyen, bilgi ve birikimini benimle paylaşan, tecrübeleriyle bana ışık tutan danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Serpil OĖUZTÖZÖN' e teŐekkÖrÖ bir borç bilirim. ÇalıŐmamın doku kazanımını sağlayan Sayın Dr. Sedat AYDIN'a, preperatların değerlendirmesine yardımcı olan Sayın Dr. Aylin Göl'e ve yardımlarından dolayı Sayın Dr.Mehtap AYDIN'a ayrıca iten teŐekkÖrlerimi sunarım. ÇalıŐmamın istatistiksel analizlerinde bana yardımcı olan Sayın Öęr. Gör. MÖzeyyen ÖZHAVZALI'ya ve Milli ProdÖktivite Merkezi Uzman Yardımcısı Aslıhan SERTKAYA'ya iten teŐekkÖr ederim.

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### ÇİZELGELER

1-1 TNM sınıflandırmasına bağlı olarak larenks kanserlerinde evrelendirme	12
2-1 Larenks Skuamöz Hücreli Kanserli Hastaların Özellikleri .....	34
3-1 GST izozimlerinin ve P53'ün tümörlü ve normal larenks dokularındaki dağılımı .....	38
3-2 Hastaların klinik parametrelerinin dağılımı .....	46
3-3 Klinik parametrelerle immünohistokimya sonuçlarının karşılaştırılması .	46

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### ŞEKİLLER

1-1 Larengeal yapı ve boşluklar .....	3
1-2 GST Süper gen ailesi.....	17
3-1 a)Normal yüzey epitelyumu ve glandlarda GSTA ile (1+) boyanma x50	
b)GSTA ile (-) boyanan tümör hücresi x10 .....	34
3-2 a)Tümörlü dokuda GSTP (3+) boyanma x 200	
b)Normal yüzey epitelinde boyanma olmaması ve komşu glandlarda GSTP hafif (+) boyanma x 50.....	35
3-3 GSTP boyanmayan normal yüzey epiteli ve tümörde(2+) boyanma X 200.....	41
3-4 a)GST T1 Normal yüzey epiteli ile normal glandlarda (1+) boyanma X 50	
b)GST T1 ile tümörde (-) boyanma x200.....	37
3-5 a)GSTM4 ile tümörde boyanma olmaması x 100	
b)GST M4 ile normal yüzey epitelinde ve normal glandlarda (2+) boyanma x 50.....	38
3-6 a) P53 ile tümörde nükleer (+) boyanma X 100	
b)P53 ile tümörde (-) boyanma x200.....	39
3-7 P53 ile boyanmayan yüzey epiteli ile tümörde (1+) boyanma X 100 .....	44
3-8 P53 ile tümörde (+) boyanma ve normal glandlarda boyanma olmaması X 100 .....	45

# İÇİNDEKİLER

Özet .....	i
Abstract.....	ii
Teşekkür .....	iii
Çizelgeler dizini.....	iv
Şekiller dizini .....	v
İçindekiler.....	vi
1 GİRİŞ.....	1
1.1 Larenks Anatomisi .....	2
1.2 Larenks Kanseri.....	6
1.2.1 Larenks Kanseri Tipleri.....	7
1.2.2 Evreleme Ve Prognostik Faktörler.....	8
1.2.3 Larenks Kanserinde Risk Faktörleri.....	12
1.3 Toksik Maddelerin Metabolizması (Biyotransformasyon).....	14
1.4 Glutasyon S-Transferaz.....	16
1.4.1 Glutasyon S-Transferazların Sınıflandırılması.....	17
1.4.1.1 Alfa Sınıfı Glutasyon S-Transferazlar.....	18
1.4.1.2 Mü Sınıfı Glutasyon S Transferazlar .....	19
1.4.1.3 Pi Sınıfı Glutasyon S-Transferazlar.....	19
1.4.1.4 Teta Sınıfı Glutasyon S-Transferazlar.....	20
1.4.2 Glutasyon S-Transferazların Substratları .....	21
1.4.3 Glutasyon S-Transferaz'ların Biyolojik Rolü .....	21
1.4.4 Glutasyon S-Transferaz Ve Larenks Kanseri.....	22



1.5	P53'ün Yapısı Ve Fonksiyonu.....	24
1.5.1	P53 Ve Larenks Kanseri.....	26
1.6	Çalışmanın Amacı .....	27
2	MATERYALVE YÖNTEM .....	30
2.1	Materyal.....	30
2.1.1	.Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	30
2.1.1.1	Solusyonların Hazırlanışı .....	31
2.1.2	Kullanılan Cihazlar.....	31
2.2	Kullanılan Yöntemler.....	32
2.2.1	Materyal Kazanımı Ve Hazırlanışı .....	32
2.2.2	İmmünohistokimya Prosedürü .....	35
2.2.3	İstatistiksel Analiz .....	37
3	ARAŞTIRMA BULGULAR.....	38
3.1	P53 ve GST İzozimlerinin Normal ve Kanserli Larenks Dokularındaki Dağılımı .....	38
3.1.1	GST İzozimlerinin Dağılımları.....	39
3.1.2	P53 Doku Dağılımı .....	43
3.2	P53 ve GST İzozimlerinin Klinik Parametrelerle Karşılaştırılması..	45
4	TARTIŞMA ve SONUÇ.....	48
	KAYNAKLAR .....	53

# 1 GİRİŞ

Larenks kanseri ülkeler ve farklı popülasyonlar arasında çeşitlilik göstermektedir<sup>(1)</sup>. Kültürel yapıyı değerlendirmeye almazsak, orta yaş ve üzerinde (özellikle 60'lı yaşlarda), sigara ve alkol kullananlarda larenks kanseri daha sıklıkla görülmüştür<sup>(2-4)</sup>. Erkeklerde yüksek oranda görülmekle birlikte son yıllarda sigara kullanımındaki artışa bağlı olarak bayanlarda da larenks kanserine yakalanma riski artış göstermiştir<sup>(5)</sup>.

Sigara kullanımının yanında, kronik larenjit, kronik reflü, nitrojen gazları asbestoz, iyonize radyasyon, alkol kullanımı ve bazı virüslerin bu kanserin gelişiminde rol alan etiyolojik faktörler olarak bilinmektedir<sup>(5)</sup>.

Hücre döngüsünü düzenleyen, tümör baskılayıcı olarak bilinen P53 ve çok geniş çeşitliliğe sahip olan karsinojenleri detoksifiye eden GST izozimlerinin araştırılması ve elde edilen sonuçların klinik parametrelerle birlikte değerlendirilmesi, sadece larenks kanseri için değil diğer tüm kanserlerin gelişimi ve ilerlemesi konusuna ışık tutacaktır. Bu gelişmeler sayesinde tümör oluşumunun sebepleri, tümörün erken teşhisi, tedavi seçimi ve yeni tedavi yöntemlerinin belirlenmesinde ilerleme katedilecektir.

## 1.1 Larenks Anatomisi

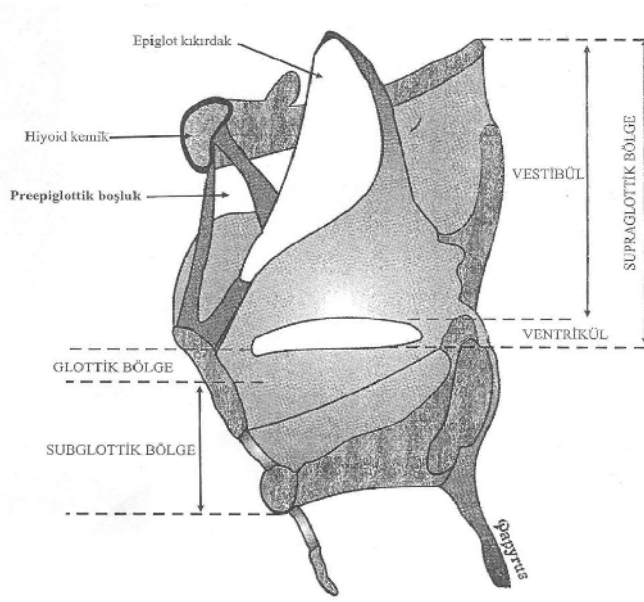
Larenks, boynun ön kısmında, orta hatta, kıkırdak iskeletten oluşan, çevresine ligamentler ve membranlar ile asılı, mobil, boşlukları mukoza ile örtülü, iç kaslarının çalışması ile öncelikli olarak alt solunum yollarının korunması, solunum ve fonasyon görevlerini üstlenen bir organdır. 3. ve 6. servikal vertebralar hizasında yer alır. Larenksin tanımlanabilir bir organ olarak ortaya çıkışı intrauterin yaşamın 33. gününde oluşur; 7. ve 8. haftalarda şekillenme belirginleşir<sup>(6)</sup>. Supraglottik bölge bukkofarengial tomurcuktan, (üçüncü ve dördüncü brankiyal arklardan) glottis ve subglottis de trakeobronşiyal tomurcuktan (beşinci ve altıncı brankiyal arklardan) gelişir<sup>(7,8)</sup>. Farklı embriyolojik kaynaktan gelen supraglottik ve glottik bölgelerin vasküler, lenfatik ve sinirsel yapıların anatomik kaynakları da farklıdır ve bu da supraglottik kanserlerin glottis'e yayılmasındaki azlığı açıklar<sup>(8)</sup>.

Larenks'in pozisyonu büyüme ile değişir. Erkek çocuklarda yaşla birlikte vokal kordlardaki uzama neticesinde sesde kalınlaşma olur. Embriyonik yaşamın ortalarında, krikoid kıkırdağın alt ucu 4. servikal vertebra'nın üst hizasına gelecek şekilde yer alır. Larenksin bu "descensus (ademelması)"u bir açı değiştirme ile beraber olur ve nazal havayoluna paralel durumundan, dik açı yapar duruma geçer<sup>(6)</sup>.

Larenksin anatomisi, üç öncelikli görevi olan alt solunum yollarının

korunması, solunumun sağlanması ve fonasyon'un oluşması amaçlarına yönelik olarak şekillenmiştir.

Larengeal lümen klinik olarak üç bölümde incelenir Bunlar larenksin onkolojik alt üniteleri olarak da kabul edilir <sup>(9)</sup>.



**Şekil 1-1 Larengeal yapı ve boşluklar**

Supraglottik Bölge: Ventrükülün tavanından yukarıda kalan vestibül - epiglot ve ariepiglottik plikalar dahil ve ventriküler bantların oluşturduğu larenks bölümüdür. Supraglottik bölgenin lenfatik damarlanması çok zengindir; epiglot'un serbest kenarında ventriküler bantlarda ve ventrikülden çok bol lenfatik kapillerler vardır<sup>(7,10)</sup>. Epiglot'ta lenfatik akım sadece laterale

doğru değil, aynı zamanda dil kökü ve vallekula'ya doğrudur ve boynun her iki tarafına da drene olur. Supraglottik lenf yolu ariepiglottik plika'nın önünden yayılmaya başlar ve nörovasküler yapılar boyunca dağılım gösterir; tiro-hiyoid membranı, superior larengeal arter ve ven ile geçer ve üç trunkusa ayrılarak devam eder. Primer supraglottik kanserler, yaygın olan düşünceye göre, dokuyu ve ender olarak glottik bölgeye geçer<sup>(8)</sup>. Supraglottik kanserler yerleşimlerine göre farklı yayılım özelliklerine sahiptir.

Glottik Bölge: Her iki vokal kord arasındaki bölgedir. Ventrikül tabanından subglottis'e doğru 1 cm kadar kısım bu bölgeye dahildir <sup>(7)</sup>.

Glottis, supraglottik ve subglottik bölgelerin lenf akımı arasında embriyolojik bir bariyer oluşturur<sup>(7)</sup>. Glotik kanserler suproglotik bölgeye yayılma eğilimi göstermez<sup>(8)</sup>. Bu bariyer nedeniyle supraglottik bölge kanserleri vokal kordlar korunarak çıkarılabilir (supraglottik larenjektomi)<sup>(11)</sup>. Yine de glottik bölgenin lenfatik kanalları temel olarak supraglottik larenks'e oradan da üst ve orta derin servikal nod'lara doğrudur <sup>(12)</sup>.

Transglottik; glottis, ventrikül ve ventriküler bandı beraber tutan tümör yerleşimidir <sup>(7)</sup>. Bu tümörler sık olarak kıkırdak yayılımı ve kötü prognoz gösterirler <sup>(8)</sup>. Transglottik deyimini başlangıçta sadece ventrikül etrafındaki bir tümörü, yani glottik ve supraglottik bölgeleri tutan bir tümör için kullanılmış ve klinik bir anlam taşımıştır. Daha sonra larenksin her üç bölgesini de tutan

büyük tümörler için kullanılmıştır. Son görüş bu deyimın sadece supraglottis çıkışlı, ön komissürden glottise yayılmış ve tiroid kıkırdağı tutmuş tümörler için kullanılması gerektiği yönündedir <sup>(8)</sup>.

Subglottik Bölge: Vokal kordların serbest kenarının 1 cm altından başlayıp krikoid kıkırdak alt kenarına kadar olan kısımdır<sup>(8)</sup>. Lenf drenaj sistemi alt jugüler lenf nodlarına<sup>(13)</sup> çok farklı yollarla invazyon yapılabilir<sup>(10)</sup>. . . Subglottik kanserler vokal kordun alt yüzünden aşağıya uzanan kanserler ile krikoid kıkırdağın iç yüzü kanserleridir. Bu bölgeden kaynaklanan kanserler daha yüksek gangliyon metastazı insidansı gösterir <sup>(8)</sup>. Larengeal boşluklar larenks'in membranları, kıkırdakları ve ligament'leri, larenks kanserlerinin potansiyel yayılımı açısından çok önemli iki potansiyel boşluk oluştururlar <sup>(9)</sup>:

1. Pre-epiglottik Boşluk: Larenks'in üst ön bölgesinde epiglot'un önünde yer alır <sup>(12)</sup>. Önde tiroid kıkırdak ve tirohiyoid membran; arkada epiglot; üstte mediyan hyoepi-glottik ligament ve vallekula ile çevrili alandır. Yağ dokusu ve gözeli doku içerir <sup>(8,9)</sup>. Yanlarda paraglottik boşluklara açılır <sup>(14)</sup>. Pre-epiglottik boşluk, supraglottik tümörlerin <sup>(8)</sup> ve özellikle epiglottik tümörlerin sıkça invazyon gösterdiği bir alandır <sup>(9,14)</sup>. Pre-epiglottik alana yayılım a) epiglotttaki deliklerden doğrudan, b) epiglottik kıkırdağın parçalanmasıyla, c) tiroepiglottik ligamentin parçalanmasıyla olabilir <sup>(9)</sup>.

2. Paraglottik Boşluk: Glottis'in her iki yanında uzanır<sup>(14)</sup>. Paraglottik boşluk ön-üst kısmında pre-epiglottik boşluğa açılır<sup>(8,14)</sup>. Paraglottik boşluk komşulukları nedeniyle larengeal kanserlerin yayılımı açısından önemlidir. Glottik tümörlerin transglottik ve supraglottik tümörlerin ekstralarengeal yayılımlarına olanak sağlayabilir<sup>(14)</sup>. Paraglottik alan invazyonu, epiglotun sınırlı tümörlerinin derin invazyonlarında da görülür<sup>(8)</sup>.

## 1.2 Larenks Kanseri

Larengeal karsinom sigara içenlerde görülen önemli bir malignitedir. Yassı hücreli karsinom, larenksin en sık görülen malign tümörüdür. Tüm larenks kanserlerinin %95'ini oluşturur<sup>(15)</sup>. Erişkinlerde üst hava yollarının en sık gözlenen tümörü olmakla birlikte tüm kanserler içerisindeki oranı yaklaşık %2.2'dir. Hastaların çoğu 50 yaşın üzerindedir ve yaklaşık %96'sı erkektir<sup>(16)</sup>. Sigara içimi, en güçlü çevresel faktördür ve sigara içmeyen larenks kanserli olgular istisnadır. Sigara içimi ve asbestoza maruz kalma ile larenks kanseri insidansı arasında istatistiksel bir ilişki mevcuttur<sup>(16-18)</sup>. Sigara içen bayanlarda görülme oranı giderek artmaktadır<sup>(19)</sup>.

Aşırı alkol tüketimi, özellikle supraglottik tümörlerde sigaranın etkisini

potansiyelize edebilir<sup>(20-22)</sup>. Larenks kanserlerinde, çeşitli metotlar kullanılarak "Human Papilloma Virüs" (HPV) tipleri gösterilmiş olsa da, bu gözlemlerin ender olması, bu tümör sisteminde HPV'nin karsinojenik etkisinin güçlü olmadığını gösterir<sup>(23,24)</sup>. Karoten içeren meyva ve sebzelerin tüketimi, diğer mesleki maruz kalmalar, örneğin odun tozu, ağır metaller ve kömür, etiyojide söz edilen diğer faktörlerdendir<sup>(14,20,22, 25)</sup>.

### 1.2.1 Larenks Kanseri Tipleri

Larenks tümörlerinin %60-65'i glottik, %30-35'i supraglottiktir<sup>(16)</sup>. Geriye kalan ufak bir bölümü, transglottik ve subglottik tümörler oluşturmaktadır, ancak bu tümörlerin oranının arttığını belirten yayınlar vardır. Subglottik karsinomlar ender olmasına rağmen, glottik tümörlerin subglottise yayılımı daha sık rastlanan bir durumdur<sup>(22)</sup>. Larenks karsinomlarının kaynaklandıkları bölgeye bağlı olarak yayılma eğilimlerinin yüksek olduğu bazı zayıf noktalar vardır<sup>(26,27)</sup>:

Glottik karsinomlar vertikal olarak yayılma eğilimindedir fakat aynı zamanda intrensek larengeal kasları da invaze ederler. Tümörün larenks dışına yayılımı en sık olarak orta hatta, tiroid kıkırdağın aşılması ile olur. Bazen buna, önde krikotiroid membran boyunca yayılım eşlik eder.



Supraglottik karsinomlar, hem yukarı doğru hem de lateral olarak yayılırlar. Epiglottik kanserler, hiyoid kemiğin üstü ya da altında yerleşenler olmak üzere iki grupta değerlendirilebilir <sup>(26)</sup>.

Subglottik karsinomlar krikotiroid membrandan dışarıya taşma, tiroaritenoid kasa yayılma ve krikoid kıkırdağı invaze etme eğilimindedir. Transglottik kanserlerde ise paraglottik mesafe tutulumu sıktır. Larenks kanserlerinin büyük çoğunluğu iyi diferansiye yassı hücreli karsinomlardır. Larenkste ender olarak yassı hücreli karsinom dışında kalan kanserler gelişebilmekte ise de, bunlar tüm larenks kanserlerinin %1'inden azını oluştururlar <sup>(28)</sup>. Larenksteki yassı hücreli karsinomların üç önemli varyantı vardır.

### **1.2.2 Evreleme Ve Prognostik Faktörler**

Larenks kanserlerinin gelişimi ve biyolojik davranışı birbirinden farklıdır. Larenks kanserlerinde prognozu etkileyen çeşitli faktörler belirlenmiştir. Bunlar temel olarak primer lezyonun yeri ve büyüklüğü, servikal metastazların varlığı ve tümörün hücresel diferansiyasyonudur. Bunun dışında cerrahi spesimenin incelenmesi sonrası saptanabilen kıkırdak invazyonu, perinöral veya vasküler invazyon, lenf nodu metastazının ekstrakapsüler invazyon göstermesi gibi çeşitli faktörler prognozu belirgin

olarak etkiler. Larenksin farklı kompartımanlarından kaynaklanan kanserlerin invazyon paternleri farklılık gösterir. Bunun nedeni larenksin çeşitli bölümlerinde kanser yayılmasına zayıf noktalar ve anatomik doğal bariyerler bulunmasıdır.

AJCC'nin (American Joint Committee on Cancer) 2002 yılında yayınladığı yeni kılavuzda, bütün baş-boyun bölgelerinde olduğu gibi larenks kanserlerinin evrelemesinde de bazı değişiklikler yapılmıştır. Yeni evreleme aşağıdaki gibidir <sup>(29)</sup>:

### **Primer Tümör**

Tx: Primer tümör değerlendirilemiyor

T0: Primer tümör bulgusu yok

Tis: Karsinoma in situ

### **Supraglottis**

T1: Tümör supraglottisin bir alt bölgesine sınırlıdır, kord hareketleri normaldir.

T2: Tümör supraglottisin birden fazla alt bölgesinde mukozasını veya glottisi veya supraglottis dışındaki bir bölgeyi (örneğin dil kökü mukozası, vallekula, piriform sinüs medial duvarı) tutmuştur, kord hareketleri normaldir.

T3: Tümör larenks içinde sınırlı olmakla birlikte kord fiksasyonu vardır ve/veya post-krikoid bölge, preepiglottik dokular, paraglottik alan invazedir ve/veya minör tiroid kıkırdak invazyonu (iç korteks) vardır.

T4a: Tümör tiroid kıkırdağı tam kat invaze etmiştir ve/veya larenks dışı dokulara taşmıştır (örneğin trakea, dilin derin ekstrinsik kasları, prelarenge-al kaslar, tiroid veya özofagus gibi boyun yumuşak dokuları)

T4b: Tümör prevertebral alanı invaze etmiştir, karotid arteri çevrelemiştir veya mediastinal yapıları invaze etmiştir.

### **Glottis**

T1: Tümör vokal kordlara sınırlıdır ve kord hareketleri normaldir (anterior veya posterior komissür invazyonu olabilir)

T1a: Tümör tek bir vokal kordadır.

T1b: Her iki vokal kordda da tümör mevcuttur.

T2: Tümör supraglottis ve/veya subglottise uzanmaktadır ve/veya kord hareketleri kısıtlanmıştır

T3: Tümör larenks içinde sınırlı olmakla birlikte kord fiksasyonu vardır ve/veya paraglottik alan invazyonu vardır ve/veya minör tiroid kıkırdak invazyonu vardır (iç korteks)

T4a: Tümör tiroid kıkırdağı tam kat invaze etmiştir ve/veya larenks dışı dokulara taşmıştır (örneğin trakea, dilin derin ekstrinsik kasları, prelarenge-al kaslar, tiroid veya özofagus gibi boyun yumuşak dokuları)

T4b: Tümör prevertebral alanı invaze etmiştir, karotid arteri çevrelemiştir veya mediastinal yapıları invaze etmiştir.

### **Subglottis**

T1: Tümör subglottise sınırlıdır.

T2: Tümör vokal kordlara uzanmakla birlikte kord hareketleri normal veya kısıtlanmıştır.

T3: Tümör larenks içinde sınırlı olmakla birlikte kord fiksasyonu vardır

T4a: Tümör krikoid veya tiroid kıkırdağı tam kat invaze etmiştir ve/veya larenks dışı dokulara taşmıştır (örneğin trakea, dilin derin ekstrinsik kasları, prelarengeal kaslar, tiroid veya özofagus gibi boyun yumuşak dokuları)

T4b: Tümör prevertebral alanı invaze etmiştir, karotid arteri çevrelemiştir veya mediastinal yapıları invaze etmiştir.

### **Bölgesel Lenf Nodları**

Nx: Bölgesel lenf nodları değerlendirilememektedir

N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yoktur

N1: En büyük çapı 3 cm'yi geçmeyen tek bir ip-silateral lenf nodunda metastaz vardır

N2: En büyük çapı 3-6 cm arasında tek bir ipsi-lateral lenf nodunda metastaz vardır, veya hiçbirinin çapı 6 cm'yi geçmeyen multipl ipsilateral lenf nodlarında metastaz vardır veya hiçbirinin çapı 6 cm'yi geçmeyen bilateral veya kontrilateral lenf nodlarında metastaz vardır.

N2a: En büyük çapı 3-6 cm arasında tek bir ipsilateral lenf nodunda metastaz vardır

N2b: Hiçbirinin çapı 6 cm'yi geçmeyen multipl ipsilateral lenf nodlarında metastaz vardır

N2c: Hiçbirinin çapı 6 cm'yi geçmeyen bilateral veya kontrilateral lenf nodlarında metastaz vardır

N3: Bir lenf nodunda 6 cm'den büyük metastaz vardır

### **Uzak Metastazlar**

Mx: Uzak metastazlar değerlendirilememektedir

M0: Uzak metastaz yoktur

M1: Uzak metastaz vardır

Evre-0	T <sub>is</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Evre-I	T <sub>1</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Evre-II	T <sub>2</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Evre-III	T <sub>3</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>3</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>3</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>3</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
Evre-IVA	T <sub>4a</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>4a</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>4a</sub>	N <sub>2</sub>	M <sub>0</sub>
Evre-IVB	T <sub>4b</sub>	Herhangi N	M <sub>0</sub>
	Herhangi T	N <sub>3</sub>	M <sub>0</sub>
Evre-IVC	Herhangi T	Herhangi N	M <sub>1</sub>

**Çizelge 1-1** TNM sınıflandırmasına bağlı olarak larenks kanserlerinde evrelendirme

### 1.2.3 Larenks Kanserinde Risk Faktörleri

1. Tütün Kullanımı: Sigara kullanımı, larenks kanseri ve diğer kanser türlerinin oluşumunda etkili bir risk faktörüdür<sup>(30)</sup>. Sigara içme süresi ve günlük içilen sigara miktarı arttıkça larenks kanseri olma insidansı da artmaktadır<sup>(31)</sup>. Yapılan çalışmalarda larenks kanserli hastaların %88-89 'u hayatlarında belli bir süre sigara kullanmış, %50'den fazlasının da günde bir paketten fazla sigara içtiği belirlenmiştir<sup>(32)</sup>. Sigara içmeyenlere oranla içenlerde kanser olma riski 6.1 ile 15.8 kat daha fazla olarak değişmektedir<sup>(31)</sup>. Sigara içinde bulunan nikotinden ziyade polisiklik aromatik hidrokarbonlar

içeren katranın kanser oluşumunda etkili olduğu görülmüştür <sup>(32)</sup>.

2. Alkol Kullanımı: Alkol kullanımının larenks kanseri oluşumunda etkili bir faktör olduğu düşünülmesine rağmen bu konuda farklı görüşler ortaya konulmuştur. Bir grup araştırmacı; 1.5 litreden fazla alkol kullananlarda, sigara kullanımı ile sinerjistik etkileşim sonucu larenks kanser riskini 30-40 kat arttırdığını bildirmektedir <sup>(33)</sup>. Ayrıca alkol kullananlarda larenks karsinomlarının sık görülmesinin sebebi riboflavin ve diğer vitaminlerin eksikliğine immünoglobülün ve diğer, immünomolekül seviyelerindeki değişikliklere ve siroza bağlanmıştır <sup>(34)</sup>.

3. Virüsler : Son yıllarda larenks kanserlerinin gelişiminde virüslerin etkisinin olabileceğine dair bulgular vardır.Yapılan çalışmalarda HPV 6 ve 11 larengeal papillomatozis ile ilişkili bulunurken, HPV 16 ve 18 larengeal yassı hücreli kanserlerle ilişkili bulunmuştur <sup>(35-36)</sup>.

4. Meslek : Mesleki nedenlerin yassı hücreli kanserlerin gelişimindeki rolleri tartışmalıdır. Elçi ve arkadaşlarını<sup>(37)</sup> SSK Okmeydanı hastanesinde yaptıkları araştırmada siliko ve pamuk tozlarına maruz kalan işçilerde , larenks kanseri sıklığının daha fazla olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar ilişkinin supraglottik kanserlerde daha belirgin olduğunu bildirmişlerdir.

5. Diyet : Epidemiyolojik çalışmalar beta karoten ve vitamin-A' nın

epitelyal neoplazmalara karşı koruyucu rollerini göstermektedir. Sigara kullanımının besinlerdeki karetenoidlerin emilimini azalttığı bildirilmektedir<sup>(38-39)</sup>. Basetti ve ark.<sup>(38)</sup> İtalya ve İsviçre de yaptıkları araştırmada yağda kızarmış yiyeceklerle larengeal kanser riskinin arttığını bildirmişlerdir.

6. Gastroözefageal Reflü : Gastroözefageal reflü ile larenks ve farenks kanserleri arasında ilişki olabileceği düşünülmele birlikte bilinen risk faktörlerinin olmadığı larengofarengeal kanserli hastaların ancak küçük bir bölümünde gastroözefageal reflü saptanmaktadır. Buna karşın larenks veya farenks kanserli hastalarda yapılan öiçüm olgularının %36-50 'sinde özefageal asit reflüsü olduğunu göstermektedir<sup>(40-42)</sup> . El-Serag ve ark<sup>(42)</sup> Houston Veterons Affairs Medical Center'da yaptıkları araştırmada gastroözefageal reflü hastalığı olan hastalarda larengofarengeal kanser insidansının arttığını göstermişlerdir. Çok değişkenli bu analizde bu artışın sigara, alkol, yaş ve cinsiyetten bağımsız olduğu bildirilmektedir. Artışın reflünün neden olduğu kronik larenjit ve faranjite bağılı olabileceği düşünülmelektedir.

### **1.3 Toksik Maddelerin Metabolizması (Biyotransformasyon)**

Çeşitli yollarla organizmaya giren lipofilik kimyasal maddeler (kemoterapötik ilaçlar, çevresel karsinojenler ve endojen moleküller v.b.)

enzimlerin katalitik etkisi ile kimyasal reaksiyona girerler ve böylece daha polar ve suda çözünebilir bileşiklere dönüştürülürler. Bu biyolojik reaksiyon sonucu oluşan ürünler safra ve böbreklerden daha kolay atılırlar. İşte bir ksenobiyotiğin canlı organizmada uğradığı bu kimyasal değişimlerin tümüne biyotransformasyon denir. Biyotransformasyon reaksiyon sonucu bileşiğin toksikolojik ve farmakolojik olarak etkisini kısmen veya tamamen kaybettiği düşünülmesine rağmen bazı durumlarda oluşan ürünler kendisinden daha toksik etki gösterebilir veya daha aktif olabilir. Bu reaktif ara ürünlerin oluşmasına “toksikasyon” veya “biyoaktivasyon”; ksenobiyotiğin ve metabolitlerin biyotransformasyon sonucu toksisitesi azalıyor veya ortadan kalkıyorsa bu olaya “detoksifikasyon” denir<sup>(43,44)</sup>.

Ksenobiyotiklerin metabolizması iki fazlı bir işlemdir: Faz I reaksiyon daha çok karaciğerde, mikrozomal enzim sistemi içinde yer alan sitokrom P450 (CYP)'ler tarafından yürütülür. Sınırlı olmakla birlikte; akciğer, böbrek, bağırsak, deri, testis, plenta, adrenal bezde de faz I reaksiyonu gerçekleşebilir. Faz I reaksiyonu ile lipitte çözünen ksenobiyotikler daha polar hale geçerler<sup>(40,45)</sup>.

CYP enzim sistemi multigen süper enzim ailesi olup, çevresel karsinojenleri ve kimyasalları reaktif ara ürünlere metabolize ederler. Bazı durumlarda substratını daha karsinojenik ve mutajenik ürünlere çevirirler. CYP'lerin çeşitli formları vardır ve substrat özgüllükleri ortaktır. Bazı CYP'



ler, örneğin CYP1A1, serbest radikallerin oluşumunda aktiftir. Karsinojenik kimyasallar CYP' ler tarafından reaktif ara ürünlere dönüştürülürken, faz II enzimleri olan GST' ler tarafından detoksifiye edilirler<sup>(45-48)</sup>.

Faz II reaksiyonları birçok sitozolik enzim tarafından yürütülen konjugasyon reaksiyonlarıdır. Detoksifikasyon olarak kabul edilen, konjugasyon reaksiyonları ile endojen maddelerle birleşen polar metabolitler inaktif şekilde eliminasyona uğrarlar<sup>(44,49)</sup>.

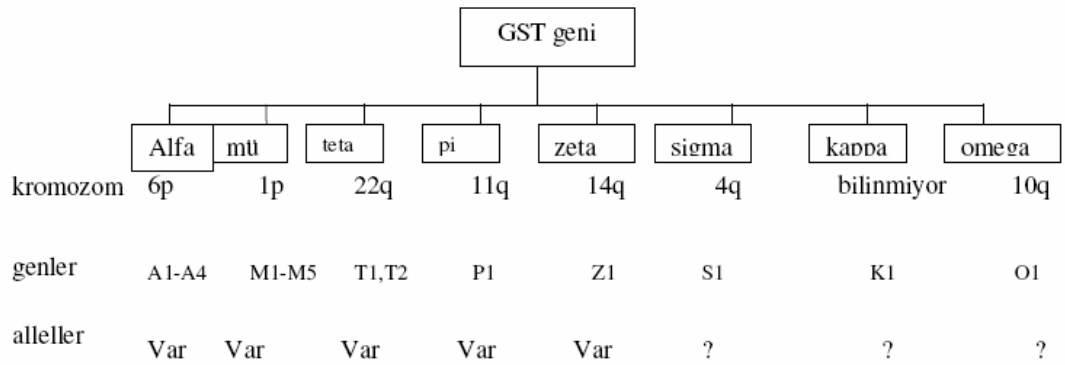
#### **1.4 Glutasyon S-Transferaz**

Glutasyon S- transferaz (GST)'lar karsinojenik substratlar, endojenik ve ekzojenik toksinlerin detoksifikasyonun da rol alan önemli enzim grupları olarak bilinirler. GST enzimleri birçok alt sınıfa ayrılmıştır. Herbir sınıf birçok gen ve enzimden oluşur<sup>(50)</sup>. GST enzimlerinin büyük bir kısmı hücrenin sitoplazmasında çözünmüş olarak bulunur<sup>(51)</sup>. Bir kısmı ise endoplazmik retikulumda (mikromazomal) lokalize olmuştur. Sitozolik GST aktivitesinin mikrozomal aktiviteye göre 5 ile 40 kat daha fazla olduğu saptanmıştır<sup>(44)</sup>. Karaciğer, böbrek, testis, bağırsak ve adrenal bezlerde GST yüksek aktivite göstermektedir<sup>(52)</sup>.

Sitozolik GST izoenzimlerinin tümü molekül ağırlıkları 23 ve 28 kDa olan birbirinin aynı ya da farklı iki dimerik proteinden oluşurlar<sup>(53)</sup>. Pi ve teta sınıfları homodimerik izoenzim formlarını temsil ederken, alfa ve mü sınıfları daha kompleks olup; homodimerik ve heterodimerik izoenzim form çeşitliliği gösterirler<sup>(54)</sup>.

#### 1.4.1 Glutasyon S-Transferazların Sınıflandırılması

GST'ler muhtemelen tek bir ortak atadan gelirler ve bunların substrat özgüllüğünün ve farklılıklarının, dublikasyon, gen rekombinasyonu ve mutasyonların birikmesi ile yeniden şekillendiği düşünülmektedir<sup>(55)</sup>.



**Şekil 1-2** GST Süper gen ailesi <sup>(56)</sup>

İnsanda 8 farklı gen ailesi tarafından kodlanan çözünebilir (sitozolik) GST'ler tanımlanmıştır. Mü 1. kromozom, alfa 6. kromozom teta 22.

kromozom, pi 11. kromozom, zeta 14. kromozom, sigma 4. kromozom, ve omega 10. kromozomda lokalize olmuştur. Kapanın ise kromozomal lokasyonu bilinmemektedir. (Şekil- 1.1) <sup>(56)</sup>

#### **1.4.1.1 Alfa Sınıfı Glutatyon S-Transferazlar**

Kromozom 6p12 üzerinde bulunan alfa gen ailesi tarafından eksprese edilen 4 GST izoenzimi tanımlanmıştır. GST A1 ve GST A2 insan dokularında yüksek düzeyde eksprese edilir. Ancak ekspresyonları bireysel ve dokusal olarak farklılık gösterir <sup>(57,58)</sup>. Alfa sınıfı izozimler karaciğer (GST'lerin %80'inden fazlasını kapsar), böbrek ve adrenal dokuda çok salgılanır<sup>(59)</sup>.

GST alfa izozimlerinin spesifik substratları organik hidroperoksitlerdir. Bu bileşiğe karşı selenyuma bağımlı olmayan GSH peroksidaz aktivitesi gösterirler <sup>(60)</sup>. Özellikle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, linoleik asit gibi hidroperoksitlere yüksek aktiviteyle redükte ederler. İnsan derisinde U.V. ışınlarının yol açtığı oksidatif strese karşı etkili olabileceği düşünülmektedir <sup>(61)</sup>.

#### 1.4.1.2 Mü Sınıfı Glutasyon S- Transferazlar

GST mü sınıfı, 5 izoenzimden (M1,M5) oluşmaktadır<sup>(62)</sup>. Bu genler 1p 13, üzerinde bulunurlar<sup>(63)</sup>. Bu genlerin ekspresyonu dokular arasında geniş varyasyon gösterir. En yaygın eksprese olan gen m1'dir. Kemik, beyin, akciğer, kalp, germ hücreleri kalp, over, böbrek paratiroid, prostat, testis ve uterus gibi organlarda bulunur. GST M2 daha çok iskelet kasıyla sınırlı olup, GST M3 ise kaslara ilaveten beyin, akciğer ve testiste bulunur. GSTM4 insan lenfoblastoid hücre soylarında, GST M5 ise beyinde eksprese edilmektedir<sup>(64-66)</sup>.

GST M1 enzimleri sigara içerisinde bulunan ana karsinojenlerden olan polisiklik aromatik hidrokarbonlardan türemiş epoksitlerin glutasyon konjugasyonlarını katalizler<sup>(67)</sup>. Sigara kullanan ve genetik olarak bu genden yoksun olan kişilerde larenks, akciğer ve mesane kanserinde yakalanma riskinin yüksek olduğu ifade edilmiştir<sup>(68-71)</sup>.

#### 1.4.1.3 Pi Sınıfı Glutasyon S-Transferazlar

Kromozom 11q 13'te haritalanmış olan GST P1 geni, GST P1-1 izoenzimini kodlar<sup>(72)</sup>. Akciğer, özafagus, böbrek ve plasenta gibi birçok

organda eksprese edilir<sup>(73-75)</sup>. Yapılan kapsamlı çalışmalarda GST P1 enzim miktarının; sigara kullanımı ve maligniteyle ilişkili olduğu ifade edilmiştir. GST P1-1 enzimi preneoplazik ve neoplastik lezyonlarda eksprese edilir. GST P1-1 enziminin; mide, mesane, ağız, farinks, larenks, akciğer, deri ve meme tümörlerinde, normal dokuyla karşılaştırıldığında yükseldiği görülmüştür. GST P1-1 enzimleri birçok farklı kanserde uygulanan kemoterapi ve radyoterapiye dirençlilik gösterir<sup>(76)</sup>.

#### **1.4.1.4 Teta Sınıfı Glutatyon S-Transferazlar**

GSTT1 ve GST T2 olan iki teta geni 22q 11,2 bölgesinde 50 kb aralıkta sıralanmıştır<sup>(77)</sup>. Benzer yapıya sahip olan GST T1 8,1 kb, GST T2 ise 3,7 kb uzunluğundadır. İnsanlar arasındaki ekspresyonları çok geniş dağılım gösterir. GST T-1 239 aminoasitten oluşan bir homodimerdir. Beyin, kolon, kalp, böbrek, overler, prostat, testis, timus, tonsil ve uterus gibi başlıca organlarda tespit edilmiştir<sup>(78-80)</sup>.

GST T sınıfı enzimlerden GST-T1 gen ürünü, monoholometan, diclorometan ve etiloksil bileşiklerinin detoksifikasyonunda önemli rol oynar. Bu enzimleri kodlayan genin bulunmaması veya bu genin ürünleri olan enzimlerin eksikliği akciğer, mesane ve larenks gibi sigarayla ilişkili kanserlerin riskinin arttığı bulunmuştur<sup>(81,82)</sup>.

### 1.4.2 Glutasyon S-Transferazların Substratları

Glutasyon S-transferaz enzimleri endojen moleküller (C-Hidroksil-2-nored, Adenin propenol, koletrol-5, 6-Oksit, Dopominokren vb.), kemoterapik ilaçlar (Sisplatin, Klorambust, siklofomib vb), çevresel karsinojenler (Bütodien, Akrolein, İrikloroetien vb) olmak üzere ksenobiyotiklerin geniş spektrumu detoksitiye ederler<sup>(83)</sup>.

GST izozimlerinin spesifik substratları GST Pi için 3-dikloro-4-12-metilen butiril feroksi asetik asit (Etakrinik asit), GST alfa için organik hidro peroksitler, GST mü için 1,2-dikloro-4-nitrobenzen, GST teta için 1,2-epoksi-3-(p-nitro feroksi) propen ve GST zeta z-bütül hidro peroksit, GST sigma için 1-koloro-2,4-dinitrobenzendir<sup>(83)</sup>.

### 1.4.3 Glutasyon S-Transferaz'ların Biyolojik Rolü

GST'ler çok sayıda ksenobiyotik, sitotoksik ajanların ve kanserojenlerin metabolizmasından sorumlu enzimlerdir. Bu enzim geniş bir yelpazede yer alan organik bileşiklerle glutasyonun reaksiyona girmesi ve tiyoester oluşmasını bazen de detoksifikasyonun ilk adımında yeralarak merkaptürik asit oluşumunu katalizler<sup>(84)</sup>. Bu reaksiyonlar sonucu oluşan

merkaptürük asit (N-asetil sisteyin) vücuttan idrarla atılır<sup>(85)</sup>. Ayrıca GST'lerin hücrede lipit peroksidasyon ve serbest radikal oluşumu ile ilgili ortaya çıkan propenollerin ve doymamış aldehit ürünlerinin detoksifikasyonunda rol aldıkları gösterilmiştir<sup>(86)</sup>.

#### **1.4.4 Glutasyon S-Transferaz Ve Larenks Kanseri**

Ünal M. ve arkadaşları<sup>(87)</sup>, Larenks skuamöz hücreli karsinomlu hastalarda ve kontrol gruplarıyla yaptıkları çalışmalarında GST M1 ve P1 gen polimorfiziminin hasta gruplarında farklı çıkmadığını, fakat GSTT1 null genotipinin larenks kanserinde kontrol gruplarına kıyasla arttığını göstermişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise GST M1 ve T1 genotipinin baş-boyun kanser riskini arttırdığı bulunmuştur<sup>(88)</sup>.

Jourenkova N. Ve arkadaşları<sup>(89)</sup>; hepsi sigara içen 129 larenks kanserli, 172 kontrol grubuyla yaptıkları çalışmada GST M<sub>1</sub> ve GSTT1 null genotipinin kanser riskini arttırdığını; GSTT1 ve M<sub>1</sub> 'in ikisinin null olduğu durumlarda kanser riskinin 2 kat arttığını belirlemişlerdir.

162 baş-boyun skuamöz hücreli karsinomlu hasta ve 315 kontrol grubuyla yapılan çalışmada hastaların %53,1'inde ve kontrollerin %42,9'unda

GST M1 null, fakat hastaların %32,7'sinde ve kontrollerin %17,5'inde GSTT1 null bulunmuştur. Her iki null genotipinin yaş, cinsiyet, sigara içme, alkol kullanımı gibi risk faktörleriyle bir ilişki bulunamamıştır. GST M1 ve T1 null genotipleri hastalarda risk faktörlerinden bağımsızdır fakat sigaraya bağlı kanserlerde genetik duyarlılık için bir belirleyicidir <sup>(90)</sup>.

Çalışmaların birçoğu GST izozimlerinin null genotiplerinin kanser riskinin olduğunu söylese de bazı çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Larenks kanserli hastaların %80'i, kontrol grubunun %50'sinde GST M1gen delesyonu bulunmasına rağmen GSTT1'in kontrol ve kanserli grup arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır. GST M1 gen delesyonunun larenks kanseri olma riskini belirlediği gösterilmiştir<sup>(91)</sup>. 235 baş-boyun skuamöz hücreli kanserli hasta ve 285 kontrol grubuyla yaptıkları çalışmada kanserli hastaların %12,3'ünde kontrol grubunun %13,6'sında, GST P1 (+) bulunmuştur. GSTP1 genetik polimorfizminin baş-boyun skuamöz hücreli kansere duyarlılığı değiştirmede pek bir rolü olmadığı düşünülmektedir <sup>(92)</sup>.

Konig ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; baş-boyun kanserli hastalarda GST enzim aktivitesinin tümörlü dokularda normale göre azaldığı tespit edilmiştir<sup>(93)</sup>. Larenks ve farenks skuamöz hücreli karsinomlarda radyoterapiden önce ve sonra immünohistokimya yöntemiyle GSTP salınımına bakılmış ve bir fark bulunamamıştır. Ayrıca, GSTP ekspresyonunun



diferansiasyon derecesiyle bağlantılı olduğu görülmüştür. G1 evresindeki tümörlerde GSTP salınımı %88, G2'de %65,7, G3'te %15,4 bulunmuştur. GSTP ekspresyonunun radyasyona duyarlılığı belirlemede direk rolü yoktur. Diğer bazı faktörlerin bu rolü belirlemede etkili olabileceği düşünülmektedir (94).

Bir çalışmada baş-boyun kanserli hastalarda GSTP seviyesi ve TNM sınıflandırılması arasında önemli bir ilişki bulunamamış; bu nedenle GSTP1-1' in baş-boyun kanserinde plazma belirleyicisi olarak kullanılamayacağı gösterilmiştir<sup>(95)</sup>. Başka bir çalışmada GSTA, GSTP ve GSTM4'e bakılmış,14 larenks kanserli hastanın 11'inde GST enzim aktivitesinin 3 katı arttığı belirlenmiştir<sup>(93)</sup>.

## 1.5 P53'ün Yapısı Ve Fonksiyonu

İlk olarak 1979 yılında, onkogen olarak tanımlanan p53 genin<sup>(97)</sup> ürünü transkripsiyon faktörü olarak işlev gören 393 aminoasitten oluşan, tetramerik yapılı nükleer bir fosfoproteindir. “ Genomun gardiyanı” olarak tanımlanan normal p53 (wilde-type) tümör baskılayıcı geni, genomun bütünlüğünü koruyarak hücresel döngünün güvenli bir şekilde devam etmesini sağlar<sup>(98-102)</sup>.

Tümör baskılayıcı gen olan p53, çok çeşitli insan kanserlerinde rol oynamaktadır. p53 mutasyonları meme, akciğer, mesane ve kolon kanserini içeren pekçok kanser çeşidinde bulunmuştur. Tüm kanser vakalarının yarısının p53 genindeki mutasyonlarla ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Bu tahmin, P53'ün hücre çoğalmasında anahtar bir olayı kontrol ettiğini ve bu regulasyonun hücreye veya dokuya özgül olmadığını akla getirir <sup>(103)</sup>.

Çalışmalar normal hücrelerin düşük düzeyde P53 proteini içerdiğini göstermiştir<sup>(103)</sup>. P53 proteini radyasyona duyarlılığından dolayı iki yola girer. 1. DNA'da hasar oluşturan U.V. ışınlar, doğal tip (normal) P53 protein düzeyini güçlü bir şekilde artırır ve bu yüzden hücresel döngüyü G1 fazında durdurarak, DNA hasarının onarımı için uygun zaman sağlar<sup>(104)</sup>. 2. yolda ise hata tamir edilmezse P53, hücrenin bölünmesini durdurur ve hücreyi apoptoza yönlendirir <sup>(105)</sup>.

Farklı mutasyonlar p53'ü değiştirerek farklı özellikler kazanmasına neden olurlar <sup>(106)</sup> ve proteinin yapısı değiştiği için DNA'ya bağlanamaz. Genin tek alelinde meydana gelen mutasyon hücrede fonksiyonel P53 proteini yokmuş gibi davranır. Mutant alel normal alelin fonksiyonunu engellediği için "dominant negatif" denir. Bu genin homozigot kaybı, DNA hasarının onarılmamasıyla sonuçlanır ve hücre malign yönde değişime uğrar <sup>(107)</sup>.

Hücre döngüsünün kontrolünde p53 geninin esas rolü, kanser ve hücre döngüsüyle, kanser ve hücre büyümesini düzenleyen genler arasındaki ilişkilerin önemini ortaya koymaktadır <sup>(103)</sup>.

### 1.5.1 P53 Ve Larenks Kanseri

Larengeal kanserler de dahil olmak üzere insan epitelyal kanserleri arasında görülen en yaygın mutasyon p53 değişimidir ve bu değişimin frekansı invaziv lezyonlarda, invaziv olmayan lezyonlara göre %60-81 oranında artarak devam eder .

Friedman ve arkadaşları <sup>(108)</sup> evre III ve IV larenks skuamöz hücreli karsinomlu olan 69 hastanın 39'unda P53'ün yüksek düzeyde ekspres edildiğini göstermiştir. Erken evredeki larenks kanserli 63 hastada yapılan çalışmada evre ve histolojik differansiasyon ve hastalığın gidişatıyla P53 ekspresyonu arasında bir ilişki bulunamamıştır<sup>(109)</sup>. Bir çalışmada ilerlemiş larenks kanserlerinin %62'sinde (16 hastanın 12'sinde) P53 overekspresyonu görülmüş, p53 genetik mutasyonu görülmemiştir. Ayrıca tümörlerin %39'unda (18 hastadan 7sinde) P53 overekspresyonu olmamış fakat p53 mutasyonu olduğu görülmüştür. Yapılan bu çalışmada P53 mutasyonlu, ileri larengeal karsinomlu hastaların yaşama oranında düşüş olduğu gösterilmiştir <sup>(110)</sup>. Yakın zamanda yapılan immünohistokimyasal bir çalışmada, 86 hastanın

%60'ında P53'ün over ekspresyonu görülmüş ve bunların %23'ü zayıf pozitif, %36'sı orta pozitif, %40'ında şiddetli pozitiflik bulunmuştur<sup>(111)</sup>.

İmmünohistokimyasal ve moleküler tekniklerle yapılan bütün araştırmalar erken evredeki larengeal skuamoz hücreli kanserlerde P53'ün prognostik marker olarak kullanılamayacağı sonucuna varılmıştır<sup>(112)</sup>.

## 1.6 Çalışmanın Amacı

Larenks kanseri tüm kanser çeşitlerinin 2,2%'sini oluşturmaktadır<sup>(15)</sup>. Tüm dünyada yılda 142,168 erkekte (ölüm sayısı 78,573) ve 19,235 kadında (ölüm sayısı 10.517) larenks kanser olgusuna rastlanmıştır. Türkiye'de ise yılda 168 kişide görülmüş ve 103'ü ölümlle sonuçlanmıştır<sup>(113)</sup>. 1956 yılında erkek-kadın arasındaki görülme oranı 15:1 iken; son zamanlarda bu oran 5:1 şeklinde dramatik bir şekilde artış göstermiştir. Bu değişim, kadınların son yıllarda sigara kullanımının artmasının yanı sıra alkol, reflü, beslenme alışkanlığı, virüsler gibi nedenlerinde larenks kanserinde önemli etiyolojik faktörler olduğu bilinmektedir<sup>(1)</sup>.

Larenks kanserinde, tümörün lokalizasyonu, evresi, diferansiasyonu prognostik faktörler olarak bilinmekte ve klinikte tedavi uygulamaları bu

parametrelere göre seçilmektedir. Bu parametrelerin, tümörün erken teşhisi, gelişim süreci ve uygulanacak tedaviyi belirlemede yetersiz kalması yeni prognostik faktörlerin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Karsinojenleri metabolize eden enzimler, çeşitli kimyasal karsinojenlerin aktivasyonu ve deaktivasyonunda görevlidir. Bu enzimlerin hedef dokulardaki ekspresyonlarında kişiler ve ırklar arasında değişimler klinik ve epidemiyolojik çalışmalarda gözlenen duyarlılıktaki farklılığı açıklayabilir<sup>(114)</sup>. GST genelde karsinojenlerin detoksife eden faz II metabolizmasında rol almaktadır. GST P insan skuamöz epitelinde eksprese olduğu gösterilmiştir<sup>(115)</sup>. Araştırılmış olan insan tümörlerinin normal dokusuna kıyasla, GST P akciğer, mide, kalın bağırsak, mesane ve serviks dokularında daha yüksek seviyede eksprese edildiği saptanmıştır<sup>(116)</sup>. GST'nin farklı izozimlerinin o dokunun farklı substrat spesifikliğini göstermektedir. Bu dokunun substratlara karşı detoksifikasyon kapasitesini etkiler<sup>(117)</sup>.

Karsinojenlerin metabolitleri ve karsinojenler, tümör süpresör genler ve protoonkogenlerin fonksiyonunu mutasyon yoluyla değiştirip malign transformasyona neden olurlar<sup>(118)</sup>. Sonuç olarak p53 geninin ekspresyonunda larenks kanserinde sigaranın karsinojenik etkisi için araştırılması gerekmektedir.

GST izozimleri ve P53'ün larenks kanserinde önemli olduğu

görülmektedir. Çalışmamızda bu faktörlerin larenks kanserinde tümör belirleyicisi olarak kullanılabilirliği immünohistokimya yöntemiyle tespit edilecektir. Ayrıca bulgularımız klinik parametrelerle ilişkilerine bakılarak hastalığın gidişatı hakkında kullanılabilirliği değerlendirilecektir.

## 2 MATERYALVE YÖNTEM

### 2.1 Materyal

#### 2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Primer Antikor (GSTA,GSTM4,GSTP,GSTT1,P53)

Sekonder Antikor (Biotinylated secondary antikor), (Dako)

TBS buffer (Thermo, USA)

%30' luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Solusyonu (Sigma)

Ksilol (Merck)

Etanol (Merck, Almanya)

Metanol (Merck, Almanya)

Sodyum sitrat (Sigma)

Sitrik asit (Sigma)

Protein Blokajı (Normal Swine Serum, Normal Goat Serum)(Dako)

ABC HRP(Avidin Biotin Complex Horse Radish Peroxidase), (Dako)

Hematoksilen (Shandon)

DAB (Diamino benzidin) (Dako)

### 2.1.1.1 Solusyonların Hazırlanışı

- I. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Blokajı Solusyonunun Hazırlanışı: 30 ml %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üzerine 470 ml methanol ilave edilerek hazırlandı.
- II. Antijen Retrival Solusyonunun Hazırlanışı (0,01 M, pH: 6.0):  
2,101 gr sitrik asit (A) 100ml distile suda; 0,1 M 14,7 gr sodyum sitrat (B) 500ml distile suda; çözüldü. 9 ml A solusyonundan,41 ml B solusyonundan alınarak 500 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 1lt'ye tamamlanır. (1 ml TBS 100ml distile suyla seyreltilerek kullanılır.)

### 2.1.2 Kullanılan Cihazlar

Etüv

-20'lik derin dondurucu ve buzdolabı

pH-metre

Vortex



Rotatör

Düdüklü tencere

Isıtıcı

Fotoğraf makinesi

Terazi

Işık mikroskop

## **2.2 Kullanılan Yöntemler**

### **2.2.1 Materyal Kazanımı Ve Hazırlanışı**

Çalışmada Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma hastanesine 2004-2006 yılları arasında başvuran, larenks kanser tanısı konmuş ve kemoterapi ile radyoterapi uygulanmamış, 44 erkek ve 4 kadın olmak üzere 48 hastadan alınan larenks tümörlü ve normal doku (tümöre uzak) örneklerinde çalışıldı. Çalışma materyalleri operasyon sırasında klinisyen tarafından larenjektomi, tiroidektomi, boyun diseksiyonu yöntemiyle alındı ve dokulardan patoloji kliniğinde parafin bloklar hazırlandı ve bu bloklardan her bir vaka için poly-L-lysin kaplı lamlara 5 kesit alındı. 48 hastanın tamamına GST izozimleri ve P53 uygulanmasına rağmen; GSTA'da 43, GSTP'de 42, GSTT1' de 46 ve GSTM4'te 35 ve P53'te 44 vaka değerlendirilebildi. Diğer vakalar elimine edildi.

Hastalara ait tümör dokularının klinik evrelendirmesine TNM evreleme sistemi <sup>(29)</sup>; tümör dokusunun differansiasyon değerlendirmesi için üçlü derecelendirme(grade) sistemi kullanılmıştır. Bu değerlendirme proje çalışması içerisinde yer alan patolog tarafından yapıldı.

Hastalara ait yaş, sigara kullanım durumu, tümör tipi, tümör yerleşim bölgesi, grade, TNM ve evreyle ilgili hasta bilgileri çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Hasta	Yaş(Cinsiyet)	Sigara Durumu(paket/yıl)	Grade	Evre	Tümör yerleşim yeri
1. E.K	60(E)	1p/20	2	2	Glottik
2. FK	60(E)	1P/40	2	-	Glottik
3. C.G	54(E)	1P/20	2	4A	Glottis,İnfrasupraglottik
4. S.K	56(E)	1P/20	3	4B	Transglottik
5. C.I	49(E)	1P/20	2	-	Supraglottik
6. A.Y	54(E)	-	1	3	Glottik
7. D.Y	- (E)	1P/30	2	4A	Supraglottik
8. R.A.Ö	71(E)	-	-	4A	Glottik
9. M.T	50(E)	-	2	3	Supraglottik
10. İ.Ç.	51(E)	1P/20	2	4A	Supraglottik
11. Ş.Y.	62(E)	1P/20	2	2	Supraglottik
12. F.D.	65(E)	2P/30	1	3	İnfrasupraglottik
13. M.Ö.	54(E)	1P/40	1	4A	Supraglottik
14. Y.G.	-(E)	1P/20	2	3	Supraglottik
15. A.A.	42(E)	-	2	4A	Supraglottik
16. A.T.	49(E)	1P/40	2	4A	Supraglottik
17. İ.S.	67(E)	1P/40	2	-	Glottik
18. H.Ç.	60(K)	2P/40	2	4A	Glottik
19. S.B.	52(E)	1P/25	2	3	Glottik
20. E.T.	38(E)	-	2	3	Supraglottik
21. B.Ö.	73(E)	1P/10	2	4A	Supraglottik
22. H.D.	60(E)	2P/45	2	4A	Glottik
23. A.M.	67(K)	1P/25	2	3	Supraglottik
24. B.G.	76(E)	1P/50	2	3	Glottik
25. H.B.	67(E)	3P/40	2	3	Supraglottik
26. M.D.	46(E)	1P/30	3	4A	Supraglottik
27. K.Y.	53(E)	1P/35	2	3	Supraglottik
28. Ş.U.	75(E)	-	2	-	Supraglottik
29. P.P.	76(E)	S(-)	1	4A	Glottik
30. İ.O.	-(E)	1P/45	2	3	Glottik
31. A.U.	60(E)	-	2	-	Glottik
32. P.F.	72(E)	-	2	2	Glottik
33. A.Z.	67(E)	-	2	-	Glottik
34. M.Ç.	68(K)	-	2	-	Glottik
35. A.Ç.	71(E)	2P/60	2	-	Glottik
36. K.S.	52(E)	-	2	3	Glottik
37. F.Y.	52(E)	1P/35	2	3	Supraglottik
38. F.S.	60(E)	2P/40	2	4A	Glottik
39. N.U.	71(K)	1P/20	2	3	Glottik
40. Ş.G.	49(E)	1P/30	2	-	Glottik
41. A.T.	69(E)	-	2	3	Supraglottik
42. F.T.	62(E)	-	2	3	Supraglottik
43. M.B.	61(E)	-	2	3	Supraglottik
44. E.F.	-(E)	-	2	3	Supraglottik
45. D.A.	38(E)	1P/20	2	2	Glottik
46. R.K.	62(E)	2P/30	2	2	Supraglottik
47. N.S.	54(E)	-	2	3-	Supraglottik
48. H.A	50(E)	-	3	4A	Supraglottik

Çizelge 2-1 Larenks Skuamöz Hücreli Kanserli Hastaların Özellikleri

## 2.2.2 İmmünohistokimya Prosedürü <sup>(119)</sup>

### I. Dokuların Deparafinizasyonu

- 1) Etüvde 70C'de 1 saat bekletildi.
- 2) Isınmış ksilolde 10 dakika bekletildi.
- 3) Etüvden çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığında soğuma işlemi için 10 dak. bekletildi.
- 4) -Absolü alkolde 1dak.  
-Absolü alkolde 1dak.  
-Absolü alkolde 1 dak.  
-Distile suda 1-2 dak. bekletildi.

### II. Basamak

- 1) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blokajı ile endojen peroksidaz aktivitesinin inhibisyonu (10 dakika)
- 2) Çeşme suyunda 5 dak. bekletildi.
- 3) TBS'e batırılıp, çıkarıldı.
- 4) Antigen Retrieval Solusyonu içinde düdüklü tencerede 3 dakika kaynatıldı.
- 5) "Protein Blocking Solution" ile non spesifik boyanma inhibisyonu için uygulandı (30 dakika)

- 6) Primer antikor uygulandı (60 dak.)
- 7) TBS ile 3defa yıkama yapıldı ve her yıkamada 5 dak. bekletildi.
- 8) Sekonder antikor uygulandı (60 dakika)
- 9) TBS ile yıkandı (3x5 dakika)
- 10)Streptavidin-peroksidaz kompleksi uygulandı (30 dakika)
- 11)TBS ile yıkandı(3x5dakika)
- 12)DAB (10 dakika uygulandı)
- 13)Distile H<sub>2</sub>O (1 dakika)

### **III. Basamak: Hematoksilen Boyaması**

- 1) Hemotoksilen 1dak.
- 2) Distile H<sub>2</sub>O 1 dak.
- 3) Absolü Alkol1 dak.
- 4) Absolü Alkol 1 dak.
- 5) Absolü Alkol 1 dak.
- 6) Absolü Alkol-ksilol 1dak.
- 7) Ksilol 1 dak.

Poly-L-lysin kaplı lamlara alınan doku kesitleri deparafinizasyon işleminden sonra immünohistokimya (IHC) yöntemi ile GSTA (1:100),GSTM4(1:50), GSTP (1:100), GSTT1(1:200) ve P53(1:100) antiserumları(antikorları) bölüm 2.2.2.'de ayrıntılı olarak açıklanan prosedüre göre boyandı. IHC uygulanan preparatlar ışık mikroskobunda boyanma şiddetine ve boyanma yüzdelerine

bakılarak patolojla birlikte değerlendirmeleri yapıldı ve fotoğrafları çekildi. Deęerlendirmede boyanma şiddeti için; boyanma olmaması durumu (-), zayıf boyanma (1+), orta şiddette boyanma (2+), şiddetli boyanma (3+) olarak; boyanma yüzdesi için hücrelerin; %0 için boyanma yok, %0-10 için (1+), %11-50 için (2+) ve >%50 için (3+) olarak değerlendirme yapıldı.

### **2.2.3 İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

Tümörlü ve normal hücrelerin karşılaştırılmasında Wilconson Signed Ranks Test; tümörlü hücreler ile klinik parametreler (evre, grade, sigara durumu) arasındaki ilişki için Sperman Rank Test uygulandı. Bu analizlerde SPSS-15 sürümü kullanıldı.

### 3 ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 3.1 P53 ve GST İzozimlerinin Normal ve Kanserli Larenks

##### Dokularındaki Dağılımı

Aynı hastalara ait larenks tümörlü ve normal hücrelerdeki GST izozimlerinin ve P53'ün dağılımını karşılaştırabilmek için Wilcoxon Signed Ranks Testi uygulandı. Analiz sonuçları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

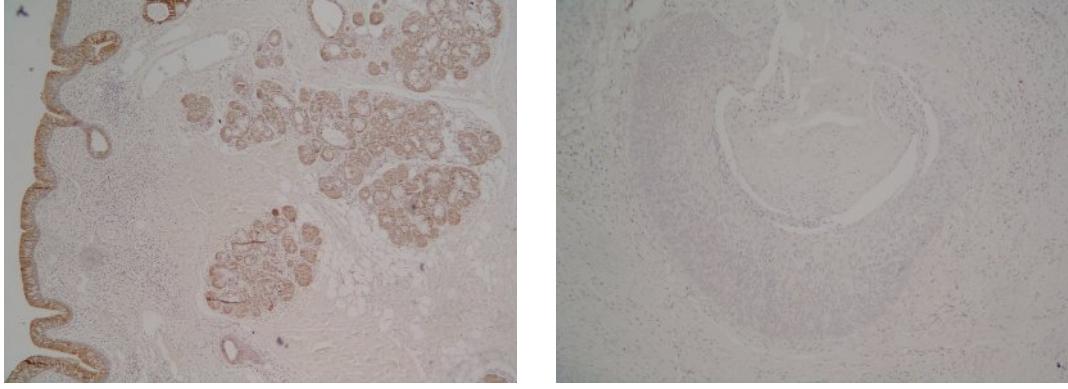
	GST ALFA		GST P		GST TETA 1		GST MÜ 4		P 53	
	T	K	T	K	T	K	T	K	T	K
(-)	29	1	-	2	1	-	1	1	6	43
(1+)	8	13	5	17	8	3	24	19	18	-
(2+)	6	29	27	18	36	41	10	15	15	1
(3+)	-	-	10	5	1	2	-	-	5	-
Toplam	43	43	42	42	46	46	35	35	44	44
Asymp. Sig.(p)	,000		,000		,013		,025		,000	
0%	29	1	-	2	1	-	1	1	6	43
1-10 %	4	6	-	6	-	-	1	-	12	1
11-50%	7	5	4	8	10	4	19	17	9	-
>50 %	3	31	38	26	35	42	14	17	17	-
Toplam	43	43	42	42	46	46	35	35	44	44
Asym.Sig.(p)	,000		,001		,011		,102		,000	

Çizelge 3-1 GST izozimlerinin ve P53'ün tümörlü ve normal larenks dokularındaki dağılımı ( T: tümör, K: kontrol (normal)) (p<0,05)

### 3.1.1 GST İzozimlerinin Dağılımları

43 larenks kanserli hastanın tümörlü ve normal dokusunda GSTA' nın dağılımı incelenmiştir (Çizelge 3.1). Boyanma şiddetine göre tümörlü hücreler 29 vakada (-), 8 vakada (1+), 6 vakada (2+) boyanma göstermiş, (3+) boyanma gösteren vakaya rastlanmamıştır. Normal hücrelerde ise 1vaka (-), 13 vaka (1+), 29 vaka (2+) şiddetle boyanmıştır. Tümörlü hücrelerde olduğu gibi (3+) boyanma normal vakalarda da görülmemiştir. Hücrelerin boyanma yüzdelerine göre gruplandırıldığında 29 tümör vakasında boyanma olmazken, normal hücrelerde 1 vakada boyanma görülmemiştir. Tümörlü hücrelerde 4 vaka, normal hücrelerde 6 vaka %1-10 arasında boyanma; tümörlü hücrelerde 7 vaka, normal hücrelerde 5 vaka %11-50 arasında; tümörlü hücrelerde 3 vaka, normal hücrelerde 31 vaka %50'nin üstünde boyanma göstermiştir. Verilerde de görüldüğü üzere GSTA, normal hücreler, tümörlü hücelere göre hem boyanma şiddeti hem de boyanma yüzdesi bakımından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. GSTA tümörlü dokuyu (-) boyarken, normal dokuyu (+) boyamıştır ( $p<0,05$ ) (Şekil3.1).

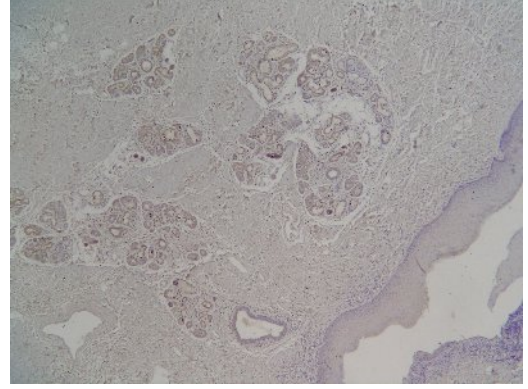
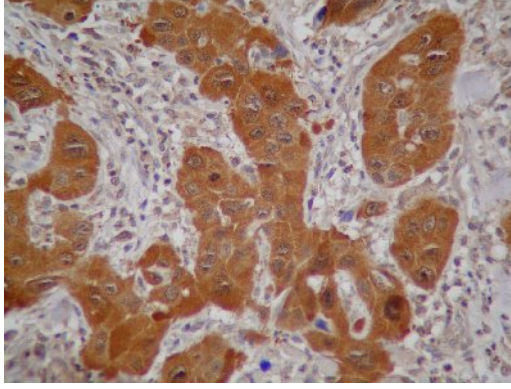




**Şekil 3-1a) Normal yüzey epiteli ve glandlarda GSTA ile (1+) boyanma x50**

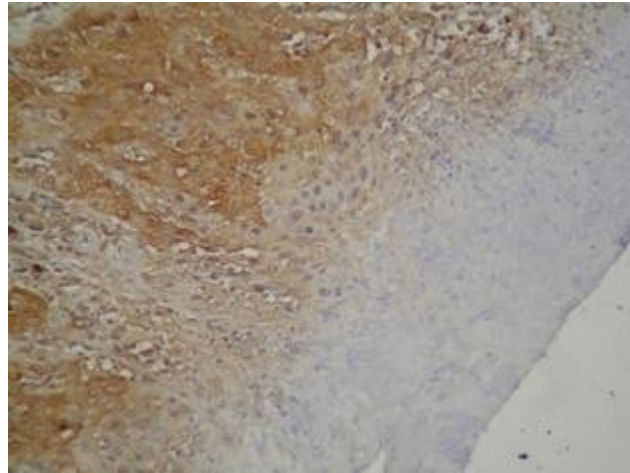
**b)GSTA ile (-) boyanmış tümör hücresi x50**

Aynı hasta grubuna ait , 42 tümörlü ve normal larenks dokusunda GSTP incelenmiştir (Çizelge 3.1). Boyanma şiddeti açısından tümörlü dokularda (-) boyanma görülmezken 2 vakaya ait normal dokuda (-) boyanma belirlenmiştir. 5 vakada tümörlü hücrelerde, 17 vakada normal hücrelerde (1+) boyanma; 27 vakada tümörlü hücrelerde, 18 vakada normal hücrelerde (2+) boyanma; 10 vakada tümörlü hücrelerde, 5 vakada normal hücrelerde (3+) boyanma görülmüştür. GSTP'nin tümör ve normal hücreleri boyama yüzdesine bakıldığında, %0 ve %1-10 değerlerine tümörlü hücrelerde rastlanmamış; normal hücreler 2 vakada %0, 6 vakada %1-10 arasında boyanma göstermiş, tümörlü hücreler 4 vakada, normal hücreler 8 vakada %11-50 arasında boyanma göstermiş, 38 tümörlü ve 26 normal vaka >%50 boyanma göstermiştir. GSTP, tümörlü hücrelerde normal hücrelere göre daha fazla eksprese edilmektedir (Şekil 3.2)



**Şekil 3-2 a)Tümörlü dokuda GST P (3+) boyanma x 200**

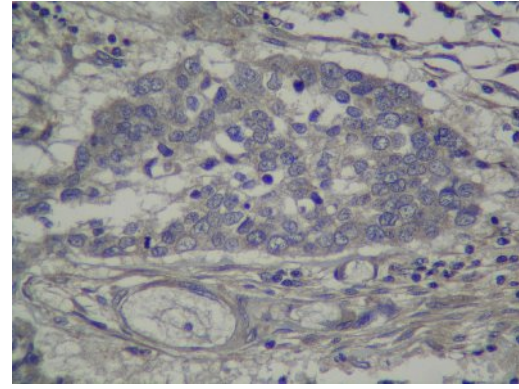
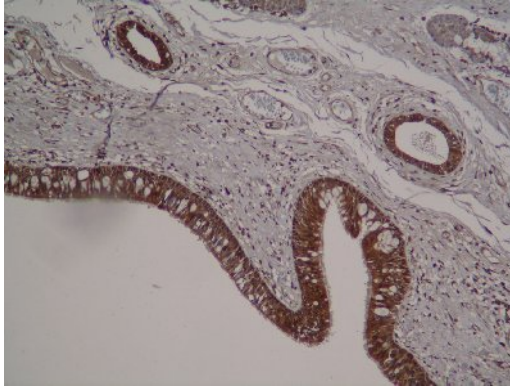
**b) Normal yüzey epitelinde boyanma olmaması ve komşu glandlarda GST P hafif pozitif boyanma X 50**



**Şekil 3-3 GST P boyanmayan normal yüzey epiteli ve tümörde (2+) boyanma X 200**

46 larenks kanserli hastanın tümörlü ve normal dokusunda, GSTT1 incelenmiştir (Çizelge 3-1).Tümörlü hücreler 1 vakada (-) boyanma gösterirken, normal dokularda (-) boyanma gösteren vakaya rastlanmamıştır. Tümörlü 8 vaka ve normal 3 vaka(1+) boyanma şiddeti, 36 tümörlü vaka , 41

normal vaka (2+) boyanma; 1 tümörlü vaka, 2 normal vaka (3+) boyanma şiddeti göstermiştir. GSTT1 'in tümörlü ve normal dokuda dağılım yüzdeleri ise; %0 boyanan 1 tümörlü vakaya karşılık, %0 boyanma normal vakada görülmemiştir. Ne tümörlü ne de normal vakalarda %1-10 boyanmaya rastlanmamıştır. 10 tümörlü ve 4 normal vakada %11-50, 35 tümörlü ve 42 normal vakada >%50 boyanma görülmüştür. GSTT1 normal hücreleri tümörlü hücrelere göre daha fazla boyamıştır ( $p<0,05$ ) (Şekil 3-4).

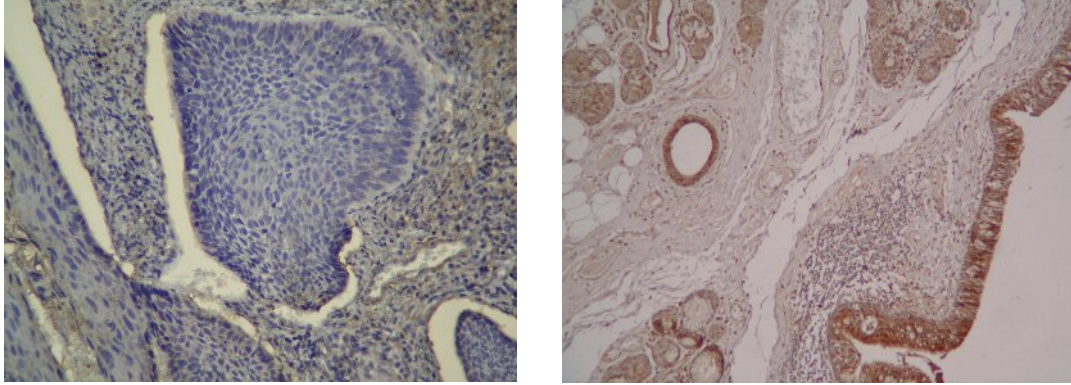


**Şekil 3-4 a)GST T1 Normal yüzey epiteli ile normal glandlarda (1+) boyanma X 50**

**b)GST T1 ile tümörde (-) boyanma X 200**

35 larenks kanserli hastanın tümörlü ve normal dokusunda, GSTM4 incelenmiştir(Çizelge 3-1). Tümörlü ve normal 1 vaka (-) boyanma göstermiş, 24 tümörlü ve 19 normal vaka (1+) boyanma, 10 tümörlü ve 15 normal vaka (2+) boyanma göstermiş, normal ve tümörlü vakaların hiçbirinde (3+) boyanma görülmemiştir. GSTM4 'ün normal ve tümörlü vakalardaki dağılım yüzdesi; 1 tümörlü ve 1 normal vakada %0, 1 tümörlü vakada %1-10 arasında boyanma görülürken, normal vakada görülmemiş, 19 tümörlü ve 17

normal vakada %11-50 arasında, 14 tümörlü ve 17 normal vakada ise >%50 boyanma görülmüştür. GSTM4 'de normal hücrelerde tümörlü hücelere göre daha fazla eksprese edilmiştir ( $p<0,05$ ) (Şekil 3.5).



**Şekil 3-5 a)GST M4 ile tümörde boyanma olmaması x 100**

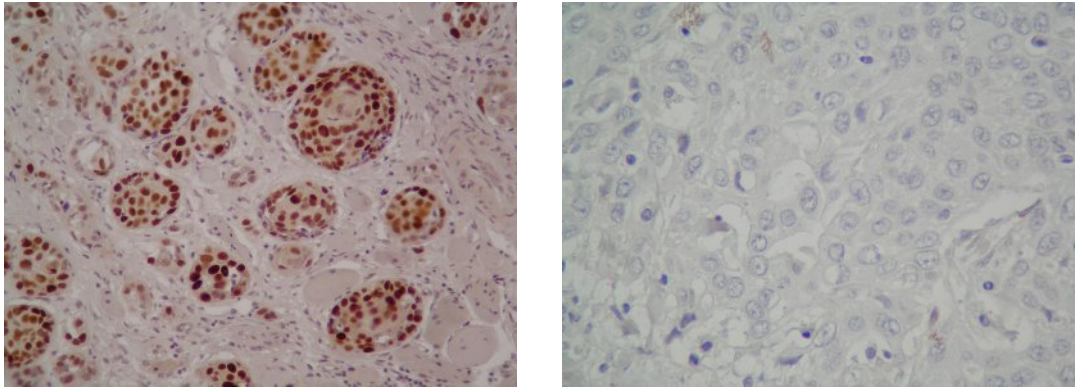
**b)GST M4 ile normal yüzey epitelyumu ile normal glandlarda (2+) boyanma X50**

### **3.1.2 P53 Doku Dağılımı**

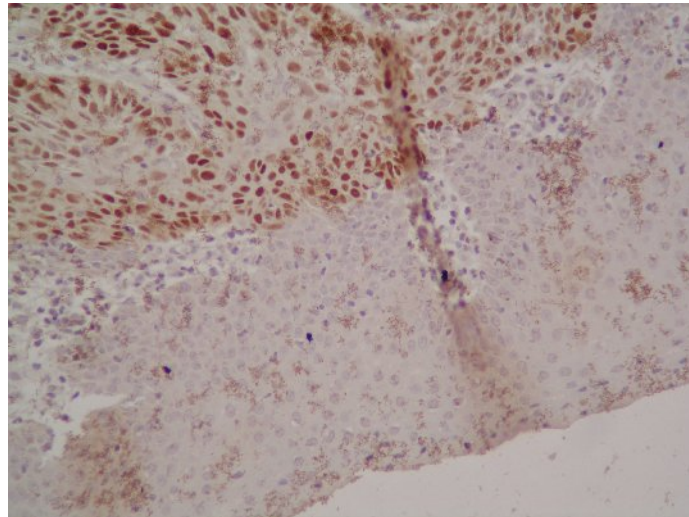
44 larenks kanserli hastanın tümörlü ve normal dokularında P53 incelenmiştir(Çizelge 3.1). Hücrelerin boyanma şiddetlerinin dağılımı; 6 tümörlü ve 43 normal vakada (-) boyanma, 18 tümörlü vakada (1+) boyanma varken normal vakalarda (1+) boyanma görülmedi.15 tümörlü ve 1 normal vakada (2+) boyanma, 5 tümörlü vakada (3+) boyanma varken normal vakalarda (3+) boyanma görülmemiştir. Boyanma yüzdelerine göre; 6 tümörlü ve 43 normal vakada boyanma görülmezken; 12 tümörlü ve 1 normal



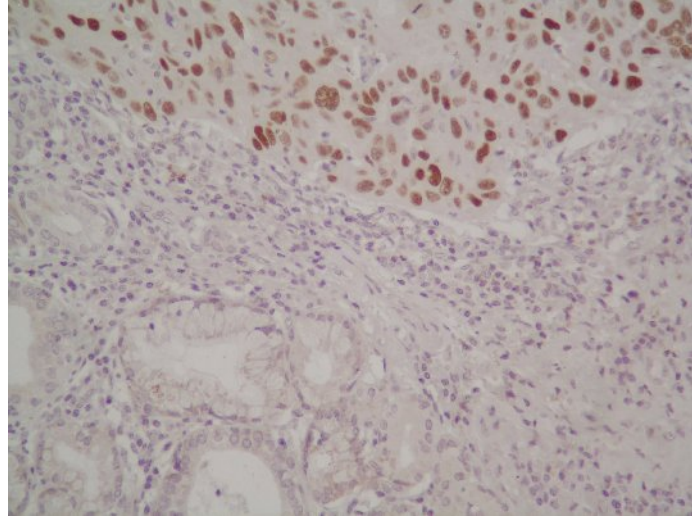
vakada %1-10 arasında boyanma, 9 tümörlü vakada %11-50 arasında boyanma, 17 tümörlü vakada >%50 boyanma görülmüştür. Normal vakalarda %11-50 ve >%50 boyanma görülmemiştir. P53, tümörlü hücrelerde normal hücrelere göre daha fazla eksprese edilmiştir ( $P<0,05$ ) (Şekil 3.6, Şekil 3.7, Şekil 3.8).



**Şekil 3-6 a) P53 ile tümörde nükleer (+) boyanma X 100 b)P53 ile tümörde (-) boyanma X 200**



**Şekil 3-7 P53 ile boyanmayan yüzey epiteli ile tümörde (1+) boyanma X 100**



**Şekil 3-8 P53 ile tümörde (+) boyanma ve normal glandlarda boyanma olmaması X 100**

### **3.2 P53 ve GST İzozimlerinin Klinik Parametrelerle Karşılaştırılması**

48 larenks kanserli hastadan; 39 hastanın klinik evrelemesi, 47 hastanın differansiasyon derecesi(grade), 32 hastanın sigara içim yılı ve 43'ünün yaşları bilinmektedir. Bu özelliklerin ortalamalarına bakıldığında hastaların 18'i evre3 ve 39'u grade 2 özelliği gösterirken, 17'si 30 yıl ve daha az süreyle günde en az 1 paket sigara içtiği, 1 hastanın hiç sigara kullanmadığı bilinmektedir. Hastaların yaş ortalamaları 59' dur. (Çizelge 3.2)

		Evre	grade	Sigara içim yılı	Yaş
N	Geçerli	39	47	32	43
	Bilgi olmayan	9	1	16	5
Ortalama		3,3333	1,9362	2,3438	59,4186
Ortalama standart hata		,11223	,05612	,09640	1,52688
Standart sapma		,70088	,38472	,54532	10,01245

**Çizelge 3-2 Hastaların klinik parametrelerinin dağılımı**

Larenks tümörlü dokularında GST izoziminin ve P53'ün evre(stage), grade ve sigara içim yılı arasındaki ilişkiyi belirleyebilmek için Sperman Rank Testi uygulanmıştır. Sonuçlar çizelge 3.3' te görülmektedir.

	GST alfaty	GST alfatr	GST Pity	GST Pitr	GST tetaty	GST tetatr	GST müty	GST mütr	p53ty	P53tr
<b>Tümör evre</b> (r <sub>s</sub> )	,199	,213	-,005	-,038	,005	,128	-,268	-,210	-,309	-,301
(p)	,237	,206	,975	,825	,978	,452	,152	,266	,067	,075
N	37	37	36	37	37	37	30	30	36	36
<b>Tümör derece</b> (r <sub>s</sub> )	,359*	,365*	-,037	-,060	-,095	-,310*	-,534**	-,533**	-,017	,091
(p)	,016	,014	,815	,698	,536	,038	,001	,001	,914	,558
N	45	45	43	44	45	45	35	35	44	44
<b>Sigara içim yılı</b> (r <sub>s</sub> )	,035	,035	,014	-,181	,044	,222	-,188	-,016	,230	,235
(p)	,853	,853	,941	,322	,816	,239	,402	,943	,231	,220
N	31	31	32	32	30	30	22	22	29	29

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed)

. \* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)

Correlation Coefficient : (r<sub>s</sub>)

Sig. (2-tailed) : (p)

ty: tümörlü hücrelerin yüzdesi,

tr: tümörlü hücrelerin boyanma şiddeti

**Çizelge 3-3 Klinik parametrelerle immünohistokimya sonuçlarının karşılaştırılması**

Çizelge 3.3'e göre tümörün evresi değerlendirildiğinde; GSTA ve GSTT1 ile çok zayıf (+) korelasyon, GSTP, GSTM4 ve P53 ile çok zayıf (-) korelasyon bulunmuştur ( $p>0,00$ ).

Grade, GSTA ile zayıf (+) korelasyon ( $p>0,00$ ) ,ancak GSTP ve P53 ile çok zayıf (-) korelasyon, GSTT1 ile zayıf (-) korelasyon, GSTM4 ile güçlü (-) korelasyon bulunmuştur.

Sigara içim yılı ile GSTM4 arasında çok zayıf (-) korelasyon; GSTP, GSTA, GSTT1 ve P53 ile çok zayıf (+) korelasyon bulunmuştur.



#### 4 TARTIŞMA VE SONUÇ

Larenks Kanseri insanlarda tüm malignitelerin %2,2'sini oluşturmaktadır. Erkeklerde 15:1 oranında 60 yaş üzerinde sık olmakla birlikte, kadınların da sosyal hayatta daha fazla yer almaları nedeniyle giderek daha sık görülmeye (5:1) başlanmıştır<sup>(15)</sup>. Skuamöz hücreli karsinom, larenksin en önemli, en sık görülen malignitesidir<sup>(23)</sup>. İncelemiş olduğumuz hasta serisi 44'ü erkek, 4'ü kadın olmak üzere literatür bilgileriyle uyumluluk göstermektedir. Hastalarımızın tümü skuamöz hücreli karsinom özelliği göstermektedir ve yaş ortalaması 59'dur.

Larenks kanserinde, tümörün lokalizasyonu, evresi, diferansiasyonu prognostik faktörler olarak bilinmekte ve klinikte tedavi uygulamaları bu parametrelere göre seçilmektedir. Bu parametrelerin, tümörün erken teşhisi, gelişim süreci ve uygulanacak tedaviyi belirlemede yetersiz kalması yeni prognostik faktörlerin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Karsinojenleri metabolize eden enzimler, çeşitli kimyasal karsinojenlerin aktivasyonu ve deaktivasyonunda görevlidir. Bu enzimlerin hedef dokulardaki ekspresyonlarında kişiler ve ırklar arasında değişimler klinik ve epidemiyolojik çalışmalarda gözlenen duyarlılıktaki farklılığı açıklayabilir<sup>(114)</sup>. GST genelde karsinojenlerin detoksife eden faz II

metabolizmasında rol almaktadır. GSTP insan skuamöz epitelinde eksprese olduğu gösterilmiştir<sup>(115)</sup>. Araştırılmış olan insan tümörlerinin normal dokusuna kıyasla, GSTP akciğer, mide, kalın bağırsak, mesane ve serviks dokularında daha yüksek seviyede eksprese edildiği saptanmıştır<sup>(116)</sup>. GST'nin farklı izozimlerini o dokunun farklı substrat spesifikliğini göstermektedir. Bu dokunun substratlara karşı detoksifikasyon kapasitesini etkiler<sup>(117)</sup>.

Karsinojenlerin metabolitleri ve karsinojenler, tümör süpresör genler ve protoonkogenlerin fonksiyonunu mutasyon yoluyla değiştirip malign transformasyona neden olurlar<sup>(118)</sup>. Sonuç olarak P<sub>53</sub> geninin ekspresyonunda larenks kanserinde sigaranın karsinojenik etkisi için araştırılması gerekmektedir.

Tümörün diferansiasyonu (grade) çeşitli kanserlerde zaman zaman prognostik parametre olabilecek özellik göstermektedir. Vakaların büyük çoğunluğu grade 2 derecesindedir. Tümör dokularında GSTM4 ekspresyonu ve tümör derecesi arasında güçlü (-) korelasyon bulunmuştur (p<0,01). GSTM4 ekspresyonu G1,G2,G3 derecelerinde gittikçe azalmıştır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda GSTM4 ve grade ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Fakat GSTP ile yapılan bir çalışmada GSTP ekspresyonu, G1,G2,G3 tümörlerinde %88, %69,7, %15,4 olarak bulunmuştur<sup>(91)</sup>. Başka bir çalışma da ise orta ve kötü diferansiye hücrelerde GSTP mRNA'sının iyi diferansiye hücrelere göre arttığı bulunmuştur<sup>(120)</sup>. Bizim çalışmamızda bu

bulgulara paralel olarak GSTP'nin ekspresyonu ile grade arasında çok zayıf (-) ilişki bulunmuştur. Çalışmamızda GSTT1 ile tümör derecesi zayıf (-) korelasyon göstermektedir. Bu da GSTT1 ekspresyonunun az diferansiye (G3) tümörde daha az eksprese edildiğini göstermektedir. GSTA iyi diferansiye(G1) tümörlerde, az diferansiye(G3) tümörlere göre daha az eksprese edilmektedir. Bir çalışmada <sup>(121)</sup> P53 ile grade arasında yüksek dereceli istatistiksel olarak anlamlı (+) yönlü ilişki ( $p<0,05$ ) bulmuşlardır. Çalışmamızda da bu bulgular desteklenmektedir. Yani artmış olan P53 ekspresyonu kötü prognozu gösterebilecek az diferansiye(G3) tümörü işaret etmektedir.

Hastalarımızın çoğu ileri klinik evre (evre III) göstermektedir. Evre yükseldikçe GSTA, GSTT1 ekspresyonu yükselmiştir. Ancak bu korelasyon zayıf dereceli bulunmuştur. Bu istatistiksel ilişki göz önüne alındığında GSTA ve GSTT1'in bir kötü prognoz belirleyicisi olabileceği anlaşılmaktadır. Ayrıca P53 ekspresyonunun klinik evre ile (+) yönlü ilişkili olduğu başka bir çalışmada gösterilmiştir<sup>(117)</sup>. Tümörlerin kötü seyirleriyle anlamlı birlikteliği göstermek hasta sayısındaki artışla mümkün olabilecektir.

Sigara kullanımı, larenks kanseri ve diğer kanser türlerinin oluşumunda etkili bir risk faktörüdür <sup>(30)</sup>. Yapılan çalışmalarda larenks kanserli hastaların % 88-89 'u hayatlarında belli bir süre sigara kullanmış, %50'den fazlasının da günde bir paketten fazla sigara içtiği belirlenmiştir <sup>(32)</sup>.

Sigara içmeyenlere oranla içenlerde larenks kanseri olma riski 6.1 ile 15.8 kat daha fazla olarak değişmektedir<sup>(31)</sup>. Bizim bulgularımız da sigara içim yılı ile GSTA, GSTP, GSTT1 ve P53 arasında çok zayıf (+) ilişki görülmüştür. Bu hastaların sigara kullanımıyla birlikte GSTA, GSTT1 GSTP izozimleri ve P53 ekspresyonu artış göstermiştir. Ancak GSTM4 ile sigara içim yılı arasında çok zayıf (-) korelasyon bulunmuştur. Sigara içim yılı arttıkça GSTM4 ekspresyonu azalmıştır. Bizim bulgularımıza paralel olarak; sigara içenler arasında larenks kanserine yakalanma riski GST M1 null genotipiyle arttığını göstermiştir<sup>(89,90)</sup>. Çalışmamızdaki tümörlü hastalarda sigara içim yılı arttıkça GSTM4 ekspresyonunun azalmış olduğu istatistiksel olarak tespit edilmiştir. Bu da sigarada bulunan karsinojenik maddelerin GSTM4'ün substratları olabileceğini ve GSTM4'ün azalmış olmasının larenks kanserinin oluşmasında rolü olabileceğini göstermektedir.

Yapılan çalışmaların bazılarında larenks kanserinde GST enzim aktivitesinin 3 katı arttığı bulunmuştur. Ama GST izozimleri bu artışta farklı şekillerde eksprese edilmiştir. Tümörlü ve normal dokularda GST M5 eksprese olmamış ancak tümörlü dokuda normale kıyasla GSTP artmış, GSTM4 ve GSTA azalma göstermiştir<sup>(99)</sup>. Bizim çalışmamızda ise bu literatür bilgilerine uygun olarak GSTP ve P53 tümörlü dokuda normale göre daha fazla eksprese olmuştur. Ayrıca GSTA, GSTM4 ve GSTT1'in tümörlü dokuda daha az eksprese edildiği tespit edilmiştir

Sonuç olarak, tümörün derecesi ile GSTM4 arasında istatistiksel açıdan anlamlı güçlü (-) ilişki bulunmaktadır. Sigara içim yılı ile tümör belirleyicileri arasında (+) yönlü çok zayıf ilişki bulunurken, sadece GSTM4 ile (-) yönlü zayıf ilişki bulunmuştur. Çünkü çoğu vakamızın sigara içim yılı bilgileri elde edilememiştir.

Kişi sayısı artırılarak bu çalışmanın tekrar edilmesi kliniğe uygulanması açısından gereklidir.

## KAYNAKLAR

1. L Harrison, R. Sessions, W. Hong,. Head and Neck Cancer, Second Edition, Lippicott Williams and Wilkins Inc. , Newyork, 2004.
2. Z. Karajina, Z. Kucar, V. Zonic-Carnolutti, Epidemiology of squamous laryngeal cancer, .Laryngoscope, **85**, 11(1975)
3. H. Iwai, Y. Koike, Primary laryngoplasty, Laryngoscope **85**, 929 (1975).
4. W. Lowry, Alcholism in cancer of the head and neack. Laryngoscope **85**, 1275,(1975).
5. S. Krozumi, Y. Harada, Y. Sugimoto, et al. Airway malignancy in poisonous gas workers. J Laryngol Otol, **91**, 217(1977).
6. J. A. Kirchner. Pressman and Kelemen's physiology of the larynx. 3rd ed. Washington, AAO-HNS Foundation Inc; 1986.
7. W. Becker, H.H. Neumann, CR Pfaltz, KBB Hastalıkları El Kitabı (çeviri). Cevanşir B, çeviri editörü. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin ve Çocuk KBB Hastalıkları, Baş-Boyun Cerrahisi ve iletişim Bozuklukları Derneği Yayını, İstanbul:;386(1993).
8. M Ömür, T Gökçeer, Larenks kanserinin yayılma özellikleri. İn: Ömür M, Önder D, Kaleli Ç, editörler. Larenks kanseri ve boyun. İstanbul: Haseki Hastanesi Vakfı Yayını, 52(1992).
9. C. E..Silver, R. V. Smith, Larinks ve hipofarinkas. İn: Silver CE, Rubin JS, editors. Baş ve boyun cerrahisi atlası çeviri.( Şenocak D, Erem M, çeviri editörleri). Ch 8,İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri Ltd,185, (2000).

- 10 .H Kepekçi. Larenks anatomisi. İn: M. Ömür, D. Önder, Ç Kaleli, editörler. Larenks kanseri ve boyun. İstanbul: Haseki Hastanesi Vakfı Yayını, **12,1** (1992)
11. R Janfaza WW Montgomery, EW Randolph. Baş ve boyunun cerrahi anatomisi (Janfaza P Nadol JB, Gall R, Fabian RL, Montgomery WW, editors, Cansız H, Yüksel S, çeviri editörleri), istanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 629(2002).
- 12.H Çoşkun., Larenks lenfatik drenajı,. T Klin KBB, **2**, 7(2002).
13. R. S. Cotran, V. Kumar, S. L. Robbins, Robbins pathologic basis of disease. 5th ed, Philadelphia: WB Saunders Company, 1994.
14. C. T. Sasaki, B. P., Driscoll C Gracco. Larinks anatomi ve fizyolojisi (çeviri, Öktem F). İn: Ballanger JJ, Snow JB, 13 editors, Otolarengoloji - baş° ve boyun cerrahisi, çeviri, fenocak D, Kaleli Ç, çeviri editörleri). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2000.
15. CII Cann, M. R. Fried, K, J. Rothman. Epidemiology of squamous cell cancer of the head and neck. Otolaryngol Clin North Am **18**, 367(1985).
16. J. Rosai Ackerman's surgical pathology. 8th ed, St Louis: Mosby, 1996.
17. P. Chandrasoma, C. .R Taylor. Concise pathology. 3rd ed, London: Appleton and Lange, 1989.
- 18 Underwood JCE. General and systematic pathology. 2nd ed, New York: Churchill Livingstone, 1996.
19. A. Stevens, J Lowe. Pathology. London: Mosby, 1995.
20. H. Maier, U. Gewelke, A, Dietz, et al., Risk factors of cancer of the larynx: results of the Heidelberg case-control study, Otolaryngol Head Neck Surg **107(4)**, 577(1992).

21. E. De Stefani, P. Correa, F. Oreggia, et al., Risk factors for laryngeal cancer, *Cancer*, **60(12)**, 3087(1987).
22. J. E. Muscat, E. L. Wynder, tobacco, alcohol, asbestos, and occupational risk factors for laryngeal cancer, *Cancer*, **69(9)**, 2244(1992).
23. M. S. Brandwein, G. J. Nuovo, H. Biler, . Analysis of prevalence of human papillomavirus in laryngeal carcinomas, study of 40 cases using polymerase chain reaction and consensus primers. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **102(4)**, 309(1993).
24. J. B Taxy, Upper respiratory tract. In: Damjanow, Linder J, editors. *Anderson's pathology*. 10th ed, St Louis: Mosby, 1996.
25. W. Zheng, W. J. Blot, X. O. Shu, et al. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in Shanghai, with emphasis on diet. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **I(6)**, 441(1992).
26. A. Kirchner, D. Carter, The Larynx. In: Sternberg SS editor. *Diagnostic surgical pathology*. Vol I, New York: Raven Press, 1994.
27. J Olofsson, Growth and spread of laryngeal carcinoma. In: Alberti PW, Bryce DP editors. *Workshops from the centennial conference on laryngeal cancer*. E.Norwalk: Appleton and Lange, 1976.
28. JG Batsakis, MA Luna, AK el-Naggar. Nonsquamous carcinomas of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **101(12)**, 1024(1992).
29. *AJCC Cancer Staging Manual, Sixth Edition*. New York: Springer Livingstone, 2002.
30. F. Öktem, Larenks kanserinde DNA akım sitometrisi sonuçlarıyla prognoz arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi, *Uzmanlık Tezi*, Cerrahpaşa Üniversitesi, İstanbul, 1994.
31. C.T.Sasaki, R. D. Carlson., *Malignant Neoplasms of The Larynx*. In :



Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Vol.3. Cummings C. W, Fredrickson JM (Eds) . C.V.Mosby Company, St. Louis, Missouri, 1987(1986).

32. T. Nm. Kaiser, G.J. Spector: Tumours of The Larynx and Laryngopharynx In: Diseases of The Nose , Throt, Ear, Head and Neck. Ballenger JJ(Ed). Lea and Febiger, Malvern, Pennsylvania, 6821991).

33. G. L. Adams: Malignant tumours of the larynx and hypopharynx. In: Cummings CW, Fredricson JM, Harker LA, Krause CJ, Richardson MA, Schuller DE (Eds.) Otolaryngology Head and Neck Surgery, 3. Baskı, Vol III, Mosby, 1998.

34. E. De Stefani, P Correa, F Orregia: Risk factors for laryngeal cancer. Cancer, **60**,3087, (1987).

35. D. G. Barchman, D Groves, E. Vokes et. al. Occurence of p53 gene deletions and human papillora virus infection in human head and neck Cancer, Cancer Res **52**,4832(1992).

36. G. Almadori, J. Gali, G. Cadoni, et.al. Human papillora virus infection and cyclin D1 gene amplification in larynganeal squamous cell carcnoma; biologic function clinical significance, Head and Neck, **24**,597(2002)

37.O. C..Elci, M Akpınar-Elci A,Blair,et.al. Occupational dust exposure and the risk of laryngeal cancer in Turkey ScandJ Work Environ Health **28**, 278(2002).

38. Bosetti, C La Vecchia, R Talamini, et.al.Foods groups and laryngeal cancer risk: a cosecontrol study in Italy and Switzerland.Int J cancer **20**, 355,(2002).

39. A. E. Uzcudun, I. R. Retolaza, P. B. Fernandes et. al. xlutrition and pharyn geal cancer,results fron a case control study A Spain,Head Neck **24(9)**, 830(2002).

40. PJ Donald., Mariswana smoking-possible cause of head and neck carcinoma in young patients. *Otolaryngol Head Neck Surg* **94**,517,(1986).
41. J. Galli, G. Cammonota, L Calo. al. The role of acid and alkaline refluxin laryngeal squamous cell carcinoma laryngoscope **112**,1861(2002).
42. H. B. El-Serag, E.J,Hepworth P, Lee et. al. Gastroesophageal reflux disease is a risk factor for laryngeal and pharyngeal cancer. *Am J Gastroenterolog* **96**, 2013(2001).
43. D. Pessayre, Cytochroms P450 s in formain of metabolic reactives Therapie, **48**, 537(1993).
44. N Vural, Toksik maddelerin metabolizması. Toksikoloji, Ankara Üniv. Yayınevi, 73, 2005.
45. .F.P Guengerich. Characterization of human microzomal P450 enzymes. *Ann. Rev. PharmacolToxicol*, **29**, 241(1989).
46. M. Iscan, T. Klaavuniemi, T., Coban,.N Kapucuoğlu, O Pelkonen and H Raunio. The exspression of cytochrome P 450 enzymes in human breast tumours and normal breast tissue. *Breast Cancer Research and Treatment*, **70**, 47( 2001).
47. N. Kapucuoğlu, T. Coban, H. Raunio, O. Pelkonen, R. J. Edwards, A R Boobis, M Iscan. Immunohistochemical demonstration of the exspression of CYP2E1 in human breast tumour and non tumour tissue. *Cancer Letters*, **196**, 153(2003).
48. M. Iscan, T. Coban, C Eke, S Aygörmez and U Berberoğlu. Xenobiotic metabolizing and antioxidant enzymes in normal and neoplastic human breast tissue. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **23**, 497 (1998).
49. J.Caldwell. Conjunction reactions in foreing compounmetabolis:745(1982).

50. E. Hanna, S. Maclead, E. Vural, et. al: Genetic Deletions of glutathione s transferases as a risk factor in squamous cell carcinoma of the larynx :a preliminary report . Am J. Otolaryngol **22**, (2001).
51. G. M. Pacifici, G. N. Fracchia. Human Glutathione Transferase In Advances in Drug Metabolism in Man. Off. Pub of the Eur. Comm. Luxemburg, 1995.
- 52.A . Parkinson. Biotransformation of xenobiotics in Caseretti and Doll's Toxicology(Klassen CD ed), , Mc Grow-Hill Company, Newyork, 2001.
53. B. Mannevrík, UH Danitelsan. Glutathione transferases: structure and catalytic activity, CRC Crit Rev. Biochem Mol. Biol. **23**, 287(1988).
54. S. E. Pemple, J. B Taylor. An evolutionarty perspective on glutathione transferases inferred from class-teta glutathione transferases cDNA sequence, Biochem j., **287**,957(1992).
55. F. F. Parl, Glutathione s transferase Genotypes and cancer risk. Cancer Letters, **221**:123(2005).
56. R. Strange, M. Spteri, S. Ramachandra, A. Fryer. Glutathione S-transferase family of enzymes, Mutation Research, **482**, 21(2001).
57. P. K. Stocman, LI Mclellen, J. D. Hayes. Characterization of the basic glutathione s transferase B1 and B2 subunits from human liver. Biochem j. **244**, 55(1987).
58. H. Amad, S. S. Singhal, M Saxena, TC Awasthi . characterisation of two novel subunits of the alpha class glutathione s transferase of human liver. Biochem Biophys Acta. **116**, 333(1993).
59. J Seidgard, G Ekstöm. The role of human GST's and epoxide hylolases in metabolism of xenobiotics. Environ Health Perspect, **105(4)**, 791(1997).

60. A. M. Benson, P Talalay, Role of reduced glutathione in the keto steroid isomerase reaction of liver. *Biochem biophys Res Commun.*6),1073(1976).
61. J Kimura, M Hayakari, T Kumano, H Nakano, K, Satah S Tsuchida. Altered Glutathione transferase in rat skin inflamed due to Alpha –class subunit. *Biochem.J.* **335**, 605(1998).
62. JD Hayes, DJ Pulford. glutathione S-transferase supergen family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Grit Rev Biochem Mol. Biol.* **30(6)**,600 (1995).
63. A Inskip, J. Elexperu, N Buxton, et al. Identification of polymorphism at the glutathione S-transferase, GST M3 locus; evidens for linkage with GST M1 A.*Biochem*, **312(Pt3)**, 713(1995).
64. R. C, Strange, A. A. Fyer, B Matteredo, L Zhao, J Broome, D Campfle, P Jones, I Pastor, R Singh. The glutathione S-transferase: comparison of isoenzymes expressione in normal and astrocytoma brain. *Biochem Biophs Acta*, **1139**, 222(1992).
65. Y, Takahashi EA Champbel, Y. Hirida, T. Takayama, I .Listowsky. The basis of differentiating among the multiple human mu-glutathione S-transferase and mulecular cloning of brain GST M5. *J Biol Chem.* **268**, 8893- (1993).
66. R. C. Strange, C. Foulder, et al. The human GST: studies on the tissue distribution and genetic variation of the GST, GST T2 and GST T3 isoenzymes. *Am Hum Genet*, **11**, 20(1984)
67. C Matthios, U Bokmühl, V Jhanke, et al. The Glutathione S-transferase GST P1 polymorphismi. Effects on susceptibility to oral pharyngeal and laryngeal carcinoma. *Rhormacagenetics*, **8**,16(1998)
68. J Seldegard, RW Pero, DG Miller, EJ Beattle. A glutathione transferase in

human leukocytes as a marker for the susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis*, **7**,751(1986)

69. J. Seldegard, R. W. Markowitz, et al. Isoenzymes of glutathione transferase (class mu) as a marker for the susceptibility to lung cancer: a follow up study. *Carcinogenesis*, **11**,3(1990).

70. P. Cole, R. R. Manson, H Hannig and GH Fridell. Smoking and cancer of the lower urinary tract. *Engl. J. Med* **284**, 129(1971).

71. E. Stefani, P. Cornea, F. Oreggia, J Leiva, S Rivera, G Fernandez, H Denea, D Zavala, E Fantham. Risk factors for laryngeal cancer. *Cancer*, **60**, 3087(1987).

72. J A Moscow, A.J. Towse, M. E. Goldsmith, et al. Isolation of the human anionic glutathione transferase cDNA and relation of its gene expression to estrogen receptor content in primary breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. **85**, 6518(1988).

73. B Mannevik. The isozyme of glutathione transferase. *Avdan Enzymol*. **57**, 3577(1985).

74. J. D. Hayes, TJ Mantle. Use of immunoblot techniques to discriminate between the glutathione transferase Yf, Yk, Yn/Yb, and Yc subunits and to study their extra hepatic distribution. *Biochem J.* , **233**, 779, (1986).

75. J. A Moscow, CR Faichid, et al. Expression of anionic glutathione transferase and p-glycoprotein genes in human tissues and tumors. *Cancer Res*. **49**,1422(1989).

76. A Özaydın, Glutathion S-Transferaz GST-M1 ve GST T-1 polimorfizmlerinin glutathionla ilişkili detoksifikasyon sistemlerine etkisi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi; İstanbul, 2000.

77. M Coggan, A Whitbread, A Whittington, P Board. Structure and

organization of the human theta-class glutathione S transferase and D-dopachrom tautomerase gene complex. *Biochem J*, **334**,617(1998)

78. S. Pemple, K. R. Schroder, DJ Mayer, et al. Human glutathione S transferase theta CDNA clonning and the chracterization of a genetic polymorhhism. *Biochem J*. **300**, 271(1994).

79. D. J Meyer, et al. Theta, anew class of glutathione transferase purified from rat and man. . *Biochem J*. **274**, 409,(1991).

80.G. W Mainwaring, at al. The distrubiotion of theta class glutathione transferasein the liver and lung of Mouse rat and human. . *Biochem J* **318**, 297(1996).

81.V Bongers, GB Snow, N Vries, et al. Second primary head and neck squamous cell carcinoma predicrted by the glutathione S transferase exspression in healty tissue in the direct vicinity of the first tumor. *Lab Invest* **73**: 503(1995).

82. A. Lafunete, F. Pujol, P Caretero et al. Human glutathine S transferase M defeciency as a nmarker fort he susceptibility to bladder and larynx cancer among smokers. **73**,503(1995).

83. F Hançer, Akciğer Kanserinde Metabolik Polimorfizmin (GST P1 Ala 114 Val) İlaç Rezistansındaki Rolü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 2006.

84. T.H Rushmore,. C.B Pickett. Glutathione S-Transferases, Structure, Regulation and Therapeatic Implications, *J. Biol. Chem*, **268**, 11475(1993)

85. N. P.T Vermeulenn, Analysis of mercapturic acids as a tool in biotransformation, bio and toxicological studies. *Glutathione S-transferases and Drug Resistance*, Tylor and Francis London,**1**,14(1990)

86. K Berhane, M Widersten, A Engstrom, JW Kazarich, B Manrevrik,

Detoxication of base propenals and other alpha, beta unstaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases, Proc Nat Acad. Sci USA, **91(4)**,1480(1994).

87. M Ünal, L Tamer, N Ateş, Y Akbaş, YS Pata, Y Vayisoğlu, B Ercan, K Görür, U Atik. Glutatayon S-Transferase M1,T1, and P1 Gene Polymorphism in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. Otorarngology, **25**,(2004).

88. Z. Ye, H. Song, Y. Guo. Glutathione S-transferase M1, T1 status and the risk factor head and neck cancer : a meta-analysis. J Med Genet, **41**,360(2004).

89. V. Jahnke, R Strange, C Matthias. A Fryer., Glutatahione s-transferase and cytochrome P 450 genotypes as risk factors for laryngeal carcinoma, Eur Arch Otorhinolaryngol, **254**,147(1997).

90. L Cheng,E Sturgis , S Eicher ,D Char, M Spittz ,Q Wei, Glutatahione S-Transferase Polymorphisms And Risk Of Squamous-Cell Carcinoma Of The Head And Neck. Int J. Cancer ,**84**, 220(1999).

91. E. Hanna, S. MacLeod, E Vural, N Lang. Genetic Deletions of Glutathione-S-Transferase as a Risk Factor in Squamous Cell Carcinoma of the Laynx: A Preliminary Report, Otolaryngology ,**22**,121(2001).

92. M Ophuis, H Roelofs, P Brandt, W Peters, J Mani. Polymorphism of the Glutathione s-Transferase P1 gene Head and Neck Cancer Susceptibility, Head and Neck,**37**(2003).

93. D König, H Riechelmann, U Wittich S Gronau. Genotype and phenotype of glutathione with head and neck carcinoma, **130**, 718(2004).

94. J. Tanita, S. Tsuchida, J. Hozawa, K. Sato, Cancer, **72**, 568(1993).

95. M. Ophuis, T. Mulder, W. Peter, Plasma Glutathione S-Transferase P1-1

Levels in Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, **82**, 2434(1998).

96. T. Molder, J. Manni, H. Roelofs, W. Peters, A. Wiersma, Glutathione S-transferase and glutathione in human head and neck cancer, *Carcinogenesis*, **16** 619 (1995).

97. R. S. Cotran, V. Kumar, T. Collins: Pathologic basis of disease, 6th Ed. WB Saunders C. O. Philadelphia, 1999.

98. A. J. Levine, J. Momand, C. A. Finlay, The p53 tumour suppressor gene, *Nature* **351**, 453(1991).

99. L. J. Ko, C. Prives, P53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* **10**, 1054(1996).

100. A. J. Levine: p53 the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell* **88**, 323(1997).

101. C. Prives and P. A. Hall, The p53 pathway, *J Pathol* **187**, 112(1999).

102. K. Somasundaram: Tumor suppressor p53: regulation and function, *Font. Biosci*, **5**, 424(2000).

103. W. Klug, M. Cummings: Genetics: The p53 tumour suppressor gene, 2000.

104. D. P. Lane, Ben-Chimol S: P53: Oncogene or anti oncogene *Genes Dev* **4**, 1(1990).

105. A. Maity, W. McKenna, R. J. Muschel, The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: A review. *Radiother Oncol*, **31**, 1(1994).

106. C. A. Finlay, Normal and malignant growth control by p53. In: Benz CC, Liu ET, eds. *Oncogenes and tumor suppressor genes in human malignancies*, Boston: Academic Publishers, 1993.

107. P. Chene. In vitro analysis of the dominant negative effect of p53



mutants, *J Mol Biol* **281**, 205(1999).

108. M. Friedman, J. W. Lim., Manders.,., Schanffner, A. D., Kirshenbaumg., L., Tanyeri, H. M., Calderelli, D., D., Coon, J., S.: Prognostic significance of Bcl-2 and p53 ekspression in advanced laryngealsquamous cell carcinoma, *Head Bleck* **23**, 280(2001).

109. Y. Horibe, M. Murakami, K. Komori, Imaeda, Kasahram; Exspression of topoisomere II alpha, Ki67 and Pi3 early stage laryngeal carcinomos not featuring vocal cord fixation: *APMIS*, **108**, 689(2000).

110. C. R. Bradford Zhus, J. Poore, S. G. Fisher, T. F. Beals, D. Thoraval, S. M. Hanash, T. E. Carey, G. T. Wolf: p53 mutation as a prognostic marker in advanced laryngeal carcinoma, *Arc Otolaryngol Head Neck Surg*, **123**, 605(1997).

111. H. H. Pai, L. Rochon, B. Clark, M. Black, G. Shenouda: Overexpression of p53 protein does not predict local-regional control or survival in patients with early-stage squamous II arcinoma of the glottik larynx treated with radiotherapy Int; *Rad Oncol* **41**, 37(1998).

112. D. Assimakopoulos, E. Kolettas, N. Zagorianakou, A. Evangelou, A. Skevas, N. Agnantis, Review, Prognostic significance of p53 in the cancer of the larynx: *Anticancer research*, **20**, 3555(2000).

113. Cancer incidance, mortality and prevalence worldwide. IARC cancer base No.5 Lyon: Pres, 2001.

114. Haris CC., Interindividual variation among humans in carcinogen metabolism, DNA adduct formation and DNA repair. *Carcinogenesis*, **10**, 1563(1989).

115. J. R. Manning, K. J. Nikula, J. A. Hotchkiss, et al. Nasal cytocrom P450

- 2A:identification, regional localization, and metabolic activity toward hexamethylphosphoramide, a known nasal carcinogen, *Toxicol Appl Pharmacol*, **142**, 22(1997).
116. S. Tsuchida, K. Sato, Glutathione transferases and cancer, *Crit. Rev. Biochem Mol. Biol.* **27**, 337(1992).
117. B. Mannevik, The isoenzymes of glutathione S- transferase, In Meister.A (ed). *Advances in Enzymology*, John Wiley and Sons, New York,NY, 1985.
118. P Cairns, TJ Polascik, Y Eby et al. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumors, *Nat Genet*, **11**, 210(1995).
119. S. Oğuztüzün. Immunohistochemical localization of glutathione s-transferases in normal and carcinoma human human breast tissue, Doktora tezi, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Ankara, 2000.
120. X.Wang, Z.Pavelic, Y. Li, L.Gleich, P.Getside, L.Pavelic, J.Gluckmon, P Stambrook: Overexpression and Amplification of Glutathione S-Transferase Pi Gene in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas *Clinical Cancer Research*, **3**,111(1997) .
121. T.Krecicki, M.Jelen, M.Krecicki, T Szkudlarck, K Szajowski, Immunohistochemically stained markers (P53, PCNA, bcl-2) in dysplastic lesions of the larynx, *Cancer Letters*, **143**, 23(1999).