

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

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TÜKÜRÜK BEZİ KANSERİNDE GLUTATYON S-  
TRANSFERAZ İZOZİMLERİNİN  
EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ**

**NURAN TOPAL**

**OCAK- 2020**

**Biyoloji Anabilim Dalında** Nuran TOPAL tarafından hazırlanılan TÜKÜRÜK BEZİ KANSERİNDE GLUTATYON-S-TRANSFERAZ İZOZİMLERİNİN EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ adlı yüksek lisans tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Aysun ERGENE

Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN

Jüri yeleri

Başkan : Doç. Dr. Metin KONUŞ \_\_\_\_\_

ye : Prof. Dr. Nazife YİĞİT KAYHAN \_\_\_\_\_

ye (Danışman) : Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN \_\_\_\_\_

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

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

Prof. Dr. Recep ÇALIN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### TÜKÜRÜK BEZİ KANSERİNDE GLUTATYON S-TRANSFERAZ İZOZİMLERİNİN EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ

TOPAL, Nuran

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN

Ocak 2020, 92 sayfa

Bu çalışmada, 52 tükürük bezi kanserli ve normal tükürük bezi dokusunda Glutasyon S-Transferaz izozimlerinden pi (GSTP1) ve kappa (GSTK1) 'nın protein ekspresyonları immünohistokimyasal metodla karşılaştırılmıştır. GST ekspresyonu arasındaki ilişki Mann Whitney-U testi ile ve klinik parametrelerle ilişkisine spearman correlation rank testi ile bakılmıştır. Hastaların tümörlü dokularıyla normal dokuları arasında GSTP1 ve GSTK1 izozimlerinin ekspresyonlarının farklılıklarına bakıldığında; Tümörlü ve normal dokular arasında GSTP1 protein ekspresyon farklılıkları bulunamadı.( $p=0,1902>0,05$ ).Ancak hastaların normal dokularında GSTK1 ekspresyonu tümörlü dokulara oranla daha yüksek olduğu bulundu ( $p<0,05$ ).

**Anahtar kelimeler:** Tükürük bezi kanseri, Glutathione S-transferase, immünohistokimya

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE ISOENZYMES EXPRESSIONS IN SALIVARY GLAND CANCER

TOPAL, Nuran

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, M.Sc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN

January 2020, 92 pages

In this study we investigated the immunohistochemical staining characteristics S-of glutathione s-transferase pi (GSTP1), and kappa (GSTK1) , salivary gland tumor and surrounding tumor free (normal) salivary gland tissues from 52 patients. For immunohistochemical studiends, tissues were obtained from 52 patients with salivary gland carcinoma. Tumor and control tissues of patients were compared according to their staining intensity. Relationships between GST expressions in salivary gland carcinoma tissue were examined by the Mann Whitney-U test and the clinicopathological data were examined by the spearman correlation rank test. Differences in GSTP1 and GSTK1 ızoenzymes expression between tumor and normal tissues of patients were not found between tumor and normal tissues ( $p=0,1902>0,05$ ). However, GSTK1 expression was found to be higger in patients normal tissues compared to tumor tissues ( $p<0,05$ ).

**Key words:** salivary gland karsinoma, glutathione-S-transferase, immunohistochemistry

## TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında, ortaya çıkmasında ve yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve birikiminin yanı sıra maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN'e teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmamın deneysel kısmında doku kazanımı ve immünohistokimyasal boyama sonuçlarının değerlendirilmesinde bana yardımcı olan İstanbul Kartal Lütfü Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Uzmanı Sayın Prof. Dr.Nagehan BARIŞIK'a teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam boyunca sağladıkları imkanlardan dolayı Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Laboratuvarları Müdürlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Kızlarım, Kardeşim, Oğlum ve Eşime teşekkürlerimi iletmek isterim.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	iv
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	vii
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	viii
<b>1.GİRİŞ</b> .....	1
1.1 Karsinogenez .....	1
1.2 Karsinogenezde serbest radikallerin rolü .....	4
1.3 Tümör belirteçleri .....	7
1.3.1. Glutatyon S-transferaz (GST) .....	8
1.3.2. Gluatyon S-Transferazların Sınıflandırılması .....	10
1.3.2.1.GST Pi (GSTP) Sınıfı Transferazlar .....	10
1.3.2 2.GST Kappa (GSTK) Sınıfı Transferazlar .....	10
1.4.Yapı .....	11
1.5. Enzimatik mekanizmalar .....	14
1.6. Metabolik roller .....	16
1.7. Fonksiyonlar .....	20
1.7.1. GST ve hücre sel detoksikasyon .....	20
1.7.2. Hücre çekirdeğinde GST fonksiyonu .....	22
1.7.3..GST ve ilaç direnci .....	23
1.8. GST'lerin indüksiyonu ve düzenlenmesi .....	27
1.9. Normal insan dokularında GST doku dağılımları .....	29
1.9.1. Glandüler dokularda GST-Pi dağılım .....	32
1.9.2. Tükürük bezlerindeGST-Pi dağılımı .....	32
1.10.. Neoplazi ve preneoplazide bir belirteç olarak GST .....	32
1.10.1.. GST ve klinik uygulamalardaki kullanımı serum analizi... 36	
1.10.2. İnsan tümörleri ve insan tümörü hücre dizilerindeki GST-Pi	

Dağılımı .....	39
1.11. GST’de cinsiyet farklılıkları .....	40
1.12. İnsan Tükürük Bezi Dokusu ve Tümörleri.....	42
1.12.1.. Etyoloji .....	44
1.12.2.. Tükürük bezi tümörlerinin sınıflandırılması .....	45
1.12.2.1. İyi huylu tükürük bezi tümörleri .....	47
1.12.2.1.1. Pleomorfik adenom .....	47
1.12.2.2.2. Monomorfik adenom .....	48
1.12.2.2. Kötü huylu tükürük bezi tümörleri.....	49
1.12.2.2.1. Asinik hücreli karsinom .....	49
1.12.2.2.2. Mukoepidermoid karsinom .....	50
1.12.2.2.3. Adenoid kistik karsinom .....	51
1.12.2.2.4. Kötü huylu karışık tümör .....	52
<b>2.MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>53</b>
2.1. Materyal .....	53
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	53
2.1.1.1 Solusyonların Hazırlanışı .....	53
2.1.2. Kullanılan Cihazlar .....	54
2.2. Kullanılan Metod .....	54
2.2.1. Materyal Kazanımı ve Hazırlanışı .....	54
2.2.2 İmmünohistokimya Prosedürü .....	57
2.3. İstatiksel Analiz .....	59
<b>3.ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>60</b>
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>64</b>
<b>5.KAYNAKLAR .....</b>	<b>68</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1. Tükürük Bezi Tümörleri .....	46
Çizelge 2.1. Hastaların klinik verileri .....	55
Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan hastaların özellikleri (Yaş, cinsiyet, tanı ) .....	55
Çizelge 3.1. GSTP1 İzozimlerinin Tükürük Bezi Kanserindeki Normal ve Tümörlü Dokulardaki İfadesi .....	60
Çizelge 3.2. GSTK1 İzozimlerinin Tükürük Bezi Kanserindeki Normal ve Tümörlü Dokulardaki İfadesi .....	62

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### ŞEKİL

### Sayfa

Şekil 1.1. Glutasyon Metabolizmanın Tüm Yolakları .....	18
Şekil 3.1. Normal hücrelerde zayıf şiddette (+1) ve Tükürük Bezi Kanseri hücrelerinde zayıf şiddette (+1) immunohistokimyasal GSTP1 proteini ekspresyonu (X200) .....	61
Şekil 3.2. Normal hücrelerde orta şiddette (+2) ve Tükürük Bezi Kanseri hücrelerinde zayıf şiddette (+1) immunohistokimyasal GSTK1 proteini ekspresyonu (X200) .....	63

## KISALTMALAR DİZİNİ

WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
GST	: Glutasyon S-Transferaz
GSH	: $\gamma$ - Glutamil Sisteinil Glisin = Glutasyon
PAH	: Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
BHA	:2-(3)-tert-butyl-4hidroksiasinol
OSCC	: Oral Skuamöz Cell Carcinoma
EMA	: Epitelyal membran antijeni
CEA	:Karsinoembriyonik antijen
TPA	; Doku peptit antijeni
GGT	:Gama-glutamil transferaz
MDR	:Çoklu ilaç direnç
TopoII	; DNA topoizomeraz II
EpRE	:elektrofile yanıt veren element
DMN	:dimetilnitrozamin
DEN	:dietilnitrozamin
NSE	:Nöron spesifik enolaz
SSC	:Skuamöz hücreli karsinoma

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Karsinogenez

Kanser, bazı etkilerle değişikliğe uğramış hücrelerin, vücudun bir organ veya dokusunda kontrolsüz ve düzensiz şekilde çoğalması ile tanımlanan bir hastalıktır. Karsinogenezin, genellikle, ayrı ve ardışık başlangıç, artış ve gelişim aşamalarını içeren çok aşamalı bir süreç olduğu bilinmektedir. *Başlangıç*, neoplazma üretemeyecek seviyedeki bir karsinojene maruz kalmış olan bir ya da birkaç hücrenin DNA'sındaki kalıcı değişim anlamına gelmektedir [1]. DNA sentezi, yavru hücredeki mutant genin bağlanması için gereklidir ve başlangıç hücrelerinin geri dönülmez yapılarının oluşmasını sağlar [2]. *Artış*, çevredeki normal hücrelerden daha hızlı büyüyen ve görünür bir neoplazmada gelişen başlangıç hücrelerinin klonal büyümesi olarak açıklanmaktadır [1,3]. Hem genetik hem de epigenetik mekanizmaların artış aşaması içerisinde yer aldığı düşünülmektedir. Bu değişimler, başarılı bir biçimde evrimleşme ve normal büyümeyi ve/veya gelişimsel kontrolü atlatma ihtimali olabilecek hücrelerin monoklonal popülasyonu ile sonuçlanır. *Gelişimin*, öncelikli olarak, karyotipik instabilite ve maligniteye evrimleşmeyle oluştuğu düşünülmektedir. Bazıları gelişimi, malignite ile sonuçlanan ya da maligniteye doğru artan bir ilerleme potansiyeli taşıyan bir başlangıç hücre grubundaki niteliksel ve kalıtsal değişimler serisi olarak tanımlamayı tercih etmektedir [4]. Geri dönülmez, anöploid kötü huylu neoplazmaların oluşması, gelişimi başlangıç ve artıştan ayıran şeydir. İlerleyen seleksiyon süreçleri ya da genetik değişimler, değişken fenotip özelliklerle birlikte daha heterojen bir hücre nüfusunun oluşumu ile sonuçlanabilir. Ayrıca, bu hücrelere normal konakçı immün takibinden kurtulma ve metastatik yerlerde tümör progenitör hücreleri geliştirme ve oluşturma kabiliyeti vermektedir.

Üç aşamadan oluşan başlangıç, artış ve gelişim, asıl olarak, kimyasal karsinojenler kullanılarak fare derisi karsinogenez modelinde keşfedilmiş ve böylelikle tanımlanmıştır. Bilinen karsinojenler içerisinde üzerinde en fazla çalışılmış olanı, polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) grubu karsinojenleridir; çünkü bunlar, baş ve boyun kanseri de dahil insan kanserlerine sebep olan en yaygın çevresel

karsinojenlerdir [5]. PAH kullanılarak yapılan çalışmalarda fare derisi, eşik altı dozda ve başlatıcı nitelikte olan bir karsinojen ile topikal tedavi gerçekleştirilerek “başlatılmıştır” [6]. Devamında hayvanlara herhangi bir tedavi uygulanmadığında, hiçbir tümör gelişimi görülmemiştir. Önceden tedavi uygulanmış bir fare derisinin tedavisi, kendisi karsinojenik olmayan bir başlatıcı olan kroton yağının düzenli ve periyodik uygulanması ile devam ettiğinde, birçok tümör meydana gelmiştir. Oluşan tümörlerin sayısı, verilen karsinojenin dozajıyla bağlantılıdır. Karsinojenik başlatıcı ile promotörün uygulanması arasındaki sürenin -bu süre 1 yıl kadar uzun olsa da- tümör oluşumunu etkilememiş olduğu görülmektedir [6].

Bir karsinojen çeşidinin insan ya da hayvanda kansere sebep olabilmesi için, protein ve lipidleri içeren hücrel makromoleküller ve daha da önemlisi hücrelerin genetik materyalleri olan nükleik asitler ile etkileşime girmesi gerekmektedir. Bazı karsinojenik bileşenler, metabolik aktivasyon gerektirmeden hücrel bileşenler ile doğrudan etkileşime geçmelerini sağlayan yapılara sahiptir. Bunlar, direkt etkili karsinojenler olarak adlandırılmaktadır. Direkt etkili karsinojenlerin birçoğu, genellikle, nükleik asitlerdeki guanin 7 pozisyonunda hücrel makromoleküllerin alkilasyonuna sebep olur. Diğerleri, indirekt karsinojen ya da pre- ya da pro-karsinojen olarak adlandırılan ve sonrasında hücrel bileşenler ile tepkimeye girebilecek reaktif ara girdiler oluşturmak amacıyla metabolik aktivasyona ihtiyaç duyarlar. Sonuç olarak bu bileşenler (direkt-indirekt olsun ya da olmasın), daha fazla ara reaktif bileşen oluşturmak amacıyla metabolize edilmekte ve hücrel reseptörler ya da hücrel bileşenlerle bağlanmaya devam etmektedir. Bunun yerine, suyla reaksiyona girerek ya da metabolik konversiyon ile deaktive edilebilirler. Bu sebeple, karsinojenlerin metabolik aktivasyonu ya da deaktivasyonunda yer alan birçok enzim, karsinogenezde önemli roller oynamaktadır.

Tür, ırk, cinsiyet, beslenme, bağışıklık durumu ve enzim uyarıcıları ile inhibitörleri gibi birçok faktör bu direkt ve indirekt etkili karsinojenlerin metabolizmalarını etkileyebilir. Örneğin, bir türde karsinojenik olan bir prokarsinojen, kendisini aktive edecek gerekli enzim sistemlerini barındırmayan diğer bir türde karsinojenik olmayabilir. Karsinojenleri detoksifiye edecek metabolik sistemlere sahip olmayan bireyler, kanser gelişimi açısından daha fazla risk altında olabilir. Cinsiyet

farklılıklarının, karsinojenler de dâhil ksenobiotiklere verilen tepkiyi değiştirdiği görülmüştür. Bazı durumlarda da cinsiyetler arasındaki farklı tepkiler, kadın ve erkeklerdeki farklı enzim seviyeleri ile ilişkili olmaktadır. Bileşenlerin karsinojenik potansiyellerini etkileyen bu faktörler farklı farklıdır ve genellikle birbirleriyle ilişkilidir [7].

Çok aşamalı karsinogenez esnasında oluşan preneoplastik ve neoplastik hücreler, farklı genetik ve fenotipik değişimler tarafından şekillendirilir. Fakat bütün tümörlü hücrelerdeki ortak özellik, normal büyüme kontrolünün kaybıdır. Çok aşamalı karsinogenezin moleküler mekanizmaları hala tam olarak bilinmemektedir. Hücreler, normal şartlar altında, hücre bölünmesi, farklılaşması, adhezyonu, göçü, yaşlanması ve düzenlenmiş, işlenmiş uyarılar altında gerçekleşen ölüm gibi birçok yolağa doğru evrilir. Bu süreçler, önemli hücresele fonksiyonların gerçekleştirildiği araçlardır. Hücrelerarası ve hücre içi iletişim normal aktif genler tarafından düzenlendiğinde çoklu düzeyde ilerler; fakat eğer bu genler değişir ya da bozulursa normal hücresele işleyişte bir bozukluk meydana gelir ya da büyüme görülür. Farklı karsinojenlerin - kimyasal, viral ya da radyasyon- hücre büyümesi ve farklılaşması uyarı noktalarında yer alan bir kısım kritik kontrol genlerinde genetik alterasyonlara sebep olduğu düşünülmektedir.

İki farklı gen grubunun kanser gelişimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bunlar, onkogenler ile tümör supresör genleridir. Onkogenlerin aktivasyonu ile tümör supresör genlerinin deaktivasyonun, tümörlü hücrelerdeki normal büyüme kontrolünün kaybına neden olduğu düşünülmektedir [7].

Onkogenler asıl olarak hızlı dönüşen retrovirslerin sebep olduğu genetik transdksiyonlar hakkında yapılan çalışmalar esnasında bulunmuştur. Transdüksiyon, DNA'nın bakteriyofaj tarafından bir organizmadan diğerine taşındığı ve böylece genetik değişime sebep olan bir vakadır. Retrovirüs çalışmalarında transdksiyonun, aşılı hayvanlarda maruziyetin ardından sarkomlara sebep olduğu görülmüştür.

Onkogenler ve onların normal hücre sel benzerleri olan proto-onkogenler, büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, protein kinazları, düzenleyici proteinler ve transdüksiyon yolları ile ilişkilendirilmiştir [2]. Hücre sel proto-onkogenler, retroviral insersiyon, mutasyon, gen amplifikasyonu ve kromozomik translokasyon gibi mekanizmalar ile onkogene dönüştürülebilir. Kimyasal karsinojenler ise hücre sel proto-onkogenlerin aktive olmasına yol açan nokta mutasyonları ile gen amplifikasyonuna neden olabilir. Bu sebeple, proto-onkogenler normal hücre sel genlerdir; fakat onkogenler, neoplastik hücreler için pozitif proliferatif uyarımlar olarak hareket eden aktive edilmiş tümör genleridir. İlk belirlenen onkogenler H- ve K-ras onkogenleridir (Harvey ya da Kirsten rat sarkoma); diğ erleri daha sonradan tanımlanmıştır [4,7].

Antionkogenler ya da tümör baskılayıcı genler, normal şartlar altında tümör oluşumunu önleyen genlerdir. Bu genler, mutasyon yoluyla inaktive hale getirildiklerinde ya da başkalaşım geçirdiklerinde, sahip oldukları pozitif etkiler kaybolur ve sonrasında tümör gelişebilir [8,9]. Tümör baskılayıcı genlerin hangi mekanizmalar ile kendilerini korudukları tam olarak bilinmemektedir; fakat ileri sürülen fonksiyonlar arasında onkogen anlatımının ve fonksiyonunun düzenlenmesi, hücre büyümesinin normal gen anlatımının transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel kontrolü vasıtasıyla olumsuz düzenlenmesi, ölümcül farklılaşma ile hücre sel yaşlanmanın indüksiyonu ve büyüme düzenleyici maddelerin üretimi sayılmaktadır [4].

Karsinojenler hakkında yapılan son çalışmaların birçoğ u, çok aşamalı süreçler boyunca oluşan ve moleküler ve enzimsel değ işimler ile bu değ işimlerle alakalı mekanizmaları da içeren değ işimleri algılamaya odaklanmaktadır.

## **1.2. Karsinogenezde Serbest Radikallerin Rolü**

Serbest radikal, bir ya da daha fazla çiftleşmemiş elektron barındıran ve bağımsız bir mevcudiyete sahip olma yetisine haiz türlere denir. Çiftleşmemiş elektron ise, bir atom içerisindeki boşluk alanı olan yörüngede yalnız başına bulunan elektrona denir

[10]. Serbest radikaller, çok çeşitli insan hastalıklarının patolojisinde yer almıştır. Oksijen kullanarak yaşayan organizmalar olan insanlar, hidrojen peroksid, süperoksit anyon radikalleri ve hidroksil radikaller benzeri serbest radikaller ve oksijen türlerinden kaynaklanan oksidatif stres ve hasara uğramaya yatkındır [10]. Serbest radikaller ile diğer reaktif oksijen türleri, hem bilinçli sentezler hem de mitokondriyal elektron taşıma sistemi, hücrel peroksidaz, monooksijenaz ile flavin, tiyol ve lipidlerin otooksidasyonu gibi kaynakların sebep olduğu kimyasal yan-reaksiyonlar sebebiyle insan vücudunda oluşur. Genellikle antioksidant savunmalar ile ortadan kaldırılırlar. Fakat eğer antioksidant savunmaları arasındaki denge kaybolursa, hücrel metabolizmayı başkalaştırabilecek çok bileşenli karmaşık bir oksidatif hasar meydana gelebilir.

Reaktif oksijen çeşitleri sadece içsel olarak üretilmez; eksojen oksidan kaynakları da mevcuttur. Eksojen oksidatif hasar, ya da bağımsız radikallerin oluşumu, karsinogenler ya da sitotoksik ilaçlar gibi ksenobiotikler tarafından da üretilebilir.

Serbest radikallerin çok basamaklı karsinogenez yolu içerisinde de yer aldığını ve başlangıç, artış ve gelişimde rol oynadığını iddia eden kanıtlar giderek birikmektedir. Belirli başlatıcılar, radyasyon ve kimyasal karsinogenler de dahil, serbest radikal üretirler. Dahası, kanserin oluşmasıyla süperoksit radikaller ve hidrojen peroksid gibi oksijen türleri arasında bir bağlantı olduğu görülmüştür. Bazı karsinogenler, hücrel DNA'yı başkalaştıran ve tekli ya da çift sarmal DNA kırılmalarına sebep olabilecek serbest radikaller üretebilir; bir hücre içerisindeki serbest radikal temizleyicilerini ortadan kaldırabilir [11].

Serbest radikallerin, bir kısım mekanizma vasıtasıyla, onkogenler ile onkogenezi büyük oranda etkilediği bilinmektedir [12]. Bunlar, doğrudan oksidasyon ya da lipid peroksidasyon ürünlerinin dolaylı DNA-bağlanması ile DNA hasarına sebep olabilir. Oksijen radikalleri, lipid peroksidasyonu ve protein yıkımı ile plazma zarlarında üç boyutlu yapı değişimlerine sebep olabilir. Bu üç boyutlu değişimler, zarla ilişkili hücrel faaliyetlerde başkalaşım yarattır. Hücre lipidlerinin oksidatif modifikasyonu, tümör hücresi proliferasyonu açısından potansiyel sonuçlar taşımaktadır [11]. Serbest radikaller, membrana bağlı protein kinazlarını ve büyüme

faktörleri ile reseptörlerini etkileme kabiliyetine sahiptir. Sonuç olarak da sinyal iletimi ile hücrel iletişim başkalaştırma ihtimali taşır. Trombositte bağı büyüme faktörleri benzeri bazı büyüme faktörleri, en az iki proto-onkogeni, c-myc ve c-fos, aktive eder [12]. Lipid hidroperoksitler hücrel düzenleyici proteinleri etkileyebilir; fakat tümör önleyici ya da immünoşpresifler ile prostaglandinlerin oluşumunda prekürsör olarak hareket edebilirler. Ayrıca, tümörlü hücrelerde toksik etkiler gösteren n-3 çoklu doymamış yağ bakımından zengin olan yağların ortadan kaldırılmasını sağlayabilirler [11].

Enflamatuar hücrelerinin tümör oluşumuyla mücadeleye yardımcı olduğu düşünülüyor olmasına rağmen, inflamasyonun tümör artışına destek olabileceğini ve tümör hücrelerini ayırt eden immün lenfositlerin metastatik alanların kolonizasyonunu artırabileceğini söyleyen bir teori de mevcuttur. Bu teoriye göre sebep, lökositler tarafından salınan hidrojen peroksit ve superoksitlerin tümörlü hücrelere hatırı sayılır derecede fayda sağlamasıdır. [11].

Antioksidanlar, oksitlenebilir substratların konsantrasyonuna nazaran düşük konsantrasyonlarda bulduklarında, bahse konu substratların oksitlenmesini geciktiren ya da önleyen maddelerdir [10]. Bu maddeler, reaktif oksijen türlerini temizleyerek, oluşumlarını engelleyerek ya da sebep oldukları hasarı onararak antioksidanlar gibi davranırlar. Bir karsinojen ya da onun metabolik ürünlerinin antioksidan ile doğrudan etkileşimi; prokarsinojen aktivasyonunun reaktif ara ürünlerle olan rekabeti ya da tıkanıklığı; hasarlı DNA'nın onarılmasındaki artan yeterlilik ve karsinojenleri inaktive hale getiren ve böylelikle de hücrel transformasyonu sınırlayan gelişmiş enzim aktiviteleri konuları da dâhil olmak üzere belirli antioksidan aktivite mekanizmaları teorize edilmiştir [13]. Normal şartlar altında, hücrel antioksidan savunma sistemi gerekli oksidatif olaylar ile gerekli olmayanlar arasında uygun bir denge sağlar. Bu denge olmadığı vakit, hücrel redoks sisteminde aşırı yüklenme meydana gelir ve o zaman, oksijen radikalleri hücrel hasara sebep olabilir. E vitamini, C vitamini, beta-karoten, selenyum ve 2-(3)-tert-butyl-4-hidroksianisol (BHA) gibi doğal antioksidanların antikarsinojenik maddeler olduğu belirtilmektedir [11]. Hem doğal hem de sentetik antioksidanların karsinogenez modülatörleri olarak sergiledikleri faaliyetler benzerlikler taşıyabilir.

Endojenöz ve ekzojen reaktif oksijen türleri, enzimatik olan ve olmayan antioksidan savunmaları ile ortadan kaldırılabılır.

Dokuların, organların ve hücrelerin serbest radikallerin zararlarından korunmak amacıyla kendilerini donattıkları mekanizmalar arasında hücrelerin yapısal bütünlüğü, hücre bileşenleri ile fonksiyonlarının bölümlere ayrılması, antioksidan kullanımı ve farklı koruyucu enzimlerin varlıkları bulunmaktadır. Birkaç yolağın karşılıklı bağımlılığı ve etkileşimi, hücre içi ve çevresinde toksik olmayan ve korunmuş bir dengenin oluşturulması ve sürdürülmesi açısından gereklidir. Enzimatik redoks reaksiyonlarını da içeren bir kısım kompleks etkileşimler, toksik olmayan ve korunmuş bir hücrel çevrenin sürdürülmesinde önemli roller oynamaktadır. Bu enzimler arasında, pro-oksidanları inaktif hale getiren ve karsinojenler ile sitotoksik ilaçları da kapsayan ksenobiotikleri inaktif ürünler olarak metabolize eden önemli bir enzim grubu bulunmaktadır. Bu enzim grubu, katalaz, süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz, DT-diyaferez, gama glutamil transpeptidaz ile bu tezin konusu olan glutasyon S-transferazı (GSTs) içermektedir. Bu enzimler oldukça birbirine bağımlıdır. Glutasyon transferaz ile diğer enzimlerin bu yolaklardaki indüksiyonu, hücrel stabilitenin sağlanmasında önemli bir rol oynar.

### **1.3. Tükürük Bezi Tümörü Belirteçleri**

Tümör belirteçleri kavramı, herhangi bir konakçı hasta tümör içerisinde meydana gelen belirli değişimleri tanımlamak için kullanılmaktadır [14]. Bu değişimler belirli genetik ve fenotipik özellikleri içermektedir ve yeni niteliklerin kazanılmasına neden olabilecekleri gibi var olan niteliklerin yitimine de sebep olabilirler [15]. Tümör belirteçlerine örnek olarak c-myc benzeri onkojenler, p53 benzeri mutant tümör baskılayıcı genler, onkoproteinler ve farklı enzimler ile büyüme faktörleri verilebilir.

Tümör belirteci çalışması önemli bilgiler sunmaktadır. Belirteçler, hücrelerin görsel olarak "işaretlenmesini" ve böylelikle üzerlerinde çalışılıp hücrelerin takip edilmesini sağlamaktadır. Tümör belirteçlerinin belirlenmesi metabolik vakalar, hücre farklılaşmaları ve proliferasyonu, dolayısıyla da fonksiyonel durumlar

hakkında bilgiler sunar. Enzimatik ya da protein tümör belirteçlerinin immunohistokimyasal demonstrasyonu, parafine gömülmüş doku kesitlerinde gerçekleştirilip rutin boyama tekniği olarak tıbbi laboratuvarların birçoğunda kullanılabilir. Normal ve anormal hücreler ile dokulardaki temel enzimsel değişimlerin anlaşılması, preneoplazi ile neoplazi tedavisindeki önleme ve müdahale süreçlerinin başlamasına sağlayabilir. Herhangi bir neoplastik ve özellikle de preneoplastik değişime yapılacak erken müdahaleyle daha olumlu prognostik değerler elde edilir.

Preneoplastik ve neoplastik değişimler üzerinde çalışmak ve bu değişimlerin tanısı, hücrel vakaların meydana geldiğini gösteren kayda değer değişimlerin olmasını gerektirir. Uzun neoplastik transformasyon sürecinin oldukça sonlarına doğru, karsinojen değişimli hücrelerin mevcudiyetini gösteren önemli histomorfolojik değişimler meydana gelir. Histomorfolojik değişimler, premalign ve malign lezyonların tanısı, premalign lezyonların taşıdığı malignite potansiyelinin belirlenmesi ve bir tümörün teşhisi için ilk ve belki de tek yöntemdir. Fakat benzer morfolojik lezyonlar, farklı klinik davranışlara, farklı malignite potansiyeline ve oldukça farklı teşhislere sahip olabilir. Tümör belirteçlerinin oluşturulması, konvansiyonel histomorfolojik değişimler öncesinde karsinojen değişimli hücrelerin belirlenmesinde kullanılacak ilave araçlar sunabilir. Morfolojik olarak benzer; davranışsal olarak ise farklı olan lezyonların belirlenmesi arzu edilmektedir.

Dahası, tümör belirteçleri üzerine yapılan çalışmalar, tümör oluşum mekanizmalarının anlaşılmasında büyük önem taşımaktadır; çünkü bu çalışmalar, neoplazi döneminde oluşan hücrel vakalar hakkında fikir vermektedir. Tümör oluşum mekanizmalarının belirlenmesiyle, önlemeye yönelik araçlar ile muhtemel tümör müdahale tedavileri elde edilebilir.

### **1.3.1. Glutatyon S-Transferaz (GST)**

Glutatyon S-transferazlar, elektrofilik ve hidrofilik bileşiklerin glutatyon ile etkileşimlerini sağlayarak, hücrel makromolekülleri reaktif elektrofillere karşı

koruyan Faz-II detoksifikasyon enzim ailesi üyesidir. Molekül ağırlıkları 20.000-25.000 daltondur ve her bir alt birim 200-240 aminoasitten oluşur. İlk kez sıçan karaciğerinde Boyland ve ark tarafından tanımlanmıştır [16].

GST'ler kataliz reaksiyonlarında, elektrofilik substratlar üzerine glutatyon (GSH) tripeptidin nükleofilik atağını kataliz ederler. Bunun yanında oksidasyonla oluşan ürünlerin ya da dışarıdan alınan yabancı toksik maddelerin, vücutta bulunan diğer makromoleküller ile birleşmesini önleyip, hücre komponentlerine zarar vermeden atılmasını sağlarlar. Bu yüzden GST'ler, çok önemli koruyuculuk görevi gören enzim gruplarından biridir [17].

Glutatyon S-transferazlar; mitokondriyal, sitosolik ve mikrozomal olmak üzere üç aileye ayrılırlar. Mitokondriyal ve sitosolik GST'ler üç boyutlu katlanmaları açısından birbirlerine benzerler ve çözünebilen GST'ler olarak isimlendirilirler. Bu gruptaki GST'ler fazla sayıda izoenzime sahiptirler; bu izoenzimler farklı dokularda farklı miktarlarda bulunabilirler. Çözünebilir GST izoenzimleri birbirlerinden izoelektrik noktaları ve aminoasit dizileri arasındaki farklılıklarla ayrılırlar. Mikrozomal GST'ler, (MAPEG) çözünebilir gruplara yapısal benzerlik göstermezler, bu yüzden mitokondriyal GST formları ve primer yapıları farklıdır [18].

Glutatyon S-transferazların (GST) indirgeme özelliği, membran bileşenlerini lipit peroksidasyonundan korur. Ayrıca lipit peroksidasyonunun aldehit yapıda ürünleri olan 4-

hidroksi alkenaller, GSH ile konjuge olurlar. Mikrozomal fraksiyonda bulunan GST'ler de peroksidaz aktivitesiyle lipit peroksitlere karşı koruma sağlar. Doğal koruyucu sistemlerden biri olarak da kabul edilen GST'ler herbisid, pestisid, antikanser ilaçlar, kimyasal kanserojenler ve çevresel kirlilikler gibi elektrofilik ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda da önemli bir role sahiptirler. GST, E.coli'den memelilere kadar birçok organizmada bulunmakta olup insan, sıçan, fare, sığır, gibi hayvanların karaciğer, eritrosit, akciğer, plasenta ve barsak mukozasından izole edilerek çalışılmıştır [19].

### **1.3.2. Glutasyon S-Tranferazların Sınıflandırılması**

Primer yapılarına, enzimatik özelliklerine, antikorlarla ilgili reaksiyonlarına, yapısal karakteristiklerine, kimyasal affinitelerine, aminoasit dizilerine ve enzimlerin kimyasal davranışlarına göre GST'ler sitozolik, mikrozomal ve mitokondriyal olmak üzere üç ailede sınıflandırılmıştır. Buna göre sitoplazmik GST'ler: GST Alfa (GSTA1-1, GSTA2-2, GSTA3-3, GSTA4-4, GSTA5-5), GST Mü (GSTM1-1, GSTM 2-2, GSTM3-3, GSTM4-4, GSTM5-5), GST Pi (GSTP1-1), GST Sigma (GSTS1-1), GST Teta (GSTT1-1, GSTT2-2), GST Zeta (GSTZ1-1), ve GST Omega (GSTO1-1, GSTO2-2) olmak üzere 7 sınıfa, eicosanoid ve glutasyon metabolizmasında membrana bağlı proteinler (MAPEG: Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism) olarak da adlandırılan mikrozomal GST'ler; MGST1, MGST2 ve MGST3 olarak üç sınıfa ve son olarak mitokondriyal GST sınıfını oluşturan GST Kappa (GSTK1-1,GSTK2) olmak üzere toplam 11 sınıfta incelenmektedir [16].

#### **1.3.2.1. Glutasyon S-Transferaz pi Sınıfı (GSTP)**

GST'ler arasında en yaygın olan pi sınıfıdır. Akciğer, özafagus, böbrek, adrenal bez, kalp beyin ve plesanta gibi birçok organda eksprese edilir [20-22]. Pi genleri arasında GSTP1 tanımlanmıştır. GSTP1 geni insanlarda polimorfiktir. Ayrıca GSTP enzimlerinin farklı kanserlerde uygulanan kemoterapi ve radyoterapiye dirençlilik gösterdiği belirtilmiştir [23].

#### **1.3.2.2. Glutasyon S-Transferaz Kappa Sınıfı (GSTK)**

GST ailesinin bu sınıfı hakkında literatürde pek bilgiye rastlanmamıştır. GSTK1 (GSTK1-1) enziminin 1- kloro-2,4-dinitro benzen ve etakrinik asit substratlarına aktiviteleri bulunmaktadır. Önceleri GSTT izoziminin alt grubundan olduğu düşünülüyordu.

GSTK1-1, GSTK2-2 olmak üzere iki adet izoenzimi bulunmaktadır. Hücrede mitokondri ve peroksizomda bulunur. Kemiriciler insan ve *C. elegans* da bulunan GST kapp mitokondri ve peroksizomda enerji ve lipit metabolizmasında görevlidir. GST'lerin aktivitelerine benzemesine karşın mitokondri ve peroksizomda bulunmaktadır. Glutasyon transferaz(GST) kapp mitokondrial olarak bilinmektedir. Bakteri ve ökaryotlarda bulunur. GSTK ayrıca adinopektin (beyaz yağ) biyosentezinde anahtar görevindedir. Proteinlerin doğru katlanmasında şaperon proteini olarak fonksiyon göstermektedir.

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

GSTK1-1 birçok dokuda özellikle yağ dokusunda eksprese olmaktadır. GSTK1-1 fare ve insanda obezite ile negatif ilişkilidir ve insülin direnci hastalığının tedavisinde geliştirilen ilaçlar için hedef olarak düşünülmektedir [24-26].

#### **1.4. Yapı**

Glutasyon S-transferaz, hücrelerde bulunan düşük moleküler ağırlıklı bir ana peptit olan hücrel glutasyon ile etkileşime girmektedir. Glutasyon ayrıca gama-glutamil-sisteinglisin olarak da bilinmektedir. Bu molekül, üç amino asit, glutamin, glisin ve sistein içermektedir. Bunlar, yabancı bileşenlerin metabolizmalarında da bulunabilir. Glutasyon sistein kalıntısındaki nükleofilik sulfur atom gerçekleştirmeleri ile glutasyonun antioksidan içerikleri, ksenobiotikler ve oksidanların bu tripeptit tarafından detoksifikasyonuna sebep olur [27]. Hücrel glutasyonun biokimyasal yapısı şöyledir:



I



I



Merkaptürük asit biosentezinde bulunan ve detoksifikasyonda temel rol oynayan şey amino asit sistein ( $\text{SHCH}_2\text{-CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ ); özellikle de reaktif tiyol parça yani tek değerli radikal  $-\text{SH}$ 'dir.

Yakın zamana kadar GST enzimleri hakkında çok az şey bilinmekteydi. Bu enzimlerin doğal hallerinin genellikle bağımsız olarak hareket eden bireysel alt birimlere sahip dimerler olarak var olduğu öğrenilmiştir. Bu dimerlerin her bir alt birimi yaklaşık 24-28 kDa'dır. Bunlar, kovalent olmayan etkileşimlerle iki benzer molekül kombinasyonu oluşturmak için dimer oluştururlar ve heterodimerin her bir alt birimi, diğer alt birimlerden kinetik olarak bağımsızdır. Bireysel alt birimlerin sadece benzer enzim sınıflarına ait alt birimler ile dimer oluşturduğu görülmüştür.

Memelilerin tam cDNA kodlamasında, sitosolik glutatyon S-transferazları yalıtık bırakılmış ve bilinen sınıflar için dizge haline getirilmiştir [28]. Pi sınıfı GST'ler içerisinde 208 aminoasitten, alfa sınıfı içerisinde 221 amino aside kadar uzanan peptitlerin açık okunabilir cDNA çerçeveleri tarafından kodlandığı belirlenmiştir.

1988 yılında ilk pi sınıfı GST, sığır plasentasından alınarak kristalize edilmiştir [29]. Sonrasında aynı grup, domuz akciğerinden elde edilmiş olan bir pi sınıfı enzimini saflaştırmış ve kristalize etmiştir [30]. 1991 yılında, bir GST'nin üç boyutlu yapısının ilk kez belirlenmesini sağlayan şey de bu kristaller olmuştur [31]. Pi sınıfı bir glutatyon S-transferazının üç boyutlu yapısı, bir domuza ait olan glutatyon S-transferaz pi/glutatyon sülfonat co-kristalinin kristalografik x-ışını analizi ile çözülmüştür. Rinemer'in yaptığı bu analiz, bu pi sınıfı GST'nin yaklaşık  $55\text{Å} \times 52\text{Å} \times 45\text{Å}$  molekül boyutlarında olan küresel bir şekle sahip olduğunu göstermiştir. Yalıtık haldeki bireysel alt birimler,  $10345\text{Å}^2$ 'lik ulaşılabilen bir yüzey alanına sahipken; dimer yapıdaki bir alt birimin ulaşılabilir yüzey alanı, bireysel alt

birimlerin 8975A<sup>2</sup>'ye katılmaları sonrasındaki toplamdan azdır. Dimerik bir yapının en belirgin özelliği, dimerizasyon sonrasındaki ulaşılabilir yüzey alanını sınırlayan iki alt birim arasında geniş bir kavite ya da yarık olmasıdır. Bu domuz modelindeki pi sınıfı, 209 amino asidi içeren bir homodimerik enzimdir. Bu enzimin yapısı ile polipeptit kıvrımı, bütün sitosolik GST ailesi için prototipiktir.

Bu pi yapısına ait olan her bir GST monomeri iki adet domain içermektedir: Bir küçük domain -1'den 76'ya kadar numaralandırılmış olan ve 76 amino asit içeren domain I- ile bir büyük domain -83'ten 209'a kadar numaralandırılmış olan ve 126 amino asit içeren domain II- [31,32], bu enzimin şerit temsilidir. Glutatyona bağlı olan enzim parçası, G-alanı, proteinin ilk domaini içerisinde bulunur [31-33] ve dimerizasyon sonucu oluşan yarıktaki kendine yer edinmiştir [34]. Bu glutatyon bağlanma alanı oldukça özeldir. Çalışmalar, aktivite için dimer yapısının ne kadar önemli olduğunu göstermiştir [32]. Kıvrım ve dizileme de dâhil bu polipeptitler hakkındaki ayrıntılı açıklamalar Wilce ve Parker, 1994 tarafından yapılmıştır.

İnsan glutatyon S-transferazı pi proteini ile ilgili çalışmalar yapılırken, monoklonal antikordardan birkaç farklı şekilde yararlanılmıştır. Antikorlar, dokularda bulunan bu enzimlerin hücrese seviyedeki yerlerinin tayin edilmesi için belirteç olarak kullanılmıştır. Bunlar, protein antijenlerinin belirli bölgelerine bağlanmak amacıyla üretilebilirler ve böylece protein moleküllerinin yapısal ve fonksiyonel parçalarının belirlenmesinde proplar olarak yararlı olurlar. Bir kısım monoklonal antikorun negatif ya da denatüre halde olan GST-pi ile tepkimeye girebilmesi, molekülün bütün yapıları, bağlayıcı domainin belirlenmesi ve glutatyon moleküllerinin bütün ya da bir parçasının katalizör fonksiyonlarının netliğe kavuşturulması ile ilgili ilave bilgilerin ortaya çıkmasını sağlamıştır [33].

Elektrofil substratların bağlı olduğu aktif alan, H-alanı, henüz tam olarak açıklanmamıştır. Bazı çalışmalar, bu alanın enzimin karboksil terminal bölgesinde olabileceğini göstermiştir [33]. Reinemer ve arkadaşları ise G-alana bitişik olarak konumlandığını iddia etmiş ve üç bölgeyi muhtemel bağlanma alanları olarak kabul etmişlerdir: 1. domain II'deki kavite, 2. yukarıda açıklanan ve küçük moleküllerin yer aldığı G-alanına bitişik olan yarıktaki hidrofobik bölge ve 3. bir dimerik yapıda

bulunan alt birimler arasında oluşmuş olan kavite ya da yarık [31]. Substrat bağlanma alanı, glutatyon bağlanma alanından çok daha az belirgindir; bu da GST'lerin çok çeşitli toksik maddelerle reaksiyona girmesini sağlar [32].

Beşinci sınıf pi izoenzimlerinin amino asit dizisi, izoenzimler arasında önemli bir yapısal ilişki olduğunu göstererek oluşturulmuştur. Öyle ki pi sınıfındaki kalıntıların %76'sı, yaklaşık %82-85 oranında bir benzerliğe sahip olan konumsal kimlik ile tamamen muhafaza edilmektedir. Yüksek benzerlik derecesi, farklı glutatyon S-transferaz sınıfları arasında görülmez. Sadece, pi sınıfı ile kıyaslandığında alfa ve mu sınıfları arasında yaklaşık %34'lük bir konumsal benzerlik bulunmaktadır. Bu sebeple, bu enzim ailesi belki fonksiyonel olarak birbiriyle ilişkili olabilir; fakat birincil yapısal ilişkilerine bakıldığında farklılık göstermektedir. Birçok izoenzim G-alanındaki yapısal farklılıklarının, bu izoenzimlerin glutatyon molekülündeki farklılaşın modifikasyonlara verdikleri cevapları belirlediği düşünülmektedir. Fakat H-alanındaki yapısal farklılıklar, birçok elektrofilik substrata farklılaşan özgüllükler katar.

### **1.5. Enzimatik Mekanizmalar**

GST'ler, daha az reaktif, daha fazla hidrofilik ve daha fazla salgılanmış olan ürünler elde etmek amacıyla hücrel glutatyonun fizyolojik ve ksenobiotik elektrofiller ile bağlanmasını katalize eder [28]. Memeli hücrelerindeki sülfhidril glutatyon grupları, bir hücre içerisindeki protein olmayan sülfhidril gruplarının yaklaşık % 10-20'sini içerir. Glutatyon üzerindeki S atomu, elektrofilik ksenobiotik alanlara kovalent olarak bağlanır. Glutatyon S-transferazları tarafından katalize edilen glutatyonun (GSH) elektrofilik bir substrat ile (R-X) yaygın bağlanma reaksiyonu aşağıdaki şekilde açıklanmaktadır:



Bu çeşit bağlanma reaksiyonuna verilebilecek örnek azot hardalında şu şekilde görünmektedir:



Alkilleyici bir ajanın yer aldığı bu reaksiyon, klorürün yer değiştirmesi yoluyla gerçekleşebilir. Bu, elektrofilik hardal fonksiyonelliğinin inaktivasyonuna sebep olur [35].

Nükleofilik katalizlerdeki glutatyon, genel olarak, anyonik tiyolat olarak tepkimeye girer. Glutatyon S-transferazları tarafından katalize edilen çoğu reaksiyonda ise nükleofilik bileşenler olarak bulunur. Bu reaksiyonlarda, bağlı glutatyon tiyolu transferazlar tarafından aktive edilir. Fakat tiyolu ne şekilde aktive ettiklerine dair az bilgi bulunmaktadır. Bu aktivasyon, elektrofiller üzerindeki baskıyı kolaylaştırır. İki aktivasyon mekanizması ileri sürülmüştür. Birincisi, proteinin tiyol grubunun protondan arındırılması amacıyla uygun bir pKa'nın aktif alanında bir zemin oluşturarak tiyolün nükleofililiğini artırdığının düşünüldüğü genel baz-katalizidir. İkinci ihtimalde ise bağlı glutatyonun tiyolat anyonu tiyol kısmı pKa'sı, enzimin aktif alanı tarafından gerçekleştirilen stabilizasyon sonrasında azalır [36]. Bu muhtemel aktivasyon mekanizmalarının tam olarak anlaşılması ve katalize sebep olan yapısal ve kimyasal olayların ayrıntılı bir biçimde anlaşılabilmesi için daha fazla incele yapılmasına ihtiyaç vardır.

Artan hücre içi GST seviyesinin hücreleri toksinlerden koruduğuna dair iddia, Manoharan ve arkadaşlarının (1987) çalışmalarında kanıtlanmıştır. Çalışmada, GST-1 için sıçan cDNA'sı COS ya da 10T1/2 hücreleri içerisine transfekte edilmiştir. Transfekte edilmiş bu hücreler GST aktivasyonunda 260 kat artış göstermiş; ayrıca transfekte durumunun görülmediği hücreler ile kıyaslandığında benzo(a)piren anti-diol epoksite karşı direnç oluşmasına sebep olmuştur.

GST enzimleri, ayrıca, bağımsız bir selenyum glutatyon peroksidaz aktivitesini katalize ederek lipid ve nükleik asit hidroperoksidlerinin detoksifikasyonuna yol açar. Bu reaksiyonlarda hidroperoksidin (R-OOH) azalması, iki glutatyon molünü yok eder ve nihai üründe glutatyonun katılımı olmadan yol alır.



Azalan hidroperoksidler, birçok ilaç ve diğer ksenobiotiklerin redoks geri dönüşümü esnasında oluşur; fakat hücrel oksijen kullanımının yan ürünleri biçimindeki normal metabolizmalarda da üretilebilir.

### 1.6. Metabolik Roller

GST'ler çok yönlü ve çok fonksiyonlu enzim aileleri oluşturan homo ve heterodimerik proteinlerdir. Bu enzimler, hemen hemen bütün aerobik hücrelerde bulunur; ayrıca bitki, balık, böcek, mantar, maya, bakteri, hayvan ve insanlarda da görülmektedir [32]. Bu enzimlerin tepkimeye girdiği substrat ya da elektrofilik moleküller oldukça çeşitlidir; fakat bunlar genellikle iri ve hidrofobiktir. GST-pi ilk olarak 1981 yılında Guthenberg ve Mannervik tarafından term insan plasentasından alınmıştır ve bu sebeple plasental GST olarak adlandırılmaktadır [37]. GST'ler, ksenobiotikler ile hidroperoksidlerin hücrel detoksifikasyonunda yer alır ve mutajenez ile karsinogenezde önemli bir rol oynar. Günümüzde, GST'lerin sitotoksik ilaçlar ile karsinojenlere karşı birçok detoksifikasyon mekanizması oluşturduğu bilinmektedir.

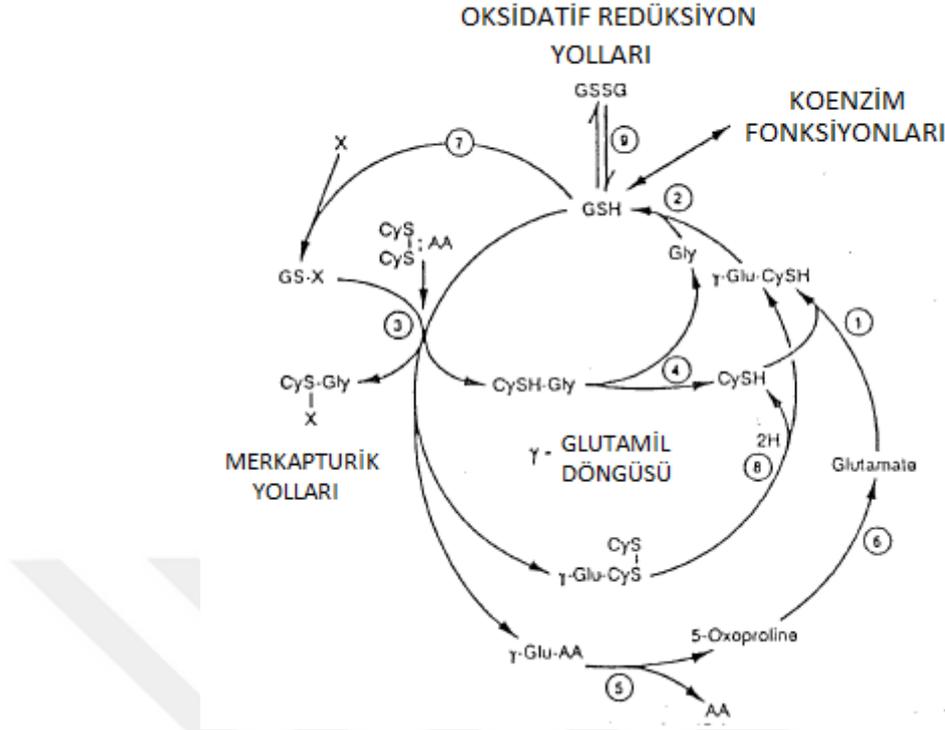
En önemli hücrel antioksidan olduğu düşünülen glutatyonun metabolik kullanımı, birkaç yol izler. Bunların arasında, merkaptüre yolu boyunca glutatyon S-transferazları tarafından katalize edilen tepkimeler de bulunmaktadır. Glutatyon, ayrıca, hidrojen peroksit ile organik peroksitleri yok eden bir glutatyon peroksidaz substratıdır. Buna ilaveten, askorbat için dehidroaskorbat konversiyonu ve deoksiribonükleotit için ribonükleotit konversiyonunda ihtiyaç duyulan indirgeme gücünü sağlar; bu sebeple DNA sentezi ve onarımı ile yeni sentezlenmiş proteinlerin katlanmasında önem taşımaktadır. Hücrel koruma ile glutatyon metabolizmasında bulunan farklı metabolik yollar, bunlar, güçlü bir biçimde birbirine bağlanmıştır ve glutatyon S-transferazları merkaptür yolağında belirgin bir rol oynar.

Glutasyon S-transferazın karsinogenezdeki rolü, bu transferazların hücrel glutasyonu farklı ksenobiotiklere bağlama kabiliyeti ve dolayısıyla da potansiyel karsinojenleri daha az reaktif formlara dönüştürme becerisiyle ilişkilidir. Bunların bağlandığı elektrofillerden bazıları, alkil ve aril halideler, epoksitler, kinonlar ve aktive alkenlerdir. Bunlara benzer bileşimler ile gerçekleşen birleşme reaksiyonu, merkaptürik asit yolakta ilk adım olarak seyretmektedir.

Merkaptürik asit yolağı, tabiatı gereğı ubikuitöz olan hücrel glutasyon içerir. 0.5'ten 10 mM'ye uzanan bir konsantrasyona sahiptir ve yapısal iki karakteristik özelliğı vardır: sülfhidril (SH) grubu ve gama-glutamil bağ Bu iki karakteristik özellik bu tripeptidin biyolojik fonksiyonlarını tanımlar. Glutasyonun GST'ler tarafından elektrofilik bileşenlere bağlanması, bu yolaktaki ilk adım olarak gerçekleşir. Sonrasında ise glutasyon S-bağı, enzimle katalize edilmiş üç tepkimeyle merkaptürik aside dönüşür:

1. gama-glutamil kısmın membrana bağı GGT ile katalize edilerek ortadan kaldırılması
2. cys-gly S-konjugatı glisin kısmının bazı aminopeptidazlar ya da dipeptidazlar ile ortadan kaldırılması
3. ilgili merkaptürik asidin elde edilmesi amacıyla, sistein konjugatın N-asetiltransferaz ile katalize edilerek N-asetilasyonu

Merkaptürik asitler yani N-asetilsistein S-konjugatları, alkil ve aril gruplar ile halojen, nitro, amino ya da diğler gruplara sahip olan ya da olmayan heterosiklik grup benzeri sülfür sübstitüleri içerebilir [38].



**Şekil 1.1.** Glutasyon Metabolizmasının Tüm Yolakları

Lipofilik bileşimlerin bağlayıcı özelliğine sahip tek bir proteinin ve glutasyon ile geri dönüşlü bağlanma gerçekleştirme kapasitesinin, bir organizmanın potansiyel olarak toksik özellik taşıyan maddeler ile (solunmuş, yenilmiş ya da metabolik olarak üretilmiş) mücadele etmesine olanak tanıyan çok yönlü araçlar sağladığı bilinmektedir. Aflatoksin B<sub>1</sub>, vinil klorid ve 1,2-dibromoetanları (bir benzin katığı) içerin kuvvetli karsinojenler, glutasyon eklentileri oluşturur ve dışarı atılır [40-42]. Bazı yararlı ilaçlar doğrudan test edilmiş ve GST substratları oldukları ortaya çıkmıştır. Bunlar [38]:

- Benzo(a)piren 4,5-oksit
- Bromsülfoftalein
- 1-Kloro-2, 4-dinitrobenzen
- 1,2-Dikloro-4-nitrobenzen
- 1,2-Epoksi-3-(p-nitrofenoksi)-propan

Etakrinik asit  
İyodometan  
2-Nitropropan  
Menaftil sülfat  
*p*-Nitrobenzil klorür  
*trans*-4-Fenil-3-büten-2-one  
Prostaglandin A<sub>1</sub>

Diğer ilaçların, sadece, aynı anda her yerde bulunan enzimlerden olan sitokrom P-450 mikst fonksiyonlu oksidazlar tarafından gerçekleştirilen oksidasyon sonrasında glutasyon transferazı konjugatı oldukları bilinmektedir [39].

Transferazlar, katalizörlük yeteneklerinin yanı sıra, organik maddeler ve steroidler, prostaglandinler ve lökotrienleri içeren endojen bileşimler için taşıyıcı protein olarak hareket etmektedir [34,42]. Bu ligand bağlama fonksiyonu, safra tuzu, safra boyası, hem ve steroidleri içeren hidrofobik ve amfipatik nitelikteki birçok bileşenin hücre içi taşınımını kolaylaştırır. Genellikle, bu bileşenler tarafından gerçekleştirilen bağlanma sonrasında enzim aktivitesi bağlı ligand tarafından engellenir.

Detoksifikasyon yollarında yer almamış olan glutatyona birleşik hidrofobik toksinler, suda daha fazla erir hale gelebilir ve dolayısıyla da hücreden rahatlıkla atılabilir. Dahası hücreler, glutasyonla olan yüksek bağlama afinitesi sonrasında meydana gelen toksik maddelerin izolasyonu ve sekestrasyonu sebebiyle toksik maddelerden bir nebze korunabilir. Bu sebeple, maddelerin non-toksik ya da metabolize edilmiş substratlara dönüşümünden ayrı olarak, glutasyon S-transferazları ile ilişkili olan hücreler için bazı korunma araçları sağlanır.

GST'lerin, ayrıca, oksidatif strese karşı verilen hücresel yanıt sürecinde de yer aldığı düşünülmektedir. Bunlar, özellikle, intrinsik peroksidaz aktivitesine sahip olan alfa ve pi formundaki GST'lerdir. Bazı transferazlar, bir selenyum-bağımsız peroksidaz aktivitesini lipid ve nükleik asit hidroperoksitleri ile katalize edebilir. Diğerleri, delta5-3-ketosteroyidlerin izomerizasyonunda olduğu gibi gerçek koenzimler olarak hareket ederler [31]. Bu sebeple, iyonizan radyasyon ya da diğer kaynaklar sebebiyle

ortaya çıkan oksidatif strese karşı korunmada rol oynayabilmektedirler. Bu sebeble iyonize radyasyon ya da diğer kaynaklar sebebiyle ortaya çıkan oksidatif strese karşı rol oynayabilmektedirler.[43,44].

Glutasyon S-transferaz ailesi, üç çeşit reaksiyonu (hidroliz, transpeptidasyon, ototranspeptidasyon) katalize edebilen fonksiyonel metabolizmanın birçok safhasında bulunan bir enzim grubu olan gama-glutamil transpeptidaz (GGT) ile yakından ilişkilidir. Glutasyonun metabolik döngüsü, GGT aktivitesi ile yakından ilişkilidir; çünkü bu enzim, hücrel glutasyon tiyoeterin merkaptürik asitlere dönüşümünü katalize ettiği bilinen tek enzimdir. GGT, ayrıca, amino asitlerin hücrel dolaşımında da yer alır. Memelilerin endojenöz bileşimlerden önemli miktarlarda merkaptürik asit ürettiğine dair herhangi bir kanıt olmamasına rağmen, çok sayıda ksenobiotik ve normal yiyecek bileşeni merkaptürik asit olarak vücuttan dışarıya atılır [38].

## **1.7. Fonksiyonlar**

### **1.7.1. GST ve Hücrel Detoksifikasyon**

İnsanın geniş yapısal çeşitliliğe sahip çok sayıda farklı kimyasala maruz kalması fiili olarak kaçınılmazdır. Potansiyel olarak zararlı ve toksik maddeler, suda, havada, yiyeceklerde bulunabilir ve hatta ilaç olarak sunulmaktadır. Kimyasalların vücut tarafından polar ve atılabilir metabolitlere dönüştürülmesi, bunların vücuttan atılabilmesini kolaylaştırmaktadır. Fakat alternatif yollar, çeşitli hücrel makromoleküllere sahip yüksek reaktif potansiyel barındıran elektrofilik bileşenlerin üretilmesi amacıyla bu kimyasalları metabolize edebilir. Hücrel makromoleküller ile gerçekleşen tepkimelerdeki bozukluklar ve/veya sonuçlar, toksisite olgusunu (sitotoksisite, immünotoksisite, mutajenisite ya da karsinojenite) ortaya çıkarabilir.

Hücrelerin çeşitli kimyasal ajanlara karşı sahip oldukları *temel* savunma mekanizması tripeptit glutatyondur. Glutasyon (gama-glutamil-sisteinglisin), memeli hücrelerinde bulunan düşük moleküler ağırlıktaki ana peptittir ve önceden de

bahsedildiği üzere çeşitli hücrel tepkimelerde yer alır [27,45]. Glutasyon, kimyasal elektrofili nötralize etme ve böylelikle bunların hücrel bileşenler ile tepkimeye girmelerini engelleme yeteneğine sahiptir. Eğer bu protein, yetersiz beslenme ya da kimyasallar sebebiyle dokularda tükenirse kimyasalların toksik etkileri çok fazla artış gösterebilir. Antikarsinojenik tedavi yöntemleri hakkında yapılan araştırmalarda, terapötik maddelerin seçiminde, kimyasalların glutasyon ile bağlanmasıyla sonuçlanan detoksikasyonun stimule edilme çabaları baz alınmaktadır. Elektrofilik bileşenler, bir dereceye kadar kendiliğinden hücrel glutasyona bağlanır; fakat bağlanma, genellikle, glutasyon S-transferaz enzim ailesinden etkilenir.

Glutasyonun bir diğer rolü ise reaktif oksijen türlerine karşı sergilenen savunmada yer almasıdır. Askorbat ve tokoferol ile konjugasyon halinde olan glutasyon, temel antioksidan olarak hareket eder ve glutasyon redüktaz tarafından yeniden üretilir. Glutasyon, ayrıca, glutasyon peroksidaz sisteminin de parçasıdır. Peroksidaz ve hidroperoksidazlar hücrel letaliteye sebep olabilir. Bu sistem, hücrelerin peroksitlerden korunmasını sağlar ve biyolojik membranları lipit peroksidasyondan korur. Glutasyon transferazlarının bir kısmı, özellikle de alfa ve pi formundaki GST'ler, yapısal olarak peroksidaz aktivitesine sahiptir ve redoks tepkimeleri ya da normal hücrel oksijen kullanımındaki yanı sıra iyonizan radyasyon ya da diğer kaynaklar tarafından üretilen oksidatif strese karşı korunmada rol oynar [43,44].

Radyasyon, bir takım zararlı serbest radikaller, serbest radikal ürünleri ve hem organik hem de hidrojen peroksit-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peroksitleri üretir [44] Dahası, süper oksit de radyasyon tarafından üretilir. Radyasyon letalitesi, peroksitin, hücre tarafından daha az reaktif olan alkollere ve suya d n st r lmesine kıyasla daha hızlı olarak biriktiği zamanlarda meydana gelir. Peroksit indirgemesi için temel yolak, düşük derecedeki peroksit inaktivasyonunun %70'ine tekabül eden ve kalan inaktivasyondaki katalaza sahip olan glutasyon peroksidazıdır. İndirgenmiş durumdaki hücrel glutasyon seviyesi, heksoz monofosfat şantı ve peroksidazdan elde edilen elektronlarca sürdürülür ve transferaz aktiviteleri de glukoz oksidasyonuna bağlıdır [44]. Bu şant olmaz ise, hidroperoksitlerden kaynaklı toksisite artar.

GST'ler, katalize etme fonksiyonlarının yanı sıra, detoksikasyonda da rol oynar. Bunu, bağlanma tepkimesi substratları olmayan ligandları doğrudan bağlayarak ve ayırarak gerçekleştirir [46]. Yapılan ilk incelemelerde, purifiye edilen sıçan karaciğeri izoenzimi yüksek bağlama afinitesi özelliği sebebiyle "ligand" nitelikte olarak tanımlanmıştır. GST'ler ise bilirubini de içeren bileşenleri bağlar ve taşır; hücre boyunca taşınımı kolaylaştırır ve diğer safra tuzlarını da bağlar. Bakır ve bakır türevlerine bağlanma durumu da meydana gelmektedir. Steroidleri de içeren diğer biyolojik medyatörler, erken tip hipersensitivite reaksiyonlarında yer alan önemli bir medyatör olan lökotriene de olduğu gibi, güçlü bağlanma affinitesi göstermişlerdir. Bu, bir bağlanma reaksiyonu ya da parakrin lökotrien C4 hormonu ortaya çıkaran bir endojen lökotrien A4 bileşenine glutatyonun doğrudan bağlanması yolu ile gerçekleşir. GST-aracılı ligand bağlanma, genellikle, bağlı ligand tarafından gerçekleştirilen GST aktivitesinin inhibisyonu ile ilişkilidir ve lipofilik bileşenlerin hücre içi taşınımını kolaylaştırır.

Glutatyon konjugasyonunun önemli bir detoksikasyon tepkimesi olduğu belirtilmesine rağmen, toksik glutatyon S-konjugatı oluşumuyla sonuçlanan glutatyon bağımlı bioaktivasyon tepkimelerinin de meydana geldiği görülmüştür. Farklı bileşen tipleri, haloalkanlar, hidrokinonlar ve aminofenolün toksik glutatyon S-konjugatları oluşturduğu görülmüştür [27-35]. Dahası, antibiyotik neokarsinostatin sitotoksikite de tiyoller tarafından artırılmaktadır. Glutatyon ya da glutatyon/GST tarafından aktive edilen ve toksik konjugatlar oluşturan bu gibi bileşenler, muhtemelen hücrelere doğru yönlendirilir ve yüksek GSH ya da GSH/GST seviyesi ile sitotoksik ya da kemoterapötik maddeler olarak kullanılırlar. Buna karşılık, nispeten daha yararlı maddeler toksik; ender durumlarda da karsinogenik maddelere dönüştürülebilir ki sonuç olarak enzim sisteminde karsinogenez sürecine katkı sağlayan bir faktör rolü oynar.

### **1.7.2. Hücre Çekirdeğinde GST Fonksiyonu**

Glutatyon S-transferazlarının hücre çekirdeğindeki fonksiyonu/fonksiyonları konusunda varsayımdan öte bir bilgi mevcut değildir. Hücre sitoplazmasındaki

rolleri düşünülürken, hücre çekirdeğindeki fonksiyonları konusunda yapılabilecek en net tahmin, sitoplazmadaki detoksifikasyondan sıyrılmış olan elektrofilik bileşenlerin biotransformasyonunu gerçekleştirmesi ve böylece bunların DNA ya da diğer moleküller ile etkileşime girmesini engellemesidir. GST-pi, kimyasal karsinogenezin ilk evreleri süresince sıçan karaciğerindeki preneoplastik lezyon çekirdeklerinde immünohistokimyasal olarak tespit edilmiştir. Tan ve arkadaşları (1986), timin hidroperoksite karşı yüksek GST-pi reaktivitesi olduğunu göstermiş ve detoksifikasyonda yer aldığı ya da taşıyıcı protein olarak hareket ettiği ileri sürülmüştür. Normal sıçan ve insan karaciğerinde, GST alt birimleri ile GST- $\mu$  ve GST-pi'nin serbest ve çekirdeğe bağlı kesitler olarak var olduğu tespit edilmiştir ve bunlar, DNA peroksitlerinin detoksifikasyonunda belirli bir önem taşıyor olabilir [47,48]. GST'lerin DNA ve benzo(a)piren arasında in vivo ve in vitro olarak gerçekleşen kovalent bağlanmayı engelleyerek koruyucu bir rol oynadığı görülmektedir [49]. GST'nin diğer bir görevi ise, nükleer fonksiyonun düzenlenmesinde oynadığı roldür. Bir non-histon proteinin de glutatyon S-transferazı olduğu belirlenmiş ve DNA transkripsiyonu ya da prosesinin gerçekleştiği alanlardaki ya da bu alanlara bitişik yerlerdeki GST alt birimlerinde nükleer lokalizasyon meydana geldiği görülmüştür. Bunlar, özellikle, hnRNA'nın mRNA'ya doğru gelişiminde kritik rol oynadığı öne sürülen parçaları oluşturmak amacıyla proteinlerle ilişki halinde olan ürik asit bakımından zengin küçük nükleer RNA'lar ile ilintili olarak bulunmuşlardır [49]. Bu sebeple gen ekspresyonunun modüle edilmesinde rol oynayabilirler.

### 1.7.3. GST ve İlaç Direnci

Kemoterapötik maddeler sürekli olarak geliştirilmekte; ayrıca hayatta kalma süresini uzatma ve farklı insan tümörlerini tedavi etme süreçlerindeki etkinlikleri bakımından incelenmektedir. Kemopreventif maddeler geliştirilirken bazı ayırt edici stratejiler izlenir: 1. Kemopreventif aktivitenin ölçülmesi amacıyla son nokta olarak kullanılabilir premalign belirteçlerin, özellikle de erken premalign lezyonların, belirlenmesi ve validasyonu; 2. Etki mekanizması bazındaki potansiyel terapötik maddelerin belirlenmesi ve test edilmesi; 3. Etkinliğin maksimize, toksisitenin ise

minimize edilmesi amacıyla birleşik tedavilerin değerlendirilmesi; 4. Gelişimin her aşamasında, en iyi maddenin tercih edilmesi ile mevcut kaynakların en etkili kullanımının kontrol edilmesi maksadıyla maddeleri belirlemek ve derecelendirmek [50]. Kemoterapötik maddeler, hodgkin ve non-hodgkin lenfoma, akut lösemi ve teratom olmak üzere az sayıdaki yetişkin tümörünü tedavi eder ve erken başvuru olması durumunda ise çocuk tümörlerinin çoğunluğunu tedavi edebilirler. Fakat solid tümörlerin çoğunda kemoterapiye verilen yanıt %20'den daha düşük bir orandadır ve bazı tümörler tedavi edilebilir olarak kabul edilmelerine rağmen, nihayetinde tekrarlayabilir ve ilaç tedavisine direnç gösterebilir [51]. Bu direnç, belki de, belirli hücrelerde kendi karakteristikleri olarak mevcut durumdadır. Ayrıca, kendi orijinal formlarındayken ya da başkalaşmış hallerinde görülebilir ki bu da hücre içerisinde sabit bir değişime sebep olur. Ya da belirli bir ilaca maruz kalınması sonrasında direnç oluşumu ortaya çıkabilir. İlaçların etkili olmadığı ve ilaç direnci oluşumunu da içeren mekanizmalar, ilaç farmakokinetikleri ile bunların moleküler seviyedeki etkinliğini etkileyecek olan faktörlerle ilişkili olarak ele alınmalıdır. Etkinlik, hedef alanda gerçekleştirilen ve uygulama anından sitosidal konsantrasyonların elde edildiği zamana kadar olan süre içerisinde etki altında olacaktır ve büyük önem taşımaktadır.

Çoklu ilaç direnci (MDR), hücrenin hiçbir zaman maruz kalmadığı farklı kimyasal sınıflardaki çeşitli maddelere karşı gösterilen ilaca bağlı çapraz dirence maruz kalınması olgusudur [51]. İlaç direnci birden fazla yolak vasıtasıyla sağlanıyor olmasına rağmen, MDR'nin ayırt edici özelliği p-glikoprotein ekspresyonudur.

P-glikoprotein, dirençli hücrelerdeki toksin birikimini azaltmaya yardımcı olan ve bir ilaç akış pompası olarak çalıştığı düşünülen membrana bağlı 170kD bir glikoproteindir. Altı adet hidrofobik domain ve bir adet de ard arda tekrarlanan ATP bağlama domainine sahiptir. Klonlanmış p-glikoprotein nükleotit sekansları, membrana bağlı nakil proteini ile ona ilaç ya da substrat taşıma işlevi gören periplazmik substrat bağlama proteinlerini de içeren iyi karakterize edilmiş bakteriyel taşıma sistemleri ile güçlü benzerlikler gösterir. Normal substratlar için henüz net bir fikir olmamasına rağmen, P-glikoproteinlerin ilaçlar için transmembran taşıyıcı olarak hareket ettiği bilinmektedir. MDR1 geni (çoklu ilaç direnci geni) ile p-

glikoprotein geni, insanlarda 7q21-31 kromozomunda yer alır. Bu gen ya da p-glikoprotein düzenlenmesi, seleksiyon süresi boyunca değişkenlik gösteren ilgili her bir katkı ve amplifikasyon, transkripsiyon ve çeviri yoluyla gerçekleştirilir [51].

Çoklu ilaç direnci gösteren bir meme kanseri hücre dizisinde yüksek oranda GST-pi ve aşırı p-glikoprotein okuması görülmesi sonucunda, GST'lerin p-glikoproteinler ile memelilere ait bir ilaç ya da toksin taşıma sistemi olarak tepkimeye girebileceği öne sürülmüştür [46]. Farklı ilaç direnç mekanizmaları arasında karşılıklı bir ilişki olduğu reddedilemez. Bir seferde birden fazla direnç mekanizmasının değerlendirildiği çok az çalışma vardır. Efferth ve arkadaşları (1992) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, ilaç direnç belirteçleri olan p-glikoprotein (P-1700), glutatyon S-transferaz (GST-pi) ve DNA topoizomeraz II (Topoll) ekspresyonları, insan böbreği kanseri hücre dizisi ile insan hematolojik neoplazilerinde ve insan göğüs kanserinde incelenmiştir. Direnç belirteçlerinin ko-ekspresyonu da görülmüştür. Böylelikle, tümör hücrelerinin proliferatif aktivitesinin bu belirteçlerin ekspresyonunda ve sitostatik ilaçlara karşı sergilenen direncin artmasında rol oynadığı kanıtlanmıştır [52]. Benzer bir şekilde, Volm ve arkadaşlarının (1991) yaptığı çalışmada, küçük hücreli olmayan dirençli akciğer kanserindeki fazla p-glikoprotein ve GST-pi ekspresyonu incelenmiş ve sonuç olarak kayda değer protein seviyesi ile P-170 ve GST-pi overekspresyonu arasında önemli bir ilişki olduğu görülmüştür. Ko-ekspresyon ya da çoklu ilaç direnci yollarını içeren çalışmalarda görülmüştür ki, eğer *dominant bir enzim* belirli bir reaksiyonda yer alabilirse bu, enzim ailelerinin katalitik seçiciliği ile bunların farklı doku ve tümör çeşitlerinde yer almalarıyla ilgili fikir sahibi olunmasını sağlar.

Buna karşılık, farklı enzim seviyeleri bakımından değerlendirilmiş olan hastalarda görülmüştür ki, bilinen karsinogenlerin detoksikasyonunda yer alan bir enzim ortalamadan *daha az* bir seviyede bulunuyor ise, hasta bu belirli karsinogenlere maruz kaldığı zaman bilinen kanser formu risklerine sahip olma ihtimali taşıyacaktır. Farklı mekanizmaların birbirinden tamamen bağımsız hareket etmediği belirtilmiş olmasına rağmen, diğer enzimlerin yaptığı katkılar düşük aktiviteyle sonuçlanabilir ki bu da yüksek risk demektir. Dahası, ilaç direnci ile ilgili olarak tam tersi düşünülebilir. Şöyle ki: eğer bir bireysel enzim, istenilen kemoterapötiklerin

inaktivasyonunda hâkim katalizör olarak var oluyorsa, tedavi altındaki bir birey için gerekli olan enzim seviyeleri, seçilmiş terapötiklerin potansiyel inaktivasyonun tahmini için yararlı olabilir ki böylelikle, gerekli görülürse, alternatif bir rejime geçilebilir.

Çeşitli antikanser ilaçları, GST katalizleri tarafından inaktive edilebilir ki birçok rapor, ilaç direnci başlangıcı ile yüksek GST seviyesi görüldüğünü bildirmiştir [51]. GST-pi'nin bazı çoklu ilaç dirençli hücre dizilerinde, özellikle de bir GST-pi substratı olan adriamisin ve etakrinik aside direnç gösterenlerde çokça bulunduğu görülmüştür.

Kemoterapi, tükürük bezi tümörleri için öncelikli tedavi seçeneği olmasa da, münferit kötü huylu tükürük bezi tümörlerinin metastatik lezyonlarının tedavisinde etkili olduğu görülmüştür. Diğer bazı doku tümörlerinde kemoterapi oldukça faydalıdır; ayrıca GST'ler ile diğer direnç biçimlerinin rolü konusundaki incelemeler de devam etmektedir.

Diğer ilaç direnci mekanizmaları, DNA yinelenmesi, kromozom iskelesi oluşumu ve kromozom ayırımında rol oynayan topoizomerez II enzimlerini (Topo II) içerir. Ayrıca, rekombinasyon ve gen transkripsiyonunda da rol oynarlar. Bu enzim, tek ve çift sarmallı DNA'da kopmalar yaratarak kendisini kopmanın 5' ucuna eklemler ve kovalent enzim DNA kompleksleri oluşturarak hareket eder. Doksurubisin benzeri bazı ilaçlar, topoizomerez II'yi engeller ve enzim-DNA bağı dengesini sağlar. Bu, ayrı DNA zincirinin bağlanması engellenmesi ile sonuçlanır. Direnç belirteçlerinin ko-ekspresyonu üzerine yapılan çalışmalarda, kanserli insan böbreği hücre dizilerinde ve meme kanserlerinde artan P-170 ve GST-pi ile kanserli böbrek hücre dizilerinde azalan Topo II ve artan P-170 ko-ekspresyonuna doğru bir yönelim olduğu görülmüştür [52]. Eğer böyle ise, özellikle HnRNA transkripsiyon ve gelişim bölgelerindeki çekirdekdeki GST bulguları, belirli hücrelerde ko-eksprese olduğunda muhtemel bir karşılıklı ilişki oluşması anlamında dikkat çekse de GST ile Topo II arasındaki ilişki tam olarak bilinmemektedir.

Eksizyon onarımı, glikosilaz, hatasız onarım, rekombinasyon onarımı ve uyumsuzluk onarımı çoklu DNA onarım mekanizmaları, ilaç direncinde rol oynamaktadır. Karsinogenezde ilaç direnci, onarım eksikliğinin hücre dizilerindeki hassasiyet ile ilişkili olduğu insana ait onarım yetersizliği hastalıklarında görülür. Buna karşılık, onarım ve diğer mekanizmalar tarafından belirli hücreler üzerinde daha fazla direnç uygulanabilir. Dirence, genellikle, birden fazla yolak vasıtasıyla aracılık edilir; fakat bireysel yolakların katkısı hususundaki bilgiler ile bu yolakların diğer direnç biçimlerine -moleküler ve kinetik- ilişkin bireysel rollerinin anlaşılmasına yardımcı olunur ve ayrıca ilaç protokollerinin planlanması için de bilgi temin edilir.

### **1.8. Glutasyon S-Transferaz İndüksiyonu ve Düzenlenmesi**

GST-pi'nin on sekiz aylık bir fetüsün mide epitelyumunda bulunduğu görülmüştür. Bu, bu formun insan mide kanserinde tabiatı gereği onkofetal olabileceğini göstermektedir [53]. Onkogenlerin GST ekspresyonundaki muhtemel aktivasyonu hakkında yapılan ilk çalışmalarda, GST ekspresyonu düzenlenmesine insan *ras* onkogeni de dâhil edilmiştir. Li ve arkadaşları (1988)'nin epitelyal sıçan karaciğeri hücrelerine insan *ras* ekspresyonu vektörünü transfekte ettikleri çalışmalarda, eksprese edilen GST7-7 mRNA seviyesinde altı kat artış görülmüştür. Power ve arkadaşları (1987) benzer bulgulara N-*ras* transfekte edilmiş BL8 hücrelerinde ya da metabolik olarak aktive edilmiş AfB<sub>1</sub> ile yapılan tedavilerde de rastlamıştır. Bu ilk çalışmalar, onkogenik faktörlerin GST gen ekspresyonunu başkalaştırdığını göstermektedir.

Glutasyon transferaz enzimleri indüksiyonu, sentetik gıda katkıları da dâhil olmak üzere bazı farklı araçlar vasıtasıyla da gerçekleşir. Bu katkılardan dördü olan [2(3)-tert-bütül-4-hidroksianisol] (BHA), BHT, propil galat ve etoksikuinin, deneysel karsinogenezi modüle ettiği görülmüştür [13]. Çok etkili bir lipid peroksidasyon inhibitörü ve doğrudan bir antioksidan olan etoksikuin, detoksifikasyon enzimlerinin, özellikle de glutasyon S-transferazlarının, indüksiyonu vasıtasıyla hareket eder. Etoksikuin ve BHT, BHA ve oltipraz içeren antioksidanlar, etkili glutasyon redüktaz, glutasyon S-transferaz, UDP-glukuronil transferaz ve epoksit hidrolaz uyarıcılarıdır.

%4 oranında etoksikuin içeren gıda takviyelerinin aflatoksine maruz kalmadan önceki hallerini inceleyen çalışmalar, in vitro olarak çoklu glutatyon S-transferaz biçimlerinin beş kattan daha fazla indüksiyon sergilediğini ve in vivo olarak aflotoksinin bilyer eliminasyonunda glutatyon konjugatı olarak 4.5 kat artış kaydedildiğini göstermiştir [13].

Soğan ve sarımsak gibi yiyeceklerde bulunan allyl di- ve tri-sülfür benzeri organosülfür bileşenlerin, karsinogenezin hem başlamasını hem de gelişmesini engellediği görülmüştür. Bu bileşenler karsinogenez başlangıcını, glutatyon S-transferazı aktivitesini başlatma yetenekleri ile engellemektedir [13]. GST tetikleyici diğer bileşenler içerisinde DDT, indol ve benzilizotiyosiyanat bulunmaktadır. Endüksiyonun, bunlar ve oksitlenebilir difenol ve fenilendiaminler, Michael reaksiyonu akseptörleri, organo-tiyosiyanat, elektrofiller (alkil ve aril halojenürler), metal iyonlar ( $HgCl_2$  ve  $CdCl_2$ ), trivalan arsenik türevler, komşu dimerkaptanlar, organik hidroperoksitler ve hidrojen peroksit ile 1,2-ditiyol-3-tiyonları içeren kapsamlı kimyasal ajan gruplarının sebep olduğu yüksek transkripsiyon sonucu oluştuğu düşünülmektedir [54].

Prestera ve arkadaşları (1992), GST'nin yukarıda belirtilen gruplardaki 28 bileşen tarafından gerçekleştirilen indüksiyonundaki moleküler mekanizmaları incelemiştir. Bu noktada, bir fare karaciğerinin GST alt birim geninin 5' üst bölgesinden alınan ve bu genin izole promotör bölgesinin 5' ucuna bağlı olan 41-bp artırıcı elementi barındıran ve bunu insan büyüme hormonu reseptör genini içeren bir plazmid içerisine yerleştiren bir yapı hazırlanmıştır. Bu yapı, sonrasında, Hep G2 insan hepatom hücrelerinin içerisine transfekte edilmiştir. İki katı hormon üretimi büyümesi ve çift kinonlu redaktaz faaliyetleri için gerekli olan test edilmiş 28 bileşen konsantrasyonunun oldukça doğrusal olduğu görülmüştür. Test edilen bütün kimyasal uyarıcıların, test edilmiş olan bileşen sınıflarının çeşitliliğinden bağımsız olarak, bu 41 baz çifti artırma elementleri vasıtasıyla gen ekspresyonunu tetiklediği görülmüştür. Uyarıcılara cevap verdiği anlaşılan bu genin artırıcı akış yukarı element dizileri, elektrofile yanıt veren element (EpRE) ve 41 nükleotit katman içerisinde bulunan antioksidana yanıt veren element (ARE) olarak adlandırılmıştır. Bu artırıcı

elementin, tamamen farklı bileşenlerin II. safha uyarıcı enzim aktivitesinin büyük çoğunluğuna aracılık ettiği düşünülmektedir [54].

Gen kodlayıcı insan GST-pi'si, promotör bölgesi de dâhil edilerek sıralandırılmıştır [55]. Konsensus aktive edici 1, AP1 proteininin bağlanma alanının promotör aktivitesi için gerekli olduğu görülmüştür. GSTP1 transkripsiyonunu yukarıya doğru regüle eden ve promotöre bağlı olan bir intron dizi de bulunmaktadır [55]. İnsan GST-pi geni ekspresyonu modülasyonunun retinoik asitten olumsuz anlamda; insülinde de olumlu anlamda etkilendiği görülmüştür. Retinoik asidin bazı kanserlerin tedavi edilmesinde etkili bir terapötik madde olduğu ortaya çıkmıştır [55]. Bunun GST'ler üzerinde yarattığı olumsuz modülasyona ilişkin bulgular, tümörlerde GST overekspresyonuna sebep olan mekanizmalar ile retinoik asidin hücre farklılaşmasını tetikleme ve malign potansiyelini engelleme kapasitesinin anlaşılmasını sağlar.

İnsülinin GST'ler üzerinde yarattığı olumlu modülasyona ilişkin bulgular, *c-jun*, *c-fos* ve *ras* genlerinin muhtemel ilişkisi hakkında bilgi vermektedir. İnsülin stimülasyonu, *c-jun* ve *c-fos* mRNA'da artışa sebep olur [55]. Bu sebeple, artan GST-pi transkripsiyonunun Fos ve Jun proteinleri tarafından düzenlendiği düşünülmektedir ki bu, Burgering ve arkadaşlarının (1991) ortaya attığı p21<sup>ras</sup>'ın *c-jun* ve *c-fos* gibi genlerin düzenlenmesinde yer alan bir insülin sinyali iletim yolağı aracısı olduğu fikrini desteklemektedir [55,56].

### **1.9. Normal İnsan Dokularında Glutasyon S-Transferaz Doku Dağılımları**

İnsan alfa, mu ve pi sınıfı glutasyon S-transferazları, immunohistokimyasal olarak bazı organlarda yer almaktadır. İnsan dokuları, hem bütün GST içeriklerinde hem de GST alt birimleri ya da izoenzimlerinin ekspresyonunda büyük oranda çeşitlilik gösterir. Dokular arasındaki niceliksel ve niteliksel farklılıkların, bir dokunun bireysel ya da çoklu karsinogenlere karşı yatkınlığının belirlenmesinde önem taşıdığı belirtilmektedir. Hem hayvanlar hem de insanlar üzerine yapılan çalışmalarda,

gelişim aşamaları esnasında farklı izoenzim ekspresyonlarında değişkenlikler meydana geldiği görülmüştür.

Sıçan karaciğeri gelişimi esnasında gerçekleşen glutatyon S-transferazı ekspresyonu üzerine yapılan çalışmalarda, karaciğerin fetüs haldeyken ve doğum sonrası gelişimi esnasındaki ontogenezinin üç temel GST sınıfı ekspresyonu –alfa, mu ve pi- ortaya çıkardığı görülmüştür. Ve her biri, karaciğer gelişim evrelerinde farklı ekspresyonlar sergilemiştir. Buna göre pi, transkripsiyon seviyesinde düzenlenen bir fetal proteindir; alfa ve mu ise fetüs gelişimi esnasındaki transkripsiyonel kontrol ve doğum sonrasındaki post-transkripsiyonel kontrolü kapsayan çoklu bir mekanizma tarafından düzenlenen “matür” proteinlerdir [57]. Gelişimin farklı derecelerindeki üç enzimin ekspresyonunda görülen değişimlerin önemi tam olarak belli olmamasına rağmen önemli olan mesele, fetüs ile yenidoğanın toksik maruziyete ve o anda orada bulunan enzim çeşitlerine yatkınlığıdır. Yetişkin sıçan karaciğerinde GST7-7 ifade edilmemektedir; fakat hepatokarsinogenez esnasında oldukça artmaktadır. Bu ifade biçimi ile fetüs gelişimi boyunca sergilediği farklı ifade şekli, bunun onkofetal bir protein olabileceğini ortaya koymaktadır [57]. İnsan karaciğerindeki GST-pi üzerine yapılan çalışmalarda ise mevcut mRNA ile protein seviyeleri tarafından belirlenen ekspresyon seviyesinin yetişkin ve fetüs karaciğerlerinde oldukça farklı olduğu görülmüştür [58], insan fetüs organlarında, glutatyon S-transferazı izoenzim bileşimini incelemişlerdir. İnsan fetüs akciğeri, beyni, böbreği, bağırsağı, karaciğeri ve böbreküstü bezleri üzerine çalışmalar yapılmış; akciğer, beyin, böbrek ve bağırsakların sadece asidik transferaz biçimini (GST-pi) içerdiği görülmüştür. Bu, GST-pi'nin fetüs dokularında daha fazla miktarda; daha primitif halde ve potansiyel bir multifonksiyonel role ve geniş substrat özgüllüğüne sahip bir biçimde bulunduğunu göstermektedir [59]. Fetüs karaciğeri, böbreği ve böbreküstü bezi seviyesi karşılık gelen yetişkin dokuları ile kıyaslandığında, farklılaşan izoenzim ekspresyonlarında gelişimsel değişimler görülmüştür; fakat fetüs ve yetişkin akciğeri ile beyinde hiçbir gelişimsel farklılığa rastlanmamıştır.

GST'nin farklı doku ekspresyonları konusundaki bilgilerin büyük çoğunluğu, yetişkin insan dokularıyla ilgilidir. Terrier ve arkadaşları (1990), normal insan dokuları üzerine yaptıkları bir çalışmada, GST-pi'nin genellikle epitel ürener,

sindirimsel ve solunum yolu hücrelerinde eksprese edildiğini görmüşler ve detoksikasyon ile toksik maddelerin yok edilmesinde rol oynayabileceğini iddia etmişlerdir. Bu bulgular, sekretuar epitelde bulunan p-glikoprotein ekspresyonu için iddia edilenlerle örtüşmekte ve bunların normal ve/veya malignan hücrelerde ko-regüle olma olasılıklarına destek sunmaktadır [60]. Bu, Efferth ve arkadaşlarının (1992) çalışmalarıyla da desteklenmiştir. Efferth ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda insan böbreği hücre dizileri, hematolojik malignite ve meme kanserinin böbrek ve memede P-170 ve GST-pi ko-ekspresyonlarına yönelik bir eğilim sergilediği görülmüştür. Hematolojik malignitede ise hiçbir ekspresyona rastlanmamıştır [52]. Tükürük bezlerindeki GST-pi ekspresyonu, Terrier'in çalışmasında yoktur.

Corrigall ve Kirsch, dokuz bireye ait 18 organdaki GST alfa, mu ve pi konsantrasyonları üzerine çeşitli bulgular sunmuşlar, Campbell ve arkadaşları da immünohisto kimyasal olarak yerleri belirlenen ve 15 insan dokusunda yer alan insan alfa, mu ve pi sınıfı GST'ler ile 39 farklı çeşit iyi huylu ve kötü huylu tümör belgelendirmişlerdir [48,61]. Bu çalışmalarda, alfa transferazlarında organlar arası yüksek değişimler ile nispeten sabit pi sınıfı transferaz konsantrasyonu görülmüştür. Pi sınıfı transferazlar, karaciğer, böbrek ve tükürük bezinde bulunan duktular hücrelerde fazlaca; parankimal hücrelerde ise çok az bulunmaktadır. Safra kanalı, pankreas kanalı, epididim, renal toplayıcı sistem ve tükürük kanallarındaki doku dağılımı ve GST-pi varlığının sonuçları detoksikasyondaki muhtemel rolleri düşünüldüğünde önem taşımaktadır. Terrier ve arkadaşlarının (1990) elde ettikleri sonuçların çarpıcı noktası, toksik maddelerin vücuttan atılmasında rol alan 3 temel sistem olan üriner, solunum ve sindirim sistemi epitelyumlarında bulunan güçlü GST-pi ekspresyonudur ki bu, toksin atımı ile metabolizmada rol oynadıkları anlamına gelmektedir. GST-pi izoenzimi daha çok böbrekte bulunur ve nefron, Henle kulpu, distal dalgalı kanal, toplayıcı kanal ile sidik borusu ve idrar kesesinde görülmüştür. GST-pi, ayrıca, akciğerdeki en etkili izoenzimdir. Buradaki rolü, solunum sistemini uçucu toksinler ve kirleticilerden korumaktır.

### **1.9.1. Glandüler Dokularda GST-pi Dağılımı**

Enzimlerin benzer fonksiyonel ya da gelişimsel karakteristiklere sahip yapılarıdaki dağılım biçimi, bu enzimlerin in vivo olarak oynadıkları rol hakkında kısmen bilgi verebilir. Histolojik olarak meme ve pankreas tükürük beziyle benzer bir karakteristiğe sahiptir ve bu sebeple GST-pi'nin bu dokulardaki dağılımı, doku kıyaslaması yapıldığında dikkat çekmektedir. Bazı meme tümörleri ve tükürük bezi tümörleri arasında güçlü benzerlikler bulunmaktadır. Pankreastaki GST-pi doku dağılımı, asiner ve adacıkları lekesiz bırakarak sentroasiner ve duktular yapıları hızlı bir biçimde belirler [48]. Bu, tükürük bezlerindeki ekspresyonuyla benzerdir. Fakat meme, hem asiner hem de duktal epitelyumda lekeli çıkar; burada miyoepitelyal hücreler de lekeli durumdadır.

### **1.9.2. Tükürük Bezinde GST-pi Dağılımı**

Campbell ve arkadaşlarının (1991) yaptığı çalışmanın, GST-pi'nin normal insan tükürük bezi dokusunda ve insan tükürük bezi tümörlerindeki ekspresyonu hakkında önceki bilgileri ortaya koyduğu görülmektedir. Normal bezler hakkındaki bulgular, belirsiz alanlarda bulunan sadece üç örneğe dayandırılmıştır ve duktular hücrelerin, pankreas kanallarınıninkine benzer olarak, pozitif boyanma; asiner hücrelerin ise negatif boyanma sergilediği görülmüştür. Sadece üç iyi huylu tükürük bezi tümörü boyanmıştır ve hepsi de pozitifdir. Farklı tükürük bezlerindeki enzimatik derecelerin, verili bir enzim için farklılık gösterebileceği bilinmektedir. Fakat GST-pi derecelerinin farklı insan tükürük bezlerinde farklılık gösterip göstermediği bilinmemektedir. Ayrıca, farklı insan tükürük bezleri tümörlerindeki GST-pi ekspresyonuna dair herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.

### **1.10. Neoplazi ve Preneoplazide Belirteç Olarak GST**

GST'ler sadece karsinojenlerin detoksikasyonunda rol oynamaz. Ve bir izoenzimin, en az bir kimyasal karsinojen modelinde bulunan neoplastik bir transformasyon

belirteci olduğu kaydedilmiştir. Solt-Farber karsinogenez modeli, sıçanlarda bulunan pi sınıfı GST için eski bir klasifikasyon olan GST7-7'nin önemli derecede yükseldiğini göstermektedir [62]. Bu modelde, transformasyonu başlatmak amacıyla sıçanlar bir karsinogene maruz bırakılıp sonrasında ise kısa bir ara veriliyor. Daha sonra hepatosit proliferasyonu tetiklemesi için kısmi hepatektomiye tabi tutuluyor ve normal hepatosit büyümesini önleyen bir toksik madde ile (örn: 2-asetilaminofluren) tedavi ediliyor. Toksine maruz bırakıldıktan birkaç hafta sonra sıçan karaciğerinin, büyük çoğunluğu preneoplastik olan ve zamanla gerileyen hiperplastik nodüller ile bezendiği görülmüştür. Kırkın üzerinde farklı karsinogenin bu tip hiperplastik nodüller oluşturduğu bilinmektedir. Bazı nodüller, hepatoselüler karsinoma doğru bir malignan transformasyona uğrarlar. Birçok araştırmacı, hiperplastik nodüllerde artan oranda sıçan GST7-7 ekspresyonu olduğunu ve premalign karaciğer hücrelerindeki GST7-7 endüksiyonunun öngörülebilir olduğunu (sıçan hepatositindeki premalign değişim belirteci halini alması gibi) keşfetmişlerdir [46]. Benzer bulgulara hepatoselüler insan karsinomlarındaki asidik GST (GST-pi) formunda da rastlanmaktadır [63]. Sıçanlarla yapılan çalışmalarda, yüksek oranda GST seviyesinin görüldüğü alanların yüksek oranda DNA replikasyonunun bulunduğu yerler olmadığı bilinmektedir. Bu, GST overekspresyonunun hücre proliferasyonu ile ilişkili olmadığını göstermektedir [46]. Sato (1989) tarafından yapılan bir çalışmada, Solt-Farber modeli tarafından M2 antikoru (mu sınıfı GST) kullanılarak tetiklenen odakların bir kısmı heterojen olarak lekelenmiştir. Bu, incelemeyi yapanlara göre, farklı sistemlerde ortaya çıkan lezyonlar arasındaki farklılıklara işaret ediyor olabilir.

Tetikleyicilerin kullanımını kapsayan immunohistokimyasal çalışmalarda, çok küçük pozitif GST-7-7 odaklarının ya da hatta tekli hücrelerin, bir örnekte tek tetikleyicinin verilmesinden 1-2 hafta sonra [54], diğer bir modelde ise tek doz dietilnitrozamin (DEN), dimetilnitrozamin (DMN) ya da aflatoksin B<sub>1</sub> (AfB<sub>1</sub>) verildikten sonraki 48 saat içerisinde meydana gelen GST-7-7 içeriğinde bir artış olmadan ya da GGT aktivitesi biokimyasal olarak belirgin olmadan önce görünür olduğu ortaya çıkmıştır [54,65]. Bu bireysel hücreler ile pozitif GST7-7 odakları, artan tetikleyici dozuyla (DEN) birlikte artış göstermiş; fakat fenobarbital, metilkolantren, poliklorlu bifenil ve izosafrolü içeren bilinen karaciğer karsinogenezi promotörleri tarafından tetiklenmemiştir [65]. Bu, GST-7-7'nin ilk değişimler ya da "harekete geçirilen"

hücreler için doğru belirteç olduğunu göstermiştir. Dahası, erken ve daha küçük lezyonlarda çekirdek boyanması görülmüştür; fakat bu diğer GST formları ile pozitive göstermemiştir. Buradan, GST-7-7'nin preneoplastik hücre çekirdeğinde bulunabileceği anlaşılmaktadır. Moore ve arkadaşları(1987) , karsinojenlere maruz bırakılan Suriye hamsterlarının pankreas dokularında da benzer GST7-7 yükselmesi görüldüğünü belirtmişlerdir. Polinitrozamin verildiğinde GST7-7 seviyesinin hem preneoplastik hem de neoplastik pankreas dokusunda arttığı görülmüştür. Sıçan karaciğerindeki GST-7-7 pozitif odağı, hem genotoksik hem de non-genotoksik karsinojenler için güvenilir belirteçler olduğu için GST-7-7 pozitif odağı, risk değerlendirmesinde pratik bir uygulama gerçekleştirilmesi ve çevresel bileşenlerin karsinojenik potansiyelinin belirlenmesi açısından ayrıca yarar sağlamaktadır [65].

Mu sınıfı GST enzimlerinde, insan GST- $\mu$  geni ekspresyonunda önemli derecede polimorfizm görülmektedir. Warholm ve arkadaşlarının (1983) yaptığı çalışma, bazı bireylerin bu enzim sınıfını eksprese ettiğini ve GST- $\mu$  ekspresyonu ile potansiyel karsinojenite arasında bir bağ olduğunu göstermiştir.

GST7-7 (GST-P) ve GST-pi içeren plasental GST'lerin, yukarıda belirtildiği üzere, deneysel modellerdeki preneoplastik ve neoplastik lezyonlar ile insan dokularında yükselmiş halde bulunduğu görülmüştür [52, 66-68]. Bazı durumlarda, yüksek GGT seviyesinin yüksek GST seviyesi ile birlikte meydana geldiği belirtilmiştir. Bu enzimlerin (GST ve GGT) premalignan ve malignan hücrelerdeki yüksek ekspresyonunun, GST ve GGT negatif hücreleri üzerinde seçici bir büyüme potansiyeli sağladığı ve sitotoksiteye yönelik direnç gösterdiği belirtilmiştir. Yüksek direnç, GGT ve GST enzimlerinin endüksiyonundan kaynaklı olabilir. GGT, kendi iç glutatyon seviyelerini korumaları için hücrelere hücre dışı glutatyondan yararlanma fırsatı tanır ve GST endüksiyonu da, ksenobiotiklere maruziyetin görüldüğü bir çevrede başkalaşmış hücrelerin korunması amacıyla glutatyon kullanımına olanak sağlar. Bu sebeple, bu enzimlerin toksik bir çevredeki birleşik etkisi, seçici hücre büyümesi ya da artan hücre proliferasyonu anlamına gelmektedir [69].

GST'ler ile GGT'lerin diğer detoksikasyon yollarıyla, özellikle de glikoprotein P-170 ile sitokrom p450'yle olan ilişkisi önem taşımaktadır. p450 (kendi indirgenmiş

biçiminin karbonmonoksit türevinin dalga boyu (450nm) tarafından ayırt edilen bir hemoprotein) için kullanılan p450 sistemi, birçok metabolik reaksiyondan sorumludur. Karsinojenleri de içeren ksenobiotikler için başlangıç metabolik reaksiyonlarından bir tanesi, bir detoksikasyon ürününün oksidasyonudur. Metabolik reaksiyonların ksenobiotikleri, aktive edilebilecek ya da yüksek karsinojene daha yakın olabilecek bir biçime dönüştürdüğü görülmüştür. Detoksikasyon enzimlerinin bu reaksiyonların bazıları içerisindeki potansiyel mevcudiyetini inceleyen çalışmalarda, p-glikoprotein (P-170) ko-ekspresyonu ile GST-pi'nin insan böbreği karsinom hücre dizisinde, hematolojik malignitede ve insan memesi karsinomlarında bulunduğu anlaşılmıştır [52]. Sigara kullanan kişilerin küçük hücreli olmayan dirençli akciğer karsinomundaki iki protein arasında önemli bir ilişki olduğu görülmüştür [70]. Bu enzimlerin sahip oldukları nitelikler ile karsinogenezlerle alakalı süreçlerdeki karşılıklı ilişkileri göz önüne alındığında beklenmeyen bir durum olmamasına rağmen, bu ikili ekspresyonun önemi henüz tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır. Bu enzimlerin, sadece hücrelerin maruziyet sonrasındaki ilk reaksiyonlarında değil muhtemel karsinogenez ya da tümörigenez sürecinin başlangıç, büyüme ve gelişme dönemlerinde de yer alabileceği görülmüştür. Hatta ortak bir düzenleyici kontrol altında da olabilirler. Yüksek GST seviyesi, tümör gelişiminin bir süreci olduğu düşünülen lipid peroksidasyonun önlenmesinde de rol oynuyor olabilir [71].

Çalışmalar, pi sınıfı glutatyon S-transferazın bazı neoplazmalarda bulunan alfa GST'ler ile birlikte çoklu insan tümörlerindeki en persistan ve güçlü bir şekilde eksprese edilen sınıf olduğunu göstermiştir [72,73]. Campbell ve arkadaşlarının (1988) otuz dokuz farklı iyi ve kötü huylu tümör üzerine yaptığı çalışmada, bu 39 farklı çeşit tümörün 31'inin GST-pi'ye pozitif reaksiyon gösterdiği görülmüştür. GST-pi antikorunun immunohistokimyasal olarak belirlenmesi üzerine yapılan diğer birçok araştırmanın, prekanseröz durumların, displazinin ve insan organlarında bulunan farklılaşmış karsinomların belirlenmesinde önemli bir rol oynadığı görülmüştür. Yüksek GST-pi seviyesi, meme, böbrek, akciğer, karaciğer, kolon, safra kesesi, mide, yemek borusu, rahim boynu ve oral mukozayı içeren birçok premalign ve malign lezyonda bulunmaktadır [74-85].

GST-pi'nin bazı neoplazmalardaki over-ekspresyonu, onun bu lezyonlar için bir belirteç olabileceğini göstermiştir. Ayrıca, onkogenler ile de ilişkili olduğu; bu sebeple de bir protoonkogen transformasyonu ya da onkogen aktivasyonu belirteci olabileceği belirtilmiştir. Teta sınıfı GST'lerin alfa, mu ve pi sınıflarının evrimsel önceli olduğu düşünülmektedir ki bunlar, organizmaların evrim boyunca görülen farklı toksik streslere adapte olmasına imkân tanıyan teta geninin duplikasyonu sonrasında ortaya çıkmışlardır [32]. Pi form GST ise daha çok fetüste bulunur ve bu formun, primitif bir karaktere sahip olduğu ve bu sebeple de tabiatı gereği onkofetal olduğu düşünülmektedir [57,58].

Önceki çalışmalara aykırı olsa da, özellikle servikal neoplaziyle ilgili olarak, displastik ya da neoplastik ve normal dokular ile GST-pi ekspresyonu arasında ayırım farkı olmadığını söyleyen bazı çalışmalar da mevcuttur [86-88]. Normal insan kolonu ve tümörlü kolon dokusu çoğunlukla GST-pi eksprese eder; bu sebeple bunun kolon tümörleri için iyi bir belirteç olduğu düşünülmemektedir. Fakat tümörlerde yüksek seviyede bulunmasıyla, bu gibi tümörlerin kemoterapötik maddelere karşı oldukça fazla direnç göstermesine katkı sağlanabilir [89].

### **1.10.1. GST ve Klinik Uygulamalardaki Kullanımı – Serum Analizi**

GST-pi serum analizleri, bazı klinik analizler açısından ele alınmıştır. İntravenöz piyelografi takip edilerek, yüksek oranda iyot içeren kontrast maddelerin enjeksiyonuyla birlikte idrar içerisinde yüksek oranda GST-pi'ye rastlanmaktadır. Bu enzimlerin varlığından, transplantasyon için böbrek seçimi sürecinde yararlanılmıştır. Çünkü bu, yüksek seviye hücre ölümünün bir işareti olarak görüldüğünden bu organın kullanımının önüne geçilebilir [90]. Yüksek GST-pi serum seviyesine, hepatit ve siroz durumları ile karbon tetraklorür kaynaklı karaciğer problemleri sonrasında da rastlanmıştır [38]. İlaç toksisitesi ve fasioliyazisle (trematod solucan ailesinin sebep olduğu bir enfeksiyon) ilişkili enzim seviyesine ilişkin çalışmalarda, kan glutasyonu (GSH), eritrosit glutasyon S-transferazı (GST) ve serum gama-glutamil transferaz (GGT), bithinol tedavisi öncesi ve sonrasında ölçülmüştür. Sonuç olarak, fasioliyazisli hastalardaki GSH, GST ve GGT seviyeleri ölçülmüş; bithinol

ile yapılan tedavi sonrasında bu seviyelerin normal kontrol değerlerine geri döndüğü görülmüştür. Böylelikle Fasciola enfeksiyonundan kaynaklı toksik özelliklerin oluştuğu doğrulanmış; bithinol tedavinin hiçbir yan etkisi olmadığı görülmüştür [91]. Bu sebeple fasioliyazisteki kan ve serum seviyeleri, erken terapötik yanıt verme noktasında yararlı olmuştur.

Tümörlü hastalarda kullanılan serumlardaki GST-pi seviyeleri üzerine de bazı incelemeler yapılmıştır. Gastrik karsinom ve özofajiyal karsinom sahibi hastalardaki GST-pi seviyeleri ölçülmüştür. Dahası, yüksek seviyelerin, özofajiyal karsinom sahibi hastalardaki tümörlerin ameliyatla alınmasından sonra normal seviyeye doğru gerilediği görülmüştür [84]. Kanserli hastaların tedavileri esnasında izlenmesi açısından serum GST-pi seviyelerinin tedavi sonrası takip edilmesi yararlı olabilir [53].

Sindirim sistemi kanseri olan hastalardaki GST seviyesini ölçen çalışmalar da yapılmıştır. Severini (1993), gastrik, karaciğer ve kalınbağırsak kanseri olan insanlarda ortalama seviyeden oldukça yüksek bir GST seviyesi olduğunu göstermiştir. Sindirim sistemi neoplazması görülen 95 kişi üzerinde incelemeler yapılmış; gastrik kanser olanların %90'ında, karaciğer kanseri olanların %100'ünde ve kalınbağırsak kanseri olanların da %89'unda, non-neoplastik hastalığa sahip olanlarınkinin üzerinde bir GST seviyesine rastlanmıştır. Bir kısım hastada da (15/95) ameliyat sonrası GST seviyesinin başlangıçta yükseldiği; sonrasında ise düştüğü görülmüştür ki bu, plazmadaki GST seviyesinin gastrik, karaciğer ve kalınbağırsak kanserinde bir tümör belirteci olarak kullanılabileceği anlamına gelir ve karsinoembriyonik antijen gibi belirteçlerle kombinasyon halinde değerlendirildiğinde yüksek bir hassasiyet yaratabilir [92].

Kanser tedavisi öncesinde, esnasında ve sonrasında hastalardaki farklı enzimlerin serum seviyesini inceleyen ve son zamanlarda yapılmış olan çalışmalar GST-pi seviyesinin, karma kemoterapi rejimlerine verilecek terapötik cevabın tahmin edilmesinde kullanılabilecek parametreler olarak önem taşımakta olduğunu göstermiştir. Kemoterapötik maddelere karşı gösterilen direnç, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin tedavisindeki temel sorundur. İlaç direncindeki ve

özellikle de platin içeren bileşenleri kapsayan alkilleyici ajanlara karşı gösterilen dirençteki GST rolünün, kemoterapide önemli bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Hida ve arkadaşlarının (1994) gerçekleştirdiği bir çalışmada, platin bileşenli karma kemoterapi alan hastalardaki GST-pi, karsinoembriyonik antijen (CEA), nöron spesifik enolaz (NSE) ve skuamöz hücreli karsinoma (SSC) antijeni içeren farklı bazı enzimlerdeki serum seviyesi incelenmiştir. Sonuç olarak, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olan 121 hastadan 50'sinde (%41,3), sağlıklı kontrol özneleriyle kıyaslandığında daha yüksek oranda GST-pi serum seviyesine rastlanmıştır. Kemoterapiye kısmi cevap veren hastalar arasındaki tedavi öncesi GST-pi seviyesi değişkenlik göstermiştir. Hiç cevap vermeyen hastalarda, kısmi cevap verenlerden çok daha yüksek oranda tedavi öncesi GST- $\pi$  seviyesine rastlanmıştır. Üzerinde çalışma yapılan diğer hiçbir enzimin tedaviye yanıt verme hususuyla ilişkisi bulunmamaktadır. Bu sebeple, tedavi öncesi GST-pi seviyelerinin, platin bileşenini içeren kemoterapi rejimlerine ne şekilde yanıt verileceğinin tahmin edilebilmesi açısından yararlı bir parametre olabileceği sonucuna ulaşılmıştır [93].

Faz II enzimlerini tanımlamak için kullanılan detoksikasyon enzimleri, glutatyon S-transferaz, kinon redaktaz ve UDP-glukronosil transferazlarını içerir. Bu enzimler, detoksikasyon potansiyellerinden ötürü antikarsinogenik olarak kabul edilmektedir. GST serum seviyesi ile kinon redaktazının korunan muhtemel bir alandaki doku seviyesiyle olan muhtemel ilişkisi üzerine incelemeler yapılmıştır [94]. Bu enzimlerin uyarıcıları, gıda katkı maddesi, ilaç ya da gıda bileşenleri olarak tüketiliyor olabilir ve yüksek doku seviyesinin oluşmasına sebep olmaktadır. Besin BHA'sı ya da dimetil fumarat, bu uyarıcılardan bir tanesidir ve farelerde hem kinon redaktazında hem de GST'de yüksek oranda hepatik özgül etkinliğe ve yine yüksek oranda serum aktivitesine sebep olmaktadır. Faz II serum enzimi aktiviteyi, doku seviyelerine bağlıdır ve serumdaki kinon redaktazı ile glutatyon S-transferazı aktiviteyi ölçümü ile belirlenir. Bu enzimlerin meyve ve sebzelerde bulunan uyarıcılar tarafından indüksiyonunun önleme hususunda önem taşıdığı ve faz II enzimlerinin serum enzim testlerinin de kemoprevansiyon denemelerinde işe yarayabileceği iddia edilmektedir [94].

Dahası, serum lipit peroksitleri, C ve E antioksidan vitaminleri, serum selenyum, serum seruloplazmin, eritrosit ile bunun membran lipit peroksidasyonu ve katalaz, süperoksit dizmutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon S-transferazı içeren antioksidan enzim seviyeleri, iyi ve kötü huylu meme tümörlerine sahip olan tedavi edilmemiş postmenopozal kadınlar ile bilinen herhangi bir neoplazisi olmayan yaş eşleşmeli kadınlar arasında kıyaslanarak incelenmiştir [94]. Meme kanseri olan kadınlarda, ciddi antioksidan potansiyeli bozukluğuna rastlanmış olup; bu, dolaşımdaki yüksek lipit peroksitleri, seruloplazmin ile antioksidan vitamin ve selenyumdaki azalış sebebiyle fark edilmiştir. Eritrosit ve GST'yi içeren membran lipit peroksidasyonu da önemli derecede artmıştır. Bu çalışmada, birbirine bağlı birçok sistem değerlendirilmiş ve antikarsinogenik ya da antioksidan potansiyelin farklı mekanizmalara bağlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu mekanizmaların her biri, kanser hastalarında yüksek çıkması beklenen lipit peroksidasyonunun önlenmesine katkıda bulunmaktadır [95].

### **1.10.2. İnsan Tümörleri Ve İnsan Tümörü Hücre Dizilerindeki GST-pi Dağılımı**

İnsan tümörü hücre dizilerindeki GST aktivitesi ile izoenzim kompozisyonun in vivo bulgularını yansıtmayı yansıtmadığını belirlemek amacıyla, insan tümörleri ile tümör hücre dizisindeki GST aktivitesi hakkında bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Substrat olarak 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) kullanılarak, solid tümörler ve tekabül eden tümör hücre dizilerindeki GST aktivitesi seviyesi ölçülmüştür [96]. Birçok durumda, solid tümörlerdeki ortalama aktivitenin hücre dizilerindekinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu tümör hücre dizileri, bu enzim seviyesinin karşılık gelen solid tümörlerde bulunanlardan farklı olduğunu gösterdiği için, hücre dizilerini kullanan ve doku örnekleri yerine anti kanser ilaçlarının etki mekanizmalarını inceleyen araştırmalarda da bu duruma rastlanabilir.

### 1.11. GST'de Cinsiyet Farklılıkları

GST konsantrasyonu regülasyonu farklı seviyelerde gerçekleşir. Bazı normal ve neoplastik hayvan ve insan dokularındaki GST ekspresyonunda cinsiyet farklılıkları görülmüştür. Farklı substratların test edilmesine dayanılarak hayvanlar üzerinde yapılan bazı çalışmalarda, erkek sıçanların daha yüksek derecede GST aktivitesine sahip oldukları görülmüştür [98]. Bazı izoenzimler (B transferaz) bulunmuş; fakat bunların dişi hayvanlarda daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca, yetişkin erkek fare karaciğerinde yüksek miktarda ve yetişkin dişi fare karaciğerinde de dikkate değer bir oranda olduğu görülen hepatik GSTM II'nin, testosteron enjeksiyonu ile dişilerde daha yüksek seviyelere çıkarılabileceği görülmüştür. Erkek faredeki seviye de kısırlaştırma ile kadınlardakine yakın bir seviyeye kadar düşürülebilir. Bu GST biçimindeki izoenzimler, testosteron ya da kısırlaştırma uygulamasından etkilenmezler [99].

Sıçan karaciğerinde de steroid hormon metabolizmasında ve ksenobiotik metabolizmada cinsiyet farklılıkları olduğu görülmüştür. Metabolizmadaki cinsiyet farklılıkları, neonatal dönemdeki testis androgenleri tarafından gerçekleştirilen neonatal "tanımlama"ya bağlanmıştır [100]. Önceki çalışmalarda, GST-7-7 pozitif odak gelişiminde bazı karsinojenler tarafından tetiklenen cinsiyet farklılıklarına rastlandığı görülmüştür. Solt-Farber modelindeki pozitif GST-7-7 lezyon alanları, erkek sıçanlarda dişi sıçanlarınkinden çok daha büyüktür [101]. Aynı etkiye, sıçanlardaki GGT-pozitif karaciğer odağında da rastlanmıştır. Cinsel anlamda yetişkin olan erkek ve dişi Wistar sıçanlarındaki enzim kaynaklı karaciğer odağı değişimi alan oranında belirgin cinsiyet farklılıklarına rastlanmıştır. Hepatik karsinom gelişimindeki farklılıklar da erkeklerdeki kanser gelişiminin dişilerden daha önce gerçekleştiğini göstermiştir ki erkeklerde kadınlara göre daha uzun bir latensi dönemi eğilimi görülmektedir [100-102] Malignan bir transformasyona uğrayacağı görülen hepatik karaciğer odağı, hormonal kontrollerdeki hipotalamik-pituiter aks etkisinin kontrol edilmesiyle değiştirilmiştir. Bu çalışmalar, sıçanlardaki farklı enzimatik ve metabolik hepatokarsinojen yollarının en azından bir kısmında hipotalamik-pituiter etkisi olduğunu göstermektedir.

İnsan (erkek ve kadın) kolon dokuları üzerine yapılan çalışmalarda, üç GST sınıfı da eksprese edilmiştir. Alfa GST'nin erkeklerde 2 kat daha yüksek oranda; mu sınıfı GST'nin kadınlarda 2 erkeklerde ise sadece 1 adet olduğu ve erkeklerle kıyaslandığında kadın kolonunda daha yüksek bir pi sınıfı GST termostabilitesi bulunduğu görülmüştür [103]. Pi izoenzimi için sadece bir gen gösterilmiş olmasına rağmen, tek bir plasentadan ayrılan amino asit dizisi üzerine yapılan çalışmalar, ana yapıda tekli amino asit farklılaşmaları olduğunu göstermektedir. Bu tip farklılıkların termostabilitedeki farklılıkların açıklayıcısı olduğu ve bu sebeple de yapıdaki güç algılanan değişikliklerin erkek ve kadın enzimleri arasındaki farkı açıklayabileceği iddia edilmiştir. Ana yapıda sadece ayrıntılı incelemelerle algılanabilecek cinsiyet bağlantılı farklar mevcut olabilir. GST'lerin steroidleri içeren bir kısım hidrofobik ligandı bağladığı düşünüldüğünde, GST'lerin cinsiyet hormonlarına ya da onların metabolitelerine karşı sergiledikleri farklı bağlanma biçimleri, cinsiyetler arası potansiyel konsantrasyon ile kinetik kabiliyet değişkenliğini açıklayabilir.

İnsan derisindeki GST aktivitesini, miktar tayinini ve kinetik niteliklerini karşılaştıran çalışmaların kolon üzerine yapılan önceki çalışmalar ile uyumlu olduğu görülmüştür [103]. Üç GST izoenzimi, asıl form GST-pi olmak üzere, hem erkek hem de kadın derisinde eksprese edilmiştir. Kolonik dokularda da olduğu üzere, kadın derisinde erkeklerle kıyaslandığında daha yüksek bir GST-pi özgül etkinliği bulunduğu gözlemlenmiştir. GST-pi'nin diferansiye ekspresyonunun bu bulguların asıl nedeni olup olmadığı ya da posttranslasyonel modifikasyonun cinsiyetlerde görülen kinetik niteliklerdeki farklılaşmalara sebep olup olmadığı bilinmemektedir.

İnsana ait normal tükürük bezi ile tükürük bezi tümörlerindeki östradiol, progesteron ve progesteron reseptörü ekspresyonu ile lokalizasyonundaki farklılıklar üzerine de çalışmalar yapılmıştır. Adenoid kistik tümörlerde hem cinsiyet steroidlerine hem de progesteron reseptörüne rastlanmıştır. Bu bulgular, insan tükürük bezinin hedef östrojen dokularından bir tanesi olduğunu ve progesteron reseptörlerini eksprese eden tümörlerin endokrin tedavisine cevap verebileceğini göstermektedir [104]. Glutatyon S-transferaz ekspresyonu ile hücrese düzey üzerindeki hormonal etki ve tükürük bezindeki kinetikler arasındaki ilişki tam olarak bilinmemektedir. Fakat deri ve kolonda da görüldüğü üzere, erkek ve kadındaki benzer dokularda görülen GST

ekspresyonunda cinsiyet farklılıklarına rastlanıldığına ve tükürük bezinin, farklı hassasiyetlikler gösteren tükürük bezi tümörleri için hormonal olarak hassas bir doku olduğuna dair bilgiler ortaya çıkmaktadır. Bu sebeple, cinsiyetler arasındaki izoenzim seviyesinde farklılıklar olduğu düşünülebilir.

Belirli enzim ekspresyonlarındaki niteliksel ve niceliksel farklılıkların, karsinogenleri de içeren ksenobiyotikleri detoksifiye etme becerisini kazanıp kazanmayacağı hususu dikkate alınmalıdır. Bazı kanser vakalarında, özellikle de baş ve boyun kanserlerinde, kadın ve erkek arasında görülen farklılıkların, cinsiyet hassasiyeti ile ksenobiyotiklere maruziyetle bağlantılı faktörlerle ilişkili olduğu görülmüştür [105]. Cinsiyete bağlı farklılıkların fizyolojik önemi tam olarak bilinmemektedir; fakat GST izoenzimleri kimyasal karsinogenlere karşı sergilenen savunma mekanizmalarında yer aldığı ve GST ekspresyonları da ksenobiyotiklere maruz kalındığında etkilendiği için, cinsiyetler arasında ayırıcı bir ekspresyonun görülme ihtimali olduğu söylenebilir. Farklılık gösteren GST endüksiyonları, kadın ve erkek arasındaki farklılıkları açıklayabilir ki çalışma ortamı, kullanılan kozmetikler vs sebebiyle ksenobiyotiklere maruz kalınmasıyla cinsiyete ilişkin kesin farklılıklar değil değişen seviyeler ortaya çıkar.

### **1.12. İnsan Tükürük Bezi Dokusu ve Tümörleri**

Majör ve minör olmak üzere iki çeşit tükürük bezi bulunmaktadır. Majör bezler, çiftli parotis, submandibular ve sublingual bezlerini içerir. Minör tükürük bezleri ise, boyut olarak daha küçük olmalarına rağmen, damak, dil, dudak, ağız mukozası ve ağız tabanına yayılmıştır. Salgı birimlerinin mikroskobik yapısı çok az farklılık göstermektedir ve buna bağlı olarak, bezlerdeki tükürük bileşimi de farklıdır: sublingual bezler asıl olarak muköz; parotis bezler serum; submandibular bezler ise bir ara form üretirler. Tüm bu glandların duktal, sinir, damar ve bağ doku sistemleri vardır. Özellikle parotis gland içerisinde bez içil lenf nodları bulunur. Sayıları 30-50 arasındadır. Ağız boşluğunun mukoza yüzeyinde ek olarak birkaç bin adet daha küçük tükürük bezi bulunur. Bu farklara rağmen, bütün tükürük bezlerinde majör ve minör olarak aynı tip tümör çeşitleri meydana gelir.

## Normal hücreler

*Bazal hücreler:* Yuvarlak nükleuslu küçük hücrelerdir. Sitoplazma daima ökromatiktir. Bazen bunların gerçek doku fragmanları arasında ya da üç boyutlu hücre kümelerinin dışında palizadlanma oluşturduğunu görebiliriz. Zeminde yer alan stromayı görmek, adenoid kistik karsinom gibi küçük hücreli tümörlerden ayırmada önemlidir. Bu vakalarda stroma, Giemsa ile metakromatik boyanır. Aynı zamanda ekstrasellüler materyalin morfolojiside önemlidir.

*Asiner hücreler:* Büyük seröz hücreler veya sitoplazması müsün içeren küçük nükleuslu hücrelerdir. Sitoplazmada sıklıkla zimojen granüller görülür. Duktal hücrelerde bir arada yer aldıklarını görmek, monoton bir çoğalma varlığını ve buna bağlı olarak iyi diferansiye asiner hücreli karsinom ihtimalini dışlayacağından oldukça değerli bir bulgudur.

*Duktal hücreler:* Sitoplazması homojen, nükleusu santral yerleşmiş hücrelerin oluşturduğu küçük balpeteği yapıları şeklinde görülür. Bu duktal, fragmanlara tutunan miyoepitelyal hücreler izlenebilir.

*Miyoepitel hücreleri:* genellikle asiner hücreler ile birlikte aspirata gelirler. Uzamış sitoplazmalı plazmositoid ya da epiteloid hücrelerdir. Nükleus yuvarlak-oval, sitoplazma mavi ve metakromatiktir. Miyoepitel üstünlüğü gösteren çok sayıda tükürük bezi lezyonu vardır. Bağ doku fragmanları ve kristal benzeri yapılarda görülebilir [106].

İnsan tükürük bezi tümörleri hakkında son yıllarda önemli bilgiler edinilmiştir. İmmünohistokimya, sitofotometre, melezleme teknikleri, doku kültürü ve kromozal analizler sayesinde, histolojik tiplere ile teşhis ve tedavideki farklılıklar daha iyi anlaşılmıştır. Dahası, immünohistokimyasal ya da histokimyasal teknikler, sürekli klasifikasyon, fonksiyonel diferansiyasyon ile terapötik planlama için prognostik göstergeler elde edilmesi amacıyla yararlı bilgiler vermektedir. Tükürük bezinde bulunan üç ana epitelyal hücrenin (asinik hücre, duktal hücre, miyoepitelyal hücre) ayırt edilebilmesi için bazı tümör belirteçlerinden yararlanılmaktadır [107,108].

Asinik hücre belirteçleri, amilaz, sitokeratin, epitelyal membran antijeni (EMA), laktoferin, lizozim, salgı bileşeni, karsinoembriyonik antijen (CEA) ve bazı kan grubu antijenleridir. Duktal hücreler için olanlarıysa, sitokeratin, EMA, doku peptid antijeni (TPA), laktoferin, lizozim, salgı bileşeni, immünoglobülin A, lektin reseptörleri, CEA ve bazı kan grubu antijenleridir. Miyoepitelyal hücreler ise salgı ürünlerinin yokluğu ile aktin, miyosin ve S-100 proteinlerinin mevcudiyeti ile çift sitokeratin ve vimentin ekspresyonu ile ayırt edilebilir. Ortak lökosit antijeni ve sitokeratin, indifferansiye karsinomlar ile malignan lenfoma ya da sarkomayı ayırmak için kullanılır. Karsinoembriyonik antijen ile tiroglobulin, ana tükürük bezi tümörleri (adenokarsinom) ile tiroit karsinomu metaztazının ayırıcı tanısında bulunmak için kullanılır. Bu zamana kadar, insan tükürük bezi ile tükürük bezi tümörlerindeki detoksikasyon enzimi ekspresyonları hakkında çok az çalışma yapılmıştır.

### **1.12.1. Etyoloji**

Çoğu hastalığı etkileyen iki ana faktör genetik ve epigenetik faktörlerdir. Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomların ve minör tükürük bezi karsinomlarının oral gelişimi, hem bu faktörlerden, hem de tütün, alkol, diyet ve beslenme, virüslerden, radyasyondan, ailesel ve genetik yatkınlıkla, oral pamukçuktan, ağız gargaralarından, immün baskılama, frengi, oral faktörler, mesleki riskler ve mate çayından etkilenir.

*Tütün:* Her yıl milyonlarca insan ölümüne neden olduğu için tütün tüketimi en önemli kanser riski olmaya devam ediyor.

*Betel quid:* özellikle Hindistan'ın alt kısmında güneydoğu Asya'da en yaygın alışkanlık, farklı malzemelerle çiğnenen bitki türüdür.

*Alkol:* Alkol oral kanser gelişiminde rol oynar. Alkollü içeceklerin özellikle insanlarda kansere neden olduğu, ağız boşluğu, farinks, gırtlak, özafagus ve karaciğer tümörlerine neden olur. Alkol tütün ile birlikte ağız kanseri gelişme riskini artıran faktörlerdir.

*Diyet ve beslenme:* Diyet ve beslenme ile kanser gelişimi arasındaki ilişki birkaç epidemiyolojik ve labrotuvar çalışmasıyla belirlenmiştir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı çalışma grubu, meyve ve sebzelerin düşük alımının kanser gelişimi riskinin artmasına neden olduğunu onaylamıştır.

*Gargara:* Gargara kullanımının ağız kanserine neden olduğu belirtilmiştir.

*Mate:* Güney Amerika'da ve Avrupa'nın bazı bölgelerinde tüketilen çay gibi içecek olan mate'nin, oral ve farengial kanserlerin gelişiminde bağımsız bir neden olduğu gösterilmiştir.

### **Çevresel Faktörler**

*Viral enfeksiyonlar:* Virüsler, oral skuamöz epitel de dahil olmak üzere skuamöz epitel maligen tümörlerinin gelişiminde güçlü bir şekilde yer almaktadır.

*Mantar enfeksiyonları:* Candida türlerinin neden olduğu fungal enfeksiyonlar, özellikle Candida albicans oral premaling lezyonların patogeneğinde etkilidir.

*Mesleki faktörler:* Mesleksel risklerin yani aşırı radyasyon/ultraviyole ışığına maruz kalmanın dudak kanserlerine neden olduğu bilinmektedir.

*Diş faktörleri:* zayıf ağız hijyeni, zayıf diş durumu ve uygun olmayan bir protezden kronik ülserasyonun diğer risk faktörlerinin varlığında neoplazm oluşturduğu öne sürülmüştür.

*Frengi:* Frenginin, oral kanser gelişiminde tütün ve alkol gibi etkili olduğu bilinmektedir.

*Radyasyon:* iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma ve tükürük bezi tümörlerinin daha sonraki gelişimi arasında bir ilişki olduğuna dair önemli kanıtlar var.

### **Genetik Faktörler**

Genetik yatkınlıkların OSSC(Oral Skuamöz Cell Carcinoma) gelişiminde önemli risk faktörü olduğu gösterilmiştir [109].

#### **1.12.2. Tükürük Bezi Tümörlerinin Sınıflandırılması**

Tükürük bezi tümörleri geniş bir histolojik subtipte sahiptir. Tükürük bezi tümörlerinin histolojik sınıflandırmasına dair yapılan en son çalışma, Dünya Sağlık Örgütü tarafından gerçekleştirilmiştir [110].

**Çizelge 1.1.** Tükürük Bezi Tümörlerinin Sınıflandırılması.

<p>BENİNG EPİTELYAL TÜMÖRLER</p>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Pleomorfik adenom</li><li>-Monomorfik adenom</li><li>-Bazal hücreli adenom</li><li>-Warthin tümörü</li><li>-Onkositoma</li><li>-Kanaliküler adenom</li><li>-Sebaseöz adenom</li><li>-Lenfadenom(sebaseöz ve sebaseöz olmayan)</li><li>-Duktal papillom, inverted, intraduktal ve sialoadenoma papilliferum</li><li>-Kistadenom</li></ul>
<p>MALİNG EPİTELYAL TÜMÖRLER</p>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Asinik hücreli karsinom</li><li>-Mukoepidermoid karsinom</li><li>-Adenoid kistik karsinom</li><li>-Polimorfik düşük dereceli adenokarsinom</li><li>-Epitelyal miyoepitelyal karsinom</li><li>-Şeffaf hücreli karsinom</li><li>-Bazal hücreli adenokarsinom</li><li>-Sebaseöz lenfo adenokarsinom</li><li>-Kistadenokarsinom</li><li>-Onkositik karsinom</li><li>-Tükürük bezi duktus karsinomu</li><li>-Adenokarsinom NOS</li><li>-Miyoepitelyal karsinom</li><li>-Karsinoma ex pleomorfik adenom</li><li>-Karsinosarkom</li><li>-Metastaz yapan pleomorfik adenom</li><li>-Skvamöz hücreli karsinom</li><li>-Küçük hücreli karsinom</li><li>-Büyük hücreli karsinom</li><li>-Lenfoepitelyal karsinom</li><li>-Sialoblastom</li></ul>

### 1.12.2.1. İyi Huylu Tükürük Bezi Tümörleri

#### 1.12.2.1.1. Pleomorfik Adenom

İyi huylu karışık tümör, ya da pleomorfik adenom (PA), hem majör hem de minör tükürük bezlerinde görülen en yaygın tümör çeşidi olduğundan büyük önem taşımaktadır. Oldukça yüksek tekrarlama oranına ve kötü huyluya dönüşme potansiyeline sahiptir.

Bu tümör, mimari ve hücrel pleomorfizmi sebebiyle bu şekilde isimlendirilmiştir çünkü mukoid, miksoid, kondroid ve hiyalen içeren bağdokuları ile karışmış olan epitelyal ve modifiye miyoepitelyal bileşenleri kapsamaktadır. Pleomorfik adenom kanalları, normal tükürük bezlerinininkiler gibi, iki ana hücre tipinden oluşmaktadır: kanal kaplayıcı iç hücreler ile miyoepitelyal dış hücreler. Normal bezlerde iç duktal hücreler daha belirgindir; dış miyoepitelyal hücreler ise daha az belirgindir. Pleomorfik adenomda ise tam tersi görülür; yani miyoepitelyal hücreler daha belirgin durumdadır [111]. Bu hücreler, bu tümörün tam anlamıyla belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Epitelyal hücrelerin diferansiyasyonu ve stromanın proporsiyonu ile diferansiyasyonuna dayanılarak pleomorfik adenom sınıflandırması yapılmaya çalışılmıştır. Bu çeşitler genellikle hücre-zengini ve hücre-fakiri olarak tanımlanmaktadır. Hücre-zengini PA'lar, çok miktarda epitelyal hücre içerir. Fakat bazı hücre-fakiri pleomorfik adenomlardaki bu tümörün belirgin özelliği olan miksoid ve kondroid alanlar, bir neoplazmanın en büyük parçasını oluşturacak kadar büyük olabilir.

Pleomorfik adenomlar yavaş yavaş büyüyen neoplazmalardır. Bunlar, genişleme ve fibröz dokusu kabuğunu bitişik beze doğru iten lokal salgınlar vesilesiyle büyürler. Mikroskobik odakta kapsüler iç-büyüme gerçekleştiği görülmüştür. Bu büyümenin düzenli olarak boyutsal anlamda arttığı ve sonuç olarak da tümörlerin çoklu lobülasyonuna sebep olduğu düşünülmektedir [112]. İyi huylu olmalarına rağmen, tekrarlama ve kötü huylu olmaya yönelik transformasyona uğrama eğilimleri vardır.

Pleomorfik adenomların nüksetmesine yönelik birçok açıklama yapılmıştır ki tekrarlama oranının %17 ile %50 arasında değişkenlik gösterdiği söylenmektedir [113]. Tekrarlama, genellikle, eksik eksizyon ile alakalıdır [113,114]. Fakat tekrarlama oranındaki değişimler daha çok ön tedavide kullanılan cerrahi prosedürle ilgilidir [112]. Submandibular bezler ile kıyaslandığında, parotit bölgedeki pleomorfik adenomlarda daha yüksek oranda tekrarlama oranı görülmesinin sebebi, yüz sinirlerine zarar vermektan kaçınmak amacıyla bu bölgede çok daha konservatif cerrahi müdahalelerde bulunulmasıdır. Tümör genişlemesi ve/ya da kapsüler iç büyüme sebebiyle gerçekleşen yayılmalar, enükleasyon sırasında küçük tümör bölgelerinin ortaya çıkmasına sebep olur. Dahası, miksoid ve kondroid alanlarda tümör içerisinde yarıklar oluşabilir. Bunlar, rezeksiyonun derin marjini olarak tanımlanan yere paralel durumda olurlar ise tümörü fibröz kapsüle bağlı bir biçimde geride bırakarak yalancı bir rezeksiyon düzlemi oluşturabilirler [116]. Fakat eksizyon esnasında gerçekleşen tekrarlama durumunun en bilinen sebebinin, tümörün çıkartılması esnasında ince fibröz kapsülde meydana gelen yırtılma olduğu düşünülmektedir. Bunun sonucunda, tümör parçaları yara üzerine saçılır ve ameliyat alanında çoklu tümör nodülleri oluşmasına sebep olur [116].

Hücre-fakiri pleomorfik adenom varyantları daha fazla tekrarlama riski taşımaktadır. Hücre zengini olanlar ise malignan transformasyona uğrama riskine daha fazla sahiptir. Fakat selülarite ve tekrarlama arasındaki ilişkiye dair bulgular çelişkilidir. Fakat tekrar eden tümörlerin, hücre-fakiri olanlarda daha yaygın olarak görüldüğü genel kabul görmektedir. Ayrıca, intrensek hücre davranışının da PA tekrarlamasında kısmen etkili olduğuna dair kanıtlar da bulunmaktadır.

#### **1.12.2.2.2. Monomorfik Adenom**

Monomorfik adenom kavramı, karışık tümör ya da pleomorfik adenomdan ayrı olan özel kliniksel patolojik birimlerin ifade edilmesi amacıyla 1967 yılında kullanılmaya başlanmıştır. Monomorfik adenomlar epitelyumun, içerilerinde düzenli ve genellikle de glandüler yapılar oluşturduğu iyi huylu tümörlerdir. Bu tümörlerde, pleomorfik adenomun karakteristik bileşeni olan mezenkimal dokuların var olduğuna dair

herhangi bir kanıt bulunmamaktadır [116]. Fakat miksokondroid dokuların mevcut olmaması, bunun monomorfik olarak nitelenmesi için yeterli bir sebep değildir. Bu tümörler, çoğunlukla, bağ doku değişimlerinin görülmediği bir hücre tipini içeren monofazik bir histolojiden meydana gelmektedir. Epitelyum, tümör içerisinde bir şekilde düzenlenir. Bu, bireysel tümörlerin bir monomorfik adenom alt kategorisine ait olduğunu ifade eder. Bazı hücresel türler ile yapılar bu tümör grubunda görülebilir. Bunlar: bazal hücre adenomu, kanalikül adenom, sebasöz adenom, sebasöz lenfadenom, onkositom, papiller kistadenoma lenfomatozum (Warthin tümörü) ve papiller siyaladenom ya da içe dönmüş kanal papillomudur ve her biri kendine has epitelyum yapısına sahiptir.

Farklı monomorfik adenomları içeren tümör grupları, dâhil olmamış normal doku marjini ya da yüzeysel parotidektomi gibi konservatif cerrahi müdahaleler ile tedavi edilir. Bunlarda düşük tekrarlama oranı görülür.

#### **1.12.2.2.Kötü Huylu Tükürük Bezi Tümörleri**

##### **1.12.2.2.1.Asinik Hücreli Karsinom**

Bu tükürük bezi tümörü birçok histopatolojik özellik sergilemesine rağmen, kendine has ayırıcı niteliklere sahiptir. Bu tümör, asiner hücreler yönünde bazı sitolojik farklılaşmalar gösteren kötü huylu bir epitelyal neoplazmadır. İnterkalar kanal hücreleri ya da asiner hücrelerin neoplastik transformasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bireysel hücre özellikleri, iyi diferansiye asiner hücrelerden interkalar kanal hücrelerine kadar farklılık gösterir. Bunlar vakuol, berrak ya da non-spesifik glandüler hücreler olabilir. Bütün hücre türleri mevcut olabilir; fakat bazofilik granüler stoplazmaya sahip; perde perde ya da salkım biçiminde düzenlenmiş olan yuvarlak ya da çok yüzlü hücre görünümünden dolayı asiner olarak tanımlanan hücreler, geniş asinik hücre karsinomu yelpazesinin açıklanabilmesini sağlamaktadır. Solid patern, mikrokistik patern, papiller kistik patern ve foliküler büyüme paterni gibi büyüme paternleri mevcuttur. Mikroskopik incelemeler, bunların çoğunun infiltratif olduğunu göstermektedir.

Asinik hücre karsinomları çok düşük bir metastatik potansiyele sahip olmalarına rağmen, ciddi bir yineleme eğilimi taşımaktadır ki bazı hastalar birkaç yıl içinde tümör nodüllerinin tekrardan alınmasını talep etmektedir. Vakaların %10'unda bölgesel lenf nodu metastazı görülür; uzak metastazların görülme oranı ise %15'tir. Kötü prognostik özellikler arasında ağrı, çevre dokuya sabitlenme, tümör invazyonu ve mikroskobik dezmoplazi özellikleri ile hücrel atipi ve yüksek mitotik aktivite sayılabilir. Bu tümör çeşidinin morfolojik paterni ve hücrel kompozisyonu prognozu açıklamaz. Ameliyat en çok tercih edilen seçenektir [117].

#### **1.12.2.2.2.Mukoepidermoid Karsinom**

En yaygın kötü huylu tükürük bezi tümörü olan bu tümörler, isimlerinden de anlaşılacağı üzere müsin üreten epitelize tümörlerdir. Skuamöz hücreler, müsin hücreler ve ara tip hücreler ile karakterize edilmektedirler. Ayrıca, görüntü ve biyolojik davranış açısından tartışmalı bir noktadadırlar. Bütün mukoepidermoid lezyonların karsinom olduğunu ve makroskopik ve mikroskobik görünüşlerinden bağımsız olarak metastasise gerçekleştirebileceklerini gösteren kanıtlar mevcut olmasına rağmen, kesin olmamakla birlikte, yakın zamanda yapılan bir sınıflandırmada görülmüştür ki lokal tekrarlama ve metastatik potansiyel bağlamındaki muhtemel prognozları düşünüldüğünde bu tümörler ya düşük ya da yüksek derecelidir. Düşük dereceli mukoepidermoid karsinomlar, iyi diferansiye; genellikle sınırlanmış ama kapsüllü olmayan ve çoğunlukla kistik, lokal olarak invaziv ve nispeten agresif olmayan karsinomlardır; fakat yüksek dereceli mukoepidermoid tümörler, kötü diferansiye, makroskobik olarak tam tanımlanmamış, katı olma eğilimi gösteren; kanama ya da kangren bölgeleri oluşturma ihtimali olan ve daha yüksek metastatik potansiyele sahip olan tümörlerdir.

Mukoepidermoid karsinomların klinik görünüşleri malignite derecesine bağlıdır. Düşük dereceli olanlar, iyi huylu tümörlerde olduğu gibi, uzun ve ağrısız geçen bir büyüme genişleme sergileyebilirler. Ağız boşluğunda, mukoseli andırabilir ve kistik

formasyonu sebebiyle de dalgalı bir seyir izleyebilirler. Yüksek dereceli mukoepidermoid karsinomlar, hızla büyür; ağrı ve mukozal ülserasyona sebep olabilirler. Majör tükürük bezlerinde görüldüklerinde, obstrüksiyon ya da fasiyal sinir belirtileriyle birlikte yüksek dereceli malignite gösterebilirler.

Mukoepidermoid karsinomdaki prognostik önem, tümör derecesine göre belirlenir. Düşük dereceli olanlar iyi huylu bir klinik seyir izlerken, yüksek dereceli olanlar, vakaların neredeyse %60'ında lokal ve uzak metastaz sergileyebilirler. Düşük dereceli lezyonlardaki beş yıllık hayatta kalma oranı genellikle %95 ya da daha fazlasıdır. Fakat yüksek dereceli olanlarda bu oran, yaklaşık %40 olup; 15 yıllık süreç içerisinde %25'e kadar düşer. Tekrarlama durumu ise ilk lezyonun eksiksiz olarak alınmasına ve metastaz öncesi saptamaya bağlıdır.

#### **1.12.2.2.3. Adenoid Kistik Karsinom**

Kötü huylu bu tükürük bezi tümörü infiltratiftir ve baş ve boyun bölgesindeki biyolojik anlamdaki en aldatıcı tümörlerden biri olarak kabul edilir. Bütün tükürük bezi karsinomlarının yaklaşık %23'ünü oluşturur ki bunların %50-%70'i baş ve boyun bölgesindeki minör tükürük bezlerinde meydana gelir. Üç büyüme paternini içeren farklı histolojik özelliklere sahiptir. Bunlar, kribriform (glandüler), tübüler ve solid. Tümörler iki hücre türünü içerir: kanal kaplayan hücreler ve miyopitelyal türde olanlar. Adenoid kistik karsinom, mikroskopik görüntüsü, biyolojik davranışı ile yüksek lokal tekrarlanma oranı ve sistemik yayılımı ile karakterize edilmektedir. Stromal reaksiyon görülmeyen perinöral ve perivasküler yayılmaya sık rastlanır ve bunlar diğer tümör türlerindeki kötü prognoz belirtileri olmalarına rağmen, mitotik aktivite ve pleomorfizm de dâhil olmak üzere prognozla ilişkili değildir. Bütün bu tümörler, hangi tür olursa olsun, biyolojik anlamda agresiftir ve ilk tümörün çıkarılmasından uzun yıllar sonra bile metastazı harekete geçirebilir. Solid türler, genellikle erken tekrar ve metastaz sergileyen ve yüksek mortalite oranı gösteren en kötü prognoz sahibi türdür. Kemikteki lokal büyüme kötü prognoz göstergesi olabilir. Glandüler ve tübüler türler istatistiksel olarak daha iyi bir prognoza sahiptir.

Klinik olarak görünüşü unilobüler kütle şeklindedir. Ve ağrı ve hassasiyetin de kimi zaman eşlik ettiği palpasyona dayanıklıdır. İnaktif olan bir tümör içerisinde hızlıca büyümüş bir kütle biçiminde var olma ihtimali de taşımalarına rağmen, düşük büyüme oranı eğilimi göstermektedirler. Bu tümör hareket edebilir ya da bitişik dokulara sabitlenmiş biçimde durabilir. Nöral alanların infiltrasyonu isteği taşıdıklarından ötürü ağrı yaygın olarak görülür ve fasiyal sinir zayıflığı ile felç meydana gelebilir.

Adenoid kistik karsinom, yavaş büyümesi ve son aşamaya kadar metastaz görülmemesi sebebiyle, 15 ile 20 yıllık bir hayatta kalma oranı ile değerlendirilir. İlk başlardaki hayatta kalma oranı iyi olmasına rağmen –ki bu ilk 5 yılda %70 oranındadır- uzun süreli veriler oldukça kötüdür. On beş yıllık hayatta kalma oranı %10'dur. Metastazın yanı sıra tekrarlayan lokal hastalık da çokça görülür. Kötü prognostik faktörler içerisinde yüz siniri felci ki bu komplikasyona sahip olan hastalarda hastalık başlangıcından sonraki beş yıl içerisinde ölüm gerçekleşir, tamamlanmamış eksizyon, 3 cm'den büyük tümör boyutu ile nekroz alanlarına sahip solid büyüme paterni gösteren tümörler bulunur.

#### **1.12.2.2.4.Kötü Huylu Karışık Tümör**

Kötü huylu karışık tümörler çok sık görülmez ve vakaların %2-10'unu oluştururlar . İyi huylu emsalinin, yani pleomorfik adenomun, tekrar etmesine sebep olan histolojik kriter ve özellikler, burada malignite kriteri olarak kabul edilmemektedir. Fakat iyi huylu lezyonlardaki yüksek tekrarlama oranı ile taşıdıkları malignan transformasyon potansiyeli, bunları diğer tükürük bezi tümörlerinden ayırır. Taşıdıkları tek malignite özelliği, infiltratif ve yıkıcı büyüme paternine sahip olan tümörlerdir ki bu doğrudan bir malignan transformasyon işaretidir [107]. Nadir bir oluşum olan metastasise pleomorfik adenomun, uzak metastaz alanında iyi huylu histolojik niteliklere sahip bir biçimde var olduğu ifade edilmiştir. Metastatik tümör, ana tümör ile aynı görüntüye sahiptir; fakat genellikle sonradan gelen çoklu lokal tekrarlamalar gösterir [116,118,119]

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Primer Antikor (GSTP1, GSTK1)
- Sekonder Antikor (Biotinylated secondary antikor), (Santa Cruz)
- TBS buffer (Santa Cruz)
- %30' luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Solusyonu (Sigma)
- Ksilol (Merck)
- Etanol (Merck)
- Metanol (Merck)
- Sodyum Sitrat (Sigma)
- Sitrik Asit (Sigma)
- Protein Blokajı (Santa Cruz)
- ABC HRP (Avidin Biotin Complex Horse Radish Peroxidase) (Santa Cruz)
- Hematoksilen (Shandon)
- DAB (Diamino benzidin) (Santa Cruz)

#### 2.1.1.1. Solusyonların Hazırlanışı

- I. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Blokajı Solusyonu Hazırlanışı: 30 ml %30' luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üzerine 470 ml metanol ilave edilerek hazırlandı.
- II. Antijen Retrieval Solusyonunun Hazırlanışı (0,01 M, pH: 6.0): 2,101 gr sitrik asit (A) 100 ml distile suda; 0,1 M 14,7 gr sodyum sitrat (B) 500 ml

distile suda çözüldü. 27 ml A solusyonundan, 123 ml B solusyonundan alınarak 1500 ml'ye distile su ile tamamlandı.

- III. 0,005 M Tris Tamponunun Hazırlanışı: 60,55 gr tris base, 85,20 gr NaCl 500 ml distile suda çözülür. 370 ml 1 M HCl eklenerek pH: 7,6'ya getirilip 1 lt'ye tamamlanır. (1 ml TBS 100 ml distile suyla dilüe edilerek kullanılır.)

### 2.1.2. Kullanılan Cihazlar

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

## 2.2. Kullanılan Metot

### 2.2.1. Materyal Kazanımı ve Hazırlanışı

Çalışmada İstanbul Kartal Lütfü Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne 2018-2019 yılları arasında başvuran, tükrük bezi kanseri tanısı konmuş 25 erkek (yaş ortalaması 67,78) ve 27 kadın (yaş ortalaması 70,32) olmak üzere 52 hastadan (yaş ortalaması 68.89) alınan tükrük bezi doku örnekleri çalışıldı. Çalışma materyalleri klinisyen tarafından ameliyat yöntemiyle alındı ve dokulardan patoloji kliniğinde parafin bloklar hazırlandı. Bu bloklardan her bir vaka için

poly-L-lysin kaplı lamlara 5 kesit alındı. Elli iki hastanın tamamına GSTP1 ve GSTK1 için immünohistokimya boyama prosedürü uygulandı. Hastalara ait tümör dokularının klinik evrelendirmesine TNM evreleme sistemi kullanıldı. Bu değerlendirme, patolog eşliğinde tarafımızca yapıldı. Hastalara ait yaş, cinsiyet, tanı, ile ilgili hasta bilgileri Çizelge 2.1 ve 2.2’de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Hastaların klinik verileri

	<b>n</b>	<b>n%</b>
<b>Tükrük bezi kanseri</b>	52	100
<b>Cinsiyet</b>		
<b>Erkek</b>	25	48.7
<b>Kadın</b>	27	51.3
<b>Yaş</b> 40±13.4; (18-77)		
<b>≤40</b>	32	61,6
<b>&gt;40</b>	20	38.4

**Çizelge 2.2.** Çalışmada kullanılan hastaların özellikleri (Yaş,Cinsiyet,Tanı)

Hasta	Yaş (cinsiyet)	Tanı
Ş.Ö	61(E)	Pleomorfik adenom
M.A	30(K)	Pleomorfik adenom
Y.K	48(E)	Pleomorfik adenom
E.Ü	18(K)	Pleomorfik adenom
E.E.A	54(E)	Pleomorfik adenom
E.A	58(E)	Pleomorfik adenom
J.K	31(K)	Pleomorfik adenom

M.T	18(E)	Pleomorfik adenom
H.B	30(K)	Pleomorfik adenom
C.C	48(K)	Pleomorfik adenom
E.S	40(K)	Pleomorfik adenom
Y.G	30(E)	Pleomorfik adenom
E.Ş	58(K)	Pleomorfik adenom
K.K	21(K)	Pleomorfik adenom
N.B	33(K)	Pleomorfik adenom
G.C	25(K)	Pleomorfik adenom
T.A	58(E)	Pleomorfik adenom
A.Ö	18(E)	Pleomorfik adenom
S.T	38(K)	Pleomorfik adenom
T.K	57(K)	Pleomorfik adenom
N.K	52(K)	Pleomorfik adenom
G.D	32(K)	Pleomorfik adenom
M.Ç	36(E)	Pleomorfik adenom
S.U	50(K)	Pleomorfik adenom
A.K	32(E)	Pleomorfik adenom
S.Y	46(K)	Pleomorfik adenom
A.E	35(E)	Pleomorfik adenom
H.A	27(E)	Pleomorfik adenom
A.Ç	30(K)	Pleomorfik adenom
K.Ş	49(K)	Pleomorfik adenom
F.M	40(K)	Pleomorfik adenom
S.B	35(K)	Pleomorfik adenom
M.E	37(E)	Pleomorfik adenom
M.Ç	46(E)	Pleomorfik adenom
G.B	35(K)	Pleomorfik adenom
H.T	53(K)	Pleomorfik adenom
Y.A	28(E)	Pleomorfik adenom
H.Y	47(E)	Pleomorfik adenom
Ü.K	28(E)	Pleomorfik adenom

E.Ö	39(K)	Pleomorfik adenom
T.M	40(K)	Pleomorfik adenom
R.K	54(E)	Pleomorfik adenom
S.P	39(E)	Pleomorfik adenom
K.K	48(K)	Pleomorfik adenom
T.D	38(E)	Pleomorfik adenom
E.K	35(E)	Pleomorfik adenom
Y.B.B	77(E)	Pleomorfik adenom
F.M	34(E)	Pleomorfik adenom
Ö.Y	36(K)	Pleomorfik adenom
Ö.I	26(E)	Pleomorfik adenom
A.O	49(K)	Pleomorfik adenom
N.Y	66(E)	Pleomorfik adenom

## 2.2.2. İmmünohistokimya Prosedürü

### I. Dokuların Deparafinizasyonu

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

## II. Basamak

- 1) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blokajı ile endojen peroksidaz aktivasyonunun inhibisyonu için solusyonda 10 dakika bekletildi.
- 2) Çeşme 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 işleminden sonra immunohistokimya (IHC) yöntemi ile tükürük bezi kanserli hastalar için bölüm 2.2.2.'de ayrıntılı olarak açıklanan prosedüre göre boyandı. IHC uygulanan preparatlar ışık mikroskopunda boyanma şiddetine bakılarak patolojla birlikte değerlendirme yapıldı ve fotoğrafları çekildi. Değerlendirme boyanma şiddeti için;

boyanma olmaması durumu (-), hafif boyanma (+1), orta şiddette boyanma (+2), şiddetli boyanma (+3) olarak değerlendirme yapıldı.

### **2.3. İstatiksel Analiz**

Yapılan çalışmada tümörlü ve normal dokular arasında GSTP1 ve GSTK1 ekspresyonlarının farklılık analizleri Mann-Whitney U Test ile GSTP1 ve GSTK1 ekspresyonları ile hastaların yaş, cinsiyet gibi klinik bilgileri arasındaki ilişkiler Pearson Correlation Test ile incelendi. İstatistiksel olarak anlamlı ilişki görülen gruplar Fitted Line Plot analizi ile regresyon grafikleri ile gösterildi. İstatistiksel sonuçlar %95'lik güvenilirlik düzeyinde  $p < 0,05$  için anlamlı kabul edildi.

### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 3.1. GSTP1 ve GSTK1'in Tükürük Bezi Kanserindeki Normal ve Tümörlü Dokularındaki Protein İfadelerinin Sonuçları

##### 3.1.1. GSTP1 İzozimlerinin Tükürük Bezi Kanserindeki Normal ve Tümörlü Dokulardaki İfadesi

Elli iki tükürük bezi kanserli dokularda GSTP1 izozimlerinin ekspresyonlarının immünohistokimya sonuçlarına baktığımızda; GSTP1 izoziminin tümörlü dokularda % 26.92 oranında (1,92), normal dokularda % 42.31 oranında (2,12) protein ifadesinin pozitif olduğu fakat istatistiksel olarak tümörlü ve normal dokular arasında GSTP1 protein ekspresyon farklılıkları bulunamadı. ( $p=0,1902>0,05$ ) (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1.** GSTP1 İzozimlerinin Tükürük Bezi Kanserindeki Normal ve Tümörlü Dokulardaki İfadesi

Doku Tipi	GSTP1
<b>Tümör</b> (n=52)	1,92+0,11 (1-3)
<b>Normal</b> (n=52)	2,12+0,09 (0-3)
<b>T/N*</b> <b>P value**</b>	0,91 <b>0,190</b>

Boyanma skorları, aynı hastalara ait normal tükürük bezi kanserli 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.

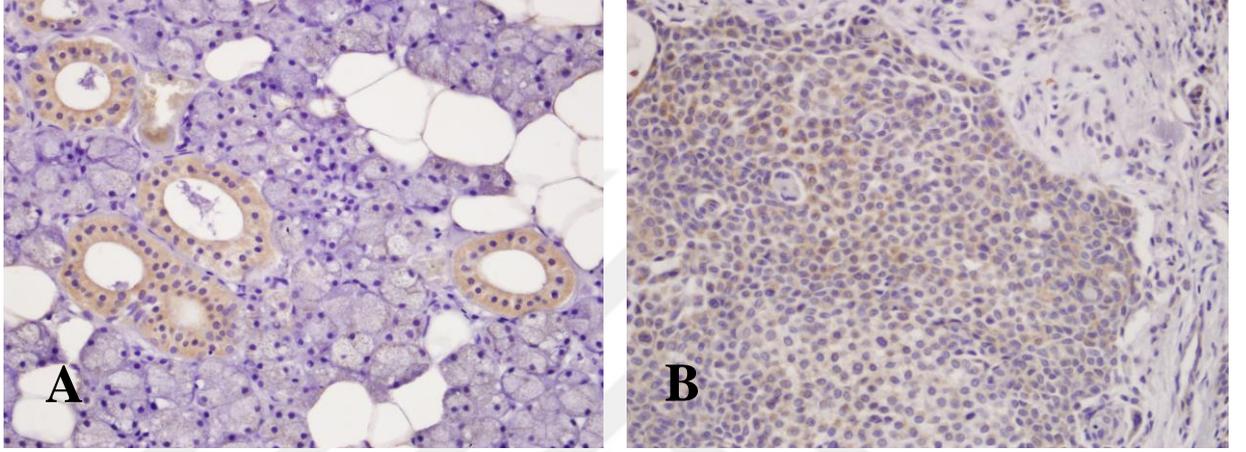
Normal ve Tümörlü dokular arasındaki protein ifadelerin farklılıkları Mann-Whitney U Test ile %95'lik güvenilirlik düzeyinde incelenmiştir.

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

a: ortalama değer±standart hata

b: minimum ve maksimum boyama şiddeti

\*: Tümörlü / Normal oranı



**Şekil 3.1.** Tükürük bezi normal dokuları ve tükürük bezi kanseri dokularında immunohistokimyasal GSTP1 proteini **A**: Tükürük bezi normal dokuda (+1)şiddetinde GSTP1 proteinin ifadesi;( X200) **B**: Tükürük bezi tümörlü dokuda (+1)şiddetinde GSTP1protein ifadesi;( X200)

### 3.1.2. GSTK1 İzozimlerinin Tükürük Bezi Kanserindeki Normal ve Tümörlü Dokulardaki İfadesi

Tükürük Bezi Kanserli dokularda GSTK1 izozimlerinin ekspresyonlarının immünohistokimya sonuçlarına baktığımızda; GSTK1 izoziminin tümörlü dokularda % 23.08 oranında (1.89), normal dokularda ise % 50 (2,31) oranında protein ifadesinin pozitif olduğu ve normal dokularda tümörlü dokulara oranla daha fazla

miktarda ekspresyonun gerçekleştiği istatistiksel olarak görüldü (p=0,0148<0,05) (izelge 3.2) .

**Çizelge 3.2.** GSTK1 İzozimlerinin Tükürük Bezi Kanserindeki Normal ve Tümörlü Dokulardaki İfadeyi

Doku Tipi	GSTK1
<b>Tümör</b> (n=52)	1,89±0,12 (0-3)
<b>Normal</b> (n=52)	2,31±0,09 (1-3)
<b>T/N*</b> <b>P value**</b>	0,81 0,0148

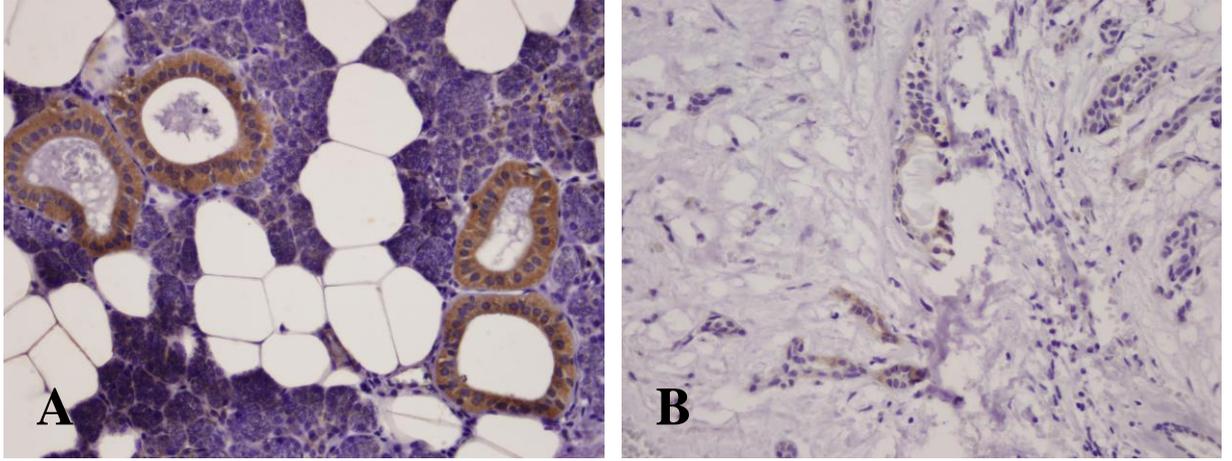
Boyanma skorları, aynı hastalara ait tükürük bezi kanseri ve normal hücrelerin boyanma şiddetine göre hesaplanmıştır. Buna göre 0; protein ifadesi görülmeyen, 1; hafif şiddette protein ifadesi, 2; orta şiddette protein ifadesi ve 3; şiddetli protein ifadesi şeklinde derecelendirilmiştir. Normal ve Tümörlü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

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

a: ortalama değer±standart hata

b: minimum ve maksimum boyama şiddeti

\*: Tümörlü / Normal oranı



**Şekil 3.2.** Tükürük bezi normal dokuları ve tükürük bezi kanseri dokularında immunohistokimyasal GSTK1 proteini A: Tükürük bezi normal dokuda (+2) şiddetinde GSTK1 proteinin ifadesi;( X200) B: Tükürük bezi tümörlü dokuda (+1) şiddetinde GSTK1 protein ifadesi;( X200)

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, dünya genelinde ani ölümlerden sonra insan hayatını etkileyen nedenlerin başında yer almaktadır. Gelişen teknoloji ve bilimsel çalışmalar ışığında her ne kadar bu insan hayatını olumsuz şekilde etkileyen hastalığa çareler aransa da henüz günümüz bilim ve teknolojisi bu konuda yetersiz kalmaktadır. Bunun başlıca sebebi; bu hastalığın 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 supressör 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 hastalığın 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 işlevler için ürettiği gen ve proteinlerinin de bu hastalığın 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.

Çevresel faktörlerden başka özellikle çalışmaya konu olan enzimlerde görülen metabolik enzim polimorfizmleri kanserlerin moleküler patogenezinde sorumludur. Ailesel yatkınlığa neden olan genetik değişiklikler, 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 çalışma bu durumu kanıtlamaktadır [ 119]. Bunların yanı sıra hücrede DNA tamir enzimlerinde görülen polimorfizmler, p53 gen mutasyonları tükürük bezi kanserlerinin oluşumunun diğer

moleküler patojenizini oluşturur.

Karsinogenik etkilerden hücrenin korunmasında detoksifikasyon mekanizmalarının büyük önemi vardır. Detoksifikasyon (biotransformasyon), ksenebiyotikler (toksik maddeler, metabolitler, epoksidler) gibi zararlı maddelerin çeşitli enzim ya da moleküller yardımı ile zararsız hale getirilerek vücuttan dışarı atılmasını sağlama mekanizmalarıdır. Bu mekanizmalarda görev alan enzimler ya da moleküller de bu hayati olguyu desteklemektedirler. Glutasyon S-Transferaz enzim ailesi, detoksifikasyon metabolizmasında, ksenebiyotiklerin zararlı etkilerini zararsız hale getirerek vücuttan elemine edilmesini 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 oluşumunda, gerek normal hücre içi antioksan aktivite, gerek ilaç metabolizmasında ilaç dirençliliği, gerek detoksifikasyon metabolizması gibi çoğu çalışmalarda bu enzim ailesinin rolleri açıklanmıştır. Ne yazık ki GST pi ve kappa izozimlerinin kanser oluşumundaki rolleri tam olarak çalışılmamıştır.

Yapılan tez çalışmasında, tükürük bezi kanserinin oluşmasında ve gidişatında büyük bir rol oynayan glutasyon-S-transferaz (GSTs) pi ve kappa izozimlerinin dağılımları immünohistokimya metoduyla çalışılmıştır. GSTP1 ve GSTK1 izozimlerinin benign hücrelerindeki dağılımları tespit edilmiş ve kanser biyolojisindeki rolü ve klinikte kullanılması değerlendirilmiştir. Ayrıca GST pi ve kappa izozimlerinin benign hücrelerindeki dağılımlarıyla hastaya ait klinik parametreleri (yaş, cinsiyet,) istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Yapılan bu tez çalışmasında 52 tükürük bezi kanserli hastanın GSTP1 ve GSTK1 izozimlerinin ekspresyonları değerlendirilmiştir. Hastaların tümörlü dokularıyla normal dokuları arasında GSTP1 ve GSTK1 izozimlerinin ekspresyonlarının

farklılıklarına bakıldığında; Tümörlü ve normal dokular arasında GSTP1 protein ekspresyon farklılıkları bulunamadı. ( $p=0,1902 > 0,05$ ). Ancak hastaların normal dokularında GSTK1 ekspresyonu tümörlü dokulara oranla daha yüksek olduğu görüldü. ( $p=0,0148 < 0,05$ ). Hastaların yaşları ve cinsiyetleri ile tümörlü ve normal dokuları arasında izozimlerinin dokulardaki ekspresyonu ile hastaların yaş ve cinsiyetleri arasında anlamlı ilişki görülmedi ( $p > 0,05$ ). Literatüre bakıldığında tükürük bezi kanserlerinde GSTK1'in protein ekspresyonlarıyla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. İlk defa bu çalışmada tükürük bezi kanserlerinde GSTK1' in protein ekspresyonları gösterilmiştir.

Franky D. Shah ve arkadaşları, Tükürükten yapılan GSTM1 analizleri GSTM1 null genotip sıklığının oral kanser hastalarında %36, kontrol gruplarında %36 olduğunu göstermiştir.

GSTT1'in tükürük analizleri GSTT1 null genotip sıklığının oral kanser hastalarında %24 kontrol gruplarında %16 olduğunu göstermiştir. Null GSTT1 genotipinin oral kanser hastalarında, null genotipli bireylerin kontrol gruplarıyla kıyaslandığında, kanser gelişimi için daha yüksek risk altında oldukları tespit edildi [120].

Oğuztüzün 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 incelemişlerdir. NH'lı hastaların %81,48, FA'lı hastaların %80 ve TPK'lı hastaların %60'ında GSTO1'in eksprese olduklarını ve GSTK1 izoziminin ise NH'lı hastaların %48,14'ünde, FA'lı hastaların %60'ında 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 bildirmişlerdir [121].

GSTK1 izozimlerinin tükürük bezi kanserinin oluşumundaki önemi bu çalışmayla ilk olarak ortaya konmuştur. Fakat bu izozimlerin diğer kanser çeşitlerinde de daha fazla hasta grubuyla çalışılması ve hasta klinik parametreleriyle karşılaştırılarak hastalığın prognozuna katkıda bulunması beklenmektedir.



## KAYNAKLAR

- [1] Boutwell R.K. Model systems for defining initiation promotion and progression of skin neoplasms in: Skin Carcinogenesis: Mechanisms and Human Relevance. Alan R.Liss inc., pp 3-15,1989
- [2] Weiner T. And Cance W.G Molecular mechanisms involded in tumorigenesis and Their surgical implications Am j of surg 167:428-34, 1994
- [3] Pitot H.C .et al Regulation of the expression of some genes for enzymes of glutathione metabolism in hepatotoxicity and hepatocarcinogenesis Toxicol and Applied Pharm 9 7(1): 23-34, 1989
- [4] Sudilovsky O., Pitot H.C., and Liotta L.A Boundries Between Promotion and Progression During Carcinogenesis. Basic Life Sciences Vol 57, Plenum Press, New York, 1991
- [5] Dipple A., Michejda C.j., and Weisburger E.K.. Metabolism of chemical carcinogens. Pharm and Ther 27(3): 265-96, 1985
- [6] Periano C. and Jones C.A The multistage concept of carcinogenesis. In: The Pathobiology of Neoplasia. Sirica AE, (ed.) New York: Plenum Press; p 131-48, 1989
- [7] Waalkes M.P. and Ward J.M. carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York, 1994

- [8] Sager R. Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. *Science* 228:597-7, 1985
- [9] Weinberg R.A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular basis of multistage Carcinogenesis. *Cancer Res* 49: 3713-21, 1989
- [10] Halliwell B. Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? *Drugs* 42(4):569-605, 1991
- [11] Rice Evans Cand Burdon R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog in Lipid Res* 32(1): 71-110, 1993
- [12] Sahu SC. Oncogenes, oncogenesis, and oxygen radicals. *Biomed&Environ Sci* 3(2): 183-201, 1990
- [13] Taylor S.L. and Scanlan R.A. Food toxicology. A perspective on the relative risks. Basic Symposium series institute of Food Technologists. Chicago III. Marcel Dekker, Inc New York and Basel, 1989 pp. 104, 107, 108, 116, 127, 170, 178, 179, 189, 355, 358, 360
- [14] Beer D.G. and Pitot H.C. Biological markers characterizing the development of preneoplastic and neoplastic lesions in rodent liver. *Arch Toxicol* 10(5):68-80, 1987
- [15] Miller E.C. and Miller J.A. Biochemical mechanisms of chemical carcinogenesis. In: *The Molecular Biology of cancer*. Busch H (ed), Academic press, N.Y., ppM 337-402, 1974
- [16] Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey, I.R. Glutathione Transferases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45:51-88, 2005
- [17] 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

- [18] Mannervik B. Board PG, Hayes JD Listowsky I. Pearson WR. Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods in Enzymology* 2005;401,1-8
- [19] Vural, N. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları,73, 381.2005
- [20] Strange R.C.,Spiteri M.A., Ramachandran to cancer.S., Fryer A., Glutathione S- transferase family of enzymes. *M utat. Res.* 482;21-26,2001
- [21] Hirvonen A., Polymorphisms of xenobiotic-metabolizing enzymes and susceptibility to cancer. *Environ Health Prospect.* 107;37-47, 1999
- [22] EatonD.L., Bammler T.K., Concise review of glutathione S- transferase and their significance to toxicology.*Toxicological Science.*49;156-164,1999
- [23] A.Özaydın, Glutatyon S-Transferaz GST-M1 ve GST-T1 polimorfizmlerinin glutatyonla ilişkili detoksifikasyon sistemlerine etkisi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2000
- [24] Li, Ji, Zongxiang, and Jianping Ding. “Thioredoxin-like domain of human class glutathione transferase reveals sequence homology and structure similarity to the  $\Omega$  class enzymes” *Protein science* 14.9 (2005):23-61-2369
- [25] Morel, Fabrice, et al.”Gene and protein charecterization of the human glutathione S- transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization “ *Journal of Biological Chemistry* 279,16 (2004): 16246-16253
- [26] Shield. Alison J et al. Polymorphism in the human glutathione transferase Kappa (GSTK1) promotor alter gene expression. *Genomics* 95,5 (2010):299-305

- [27] Dekant W. And Vamawakas S. Glutathione dependant bioactivation of xenobiotiks, *xenobiotica* 23(8);873-7, 1993
- [28] Manoharan T.H., Gulick A.M., Puchalski R.B., Servais A.L., and Fahl W. Structural Studies on human glutathione S-trnasferase pi. *J of Biol Chem* 267(26): 18940-5, 1992
- [29] Schaffer J, Gallay O., and Ladenstein R. Glutathione transferase from bovine placenta. Preparation, biochemical characterization, crystallization, and preliminary
- [30] Dirr H.W., Mann K., Huber R., Ladenstein R., and Reinemer P. Class pi glutathione S-transferase from pig lung. Purification, biochmical characterization, primary structure and crystallization. *Eur j Biochem* 196: 693-8, 1991
- [31] Reinemer P., Dirr H.W., Ladenstein R., Schaffer J., Gallay O., and Huber R. The three-dimensional structure of class pi glutathione S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 A resolution. *EMBO j* 10(8): 1997-2005, 1991
- [32] Wilce M.C.J., Parke rM.W. Structure and fuction of glutathione s-transferase. *Bioch et Biophys Acta* 1205: 1-18,1994
- [33] Gulick A.M., Lathrop Gohl A., and Fahl W.E. Structural studies on human glutathione S-transferase pi. *J of biological Chemistry* 267: 18946-52,Sept 1992
- [34] Mannervik B., Alin P.,Guthenberg C., Jensson H., Tahir M. K. Warholn M. And Jornvall H. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: Correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci USA Biochem* 82: 7202-6, 1985

- [35] Waxman D.J. Glutathione S-transferases: Role in alkylating agent resistance and Possible target for modulation chemotherapy – a review. *Cancer Res* 50: 6449-6454, 1990
- [36] Mannervik B. and Danielson U.H. Glutathione transferases-structure and catalytic Activity (review). *Crit Rev Biochem* 23(3); 283-37, 1988
- [37] Guthenberg C and Mannervik B Glutathione S-transferase (transferase-pi) from Human placenta is identical or closely related to glutathione S-transferase (transferase rho) from erythrocyte. *Biochim, Biophys Acta* 661: 244-60, 1981
- [38] Jakoby W.B. *Enzymatic Basis of Detoxication Vol II* Jakoby W.B.(ed.) Academic Press, New York, 1980
- [39] Degen G.H. and Neumann H.G. The major metabolite of aflatoxin B1 in the rat is a glutathione conjugate. *Chem – Biol Interact* 22: 239-55, 1978
- [40] Vainio H. Vinyl chloride and vinyl benzene (styrene) – metabolism, mutagenicity, and carcinogenicity. *Chem –Biol Interact* 22: 117-24, 1978
- [41] Nachtomi E The metabolism of ethylene dibromide in the rat. The enzymatic reaction with glutathione in vitro. *Biochem Pharmacol* 19: 2853-60, 1970
- [42] Bogaards .J.J.P., van Ommen B., and Bladeren P.J. Purification and characterization of eight glutathione S-transferase isoenzymes of hamster. *Biochem J.* 286: 383-8, 1992
- [43] Cholon A., Giaccia A.J., Lewis A.D., Hickson I., and Brown J.M. What role do glutathione S-transferases play in the cellular response to ionizing radiation *Int J Radiation oncology Biol Phys* 22: 759-63, 1991

- [44] Biaglow J., Mitchell J.B., and Held K. The Importance of peroxide and superoxide in The x-ray response. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 22: 665-9, 1992
- [45] Meister A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res Suppl* 54: 1969s-1975s, 1994
- [46] Cazenave L.A., Moskow J.A., Myers C.E., and Cowan K.H., Glutathione S-transferase and drug resistance. *Drug Res in cancer Therapy* 48:171- 187. 1989
- [47] Ketterer B., Tan K.H., Meyer D.J, and Coles B. Glutathione transferases: A possible role in the detoxification and repair of DNA and lipid hydroperoxides. *Mutation Res* 214: 433-40, 1989
- [48] Campbell J.A.H., Corrigan A.V., and Kirsch R.E. Immunohistologic localization of alpha, mu, and pi class glutathione S-transferases in human tissue. *Cancer* 67: 1608-13, 1991
- [49] Bennet C.F., Spector D.L., and Yeoman L.C. Nonhistone protein BA is a glutathione S-transferase localized to interchromatinic regions of the cell nucleus *J Cell Bios* 102: 600-9, 1986
- [50] Kelloff G.J. et al. Chemopreventive drug development: perspectives and progress (review). *Cancer Epidemiology, Biomarkers and prevention* 3(1): 85-98, 1994
- [51] Hochhauser D. And Harris A.L. Drug Resistance. *Brit Med Bull* 47(1) : 178-96, 1991
- [52] Effert T., Mattem J., and Volm M. Immunohistochemical detection of P glycoprotein, glutathione S-transferase and DNA topoisomerase II in human tumors. *Oncology* 49: 368-375, 1992

- [53] Sato K. Glutathione transferases as markers of preneoplasia and neoplasia. *Adv Cancer Res* 52: 205-255, 1989
- [54] Presterl T., Holtzclaw W.D., Zhang Y., and Talalay P. Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 2665-9, 1993
- [55] Xia C., Taylor J.B., Spencer S.R., and Ketterer B. The human glutathione S-transferase P1-1 Gene: Modulation of expression by retinoic acid and insulin. *Biochem*; 292:845-50, 1993
- [56] Burgering B.M., Medema R.N., Maassen J.A., van de Wetering M.L., van der Eb A.J., McCormick F., and Bos J.L. Insulin stimulation of gene expression mediated by p21 ras activation. *EMBO* 10: 1103-1109, 1991
- [57] Tee L.B.G., Gilmore K.S., Meyer D.J., Ketterer B., Vanderberghe Y., and Yeoh G.C.T. Expression of glutathione S-transferase during rat liver development. *Biochem J* 28: 209-18, 1992
- [58] Kashiwada M. et al. Purification and Characterization of acid form of glutathione S-transferase in human fetal livers; high similarity to placental form. *J of Biochem* 110(5):743-7, 1991
- [59] Pacific G.M., Warholm M., Gutherberg C., Mannervik B. and Rane A. Organ distribution of glutathione transferase isoenzymes in the human fetus. Differences between liver and extrahepatic tissues. *Biochem Pharmacol* 35 (9): 1616-9, 1986
- [60] Terrier P., Townsend A.S., Coindre J.M., Triche T.J., and Cowan K.H. An immunohistochemical study of P1 class glutathione S-transferase expression in normal human tissues. *Am J pathology* 137(4): 845-53, 1990

- [61] Corrigan A.V. and Kirsch R.E. Glutathione s- transferase distribution and concentration in human organs. *Biochem int* 16: 443-8, 1988
- [62] Solt D.B., Medline A and Farber E. Rapid emergence of carcinogen-induced hyperplastic lesions: A new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis *Am J of Pathol* 88: 595-610, 1977
- [63] Tatematsu M., Mera Y., Ito N., Satoh K., and Sato K. Relative merits of immunohistochemical demonstrations of placental, A,B and C Forms of glutathione s- transferase and histochemical demonstration of gamma-glutamyl transferase as markers of altered foci during liver carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 6(11): 1621-1626, 1985
- [64] Moore M.A. et al. Immunohistochemically demonstrated increase in glutathione s- transferase species in propyl nitrosamine-induced focal proliferative and neoplastic syrian hamster pancreatic lesions. *Virchows Arch [cell path]* 52: 479-88, 1987
- [65] Ito N., Hasegawa R., Imaida K., Masui T., Takahashi S., and Shirai T. Pathological markers for non genotoxic agent associated carcinogenesis. *Toxicology Letters* 64/65: 613-20, 1992
- [66] Daly H.M., Tee L.B.G., Oates P.S., Morgan R.G.H. and Yeoh G.C.T. Glutathione s- transferase (mu class) as an early marker of azaserine- induced foci in the rat pancreas. *Carcinogenesis* 12(7) :1237 -40, 1991
- [67] Toffoli G., Viel A., Tumiotto L., Giannini F., Volpe R., Quara M., and Boiocchi M. Expression of glutathione s- transferase pi in human tumors. *Eur J Cancer* 28A(819):1441-6, 1992
- [68] Zhang L., Mock D., and Cameron R. Development of glutathione s- transferase placental form ( GST-P) stained foci during hamster buccal pouch mucosa carcinogenesis. *Cancer Letters* 64: 241-7, 1992

- [69] Hendrich S. And Pitot H.C. Enzymes of glutathione metabolism as biochemical markers during hepatocarcinogenesis. *Cancer and metastasis Rev* 6: 155-78, 1987
- [70] Volm M., Mattern J., and Samsel B. Overexpression of p- glycoprotein and glutathione s- transferase-pi in resistant non small cell lung carcinomas of smokers. *Br J. Of Cancer* 64: 700-4, 1991
- [71] Tan K.H., Meyer D.J. Coles B. and Ketterer B. *FEBS Letter* 207:231-3, 1986
- [72] Lewis A., Forrester L.M., Hayes J.D, Wareing C.J., Carmichael J., Harris A.L., Mooghen M., and Wolf C.R. Glutathione S-trasnferase isoenzymes in human tumours and tumour derived cell lines. *Br J Cancer* 60(3): 327-31, 1989
- [73] Lewis A.D., Hayes J.D., and Wolf C.R. Glutathione and glutathione dependent enzymes in ovarian adenocarcinoma cell lives derived from a patient before and after the onset of drug resistance: Intrinsic differences and cell cycle effects. *Carcinogenesis* 9(7):1283-7, 1988
- [74] Di llio C., Del Boccia G., Massoud R., and Federici G. Glutathione transferase of human breast is closely related to transferase of human placenta and erythrocytes *Biochem Int* 13(2): 263-9, 1986
- [75] Di llio C., Del Boccio G., Aceto A., and Federici G. Alteration of glutathione trasnsferase isoenzyme concentration in human renal carcinoma. *Carcinogenesis* 8(6): 861-4, 1987
- [76] Di llio C., Del Boccia G., Aceto A., Cassascia R., Mucilli F., and Federici G. Elevation of glutathione transferase activity in human lung tumour. *Carcinogenesis* 9(2): 335-40, 1988

- [77] Satoh K., Kitahara A., and Sato K. Identification of heterogeneous and microheterogeneous subunits of glutathione S-transferase in rat liver cytosol. *Arch Biochem Biophys* 242:104-11, 1985
- [78] Kodate C., Fukushi A., Narita T., Kudo H., Soma Y., and Sato K. Human placental form of glutathione S-transferase (GST-pi) as a new immunohistochemical marker for human colonic carcinoma. *Japanese J of Cancer Res* 77(3): 226-9, 1986, 1987
- [79] Soma Y., Satoh K., and Sato K. Purification and subunit-structural and immunological characterization of five glutathione S-transferases in human liver, and the acidic form as a hepatic tumor marker. *Biochimic et Biophysica Acta* 869: 247-58, 1986
- [80] Nishihira T. Expression of glutathione S-transferase-pi messenger RNA in human esophageal cancer. *Cancer* 67(10): 2560-4, 1991
- [81] Shea T.C. and Henner W.D. Glutathione transferases II human tumors. In: *Glutathione S-Transferases and Carcinogenesis*, Mantle T.J., Pickett C.B., and Hayes J.D.(eds.) Taylor & Francis, London p. 227, 1987
- [82] Tsunemoto H., Morita S., Sato S., Lino Y., Yul Yoo. Present status of fast neutron therapy in Asian Countries. *Strahlenther Onkol* /165:330-6, 1989
- [83] Shiratori Y., Soma Y., Maruyama H., Sato S., Takaro A. And Sato K. Immunohistochemical detection of the placental form of the glutathione S-transferase in dysplastic and neoplastic and human uterine cervix lesions. *Cancer Res* 47: 6806-6809, 1987
- [84] Tsuchida S., Sekine Y., Shineha R., Nishihira T. and Sato K. Elavation of the placental glutathione S-transferase form (GST-pi) in tumor tissues and the levels in sera of patients with cancer *Res* 49:5225-9, 1989

- [85] Zhang L., Mock D., and Cameron R. Development of glutathione S-transferase placental form (GST-P) stained foci during hamster buccal pouch mukosa carcinogenesis. *Cancer Letters* 64: 241-7, 1992
- [86] Moquire N.C., Drozd K., Luff R.D., and Kantor R.R.S. Immunohistochemical localization of glutathione S- transferase in preneoplastic and neoplastic lesions of the human cervix. *Acta Cytologica* 35(1): 94-9, 1991
- [87] De Camargo J.L. and Rodrigues M.A. Placental form of glutathione S-transferase as a marker for cervical neoplasia *Acta Cytologica* 36(5) : 850, 1992
- [88] Randall B.G. Angus B. Akiba R., Hall A., Cattan A.R., Proctor S.J., Jones R.A. and Horne C.H.W.. Glutathione S- transferase (placental) as marker of transformation in the human cervix uterus An immunohistochemical study. *Br J of Cancer* 62: 614-8, 1990
- [89] Peters W.H.M. Roelofs H.M.J., Nagengast H.M. and Van Tongeren J.H.M. Human intestinal glutathione S- transferases, *Biochem J* 257:471-6, 1989
- [90] Feinfeld D.A. et al. Ligandin in perfusate from transplanted kidneys: A test for tubular necrosis. *Nephron* 21: 38-41, 1978
- [91] Abdel-Rahman S.Z. Glutathione and related enzymes in fascioliasis before and after treatment with biothiond. *J Trop Med and Hyg* 93(5):337-40, 1990
- [92] Severini G. Glutathione S- transferase activity in patients with cancer of the digestive tract. *J of Cancer Res and Clin Oncol* 120(1):112-4, 1993
- [93] Hida T. et al Serum glutathione S- transferase-pi level as tumor marker for non small cell lung cancer. Potential predictive value in chemotherapeutic response. *Cancer* 73(5):1377-1382, 1994

- [94] Prochoska H.J. and Fernandes C.L. Elavation of serum phase two enzymes by anti carcinogenesis enzyme Inducers: markers for a chemoprotected state *Carcinogenesis* 14(12):2441-5, 1993
- [95] Kumar K.,Thangaraj M., and Sachdanandam P. Changes in antioxidant systems in the blood of postmenopausal women with breast cancer. *Biochem Int* 25(2):37180, 1991
- [96] Lewis A.D., Forrester L.M., Hayes J.D. Woreing C.Y., Carmichael J., Harris A.L., Mooghen M. And Wolf C.R. Glutathione S- transferase isoenzymes in human tumours and tumour derived cell lines. *Br J Cancer* 60(3):327-31, 1989
- [97] Hales B.G. and Neims A.H. Asex differences in hepatic glutathione S-transferase B and the effect of hypophysectomy *Biochem J* 160:223-9, 1976
- [98] Jakoby W.B. The glutathione S- transferases: A group of multifunctional detoxification proteins. *Adv Enzymol* 46: 383-414, 1978
- [99] Mantle T.J.,Pickett C.B and Hayes J.D.(eds). *Glutathione S-transferase and Carcinogenesis*. Taylor&Francis, London, 1987
- [100] Blanck A., Hansson T., Eriksson L.C.,and Gustafsson J. On mechanism of sex differences in chemical carcinogenesis: effects of implantation of ectopic pituitary grafts on the early stages of liver carcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis*. 5: 1257-62 1984
- [101] Satoh K., Hatayama I, Tsuchida S., and Sato K. Biochemical characteristics of A preneoplastic marker enzyme glutathione S-transferase P-form (7-7). *Arch of Biochem and Biophys* 285(2): 312-6, 1991

- [102] Blanck A. Hansson T., Gustafsson J., and Eriksson L.C. Pituitary grafts modify sex differences in liver tumor formation in the rat following initiation with diethylnitrosamine and different promotion regimens. *Carcinogenesis*. 7(6):981-5, 1986
- [103] Singhal S.S., Saxena M., Ahmad H., Awasthi S., Haque A.K., and Awasthi Y.C. Glutathione S-transferases of human lung: Characterization and evaluation of the protective role of the alpha-class isozymes against lipid peroxidation. *Arch Biochem & Biophys* 299(2): 234-41, 1992
- [104] Ozono S. et al. Immunohistochemical localization of estradiol, progesterone, and progesterone receptor in human salivary glands and salivary adenoid cystic carcinoma *Cell Structure and Function* 17(3): 169-75, 1992
- [105] Silverberg E and Lubera J. Cancer statistics 1987. *Cancer J. Clin* 37: 2-19, 1987
- [106] Web sitesi, <http://eurocytology.eu/course/302> 21.10.2019
- [107] Seifert G and Caselitz J. Epithelial salivary gland tumours: tumor markers *Prog Surg Pathol* 9: 157-87, 1989
- [108] Seifert F and Sobin L.H. World Health Organization's Histologic Classifications of salivary Gland Tumors. A commentary on the second edition. *Cancer* 70(2): 379-85, 1992
- [109] M.Kumar, R. Nanavati, T.G. Modi, C. Dobariya. *Cancerjournal. net* on Wednesday January 9, 2019, IP: 194.27.51.50
- [110] Prof Dr Ömer Günhan. GATA Patoloji. WHO. 2005 A.F.B.Rosai
- [111] Thackray A.C., Lucas R.B., (eds.) *Tumors of the Major Salivary Glands*. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, 1974, p. 16-39, p. 107-118

- [112] Naeim S.,forsberg M.I.Jr., Waisman J., Coulson W.F. Mixed tumors of the salivary glands. Arch Pathol'Lab Med 100: 271-75, 1976.
- [113] Krolls S.O. and Boyers C. Mixed tumours of salivary glands long term follow up. Cancer 30: 276-81, 1972.
- [114] Patey D.H. and Thackray A.C The treatment of parotid tumours in the light a pathological study of parotidectomy material. Br J Surg 45: 477-87, 1958
- [115] Thackray A.C., Lucas R.B., (eds.)Tumors of the Major Salivary Glands. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, 1974, p. 16-39, p. 107-118
- [116] WHO International histologic classification of tumours. Histologic typing of salivary gland tumours. G. Seifert,(ed) in collaboration with pathologist in 6 countries. 2nd edition. Springer-Verlag, 1991
- [117] Freeman S.B., Kennedy K.S.,Parker G.S., and TatumS.A.Metastasizing pleomorphic adenoma of the nasal septum. Arch Otol H & N Surg 116:1331-3, 1990
- [118] Wenig B.M. Hitchcoble C.L. Ellis G.L. and Gnepp D.R. Metastasizing mixed tumour of salivary glands. A clinicopathologic and flow cytometric analysis. Am J Surg Path 16(9):845-58, 1992
- [119] Sandra Gottschling, Philipp A. Schnabel, Felix J.F. Hert And Esther Herpel, Are We Missing The Target?- Cancer Stem Cells And Drug Resistance in Non Small Cell Lung Cancer, Cancer Genomics & Proteomics 9:275-286, 2012.
- [120] Franky D. Shah., Rasheedennisa Begum., Bhairavi N. Vajaria., Kinjal R. Patel., Jayendra B. Patel ., Shilin N. Shukla., Prabhudas S. Patel Ind J Clin Biochem. (Oct- Dec 2011) 26(4): 326-334

- [121] Oğuztüzün S., Kiliç M., Şimşek, G.G. , Moran, B., Akdemir, Y., Buluş, H., Yazıcı Gökbulut, Z., Troid Papiller Karsinom, Foliküler Adenom, Nodüler Hiperplazide GSTO1 ve GSTK1 Ekspresyonları. 25. Ulusal Biyokimya Kongresi, 3-6 Eylül 2013, İzmir [25th National Biochemistry Congress, İzmir/ Turkey), Turk J Biochem., 38(Suppl. 1); P-133, 2013

