

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

**Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomunda Sitokrom P450 ve Glutasyon S-
Transferaz İzozimlerinin Gen ve Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi**

Murat KILIÇ

TEMMUZ 2013

Biyoloji Anabilim Dalında Murat KILIÇ tarafından hazırlanan Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomunda Sitokrom P450 ve Glutasyon S-Transferaz İzozimlerinin Gen ve Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi adlı Doktora Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Yrd. Doç. Dr. Tarık DANIŞMAN
Anabilim Dalı Başkanı V.

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

Doç. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN
Ortak Danışman

Doç. Dr. Sezgin ÇELİK
Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Mümtaz İŞCAN _____
Üye (Danışman) : Doç. Dr. Sezgin ÇELİK _____
Üye : Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK _____
Üye : Doç. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN _____
Üye : Doç. Dr. Ahmet Oğuz ADA _____

12/07/2013

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

Doç. Dr. Erdem Kamil YILDIRIM
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

merhum babam Hurrem Kılıç'a

ÖZET

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KARSİNOMUNDA SİTOKROM P450 VE GLUTATYON S-TRANSFERAZ İZOZİMLERİNİN GEN VE PROTEİN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

KILIÇ, Murat

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Sezgin ÇELİK

Ortak Danışman: Doç. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN

Temmuz 2013, 121 sayfa

Akciğer kanserinin, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve nitrozamin gibi sigara dumanında bulunan karsinojenlere maruziyet sonucu olduğu bilinmektedir. Ksenobiyotiklerin etkilerinin, enzim ya da çeşitli moleküller yardımıyla zararsız hale getirilerek vücuttan atılması, detoksifikasyon mekanizmaları ile sağlanır. Detoksifikasyon mekanizmasında, Sitokrom P450 (CYP) izozimlerinin katalizlediği I. Faz reaksiyonlarında, lipofilik ksenobiyotikler genelde daha polar türevlerine dönüştürülürler ve II. Faz reaksiyonları ile konjugasyona uğrayıp vücuttan atılırlar. Ksenobiyotiklerin özellikle karsinojenik etkilerinden korunmada, beş farklı II. Faz reaksiyonlarından biri olan glutatyon ile konjugasyonda, glutatyon-S-transferaz (GST) izozimleri önemli rol oynar. Bu çalışmada, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomu (KHDAK)'da CYP ve GST izozimlerinin mRNA ve protein ifadelerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi EĞitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü'nden alınan KHDAK'lı 39 hastanın (3 Kadın, 36 Erkek; 57,41±8,09), normal ve tümörlü parafine gömülü

dokuları çalışma grubu olarak belirlendi. Tümörlü ve normal dokularda CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, GSTM1, GSTP1 ve GSTT1 izozimlerinin mRNA ifadeleri RT-PCR yöntemiyle, protein ifadeleri immunohistokimyasal boyama yöntemiyle belirlendi. Tümörlü ve normal dokular arasında, çalışılan genlerin mRNA ifadelerinin rölatif kantitasyon oranları incelendiğinde, CYP1A1 mRNA'sının 4 hastanın normal dokularında; CYP1B1 mRNA'sının 9 hastanın tümörlü ve 6 hastanın normal dokularında olmak üzere toplamda 15 hastada; CYP2E1 mRNA'sının 3 hastanın tümörlü ve 4 hastanın normal dokularında olmak üzere toplamda 7 hastada; GSTP1 mRNA'sının 8 hastanın tümörlü, 5 hastanın normal dokularında olmak üzere toplamda 13 hastada; GSTM1 mRNA'sının 5 hastanın tümörlü, 8 hastanın normal dokularında olmak üzere toplam 13 hastada; GSTT1 mRNA'sının 10'u tümörlü, 15'i normal dokularda olmak üzere toplamda 25 hastada ifade olduğu görüldü. İmmunohistokimyasal incelemelerde; GSTP1 ve CYP1B1 izozimlerinin tümörlü ve normal dokularda aşırı ifade olduğu görülürken, CYP1A1 izoziminin akciğer adenokarsinomlu dokularda, normal dokulara oranla; CYP2E1 ve GSTM1 izozimlerinin, KHDAK'lı hastaların tümörlü dokularında normal dokularına oranla daha fazla ifade edildiği istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Hastaların klinik bilgileri ile protein ifadeleri arasındaki ilişki incelendiğinde, tümör evresi ile GSTP1 izoziminin protein ifadesi arasında pozitif yönde bir ilişki olduğu görüldü ($r=0,30$, $p<0,05$). Sonuç olarak, Hastaların tümörlü ve normal dokuları arasında görülen CYP ve GST izozimlerinin, gen ve protein ifadelerindeki farklılıklar, KHDAK'nun oluşumunda ve kemoterapötik açıdan ilaç dirençlilik mekanizmalarında önemli rollerinin olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomu, CYP, GST, RT-PCR, İmmunohistokimya

ABSTRACT

DETERMINATION OF
GENE and PROTEIN EXPRESSION LEVELS OF
CYTOCHROME P450 and GLUTATHIONE S-TRANSFERASE ISOENZYMES in
NON SMALL CELL LUNG CARCINOMA

KILIÇ, Murat

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Ph. D. Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sezgin ÇELİK

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN

July 2013, 121 pages

Lung cancer is known to occur mainly as a result of exposure to carcinogens such as polycyclic aromatic hydrocarbons and nitrosamine, which are present in cigarette smoke. The interference with the harmful effects of xenobiotics by removal of them from the body with enzymes or the help of various molecules in a harmless way is provided with detoxification mechanisms. In Phase I reaction catalyzed by Cytochrome P450 (CYP) isoenzymes in the detoxification metabolism, lipophilic xenobiotics are generally converted to more polar derivatives, and these polar derivatives are eliminated from the body by Phase II conjugation reactions. Particularly, in the prevention of carcinogenic effects of xenobiotic, glutathione S-transferases (GSTs) in conjugation with glutathione, which is one of the five different Phase II reactions, plays an important role. This study aimed to evaluate mRNA and protein expressions of CYP and GST isoenzymes in non small cell lung carcinoma (NSCLC). For this purpose, paraffin-embedded normal and cancerous tissues from 39 patients (3 female, 36 male; 57.41±8.09) with NSCLC were used as

the study materials were obtained from the Atatürk Chest Diseases and Chest Surgery Education and Research Hospital Department of Pathology. mRNA and protein expressions of CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, and GSTP1 isoenzymes were detected RT-PCR and immunohistochemical staining methods, respectively. In examination of mRNA expression relative quantification ratios of the gene studied, the followings were detected: CYP1A1 mRNA in normal tissues of 4 patients, CYP1B1 mRNA in tumor tissues of 9 patients and normal tissues of 6 patients with a total of 15 patients, CYP2E1 mRNA in tumor tissues of 3 patients and normal tissues of 4 patients with a total 7 patients; GSTP1 mRNA in tumor tissues of 8 patients and normal tissues of 5 patients with a total of 13 patients, GSTM1 mRNA in tumor tissues of 5 patients and normal tissues of 8 patients with a total of 15 patients, and GSTT1 mRNA in tumor tissues of 10 patients and normal tissues of 15 patients with a total of 25 patients out of 39 NSCLC patients. In immunohistochemical examinations, CYP1A1 isoenzyme expression was significantly higher in lung adenocarcinoma tissues than normal tissues, CYP2E1 and GSTM1 isoenzymes expressions were significantly higher in tumor tissues than normal tissues in NSCLC patients ($p<0,05$) whereas GSTP1 and CYP1B1 isoenzymes overexpressed in both tumors and normal tissues. In examination of patients in regard to relationship with their clinical data and protein expression profile, a low positive correlation was observed between GSTP1 protein expression and the tumor stage ($r=0,30$, $p<0,05$). As a conclusion, the differences in gene and protein expressions of CYP and GST isoenzymes between tumor and normal tissues of the patients might show their possible roles, which may be important in pathogenesis of NSCLC and chemotherapeutic drug resistance mechanisms.

Keywords: Non Small Cell Lung Carcinoma, CYP, GST, RT-PCR, Immunohistochemistry

TEŞEKKÜR

Yapılan bu tez çalışması ve doktora eğitimim boyunca benden bilimsel, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen başta tez hocalarım Sayın Doç. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN ve Sayın Doç. Dr. Sezgin ÇELİK olmak üzere; tez çalışması kapsamında bilimsel desteklerini gördüğüm, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyeleri hocalarım Sayın Prof. Dr. Mümtaz İŞCAN ve Sayın Doç. Dr. Ahmet Oğuz ADA'ya; çalışmamda kullandığım parafine gömülü dokuların kazanımında yardımlarını esirgemeyen Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü'nden hocam Sayın Doç. Dr. Funda DEMİRAĞ ve Sayın Dr. Pınar BIÇAKCIOĞLU'na, materyal kazanımı sırasında yardımlarını esirgemeyen Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Laboratuvarı teknisyeni Sayın Lokman DEMİRBAŞ şahsında tüm laboratuvar çalışanlarına; tezimin istatistik hesaplamaları kısmında yardımlarını esirgemeyen iş arkadaşım Pamukkale Üniversitesi Acıpayam Meslek Yüksekokulu Öğretim Görevlisi Sayın Doğan SÖZBİLEN'e, çalışmalarımın deneysel aşamalarında her türlü laboratuvar imkânını sağladığı için Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Laboratuvarları Müdürlüğü ve çalışanlarına, tez çalışmamın tamamlanmasında proje desteklerini esirgemeyen Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, doktora eğitimim boyunca her türlü idari işlerimizde kolaylıklarını esirgemeyen Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü ve çalışanlarına ve son olarak, doğduğum andan itibaren hayatıma en büyük eğitimci olarak katkıda bulunan, verdiği eğitimlerinin yanında maddi ve manevi desteğini esirgemeyen annem Sayın Ayşe KILIÇ'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Akciğer Kanseri	7
1.1.1. Epidemiyoloji	7
1.1.2. Etiyoloji	7
1.1.3. Patoloji	12
1.1.3.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri	14
1.1.3.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri	14
1.1.3.2.1. Epidermoid (Skvamoz Hücreli) Karsinom	14
1.1.3.2.2. Adenokarsinom	14
1.1.3.2.3. Büyük Hücreli Karsinom	15
1.1.4. Evrelendirme	15
1.2. Ksenobiyotik Mekanizması	17
1.2.1. I. Faz Reaksiyonları	18
1.2.2. II. Faz Reaksiyonları	19
1.3. Sitokrom P450 (CYP)	22
1.4. Glutatyon S-Transferaz (GST)	24
1.5. Akciğer Kanserinde CYP Ve GST Enzimlerinin Gen ve Protein İfadeleri	25
2. MATERYAL VE YÖNTEM	29
2.1. Kullanılan Malzemeler	29
2.1.1. Kullanılan Laboratuvar Cihaz ve Malzemeleri	29
2.1.2. Kullanılan Kitler ve Kimyasal Malzemeler	30
2.1.3. Kullanılan Primer Gen ve Antikorlar	30

2.2. Materyal	31
2.2.1. Hasta Dokularının Toplanması ve Klinik Bilgiler	31
2.3. Yöntem	32
2.3.1. Parafine Gömülü Dokulardan Gen Ekspresyonu	32
2.3.1.1. Dokuların Deparafinizasyonu	32
2.3.1.2. Deparafinize Edilmiş Dokulardan mRNA İzolasyonu.....	33
2.3.1.3. İzole Edilen mRNA'ların Kantitasyonu	33
2.3.1.4. cDNA Sentezi	34
2.3.1.5. Real Time PCR ile Gen ifadelerinin Rölatif Kantitasyon Analizi	34
2.3.2. Parafine Gömülü Dokulardan Protein Ekspresyonu.....	36
2.3.2.1. İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi	36
2.3.3. İstatistiksel Analiz	37
3. BULGULAR	38
3.1. Dokulardan İzole Edilen mRNA Miktarları	38
3.2. CYP ve GST Enzimlerinin Gen İfadelerinin Sonuçları	39
3.2.1. CYP Enzimlerinin Gen İfadeleri ve Klinik Hasta Bilgileri ile Karşılaştırılması.....	39
3.2.2. GST Enzimlerinin Gen İfadeleri ve Klinik Hasta Bilgileri ile Karşılaştırılması	45
3.3. CYP ve GST Enzimlerinin Protein İfadelerinin Sonuçları	52
3.3.1. CYP Enzimlerinin Protein İfadeleri ve Klinik Hasta Bilgileri ile Karşılaştırılması	52
3.3.2. GST Enzimlerinin Protein İfadeleri ve Klinik Hasta Bilgileri ile Karşılaştırılması	70
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	88
KAYNAKLAR.....	100
EK 1.	112
ÖZGEÇMİŞ	113

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

	<u>Sayfa</u>
1.1. 1999 yılında WHO tarafından yapılan akciğer kanserinin patolojik sınıflandırması	13
1.2. Akciğer kanserinin TNM Sınıflandırması	16
1.3. Akciğer kanserinin evrelendirilmesi	17
1.4. I. Faz ve II. Faz reaksiyon tipleri ve görev alan enzimler	22
2.1. Tez çalışmasına konu olan hastaların klinik bilgileri	32
3.1. mRNA miktarları	38
3.2. CYP izozimlerinin gen ifadelerinin görüldüğü hasta sayıları	42
3.3. Tümör evrelerine göre CYP izozimlerinin mRNA'larının ifade olduğu hasta sayıları	42
3.4. Sigara içim durumuna göre CYP izozimlerinin mRNA'larının ifade olduğu hasta sayıları	43
3.5. Yaş gruplarına göre CYP izozimlerinin mRNA'larının ifade olduğu hasta sayıları	44
3.6. Cinsiyete göre CYP izozimlerinin mRNA'larının ifade olduğu hasta sayıları	44
3.7. GST izozimlerinin gen ifadelerinin görüldüğü hasta sayıları	49
3.8. Tümör evrelerine göre GST izozimlerinin mRNA'larının ifade olduğu hasta sayıları	49
3.9. Sigara içim durumuna göre GST izozimlerinin mRNA'larının ifade olduğu hasta sayıları	50
3.10. Yaş gruplarına göre Faz II izozimlerinin mRNA'larının ifade olduğu hasta sayıları	51
3.11. Cinsiyete göre GST izozimlerinin mRNA'larının ifade olduğu hasta sayıları	51
3.12. KHDAK'da tümörlü ve normal dokular eşleştirildiğinde CYP izozimlerinin protein ifadelerinin yüksek olduğu tümörlü dokuların sayıları ve yüzde oranları	53

3.13. KHDAK hastaların tümörlü ve normal dokularında CYP izozimlerinin protein ifadeleri	58
3.14. Tümör evrelerine göre CYP izozimlerinin protein ifadeleri	63
3.15. Sigara içim durumlarına göre CYP izozimlerinin protein ifadeleri	65
3.16. Yaş gruplarına göre CYP izozimlerinin protein ifadeleri	67
3.17. Cinsiyete göre CYP izozimlerinin protein ifadeleri	69
3.18.KHDAK'da tümörlü ve normal dokular eşleştirildiğinde GSTP izozimlerinin protein ifadelerinin yüksek olduğu tümör dokuların sayıları ve yüzde oranları	71
3.19. KHDAK hastaların tümörlü ve normal dokularında GST izozimlerinin protein ifadeleri	76
3.20. Tümör evrelerine göre GST izozimlerinin protein ifadeleri	81
3.21. Sigara içim durumlarına göre GST izozimlerinin protein ifadeleri	83
3.22. Yaş gruplarına göre GST izozimlerinin protein ifadeleri	85
3.23. Cinsiyete göre GST izozimlerinin protein ifadeleri	87

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Türkiye’de kanserin görülme sıklığı, 2008	3
1.2. Ülkemizde en sık görülen kanser türlerinin yaşa standardize insidans hızları (YSH), 2008	4
1.3. Ülkemizde kadınlarda en sık görülen kanser türlerinin yaşa göre özel hızları (YÖH), 2008	5
1.4. Ülkemizde erkeklerde en sık görülen kanser türlerinin yaşa göre özel hızları (YÖH), 2008	5
1.5. PAH metabolizması	9
1.6. Ksenobiyotik Mekanizması	18
2.1. Real Time PCR koşulları	35
3.1. CYP1A1 izoziminin gen ifadesinin görüldüğü hastalarda rölatif gen ifadelerinin oranı	39
3.2. CYP1B1 izoziminin gen ifadesinin görüldüğü hastalarda rölatif gen ifadelerinin oranı	40
3.3. CYP2E1 izoziminin gen ifadesinin görüldüğü hastalarda rölatif gen ifadesinin oranı	41
3.4. GSTP1 izoziminin gen ifadesinin görüldüğü hastalarda rölatif gen ifadesi oranı	45
3.5. GSTM1 izoziminin gen ifadesinin görüldüğü hastalarda rölatif gen ifadesi oranı	46
3.6. GSTT1 izoziminin gen ifadesinin görüldüğü hastalarda rölatif gen ifadesinin oranı	48
3.7. KHDAK’lı hastaların tümörlü ve normal dokularında CYP1A1 izoziminin protein ifadesi	55
3.8. KHDAK’lı hastaların tümörlü ve normal dokularında CYP1B1 izoziminin protein ifadesi	56
3.9. KHDAK’lı hastaların tümörlü ve normal dokularında CYP2E1 izoziminin protein ifadesi	57

3.10. Tümörlü ve normal dokularda immunohistokimyasal CYP1A1 proteini..	59
3.11. Tümörlü ve normal dokularda immunohistokimyasal CYP2E1 proteini..	60
3.12. Tümörlü ve normal dokularda immunohistokimyasal CYP1B1 proteini..	61
3.13. KHDAK'lı hastaların tümörlü ve normal dokularında GSTP1 izoziminin protein ifadesi	73
3.14. KHDAK'lı hastaların tümörlü ve normal dokularında GSTM1 izoziminin protein ifadesi	74
3.15. KHDAK'lı hastaların tümörlü ve normal dokularında GSTT1 izoziminin protein ifadesi	75
3.16. Tümörlü ve normal dokularda immunohistokimyasal GSTP1 proteini ...	77
3.17. Tümörlü ve normal dokularda immunohistokimyasal GSTM1 proteini ..	78
3.18. Tümörlü ve normal dokularda immunohistokimyasal GSTT1 proteini ...	79

SİMGELER DİZİNİ

°C	Derece santigrat
μ	Mikron
Δ	Delta
β	Beta

KISALTMALAR DİZİNİ

T.C.	Türkiye Cumhuriyeti
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
YSH	Yaşa standardize insidans hızı
CYP	Sitokrom P450
GST	Glutasyon S-Transferaz
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KoA	Ko enzim A
TNM	T: primer tümör; N: bölgesel lenf bezleri; M: uzak metastaz
AHR	Aril hidrokarbon reseptör
ARNT	Aril hidrokarbon reseptör nüklear translakotör
MAPEG	Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism
DNA	Deoksiribonükleik asit
RT-PCR	Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
cDNA	komlomenter DNA

RNA	Ribonükleik asit
mRNA	mesajcı RNA
HRP	Horseradish peroxidase
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
TCDD	2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin
NNK	nitrozamin 4-(metilnitrozamin)-1-(3 piridil)- 1-butanon
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
Cp	Crossing points=geçiş noktaları
ANF	alpha-naphthoflavone
MAP-kinaz	mitogen-activated protein kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase 1
nm	Nanometre
ml	Mililitre
µm	Mikrometre
g	Göreceli merkezkaç kuvveti
µl	Mikrolitre
dk	Dakika
rpm	Dakikadaki devir sayısı
sa	saat

1. GİRİŞ

Sürekli artan dünya nüfusuna bağlı olarak, temel ihtiyaçların karşılanması amacıyla teknolojik gelişimlerde aynı paralellikte artmaktadır. Ancak, artan nüfusun ihtiyaçlarını karşılamada hammadde sağlayıcısı olan doğa, ürünlerinin kullanımının sonucunda hızla yıkılmakta ve ardından özellikle insan nüfusu açısından son derece tehlikeli olmaya başlamaktadır. Örneğin; ulaşım sektörü açısından sayıları artan motorlu taşıtların kullanımı ile artan egzoz gazlarının atmosfere salınımı, ısınmak ve ya hammadde işleme sırasında kullanılan petrol ürünlerinin baca gazları ya da atıklar şeklinde doğaya bırakılması ile bu gazlara maruziyet, oluşan sera gazlarının etkisi ile atmosferde ozon tabakasında meydana gelen yırtılmalarla güneşin kızılötesi ışınlarına doğrudan maruz kalma, gelişen teknoloji ile ulaştırma ve haberleşme yönünden sürekli bilgisayar sistemlerine ihtiyaç duyulması ile maruz kalınan radyasyonun artması, beslenme ve diyetik açıdan sağlıklı ürünlerin kullanılmamasının yanında, kimyasal içerikli gıda katkı maddelerinin özellikle beslenme ürünlerinin kullanım sürelerinin arttırılması amacıyla gıdaların içerisine gelişmiş katılması, insanların iş ortamlarında mesleki maruziyetlerinin artması, kirlenen doğa ile çevrede mutajen bakteri ve virüs gibi biyolojik risklerin artması, sigara içimi, alkol kullanımı, ailesel ve genetik yatkınlık öyküleri gibi fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörler, günümüzde ölümle sonuçlanabilen kanser hastalıklarının çoğalmasına neden olmaktadır.

Canlılığın temel birimini oluşturan hücre, kendi hemoostazisinin yanında farklı fizyolojik görevler üstlenerek oluşturduğu sistemin de hemoostazisini sağlamakla yükümlüdür. Olay, hücre çekirdeğinde mevcut bulunan kromozomlar üzerinde taşınan genler sayesinde gerçekleşmektedir. Büyüme hormonlarının etkisiyle belirli bir morfolojik görünüm ve özellik kazandığında, ihtiyaca göre kontrollü olarak bölünüp çoğalır ve bir taraftan da organizmadaki fonksiyonunu yitirmiş olan hücreler de programlı bir şekilde (apoptozis) ölürler. Bu programda hücrenin sahip olduğu genler, bu hemoostaziye kontrol eder. Büyüme sinyallerinin ve hormonlarının üretimi, programlanmış hücre ölümü, hücre döngüsü kontrolü, bölünme sırasında DNA tamirinin ve onarımının yapılması gibi işlevlerin yanında; yukarıda bahsedilen

fiziksel kimyasal ve biyolojik karsinojenlere maruziyet durumunda aktive olan onkogenlerin inaktivasyonu ve bu olayda görev alan tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonu gibi durumlarda da hücre ve barındırdığı genler ve genlerin ürünü olan proteinler görevlidir.

Bu bilgiler ışığında genel anlamda tanımlanacak olursa kanser; fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkilerle değişikliğe uğramış hücrelerin, vücudun bir organ veya dokusunda kontrolsüz ve düzensiz bir şekilde çoğalması ve hatta bulunduğu organ veya dokudan uzak doku ve organlara yayılması ile karakterize edilen bir hastalık olarak tanımlanabilir.

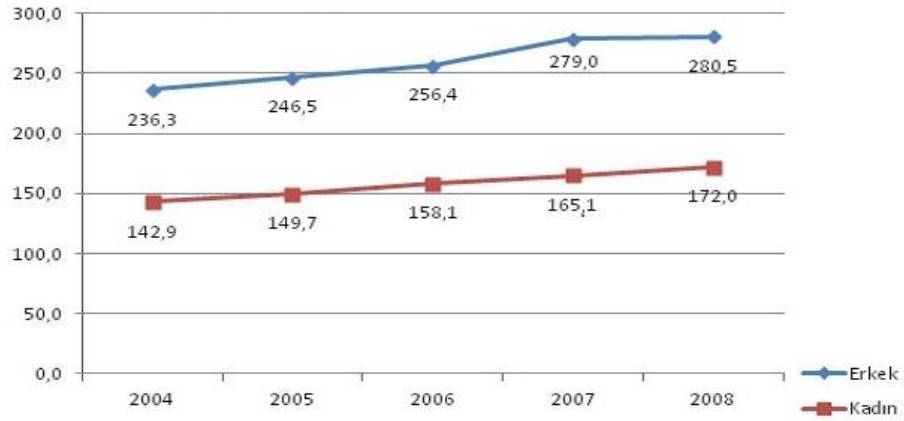
Yukarıda genel ifade ile verilen kansere neden olan etmenleri sınıflandıracak olursak karsinojenler; fiziksel karsinojenler (güneş ışınları, UV, radyasyon vb.), kimyasal karsinojenler (polisiklik aromatik hidrokarbonlar, nitrozaminler, asbest, radon, alkol, sigara vb.) ve biyolojik karsinojenler (virüsler,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

Kanserin görülme sıklığı; bir toplumda bir yılda ortaya çıkan yeni kanser hasta sayılarının o toplumda yüz binde nüfusa oranı şeklinde ifade edilir ve toplumlarda, yaş, cinsiyet, kanserin türü, çeşidi ve bölgesel farklılıklara göre değişir.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC)'nın 2008 Dünya Kanser Raporu verilerine bakıldığında; 2008 yılı tamamında 12,4 milyon tahmin edilen yeni kanser vakası ve 7,6 milyon kanser nedeni ölüm meydana gelmiştir. İnsidans yönünden dünyada en yaygın kanserler, akciğer (1,52 milyon), meme (1,29 milyon), ve kolorektal (1,15 milyon) kanserleridir. Kötü prognoz nedeniyle akciğer kanseri aynı zamanda en fazla ölüme (1,31 milyon) neden olan kanserken, onu mide kanseri (780.000 ölüm) ve karaciğer kanseri (699.000 ölüm) izlemektedir. Gelişmiş ülkelere nazaran, yeni kanser vakalarının %53'ü ve ölümlerin %60'ı az gelişmiş ülkelerde meydana gelmektedir. Erkeklerde prostat kanseri, gelişmiş bölgelerde en fazla teşhis edilen kanser türü haline gelirken (643.000 vaka,

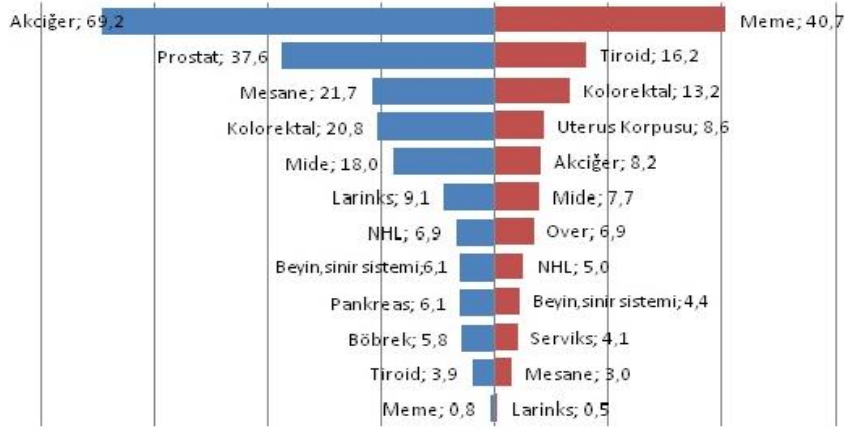
yeni vakaların toplamının %20,2'si), az gelişmiş ülkelerde birinci sıradaki akciğer kanserinin (538.000 vaka, %15,3) oldukça gerisinde, altıncı sıradadır (197.000 vaka, %5,6). Kadınlarda meme kanseri gelişmiş bölgelerdeki tahmini 715.000 (toplamın %26,5'i) ve az gelişmiş ülkelerdeki 577.000 yeni vaka ile (%18,8) büyük farkla dünya genelindeki en yaygın kanser türüdür. Kanser genellikle ileri yaş gruplarını etkilemektedir ve aynı zaman dilimi içerisinde 65 yaş üzeri nüfusun az gelişmiş ülkelerde %5,3'ten %9,8'e, gelişmiş ülkelerde ise %14,6'dan %22,6'ya tırmanacağı öngörülmektedir. Ayrıca aynı raporda, 2008 yılına kadar cinsiyet bakımından erkeklerde kadınlara oranla daha yüksek olan kanserin görülme sıklığı, bu tarihten itibaren özellikle gelişmiş ülkeler başta olmak üzere yerini kadınlarda erkeklere oranla daha fazla kanser vakasının ve ölümlerinin olduğuna bırakmıştır [1].

Ülkemizde kanser istatistiklerine bakıldığında T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığının 2006-2008 yılları arasında yayınladığı verilere göre erkeklerde kanserin görülme sıklığı 280,5/100.000 iken, kadınlarda 172/100.000 olarak belirlenmiştir (Şekil 1.1.) [2].



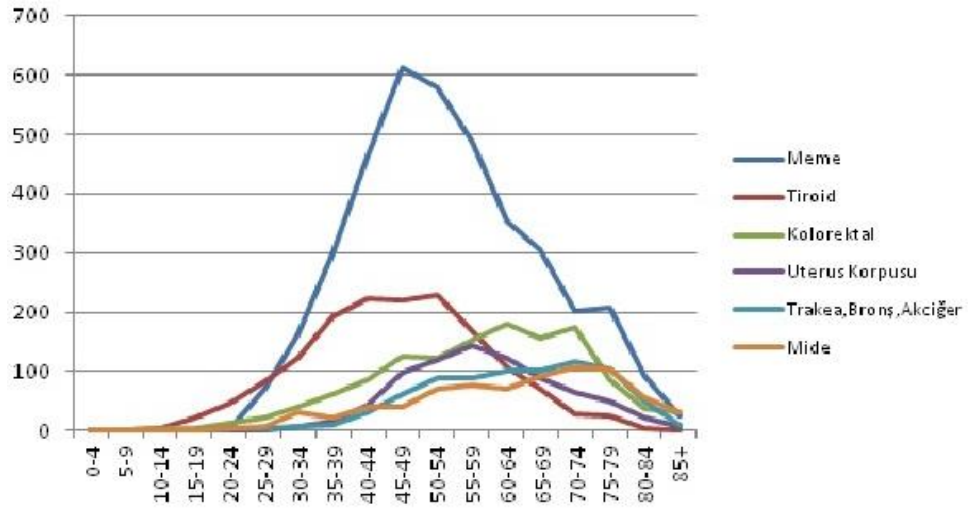
Şekil 1.1. Türkiye’de kanserin görülme sıklığı, 2008 [2]

Ülkemizde erkek ve kadınlarda yaşa standardize insidans hızlarına (YSH) göre en çok görülen kanser türlerine bakıldığında, erkeklerde; 69,2/100.000 ile en yüksek oranda görülen kanser türü akciğer kanseri olmakla birlikte, bunu sırasıyla 37,6/100.000 YSH ile prostat, 21,7/100.000 YSH ile mesane, 20,8/100.000 YSH ile kolorektal, 18/100.000 YSH ile mide kanserleri izlemektedir. Kadınlarda ise en yüksek oranda gözlenen kanser türü 40,7/100.000 YSH ile meme kanseri ve sırasıyla 16,2/100.000 YSH ile tiroid, 13,2/100.000 YSH ile kolorektal, 8,5/100.000 YSH ile uterus ve 8,2/100.000 YSH ile de akciğer kanserleri izlemektedir (Şekil 1.2.) [2].

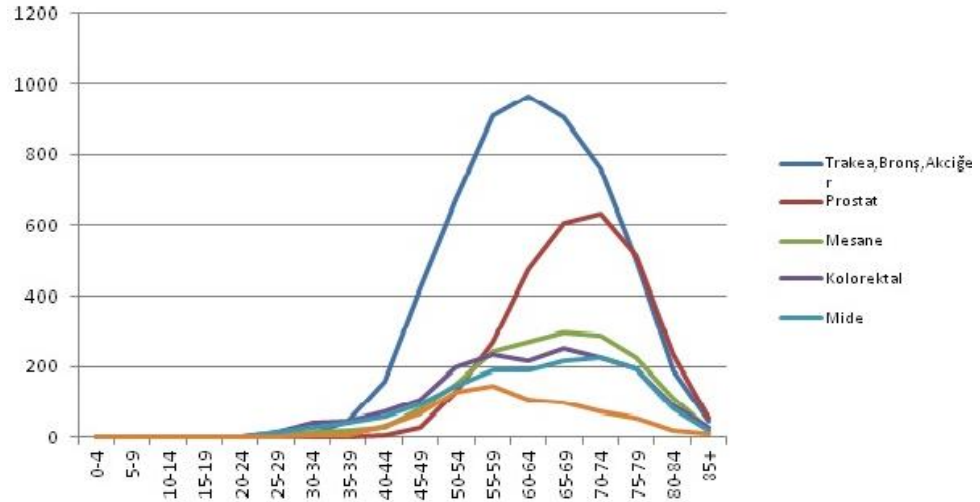


Şekil 1.2. Ülkemizde en sık görülen kanser türlerinin yaşa standardize insidans hızları (YSH), 2008 [2]

Ülkemizde görülen kanser türlerinin ve kanser sıklığının yaşa göre özel hızları (YÖH) incelendiğinde, 0-4 yaş grubunda dâhil olmak üzere 2008 yılı verilerine göre her yaşta kanser görülebilirken ortalama kadınlarda 45-49 yaş grubu ve üzeri yaşlarda, erkeklerde ise 55-59 yaş grubu ve üzeri yaşlarda daha çok kanser görülmektedir (Şekil 1.3, 1.4) [2].



Şekil 1.3. Ülkemizde kadınlarda en sık görülen kanser türlerinin yaşa göre özel hızları (YÖH), 2008 [2]



Şekil 1.4. Ülkemizde erkeklerde en sık görülen kanser türlerinin yaşa göre özel hızları (YÖH), 2008 [2]

İçerdiği kimyasal karsinojenlerin çeşitliliği bakımından sigara kullanımının toplumlarda artması buna paralel olarak gerek mesleki gerekse çevresel faktörlere maruziyet ile genetik yatkınlıklar, dünyada olduğu gibi ülkemizde de özellikle erkek

popülasyonu üzerinde akciğer kanserini görülme sıklığı bakımından ilk sırada tutmaktadır.

Fiziksel, kimyasal ve biyolojik karsinojenlere maruziyet ile kansere yakalanma arasında uzun ve sessiz dönemin olması, ileri yaşlarda bu hastalığa yakalanmanın sebebini açıklamaktadır. Ne var ki, hücre ve oluşturduğu iç denge maruziyet sonucunda hasarı ve etkiyi en aza indirmek için de kendi metabolik yollarını kurar. Bu anlamda karsinojenlerin vücutta oluşturduğu etkilerin en aza indirilmesi ve sistemin korunması ksenobiyotik mekanizması (detoksifikasyon) ile açıklanır.

Detoksifikasyon (biyotransformasyon); toksik maddeler, metabolitler, epoksidler gibi ksenobiyotiklerin zararlı etkilerinin çeşitli enzim ya da moleküller yardımı ile zararsız hale getirilerek vücuttan dışarı atılmasını sağlama mekanizmaları olarak açıklanabilir [3,4]. Bu mekanizmalarda görev alan enzimler ya da moleküller de bu hayati olguyu desteklemektedirler. I. Faz ve II. Faz reaksiyonları olmak üzere başlıca iki ana grupta toplanan ksenobiyotik mekanizmasında; karsinojenler, sırasıyla I. Faz reaksiyonları ile ya reaktif olmayan ürünlere yıkılarak vücuttan doğrudan atılırlar, ya da reaktif metabolitlere transforme olurlar. Vücutta birikmesi ve atılmamasıyla DNA hasarı, doku hasarı, mutasyon, hücre yaşlanması, kanser gibi metabolik ve kalıtsal rahatsızlıklara yol açan bu reaktif metabolitler, II. Faz reaksiyonları ile konjugasyon reaksiyonlarına uğratılarak idrar, safra, ter yoluyla vücuttan dışarı atılırlar.

Detoksifikasyon metabolizmasını oluşturan enzimleri kodlayan genlerin mutasyona uğraması ya da polimorfik olması, gen ifadelerinin yeterince sağlanamaması, gen ürünleri olan proteinlerinin ifadelerinin olmaması ya da aşırı veya çok az ifadeleri gibi faktörler doğrudan kanser oluşumunu etkileyen ve başlatan faktörlerdir. Detoksifikasyon metabolizmasının üyelerinin ayrıca platin bazlı kanser ilaçları başta olmak üzere, antikanser ilaç etkileşimleri, ilaçların etkilerinin azaltılması ve ya inaktivasyonunda da görev aldığı düşünüldüğünde de kanser hastalığı sonrası kemoterapötiklerin uygulanması hususunda önemli ön görüler sağlamaktadır. Çoklu ilaç direncinde de görev alan bu enzimlerin hücrelerdeki ifadeleri bahsedilen sebeplerden dolayı çok büyük önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında da, ksenobiyotik mekanizmasının başlıca iki reaksiyonda görev alan ve I. Faz reaksiyonlarını katalizleyen, Sitokrom P450 (CYP) enzim sisteminin üyelerinden CYP1A1, CYP1B1 ve CYP2E1 izozimleri ile II. Faz reaksiyonlarını katalizleyen Glutatyon S Transferaz (GST) enzim sisteminin üyelerinden GSTP1, GSTM1 ve GSTT1 izozimlerinin gen ve protein ifadelerinin, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomalı (KHDAK) hastaların parafine gömülü dokularında incelenmesi amaçlanmıştır.

1.1. Akciğer Kanseri

1.1.1. Epidemiyoloji

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC)'nın 2008 Dünya Kanser Raporu verilerine göre 2008 yılı tamamında 12,4 milyon tahmin edilen yeni kanser vakasında, insidans yönünden dünyada en yaygın kanser olarak (1,52 milyon, %12,26) oranla akciğer kanseri gelmektedir. Ayrıca kanser ölümleri bakımından değerlendirildiğinde dünya genelinde, gelişmiş ülkelerde 2008 yılı verilerine göre, akciğer kanseri tahmini 455.000 toplam ölüm sayısı (%27), ve az gelişmiş ülkelerde kanserden ölümlerin tahmini 475.000 toplam ölüm sayısı (%18,2) ile ilk sırada yer almaktadır. Özellikle kanser nedenli ölümlerde erkeklerde en yaygın görülen ölüm sebebidir [1]. Ülkemizde erkek ve kadınlarda yaşa standardize insidans hızlarına (YSH) göre en çok görülen kanser türlerine bakıldığında; erkeklerde akciğer kanseri 69,2/100.000 insidansla ilk sırada yer alırken; kadınlarda ise 8,2/100.000 insidans ile akciğer kanserleri beşinci sırada yer almaktadır (Şekil 1.2.) [2].

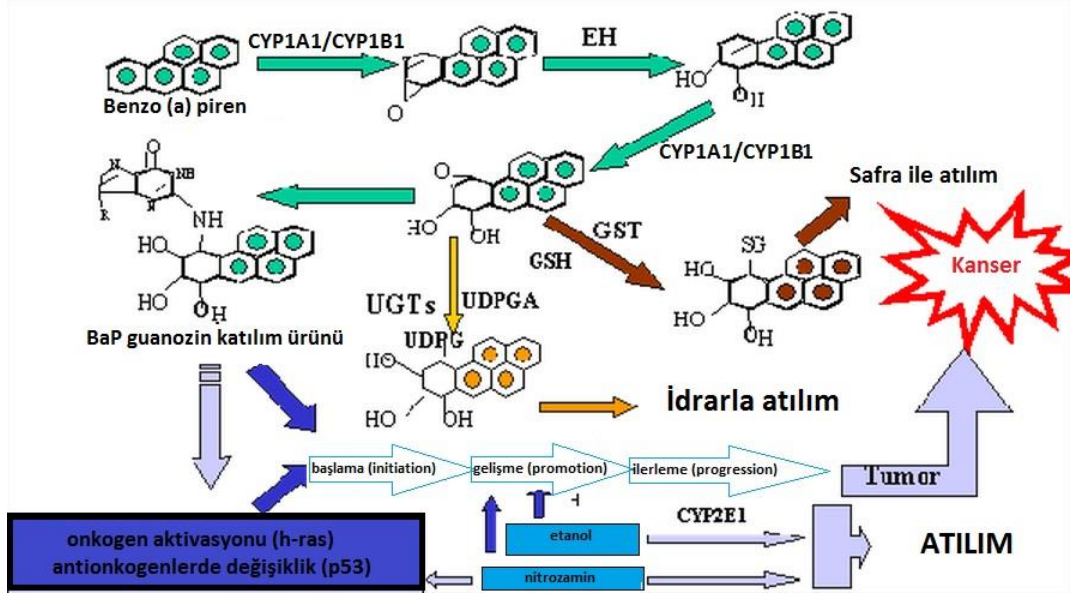
1.1.2. Etiyoloji

Akciğer kanserinin başlıca sebebi sigara içimidir. Günlük içilen sigara sayısının ve sigara içme süresinin yıl bazında artması, filtresiz, kısa filtreli ve yüksek katran içerikli sigara içilmesi akciğer kanseri riskini doğrudan arttırdığı bilinmektedir.

Ayrıca, sigarayı bırakma süresi ile doğru orantılı olarak akciğer kanser riskinin azaldığı bilinmektedir. 20 yıl ya da daha fazla süre ile günde bir paket ve üzeri sigara içenlerde akciğer kanseri riski 10-65 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, sigarayı bıraktıktan sonraki 5. yıldan itibaren akciğer kanserine yakalanma riskinin, sigarayı bırakmayanlara oranla azaldığı bildirilmiştir [5-8]

Sigara; karsinojenler, ko-karsinojenler ve tümör promotorları olmak üzere binlerce substrat içerir. Sigara dumanındaki majör karsinojenler; polisiklik hidrokarbonlar, aromatik aminler, nitrozaminler, piridin alkaloidler ve radyoaktif bileşenlerdir. Bunların içinde nitrozamin 4-(metilnitrozamin)-1-(3 piridil)-1-butanon (NNK), en potent mutajen karsinojendir ve nikotinin nitrozasyonundan oluşur. Sigarada bulunan karsinojenlerin aktivasyonunda CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2D6 ve CYP2E1 izozimlerinin ve detoksifikasyonunda GSTM1 ve GSTT1 izozimlerinin doğrudan ilişkili olduğu yapılan çalışmalar tarafından gösterilmiştir [5].

Şekil 1.5.'de PAH (polisiklik aromatik hidrokarbon) metabolizması, benzo (a) piren örneği üzerinden gösterilmiştir. Buna göre PAH'lar I. Faz enzimler (CYP1A1, CYP1B1) tarafından reaktif olan ve DNA'ya bağlanan epol dioksitleri metabolize eder. Ancak II. Faz reaksiyonları tarafından (Glutatyonla konjugasyon reaksiyonlarını katalizleyen GST'ler, glukuronik asitle konjugasyon reaksiyonlarını katalizleyen UGST'ler) bu reaktif DNA katılım ürünleri detoksifiye edilerek idrar ya da safra ile vücuttan atılırlar. Bu işlemler sırasında detoksifikasyonda görev alan enzimlerden bazılarının ya da tamamının ifade edilmemesi ya da mutant olması durumlarında, benzo (a) piren nihai karsinojenlere aktive olur ve bu karsinojenler DNA ile kovalent reaksiyonlar gerçekleştirerek, DNA katılım ürünlerini oluşturur. DNA'da hatalı kodlama ve mutasyon oluşturması yoluyla, sigara dumanına maruz kalan tüm bronş epitelinde; sırasıyla, hiperplazi, metaplazi, displazi, karsinoma *in situ* ve invaziv kanser şeklinde meydana gelen morfolojik değişimlerle kanser başlamış olur [5,9].



Şekil 1.5. PAH metabolizması [9].

Dünyanın herhangi bir coğrafik bölgesinde, o bölgenin jeolojik yapısına bağlı olarak çevreye yayılım gösteren radon, akciğer kanserlerinin oluşumunda ve etiyolojisinde sigaradan sonra ikinci sırayı almaktadır. Doğal olarak oluşan ve radyoaktif özellikteki en ağır gazlardan biri olan radon, inşasında kullanılan malzemenin cinsine bağlı olarak insanların yaşadığı binalarda birikebilmekte ve kimi zaman özellikle kapalı ve iyi havalandırılmamış mekânlarda yüksek derişimlere ulaşabilmektedir. Doğal süreçlerin sonucunda insana zarar verebilen çevresel etmenlerden birisi olan radon, topraktan havaya sızar ve suda eriyebildiğinden bazen sudan da havaya geçebilmektedir [10,11].

Yapılan son araştırmalara göre, akciğer kanserinin etiyolojisinden %10-14'ünden radonun sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir [6]. 75 yaşına kadar sigara içmeyenlerin konsantrasyon oranı 100 Bq/m^3 (Becquerels) olan radona maruz kaldıkları takdirde akciğer kanserine yakalanma risklerinin bu oranda radona maruz kalmayanlara göre 1000'de 1 arttığı gözlenmiştir. Aynı radyasyon oranına tabi kalan sigara içen kişilerde ise akciğer kanserine yakalanma oranınının 25 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir [12,13].

Akciğer kanserinin bir başka etiolojik faktörü ise erkeklerde %15, kadınlarda %5 oranlarında mesleki maruziyetler olarak bildirilmektedir. Mesleki maruziyetin başında asbest gelmektedir. Madenciler, çimento, yapı malzemeleri, fren balatası yapımı, tekstil, izolasyon, tersane gibi iş sektörlerinde çalışan işçilerde sigara içmeyenlerde, akciğer kanseri riski %5 iken; sigara içen bu sektör çalışanlarında akciğer kanserine yakalanma riski %92 olduğu bildirilmiştir. Asbest maruziyetinden sonra ikinci mesleki maruziyet etmeni uranyum madeni çalışanlarında, uranyum madenine maruziyet gelmektedir. Yine bu sektörde sigara içmeyenlerde akciğer kanserine yakalanma riski %7 iken, sigara içen uranyum madeni çalışanlarında mesleki maruziyet sonucu akciğer kanserine yakalanma riski %38 olarak bildirilmiştir. Havagazı işçileri, asfalt, katran, kok fırını işçileri, baca temizleyicileri, madenciler gibi işçilerinde mesleki olarak kömür ve katrana maruz kalarak %2-6 oranında akciğer kanserine yakalanma riskleri vardır. Maden ve kaynak işçisi, böcek öldürücüler, şarapçılar, petro-kimya işçilerinin maruz kaldıkları arsenik; çamaşır suyu üretimi, cam-seramik, muşamba, mezbaha, basın endüstrisi ve batarya işçileri, itfaiyecilerin maruz kaldıkları krom; ve değişik iş kollarında maruz kalınan vinil klorür, hardal gazı, nikel, demir, berilyum, kadmiyum, kobalt, kurşun, elektromagnetik alanlara maruziyetinde akciğer kanseri oluşturma risklerinin olduğu bildirilmiştir [14,15].

Etiolojik açıdan akciğer kanser oluşumunda önemli bir faktör de beslenmedir. Yapılan çalışmalarda vitamin A ve betakaroten açısından fakirce beslenmenin, akciğer kanserine yakalanma riskini arttırdığı, diyetle alınan besinlerde betakaroten/retinol oranının yüksek olduğu gıdaların tüketilmesinin insanlarda akciğer kanseri riskini %40 oranlarında azalttığı bildirilmiştir [14]. Sebze ve meyvelerde bulunan flavonoidlerce ve omega-3 ve -6 gibi yağasitlerince zengin diyetin akciğer kanserini azalttığı tespit edilmiştir [6,16]. Sigara içiminin diyetle alınan vitaminlerin seviyesini, özellikle de vitamin C'nin seviyesini düşürdüğü bilinse de, sigara içenlerde ve içmeyenlerde, taze sebze ve meyve tüketimiyle alınan; vitamin C, karotenoidlerin (özellikle beta karotenin) akciğer kanseri riskini tüm histopatolojik tipler için ve her iki cinsiyette azalttığı bilinmektedir. Yeşil çayın kanserden koruyucu özelliği olduğu ve metastazı önlediği, doymuş yağlardan ve kolesterolce zengin beslenmenin akciğer kanseri riskini arttırdığı, folat eksikliğinin

de bronşiyal epitelde premalign lezyonlara neden olduğu ileri sürülmektedir [6,16,17].

Poliaromatik hidrokarbonlar, arsenik, nikel, krom gibi ağır metaller, fosil yakıt ürünleri, motorlu araçların egzoz dumanı, evsel ve işsel yakıt olarak kullanılan kömür dumanının havaya salınımı akciğer kanserinin etiyolojisinde %1'lik bir kısmını oluşturan hava kirliliğine neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda hava kirliliği bakımından aromatik hidrokarbonların fazla olduğu bölgelerde akciğer kanser oluşumu riski artmakta iken, ayrıca kentlerde yaşayanların kırsal kesimlerde yaşayanlara oranla 1,2-2,3 kat daha fazla risk altında olduğu bildirilmiştir [18].

Genetik yatkınlık, sigara içenler için akciğer kanser gelişimi açısından önemli bir etiyolojik faktördür. Sigaradan sonra en önemli risk faktörü olan genetik aktarım, multiple genler tarafından kodlanan I. Faz ve II. Faz enzim sistemleri ile ilişkilidir. Temelde, CYP süperailisi, GST ve N-asetil transferaz süperailisi bu gen gruplarını oluşturmaktadır. I. Faz enzim sistemi, ekzojen maddeleri reaktif bileşenlere dönüştürme yeteneğine sahiptir. II. Faz ise, konjugasyon veya suda çözünürlüğü değiştirerek bu maddelerin eliminasyonunu sağlayabilmektedir. Bu enzim sistemlerinin karsinojenlere karşı az veya daha fazla başarılı olmasının genetik aktarım ile ilgili olduğu ileri sürülmektedir. Akciğer kanseri ile ilişkili olan gen grupları; I. Faz genleri için; CYP1A1, CYP2D6, CYP2A6, CYP2C9, CYP3A4, CYP2E1 ve II. Faz genleri için; GSTM1, GSTT1, GSTP olup en çok suçlanan genler ise CYP1A1, CYP2D6 ve GSTM1'dir [19,20].

Onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, hücre döngüsünün ve apoptozisin düzenlenmesinde görev alan özellikle p53 gibi genlerde ortaya çıkan değişiklikler, DNA tamirinde görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler, büyüme faktörleri ve reseptörlerine ilişkin değişiklikler akciğer kanseri oluşumunda etiyolojik açıdan moleküler düzeyde incelenen genetik olaylardır [5,14].

1.1.3. Patoloji

Tümörlerin sınıflandırılması; hastaların tedavisinde uyum sağlanmasının yanı sıra epidemiyolojik ve biyolojik çalışmaların temelini oluşturması açısından oldukça önem taşımaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) akciğer kanserinin patolojik sınıflandırmasını 1981 yılında yapmıştır. Ancak o tarihten günümüze toplumlarda, sigara içme sıklığı ve alışkanlıklarındaki değişiklikler tüm dünyada akciğer kanseri insidansını ve mortalitesini büyük ölçüde değiştirmiştir. Bu değişikliklerin akciğer kanserlerinin histolojik tipleri ve bunların görülme oranları üzerine de etkisi olmuştur. Bu nedenlerden dolayı, tanı yöntemleri ve kriterlerinde belirgin değişiklikler gerçekleşmiş, bunun üzerine sınıflama WHO tarafından 1999 yılında yeniden düzenlemiştir. Buna göre 1999 yılında WHO tarafından yapılan patolojik sınıflandırma Çizelge 1.1.'de verilmiştir [21,22].

Çizelge 1.1. 1999 yılında WHO tarafından yapılan akciğer kanserinin patolojik sınıflandırması [21].

<p>Malign Epitelyal Tümörler Skvamöz hücreli karsinom Papiller Berrak hücreli Küçük hücreli Bazoloid Küçük hücreli karsinom Kombine küçük hücreli karsinom Adenokarsinom Adenokarsinom, mikt tip Asiner adenokarsinom Papiller adenokarsinom Bronkoalveoler Non-müsinöz Müsinöz Miks müsinöz ve non-müsinöz ya da belirsiz hücre tipi Müsin salgılayan solid adenokarsinom Fetal adenokarsinom Müsinöz (kolloid) karsinom Müsinöz kistadenokarsinom Taşlı yüzük adenokarsinom Berrak hücreli adenokarsinom Büyük hücreli karsinom Büyük hücreli nöroendokrin karsinom Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinom Bazoloid karsinom Lenfoepitelyoma benzeri karsinom Berrak hücreli karsinom Rabdoid fentipinde büyük hücreli karsinom Adenoskuamöz karsinom Sarkomatoid karsinom Pleomorfik karsinom İğ hücreli karsinom Dev hücreli karsinom Karsinosarkom Pulmoner blastom Karsinoid tümörler Tipik karsinoid Atipik karsinoid Tükrük bezi tipindeki karsinomlar Mukoepidermoid karsinom Adenoid kistik karsinom Epitelyal-myoepitelyal karsinom Preinvaziv lezyonlar Skvamöz hücreli in situ karsinom Atipik adenomatöz hiperplazi</p>	<p>Diffüz idyopatik pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi Mezenkimal tümörler Epiteloid hemanjiyoendotelyoma Anjiyosarkom Plöröpulmoner blastom Kondroma Konjenital peribronşiyal miyofibroblastik tümör Diffüz pulmoner lenfanjiyomatosis İnflamatuar miyofibroblastik tümör Lenfanjiyoleiomyomatosis Sinovyal sarkom Monofazik Bifazik Pulmoner arter sarkoması Pulmoner ven sarkoması Benign epitelyal tümörler Papillomalar Skvamöz hücreli papillom Ekzofitik Ters yerleşimli Glandular papilloma Mikt skuamöz hücreli ve glanduler papilloma Adenomalar Alveolar adenoma Papiller adenoma Tükrük bezi tipi adenom Müköz gland adenomu Pleomorfik adenom Diğerleri Müsinöz kistadenom Lenfoproliferatif tümörler MALT tipi marjinal zon B hücre lenfoması Diffüz büyük B hücreli lenfoma Lenfomatoid granülomatosis Langerhans hücreli histiyositozis Çeşitli tümörler Hamartoma Sklerozan hemanjiom Berrak hücreli tümör Germ hücreli tümör Teratom, matür İmmatür Diğer germ hücreli tümörler İntrapulmoner blastom Melanoma Metastatik tümörler</p>
--	--

WHO'nun 1999 yılında yapmış olduğu patolojik sınıflandırmadan farklı olarak American Lung Association, akciğer kanserini Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) ve Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) olmak üzere iki ana grupta toplamıştır [23].

1.1.3.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK)

Akciğer kanserlerinin % 20-25'ini oluşturan KHAK, genellikle sigara içenlerde görülmekle birlikte sıklıkla peribronşiyal yerleşimli, submukoza ve periferik parankimal dokuları infiltre eden, erken ve yaygın metastaz gösteren agresif bir tümördür. Yoğun nukleuslu, dar sitoplazmalı, düzenli küçük hücrelerden oluşmaktadır. Primer akciğer kanserleri içinde hızlı seyirli olması, erken dönemde hematojen ve lenfatik metastaz yapması ve bu nedenle cerrahi tedaviden çok medikal tedavi uygulanması nedeniyle diğer akciğer kanserlerinden farklı bir grup olarak değerlendirilmektedir. Tanı konulduğunda genellikle yayılmıştır ve hastaların çoğu 6 aydan az yaşamaktadır [24,25].

1.1.3.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK)

Akciğer kanserlerinin yaklaşık % 75-80' ini oluştururlar. Gelişme ve diğer organlara yayılma bakımından KHAK'den daha yavaştır. Kanserin geliştiği hücrenin tipine göre 3 tipi vardır [23].

1.1.3.2.1. Epidermoid (Skvamoz Hücreli) Karsinom

Proksimal segment bronşlarından köken alır ve tüm akciğer kanserlerinin % 30'unu oluşturur. En erken formu karsinoma insitudur. Skvamoz metaplaziden displaziye, karsinoma insituya, invaziv karsinomaya gidiş 5-15 yıl alabilir. Skvamöz displazi ve karsinoma insitu normal mukozaya geri dönebilir. Mikroskopik olarak dokularda keratin ve interselüler köprü oluşumu görülür [6,24,25].

1.1.3.2.2. Adenokarsinom

Skar karsinomu da denilen bu tip, akciğerde periferik yerleşimli, alveolar yüzey epiteli ya da bronş mukoza bezlerinden köken almaktadır. Genellikle kadınlarda daha

fazla oranda görülür. Akciğer kanserlerinin % 25-30'undan sorumludur. İnterstisyel akciğer hastalığı ve akciğer enfeksiyonlarına bağlı gelişen fibrozise ikincil olarak da adenokarsinom gelişebilir. Prognozu diğer adenokarsinomlardan daha kötüdür [6,24,25].

1.1.3.2.3. Büyük Hücreli Karsinom

Histolojik olarak büyük çekirdekli ve çekirdekçiği belirgin olan ve kötü diferensiyel özellik gösteren büyük hücreli karsinom, tüm akciğer kanserlerinin % 9'unu oluşturmaktadır. Santral veya periferik yerleşim gösterebilir. Büyük hücreli nöroendokrin tümörler, KHAK'lerine benzemekte ve periferik palizatlanma, rozet formasyonu gibi nöroendokrin özellik taşıyanları kötü prognoz göstermektedir [6,24,25].

1.1.4. Evrelendirme

Akciğer kanserli bir hastada tedavi seçimi ve sonuçta hastalığın prognozu, hastalığın tanı sırasındaki evresi ile yakından ilişkilidir. Analitik, terapötik ve prognostik amaçlarla tümörün yaygınlığının ölçülmesi, tümör evrelendirmesi olarak tanımlanmaktadır. Akciğer kanserinde prognozu belirleyen en önemli faktör tümörün evresidir, ikinci sırada histopatolojik hücre tipi gelmektedir [26]. Akciğer kanserinin evrelendirilmesinde kullanılan TNM (T: primer tümör; N: bölgesel lenf bezleri; M: uzak metastaz) evrelendirme sistemi, tanı sırasında hastalığın anatomik yaygınlığını gösteren önemli bir rehber olarak primer akciğer malignitesi olan tüm hastalara uygulanabilmektedir. Evrelendirme sistemi ile oluşan standardizasyon, tedavi yaklaşımına, tedavi sonuçlarının değerlendirilmesine, hastalığın prognozuna ve hastaneler arasında veri transferinin sağlanmasına yararlı olmaktadır [26]. Akciğer kanserinin evreleme sisteminin revizyonu 1997 yılında Mountain tarafından yapılmıştır (Çizelge 1.2., Çizelge 1.3.). 2002 yılında yeniden TNM sınıflandırılması yapılmış ancak akciğer kanser evrelendirilmesinde değişiklik yapılmamıştır.

Çizelge 1.2. Akciğer kanserinin TNM Sınıflandırması [27].

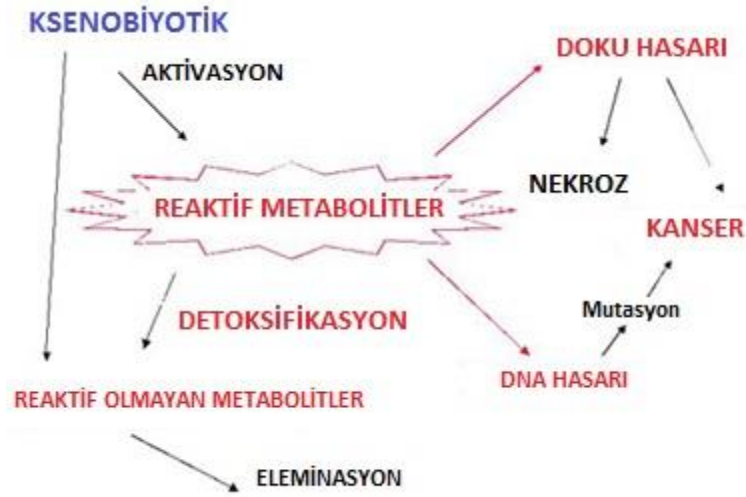
x	Tümörün büyüklüğü değerlendirilememiştir.
T0	Primer tümör kanıtı yok.
Tis	Karsinoma insitu.
T1	En geniş çapı ≤ 3 cm, akciğer veya visseral plevra ile çevrili, bronkoskopik olarak lob bronşundan daha proksimale (ana bronşa) invazyon göstermeyen tümör.
T2	Tümörün aşağıdaki özelliklerden en az birine sahip olması gereklidir: · En geniş çapı > 3 cm; ana bronş invaze ancak ana karinaya uzaklık ≥ 2 cm; · Visseral plevra invazyonu; · Hiler bölgeye ulaşan ancak tüm akciğeri kapsamayan atelektazi ya da obstrüktif pnömöni
T3	Tümörün herhangi bir büyüklükte olup göğüs duvarı (süperior sulkus tümörleri dahil), diyafragma, mediastinal plevra, pariyetal perikard gibi yapılardan herhangi birine direkt invazyon göstermesi veya karinaya 2 cm'den daha yakın ancak karinayı tutmayan ana bronştaki tümör veya bütün bir akciğeri kapsayan atelektazi veya obstrüktif pnömöni ile birlikte olan tümör.
T4	Tümörün herhangi bir büyüklükte olup mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, özefagus, vertebral kolon, karina gibi yapılardan herhangi birini invaze etmesi; veya malign plevral veya perikardiyal sıvı ile birlikte olan tümör, veya tümörle aynı lob içinde satelit tümör nodül ve nodüller.
Nx	Bölgesel lenf bezlerinin değerlendirilememesi.
N0	Bölgesel lenf bezi metastazı yok.
N1	Aynı taraf peribronsiyal ve/veya aynı taraf hiler lenf bezlerine metastaz ve primer tümörün direkt yayılması ile intrapulmoner bezlerin tutulması.
N2	Aynı taraf mediastinal ve/veya subkarinal lenf bezlerine metastaz.
N3	Karsı taraf mediastinal, hiler; aynı veya karşı taraf supraklavikular veya skalen lenf bezi metastazı.
Mx	Uzak metastaz varlığının değerlendirilememesi.
M0	Uzak metastaz yok.
M1	Uzak metastaz var.

Çizelge 1.3. Akciğer kanserinin evrelendirilmesi [27].

Okült karsinom	Tx	N0	M0
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre 1A	T1	N0	M0
Evre 1B	T2	N0	M0
Evre IIA	T1	N1	M0
Evre IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre IIIA	T1-T2-T3	N2	M0
	T3	N1	M0
Evre IIIB	Herhangi bir T	N3	M0
	T4	Herhangi bir N	M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

1.2. Ksenobiyotik Mekanizması

Karsinojenik maddelerin oluşturduğu etkilerden hücrenin korunmasında ksenobiyotik mekanizmalarının önemi büyüktür. Toksik maddeler, metabolitler, epoksitler v.b. oluşturduğu ksenobiyotiklerin, zararlı etkilerinin enzim ya da moleküller yardımı ile zararsız hale getirilerek vücuttan dışarı atılmalarını sağlayan mekanizmalar, detoksifikasyon (biyotransformasyon) mekanizmaları olarak adlandırılırlar (Şekil 1.5.) [28].



Şekil 1.6. Ksenobiyotik Mekanizması [29].

Ksenobiyotiklerin mekanizması iki ana reaksiyonda toplanır. Bunlar;

- I. Faz reaksiyonları
- II. Faz reaksiyonlarıdır.

1.2.1. I. Faz Reaksiyonları

I. Faz reaksiyonları ksenobiyotik mekanizmasının en önemli yolunu oluşturur. I. Faz reaksiyonları yükseltgenme (oksidasyon), indirgenme (redüksiyon) ve hidroliz reaksiyonları olmak üzere 3'e ayrılır (Çizelge 1.4.). Bu sistemde rol oynayan en önemli enzim sistemleri, hücrede düz endoplazmik retikulum membranlarında bulunan CYP enzim sistemidir. Başlıca yükseltgenme (oksidasyon) reaksiyonlarında, demir grubu içeren CYP enzimleri, alifatik hidroksilasyon, alifatik epoksidasyon, aromatik epoksidasyon ve hidroksilasyon, N-, O- veya S-oksidasyon (dealkilasyon), N-hidroksilasyon, Deaminasyon, S-oksidasyon, P-oksidasyon, desülfürasyon ve ester kırılması, oksidatif dehalojenasyon yolları ile bir oksijen atomu getirir. Bu sistemde oksijen, NADP ve NADP-CYP Redüktaz enzimi

gereklidir. Oksijen atomlarından sadece bir tanesi ksenobiyotiğe transfer edilirken, diğeri de suya indirgenir. Çünkü bu sistem hem bir oksidant (O_2), hem de bir redüktant (NADPH) içerir. Alkollerin aldehitlere ve aldehitlerinde karboksilik asitlere olan oksidasyonu, alkol dehidrogenaz ve aldehit dehidrogenaz enzimleri tarafından yürütülür [28,29].

İndirgenme (Redüksiyon) reaksiyonları, genelde nitro ve azo bileşenlerin indirgendiği reaksiyonlardır. Bu reaksiyonlar CYP ve NADPH-CYP Redüktaz enzimleri tarafından NADPH kullanılarak katalizlenir, oksijen tarafından da inhibe edilirler [30].

Hidroliz reaksiyonlarını kataliz eden enzimler hücrede, hem granüllü endoplazmik retikulumda, hem de mitokondrilerde bulunur. Hidrolazlar: esterazlar, amidazlar, epoksit hidrolaz ve karboksihidrolaz enzimleri olmak üzere sınıflandırılabilirler. Bu enzimler normal (endojen) substratları ve yapıcı bunlara benzeyen ksenobiyotikleri hidroliz ederler. Karşılıklı olarak esterazlar amidleri, amidazlar da esterleri hidroliz edebilirler [28].

1.2.2. II. Faz Reaksiyonları

II. Faz reaksiyonları, çeşitli konjugasyon veya sentez olaylarını içerir. I. Faz reaksiyonlarıyla, lipitte çözünen ksenobiyotikler daha polar moleküller haline geçerler, II. Faz reaksiyonlarında ise endojen maddelerle birleşen bu polar metabolitler inaktif şekilde eliminasyona uğrarlar. II. Faz reaksiyonları glukuronik asit, sülfat ve GSH (Glutatyon) ile konjugasyon reaksiyonları, asetilsyon ve metilasyon olmak üzere başlıca 3 reaksiyondan oluşur (Çizelge 1.4.) [28].

En sık gerçekleşen konjugasyon reaksiyonlarından biri olan glukuronik asit ile konjugasyonda (Glukuronidasyon); glukuronid substratların oksijen, azot veya kükürt gruplarına bağlanarak glukuronatlar şeklinde atılıma uğramasını sağlarlar. Reaksiyonları kataliz eden enzim üridin difosfat glukuronozil transferaz (UDP-glukuronozil transferaz)'dır [28].

Sülfat ile konjugasyon reaksiyonlarında (Sülfasyon); primer, sekonder, tersiyer alkoller, fenoller ve arilaminler endojen sülfat ile sülfat esterlerini oluştururlar. Bu konjugatlar iyonize oldukları ve suda çözündükleri için hızlı bir şekilde organizmadan atılırlar. Bu reaksiyonların katalizlenebilmesi için önce sülfotransferazların katalizörlüğü eşliğinde sülfat iyonlarının aktivasyonu ile aktif sülfat oluşması (3-fosfoadenozin-5-fosfosülfat) gerekir. Böylelikle, fenol, alkol ve amin grubu taşıyan birçok ksenobiyotik aktif sülfat ile aril sülfat, alkil sülfat veya sülfamatları oluşturur. Sülfotransferazlar ayrıca steroidler, karbohidratlar ve proteinler gibi endojen maddelerin de sülfat esterlerinin oluşmasını kataliz ederler [28].

Glutasyon ile konjugasyon da, Glutasyon GSH (γ glutamil sisteinil glisin) molekülü; glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşur. -SH, sülfidril grubuna işaret eder ve molekülün alışveriş yapan kısmıdır. Karsinojenik etkilerden korunmada glutasyonun önemli bir rolü vardır. Reaktif ara metabolitleri olan epoksidler ve diğer bazı toksik bileşikler dokularda nükleofilik endojen bileşiklerle, özellikle glutasyon ile konjuge edilerek inaktif duruma getirilirler. Glutasyon molekülündeki sülfidril grubu, güçlü bir nükleofilik grup gibi hareket eder, epoksid veya bazı toksik bileşiklerin veya metabolitlerin elektrofilik merkezlerine bağlanarak onları nötralize yani detoksifiye eder. Eğer toksik potansiyeli olan ksenobiyotikler GSH ile konjugasyona uğramasalar; DNA, RNA veya hücre proteini ile kovalent olarak birleşmekte serbest olacaklar ve sonuçta ciddi hücre hasarlarına yol açabileceklerdi. Bundan dolayı GSH, bazı ilaçlar ve karsinojenler gibi çeşitli toksik bileşiklere karşı önemli bir savunma mekanizmasıdır [31].

Glutasyon konjugeleri vücuttan atılmadan önce daha ileri metabolizasyona uğrarlar. Glutasyona ait glutamil ve glisin grupları spesifik enzimler tarafından uzaklaştırılırlar ve geri kalan sisteinil kısmının amino grubuna bir asetil grubu (asetil KoA'dan sağlanan) eklenir. Sonuçta meydana gelen bileşik idrarla atılıma uğrayan L-asetil sisteinin konjugesi olan merkapturik asittir [31,32].

Asetilasyon reaksiyonlarında, KoA ile endojen açıl grubu (asetil) aktive olur ve oluşan asetil KoA ile ksenobiyotik konjuge olur. Asetilasyonu, multiple şekilleri

bulunan ve genelde karaciğer, dalak, akciğer ve bağırsak mukozasında bulunan, N-asetil-transferaz enzimleri kataliz eder. Aromatik aminler, arilsubstitüe sulfonamidler, substitüehidrazin ve bazı aminoasitler N-asetilasyona uğrarlarken, alifatik ve fenil substitüe alifatik aminler asetile olmazlar [28].

Metilasyon, diğer birçok konjugasyon reaksiyonlarına göre farklılık gösterir. Konjugasyonla ksenobiyotik veya metabolitin fonksiyonel grubu maskelenir ve suda çözünürlüğü azalabilir. Metilasyonda; aminler, fenol yapısındaki bileşiklerle, tiyol grubunu içeren maddeler aktif metil grupları ile N-, O- ve S-metil konjugatlarını oluştururlar. Metil grubunu transfer eden koenzimler S-adenozilmetiyonin, N5-metil-tetrahidrofolat ve vitamin B12 türevleridir. Ksenobiyotiklerin metilasyonunda S-adenozilmetiyonin daha önemlidir. Metiltransferaz enzimleri reaksiyonu katalize ederler. Bu enzimlerin bir kısmı hücrenin çözünen fraksiyonlarında, bir kısmı ise mikrozomlarda yerleşmiştir. Organizmanın normal maddeleri yanında ksenobiyotiklerden kinolin, nornikotin, 3,4-dihidroksibenzoik asit mikrozomal enzimle ve daha az miktarda da etilmerkaptan, merkaptoetanol, tiyourasil, merkaptoasetik asit, dimerkaprol metil grubu ile konjuge olurlar [28].

Çizelge 1. 4. I. Faz ve II. Faz reaksiyon tipleri ve görev alan enzimler [28].

	Reaksiyon Tipi	Görev Alan Enzimler
I. Faz Reaksiyonları	1. Yükseltgenme (oksidasyon)	Sitokrom P-450 monoksijenaz
		Ksantinoksidaz
		Peroksidazlar
		Aminooksidaz
		Monoaminoksidaz
		Dioksijenaz
		Alkol dehidrogenaz
		Aldehit dehidrogenaz
		Superoksit dismutaz
	2. İndirgenme (redüksiyon)	Sitokrom P-450 redüktaz
		Keto-redüktaz
		Glutasyon peroksidazlar
3. Hidroliz	Epoksit hidrolaz	
	Karboksiesterazlar	
	Amidazlar	
II. Faz Reaksiyonları	1. Konjugasyon	Glukuronozil transferaz
		Sulfotransferaz
		Glutasyon S-transferaz
		Glukozil transferaz
		Tiyol transferaz
		Amidsentezi (transaçilaz)
	2. Metilasyon	O-, N-, S- metiltransferazlar
	3. Asetilasyon	N- asetiltransferaz
Açıltransferaz		
4. Diğerleri	Sülfürtransferaz (rodanez)	

1.3. Sitokrom P450 (CYP)

Sitokrom P450 (CYP) sistemi steroidler, hormonlar, prostoglandinler, lipidler ve yağ asitleri gibi birçok endojen maddenin metabolizmasında ve özellikle oral olarak alınan ekzojen bileşiklerin detoksifikasyonunda görevlidirler. Yapısında bulunan hem grubunun karbonmonoksitide bağlandıktan sonra absorbe ettiği ışığa ait dalga boyunun nanometre (nm) cinsinden değerini (450 nm) verdiği için Sitokrom P450 denilmiştir. CYP enzimlerinin hepatic ve ekstrahepatik dokularda, hedef dokuyla

ilgili ksenobiyotik bileşiklerin metabolik aktivasyonunda çoğunlukla belirleyici bir rolleri vardır [33,34].

CYP enzim sistemine ait bütün enzimler aminoasit benzerlik oranlarına göre ya aynı aile içinde, ya da farklı alt ailelerde sınıflandırılırlar. Buna göre enzimler, aminoasit dizilimi yönünden en az % 40'lık bir benzerlik gösteriyorsa aynı aile içine, % 60'tan daha fazla benzerlik gösterenler ise alt grup ailelere alınmaktadırlar. Alt aile bir harf ile belirtilir ve en son numara ise enzimi kodlayan genin numarasıdır. Örneğin **CYP3A5** [33,34].

İnsanlarda bulunan 53 CYP formunun yarısı daha çok ksenobiyotik metabolizmasından aktif olan ilk üç CYP ailesine (CYP1, CYP2, CYP3) aittir [35]. Genelde karaciğerde daha fazla olmakla birlikte, akciğer, deri gibi diğer dokularda da ifade edilen CYP'ler, eksojen kaynaklı bileşiklere savunma görevi yapmaktadırlar [36,37].

CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 genlerinin oluşturduğu CYP1 ailesi, AHR-ARNT (aril hidrokarbon reseptör-aril hidrokarbon reseptör nüklear translokotör) yolağında transkripsiyonel olarak kontrol edilmektedir. Başta sigara olmak üzere, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD) ile uyarılmaktadırlar [38,39]. PAH metabolizmasının DNA'ya bağlanma aşamasında aktiftirler. DNA'da hasar meydana gelir ve tamir edilmezse neoplazmik transformasyonlar oluşmaktadır. Bu yüzden kimyasal kaynaklı kanserlerle ilişkilendirilmektedirler [40].

CYP2 ailesi, heterojen enzimlerden oluşmaktadır. CYP2A6, CYP2A7, CYP2A13 genlerinin oluşturduğu CYP2A alt ailesini, CYP2B6 ve CYP2B7 genlerinin oluşturduğu CYP2B alt ailesini, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19 genlerinin oluşturduğu CYP2C alt ailesini, CYP2D6 geninin oluşturduğu CYP2D alt ailesini, CYP2E1 geninin oluşturduğu CYP2E1 alt ailesini, CYP2F ve CYP2J alt ailelerini içerir. CYP2B6, CYP2D6, CYP2E1, CYP2F1 ve CYP2J2 diğer alt ailelere kıyasla fonksiyonel olan üyelerdir [41,42].

CYP2E1 geni, CYP2E1 alt ailesine ait tek gendir [41]. CYP2E1 enzimi, etanol metabolizmasındaki önemli rollerinin bulunması ve kimyasal karsinojenlerin aktivatörü olmalarının yanında [43], tütündeki en önemli nitrozamin olan nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pridyl)-1-butanone (NNK) dışında, bazı spesifik nitrozaminleri de aktive etmektedir [44-46]. Parasetamol, klorzoksan, enfluran, halothan vb. hidrofobik bileşikler CYP2E1'in substratlarını oluşturmaktadır. [47]. CYP2E1 substratları aynı zamanda CYP2E1 uyarıcı ajanlardır; örnek olarak aseton, etanol, piridin, pirazol ve isoniazid verilebilir [48]. CYP2E1 prokarsinojenleri aktive ettiği gibi doku zedelenmesine yol açan serbest radikaller de oluşturur ve bu radikaller substrat varlığından etkilenmezler [43].

CYP3 ailesi CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 ve CYP3A43 genlerini içermektedir [41]. CYP3A enzimleri katalitik aktiviteye sahiptir ve ekspresyonları dokuya göre farklılık göstermektedir. Özellikle CYP3A4 genel olarak karaciğerde, CYP3A5 ekstrahepatik dokularda ifade olurken, CYP3A7 genel olarak fetal karaciğerinde ifade olmaktadır. CYP3A4 ve CYP3A7 PXR metabolizması ile regüle edilirken, CYP3A5 glukokortikoid reseptörü aracılığıyla kontrol edilmektedir. Quinidin, nifedipin, diltiazem, lidokaine, lovastatin, eritromisin, siklosporin, triazolam, midazolam ve testosteron, progesteron, androstenedion gibi endojen kaynaklar bu enzim ailesinin substratlarını oluştururken, ayrıca bu enzim ailesi aflatoksin B1, PAH, NNK ve 6-aminokirisen gibi prokarsinojenleri aktive etmektedir [46,49].

1.4. Glutasyon S-Transferaz (GST)

İnsanların birçok doku ve organında bulunan çok işlevli ve geniş spektrumlu substrat özgülüğü olan GST'ler, toksik kimyasallara maruz kalan canlı organizmalarda savunma görevini üstlenirler. GST'ler detoksifikasyon görevini, indirgenmiş glutasyonun (GSH), tiyol (-SH) grupları ile elektrofilik fonksiyonel gruba sahip olan ksenobiyotiklerin (oksidatif strese neden olanlar, çevresel kirleticiler ve karsinojenler gibi) büyük bir kısmının elektrofilik bölgelerini nötralize ederek gerçekleştirir. Oluşan ürün suda çözünen merkaptürik asittir (N-asetilsistein) ve vücuttan idrarla atılır [50].

GST'ler substratları olan, 4-hidroksil-2-nonenal, kolesterol-5,6-oksit, adenin propenal, 9-hidroperoksilinoleik asit, dopaminokrom, aminokrom gibi endojen moleküllerin; bütadien, akrolein, aflatoksin B1-8, 9-epoksit, heksaklorobütadien, trikloroetilen, stiren oksit, metilen klorid, etilenoksit, nitrokinolin oksit gibi çevresel karsinojenlerin; lindan, atrazin, DDT gibi pestisitlerin ksenobiyotik metabolizmasında detoksifikasyonunu sağlarken, başta cis-platin gibi, platin bazlı kanser ilaçları olmak üzere, klorambusil, siklosofamid, tiyotepe, fosfomisin, etakrinik asit, nitrogliserin, adriamisin, asetaminofen gibi ilaçlarında aktivitesini inhibe ederek hücrede bu ilaçlara karşı direncin gelişmesine neden olurlar [51].

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 glutatyon 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) olmak üzere toplam 11 sınıfta incelenmektedir [52].

1.5. Akciğer Kanserinde CYP ve GST Enzimlerinin Gen ve Protein İfadeleri

PAH'lar gibi solunum yoluyla alınan kimyasalların vücuda ilk yerleştiği organlar akciğerlerdir. Bu açıdan irdelendiğinde akciğer kanser oluşum mekanizmasının iyi bir şekilde anlaşılabilmesi için, akciğer kanser oluşumunda, CYP ve GST enzimlerinin de dahil olduğu ksenobiyotik mekanizmasının aydınlatılması son derece önemlidir.

PAH metabolizmasında önemli bir görev üstlenen CYP1A1 izozimi akciğerde bol miktarda ifade edilmektedir ve akciğer kanser gelişiminde önemli bir rol üstlenmiştir. Özellikle, Mollerup ve ark. (1999)'nın normal akciğer dokularında yaptıkları çalışmada, erkek sigara içicileri ile kadın sigara içicileri karşılaştırıldığında, kadınların akciğerinde, aromatik/hidrofobik DNA katılım ürünlerinin ve CYP1A1 seviyelerinin yüksek olduğunu vurgulanmıştır [53]. Mc Lemore ve ark. (1990), akciğer kanserli 56 hasta ile northern blotlama yöntemi ile yaptıkları çalışmada, 10 hastada CYP1A1 mRNA'sını [54], immunohistokimyasal yöntemle 12 akciğer kanserli hastada da Taussaint ve ark. (1993), CYP1A1 izoziminin protein ifadesini göstermişlerdir [55]. Nikotin metabolizmasında CYP2A6 izoziminin rolünü aydınlatmaya yönelik çalışmalar artsa da, son zamanlarda özellikle, Su ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada, solunum yollarında nikotin metabolizmasında, monooksijenasyon reaksiyonlarını kataliz eden, CYP2A13 izoziminin ifade düzeyinin CYP2A6'ya göre daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir [56]. Akciğer tümörlü ve normal dokularında Kivisto ve ark. (1996), CYP3A ifadesini immunohistokimyasal yöntemle belirttiklerini bildirmişlerdir [57]. Anttila ve ark. (1997), 8 akciğer kanserli hasta ile yaptıkları çalışmada hastaların tamamının tümörlü dokularında CYP3A5 mRNA'sını ve birinde de CYP3A4 mRNA'sını bulduklarını ve aynı zamanda bu hastaların normal dokularında her iki izoziminde mRNA'larının bulunduğunu rapor etmişlerdir [58]. Spivack ve ark. (2001), RT-PCR ve western blotlama teknikleri ile yaptığı çalışmada CYP1B1'in akciğer kanserli ve normal dokularında ifadelerini göstermiştir [59]. Czerwinski ve ark. (1994), RNase protection assay yöntemiyle CYP2B7 ve CYP4B1 mRNA'larının akciğer kanserinde normal ve tümörlü dokularda belirttiğini rapor etmiştir [60]. Raunio ve ark. (1998) normal akciğer dokularında CYP1A1, CYP2E1, CYP3A5, CYP2B7, CYP4B1 ve CYP2F1 mRNA'larını RT-PCR tekniği ile gösterirken, immunohistokimyasal olarak da CYP3A4 ve CYP3A5 izozimlerinin protein ifadelerini göstermiştir [61]. Chang ve ark. (2007), akciğer adenokanserinde yaptıkları çalışmada, CYP1A1 ve CYP1B1 izozimlerinin transkripsiyonunun, sigara dumanındaki bileşikler gibi ligandların, aril hidrokarbon reseptörlerine (AhR) bağlanıp aktive olmasıyla, arttığını bildirmiştir [62]. Spivack ve ark (2003) akciğer kanserli hastalarda yaptığı çalışmada 10 hastanın ikisinde RT-PCR ve western blotlama analizlerini kullanarak CYP1A1 mRNA'sının ve proteinin ifadelerini göstermiştir [63]. İmmunohistokimyasal yöntemlerle, Oyama

ve ark. (2007), 48 akciğer adenokanserli hastanın %48'inde [64], Chang ve ark. (2007), 107 akciğer adenokanserli hastaların %37'sinde CYP1A1 izoziminin protein ifadesini göstermişlerdir [62]. Lin ve ark. (2003), 89 KHDAK'lı hastayla yaptığı çalışmada hastaların dokularında %47 oranında CYP1B1'in protein ifadesinin olduğunu vurgularken [65], Chang ve ark. (2007), 107 hastanın %49'unda bu izozimin protein ifadesinin pozitif olduğunu bildirmiştir [62]. Kivisto ve ark. (1995), 28 akciğer kanserli hastanın %46'sında CYP2E1 izoziminin protein ifadesini belirtirken [66], Oyama ve ark. (2007) yaptığı çalışmada 48 hastadan %48'inin dokularında bu izozimin protein ifadesini göstermiştir [64].

CYP enzimlerinin protein ve gen ifadelerinin akciğer kanserindeki rollerini aydınlatmaya yönelik çok sayıda çalışma olsa da, GST enzimlerinin gen ve protein ifadeleri ile akciğer kanseri arasındaki ilişkiyi gösterir çalışmalar sınırlıdır.

Oğuztüzün ve ark. (2010), immunohistokimyasal yöntemle KHDAK'lı hastaların dokularında yaptığı çalışmada sırasıyla GSTA1, GSTM4, GSTT1 ve GSTP1 izozimlerinin protein ifadelerinin, tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha yüksek olduğunu vurgulamışlardır [67]. Tang ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada, 50 KHDAK'lı hastanın tümör ve normal dokularında GSTM2 izoziminin mRNA ifadesini karşılaştırdığında, tümörlü dokularda GSTM2 mRNA ifadesinin normal dokulardakine oranla daha düşük oranlarda olduğunu vurgularken [68], 82 KHDAK'lı hastanın tümörlü ve normal dokularında GSTM2 izoziminin mRNA ifadelerini araştırdığı bir çalışmasında da, tümörlü dokularda GSTM2 izoziminin gen ifadelerinin oranlarının normal dokulara oranla yüksek olduğunu rapor etmiştir [69]. Spivack ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada, akciğer kanserli hastalarda GSTM1, GSTM3, GSTP1 ve GSTT1 izozimlerinin gen ve protein ifadelerini belirtmişlerdir [63]. Platin bazlı kanser ilaçlarından özellikle cisplatin antikanser ilacına karşı GSTP enziminin hücrede sağladığı ilaç direncini göstermek amacıyla yapılan çalışmalarda Bai ve ark. (1996), cisplatin bazlı kemoterapi tedavisi gören 38 KHDAK'lı vakada GSTP ekspresyonunu immunohistokimyasal olarak incelemişler ve sonuç olarak hastaların %66'sında GSTP enziminin protein ifadesinin yüksek olduğunu, bu hastalarda tedaviye yanıtın, ekspresyon olamayan hastalara göre daha düşük olduğunu ve bu sonucun kemoterapideki önemini vurgulamışlardır [70]. Nakanishi

ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada 54 KHDAK'lı hastanın transbronşiyal biyopsi örneklerinde %69 oranında GSTP enziminin protein ifadesini göstermişler ve bu hastaların cisplatin antikanser ilacıyla yapılan tedaviye verdikleri yanıtın düşük olduklarını vurgulamışlardır [71]. Bunların aksine, Ünsal ve ark. (2003), 38 KHDAK'lı ve 23 KHAK hastada GSTP enziminin protein ifadeleri ile bu hastalara uygulanan cisplatin tedavisine karşı göstermiş oldukları yanıtı ilişkilendirdikleri çalışmalarında; ilaca yanıtla hasta gruplarında GSTP ifadesi arasında anlamlı ilişki bulamazlarken, KHDAK'da GSTP pozitifliğinin KHAK'ya oranla daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir [72].

Yapılan bu tez çalışmasında; vücutta kanser oluşum mekanizması ve ilaç dirençliliğinde önemli rolü olan ksenobiyotik mekanizmasının I. Faz reaksiyonlarını katalizleyen, CYP1A1, CYP1B1 ve CYP2E1 izozimleri ile II. Faz reaksiyonlarını katalizleyen GSTP1, GSTM1 ve GSTT1 izozimlerinin gen ve protein ifadelerinin, küçük hücreli dışı akciğer kanserindeki düzeylerinin araştırılması amaçlanmıştır. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde, bu enzimlerin gen ve protein düzeyindeki ifadelerindeki değişikliklerin belirlenmesiyle, bu kanser tipinde ksenobiyotik mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik literatüre ek bilgiler sunulacak olması ve ayrıca ilaç metabolizmasında, özellikle antikanser ilaçların inaktivasyonunda görev alan bu enzimlerin gen ve protein ifadelerinin, terapi almamış hastalarda önceden belirlenmesiyle, hastalara uygulanacak kemoterapinin şeklinin önceden belirlenebilecek olması da çalışmanın bir diğer amaç ve kapsamını oluşturmaktadır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Malzemeler

2.1.1. Kullanılan Laboratuvar Cihaz ve Malzemeleri

- Real Time PCR (Roche- Light Cycler 480)
- Thermal Cycler PCR (Techne-TCPLUS)
- Florometre (İnvitrogen- Qubit)
- Thermomixer (Tetra)
- Soğutmalı Santrifüj (Hettich-Rotina)
- Tam otomatik Rotary Mikrotom (Leica-RM2255)
- Floresan Ataçmanlı Araştırma Mikroskobu (Leica 5000B)
- pH metre (Mettler Toledo)
- Işık Mikroskobu (Zeiss- Primostar)
- Otomatik mikropipet seti (CAPP)
- Lamiar flow kabin (Ecco-Class II)
- Kit saklama dolabı (Efostar)
- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Heidolph-MRHei)
- Vortex (Heidolph)
- Etüv (Binder-ED53)
- Ultra distile Su sistemi (Elga Purelab Optia)
- Otoklav (Hirayama HG-80)
- Buzdolabı (Beko-9621)
- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (IKA C-Mag H58)
- Ocağ (Arçelik021)
- Düdüklü Tencere (Hisar)
- Boyama tablası (Biogen)
- Mikrotom bıçağı (Shandon MB35)
- Lamel (Isolab)
- Poly-L-lysin kaplı lamalar (Thermo)

- -80 °C Buzdolabı (GFL6485)
- Mezür, beher, erlenmayer, balon joje (isolab)
- Multiwell plate (Roche)

2.1.2. Kullanılan Kitler ve Kimyasal Malzemeler

- Praline gömülü dokulardan RNA izolasyon kiti (Roche, High Pure RNA Paraffin Kit Cat. No. 03 270 289 001)
- cDNA Sentez kiti (Roche, Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit Cat. No. 05 091 284 001)
- Light Cycler 480 Probes Master kiti (Roche, Cat. No. 04 707 494 001)
- Tavşan-Fare Polivalan HRP (Horseradish peroxidase) kiti (D01-110, Golden)
- Quant-iT RNA Assay Kit (Invitrogen)
- 3,3-Diaminobenzidine (DAB) kromojen kit (GBI Lab)
- Sitrat Tamponu (Boster)
- Fosfat Tamponu (Boster)
- Ksilol (Merck)
- Alkol (Merck)
- %3'lük H₂O₂ (Hidrojen Peroksit) (Boster)

2.1.3. Kullanılan Primer Gen ve Antikorlar

- CYP1A1 Sitokrom P450 1A1 geni (RealTime Ready Catalog Assay, İnsan, Assay ID: 110757, Config. No: 100039180)
- CYP1B1 Sitokrom P450 1B1 geni (RealTime Ready Catalog Assay, İnsan, Assay ID: 113037, Config. No: 100039199)
- CYP2E1 Sitokrom P450 2E1 geni (RealTime Ready Catalog Assay, İnsan, Assay ID: 110824, Config. No: 100039205)
- GSTM1 Glutasyon S-Transferaz Mü1 geni (RealTime Ready Catalog Assay, İnsan, Assay ID: 113215, Config. No: 100003213)

- GSTP1 Glutasyon S-Transferaz Pi1 geni (RealTime Ready Catalog Assay, İnsan, Assay ID: 100457, Config. No: 100003198)
- GSTT1 Glutasyon S-Transferaz Teta1 geni (RealTime Ready Catalog Assay, İnsan, Assay ID: 113004, Config. No: 100003204)
- B-Actine referans gen (Real Time Ready Catalog Assay, İnsan, Assay ID: 101125, Config. No: 000024439)
- Anti-CYP1A1 (SC-20772, Santacruz Rabbit polcl.)
- Anti-CYP1B1 (Ab33586, Abcam rabbit polcl.)
- Anti-CYP2E1 (PA1116, Boster, Rabbit polcl.)
- Anti-GSTP1 (PA1040, Boster, rabbit polycl.)
- Anti-GSTM1 (Ab113432, Abcam, rabbit polcl.)
- Anti-GSTT1 (Ab96592, Abcam, rabbit polcl.)

2.2. Materyal

2.2.1. Hasta Dokularının Toplanması ve Klinik Bilgiler

Çalışma kapsamında, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'nca 10.05.2012 tarih, 12/05 toplantı sayılı ve 12/14 karar sayılı alınan etik kurul onayı [Ek 1.] doğrultusunda, Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü Arşivi'nden alınan parafine gömülü, 39 adet KHDAK'li hasta dokusu ve bunların normal periferik dokuları kullanılmıştır.

Çalışmaya konu olan 39 KHDAK'li hastanın 18 (%46,15)'i Adenokanser, 21 (53,84)'i ise Squamoz Hücreli kanser şeklinde iki alt tümör tipine ayrılmaktadır. Hastaların yaş ortalamaları $57,41 \pm 8,09$ olup, 39 hastanın 3 (%7,69)'ünü kadınlar geri kalan kısmını ise (%92,3) erkekler oluşturmaktadır. Hasta bilgileri ve tümör TNM sınıflandırmalarına göre üç farklı tümör evresinde gruplanan hastaların toplamda 15 (%38,46)'i Evre 1, 12 (%30,76)'si Evre 2 ve diğer 12 (%30,76)'si de Evre 3 hastalardır. Hastaların geneline bakıldığında 36 hasta (%76,92), hastalık teşhisleri konulduğu güne kadar sigara içmekteyken, 9 (% 23,07) hasta ise hayatları boyunca

sigara içmediği bilinmektedir (Çizelge 2.1.). Kadın hastalar (n=3)'ün hiçbiri sigara kullanmazken, 36 erkek hastanın ise 30'unun (%83.3); minimum 5 paket/yıl, maksimum 120 paket/yıl ile ortalama 45,56 paket/yıl olarak sigara içtikleri bilinmektedir.

Çizelge 2.1. Tez çalışmasına konu olan hastaların klinik bilgileri

		KHDAK		Adenokarsinom		Squamo z Hücreli Karsinom	
		n	%	n	%	n	%
		39	100	18	46,15	21	53,84
Tümör Evre	Evre 1	15	38,46	6	33,33	9	42,85
	Evre 2	12	30,76	5	27,77	7	33,33
	Evre 3	12	30,76	7	38,88	5	23,8
Yaş		57,41±8,09		59,16±8,56		55,90±7,54	
Cinsiyet	Kadın	3	7,69	3	16,66	0	0
	Erkek	36	92,3	15	83,33	21	100
Sigara	İçen	30	76,92	14	77,77	16	76,19
	İçmeyen	9	23,07	4	22,22	5	23,8

2.3. Yöntem

2.3.1. Parafine Gömülü Dokulardan Gen Ekspresyonu

2.3.1.1. Dokuların Deparafinizasyonu

Her bir hastanın tümörlü ve normal parafin bloklarından steril 1,5 ml'lik eppendorf tüplere, 10 µm kalınlığında 8-10 adet kesit alındı. İçinde parafin kesitler bulunan tüplerin üzerine 1 ml ksilol konuldu ve oda sıcaklığında 10 dk. vorteksle tüpler çalkalandıktan sonra, 14000 g'de santrifüj edildi. Tüplerin üzerindeki ksilol uzaklaştırıldıktan sonra örneklerin üzerine, ikinci kez 800 µl ksilol konuldu ve oda sıcaklığında 2 dk. ara ara vorteksleme işlemi yapılarak bekletilen örneklerin üzerine

400 µl saf etanol konularak tekrar oda sıcaklığında 2 dk. vorteksleme yapılarak bekletildi. 2 dk'lık beklemenin ardından 14000 g'de santrifüjle tüplerin üzerindeki ksilol-alkol karışımı uzaklaştırıldı. Örneklerin üzerine 1ml saf etanol ilave edildi ve 2 dk oda ısısında ara ara vortekslenerek bekletilen örnekler, 14000g'de santrifüj edilerek üzerindeki alkol uzaklaştırıldı.

2.3.1.2. Deparafinize Edilmiş Dokulardan mRNA İzolasyonu

Deparafinize edilen dokulardan mRNA izolasyonu, prafine gömülü dokulardan RNA izolasyon kiti (Roche, High Pure RNA Paraffin Kit)'ne uygun olarak yapıldı. Buna göre, deparafinizasyon işleminin ardından tüplerdeki doku pelletlerine, 100 µl Tissue Lysis Buffer, 16 µl %10'luk SDS ve 40 µl Proteinaz K karışımı eklenerek 55 °C, 400 rpm'de ısı bloğunda bir gece inkübasyona bırakıldı. Bir gecenin ardından pelletler filtreli eppendorf tüplere aktarılarak üzerlerine 325 µl Binding Buffer ve 325 µl etanol karışımından konularak 8000 g santrifüjden sonra washing bufferler ile seri yıkamalar yapıldı. Ardından pelletler üzerine, içerisinde DNaz İnhibition Buffer bulunan DNaz Working Solution hazırlanarak 10'ar µl dokulara eklendi ve 37 °C'de 45 dk inkübasyona bırakıldı. Ardından her bir örnek için 20 µl Tissue Lysis Buffer, 18 µl %10'luk SDS ve 40 µl Proteinaz K olacak şekilde hazırlanan karışımlar içinde örnekler bulunan eppendorf tüplere eşit şekilde eklenerek 55°C, 400 rpm'de 1 sa ısı bloğunda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından filtreli eppendorf tüplere alınan örnekler Washin Bufferlar ile yıkandıktan sonra üzerlerine 50 µl Elution Buffer konularak mRNA izolasyonu tamamlandı [73].

2.3.1.3. İzole Edilen mRNA'ların Kantitasyonu

Dokulardan izole edilen mRNA'ların miktarları, içerisinde ribogreen floresans boyar madde bulunan ve doğrudan RNA'ya bağlanarak florometrede kantitasyonu sağlayan Quant-iT RNA Assay Kit (Invitrogen) prosedürüne uygun olarak ölçüldü. Kit içerisinde bulunan solüsyonlardan her örnek için 199 µl RNA Sample Buffer ve 1 µl reagent alınarak 200 µl çalışma solüsyonları hazırlandı. 190 µl çalışma solüsyonuna

10'ar µl standart 1 ve standart 2 solüsyonları ayrı ayrı 0,5 ml'lik PCR tüplerinde karıştırılarak 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve ardından Qubit 2.0 florometre cihazının kalibrasyonu yapıldı. Cihazın kalibrasyonunun ardından 190 µl çalışma solüsyonlarında 10'ar µl örnekler karıştırılarak cihazda mRNA kantitasyonu yapıldı [74].

2.3.1.4. cDNA Sentezi

İzole edilen mRNA'lardan cDNA Sentez kiti (Roche, Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit) prosedürüne uygun olarak cDNA sentezi yapıldı. Buna göre 9,8 µl mRNA örneği ve 2 µl random heksamer primer karışımı 10 dk 65 °C'de thermal cycler PCR cihazında koşturulmuş ardından bu örneklerin üzerine 4 µl Reverstrankriptaz reaksiyon Buffer, 0,5 µl RNaz inhibitör, 2 µl Deoksinükleotid karışımı, 1 µl DTT ve 1,1 µl reverstrankriptaz enzimi kullanılarak hazırlanan karışım ilave edilerek termal cycler PCR da 55°C de 30 dk. 85 °C'de 5 dk. ve son olarak 4 °C'de sonsuz şekilde koşturularak cDNA reverstranskripsiyonu işlemi sonlandırılmıştır [75].

2.3.1.5. Real Time PCR ile Gen ifadelerinin Rölatif Kantitasyon Analizi

Hastaların normal ve tümörlü dokularında gen ifadelerinin belirlenmesi amacıyla, Roche Diagnostic Real Time Ready Panel Single Assay CYP1A1 (Assay ID: 110757), CYP1B1 (Assay ID: 113037), CYP2E1 (Assay ID: 110824), GSTM1 (Assay ID: 113215), GSTP1 (Assay ID: 100457), GSTT1 (Assay ID: 113004) hedef genleri ile β-Actin referans geni (Assay ID: 101125) kullanıldı. Her bir hedef ve referans gen primer problemleri ile Light Cycler 480 Probes Master kiti kullanılarak her bir örnek için 1 µl primer-prob, 10 µl probe master miks ve 5 µl örneklerin cDNA'sı olacak şekilde hazırlanan karışım Light Cycler 480 multi well plate kuyucuklarına steril laminar flow kabin içerisinde aktarıldı. Multi well plate 4000 g'de 3 dk. santrifüj edildi. Dokularda hedef genlerin, gen ifadelerinin belirlenebilmesi amacıyla; 95 °C'de 10 dk. 1 döngü olacak şekilde denatürasyon işlemi; her döngüsü, 95 °C'de

10 sn, 60 °C’de 30 sn, 72 °C’de 1 sn olacak şekilde 45 döngülü çoğaltma işlemi ve son olarak da 40 °C’de 30 sn 1 döngülü olacak şekilde soğutma aşamalarından oluşan PCR koşullarında (Şekil 2.1.), Light Cycler 480 Real Time PCR cihazında, monocolor hidroliz probda, 465-510 kanalında rölatif kantitasyon analizi yapıldı.



Programs

Program Name	denaturasyon						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:10:00	4.40		0	0	0

Program Name	amplifikasyon						
Cycles	45	Analysis Mode	Quantification				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.40		0	0	0
60	None	00:00:30	2.20		0	0	0
72	Single	00:00:01	4.40		0	0	0

Program Name	cooling						
Cycles	1	Analysis Mode	None				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:30	2.20		0	0	0

Şekil 2.1. Real Time PCR koşulları

Çalışmada, kullanılan hedef genler β -Actin housekeeping genine karşı normalize edilerek, normal ve tümörlü dokuların gen ifadelerinin rölatif kantitasyon analizinde, her örneğin hedef gen Cp (Crossing points=geçiş noktaları) değeri ile referans gen Cp değeri arasında:

$$R = 2^{[Cp \text{ hedef gen} - Cp \text{ housekeeping gen}]}$$

$$R = 2^{\Delta CP}$$

$$R = 2^{-[\Delta Cp_{\text{tümör}} - \Delta Cp_{\text{normal}}]}$$

$$R = 2^{-\Delta \Delta Cp}$$

matematiksel formülü ile rölatif gen ifadeleri oranı (R), LC 480 Real Time PCR yazılım programında otomatik olarak hesaplandı [76].

2.3.2. Parafine Gömülü Dokulardan Protein Ekspresyonu

2.3.2.1. İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi

Hastaların normal ve tümörlü dokularından her bir izozim için 4-5 µm kalınlığında poly-L-lysin kaplı lamlara ince kesitler alındı. Dokular, deparafinizasyon için etüvde 70°C’de 1 saat, ısınmış ksilolde 10 dakika bekletildi. Etüvden çıkarılan preparatlar soğuması için oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi ve ardından alçalan alkol serilerinden 1 er dakika geçirildi. Distile suda 1-2 dakika bekletilen preparatlar endojen peroksidaz aktivitesinin inhibisyonu için 10 dakika H₂O₂ blokajında bekletildi. Çeşme suyunda 5 dakika yıkanan preparatlar PBS tampona batırılıp çıkarıldıktan sonra antijen retrieval solüsyonu içerisinde düdüklü tencerede 3 dakika kaynatıldı. Nonspesifik boyanmanın engellenmesi amacıyla protein blocking solüsyonunda 10 dakika bekletilen preparatlara 1 saat süreyle uygun dilüsyon oranlarında hazırlanan antikolar (GSTP 1/500; GSTM1 1/100; GSTT1 1/200; CYP1A1 1/50; CYP1B1 1/400; CYP2E1 1/300) uygulandı. Aralarda PBS tamponla 3 kere yıkanmak şartıyla örnekler sırasıyla, 10 dakika sekonder antikor ardından streptavidin-proksidaz kompleksi uygulandı. Tekrar 3 kere PBS tamponla yıkanan preparatlar 5 dakika DAB da tutulduktan sonra 1 dakika distile suda yıkandı. 2 dakika hemotoksilende bekletilen preparatlar yükselen alkol serilerinden 1’er dakika geçirilerek ksilolde 5 dakika bekletildi. Son olarak entellan ile preparatlar kapatıldı. İmmunohistokimyasal değerlendirmeler ışık mikroskobunda, dokuların boyanma derecelerine göre; (0): negatif boyanma (protein ifadesi yok), (+1): hafif şiddette protein ifadesi, (+2): orta şiddette protein ifadesi, (+3): şiddetli boyanma ifadesi şeklinde yapıldı [67].

2.3.3. İstatistiksel Analiz

Yapılan tez çalışmasında istatistiksel değerlendirmeler için MINITAB 14 istatistik yazılım programı kullanıldı. Tümörlü ve normal dokularda protein ifadeleri arasındaki farklılıklar Mann-Whitney U testi ile tümörlü dokuların protein ifadeleri ile hastaların yaş, cinsiyet, sigara içimi, tümör evre gibi klinik bilgileri arasındaki ilişkilerde Spearman's Rank Correlation testi ile %95'lik güvenilirlik düzeyinde incelendi. Sonuçlar $p < 0,05$ için anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Dokulardan İzole Edilen mRNA Miktarları

Çalışmaya dâhil edilen hastaların tümörlü ve normal dokularından izole edilen mRNA'ların miktarları Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Buna göre 1 hastanın tümörlü ve normal dokularında ve 5 hastanın da normal dokularında izole edilen mRNA miktarları florometrenin ölçüm sınırı olan 20 ng miktarının altında olduğu belirlenmiştir. Tümörlü dokularda en yüksek 11 µg/ml ve en düşük 0,856 µg/ml mRNA miktarı hesaplanırken, hastaların normal dokularında ise en yüksek 4,84 µg/ml ve en düşük 0,41 µg/ml mRNA miktarları hesaplandı.

Çizelge 3.1. mRNA miktarları

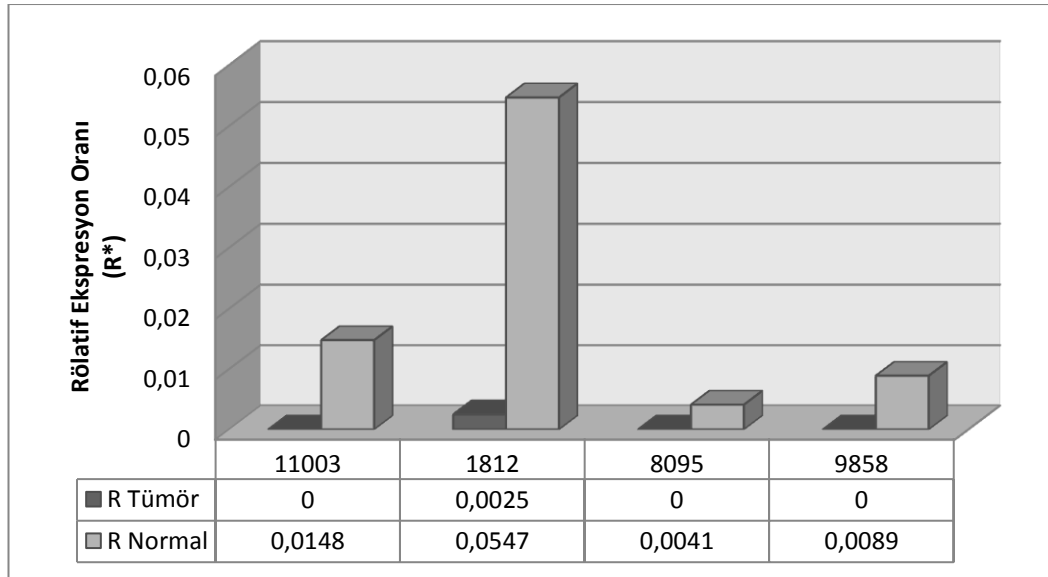
Hasta No	Tümör (µg/ml)	Normal (µg/ml)	Hasta No	Tümör (µg/ml)	Normal (µg/ml)
10023/10	1,53	1,21	13336/11	1,41	<20 ng
10485/11	<20 ng*	<20 ng	13754/11	2,83	0,41
10584/11	1,65	2,28	13957/11	1,31	<20 ng
10565/10591	1,31	<20 ng	14462/11	2,55	0,78
10963/11	4,61	0,634	14464/11	2,96	0,86
11000/11	0,934	0,808	1812/12	1,42	1,28
11003/10	2,38	0,53	2130/10	1,38	2,49
11015/11	1,12	0,618	528/10	4,01	0,935
11372/11	3,06	1,66	5283/10	2,4	0,932
11374/11	1,28	2,14	6992/10	1,81	0,917
11509/09	1,17	0,743	7901/09	2,92	0,545
11549/11	3,54	<20 ng	8095/09	0,871	4,74
11908/09	1,54	1,89	8109/09	2,67	1,83
12110/11	1,37	<20 ng	8339/09	6,32	0,621
12152/11	11	1,57	8515/09	4,5	1,32
12343/11	10	1,36	8888/09	3,11	1,46
12763/11	1,19	1,98	8889/09	1,82	1,88
12783/11	2,5	0,5	9765/10	1,42	0,43
12784/11	1,54	1,67	9858/10	0,856	0,579
13172/09	1,5	1,25			

*:Qu-bit florometre cihazının ölçülebilir minimum sınırının altında

3.2. CYP ve GST Enzimlerinin Gen İfadelerinin Sonuçları

3.2.1. CYP Enzimlerinin Gen İfadeleri ve Klinik Hasta Bilgileri ile Karşılaştırılması

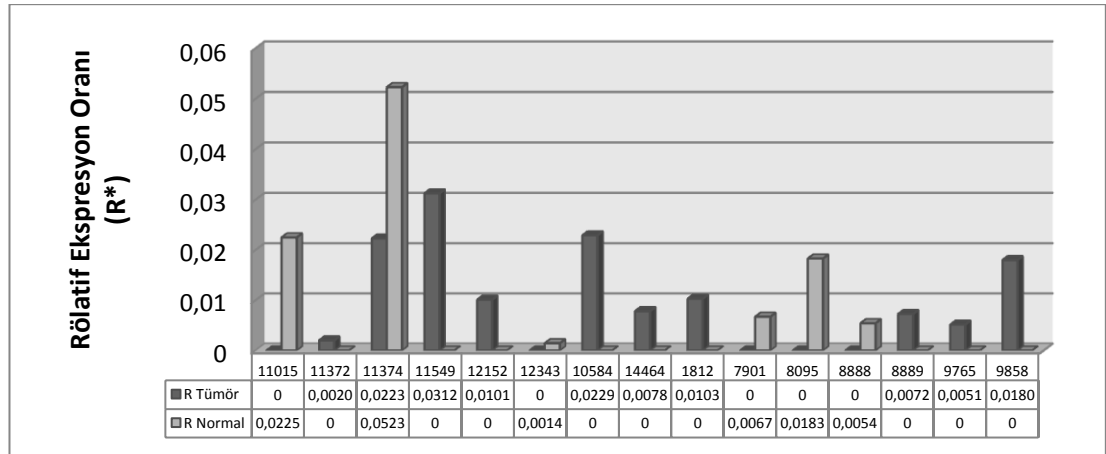
Hastaların CYP1A1 mRNA düzeylerine bakıldığında; 39 hastadan 2'si akciğer adenokarsinomlu, 2'si de squamoz hücreli karsinomlu hasta olmak üzere toplamda 4 hastada (%10,3) CYP1A1 izoziminin gen ifadesine rastlanmıştır. Bu hastaların 1'inin hem tümör hem de normal dokularında CYP1A1 izoziminin rölatif gen ifadesinin oranı hesaplanabilirken diğer 3 hastanın sadece normal dokularında bu oran hesaplanabilmiştir. Hem tümörlü hem de normal dokusunda gen ifadesi görülen hastanın rölatif gen ifadesinin oranı hesaplandığında ve diğer üç hastada da normal dokularında gen ifadeleri görülmesiyle; CYP1A1 izoziminin mRNA'sının toplamda 4 hastanın normal dokularında tümörlü dokularına oranla daha fazla ifade edildiği görülmüştür. (Şekil 3.1.) (Çizelge 3.2.). 35 hastanın tümörlü ve normal dokularında bu izozimin gen ifadelerinin rölatif kantitasyon oranları hesaplanamamıştır.



*R: Roche Light Cycler 480 Software programında relative quantification metoduna göre hesaplanmış rölatif gen ifadelerinin oranıdır.

Şekil 3.1. CYP1A1 izoziminin gen ifadesinin görüldüğü hastalarda rölatif gen ifadelerinin oranı

CYP1B1 izoziminin mRNA düzeyleri incelendiğinde 39 hastanın 4'ü Akciğer adenokarsinomlu, 11'i squamoz hücreli karsinomlu olmak üzere toplamda 15'inde (%38,46) bu izozimin gen ifadesine rastlanmıştır. Buna göre genel olarak bakıldığında 9 hastanın tümörlü dokularında, 5 hastanın da normal dokularında bu izozimin gen ifadesi görülürken; squamoz hücreli karsinomlu 1 hastanın da hem tümörlü hem de normal dokusunda CYP1B1 izoziminin gen ifadesinin rölatif kantitasyon oranı hesaplanabilmiştir. Bu hastada yapılan hesaplama göre normal dokusunda tümörlü dokusuna oranla CYP1B1 izoziminin gen ifadesi 1,02 kat daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 3.2.). Buna göre toplamda 9 hastanın tümörlü ve 6 hastanın normal dokularında CYP1B1 izoziminin rölatif kantitasyon miktarlarının fazla olduğu hesaplanırken (Çizelge 3.2.) 24 hastanın normal ve tümörlü dokularında bu izozimin gen ifadesine rastlanmamıştır.

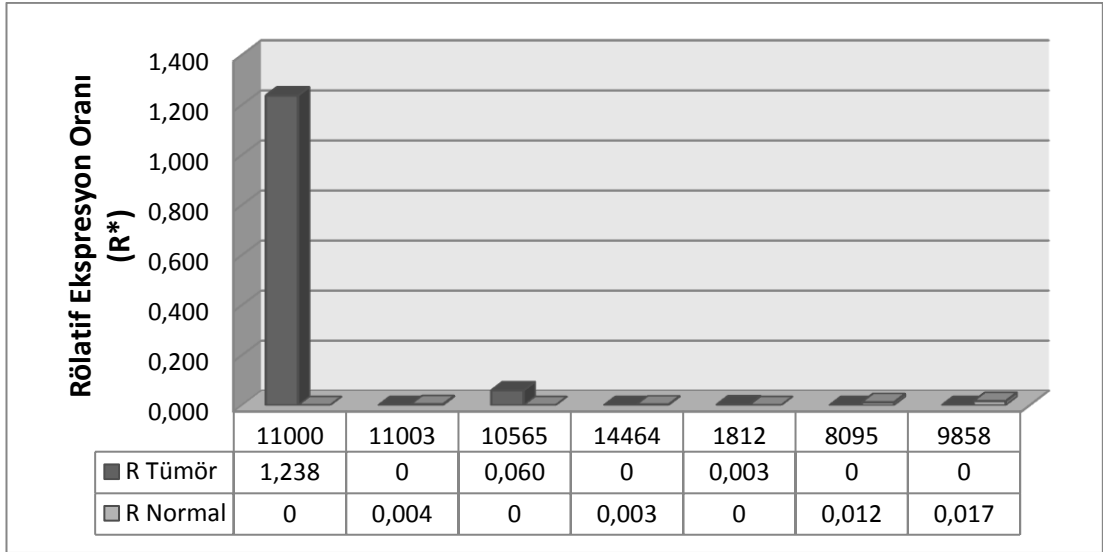


*R: Roche Light Cycler 480 Software programında relative quantification metoduna göre hesaplanmış rölatif gen ifadelerinin oranıdır.

Şekil 3.2. CYP1B1 izoziminin gen ifadesinin görüldüğü hastalarda rölatif gen ifadelerinin oranı

CYP2E1 izoziminin mRNA düzeyi incelendiğinde toplamda 7 (%17,9) hastanın dokularında bu izozimin gen ifadelerinin oranları hesaplanabilmiş, 32 hastanın tümörlü ve normal dokularında gen ifadelerinin oranları belirlenememiştir. Hastaların hiç birinde hem tümörlü ve hem de normal dokularında CYP2E1

izoziminin gen ifadelerine rastlanılmamıştır. Buna göre 2' akciğer adenokarsinomlu, 1'i squamoz hücreli karsinomlu hastalardan olmak üzere toplamda 3 (%7,69) hastanın tümörlü dokusunda; 2'si akciğer adenokarsinomlu, 2'si squamoz hücreli karsinomlu hastalardan olmak üzere toplamda 4 hastanın da (%10,25) normal dokularında bu izozimin gen ifadesinin rölatif kantitasyon oranlarının fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.3.) (Çizelge 3.2.).



*R: Roche Light Cyler 480 Software programında relative quantification metoduna göre hesaplanmış rölatif gen ifadelerinin oranıdır.

Şekil 3.3. CYP2E1 izoziminin gen ifadesinin görüldüğü hastalarda rölatif gen ifadesinin oranı

Çizelge 3.2. CYP izozimlerinin gen ifadelerinin görüldüğü hasta sayıları

	CYP1A1	CYP1B1	CYP2E1
n*	4	15	7
%**	10,25	38,46	17,9
T	0	9	3
%	0	23,07	7,69
N	4	6	4
%	10,25	15,4	10,25

*: Toplam hasta sayısına göre gen ifadesi gözlenen hasta sayıları

** : Yüzdeler sütunlara göre verilmiştir

T:Tümörlü dokular

N: Normal dokular

Tümör evrelerine göre Faz I izozimlerinin mRNA'larının gen ifadeleri görülen hasta sayılarına bakıldığında; CYP1A1 izoziminin mRNA'sının; Evre 1 hastalardan (n=15), 2'sinde (%13,33); Evre 2 ve 3 hastalardan (n=12), birer tanesinde (%8,33) ifade olduğu görüldü. CYP1B1 izoziminin mRNA'sının; Evre 1 hastaların 8'inde (%53,33), Evre 2 hastaların 2'sinde (%8,33) ve Evre 3 hastaların 6'sında (%50) ifade olduğu görülmüştür. Evre 1 ve 2 grubunda CYP2E1 izoziminin mRNA'sı 2'şer hastada (%13,33) (%16,67) eksprese olurken, Evre 3 hastaların 3'ünde (%25) bu izozimin mRNA'sının ifade olduğu görülmüştür. (Çizelge 3.3.)

Çizelge 3.3. Tümör evrelerine göre CYP izozimlerinin mRNA'larının ifade olduğu hasta sayıları

Tümör Evre	CYP1A1		CYP1B1		CYP2E1	
	n	%*	n	%	n	%
Evre 1	2	13,33	8	53,3	2	13,33
Evre 2	1	8,333	1	8,33	2	16,67
Evre 3	1	8,333	6	50	3	25

n: Gen ifadesi gözlenen hasta sayıları

*: Yüzdeler satırlara göre verilmiştir.

Sigara içim durumlarına göre bakıldığında CYP1A1 izoziminin mRNA'sı, sigara içen 30 KHDAK'lı hastanın 3'ünde (%10), sigara içmeyen 9 hastanın da birinde (%11,11) ifade olmuştur. CYP1B1 izoziminin mRNA'sı; sigara içen 12 hastada (%40) ve sigara içmeyen 3 (%33,33) hastada ifade olurken; CYP2E1 izoziminin mRNA'sı diğer iki izozimde olduğu gibi sigara içen hastaların 6'sında (%20) ve sigara içmeyen hastaların 1'inde (%11,11) ifade olmuştur (Çizelge 3.4.).

Çizelge 3.4. Sigara içim durumuna göre CYP izozimlerinin mRNA'larının ifade olduğu hasta sayıları

	N	CYP1A1		CYP1B1		CYP2E1	
		n	%*	n	%	n	%
KHDAK							
Sigara İçen	30	3	10	12	40	6	20
Sigara İçmeyen	9	1	11,11	3	33,33	1	11,11

N: Gen ifadesi gözlenen hasta sayıları

*Yüzdeler satırlara göre verilmiştir.

Yaş gruplarına göre Faz I izozimlerinin mRNA'larının rölatif kantitasyon oranlarının hesaplanabildiği hasta sayıları incelendiğinde; 57 yaş altı 19 hastada, CYP1A1 izoziminin mRNA'sının 1 kişi (%5,26)'de, CYP1B1 izoziminin mRNA'sının 6 kişi (%31,58)'de ve CYP2E1 izoziminin mRNA'sının ise 4 kişi (%21,05)'de ifade olduğu görüldü. 57 yaş üstü 20 hastada; CYP1A1 izoziminin mRNA'sının 3 kişi (%15) de, CYP1B1 izoziminin mRNA'sının 9 kişi (%45)'de ve CYP2E1 izoziminin mRNA'sının ise 3 kişi (%15)'de ifade olduğu görüldü (Çizelge 3.5.).

Çizelge 3.5. Yaş gruplarına göre CYP izozimlerinin mRNA'larının ifade olduğu hasta sayıları

	N	Yaş	CYP1A1		CYP1B1		CYP2E1	
			n	%*	n	%	n	%
KHDAK	19	<57	1	5,26	6	31,58	4	21,05
	20	>57	3	15	9	45	3	15

N: Gen ifadesi gözlenen hasta sayıları

*Yüzdeler satırlara göre verilmiştir.

Cinsiyete göre hastalar gruplandırıldığında CYP1A1 ve CYP2E1 izoziminin 1'er kadın hastada (%33,33) mRNA'larının rölatif kantitasyon oranlarının hesaplandığı görülürken, kadınlarda CYP1B1 izoziminin mRNA'sını ifade olduğu hastaya rastlanmadı. Erkeklerde CYP1A1 izoziminin mRNA'sı 3 hastada (%8,33), CYP1B1 izoziminin mRNA'sı 15 hastada (%41,67), ve CYP2E1 izoziminin mRNA'sının 6 hastada (%16,67) rölatif kantitasyon oranlarının hesaplanabildiği görüldü (Çizelge 3.6).

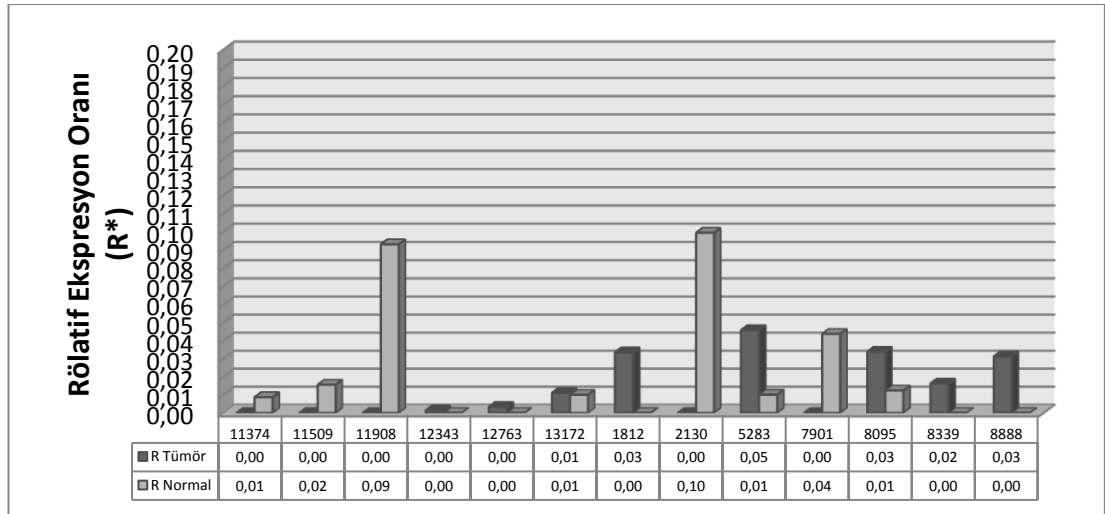
Çizelge 3.6. Cinsiyete göre CYP izozimlerinin mRNA'larının ifade olduğu hasta sayıları

		CYP1A1		CYP1B1		CYP2E1	
		n	%*	n	%	n	%
KHDAK	KADIN	1	33,3	0	0	1	33,33
	ERKEK	3	8,33	15	41,67	6	16,67

*Yüzdeler satırlara göre verilmiştir.

3.2.2. GST Enzimlerinin Gen İfadeleri ve Klinik Hasta Bilgileri ile Karşılaştırılması

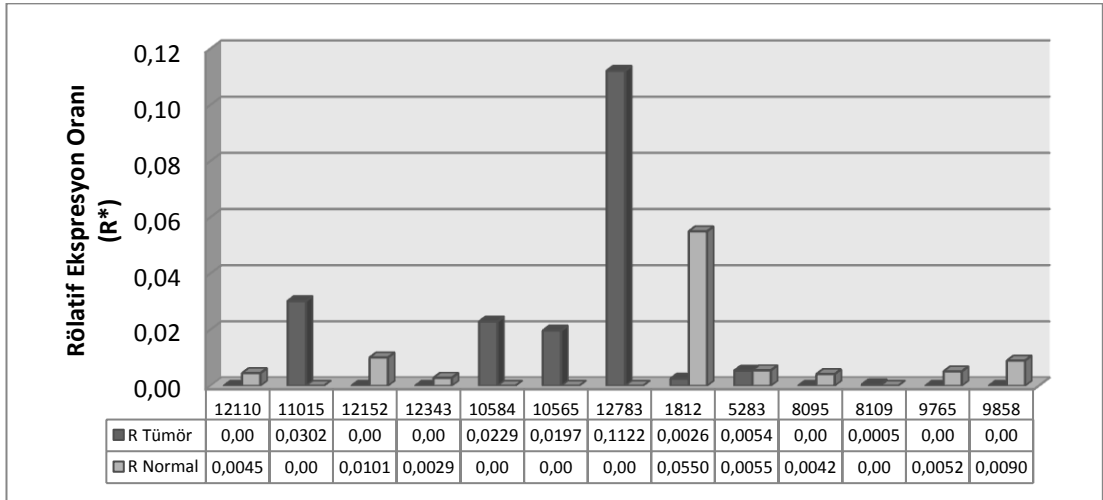
Hastaların GSTP1 mRNA düzeylerine bakıldığında; 39 hastadan 13 (%33,33)'inde bu izozimin mRNA'sı görülmüştür. Genel olarak incelendiğinde 3 hastanın tümörlü ve normal dokularının her ikisinde de GSTP1 izoziminin rölatif kantitasyon oranları hesaplanmıştır. Relatif kantitasyon oran hesabına göre bu hastaların üçünün de tümörlü dokularında GSTP1 izoziminin mRNA düzeyi normal dokularına oranla daha fazla olduğu görülmüştür. Bunun yanında 5 hastanın sadece tümörlü dokularında ve 5 hastanın da sadece normal dokularında GSTP1 izoziminin mRNA düzeylerinin rölatif kantitasyonu hesaplanabilmiştir. Hesaplamalara göre sonuçlar toplandığında genel olarak, 8 hastanın tümörlü dokularında, normal dokularına oranla ve 5 hastanın normal dokularında, tümörlü dokularına oranla GSTP1 izoziminin rölatif kantitasyon oranları yüksek bulunmuştur. 26 hastanın tümörlü ve normal dokularında bu izozimin gen ifadeleri hesaplanamamıştır (Şekil 3.4.) (Çizelge 3.7).



*R: Roche Light Cycler 480 Software programında relative quantification metoduna göre hesaplanmış rölatif gen ifadelerinin oranıdır.

Şekil 3.4. GSTP1 izoziminin gen ifadesinin görüldüğü hastalarda rölatif gen ifadesi oranı

GSTM1 izoziminin mRNA düzeyleri incelendiğinde 39 hastanın, 13'ünde (33,33) bu izozimin mRNA'sının ifade edildiği görülmüştür. Genel olarak incelendiğinde 2 hastanın tümörlü ve normal dokularının her ikisinde de GSTM1 izoziminin rölatif kantitasyon oranları hesaplanmıştır. Relatif kantitasyon oran hesabına göre bu hastaların ikisinde de normal dokularında GSTM1 izoziminin mRNA düzeyi tümörlü dokularına oranla daha fazla olduğu görülmüştür. Bununla birlikte 5 hastanın sadece tümörlü dokularında ve 6 hastanın da sadece normal dokularında GSTM1 izoziminin mRNA düzeylerinin rölatif kantitasyonu hesaplanabilmiştir. Hesaplamalara göre sonuçlar toplandığında genel olarak, 5 hastanın tümörlü dokularında, normal dokularına oranla ve 8 hastanın normal dokularında, tümörlü dokularına oranla GSTM1 izoziminin rölatif kantitasyon oranları yüksek bulunmuştur. 26 hastanın tümörlü ve normal dokularında bu izozimin gen ifadeleri hesaplanamamıştır (Şekil 3.5.) (Çizelge 3.7).

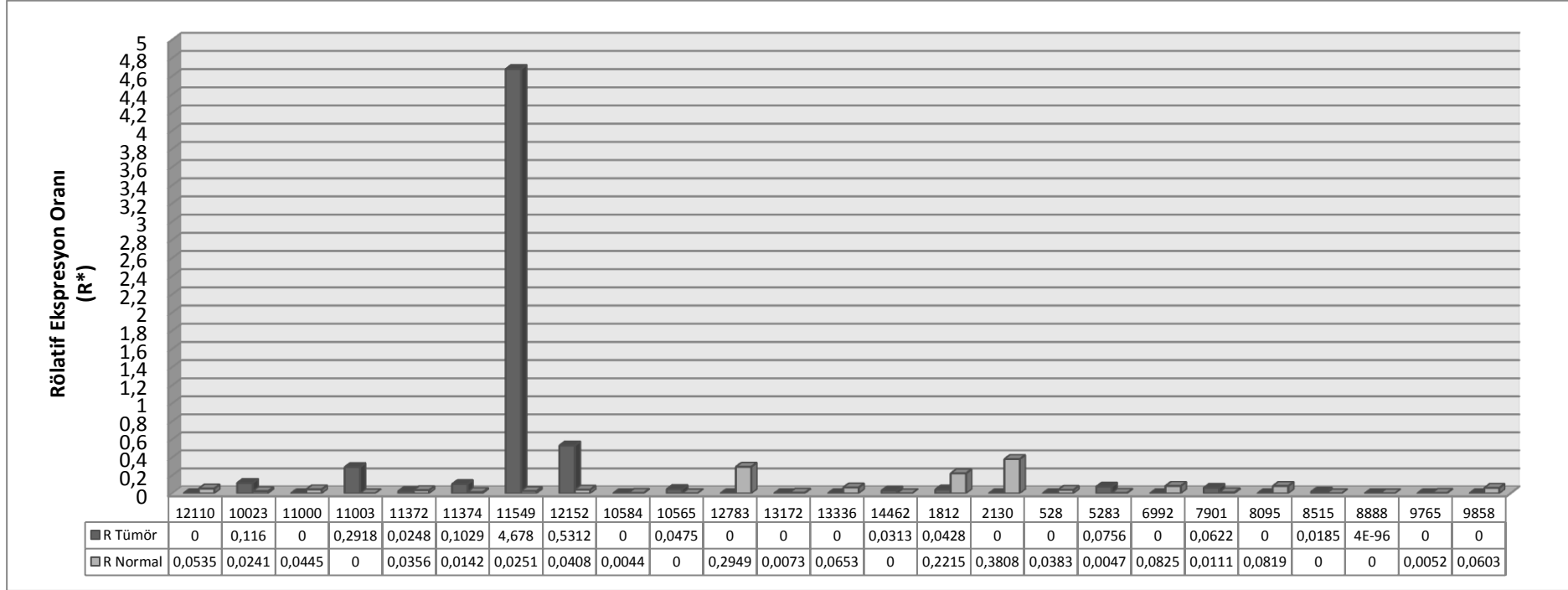


*R: Roche Light Cycler 480 Software programında relative quantification metoduna göre hesaplanmış rölatif gen ifadelerinin oranıdır.

Şekil 3.5. GSTM1 izoziminin gen ifadesinin görüldüğü hastalarda rölatif gen ifadesi oranı

GSTM1 izoziminin mRNA düzeyi incelendiğinde, toplamda 25 (%64,1) hastanın dokularında bu izozimin gen ifadelerinin rölatif kantitasyon oranları hesaplanabilmiş, 14 hastanın tümörlü ve normal dokularında rölatif kantitasyon oranı düzeyi

belirlenememiştir. Genel olarak incelendiğinde 9 hastanın tümörlü ve normal dokularının her ikisinde de GSTT1 izoziminin rölatif kantitasyon oranları hesaplanmıştır. Rölatif kantitasyon oran hesaplamalarına göre bu hastaların 6'sının tümörlü dokularında normal dokularına oranla; ve 3'ünde de normal dokularında tümörlü dokularına oranla GSTT1 izoziminin rölatif kantitasyon oranı yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte 4 hastanın tümörlü dokularında ve 12 hastanın da normal dokularında bu izozimin mRNA'larının ifade edildiği görülmüştür. Buna göre toplamda gen ifadelerinin rölatif kantitasyon oranları hesaplanan 25 hastanın toplamda 10'unda tümörlü dokularında normal dokularına oranla GSTT1 izoziminin rölatif kantitasyon oranı fazla iken 15 hastanın da normal dokularında, tümörlü dokularına oranla bu izozimin rölatif kantitasyon oranı fazla olduğu görülmüştür (Şekil 3.6.) (Çizelge 3.7.).



*R: Roche Light Cycler 480 Software programında relative quantification metoduna göre hesaplanmış rölatif gen ifadelerinin oranıdır.

Şekil 3.6. GSTT1 izoziminin gen ifadesinin görüldüğü hastalarda rölatif gen ifadesinin oranı

Çizelge 3.7. GST izozimlerinin gen ifadelerinin görüldüğü hasta sayıları

	GSTP1	GSTM1	GSTT1
n*	13	13	25
%**	33,3	33,3	64,1
T	8	5	10
%	20,51	12,82	25,64
N	5	8	15
%	12,82	20,51	38,46

*: Toplam hasta sayısına göre gen ifadesi gözlenen hasta sayıları

** : Yüzdeler sütunlara göre verilmiştir

T:Tümörlü dokular

N: Normal dokular

Tümör evrelerine göre II. Faz izozimlerinin mRNA'larının ifadeleri görülen hasta sayılarına bakıldığında; GSTP1 izoziminin mRNA'sının; Evre 1 hastalardan (n=15), 6'sında (%40); Evre 2 (n=12) hastalardan 4 (%33,33)'ünde ve Evre 3 hastalardan (n=12), 3 (%25)'ünde ifade olduğu görüldü. GSTM1 izoziminin mRNA'sının; Evre 1 hastaların 7'sinde (%46,7), Evre 2 hastaların 2'sinde (%16,66) ve Evre 3 hastaların 4'ünde (%33,3) ifade olduğu görüldü. Evre 1 hastalardan 10'unda (%66,67), Evre 2 hastalardan 6'sında (%50) ve Evre 3 hastalardan 9'unda (%75) GSTT1 izoziminin mRNA'nın ifade olduğu görüldü (Çizelge 3.8.)

Çizelge 3.8. Tümör evrelerine göre GST izozimlerinin mRNA'larının ifade olduğu hasta sayıları

Tümör Evre	GSTP1		GSTM1		GSTT1	
	n	%	n	%	n	%
Evre 1	6	40	7	46,7	10	66,67
Evre 2	4	33,33	2	16,6	6	50
Evre 3	3	25	4	33,3	9	75

n: Gen ifadesi gözlenen hasta sayıları

*: Yüzdeler satırlara göre verilmiştir.

Sigara içim durumlarına göre bakıldığında GSTP1 izoziminin mRNA'sı, sigara içen 30 KHDAK'lı hastanın 10'unda (%33,33), sigara içmeyen 9 hastanın da 3'ünde (%33,33) ifade olmuştur. GSTM1 izoziminin mRNA'sı; sigara içen 9 hastada (%30) ve sigara içmeyen 4 (%44,44) hastada ifade olurken; GSTT1 izoziminin mRNA'sı sigara içen hastaların 20'sinde (%66,67) ve sigara içmeyen hastaların 5'inde (%55,56) ifade olmuştur (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. Sigara içim durumuna göre GST izozimlerinin mRNA'larının ifade olduğu hasta sayıları

		N	GSTP1		GSTM1		GSTT1	
			n	%*	n	%	n	%
KHDAK	Sigara İçen	30	10	33,33	9	30	20	66,67
	Sigara İçmeyen	9	3	33,33	4	44,44	5	55,56

N: Gen ifadesi gözlenen hasta sayıları

*Yüzdeler satırlara göre verilmiştir.

Yaş gruplarına göre II. Faz izozimlerinin mRNA'larının ifade olduğu hasta sayıları incelendiğinde; 57 yaş altı 19 hastada, GSTP1 izoziminin mRNA'sının 6 kişi (%31,6)'de, GSTM1 izoziminin mRNA'sının 5 kişi (%26,32)'de ve GSTT1 izoziminin mRNA'sının ise 12 kişi (%63,16)'de ifade olduğu görüldü. 57 yaş üstü 20 hastada; GSTP1 izoziminin mRNA'sının 7 kişi (%35) de, GSTM1 izoziminin mRNA'sının 8 kişi (%40)'de ve GSTT1 izoziminin mRNA'sının ise 13 kişi (%65)'de ifade olduğu görüldü (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10. Yaş gruplarına göre GST izozimlerinin mRNA'larının ifade olduğu hasta sayıları

	N	GSTP1		GSTM1		GSTT1	
		n	%*	n	%	n	%
	19	<57	6 31,6	5 26,32	12 63,16		
KHDAK	20	>57	7 35	8 40	13 65		

N: Gen ifadesi gözlenen hasta sayıları

*Yüzdeler satırlara göre verilmiştir.

Cinsiyete göre hastalar gruplandırıldığında GSTP1 izoziminin mRNA'sının kadınlarda ifade olmadığı görülürken; kadın hastaların 1'inde (%33,33) GSTM1 izoziminin mRNA'sı, 2'sinde de (%66,67) GSTT1 izoziminin mRNA'sının ifade olduğu görüldü. Erkeklerde GSTP1 izoziminin mRNA'sı 13 hastada (%36,1), GSTM1 izoziminin mRNA'sı 12 hastada (%33,33), ve GSTT1 izoziminin mRNA'sının 23 hastada (%63,89) ifade edildiği görüldü (Çizelge 3.11).

Çizelge 3.11. Cinsiyete göre GST izozimlerinin mRNA'larının ifade olduğu hasta sayıları

	GSTP1		GSTM1		GSTT1	
	n	%*	n	%	n	%
KADIN	0	0	1 33,33	2 66,67		
KHDAK						
ERKEK	13	36,1	12 33,33	23 63,89		

*Yüzdeler satırlara göre verilmiştir.

3.3. CYP ve GST Enzimlerinin Protein İfadelerinin Sonuçları

3.3.1. CYP Enzimlerinin Protein İfadeleri ve Klinik Hasta Bilgileri ile Karşılaştırılması

Genel olarak I. Faz izozimlerinin protein ifadelerinin görüldüğü hastalar incelendiğinde; CYP1A1 izoziminin 39 KHDAK'lı hastadan 38 (%97,4)'inde (Şekil 3.7.), CYP1B1 izoziminin 39 hastanın tamamında (%100) (Şekil 3.8.); CYP2E1 izoziminin 39 hastanın 25 (%64,1)'inde (Şekil 3.9.) tümörlü ve normal dokularının birinde ya da her ikisinde protein ifadelerinin olduğu görüldü.

Tümörlü ve normal dokular eşleştirilerek I. Faz izozimlerinin protein ifadelerine bakıldığında 39 KHDAK'lı hastadan; CYP1A1 izoziminin 15 hastada (%38,5), CYP1B1 izoziminin 3 hastada (%7,7) ve CYP2E1 izoziminin 21 hastada (%53,8) tümörlü dokularında normal dokularına oranla daha fazla ifade olduğu görüldü. Dokular adenokarsinom ve squamoz hücreli karsinom olarak tümör tiplerine göre gruplandırıldığında, 18 adenokarsinomlu hastadan 10'unda (%55,6) CYP1A1, 1'inde (%5,6) CYP1B1 ve 7'sinde (%38,9) CYP2E1 izozimlerinin protein ifadelerinin tümörlü dokularda normal dokulara oranla fazla olduğu görüldü. Squamoz hücreli karsinomlu 21 hastaya bakıldığında; 5 hastada (%23,8) CYP1A1, 2 hastada (%9,5) CYP1B1 ve 14 hastada da (%66,7) CYP2E1 izozimlerinin protein ifadelerinin tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü (Çizelge 3.12.).

Çizelge 3.12. KHDAK’da tümörlü ve normal dokular eşleştirildiğinde CYP izozimlerinin protein ifadelerinin yüksek olduğu tümörlü dokuların sayıları ve yüzde oranları

	CYP1A1			CYP1B1		CYP2E1	
	Total (n)	Tümör (n)	%*	Tümör (n)	%	Tümör (n)	%
KHDAK	39	15	38,5	3	7,7	21	53,8
Total							
Adenokarsinom	18	10	55,6	1	5,6	7	38,9
Squamoz Hücreli Karsinom	21	5	23,8	2	9,5	14	66,7

Boyanma skorları, pozitif boyanmış neoplastik (tümör dokusu) ve non-neoplastik (kontrol; akciğer bronş ve alveol epitel dokuları) 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 derecelendirildi.

*: Yüzdeler satırlara göre verilmiştir.

İmmunohistokimyasal skorlamalarının ortalamalarına göre KHDAK’lı hastalarda tümörlü ve normal dokular arasındaki protein ifadelerinin farklılıkları incelendiğinde; CYP1A1 ve CYP2E1 izozimlerinin protein ifadelerinin tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu; CYP1B1 izoziminin ise protein ifadesinin normal dokularda tümörlü dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. Yapılan istatistiksel analizde tümörlü dokularda normal dokulara oranla CYP2E1 izoziminin protein ifadesinin fazla olması istatistiksel analizde anlamlı bulunurken ($p=0,0001<0,05$); CYP1A1 ve CYP1B1 izozimlerinin protein ifadelerinin farklılıkları istatistiksel olarak doğrulanamadı ($p>0,05$) (Çizelge 3.13.)

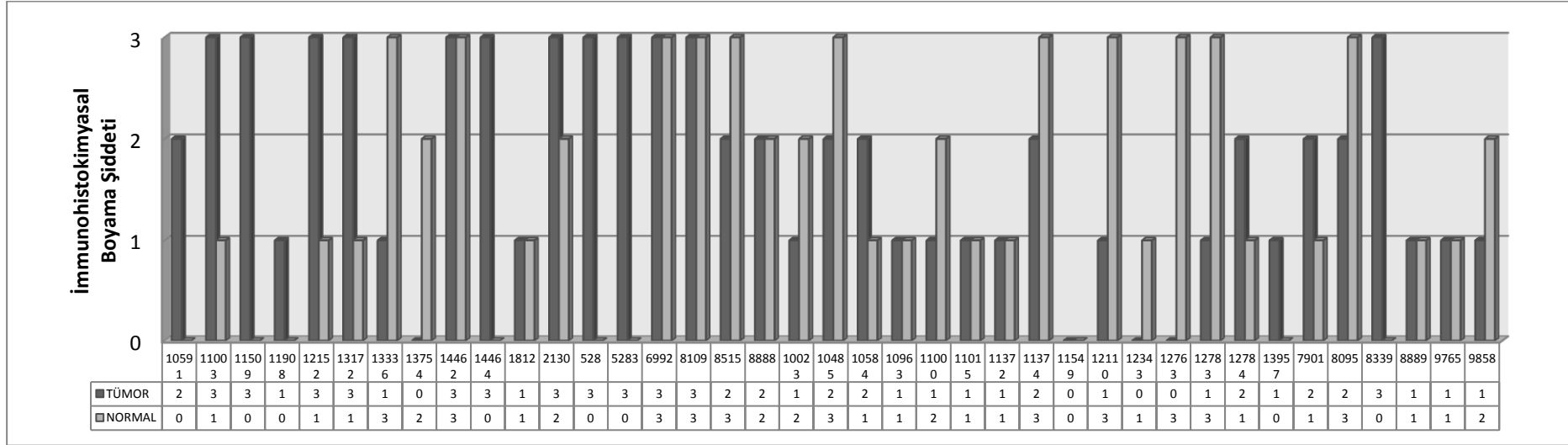
Tümör alt tiplerine göre, adenokarsinomlu hastalara ($n=18$) bakıldığında; CYP1A1 ve CYP1B1 izozimlerinin 18 hastanın tamamında (%100); CYP2E1 izoziminin ise 18 hastadan 8’inde (%44,4) tümörlü ve normal dokularının birinde yada her ikisinde protein ifadelerinin olduğu görüldü.

Adenokarsinomlu hastaların immunohistokimyasal skorlamalarının ortalamalarına bakıldığında; CYP1A1 ($p=0,02$) (Şekil 3.10) ve CYP2E1 ($p=0,04$) (Şekil 3.11.) izozimlerinin protein ifadelerinin tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu görülürken, CYP1B1 izoziminin protein ifadesinin normal dokularda

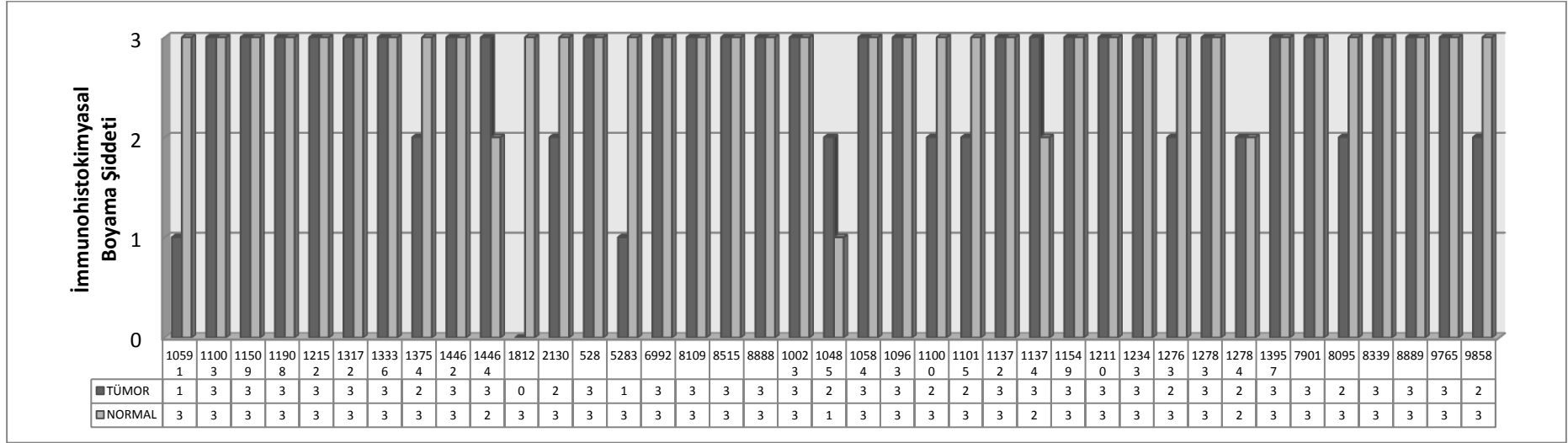
tümörlü dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. Ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p>0,05$) (Çizelge 3.13.).

Squamoza hücreli karsinomlu ($n=21$) hastalara genel olarak bakıldığında, CYP1A1 izoziminin 21 hastadan 20 (%95,2)'sinde, CYP1B1 izoziminin 21 hastanın tamamında (%100) (Şekil 3.12.); CYP2E1 izoziminin 21 hastanın 17 (%81)'sinde tümörlü ve normal dokularının birinde yada her ikisinde protein ifadelerinin olduğu görüldü.

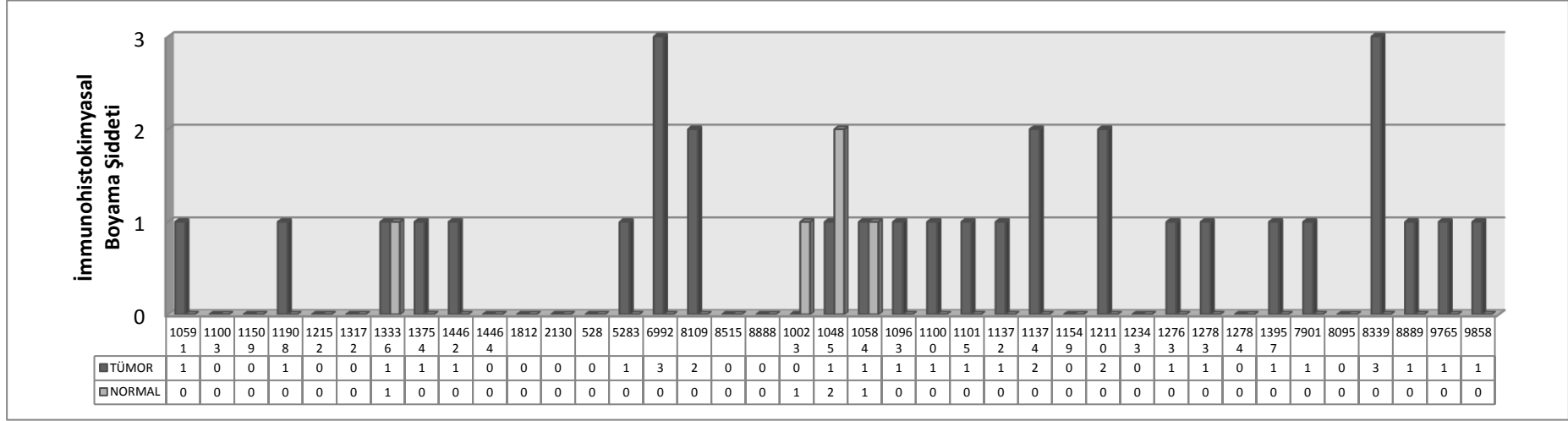
Squamoza hücreli karsinomlu hastaların immunohistokimyasal skorlamalarına bakıldığında, normal dokularda CYP1A1 ve CYP1B1 izozimlerinin protein ifadeleri tümörlü dokulara oranla daha fazla iken; CYP2E1 izoziminin protein ifadesi ise tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. İstatistiksel olarak CYP2E1 izoziminin tümördeki protein ifadesinin artışı anlamlı bulunurken ($p=0,0008$); CYP1A1 ve CYP1B1 izozimlerinin normal dokulardaki protein ifadesinin artışı istatistiksel olarak doğrulanamadı ($p>0,05$) (Çizelge 3.13.).



Şekil 3.7. KHDAK'lı hastaların tümürlü ve normal dokularında CYP1A1 izoziminin protein ifadesi



Şekil 3.8. KHDAK'lı hastaların tümürlü ve normal dokularında CYP1B1 izoziminin protein ifadesi



Şekil 3.9. KHDAK'lı hastaların tümürlü ve normal dokularında CYP2E1 izoziminin protein ifadesi

Çizelge 3.13. KHDAK hastaların tümörlü ve normal dokularında CYP izozimlerinin protein ifadeleri

	n	CYP1A1			CYP1B1			CYP2E1		
		Tümör	Normal	T/N* P** değeri	Tümör	Normal	T/N P değeri	Tümör	Normal	T/N P değeri
KHDAK Total	39	1,74±0,16 ^a (0-3) ^b	1,49±0,18 (0-3)	1,16 0,3128	2,59±0,12 (0-3)	2,87±0,07 (1-3)	0,9 0,1190	0,80±0,13 (0-3)	0,13±0,07 (0-2)	6,15 0,0001
Adenokarsinom	18	2,33±0,23 (0-3)	1,39±0,29 (0-3)	1,67 0,0279	2,5±0,22 (0-3)	2,94±0,06 (2-3)	0,9 0,2417	0,61±0,2 (0-3)	0,06±0,06 (0-1)	10,16 0,0445
Squamos Hücreli Karsinom	21	1,24±0,17 (0-3)	1,57±0,24 (0-3)	0,79 0,3924	2,67±0,11 (2-3)	2,81±0,11 (1-3)	0,95 0,3391	0,96±0,74 (0-3)	0,19±0,11 (0-2)	5,05 0,0008

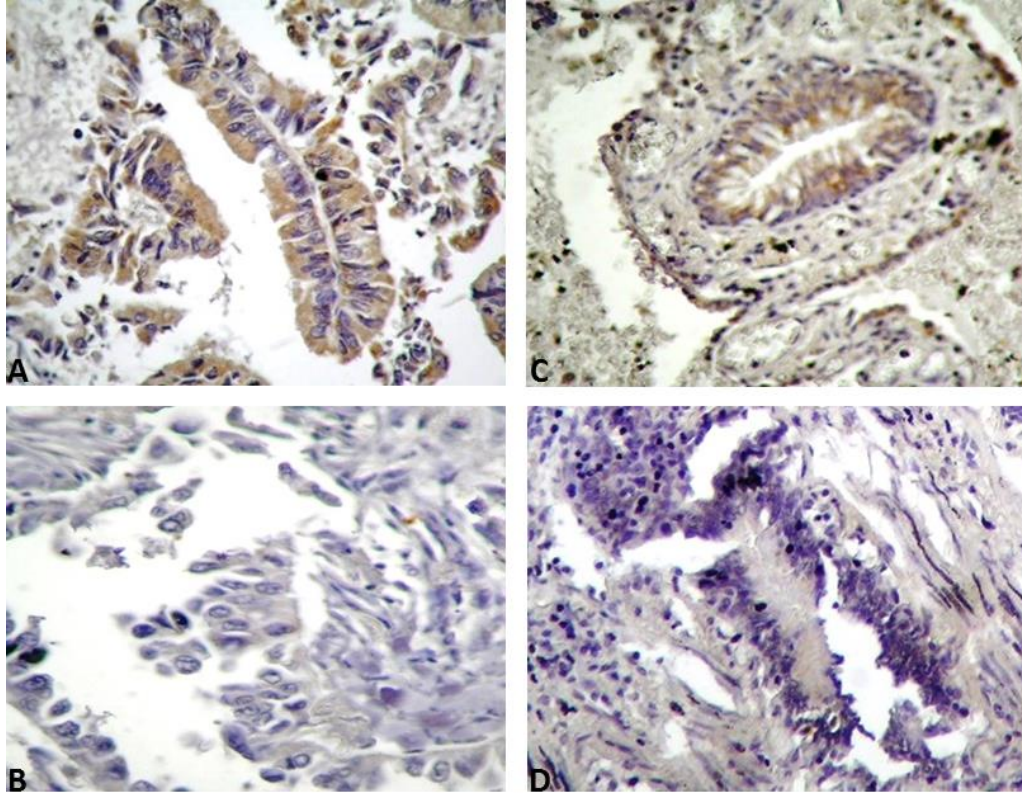
Boyama skorları, pozitif boyanmış neoplastik (tümör dokusu) ve non-neoplastik (kontrol; akciğer bronş ve alveol epitel dokuları) hücrelerin boyanma şiddetine göre hesaplanmıştır. Buna göre 0; protein ifadesi görülmemeyen, 1; hafif şiddette protein ifadesi, 2; orta şiddette protein ifadesi ve 3; şiddetli protein ifadesi şeklinde derecelendirildi. Tümör ve Normal dokular arasındaki protein ifadelerinin farklılıkları Mann-Whitney U Test ile %95'lik güvenilirlik düzeyinde incelendi.

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

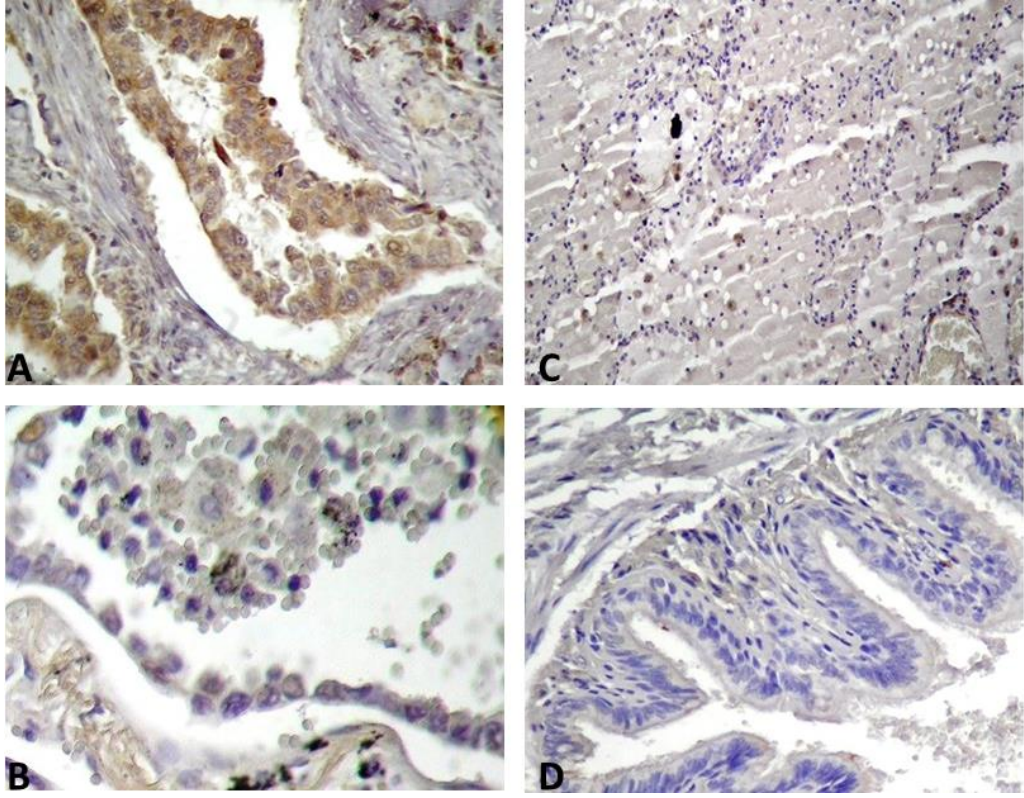
a: ortalama değer±standart hata

b: minimum ve maksimum boyama şiddeti

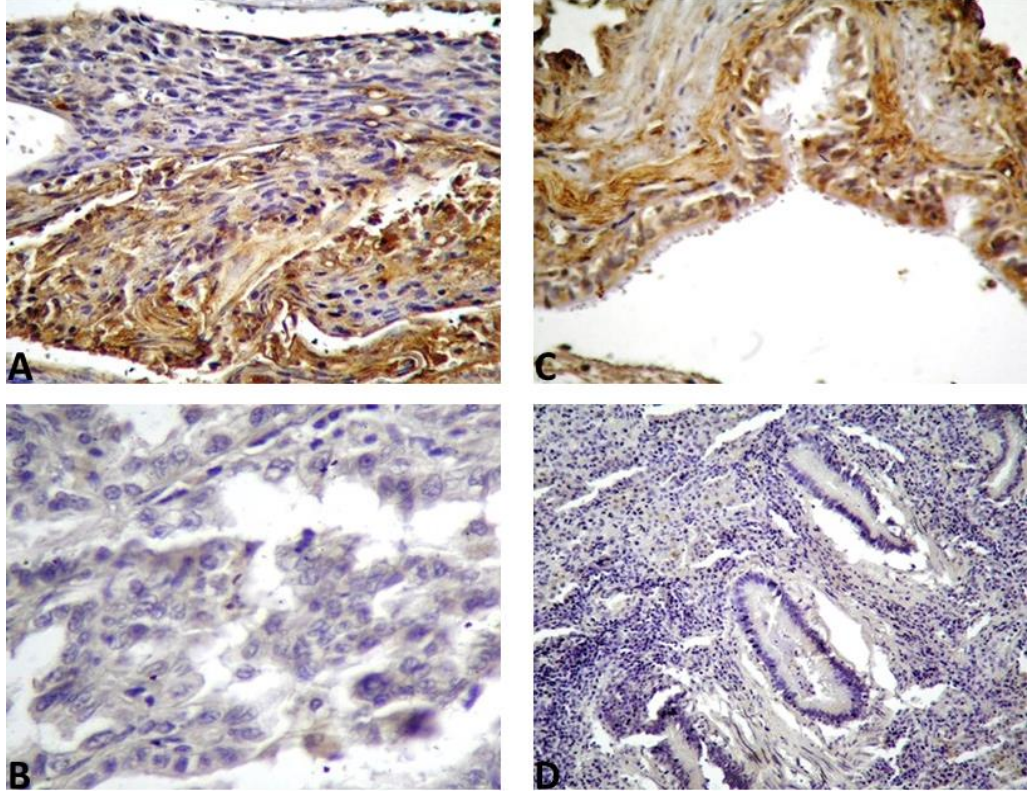
*: Tümör/Normal oranı



Şekil 3.10. Tümörlü ve normal dokularda immunohistokimyasal CYP1A1 proteini (A: Akciğer adenokanserli dokuda CYP1A1 proteinin ifadesi, 400X; B: Adenokanserli dokuda CYP1A1 antikorsuz negatif kontrol boyaması 400X; C: Akciğer bronş epitel dokusunda CYP1A1 proteinin ifadesi, 400X, D: Akciğer bronş epitel dokusunda CYP1A1 antikorsuz negatif kontrol boyaması 400X)



Şekil 3.11. Tümörlü ve normal dokularda immunohistokimyasal CYP2E1 proteini (A: Akciğer adenokanserli dokuda CYP2E1 proteinin ifadesi, 400X; B: Adenokanserli dokuda CYP2E1 antikorsuz negatif kontrol boyaması 400X; C: Akciğer alveol epitel dokusunda CYP2E1 proteinin ifadesi, 200X, D: Akciğer bronş epitel dokusunda CYP2E1 antikorsuz negatif kontrol boyaması 400X)



Şekil 3.12. Tümörlü ve normal dokularda immunohistokimyasal CYP1B1 proteini (A: Akciğer squamoz hücreli karsinomlu dokuda CYP1B1 proteinin ifadesi, 400X; B: Adenokanserli dokuda CYP1B1 antikorsuz negatif kontrol boyaması 400X; C: Akciğer bronş epitel dokusunda CYP1B1 proteinin ifadesi, 400X, D: Akciğer bronş epitel dokusunda CYP1B1 antikorsuz negatif kontrol boyaması 400X)

Tümör evrelerine göre CYP izozimlerinin immunohistakimyasal skorlamalarının ortalamalarına göre gruplar arasındaki farklılıklar incelendiğinde Evre 1, Evre 2 ve Evre 3 hasta gruplarında CYP1A1 ve CYP2E1 izozimlerinin protein ifadelerinin, tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu; CYP1B1 izoziminin protein ifadesinin ise bu üç grupta da normal dokularda tümörlü dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. CYP2E1 izoziminin Evre 1 ($p=0,02$), Evre 2 ($p=0,05$) ve Evre 3 ($p=0,01$) grup hastaların tümörlü dokulardaki protein ifadelerinin normal dokulara oranla fazla olması yapılan istatistiksel analizde de anlamlı bulundu ($p<0,05$). Ancak CYP1A1 ve CYP1B1 izozimlerinin gruplar arasındaki göstermiş oldukları farklılıklar istatistiksel olarak doğrulanamadı ($p>0,05$) (Çizelge 3.14.).

Tümör evreleri ile hastaların tümörlü dokularında CYP izozimlerinin protein ifadeleri arasında yapılan Spearman's Rank Correlation analizinde, bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmedi ($p>0,05$).

Çizelge 3.14. Tümör evrelerine göre CYP izozimlerinin protein ifadeleri

Tümör Evre	n	CYP1A1			CYP1B1			CYP2E1		
		Tümör	Normal	T/N* P*** değeri	Tümör	Normal	T/N P değeri	Tümör	Normal	T/N P değeri
Evre 1	15	1,40±0,27 ^a (0-3) ^b	1,33±0,29 (0-3)	1,05 0,8682	2,47±0,24 (0-3)	2,93±0,07 (2-3)	0,84 0,2058	0,80±0,22 (0-3)	0,13±0,09 (0-1)	6,15 0,0251
Evre 2	12	2,0±0,30 (0-3)	1,67±0,36 (0-3)	1,19 0,5444	2,5±0,15 (2-3)	2,75±0,8 (1-3)	0,9 0,2366	0,75±0,25 (0-3)	0,17±0,17 (0-2)	4,41 0,0567
Evre 3	12	1,92±0,26 (1-3)	1,5±0,34 (0-3)	1,28 0,3408	2,83±0,17 (1-3)	2,92±0,08 (2-3)	0,96 1,000	0,83±0,21 (0-2)	0,083±0,083 (0-1)	10 0,0141

Boyanma skorları, pozitif boyanmış neoplastik (tümör dokusu) ve non-neoplastik (kontrol; akciğer bronş ve alveol epitel dokuları) hücrelerin boyanma şiddetine göre hesaplanmıştır. Buna göre 0; protein ifadesi görülmemeyen, 1; hafif şiddette protein ifadesi, 2; orta şiddette protein ifadesi ve 3; şiddetli protein ifadesi şeklinde derecelendirildi. Tümör ve Normal dokular arasındaki protein ifadelerinin farklılıkları Mann-Whitney U Test ile %95'lik güvenilirlik düzeyinde incelendi.

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

a: ortalama değer±standart hata

b: minimum ve maksimum boyama şiddeti

*: Tümör/Normal oranı

Sigara içen 30, sigara içmeyen 9 KHDAK'lı hastanın dokularında CYP izozimlerinin protein ifadelerinin dağılımına bakıldığında CYP1A1 izoziminin protein ifadesi sigara içen hastaların tümörlü dokularında, normal dokularına oranla daha fazla iken, sigara içmeyen hastalarda bu izozimin protein ifadesi tümörlü ve normal dokularda eşit dağıldığı görülmektedir. İstatistiksel olarak sigara içenlerin tümörlü dokularındaki protein ifadesinin artışı anlamlı değildir ($p>0,05$) (Tablo 15). CYP1B1 izoziminin protein ifadesi sigara içen ve içmeyen her iki grupta da normal dokularda tümörlü dokulara oranla daha fazla iken ($p>0,05$); CYP2E1 izoziminin ise sigara içen ($p=0,0001$) ve içmeyen ($p=0,04$) hasta gruplarında tümörlü dokulardaki ifadesinin normal dokulara oranla yüksek olması istatistiksel olarak da doğrulanmıştır (Çizelge 3.15.). Tümör tiplerine göre adenokarsinomlu hastalarda sigara içen ve içmeyen gruplarda CYP1A1 izoziminin protein ifadesi karşılaştırıldığında; her iki grupta da bu izozimin protein ifadesinin tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha yüksek olduğu görüldü. Sigara içen hastaların tümörlü dokularındaki protein ifadesinin normal dokulara göre olan yüksekliği istatistiksel olarak da anlamlı kabul edildi ($p=0,02$). CYP1B1 izozimi adenokarsinomlu hastaların sigara içen ve içmeyen her iki grubunda da normal dokularda tümörlü dokulara oranla daha fazla ifade edilirken; CYP2E1 izozimi ise bu gruplarda tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla ifade edildiği görüldü. CYP1B1 ve CYP2E1 izozimlerinin gruplar arasındaki protein ifadeleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p>0,05$) (Çizelge 3.15.) Squamoz hücreli karsinomlu hastaların sigara içen ve içmeyenlerine bakıldığında CYP1A1 ve CYP1B1 izozimlerinin normal dokularda tümörlü dokulara oranla daha fazla ifade olduğu görülürken bu farklılıklar istatistiksel olarak doğrulanamadı ($p>0,05$). CYP2E1 izoziminin protein ifadesi sigara içen ve içmeyen squamoz hücreli karsinomlu hastaların tümörlü dokularında normal dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. Sigara içen hastalarda CYP2E1 izoziminin tümörlü dokulardaki ifadesinin normal dokulara oranla daha fazla olması istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,007$) (Çizelge 3.15.). Hastaların sigara içim durumları ile tümörlü dokularında CYP izozimlerinin protein ifadeleri arasında yapılan Spearman's Rank Correlation analizinde, istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmedi ($p>0,05$).

Çizelge 3.15. Sigara içim durumlarına göre CYP izozimlerinin protein ifadeleri

		n	CYP1A1			CYP1B1			CYP2E1		
			Tümör	Normal	T/N* P** değeri	Tümör	Normal	T/N P değeri	Tümör	Normal	T/N P değeri
KHDAK Total	Sigara İçen	30	1,77±0,18 ^a (0-3) ^b	1,43±0,21 (0-3)	1,23 0,2581	2,53±0,14 (0-3)	2,83±0,08 (1-3)	0,89 0,1785	0,80±0,16 (0-3)	0,13±0,08 (0-2)	6,15 0,001
	Sigara İçmeyen	9	1,67±0,38 (0-3)	1,67±0,38 (0-3)	1 1,000	2,78±0,15 (2-3)	3,0±0,0 (3-3)	0,92 0,7239	0,78±0,22 (0-2)	0,11±0,11 (0-1)	7,09 0,0469
Adenokarsinom a	Sigara İçen	14	2,29±0,27 (0-3)	1,14±0,32 (0-3)	2 0,0229	2,43±0,27 (0-3)	2,92±0,07 (2-3)	0,83 0,3121	0,57±0,23 (0-3)	0,0±0,0 (0-0)	? 0,1078
	Sigara İçmeyen	4	2,5±0,5 (1-3)	2,25±0,48 (1-3)	1,11 0,7728	2,75±0,25 (2-3)	3,0±0,0 (3-3)	0,91 1,000	0,75±0,48 (0-2)	0,25±0,25 (0-1)	3 0,5637
Squamos Hücreli Karsinom	Sigara İçen	16	1,31±0,20 (0-3)	1,69±0,27 (0-3)	0,77 0,355	2,63±0,13 (2-3)	2,75±0,14 (1-3)	0,95 0,439	1,0±0,20 (0-3)	0,25±0,14 (0-2)	4 0,0079
	Sigara İçmeyen	5	1,0±0,31 (0-2)	1,2±0,49 (0-3)	0,83 1,000	2,8±0,20 (2-3)	3,0±0,0 (3-3)	0,93 1,000	0,80±0,20 (0-1)	0,0±0,0 (0-0)	? 0,1437

Boyanma skorları, pozitif boyanmış neoplastik (tümör dokusu) ve non-neoplastik (kontrol; akciğer bronş ve alveol epitel dokuları) hücrelerin boyanma şiddetine göre hesaplanmıştır. Buna göre 0; protein ifadesi görülmemeyen, 1; hafif şiddette protein ifadesi, 2; orta şiddette protein ifadesi ve 3; şiddetli protein ifadesi şeklinde derecelendirildi. Tümör ve Normal dokular arasındaki protein ifadelerinin farklılıkları Mann-Whitney U Test ile %95'lik güvenilirlik düzeyinde incelendi.

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

a: ortalama değer±standart hata

b: minimum ve maksimum boyama şiddeti

*: Tümör/Normal oranı

Hastaların yaş gruplarına göre CYP izozimlerinin protein ifadeleri incelendiğinde CYP1A1 izoziminin 57 yaş altı ve 57 yaş üstü her iki grupta da tümörlü dokulara normal dokulara oranla daha fazla ifade edildiği; CYP1B1 izoziminin ise 57 yaş altı ve üstü grupların her ikisinde de normal dokularda tümörlü dokulara oranla daha fazla ifade olduğu görüldü. Bu iki izozimin gruplar arasındaki protein ifadelerinin farklılıkları istatistiksel olarak doğrulanamadı ($p>0,05$). CYP2E1 izoziminin protein ifadesi ise 57 yaş altı ($p=0,02$) ve 57 yaş üstü ($p=0,001$) hasta gruplarının her ikisinde de tümörlü dokularda normal dokularına oranla daha fazla olduğu görüldü (Çizelge 3.16.)

Hastalar tümör tiplerine göre gruplandırıldığında adenokarsinomlu hastaların 57 yaş altı ve üstü her iki grubunda da, CYP1A1 ve CYP2E1 izozimlerinin protein ifadelerinin tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu görülürken; CYP1B1 izoziminin protein ifadesinin normal dokularda tümörlü dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. Ancak gruplar arasında izozimlerin protein ifadelerinin farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p>0,05$) (Çizelge 3.16.).

Squamos hücreli karsinomlu hastalarda yaş gruplarına göre izozimlerin protein ifadelerinin farklılıklarına bakıldığında CYP1A1 izoziminin protein ifadesinin 57 yaş altı ve üstü her iki grupta da normal dokularda, tümörlü dokulara oranla daha fazla olduğu; CYP1B1 izoziminin 57 yaş altı grupta normal ve tümörlü dokuların her ikisinde de eşit düzeyde, 57 yaş üstü grupta ise normal dokularda tümörlü dokulara oranla daha fazla olduğu görülürken bu farklar istatistiksel olarak doğrulanamadı ($p>0,05$). CYP2E1 izozimin protein ifadesinin her iki yaş grubunda da tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu görülürken, 57 yaş altı hasta grubundaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,009$) (Çizelge 3.16.).

Hastaların yaşları ile tümörlü dokularında, CYP izozimlerinin protein ifadeleri arasında yapılan Spearman's Rank Correlation analizinde anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p>0,05$).

Çizelge 3.16. Yaş gruplarına göre CYP izozimlerinin protein ifadeleri

		CYP1A1			CYP1B1			CYP2E1			
		n	Tümör	Normal	T/N* P** değeri	Tümör	Normal	T/N P değeri	Tümör	Normal	T/N P değeri
KHDAK	<57	19	1,79±0,20 (0-3)	1,42±0,28 (0-3)	1,26 0,3502	2,63±0,14 (1-3)	2,73±0,13 (1-3)	0,96 0,6094	0,79±0,20 (0-3)	0,21±0,12 (0-2)	3,76 0,0286
	>57	20	1,70±0,26 (0-3)	1,55±0,25 (0-3)	1,09 0,7251	2,55±0,19 (0-3)	3,0±0,0 (3-3)	0,85 0,1719	0,80±0,17 (0-3)	0,05±0,05 (0-1)	16 0,0011
Adenokarsinoma	<57	8	2,0±0,38 (0-3)	1,0±0,42 (0-3)	2 0,1278	2,63±0,26 (1-3)	2,88±0,13 (2-3)	0,91 0,6744	0,36±0,18 (0-1)	0,0±0,0 (0-0)	? 0,4309
	>57	10	2,60±0,27 (1-3)	1,7±0,40 (0-3)	1,52 0,1212	2,40±0,34 (0-3)	3,0±0,0 (0-3)	0,8 0,4274	0,8±0,3 (0-3)	0,1±0,1 (0-1)	8 0,1212
Squamos Hücreli Karsinom	<57	11	1,64±0,20 (1-3)	1,73±0,36 (0-3)	0,94 0,8182	2,64±0,15 (2-3)	2,64±0,20 (1-3)	1 0,8438	1,09±0,29 (0-3)	0,36±0,20 (0-2)	3,02 0,0660
	>57	10	0,8±0,20 (0-2)	1,40±0,31 (0-3)	0,57 0,2123	2,70±0,15 (2-3)	3,0±0,0 (3-3)	0,9 0,4727	0,80±0,13 (0-1)	0,0±0,0±0,0 (0-0)	? 0,0091

Boyanma skorları, pozitif boyanmış neoplastik (tümör dokusu) ve non-neoplastik (kontrol; akciğer bronş ve alveol epitel dokuları) hücrelerin boyanma şiddetine göre hesaplanmıştır. Buna göre 0; protein ifadesi görülmemeyen, 1; hafif şiddette protein ifadesi, 2; orta şiddette protein ifadesi ve 3; şiddetli protein ifadesi şeklinde derecelendirildi. Tümör ve Normal dokular arasındaki protein ifadelerinin farklılıkları Mann-Whitney U Test ile %95'lik güvenilirlik düzeyinde incelendi.

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

a: ortalama değer±standart hata

b: minimum ve maksimum boyama şiddeti

*: Tümör/Normal oranı

Cinsiyete göre CYP izozimlerinin protein ifadeleri incelendiğinde kadın hastalarda CYP1A1 ve CYP1B1 izozimleri, tümörlü ve normal dokularda eşit düzeyde ifade olurken; CYP2E1 izoziminin protein ifadesi tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. Kadınlarda izozimlerin protein ifadeleri arasındaki farklar istatistiksel olarak doğrulanamadı ($p>0,05$).

Erkeklerde her üç izozimin protein ifadeleri tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu görülürken, CYP2E1 izoziminin tümörlü dokulardaki protein ifadesinin normal dokulara oranla daha fazla olduğu istatistiksel olarak anlamlı olarak doğrulandı ($p=0,0001$) (Çizelge 3.17.).

Hastaların cinsiyeti ile tümörlü dokularında CYP izozimlerinin protein ifadeleri arasında yapılan Spearman's Rank Correlation analizine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmedi ($p>0,05$).

Çizelge 3.17. Cinsiyete göre CYP izozimlerinin protein ifadeleri

	n	CYP1A1			CYP1B1			CYP2E1		
		Tümör	Normal	T/N* P** değeri	Tümör	Normal	T/N P değeri	Tümör	Normal	T/N P değeri
KHDAK	KADIN	3 2,33±0,67 (1-3)	2,33±0,67 (1-3)	1 1,000	3,0±0,0 (3-3)	3,0±0,0 (3-3)	1 1,000	1,0±0,58 (0-2)	0,33±0,33 (0-1)	3,03 0,5127
	ERKEK	36 1,69±0,17 (0-3)	1,42±0,19 (0-3)	1,19 0,2821	2,56±0,12 (0-3)	2,86±0,07 (1-3)	0,89 0,1049	0,78±0,13 (0-3)	0,11±0,07 (0-2)	7 0,0001

Boyanma skorları, pozitif boyanmış neoplastik (tümör dokusu) ve non-neoplastik (kontrol; akciğer bronş ve alveol epitel dokuları) hücrelerin boyanma şiddetine göre hesaplanmıştır. Buna göre 0; protein ifadesi görülmemen, 1; hafif şiddette protein ifadesi, 2; orta şiddette protein ifadesi ve 3; şiddetli protein ifadesi şeklinde derecelendirildi. Tümör ve Normal dokular arasındaki protein ifadelerinin farklılıkları Mann-Whitney U Test ile %95'lik güvenilirlik düzeyinde incelendi.

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

a: ortalama değer±standart hata

b: minimum ve maksimum boyama şiddeti

*: Tümör/Normal oranı

3.3.2. GST Enzimlerinin Protein İfadeleri ve Klinik Hasta Bilgileri ile Karşılaştırılması

Genel olarak GST izozimlerinin protein ifadelerinin görüldüğü hastalar incelendiğinde; GSTP1 izoziminin 39 KHDAK'lı hastanın tamamında (%100) (Şekil 3.13.), GSTM1 izoziminin 39 hastanın 17 (%43,6)'sinde (Şekil 3.14.); GSTT1 izoziminin 39 hastanın 35 (%89,7)'sinde (Şekil 3.15.) tümörlü ve normal dokularının birinde ya da her ikisinde protein ifadelerinin olduğu görüldü.

KHDAK'da tümörlü ve normal dokular eşleştirildiğinde toplamda GSTP1 izoziminin protein ifadesinin 9 hastada (%23,1), GSTM1 izoziminin protein ifadesinin 14 hastada (%35,9) ve GSTT1 izoziminin protein ifadesinin de 13 hastada (%33,3) tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü.

Hasta dokuları tümör tiplerine göre ayrıldığında adenokarsinomlu hastalarda GSTP1 izoziminin 4 hastada (%22,2), GSTM1 izoziminin 2 hastada (%11,1) ve GSTT1 izoziminin 7 hastada protein ifadelerinin tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü.

Squamos hücreli karsinomlu hastalarda ise GSTP1 izoziminin 5 hastada (%23,8), GSTM1 izoziminin 12 hastada (57,1) ve GSTT1 izoziminin ise 6 hastada (28,6) tümörlü dokularında normal dokularına oranla daha fazla ifade olduğu görüldü (Çizelge 3.18).

Çizelge 3.18. KHDAK'da tümörlü ve normal dokular eşleştirildiğinde GSTP izozimlerinin protein ifadelerinin yüksek olduğu tümör dokuların sayıları ve yüzde oranları

	GSTP1			GSTM1		GSTT1	
	Total (n)	Tümör (n)	%*	Tümör (n)	%	Tümör (n)	%
KHDAK	39	9	23,1	14	35,9	13	33,3
Adenokarsinom	18	4	22,2	2	11,1	7	38,9
Squamoz Hücreli Karsinom	21	5	23,8	12	57,1	6	28,6

Boyanma skorları, pozitif boyanmış neoplastik (tümör dokusu) ve non-neoplastik (kontrol; akciğer bronş ve alveol epitel dokuları) hücrelerin boyanma şiddetine göre hesaplanmıştır. Buna göre 0; protein ifadesi görülmemeyen, 1; hafif şiddette protein ifadesi, 2; orta şiddette protein ifadesi ve 3; şiddetli protein ifadesi şeklinde derecelendirildi.

*: Yüzdeler satırlara göre verilmiştir.

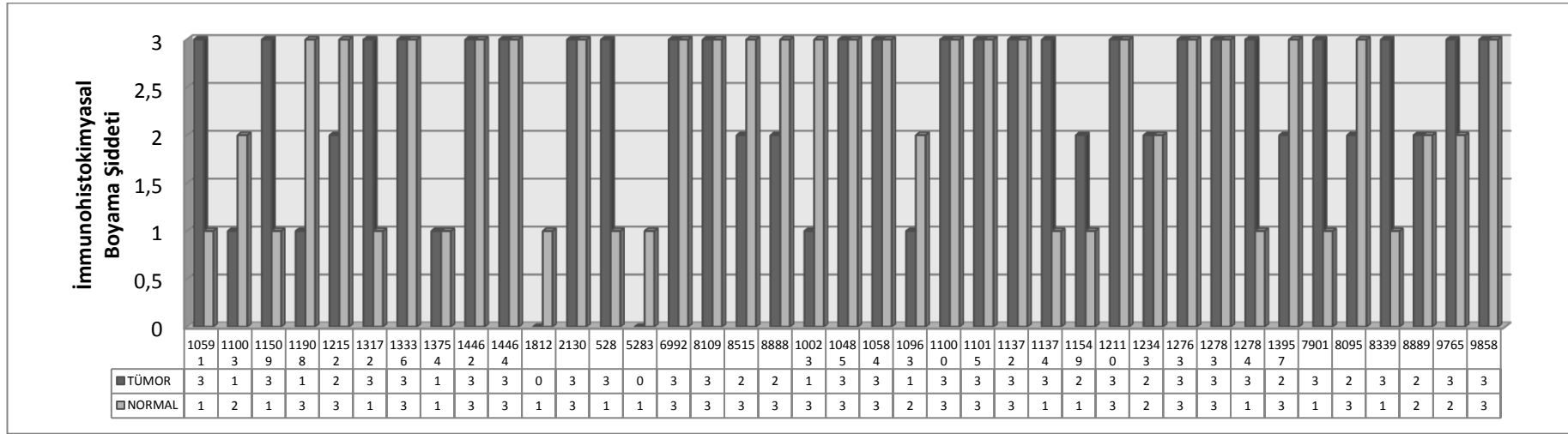
İmmünohistokimyasal skorlamalarının ortalamalarına göre KHDAK'lı hastalarda tümörlü ve normal dokular arasındaki protein ifadelerinin farklılıkları incelendiğinde her üç izoziminde protein ifadelerinin tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. GSTM1 izoziminin tümörlü dokularda normal dokulara oranla yüksek düzeyde ifade olması istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p=0,02$); GSTP1 ve GSTT1 izozimlerinin dokulardaki protein ifadelerinin farklılıkları istatistiksel olarak doğrulanamadı ($p>0,05$) (Çizelge 3.19.).

Tümör alt tiplerine göre, adenokarsinomlu hastalara (n=18) bakıldığında; GSTP1 izoziminin 18 hastanın tamamında (%100), GSTM1 izozimlerinin 18 hastanın 4 (%22,2)'ünde; GSTT1 izoziminin ise 18 hastadan 17'sinde (%94,4) tümörlü ve normal dokularının birinde yada her ikisinde protein ifadelerinin olduğu görüldü.

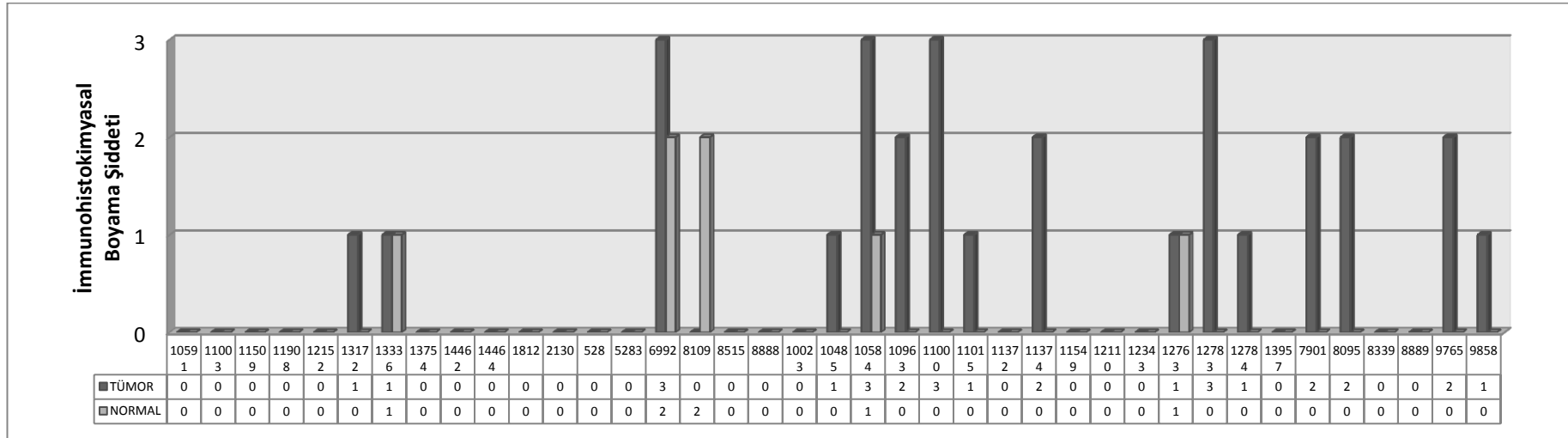
İmmünohistokimyasal skorlamalarına göre adenokarsinomlu dokularda GST izozimlerinin protein ifadelerinin farklılıkları incelendiğinde; GSTP1 (Şekil 3.16.) ve GSTM1 izozimlerinin protein ifadeleri normal ve tümörlü dokularda eşit düzeyde iken; GSTT1 izoziminin protein ifadesi tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla idi. Adenokarsinomlu dokularda izozimlerin dokulardaki farklılıkları istatistiksel olarak doğrulanamadı ($p>0,05$) (Çizelge 3.19.).

Squamos hücreli karsinomlu (n=21) hastalara genel olarak bakıldığında, GSTT1 izoziminin 21 hastanın tamamında (%100), GSTM1 izoziminin 21 hastadan 13 (%61,9)'ünde (Şekil 3.17.); GSTT1 izoziminin 21 hastanın 18 (%85,7)'inde tümörlü ve normal dokularının birinde ya da her ikisinde protein ifadelerinin olduğu görüldü (Şekil 3.18.).

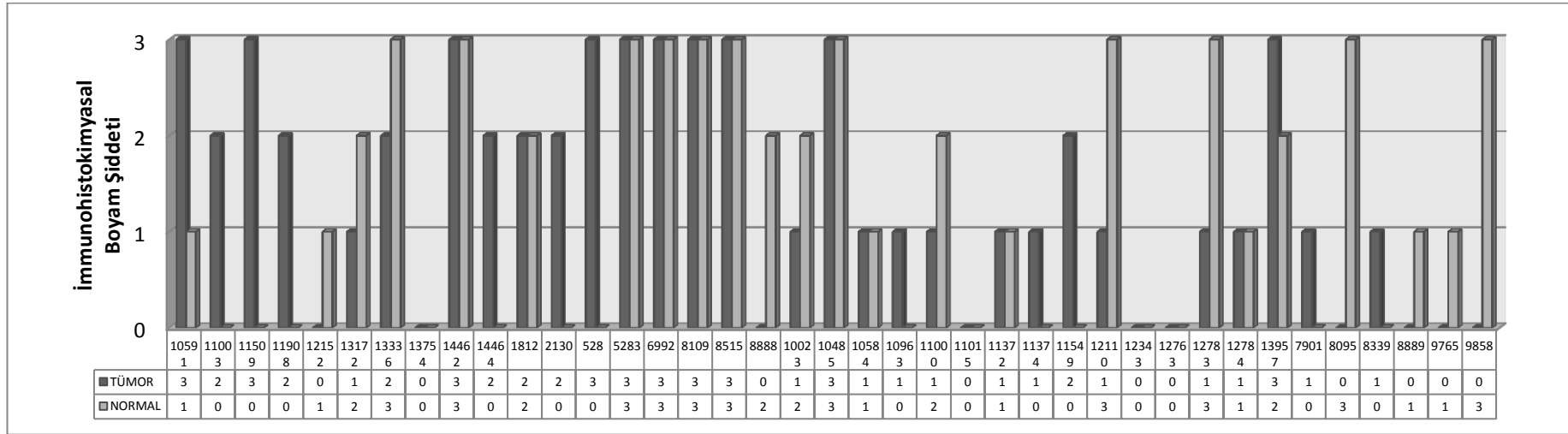
Squamos hücreli karsinomlu dokularda GSTP1 ve GSTM1 izozimlerinin protein ifadeleri tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla iken; GSTT1 izoziminin protein ifadesi normal dokularda, tümörlü dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. GSTM1 izoziminin tümörlü dokulardaki ifadesinin normal dokulara oranla fazla olması istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,002$) (Çizelge 3.19.)



Şekil 3.13. KHDAK'lı hastaların tümörlü ve normal dokularında GSTP1 izoziminin protein ifadesi



Şekil 3.14. KHDAK'lı hastaların tümörlü ve normal dokularında GSTM1 izoziminin protein ifadesi



Şekil 3.15. KHDAK'lı hastaların tümürlü ve normal dokularında GSTT1 izoziminin protein ifadesi

Çizelge 3.19. KHDAK hastaların tümörlü ve normal dokularında GST izozimlerinin protein ifadeleri

	n	GSTP1			GSTM1			GSTT1		
		Tümör	Normal	T/N* P** değeri	Tümör	Normal	T/N P değeri	Tümör	Normal	T/N P değeri
KHDAK	39	2,39±0,15 ^a (0-3) ^b	2,26±0,15 (1-3)	1,05 0,5689	0,74±0,17 (0-3)	0,18±0,08 (0-2)	4,11 0,0249	1,44±0,18 (0-3)	1,33±0,20 (0-3)	1,08 0,6457
Adenokarsinom	18	2,17±0,26 (0-3)	2,17±0,23 (1-3)	1 0,9874	0,28±0,18 (0-3)	0,28±0,16 (0-2)	1 1,000	2,06±0,26 (0-3)	1,44±0,32 (0-3)	1,43 0,2172
Squamos Hücreli Karsinoma	21	2,57±0,15 (1-3)	2,33±0,19 (1-3)	1,1 0,4657	1,14±0,24 (0-3)	0,10±0,07 (0-1)	11,4 0,0020	0,91±0,19 (0-3)	1,24±0,27 (0-3)	0,73 0,5294

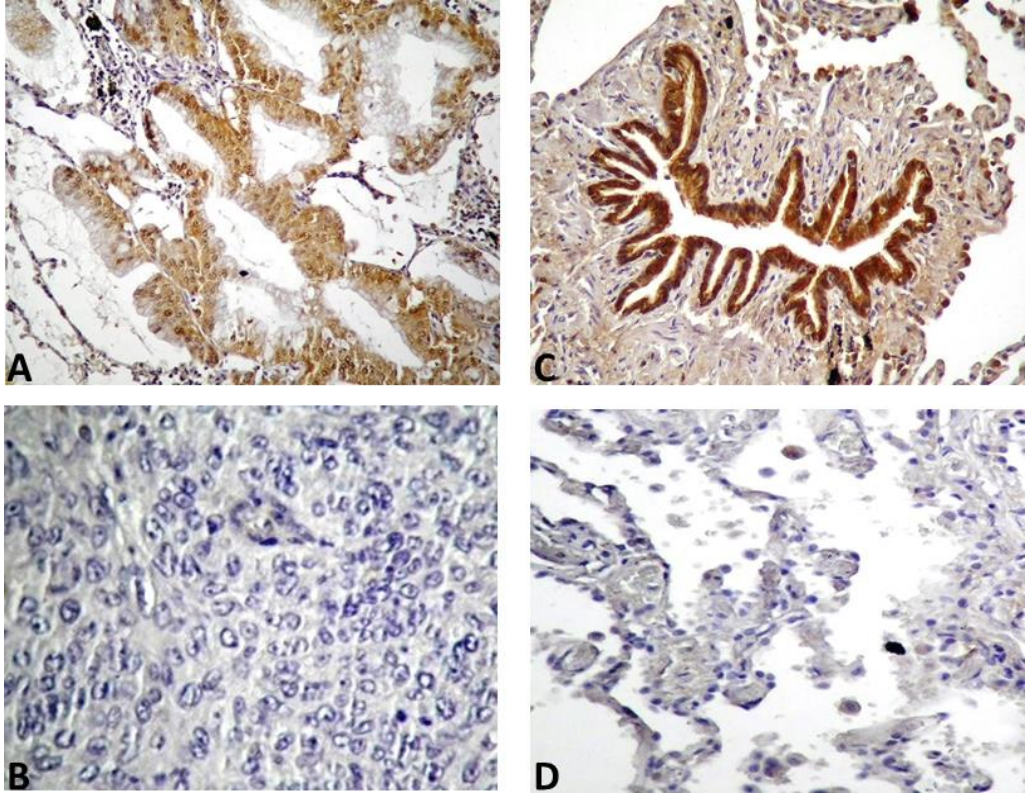
Boyanma skorları, pozitif boyanmış neoplastik (tümör dokusu) ve non-neoplastik (kontrol; akciğer bronş ve alveol epitel dokuları) hücrelerin boyanma şiddetine göre hesaplanmıştır. Buna göre 0; protein ifadesi görülmemen, 1; hafif şiddette protein ifadesi, 2; orta şiddette protein ifadesi ve 3; şiddetli protein ifadesi şeklinde derecelendirildi. Tümör ve Normal dokular arasındaki protein ifadelerinin farklılıkları Mann-Whitney U Test ile %95'lik güvenilirlik düzeyinde incelendi.

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

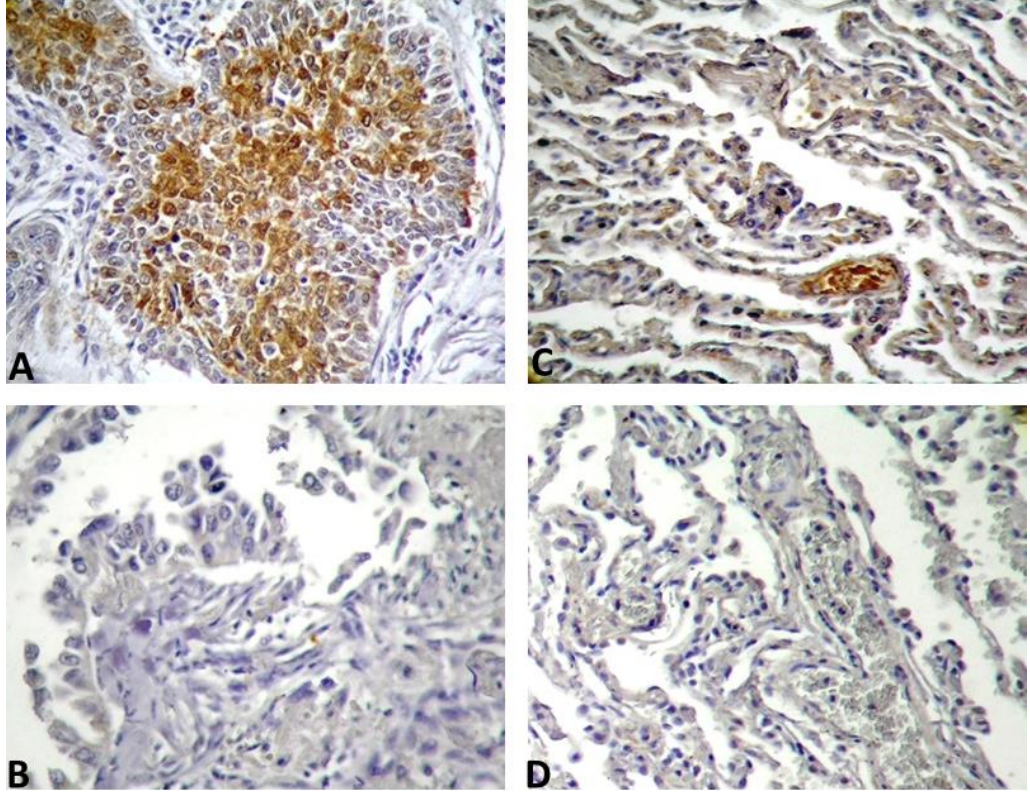
a: ortalama değer±standart hata

b: minimum ve maksimum boyama şiddeti

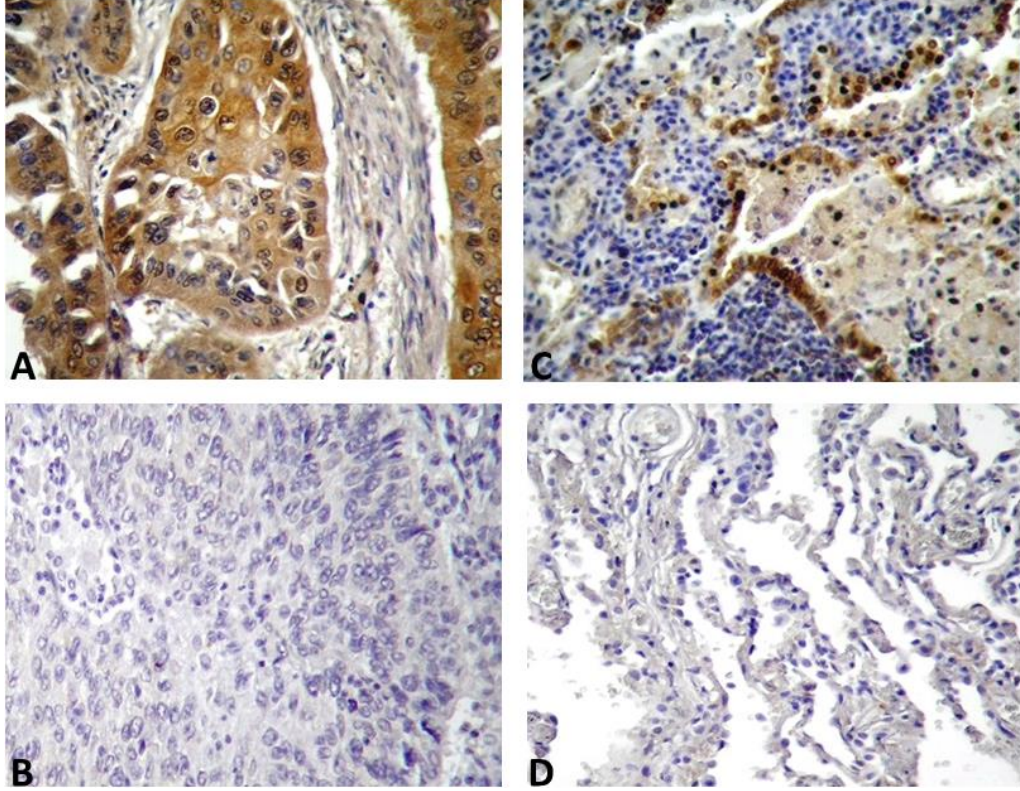
*: Tümör/Normal oranı



Şekil 3.16. Tümörlü ve normal dokularda immunohistokimyasal GSTP1 proteini (**A:** Akciğer adenokanserli dokuda GSTP1 proteinin ifadesi, 200X; **B:** Adenokanserli dokuda GSTP1 antikorsuz negatif kontrol boyaması 400X; **C:** Akciğer bronş epitel dokusunda GSTP1 proteinin ifadesi, 200X, **D:** Akciğer alveol epitel dokusunda GSTP1 antikorsuz negatif kontrol boyaması 200X)



Şekil 3.17. Tümörlü ve normal dokularda immunohistokimyasal GSTM1 proteini (**A:** Akciğer squamoz hücreli karsinoma dokusunda GSTM1 proteinin ifadesi, 400X; **B:** Adenokanserli dokuda GSTM1 antikorsuz negatif kontrol boyaması 400X; **C:** Akciğer alveol epitel dokusunda GSTM1 proteinin ifadesi, 200X, **D:** Akciğer alveol epitel dokusunda GSTM1 antikorsuz negatif kontrol boyaması 200X)



Şekil 3.18. Tümörlü ve normal dokularda immunohistokimyasal GSTT1 proteini (**A:** Akciğer squamoz hücreli karsinoma dokusunda GSTT1 proteinin ifadesi, 400X; **B:** Adenokanserli dokuda GSTT1 antikorsuz negatif kontrol boyaması 200X; **C:** Akciğer alveol epitel dokusunda GSTT1 proteinin ifadesi, 200X, **D:** Akciğer alveol epitel dokusunda GSTT1 antikorsuz negatif kontrol boyaması 200X)

Tümör evrelerine göre dokularda GST izozimlerinin protein ifadelerinin immunohistokimyasal skorlamalarının ortalama değerlerine göre farklılıklar incelendiğinde; Evre 1 grup hastalarda GSTP1 ve GSTT1 izozimlerinin protein ifadeleri, normal dokularda tümörlü dokulara oranla daha fazla iken; GSTM1 izoziminin protein ifadesi ise tümörlü dokularda, normal dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. Evre 2 ve Evre 3 grup hastalarda her üç izozimin de protein ifadeleri tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. Gruplar arasında izozimlerin protein ifadelerinin farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p>0,05$) (Çizelge 3.20.)

Hastaların tümör evreleri ile tümörlü dokularında GST izozimlerinin protein ifadeleri arasında yapılan Spearman's Rank Correlation analizine göre; izozimlerden sadece GSTP1 izoziminin protein ifadesi ile tümör evreleri arasında düşük pozitif yönde bir ilişki görülürken ($r=0,30$; $p=0,05$); diğer izozimler ile tümör evreleri arasında anlamlı ilişki görülemedi ($p>0,05$).

Çizelge 3.20. Tümör evrelerine göre GST izozimlerinin protein ifadeleri

Tümör Evre	n	GSTP1			GSTM1			GSTT1		
		Tümör	Normal	T/N* P** değeri	Tümör	Normal	T/N P değeri	Tümör	Normal	T/N P değeri
Evre 1	15	2,0±0,28 ^a (0-3) ^b	2,40±0,24 (1-3)	0,83 0,2902	0,73±0,28 (0-3)	0,27±0,15 (0-2)	2,7 0,3095	1,20±0,31 (0-3)	1,27±0,32 (0-3)	0,94 0,9174
Evre 2	12	2,58±0,23 (1-3)	2,08±0,29 (1-3)	1,2 0,2727	1,0±0,35 (0-3)	0,0±0,0 (0-0)	? 0,0690	1,58±0,34 (0-3)	1,25±0,41 (0-3)	1,26 0,4357
Evre 3	12	2,67±0,19 (1-3)	2,25±0,25 (1-3)	1,18 0,2727	0,50±0,23 (0-2)	0,25±0,18 (0-2)	2 0,5067	1,58±0,31 (0-3)	1,5±0,36 (0-3)	1,05 0,8625

Boyanma skorları, pozitif boyanmış neoplastik (tümör dokusu) ve non-neoplastik (kontrol; akciğer bronş ve alveol epitel dokuları) hücrelerin boyanma şiddetine göre hesaplanmıştır. Buna göre 0; protein ifadesi görülmemeyen, 1; hafif şiddette protein ifadesi, 2; orta şiddette protein ifadesi ve 3; şiddetli protein ifadesi şeklinde derecelendirildi. Tümör ve Normal dokular arasındaki protein ifadelerinin farklılıkları Mann-Whitney U Test ile %95'lik güvenilirlik düzeyinde incelendi.

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

a: ortalama değer±standart hata

b: minimum ve maksimum boyama şiddeti

*: Tümör/Normal oranı

Sigara içim durumlarına göre KHDAK'lı hastalarda GST izozimlerinin protein ifadeleri incelendiğinde sigara içen grupta her üç izoziminde protein ifadelerinin tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. Bu izozimlerden GSTM1'in protein ifadesinin tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olması istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p=0,03$). Sigara içmeyen hastalarda GSTP1 izoziminin protein ifadesi tümörlü ve normal dokularda eşit düzeyde olduğu görülürken, GSTM1 ve GSTT1 izozimlerinin protein ifadelerinin tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. Ancak tümörlü ve normal dokular arasında bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p>0,05$) (Çizelge 3.21.). Tümör tiplerine göre sigara içen ve içmeyen hasta gruplarında protein ifadeleri karşılaştırıldığında; adenokarsinomlu hastaların sigara içen grubunda her üç izoziminde protein ifadelerinin tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu görülürken; sigara içmeyen hastalarda GSTP1 ve GSTM1 izozimlerinin protein ifadelerinin, normal dokularda, tümörlü dokulara oranla, GSTT1 izoziminin protein ifadelerinin ise tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. Adenokarsinomlu hastaların tümörlü ve normal dokuları arasındaki izozimlerin protein ifadelerinin farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p>0,05$) (Çizelge 3.21.). Squamoz hücreli karsinomlu hastalara bakıldığında sigara içen grupta GSTP1 ve GSTM1 izozimlerinin protein ifadelerinin tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. Bu izozimlerden GSTM1 izoziminin protein ifadesinin artışı istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ($p=0,008$). GSTT1 izoziminin protein ifadesinin ise normal dokularda tümörlü dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. Sigara içmeyen grupta ise GSTP1 ve GSTM1 izozimlerinin protein ifadeleri tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla iken, GSTT1 izoziminin protein ifadesi normal ve tümörlü dokularda eşit düzeyde olduğu görüldü. Bu gruplarda izozimlerin protein ifadelerinin farklılıkları istatistiksel olarak doğrulanamadı ($p>0,05$) (Çizelge 3.21.). Hastaların sigara içim durumları ile tümörlü dokularında GST izozimlerinin protein ifadeleri arasında yapılan Spearman's Rank Correlation analizinde, istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmedi ($p>0,05$).

Çizelge 3.21. Sigara içim durumlarına göre GST izozimlerinin protein ifadeleri

		GSTP1			GSTM1			GSTT1			
		n	Tümör	Normal	T/N* P** değeri	Tümör	Normal	T/N P değeri	Tümör	Normal	T/N P değeri
KHDAK	Sigara İçen	30	2,33±0,18 ^a (0-3) ^b	2,17±0,17 (1-3)	1,07 0,5298	0,73±0,19 (0-3)	0,13±0,08 (0-2)	5,61 0,0378	1,4±0,21 (0-3)	1,37±0,22 (0-3)	1,02 0,8766
	Sigara İçmeyen	9	2,56±0,24 (1-3)	2,56±0,24 (1-3)	1 1,000	0,78±0,36 (0-3)	0,33±0,24 (0-2)	2,36 0,4268	1,56±0,37 (0-3)	1,22±0,49 (0-3)	1,27 0,6272
Adenokarsinom a	Sigara İçen	14	2,07±0,31 (0-3)	2,0±0,28 (1-3)	1,03 0,8904	0,29±0,22 (0-3)	0,14±0,14 (0-2)	2,07 0,7652	2,0±0,33 (0-3)	1,43±0,34 (0-3)	1,39 0,2603
	Sigara İçmeyen	4	2,50±0,50 (1-3)	2,75±0,25 (2-3)	0,9 1,000	0,25±0,25 (0-1)	0,75±0,48 (0-2)	0,33 0,5637	2,25±0,25 (2-3)	1,50±0,86 (0-3)	1,5 0,8852
Squamosuz Hücreli Karsinom	Sigara İçen	16	2,56±0,18 (1-3)	2,31±0,22 (1-3)	1,1 0,4856	1,13±0,27 (0-3)	0,13±0,09 (0-1)	8,69 0,0088	0,88±0,20 (0-3)	1,31±0,30 (0-3)	0,67 0,3964
	Sigara İçmeyen	5	2,60±0,25 (2-3)	2,40±0,40 (1-3)	1,08 0,9168	1,20±0,58 (0-3)	0,0±0,0 (0-0)	? 0,2506	1,0±0,55 (0-3)	1,0±0,63 (0-3)	1 0,9168

Boyanma skorları, pozitif boyanmış neoplastik (tümör dokusu) ve non-neoplastik (kontrol; akciğer bronş ve alveol epitel dokuları) hücrelerin boyanma şiddetine göre hesaplanmıştır. Buna göre 0; protein ifadesi görülmemeyen, 1; hafif şiddette protein ifadesi, 2; orta şiddette protein ifadesi ve 3; şiddetli protein ifadesi şeklinde derecelendirildi. Tümör ve Normal dokular arasındaki protein ifadelerinin farklılıkları Mann-Whitney U Test ile %95'lik güvenilirlik düzeyinde incelendi.

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

a: ortalama değer±standart hata

b: minimum ve maksimum boyama şiddeti

*: Tümör/Normal oranı

Yaş gruplarına göre hastalar gruplandırıldığında GST izozimlerinin protein ifadelerinin farklılıkları incelendiğinde 57 yaş altı hastalarda her üç izozimin protein ifadelerinin tümörlü dokularda, normal dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. Bu izozimlerden GSTM1'in 57 yaş altı hasta gruplarında tümörlü dokularında normal dokularına oranla daha fazla ifade olması istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,04$). 57 yaş üstü hastalarda GSTP1 izoziminin protein ifadesi tümörlü ve normal dokularda eşit düzeyde görülürken, GSTM1 ve GSTT1 izozimlerinin protein ifadeleri tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. Gruplar arasındaki protein ifadelerinin farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p>0,05$) (Çizelge 3.22.). Tümör tiplerine göre hastalar yaş gruplarına ayrıldığında; adenokarsinomlu hastaların 57 yaş altı olanlarında her üç izozimin protein ifadeleri tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla iken, 57 yaş üstü grupta ise GSTP1 ve GSTM1 izozimlerinin protein ifadeleri normal dokularda tümörlü dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. GSTT1 izoziminin ise protein ifadesi bu grupta tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla idi. Gruplar arasında izozimlerin protein ifadelerinin farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p>0,05$) (Çizelge 3.22.). Squamoz hücreli karsinomlu hastalarda 57 yaş altı grupta üç izoziminde protein ifadelerinin tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. Bunlardan GSTM1 izoziminin protein ifadesinin tümörlü dokulardaki artışı istatistiksel olarak da anlamlı bulunurken ($p=0,029$), diğer iki izozimin protein ifadelerinin farklılıkları istatistiksel olarak doğrulanamadı ($p>0,05$). 57 yaş üstü grupta GSTP1 ve GSTM1 izozimlerinin protein ifadelerinin tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu görülürken, GSTM1 izoziminin protein ifadesinin farklılığı istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ($p=0,04$). GSTT1 izoziminin protein ifadesinin ise normal dokularda tümörlü dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. Ancak bu fark istatistiksel olarak doğrulanamadı ($p>0,05$) (Çizelge 3.22.). Hastaların yaşları ile tümörlü dokularda, GST izozimlerinin protein ifadeleri arasında yapılan Spearman's Rank Correlation analizinde anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p>0,05$).

Çizelge 3.22. Yaş gruplarına göre GST izozimlerinin protein ifadeleri

	n	GSTP1			GSTM1			GSTT1			
		Tümör	Normal	T/N* P** değeri	Tümör	Normal	T/N P değeri	Tümör	Normal	T/N P değeri	
KHDAK	<57	19	2,47±0,18 ^a (1-3) ^b	2,21±0,22 (1-3)	1,11 0,5302	0,79±0,25 (0-3)	0,05±0,05 (0-1)	15,8 0,0455	1,42±0,26 (0-3)	1,37±0,27 (0-3)	1,03 0,8839
	>57	20	2,30±0,23 (0-3)	2,30±0,19 (0-1)	1 0,8604	0,70±0,23 (0-3)	0,30±0,14 (0-2)	2,33 0,2616	1,45±0,27 (0-3)	1,30±0,31 (0-3)	1,11 0,7150
Adenokarsinom a	<57	8	2,25±0,31 (1-3)	2,0±0,38 (1-3)	1,12 0,7132	0,13±0,13 (0-1)	0,0±0,0 (0-0)	? 1,000	1,75±0,45 (0-3)	1,0±0,42 (0-3)	1,75 0,2701
	>57	10	2,10±0,4 (0-3)	2,30±0,30 (1-3)	0,91 0,8501	0,40±0,30 (0-3)	0,50±0,27 (0-2)	0,8 0,7624	2,30±0,30 (0-3)	1,80±0,44 (0-3)	1,27 0,6232
Squamos Hücreli Karsinom	<57	11	2,64±0,20 (1-3)	2,36±0,28 (1-3)	1,11 0,6224	1,27±0,36 (0-3)	0,09±0,09 (0-1)	14,11 0,0215	1,80±0,29 (0-3)	1,64±0,34 (0-3)	1,09 0,3410
	>57	10	2,5±0,23 (1-3)	2,30±0,26 (1-3)	1,08 0,6501	1,0±0,33 (0-3)	0,1±0,1 (0-1)	10 0,0494	0,60±0,22 (0-2)	0,80±0,39 (0-3)	0,75 0,9698

Boyama skorları, pozitif boyanmış neoplastik (tümör dokusu) ve non-neoplastik (kontrol; akciğer bronş ve alveol epitel dokuları) hücrelerin boyanma şiddetine göre hesaplanmıştır. Buna göre 0; protein ifadesi görülmemeyen, 1; hafif şiddette protein ifadesi, 2; orta şiddette protein ifadesi ve 3; şiddetli protein ifadesi şeklinde derecelendirildi. Tümör ve Normal dokular arasındaki protein ifadelerinin farklılıkları Mann-Whitney U Test ile %95'lik güvenilirlik düzeyinde incelendi.

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

a: ortalama değer±standart hata

b: minimum ve maksimum boyama şiddeti

*: Tümör/Normal oranı

Cinsiyete göre gruplar ayrıldığında kadınlarda GST izozimlerinin protein ifadelerinin normal dokularda, tümörlü dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. Ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p>0,05$) (Çizelge 3.23.).

Erkeklerde ise her üç izozimin protein ifadelerinin tümörlü dokularda, normal dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. GSTM1 izoziminin, erkek hastaların tümörlü dokularında, normal dokularına oranla fazla ifade olması istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,01$) (Çizelge 3.23.).

Hastaların cinsiyeti ile tümörlü dokularında GST izozimlerinin protein ifadeleri arasında yapılan Spearman's Rank Correlation analizine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki görülmedi ($p>0,05$).

Çizelge 3.23. Cinsiyete göre GST izozimlerinin protein ifadeleri

	n	GSTP1			GSTM1			GSTT1			
		Tümör	Normal	T/N* P** değeri	Tümör	Normal	T/N P değeri	Tümör	Normal	T/N P değeri	
KHDAK	KADIN	3	2,33±0,67 ^a (1-3) ^b	2,67±0,33 (2-3)	0,87 1,000	0,33±0,33 (0-1)	1,0±0,58 (0-2)	0,33 0,5127	2,33±0,33 (2-3)	2,0±1,0 (0-3)	1,16 1,000
	ERKEK	36	2,39±0,15 (0-3)	2,22±0,15 (1-3)	1,07 0,5028	0,78±0,18 (0-3)	0,11±0,07 (0-2)	7,09 0,0118	1,36±0,19 (0-3)	1,28±0,20 (0-3)	1,06 0,6934

Boyanma skorları, pozitif boyanmış neoplastik (tümör dokusu) ve non-neoplastik (kontrol; akciğer bronş ve alveol epitel dokuları) hücrelerin boyanma şiddetine göre hesaplanmıştır. Buna göre 0; protein ifadesi görülmemen, 1; hafif şiddette protein ifadesi, 2; orta şiddette protein ifadesi ve 3; şiddetli protein ifadesi şeklinde derecelendirildi. Tümör ve Normal dokular arasındaki protein ifadelerinin farklılıkları Mann-Whitney U Test ile %95'lik güvenilirlik düzeyinde incelendi.

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

a: ortalama değer±standart hata

b: minimum ve maksimum boyama şiddeti

*: Tümör/Normal oranı

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Kompleks bir sistem olan detoksifikasyon mekanizması ayrıntılı olarak incelendiğinde; toksik etkiden korunmanın, o maddenin aktif metaboliti ile detoksifikasyonu arasındaki dengeye bağlı olduğu anlaşılmıştır. Aktif metabolit oluşumu ile detoksifikasyonun hızları arasında denge mevcut olduğu sürece hücre hasarı görülmez. Bu dengenin bozulması halinde yani; aktif metabolit oluşumu artar ve/veya detoksifikasyon kapasitesi azalırsa toksik etki görülür [3] ve sonuçta da DNA ve doku hasarı, patolojik bir ölüm şekli olan nekroz, hücre yaşlanması, kanser gibi çeşitli hastalıklar oluşur.

Vücudumuz yaşantımız boyunca, başta PAH'lar olmak üzere, 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD), nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-ridyl)-1-butanone (NNK), parasetamol, klorzoksan, enfluran, halothan, aseton, ethanol, piridin, pirazol ve isoniazid, quinidin, nifedipin, diltiazem, lidokaine, lovastatin, eritromisin, siklosporin, triazolam, midazolam ve testosteron, progesteron, androstenedion, aflatoksin B1, 6-aminokirisen, 4-hidroksil-2-nonenal, kolesterol-5,6-oksit, adenin propenal, 9-hidroperoksilinoleik asit, dopaminokrom, aminokrom, bütadien, akrolein, aflatoksin B1-8,9-epoksit, heksaklorobütadien, trikloroetilen, stiren oksit, metilen klorid, etilenoksit, nitrokinolin oksit, lindan, atrazin, DDT gibi sayılamayacak kadar çok sayıda çevresel karsinojen, endojen moleküller ve prokarsinojenlere [38,39,44,46,49,51] maruz kalmaktadır.

Bu çevresel karsinojenler, endojen moleküller ve prokarsinojen moleküllerin vücutta oluşturduğu toksik etki ksenobiyotik mekanizmasında görevli enzimler aracılığıyla en aza indirgenmeye çalışılmaktadır. Akciğer kanseri oluşumundan sorumlu en büyük etiyolojik faktör olan sigara da bulunan PAH'lar ve nitrozamin türevleri akciğer kanserini, mortalitesi ve insidansı en yüksek kanser türü yapmıştır. Bu nedenledir ki, karsinojenlerin zararlı etkilerinden korunmada ve kanser oluşumunda ksenobiyotik mekanizmasının rollerinin ayrıntılı bir şekilde incelenmesi gerekir.

Bu amaçla yapılan çalışmaların birinde, Spivack ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada I. Faz ve II. Faz enzimlerinin akciğer kanserli hastalarda normal ve tümörlü dokularda gen ve protein ifadelerini incelemişlerdir. Buna göre yapılan çalışmada, hastaların normal dokularının %9'unda CYP1A1, %75'inde CYP1B1, %16'sında GSTM1, %68'inde GSTM3, %95'inde GSTP1 ve %73'ünde de GSTT1 izozimlerinin mRNA ifadelerini, tümörlü dokuların %23'ünde CYP1A1, %95'inde CYP1B1, %19'unda GSTM1, %79'unda GSTM3, %92'sinde GSTP1 ve %76'sında da GSTT1 izozimlerinin mRNA ifadelerini rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada hastaların tümörlü dokularının %20'sinde CYP1A1, %94'ünde CYP1B1, %3'ünde GSTM1 ve %97'sinde GSTP1 izozimlerinin protein ifadeleri ile hastaların normal dokularının %27'sinde CYP1A1, %76'sında CYP1B1, %6'sında GSTM1 ve %86'sında GSTP1 izozimlerinin protein ifadelerinde bildirmişlerdir [62]. Ayrıca bu çalışmada varyansların homojen dağılmadığı datalarda anlamlı istatistiksel analizlerinde Spivack ve ark. normal dokularda kadınlarda ve erkeklerde sigara içimi ile CYP1B1 izoziminin mRNA ve protein ifadeleri arasında pozitif yönde ilişki olduğunu ve kadınlarda tümörlü dokularında sigara içimiyle GSTM3 izoziminin pozitif ilişkili olduğunu bildirmiştir [63].

Lin ve ark. (2003), 89 KHDAK'lı hastayla yaptığı çalışmada hastaların dokularında %47 oranında CYP1B1'in protein ifadesinin olduğunu vurgularken, sigarada bulunan PAH'lar tarafından indüklenen AhR ile CYP1B1 izoziminin ilişkisini incelemişlerdir. Buna göre AhR proteininin ifadesinin 89 KHDAK'lı hastanın 64'ünde yüksek düzeyde ifade edildiğini, AhR protein ifadesi yükseldikçe CYP1B1 protein ifadesinin de hastalarda arttığını istatistiksel olarak doğrulamışlardır [65].

Chang ve ark. (2007) buna benzer yaptığı bir çalışmada akciğer kanserli hastaları sigara durumuna göre içenler ve içmeyenler şeklinde iki gruba ayırmışlar CYP1B1 protein ifadesinin AhR ile her iki grupta da pozitif yönde ilişkili olduğunu vurgularken; buna ek olarak sigara içenlerde CYP1A1 ile AhR protein ifadeleri arasında da anlamlı ilişkinin olduğunu, bu grupta CYP1A1 ifade düzeyi arttıkça, AhR ifadelerinin de arttığını bildirmişlerdir [62]. Mollerup ve ark. (1999)'nın normal akciğer dokularında yaptıkları çalışmada, erkek sigara içicileri ile kadın sigara

içicileri karşılaştırıldığında, kadınların akciğerinde, aromatik/hidrofobik DNA katılım ürünlerinin ve CYP1A1 seviyelerinin yüksek olduğunu vurgulanmıştır [53].

Oyama ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada, CYP1A1, CYP2E1 ve CYP3A enzimlerinin AhR ile pozitif yönde ilişkili olduğunu gösterdikleri çalışmada, 66 yaş ve daha üstü bireylerde, yılda ortalama 400 (adet/günxyl) ve daha aşağı oranda sigara içenlerde, tümör evre 1 grup hastalarda ve kadınlarda AhR, CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6 ve CYP3A ifadelerinin yüksek olduğunu istatistiksel olarak da doğrulamışlardır [64].

Mc Lemoire ve ark. (1990), akciğer kanserli 56 hasta ile nothern blotlama yöntemi ile yaptıkları çalışmada, 10 hastada CYP1A1 mRNA'sını [54], immunohistokimyasal yöntemle 12 akciğer kanserli hastada da Taussaint ve ark. (1993), CYP1A1 izoziminin protein ifadesini göstermişlerdir [55]. Nikotin metabolizmasında CYP2A6 izoziminin rolünü aydınlatmaya yönelik çalışmalar artsa da, son zamanlarda özellikle, Su ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada, solunum yollarında nikotin metabolizmasında, monooksijenasyon reaksiyonlarını kataliz eden, CYP2A13 izoziminin ifade düzeyinin CYP2A6'ya göre daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir [56].

Anttila ve ark. (1997), 8 akciğer kanserli hasta ile yaptıkları çalışmada hastaların tamamının tümörlü dokularında CYP3A5 mRNA'sını ve birinde de CYP3A4 mRNA'sını bulduklarını ve aynı zamanda bu hastaların normal dokularında her iki izoziminde mRNA'larının bulunduğunu rapor etmişlerdir [58].

Kivisto ve ark. (1996) yaptıkları pilot çalışmada, 8 hastanın akciğer normal ve karsinomali dokularında CYP3A4, CYP3A5 ve CYP3A7 izozimlerinin mRNA'larını ve CYP3A protein ifadesini göstermişler, buna göre tümörlü ve normal dokuların tamamında CYP3A4'ün mRNA'sının ifade olduğunu, CYP3A5'in normal dokuların 4'ünde, tümörlü dokuların tamamında ve CYP3A7'nin de normal dokuların 5'inde tümörlü dokuların 1'inde ifade olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca CYP3A proteininin hem tümörlü hem de normal dokuların tamamında ifade olduğunu rapor etmiştir [57].

Yapılan bu tez çalışmasında, KHDAK'lı hastaların tümörlü ve normal dokularında, ksenobiyotik mekanizmasında I. Faz reaksiyonları katalizleyen CYP enzimlerinden, CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1 izozimleri ile II. Faz reaksiyonları katalizleyen GST enzimlerinden GSTP1, GSTM1, GSTT1 izozimlerinin gen ve protein ifadelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla yapılan çalışmada I. Faz reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerin mRNA düzeylerine bakıldığında, 4 hastada (%10,3) CYP1A1 izoziminin; 15'inde (%38,46) ve 7 hasta da (%17,9) CYP2E1 izozimlerinin mRNA ifadelerinin rölatif kantitasyon oranları hesaplanabilmiştir. CYP1A1 izoziminin mRNA'sının toplamda 4 hastanın normal dokularında tümörlü dokularında, 9 hastanın tümörlü ve 6 hastanın normal dokularında CYP1B1 izoziminin rölatif kantitasyon miktarlarının fazla olduğu ve 3 hastanın tümörlü, 4 hastanın da normal dokularında CYP2E1 izoziminin mRNA'sının rölatif kantitasyon oranının yüksek olduğu görülmüştür. Hastaların mRNA düzeyleri ile tümör evre, sigara içimi, yaş ve cinsiyet gibi klinik verileri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişkiler bulunamamıştır. Ancak klinik verilerle izozimlerin elde ettiğimiz mRNA düzeyleri karşılaştırıldığında, CYP1A1 ve CYP1B1 mRNA'ları Evre 1 hastalarda Oyama ve ark.'nın yaptıkları çalışmaya paralel olarak daha fazla ifade olsa da CYP2E1 mRNA'sı Evre 3 hastalarda daha fazla kişide ifade olmuştur (Çizelge 3.3).

Çalışma grubumuzda sigara içen hastaların sayısı 30 ve içmeyen hastaların sayısı 9 kişi olarak 2 gruba ayrılmaktadır, mRNA düzeylerini hesaplayabildiğimiz CYP izozimleri, bu gruplarla karşılaştırıldığında; CYP1A1 (3/4), CYP1B1 (12/15) ve CYP2E1 (6/7) mRNA düzeylerinin sigara içenlerde daha fazla kişide ifade oldukları görülmektedir. Kişi sayısına oranlandığında ise CYP1A1 sigara içmeyen grupta daha fazla oranla ifade edilirken, CYP1B1 ve CYP2E1 ise sigara içen gruplarda daha fazla oranla ifade edildiği görüldü. İstatistiksel olarak doğrulanamasa da sigara içiminin CYP enzimlerinin mRNA düzeylerini arttırdığı gerçeği yapılan bu çalışmada da literatüre paralel bulgular şeklinde gösterilmiştir (Çizelge 3.4.).

CYP izozimlerinin mRNA düzeylerinin hastaların yaşlarına göre dağılımına bakıldığında CYP1A1 ve CYP1B1 mRNA miktarları yaş ortalamaları 57 ve üstü

olan grupta daha fazla kişide ifade edilirken; CYP2E1 izoziminin mRNA düzeyi ise 57 yaş altı grupta daha fazla kişide ifade edildiği görüldü (Çizelge 3.5).

I Faz izozimlerinin protein ifadelerinin literatürle kıyaslanmasına bakıldığında, CYP1A1 izoziminin 39 KHDAK'lı hastadan 38 (%97,4)'inde, CYP1B1 izoziminin 39 hastanın tamamında (%100) ve CYP2E1 izoziminin 39 hastanın 25 (%64,1)'inde tümörlü ve normal dokularının birinde ya da her ikisinde protein ifadelerinin olduğu görüldü. Tümörlü ve normal dokular eşleştirilerek CYP izozimlerinin protein ifadelerine bakıldığında 39 KHDAK'lı hastadan; CYP1A1 izoziminin 15 hastada (%38,5), CYP1B1 izoziminin 3 hastada (%7,7) ve CYP2E1 izoziminin 21 hastada (%53,8) tümörlü dokularında normal dokularına oranla daha fazla ifade olduğu görüldü. Çalışmamızda tümörlü ve normal dokularda CYP enzimlerinin protein ifadeleri miktarlarının yüksek oranda olması literatüre paralellik gösterirken KHDAK'lı hastaların tümörlü ve normal dokularda sadece CYP2E1 izoziminin protein ifadesinin tümörlü dokulardaki artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Ayrıca akciğer adenokarsinomalı hastaların tümörlü dokularında CYP1A1 izoziminin normal dokulara oranla daha fazla ifade olması da istatistiksel olarak anlamlı bir fark olarak doğrulandı ($p<0,05$) (Çizelge 3.13.)

Hastaların tümör evrelerine göre CYP enzimlerinin protein ifadeleri karşılaştırıldığında CYP1A1 ve CYP1B1 izozimlerinin protein ifadelerinin ortalamaları tümör evreleri arttıkça artmış olsa da bu artış istatistiksel olarak doğrulanamadı. Ancak CYP2E1 proteininin, her üç evre de hastaların tümörlü dokularında normal dokularına oranla daha fazla ifade olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Çizelge 3.14).

Hastaların sigara içim durumları ile CYP izozimlerinin protein ifadeleri karşılaştırıldığında CYP2E1 izoziminin protein ifadesinin sigara içen ve içmeyen grupların her ikisinde de tümörlü dokularda arttığı ve aynı zamanda squamoz hücreli karsinomalı hastalarda sigara içen grupta tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla ifade edildiği istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Ayrıca akciğer adenokanserinde CYP1A1 proteininin sigara içen grupta içmeyenlere oranla tümörlü

dokularında daha fazla ifade edildiği literatüre paralel olarak doğrulandı ($p<0,05$) (çizelge 3.15.).

CYP2E1 izozimi 57 yaş altı ve üstü her iki grupta da hastaların tümörlü dokularında normal dokularına oranla daha fazla ifade olduğu istatistiksel olarak doğrulanırken ($p<0,05$), ayrıca bu izozim 57 yaş üstü squamoz hücreli karsinomlu dokularda tümörde daha fazla ifade edilmiştir ($p<0,05$).

CYP izozimlerinin protein ifadeleri ile hastaların klinik bilgileri arasında yapılan ilişki analizlerinde anlamlı sonuçlar bulunamamıştır.

II.Faz reaksiyonlarını katalizleyen GST izozimlerinin mRNA ve protein ifadelerinin incelendiği sınırlı sayıdaki çalışmalara bakıldığında; Oğuztüzün ve ark. (2010), immunohistokimyasal yöntemle KHDAK'lı hastaların dokularında yaptığı çalışmada sırasıyla GSTA1, GSTM4, GSTT1 ve GSTP1 izozimlerinin protein ifadelerinin, tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha yüksek olduğunu vurgulamışlardır [67]. Tang ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada, 50 KHDAK'lı hastanın tümör ve normal dokularında GSTM2 izoziminin mRNA ifdesini karşılaştırdığında, tümörlü dokularda GSTM2 mRNA ifadesinin normal dokulardakine oranla daha düşük oranlarda olduğunu vurgularken [68], 82 KHDAK'lı hastanın tümörlü ve normal dokularında GSTM2 izoziminin mRNA ifadelerini araştırdığı bir çalışmasında da, tümörlü dokularda GSTM2 izoziminin gen ifadelerinin oranlarının normal dokulara oranla yüksek olduğunu rapor etmiştir [69].

Platin bazlı kanser ilaçlarından özellikle cisplatin antikanser ilacına karşı GSTP enziminin hücrede sağladığı ilaç direncini göstermek amacıyla yapılan çalışmalarda Bai ve ark. (1996), cisplatin bazlı kemoterapi tedavisi gören 38 KHDAK'lı vakada GSTP ekspresyonunu immunohistokimyasal olarak incelemişler ve sonuç olarak hastaların %66'sında GSTP enziminin protein ifadesinin yüksek olduğunu, bu hastalarda tedaviye yanıtın, ekspresyon olamayan hastalara göre daha düşük olduğunu ve bu sonucun kemoterapideki önemini vurgulamışlardır [70]. Nakanishi ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada 54 KHDAK'lı hastanın transbronşiyal biyopsi örneklerinde %69 oranında GSTP enziminin protein ifadesini göstermişler ve bu

hastaların cisplatin antikanser ilacıyla yapılan tedaviye verdikleri yanıtın düşük olduklarını vurgulamışlardır [71]. Bunların aksine, Ünsal ve ark. (2003), 38 KHDAK'lı ve 23 KHAK hastada GSTP enziminin protein ifadeleri ile bu hastalara uygulanan cisplatin tedavisine karşı göstermiş oldukları yanıtı ilişkilendirdikleri çalışmalarında; ilaca yanıtla hasta gruplarında GSTP ifadesi arasında anlamlı ilişki bulamazlarken, KHDAK'da GSTP pozitifliğinin KHAK'ya oranla daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir [72].

Yapılan bu tez çalışmasında 39 KHDAK'lı hastanın 13'ünde (%33,33) GSTP1 izoziminin, 13'ünde (%33,33) GSTM1 izoziminin ve 25'inde (%64,1) de GSTT1 izoziminin mRNA'larının rölatif gen ifadelerinin oranları hesaplanabilmiştir. Buna göre GSTP1 izoziminin mRNA'sının ifade olduğu 13 hastanın 8'inin tümörlü ve 5'inin normal dokularında, GSTM1 izoziminin mRNA'sının ifade olduğu 13 hastanın 5'inin tümörlü ve 8'inin normal dokularında, GSTT1 izoziminin mRNA'sının ifade olduğu 25 hastadan 10'unun tümörlü ve 15'inin de normal dokularında gen ifadelerinin oranı yüksek bulunmuştur (Çizelge 3.7.).

Yapılan bu çalışmada, GST enzimlerinin gen ifadelerinin oranları ile hastaların tümör evreleri karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark ve ilişki bulunmasa da, Oyama ve ark'nın yaptıkları çalışmaya paralel olarak üç GST izoziminde sırasıyla, GSTP1 (6/13), GSTM1(7/13), GSTT1 (10/25) izozimlerinin mRNA oranlarının tümör evre 1 grubu hastalarda diğerlerine oranla daha fazla kişide ifade edildiği görüldü (Çizelge 3.8.).

Sigara içimi ile hastaların tümörlü ve normal dokularında yapılan bu çalışmada CYP enzimlerinin gen ifadeleri oranları arasında istatistiksel açıdan doğrulanamasa da GSTP1 izoziminin mRNA'sının görüldüğü 13 hastanın 10'u, GSTM1 izoziminin mRNA'sının ifade olduğu 13 hastanın 9'u ve GSTT1 izoziminin mRNA'sının ifade olduğu 25 hastanın 20'si sigara içen grupta yer almaktadır. Sigara içen ve içmeyen gruplarda aynı oranda mRNA ifadesi gösterirken, GSTM1 sigara içmeyen grupta daha fazla oranda ve GSTT1 ise sigara içen grupta sayıca daha fazla oranda mRNA ifadesi göstermiştir (Çizelge 3.9.).

Yaş grupları ile GST izozimlerinin mRNA düzeyleri karşılaştırıldığında kişi sayısına oranla her üç izoziminde 57 yaş ve üstü kişilerde daha fazla oranla ifade olduğu görüldü.

Yapılan bu çalışmada GST izozimlerinin protein ifadeleri oranına bakılacak olursa, Soguztuzun ve ark.'nın yaptıkları çalışmadan farklı olarak, GSTP1 izoziminin 39 KHDAK'lı hastanın tamamında (%100), GSTM1 izoziminin 39 hastanın 17 (%43,6)'sinde; GSTT1 izoziminin 39 hastanın 35 (%89,7)'inde tümörlü ve normal dokularının birinde ya da her ikisinde protein ifadelerinin olduğu görüldü. KHDAK'da tümörlü ve normal dokular eşleştirildiğinde toplamda GSTP1 izoziminin protein ifadesinin 9 hastada (%23,1), GSTM1 izoziminin protein ifadesinin 14 hastada (%35,9) ve GSTT1 izoziminin protein ifadesinin de 13 hastada (%33,3) tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. Buna göre GSTM1 izoziminin protein ifadelerinin oranı çalışmamızda düşük olsa da KHDAK'lı hasta grubunun tamamında ve squamoz hücreli karsinomlu hastalarda tümör dokularında normal dokularına oranla daha fazla ifade olduğu istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Çizelge 3.19.).

Tümör evreleri ile GSTP1 izoziminin protein ifadesi arasında düşük düzeyde pozitif yönde anlamlı ilişki görülürken ($p<0,05$, $r=0,30$), KHDAK'lı hastaların tamamı ve squamoz hücreli karsinomlu hastalarda sigara içen gruplarda tümörlü dokularında GSTM1 izoziminin protein ifadesinin artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Çizelge 3.22.).

Hastaların yaş gruplarına göre GST izozimlerin protein ifadeleri incelendiğinde GSTM1 izoziminin KHDAK'lı hastalarda 57 yaş altı grupta tümör dokularında daha fazla ifade edildiği ve squamoz hücreli karsinomlu hastalarda 57 yaş altı ve üstü grupların her ikisinde de tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla ifade edildiği görüldü ($p<0,05$) (Çizelge 3.23).

Çalışmada CYP ve GST izozimlerinin gen ifadeleri diğer floresans boyar maddeleri barındıran problemlerden daha özgül olan ve Roche Diagnostic firmasının geliştirdiği ve diğer patent isimlerince TaqMan prob olarak da bilinen hidroliz problemlerle β -actin referans genine karşı normalize edilerek hesaplanmıştır. 39 hastadan da analiz yapılabilir düzeyde mRNA pürifikasyonu gerçekleştirilmiş, ayrıca çalışmada literatürde akciğer kanserlerinde yapılan housekeeping gen validasyon çalışmasında önerilen polR2A, ve rRNA18S housekeeping (referans) genleri de kullanılmış [76], ancak çalışma boyunca bu housekeeping genlerle sonuç alınamayınca β -actin housekeeping gen kullanılarak normalizasyon işlemi tamamlanmıştır.

Parafine gömülü dokulardan gen ifadelerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda elde edilecek sonuçlarla, moleküler teşhis yöntemleri ve hastalıkların prognozunun iyi bir şekilde geriye dönük olarak aydınlatılabileceği, yeni teşhis ve tedavi yöntemleri geliştirilirken arşiv dokularından da moleküler düzeyde yararlanılabileceği düşüncesiyle [77], bu tez çalışmasında da arşiv dokularından CYP ve GST enzimlerinin gen ifadeleri çalışılmıştır. Ancak, enzimlerin gen ifadelerinin oranları verilen literatür çalışmalarıyla kıyaslandığında düşük düzeyde ve sayıda bulunmuştur. Bunun nedeni olarak parafine gömülü arşiv dokularının RNA miktarlarının, taze dokularındakine oranla düşük olması şeklinde yorumlanabilir. Bu açıdan düşünüldüğünde formalinle tespit edilip parafine gömülmüş dokularda moleküler inceleme yapılması mümkün olsa bile daha güvenilir sonuçlar alabilmek için taze dokuya gerek duyulmaktadır.

CYP ve GST izozimleri sadece çevresel ve prokarsinojenlerin metabolizmasında onları detoksifiye etmek için görev almazlar. Başta kanser ilaçları olmak üzere kullanılan ilaçların inaktivasyonunu sağlayarak çoklu ilaç direncine özellikle kanser hastalıklarında neden olabilirler. Purnapatre ve ark. (2008) yayınladıkları bir çalışmada, akciğer kanserinin tedavisinde kullanılan antikanser ilaçlardan, Vinorelbine, Erlotinib, Vindesine'nin CYP3A4 izozimi tarafından, Docetaxel'in CYP3A ve CYP1B1 tarafından, Gefitinib'in CYP3A ve CYP2D6 tarafından, Paclitaxel'in CYP3A ve CYP2C8 tarafından, Etoposide'in CYP3A4, CYP2E1, CYP1A2 tarafından metabolize edildiğini bildirmiştir [79]. Eaton ve ark. (1999) cis-platin gibi, platin bazlı kanser ilaçları olmak üzere, klorambusil, siklofosamid,

tiyotepe, fosfomisin, etakrinik asit, nitrogliserin, adriamisin, asetaminofen gibi ilaçlarında GST'lerin substratları olduklarını bildirmişlerdir [51].

Yapılan bu tez çalışmasında kullanılan dokular patolojik olarak ilk teşhislerini aldıkları, kemoterapi almamış hastaların biyopsi materyalleridir. Bu dokularda yapılan özellikle protein ifadelerinin belirlenmesine yönelik immunohistokimyasal boyama sonucuna göre, literatür verilerine paralel olarak CYP1B1 ve GSTP1 izozimlerinin hastaların normal ve tümörlü dokularında immunohistokimyasal olarak aşırı ifade edildiği görülmektedir. Hastaların aldıkları ilaçlarla, çalışılan enzimlerin arasındaki ilişkiyi gösterir türden bir çalışma olmamasına karşın, bu enzimlerin aşırı ifade olduğu hastaların klinikte kemoterapi öncesi belirlenip ya ilaç çeşitlerinin değiştirilmesinin yada bu enzimleri inhibe edecek maddelerle birlikte ilaçların verilmesinin, hastaların tedaviye yanıtını daha da güçlendireceği düşüncesindeyiz. Bu konuda McFadyen ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada bir CYP1 enzim inhibitörü olan alpha-naphthoflavone (ANF) ile Docetaxel antikanser ilacının birlikte verilmesiyle kanserli hücre hatlarında sitotoksitenin arttığını istatistiksel olarak doğrulamıştır [80]. Yapılan diğer çalışmalarda da, memeli kanser hücre hatlarının GST inhibitörü olan etakrinik asitle önceden muamele edilmesiyle mitomisin, klorombusilin ve melfalanın sitotoksitesini arttığı gösterilmiştir [81-83].

Şüphesiz kanser oluşum mekanizmasında ksenobiyotik mekanizmasının üyelerinden CYP ve GST enzimlerinin rollerini tümörlü ve normal dokular arasındaki gerek gen, gerekse protein ifadelerinin farklılıklarına bakarak anlatmak büyük bir eksiklik olur. Hücre hemoostazisinde önemli yer tutan, aşırı ifadeleri veya eksikliklerinde kanser oluşumuna neden olan veya kanserli hastalarda da ilaç direnci geliştirip kemoterapinin etkisini en aza indiren bu enzim sisteminin hücre içi diğer moleküler yollarla ilişkisinin araştırılması gerekir.

Yapılan birçok çalışmada, pekçok antikanser bileşiğin, MAP-kinaz yollarını, özellikle JNK ve p38 yollarını, aktive ederek hücreyi apoptozise götürdüğü bildirilmiştir [84,85]. GSTP ve GSTM sınıfı GST'lerin, hücresel yaşam ve ölüm sinyal iletimine katılan, mitojen ile aktive edilmiş protein kinaz (mitogen-activated protein kinase-MAP kinase) yolağındaki düzenleyici rolünün de kemoterapötik

ilaçlara direnç gelişmesinde etkili olduğunu göstermiştir. GSTP'nin MAP kinazlardan biri olan ve apoptozis yolağında anahtar enzim olan JNK ile (c-Jun N-terminal kinase 1) JNK-GSTP kompleksi oluşturarak JNK1'i inhibe ettiği ve böylece nihai etkisi istemli hücre ölümü olan JNK'nın etkisini ortadan kaldırdığı bildirilmiştir [86-91].

Yapılan bir çalışmada GSTM1 genotipinin eksikliği olan sigara içen akciğer adenokanserli hastalar ile sigara içmeyen akciğer adenokanserli hastalar ve GSTM1 genotipine sahip olan kanserli hastalar karşılaştırıldığında *Ki-Ras* onkogen mutasyonunun GSTM1 eksikliği olan hastalar ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [92].

Özetle söylenecek olursa, yapılan bu tez çalışmasında KHDAK'lı 39 hastanın tümörlü ve normal dokuları arasında CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1 ve GSTP1 izozimlerinin gen ve protein ifadelerinin farklılıkları incelenmiş ve bu kanser oluşumunda ksenobiyotik ve ilaç metabolizmasında görev alan bu enzimlerin rolleri aydınlatılmaya çalışılmıştır. Hastaların tümörlü ve normal dokuları arasında enzimlerin gen ifadelerinin oranı parafine gömülü dokulardan izole edilen mRNA ile incelenmiş geriye dönük olarak hasta dokularında moleküler tanı yöntemlerinin de kullanılabilirliği gösterilmiştir. Literatürde taze dokulardan yapılan gen ifade çalışmalarının daha güvenilir olduğu bilgisinden hareketle, aynı çalışmanın bu kanser türünde taze dokularda da yapılabileceği aradaki farkın belirtilmesi gerekmektedir. İmmunohistokimyasal açıdan incelendiğinde literatür verilerine uygun olarak çalışmamızda yaklaşık olarak hastaların tamamında normal ve tümörlü dokularında CYP1B1 ve GSTP1 izozimlerinin protein ifadelerinin aşırı yüksek olduğu görülmektedir. Bu enzimlerin aşırı ifadelerin yanında CYP1A1, CYP2E1 ve GSTM1 izozimlerinin protein ifadelerinin tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha yüksek olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tez çalışması kapsamında incelenen hastalar ilaç almayan hastalar olduğundan, bu izozimlerin ifadelerinin ilaç etkileşimleriyle olan ilişkisi bu çalışmada belirtilemese de, literatür verilerine göre bu izozimlerin substratı olan, özellikle platin ve alkilleyici ajan bazlı kanser ilaçlarının özellikle GSTP1 ve CYP1B1 protein ifadeleri yüksek olan hastalara verilmemesi hususunda klinik açıdan bir ön bilgi oluşturmaktadır. Kemoterapatik açıdan incelendiğinde, bu enzimlerin KHDAK'da kullanılan anti kanser ilaçları ile

ilişkilendirildiği ve ilaç direncine yol açan yolakların ayrıntılı bir biçimde belirleyecek çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı, Dünya Kanser Raporu 2008, Ed. P. Boyle, B. Levin, Lyon Cedex 08, Fransa 2008.
- [2] T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı <http://www.kanser.gov.tr/index.php/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri.html> Erişim tarihi. 12.06.2013.
- [3] Vural, N., Toksikoloji, A.Ü. Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 73, 1996.
- [4] Kayaalp, S. O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi farmakoloji, 1. Cilt, Güneş Yayınevi, 1994.
- [5] Köktürk N., Öztürk C., Kırıçoğlu C.E., Sigara ve Akciğer Kanseri. Solunum. 5:139-145, 2003.
- [6] G. Uçar, Akciğer Kanselerinde Siklooksijenaz-2, Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü, Osteopontin ve Human Papilloma Virüsün Prognostik Önemi. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Adana, 2007.
- [7] Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. Chest. 123: 21-49, 2003.
- [8] Mulshine JL. Reducing lung cancer risk: early detection. Chest. 116:493-496, 1999.
- [9] Gil L., Adonis M., Genomics and proteomics offers new hopes towards a personalized approach to lung cancer prevention and treatment. Electronic Journal of Biotechnology. 6: 3, 2003.

- [10] Cooke B., T. F. Indoor Air Pollutants, A. Literatüre Review, Reviews on Environmental Health. 9. 3. 1991.
- [11] Heah C.W., Electromagnetic Field Exposure and Cancer: A Review of Epidemiological Evidence, CA-A Cancer Journal For Clinicians, 46, 1, Jan-feb, 29-44, 1996.
- [12] Last, J. M., Wallace. R. B. Maxcy - Rosensu - Last Public Health And Preventive Medicine, Appleton Lange, Newyork, 1992.
- [13] Ç. Akdoğan, Radon Kirliliği Ve Halk Sağlığı İlişkisi, Ege Üniversitesi Bitirme Tezi. İzmir, 2010.
- [14] Müsellim B., Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi Ve Etyolojisi, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikler, Türkiyede Sık Karşılaşılan Hastalıklar II, Sempozyum Dizisi No:58, s.113-118, 2007.
- [15] İtil O. Akciğer kanserlerinin epidemiyolojisi ve etiolojisi. In:Haydaroğlu A. Akciğer kanserleri; tanı ve tedavi. 1. Baskı. İzmir, Ege Üniversitesi Basımevi. 15-34, 2000.
- [16] Smith JT, Yang G, Seril ND, Liao J, Kim S. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-butanone induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. Carcinogenesis. 19: 703–706, 1998.
- [17] Alkoçlu A, Özkurt S. Akciğer kanserini önleyici ilaç tedavisi. Ed. Hastürk S, Yüksel M. Akciğer kanseri, Özlem Grafik Matbaacılık, 351–358, İstanbul, 2000.
- [18] Schottenfeld D. Etiology and epidemiology of lung cancer. In: Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH, Turrisi AT, Minna JD, Eds. Lung Cancer.2nd Ed., Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 367-388, 2000.

- [19] Bouchardy C, Benhamou S, Jourenkova N, Dayer P, Hirvonen A. Metabolic genetic polymorphisms and susceptibility to lung cancer. *Lung Cancer*, 32: 109–112, 2001.
- [20] Wei Q, Spitz MR. The role of DNA repair capacity in susceptibility to lung cancer: A review. *Cancer and Metastasis Reviews*, 16: 295–307, 1997.
- [21] World Health Organization. Histological typing of lung and pleural tumors. World Health Organization, Copenhagen, 1999.
- [22] Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavi Rehberi, Türk Toraks Dergisi. (7):2, s:001-035, 2006.
- [23] Trends in Lung Cancer Morbidity and Mortality American Lung Association epidemiology and statistics unit research and program services, 2005.
- [24] Zeren EH. Akciğer Kanserine Patolojik Yaklaşım. In: Hastürk S, Yüksel M, Eds. Akciğer Kanseri. Bilmedya Grup, 2: 29–45 İstanbul, 2000.
- [25] Travis WD, Linder J, Mackay B. Classification, histology, cytology and electron microscopy. In: Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH, Turrisi AT, Eds. Lung cancer principles and practice. Philadelphia, Lipincott Williams&Wilkins 2nd Ed. S:361–389, 1996.
- [26] Işıtmangil T., The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the forthcoming Seventh Edition of the TNM classification of non-small cell lung cancer, Turkish J Thorac Cardiovasc Surg. 16(1):58-64, 2008.
- [27] Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest*. 111:1710-7, 1997.
- [28] Vural, N., Toksikoloji, A.Ü. Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 73, 2005

- [29] Jamieson D., BCM1.2 Molecular Toxicology Xenobiotic metabolism. http://web.sls.hw.ac.uk/teaching/Derek_J/mol_tox/lectures/files/xenobiotic_m_etabolism/index.html, Erişim Tarihi: 15.06.2013
- [30] Taban U.B., Akciğer Kanseri Hastalarında Ve Sağlıklı Bireylerde GSTP1 Geni ekzon 6 Polimorfizminin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2005.
- [31] Polat M., Akciğer Kanseri Hastalarında Ve Sağlıklı Bireylerde GSTM1 Gen Delesyonunun Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemiyle Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, 2005.
- [32] Murray R.K., Mayes P.A., Granner D.K., Rodwell V.W., Harper'ın Biyokimyası, s; 811-817, Çev.: Menteş G., Ersöz B., Barış Kitabevi, İstanbul, 1990.
- [33] Guengerich, F.P., Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics. Edited by Ioannides C. John Wiley and Sons Ltd, USA, 2002.
- [34] Cantürk P., Mide Antrum Mukoza Örneklerinde Sitokrom P450 Gen Ekspresyonunun mRNA Düzeyinde Belirlenmesi, Ege Üniversitesi. Yüksek Lisans Tezi. İzmir, 2008.
- [35] Nhamburo, P.T., Gonzalez, F.J., McBride, O.W., Gelboin, H.V. and Kimura, S., Identification of a new P450 expressed in human lung: complete cDNA sequence, cDNA-directed expression, and chromosome mapping. *Biochemistry* 28:8060-8066, 1989.
- [36] Raunio, H., Pasanen, M., Maenpaa, J., Hakkola, J. and Pelkonen, O., Expression of extrahepatic cytochrome P450 in humans. In: Pacifici GM and Fracchia GN (eds) *Advances in Drug Metabolism in Man*: 234-287. European Commission, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 1995.

- [37] Imaoka, S., Yamada, T., Hiroi, T., Hayashi, K., Sakaki, T., Yabusaki, Y. And Funae, Y., Multiple forms of human P450 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, systematic characterization and comparison with those of the rat. *Biochem Pharmacol* 51:1041-1050, 1996.
- [38] Schmidt, J.V., Bradfield, C.A., Ah receptor signalling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 55-89, 1996.
- [39] Willey, J.C., Coy, E.L., Frampton, M.W., Torres, A., Apostolakos, M.J., Hoehn, G., Schuermann, W.H., Thilly, W.G., Olson, D.E., Hammersley, J.R., Crespi, C.L. and Utell, M.J., Quantitative RT-PCR measurement of Cytochromes p450 1A1, 1B1, and 2B7, microsomal epoxide hydrolase, and NADPH oxidoreductase expression in lung cells of smokers and nonsmokers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17:114-124, 1997.
- [40] Shimada, T., Hayes, C.L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S.S., Guengerich, F.P., Sutter, T.R., Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res* 56:2979-2984, 1996.
- [41] Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C. and Nebert, D.W., P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6:1-42, 1996.
- [42] Ingelman-Sundberg, M., Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants The role of the CYP family of enzymes, *Mutation Research* 482:11–19, 2001.
- [43] Lieber, C.S., Cytochrome P-4502E1: Its physiological and pathological role. *Physiol Rev.*, 77:517-544, 1997.

- [44] Hecht, S.S., Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl. Cancer Inst.* 91:1194-1210, 1999.
- [45] Kushida, H., Fujita, K., Suzuki, A., Yamada, M., Endo, T., Nohmi, T., Kamataki, T., Metabolic activation of N-alkylnitrosamines in genetically engineered *Salmonella typhimurium* expressing CYP2E1 or CYP2A6 together with human NADPH-cytochrome P450 reductase. *Carcinogenesis*, 21:1227-1232, 2000.
- [46] Yamazaki, H., Inui, Y., Yun, C.H., Guengerich, F.P.,m Shimada, T., Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of N-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis* 13:1789-1794, 1992.
- [47] Guengerich, F.P., Cytochromes P450 of human liver. Classification and activity profiles of the major enzymes. In: Pacifici GM and Fracchia GN (eds) *Advances in drug metabolism in man*: 179-231. European Commission. Office for the Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 1995.
- [48] Ronis, M.J.J., Lindros, K.O. and Ingelman-Sundberg, M., The CYP2E subfamily. In: Ioannides C and Parke DV (eds) *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*: 211-239. CRC Press, Boca Raton, 1996.
- [49] Thummel, K.E., Wilkinson, G.R., In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:389-430, 1998.
- [50] Figen HANÇER, Akciğer Kanserinde Metabolik Polimorfizmin (GSTP1 Ala114Val) İlaç Rezistansındaki Rolü, Ankara Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi. Ankara, 2006.

- [51] Eaton, D.L., Bammler, T.K., Concise Review Of Glutathione S-Transferase And Their Significance To Toxicology. *Toxicological Sciences*, 49: 156-164, 1999.
- [52] Hayes J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R. Glutathione Transferases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45:51–88, 2005.
- [53] Mollerup, S., Ryberg D., Hewer A., Phillips D. H., Haugen A., Sex differences in lung CYP1A1 expression and DNA adduct levels among lung cancer patients. *Cancer Res* 59, 3317-3320, 1999.
- [54] McLemore, T. L., Adelberg S., Liu M. C., McMahon N. A., Yu S. J., Hubbard W. C., Czerwinski M., Wood T. G., Storeng, R., Lubet R.A., Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer: evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas. *J Natl Cancer Inst.*, 82, 1333-1339, 1990.
- [55] Toussaint, C., Albin N., Massaad L., Grunenwald D., Parise O. J., Morizet J., Gouyette A., Chabot G., Main drug- and carcinogen-metabolizing enzyme systems in human non-small cell lung cancer and peritumoral tissues. *Cancer Res*, 53, 4608-4612, 1993.
- [56] Su, T., Bao Z., Zhang Q. Y., Smith T. J., Hong J. Y., Ding X., Human cytochrome P450 CYP2A13: predominant expression in the respiratory tract and its high efficiency metabolic activation of a tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res.*, 60, 5074-5079, 2000.
- [57] Kivisto, K. T., Griese E.U., Fritz P., Linder A., Hakkola J., Raunio H., Beaune P., Kroemer H.K., Expression of cytochrome P 450 3A enzymes in human lung: a combined RT-PCR and immunohistochemical analysis of

normal tissue and lung tumours. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 353, 207-212, 1996.

- [58] Anttila, S., Hukkanen J., Hakkola J., Stjernvall T., Beaune P., Edwards R. J., Boobis A.R., Pelkonen O., Raunio H., Expression and localization of CYP3A4 and CYP3A5 in human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 16, 242-249, 1997.
- [59] Spivack, S. D., Hurteau G. J., Reilly A. A., Aldous K. M., Ding X., Kaminsky L. S., CYP1B1 expression in human lung. *Drug Metab Dispos.* 29, 916-922, 2001.
- [60] Czerwinski, M., McLemore T. L., Gelboin H. V., Gonzalez F. J., Quantification of CYP2B7, CYP4B1, and CYPOR messenger RNAs in normal human lung and lung tumors. *Cancer Res.* 54, 1085-1091, 1994.
- [61] Raunio, H., Hakkola J., Hukkanen J., Pelkonen O., Edwards R., Boobis A., Anttila S., Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in human pulmonary tissues. *Arch Toxicol* 20, (Suppl) 465-469, 1998.
- [62] Chang, J. T., Chang H., Chen P.H., Lin S.L., Lin P., Requirement of aryl hydrocarbon receptor overexpression for CYP1B1 up-regulation and cell growth in human lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*, 13, 38-45, 2007.
- [63] Spivack, S. D., Hurteau G. J., Fasco M. J., Kaminsky L. S., Phase I and II carcinogen metabolism gene expression in human lung tissue and tumors. *Clin Cancer Res*, 9, 6002-11, 2003.
- [64] Oyama, T., Sugio K., Uramoto H., Kawamoto T., Kagawa N., Nadaf S., Carbone D. Yasumoto K., Cytochrome P450 expression (CYP) in non-small cell lung cancer. *Front Biosci*, 12, 2299-308, 2007.

- [65] Lin, P., Chang H., Ho W. L., Wu M. H., Su J. M., Association of aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P4501B1 expressions in human non-small cell lung cancers. *Lung Cancer*, 42, 255-61, 2003.
- [66] Kivisto, K. T., Linder A., Friedel G., Beaune P., Belloc C., Kroemer H. K., Fritz P., Immunohistochemical localization of cytochrome P450 2E1 in human pulmonary carcinoma and normal bronchial tissue. *Virchows Arch*, 426, 243-7, 1995.
- [67] Oğuztüzün, S., Aydın M., Demirağ F., Yazıcı Ü, Özhavzalı M., Kılıç M., Işcan M., The Expression of GST Isoenzymes and p53 in Non-Small Cell Lung Cancer, *Folia Histochemica Et Cytobiologica* Vol. 48,1: 122-127, 2010.
- [68] Tanga S.C., Sheua G.T., Wong R.H, Huang C.Y., Weng M.W., Leec L.W., Hsuc, C.P., Ko J.L., Expression of glutathione S-transferase M2 in stage I/II non-small cell lung cancer and alleviation of DNA damage exposure to benzo[a]pyrene, *Toxicology Letters*, 192: 316–323, 2010.
- [69] Tang S.C., Wu C.H., Lai C.H., Sung W.W., Yang W.J., Tang L.C., Hsu CP., Ko J.L. Glutathione S-Transferase Mu2 Suppresses Cancer Cell Metastasis in Non–Small Cell Lung Cancer, *Mol Cancer Res.*, 11:518-529, 2013.
- [70] Bai F., Nakanishi Y., Kawasaki M., Takayama K., Yatsunami J., Pei X. H., Tsuruta N., Wakamatsu K., Hara N., Immunohistochemical Expression of Glutathione S-Transferase-n Can Predict Chemotherapy Response in Patients with Nonsmall Cell Lung Carcinoma, *CANCER*, 78 (3), 416-421, 1996.
- [71] Nakanishi Y., Kawasaki M., Bai F., Takayama K., Pei X.H., Takano K., Inoue K., Osakia S., Hara N., Kiyohara C., Expression of p53 and Glutathione S-Transferase-δ Relates to Clinical Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer, *Oncology.*, 57:318–323, 1999.

- [72] Ünsal M, Akpolat I, Kandemir B, Glutathione-S transferase- π expression in non small cell lung cancer in the assessment of response to chemotherapy, *Saudi Med J.* 24 (5): 493-498, 2003.
- [73] Bibikova M., Talantov D., Chudin E., Yeakley J.M., Chen J., Doucet D., Wickham E., Atkins D., Barker D., Chee M., Wang Y., Fan J.B., Quantitative Gene Expression Profiling in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues Using Universal Bead Arrays, *American Journal of Pathology*, 165(5), 1799-1807, 2004.
- [74] Lee AC., Dai Z., Chen B., Wu H., Wang J., Zhang A., Zhang L., Lim TM., Lin Y., Electrochemical Branched-DNA Assay for Polymerase Chain Reaction-Free Detection and Quantification of Oncogenes in Messenger RNA, *Anal. Chem.* 80, 9402–9410, 2008.
- [75] O’Roak B.J, Deriziotis P., Lee C., Vives L., Schwartz J. J, Girirajan S., Karakoc E., MacKenzie A. P, Sarah BN, Baker C., Rieder M. J, Nickerson D. A, Bernier R., Fisher S.E, Shendure J., Eichler E.E., Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations, 43:6, 585-592, 2011.
- [76] Michael W. Pfaffl, Quantification strategies in real-time PCR, Chaper 3 pages 87 - 112 in: A-Z of quantitative PCR (Editor: S.A. Bustin) International University Line (IUL) La Jolla, CA, USA, 2004.
- [77] Saviozzi S., Cordero F., Iacono M. L., Novello S., Scagliotti G.V., Calogero R.A., Selection of suitable reference genes for accurate normalization of gene expression profile studies in non-small cell lung cancer, *BMC Cancer*, 6:200, 1-10, 2006
- [78] Lewis F., Maughan N. J., Smith V., Hillan K., Quirke P., Unlocking the archive – gene expression in paraffinembedded tissue, *J Pathol.*, 195: 66–71, 2001.

- [79] Purnapatre K., Khattar S.K., Saini K.S., Cytochrome P450s in the development of target-based anticancer drugs, *Cancer Letters* 259: 1–15, 2008.
- [80] McFadyena M.C.E., McLeod H.L., Jackson F.C., Melvinc W.T., Doehmer J., Murray G.I. Cytochrome P450 CYP1B1 protein expression: a novel mechanism of anticancer drug resistance, *Biochemical Pharmacology*, 62 207–212, 2001.
- [81] Clapper, M.L., Hoffman, S.J., Tew, K.D.: Sensitization of human colon tumor xenografts to L-phenylalanine mustard using ethacrinic acid, *J. Cell. Pharmacol.*, 1, 71-78, 1990.
- [82] O'Dwyer, P.J., LaCreta, F., Nash, S., Tinsley, P.W., Schilder, R., Clapper, M.L., Tew, K.D., Panting, L., Litwin, S., Comis, R.L., Ozols, R.F.: Phase I study of thiotepa in combination with the glutathione transferase inhibitor ethacrynic acid, *Cancer Res.*, 51(22), 6059-6065, 1991.
- [83] Petrini, M., Conte. A., Caracciolo. F., Sabbatini. A., Grassi, B., Ronca, G.: Reversing of chlorambucil resistance by ethacrynic acid in a B-CLL patient, *Br. J. Haematol.*, 85(2), 409-410, 1993.
- [84] Davis, R.J., Signal transduction by the JNK group of MAP kinases, *Cell*, 103, 239-252, 2000.
- [85] Ono, K., Han, J., The p38 signal transduction pathway: activation and function, *Cell Signal.*, 12, 1-13, 2000.
- [86] Adler, V., Yin, Z., Fuchs, S.Y., Benerza, M., Rosario, L., Tew, K.D., Pincus, M.R., Sardana, M., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Davis, R.J., Ronai, Z.: Regulation of JNK signaling by GSTp, *EMBO J.*, 18, 1321-1334, 1999.

- [87] Yin, Z., Ivanov, V.N., Habelhah, H., Tew, K.D., Ronai, Z.: Glutathione S-transferase pelicits protection against H₂O₂-induced cell death via coordinated regulation of stress kinases, *Cancer Res. (Adv. Brief)*, 60, 4053-4057, 2000.
- [88] Wang, J., Arifoglu, P., Ronai, Z., Tew, K.D.: Glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) inhibits c-Jun NH₂ terminal kinase (JNK1) signaling through interaction with the carboxyl terminus, *J. Biol. Chem.*, 276, 20999-21003, 2001.
- [89] Cho, S.G., Lee, Y.H., Park, H.S., Ryoo, K., Kang, K.W., Park, J., Eom, S.J., Kim, M.J., Chang, T.S., Choi, S.Y., Shim, J., Kim, Y., Dong, M.S., Lee, M.J., Kim, S.G., Ichijo, H., Choi, E.J.: Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1, *J. Biol. Chem.*, 276(16), 12749-12755, 2001.
- [90] Townsend, D.M., Tew, K.D.: The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance, *Oncogene*, 22, 7369-7375, 2003.
- [91] Tozkoparan B., Peri Aytaç S., *Kanser Kemoterapisinde Terapötik Hedef Olarak Glutatyon S-Transferazlar*, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi, 27(2), 139-164, 2007.
- [92] Matsuzoe D, Hideshima T, Iwasaki A, Yoneda S, Kawahara K, Shirakusa T, Kimura A., Glutathione S-transferase mu1 null genotype is associated with K-ras gene mutation in lung adenocarcinoma among smokers. *Carcinogenesis.*, 22(8):1327-1330, 2001.

EK 1. Etik Kurul Onay Formu

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARI

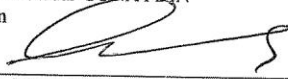
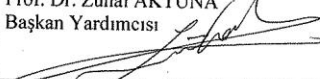
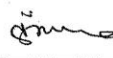
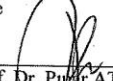
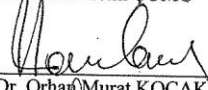
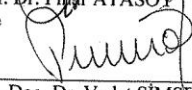
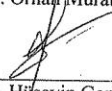
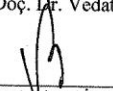
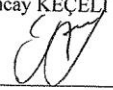
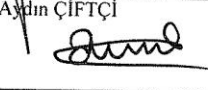
Toplantı Tarihi: 10.05.2012

Toplantı Sayısı: 12/05

Karar No: 12/14

Üniversitemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 10.05.2012 Çarşamba günü saat 12:00'de Prof. Dr. Serdar GÜNAYDIN'ın başkanlığında toplanarak gündemdeki konuları görüştü.

Kırıkkale Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Eğitimi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Sezgin ÇELİK tarafından gönderilen "Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomunda Sitokrom P450 ve Glutasyon S Transferaz İzozimlerinin Gen ve Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi" isimli proje incelenerek Kırıkkale Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Yönergesinde belirtilmiş olan Etik ilkelere uygun olduğuna oyçokluğuyla kabul edilerek karar verildi.

Prof. Dr. Serdar GÜNAYDIN Başkan 	Prof. Dr. Zuhal AKTUNA Başkan Yardımcısı 
Op. Dr. Mustafa BOYABATLI Raportör	Prof. Dr. Aytül ÇAKMAK Üye
Prof. Dr. Üçler KISA Üye 	Prof. Dr. Didem ALİFENDİOĞLU Üye 
Yrd. Doç. Dr. Faruk Metin COMU Üye 	Prof. Dr. Pınar ATASOY Üye 
Yrd. Doç. Dr. Orhan Murat KOÇAK Üye 	Yrd. Doç. Dr. Vedat ŞİMŞEK Üye 
Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Gencay KEÇELİ Üye 	Uz. Dr. Aydın ÇİFTÇİ Üye 
Uz. Dr. Alev YÜCEL Üye	Av. Orhan AYTEKİN Üye
Tolga Yaşar ORUÇ Üye	

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Murat KILIÇ
Doğum Tarihi :25.08.1984
Yabancı Dil :İngilizce

Eğitim Durumu

Lisans :Gazi Üniversitesi Kırşehir Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 2007
Yüksek Lisans :Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 2010

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl/Yıllar:

Öğr. Gör. :Pamukkale Üniversitesi Acıpayam Meslek Yüksekokulu (2011/...)
Uzman :Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Laboratuvarları, Proje Destek Uzmanı (2009-2011)

Yayımları (SCI) :

1. S. Oguztuzun, A. Abu-Hijleh, T. Coban, D. Bulbul, M. Kılıç, M. Iscan, M. Iscan. GST isoenzymes in matched normal and neoplastic breast tissue. Neoplasma 58, 4, 304-10, 2011
2. M. Kılıç, S. Oguztuzun, S. A. Karadag, E. Cakir, M. Aydin and L. Ozturk. Expressions of GSTM4 and GSTT1 in patients with Tinea versicolor, Tinea inguinalis, Tinea pedis infections: a preliminary study. Clinical and Experimental Dermatology. Clinical and Experimental Dermatology, 36, 590–594, 2011

3. Serpil Oğuztüzün, Mehtap Aydın, Funda Demirağ, Ülkü Yazıcı, Müzeyyen Özhavzalı, Murat Kılıç, Mesude İşcan. The Expression of GST Isoenzymes and p53 in Non Small cell Lung Carcinoma. Folia Histochemica et Cytobiologica, 2010; 48(1):122-127 , 2010
4. Serpil Oğuztüzün, Murat Kılıç, Nisa Tandoğan, Latif Öztürk. Usefulness of CA 15-3 for Breast or Ovarian Primary Sites in Metastatic Adenocarcinoma to pleural Fluid. Turkish journal of Biology (36) 171-75 2012
5. Kezban Ada, Mustafa Türk, Serpil Oğuztüzün, Murat Kılıç, Mehmet Demirel, Nisa Tandoğan, Ertan Ersayar, Latif Öztürk. Cytotoxicity and Apoptotic Effects of Nickel Oxide Nanoparticles in Cultured HeLa Cells. Folia Histochemica et Cytobiologica, 2010; 48(4): 524-529 , 2010
6. Gülçin Güler Şimşek, Serpil Oğuztüzün, Servet Guresci, Murat Kılıç, Ömer Faruk Bozkurt, Ali Ünsal, The expression of GST isoenzymes in acinar adenocarcinoma, intraepithelial neoplasia and benign tissue of prostate: correlation of clinical parameters with GST isoenzymes Turkish journal of Biology 36 (6); 687-693, 2012

Yayımları (Diğer) :

1. Serpil Oğuztüzün, Meral ATAY, Murat Kılıç, Müzeyyen Özhavzalı, Ziya Atay. Comparison and Evaluation of 15-3, C-ErbB-2, ER, and PR Tumor Markers in Pleural Fluid Cytology from Metastatic Breast Cancer as a Diagnostic Tool, Turkish Journal of Cancer 39(2): 45-50, 2009
2. Serpil Oğuztüzün, Murat Kılıç, Nisa Tandoğan, Latif Öztürk, Zuhal Yazıcı Gökbulut. Endüstriyel Kimyasallara Maruz Kalan Çalışanlarda Mesane Kanserine Yakalanma Risklerinin İdrar Sitolojisi Yöntemiyle Değerlendirilmesi, TAF Prev. Med. Bull. 9(6):597-604, 2010
3. Serpil Oğuztüzün, Mehtap Aydın, Z. Aytül Çakmak, Murat Kılıç, Ümit Yırtıcı, Meral Atay, Müzeyyen Özhavzalı, Erdal Yılmaz, Emine Ö. Karaaslan. The Cytological Evaluation of Bladder and Lung Carcinoma Rates on the Workers Exposed to Industrial Chemicals, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi. 66(2):49-57, 2009

4. Serpil Oğuztüzün, Murat Kılıç, Meral ATAY, Ülkü Güçlütürk, Latif Öztürk, Zuhul Yazıcı Gökbulut, Müzeyyen Özhavzalı, Ümit Yırtıcı. Üriner Şikayeti Olan Hastalarda İdrar Sitopatolojisi ile Mesane Kanseri Araştırılması, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 66(4):169-176, 2009
5. Oğuztüzün Serpil, Kılıç Murat, Cakir Ebru, Atay Ziya, Simsek Güler Gulcin. The Usefulness of GST Isoenzymes As Markers of Malignancy In Urinary Cytology. Academic Journal of Cancer Research, 3(2); 29-33,2010
6. Serpil Oğuztüzün, Murat Kılıç, Nisa Tandoğan, Latif Öztürk, Ziya Atay. Thyroid Transcription Factor-1, Cytokeratin 7, Cytokeratin 8 in Differentiating Primary and Metastatic Lung Adenocarcinoma. Academic Journal of Cancer Research 3(1); 1-6, 2010

Uluslar arası Kongrelerde sunulan Bildirirler :

1. S. Oğuztüzün, M. Kılıç, E. Çakır, G.G. Şimşek and Z. Atay. The Usefulness of GST Isoenzymes As Markers of Malignancy In Urinary Cytology. 36th European Congress of Cytopathology, 22-25 September 2011, Istanbul, Turkey (Cytopathology (SCI) Vol. 22 Suppl. 1 p-281, Oct. 2011)
2. Murat Kılıç, Mustafa Türk, Serpil Oğuztüzün, Siyami Karahan, Ömer Sonkaya, Ogün Bozkaya, A Cytotoxicity Test: an Alternative Method for Animal Experiments, 3rd International Council for Laboratory Animal Science Symposium and XV. ICLAS Assembly, June 13-15, Harbiye Military Museum 2011 İstanbul, 2011
3. Murat Kılıç, Gülçin Güler Şimşek, Serpil Oğuztüzün, Siyami Karahan, Okhan Kadir Akın, Nedret Kılıç, Bülent Salman, Tonguç Utku Yılmaz, Muhittin A. Serdar, Latif Öztürk, Evaluation of Immunohistochemical Expression of GSTA and GSTP Isoenzymes in Rat Livers before and after Treatment of Thioredoxin and L-Name in Experimental Hepatic Ischemia/Reperfusion Model, 3rd International Council for Laboratory Animal Science Symposium and XV. ICLAS Assembly, June 13-15, Harbiye Military Museum 2011 İstanbul, 2011

4. Ada K., Türk M., Oğuztüzün S., Kılıç M., Demirel M., Tandoğan N., Yırtıcı Ü. Cytotoxicity and Apoptotic Effects of Nickel Oxide Nanoparticles in Cultured HeLa Cells. Joint 4th EORTC Pathobiology Group Annual Meeting and 1st International Multidisciplinary Cancer Research Congress. 21-24 May 2009 Queen's Park Resort Antalya / Turkey, 2009

Uluslar arası Katılımlı Ulusal ve ya Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler :

1. Serpil Oğuztüzün, Murat Kılıç, Sedat Aydın, Tonsillit ve Adenoidit Hastalarında Antimikrobiyal Peptitlerin Ekspresyonlarının İmmunohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi, XXIII. Ulusal Biyokimya Kongresi 29 Kasım - 2 Aralık 2011 Hilton Hotel – Adana, 2011
2. Murat Kılıç, Serpil Oğuztüzün, Ayşe Serap Karadağ, Ebru Çakır, Mehtap Aydın, Latif Öztürk, Antimikrobiyal Peptitler ve Glutatyon-S-transferaz İzozimlerinin Tinea versicolor, Tinea inguinalis, Tinea pedis, Tinea corporis ve Candida albicans Enfeksiyonlarında Ekspresyonları, XXIII. Ulusal Biyokimya Kongresi 29 Kasım - 2 Aralık 2011 Hilton Hotel – Adana , 2011
3. Gülçin Güler Şimşek, Serpil Oğuztüzün, Servet Güreşçi, Murat Kılıç, Ayla Tezer. GST İzozimlerinin Prostat Asiner Adenokarsinoma, Prostatik İntraepitelyal Neoplazi ve Normal Prostat Dokularında Ekspresyonu. 20. Ulusal Patoloji Kongresi, 29 Eylül-3 Ekim 2010, Osmangazi Üniversitesi Kongre Merkezi Eskişehir Turkish Journal of Pathology 26, Ek Sayı, 2010) , 2010
4. Serpil Oğuztüzün, Murat Kılıç, Nisa Tandoğan, Latif Öztürk, Ziya Atay. The Usefulness of CA 15-3 for Breast or Ovarian Primary Sites in Metastatic Adenocarcinoma to pleural Fluid. III. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu, 14-17 Mart 2010, Grand Yazıcı Otel, Uludağ/ Bursa, 2010
5. Murat Kılıç, Serpil Oğuztüzün, Gülçin şimşek, Ebru Çakır, Latif Öztürk. Kolon, Mide ve Akciğer Kanserli Dokularında Beta Defensin-3 ve LL-37 Antimikrobiyal Peptitlerinin Ekspresyonları. III. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu, 14-17 Mart 2010, Grand Yazıcı Otel, Uludağ/ Bursa, 2010

6. Serpil Oğuztüzün, Murat Kılıç, Nisa Tandoğan, Latif Öztürk, Zuhal Yazıcı Gökbulut. Endüstriyel Kimyasallara Maruz Kalan Çalışanlarda Mesane Kanserine Yakalanma Risklerinin İdrar Sitolojisi Yöntemiyle Değerlendirilmesi. III. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu, 14-17 Mart 2010, Grand Yazıcı Otel, Uludağ/ Bursa 2010
7. Serpil Oğuztüzün, Murat Kılıç, Nisa Tandoğan, Latif Öztürk, Ziya Atay. Primer ve Metastatik Akciğer Adenokanser Teşhisinde TTF-1, CK 7, CK8'in Kullanımı. XXII. Ulusal Biyokimya Kongresi, 27-30 Ekim 2010, Anemon Otel/Eskişehir (Turkish Journal of Biochemistry (SCI-Exp.) 35, Special Issue 1, 2010) , 2010
8. Murat Kılıç, Serpil Oğuztüzün, Ebru Çakır, Aydın Yılmaz. Akciğer Adenokanserli Hastaların Sağkalım Tahmininde p53, GSTpi, kaspaz-3 ve bcl-2'nin Etkisi. XXII. Ulusal Biyokimya Kongresi, 27-30 Ekim 2010, Anemon Otel/Eskişehir (Turkish Journal of Biochemistry (SCI-Exp.) 35, Special Issue 1, 2010)
9. Murat Kılıç, Sezgin Çelik, Şükrü Arpacı, Kansere Hastalığı ve Çeşitliliği Bakımından Kale Toplumuna Genel Bir Bakış, Kaledavaz Sempozyumu, 2-3 Nisan 2012 Kale-Denizli
10. Murat Kılıç, Serpil Oğuztüzün, Sezgin Çelik, Funda Demirağ, Latif Öztürk, Pınar Bıçakçioğlu, Ahmet Oğuz Ada, Mümtaz İşcan. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomunda (KHDAK) Sitokrom P450 (CYP) ve Glutasyon S Transferaz (GST) İzozimlerinin Gen ve Protein Ekspresyonlarının İncelenmesi. IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi (SB9), Prof. Dr. Mete Cengiz Kültür Merkezi, 13-16 Aralık 2012 Bursa
11. Murat Kılıç, Can Yılmaz, Serpil Oğuztüzün, Sedat Aydın, Nagehan Özdemir Barışık, Latif Öztürk, Mesude İşcan. Rekürrent Tonsillit ve İdiopatik Tonsil Hipertrofisi Hastalarında Caspase-3 ve bcl-2 Protein Ekspresyonları. IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi (SB23), Prof. Dr. Mete Cengiz Kültür Merkezi, 13-16 Aralık 2012 Bursa
12. Murat Kılıç, Serpil Oğuztüzün, Gülçin Güler Şimşek, Servet Guresci, Latif Öztürk, Ali Ünsal. hBD-2, hBD-3 ve LL-37/hCAP-18 Antimikrobiyal Peptidlerinin Prostat Benign Epitel, Prostatik İntraepitelyal Neoplazi ve Prostat Adenokarsinomlu Dokulardaki Ekspresyonları. IV. Multidisipliner

Kanser Araştırma Kongresi (PB56), Prof. Dr. Mete Cengiz Kültür Merkezi,
13-16 Aralık 2012 Bursa

13. Duygu Erol, Murat Kılıç, Serpil Oğuztüzün, Gülçin Güler Şimşek, Latif ztrk, Hakan BuluŐ. Tiroid Papillar Karsinom, Folliküler Karsinom, Foliküler Adenoma ve Nodüller Hiperplazili dokularda Sitokrom (CYP) P450 ve Glutatyon S Transferaz (GST) İzozimlerinin Ekspresyonlarının İncelenmesi. IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi (PB57), Prof. Dr. Mete Cengiz Kültür Merkezi, 13-16 Aralık 2012 Bursa
14. Murat Kılıç, Serpil Oğuztüzün. Glutatyon Aracılı Detoksifikasyon Metabolizmasında Süt Serum Proteinlerinin nemi Süt Endüstrisinde Yenilikçi Yaklaşımlar Sempozyumu 15-16 Kasım 2012 Denizli, 2012
15. Murat Kılıç, Ogun Bozkaya. Acıpayam İlçesinden Toplanan iğ Süt rneklerinde Ağır Metal Kontaminasyonun Belirlenmesi Süt Endüstrisinde Yenilikçi Yaklaşımlar Sempozyumu 15-16 Kasım 2012 Denizli, 2012

Proje görevleri :

1. Küçük Hücreli Dışı Akciger Kanserinde GST Polimorfizlerinin mRNA ve Protein Ekspresyonları zerine Olası Etkilerinin Ortaya Konması, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmektedir. (Yardımcı Araştırıcı, Bütçe:19.000 TL, Devam Ediyor)
2. Tiroid Papillar Karsinom, Nodüller Hiperplazi ve Foliküler Adenomlarda Sitokrom P450 ve Glutatyon S Transferaz İzozimlerinin Protein Ekspresyonlarının İncelenmesi ve Klinik Parametrelerle Karşılaştırılması, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmektedir. (Yardımcı Araştırıcı, Bütçe:17.000 TL, Devam Ediyor)
3. Rozase hastalarında Antimikrobiyal Peptidler, Glutatyon-S-Transferaz İzozimlerinin Ekspresyonları, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmektedir. (Yardımcı Araştırıcı, Bütçe:15.000 TL, Devam Ediyor)

4. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomunda Sitokrom P450 (CYP) İzozimlerinin Gen ve Protein Ekspresyonlarının İncelenmesi Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmektedir. (Yardımcı Araştırmacı, Bütçe:20.000 TL, Devam Ediyor)
5. Mikozis Fungoides’li Hastalarda Antimikrobiyal Peptitler ve Glutatyon-S-Transferaz İzozimlerinin Ekspresyonlarının İmmunohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi (Türk Dermatoloji Derneği tarafına kabulü için sunuldu, incelemede, Bütçe: 15.000 TL)
6. Kırıkkale Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarları Alt yapı Projesi. DPT Tarafından Desteklenen 2009K120910 No’lu proje (Bütçe 7.500.000 TL, Proje Destek Uzmanı)
7. Antimikrobiyal Peptitlerin İnsan Burun Mukozası ve Bademciklerindeki Gen Ekspresyon Seviyeleri. Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi Tarafından Desteklenen Proje (Bütçe 10.000 TL, Tamamlandı, Yardımcı Araştırmacı)

Ulusal ve/veya Uluslar arası Kongre, Sempozyumlarda Görev Alma :

1. Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü ve P.Ü Acıpayam Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme Bölümü tarafından düzenlenen “Uluslar arası Katılımlı Süt Endüstrisinde Yenilikçi Yaklaşımlar Sempozyumu”. Kongre Düzenleme Kurulu Üyeliği 15-16 Kasım 2012

Konferans ve Seminerler

1. “Kanser Hastalığı ve Çeşitliliği Bakımından Acıpayam Toplumuna Genel Bir Bakış”, Acıpayam Meslek Yüksekokulu, 09.03.2012
2. “Yükseköğrenime geçişte Hangi Mesleği Seçmeliyim” Denizli Acıpayam Kız Teknik Ve Meslek Lisesi, 27.04.2012

Uluslar arası veya Ulusal Düzeyde Öğretici Olarak Katıldığı Sertifika-Kurs Programları :

1. Real Time PCR Eğitim Kurs Programı, Uzman Eğitici, 22.02.2011 Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Laboratuvarları
2. Gerçek Zamanlı Hücre Sitotoksosite Analiz Sistemleri Eğitim-Kurs Programı, Uzman Eğitici, 02-03.06.2011 Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Laboratuvarları
3. Western Blotlama Eğitim Kurs Programı, Uzman Eğitici, 08-09.02.2011 Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Laboratuvarları

Katıldığı Sertifika Kurs Programları :

1. “Fundamental of GC (Gas Chromatography)” Eğitim Kurs Programı, 10-11.11.2010, Shimadzu Ant Teknik Cih. Ltd. Şti. Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Laboratuvarları
2. “Fundamental of GCMS (Gas Chromatography Mass Spectrometry)” Eğitim Kurs Programı, 16-17.06.2010, Shimadzu Ant Teknik Cih. Ltd. Şti. Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Laboratuvarları
3. “Fundamental of HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)” Eğitim Kurs Programı, 14-18.05.2010, Shimadzu Ant Teknik Cih. Ltd. Şti. Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Laboratuvarları
4. MIC-ASAP2020 Bet Yüzey Alanı Tayin Cihazı Eğitim Kurs Programı, 28-30.05.2010, Terra Lb. Mal. San ve Tic. AŞ. Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Laboratuvarları
5. Western Blotlama Eğitim Kurs Programı 14-16.09.2010 Medsantek Lb. Mal. San ve Tic. Şti. Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Laboratuvarları
6. Real Time PCR Sistemleri Eğitim Kurs Programı 20.06.2010 Genoviz Biotechnology Products Ltd. Co. Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Laboratuvarları

7. Atomik Absorpsiyon Spektrometre Cihazı Eğitim Kurs Program 18.02.2011 Perkin Elmer Instrument Tetra Teknolojik Sistemler Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Laboratuvarları
8. Zeta Sizer NanoZS Cihazı Eğitim Kurs Program 13.01.2011 Atomika Teknik, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Laboratuvarları
9. UV-VIS Spektrofotometre Cihazı Eğitim Kurs Program 18.02.2011 Perkin Elmer Instrument Tetra Teknolojik Sistemler Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Laboratuvarları
10. Gerçek Zamanlı Hücre Sitotoksiste Analiz Sistemleri Eğitim-Kurs Programı 29-30.03.2011 Roche, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Laboratuvarları

Üye Olduğu Dernek ve Kuruluşlar

1. MOKAD (Moleküler Kanser Araştırma Derneği)
2. EARC (The European Association for Cancer Research)
3. Türk Biyokimya Derneği