

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
SONUÇ RAPORU

Projenin Adı	:Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomunda Sitokrom P450 (CYP) İzozimlerinin Gen ve Protein Ekspresyonlarının İncelenmesi
Proje Numarası	:2012/117
Proje Yürütücüsünün Adı	:Doç. Dr. Sezgin Çelik
Yardımcı Araştırmacıların Adı/Adları	:Prof. Dr. Mümtaz İşcan, Doç. Dr. Serpil Oğuztüzün, Doç. Dr. Ahmet Oğuz Ada, Doç. Dr. Funda Demirağ, Öğr. Gör. Dr. Murat Kılıç
Başlama Tarihi	:14.06.2012
Bitiş Tarihi	:14.06.2013
Rapor Tarihi	:Eylül 2013

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	i
ÇİZELGELER DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
1. Giriş ve Amaç	1
1.1. Akciğer Kanseri	7
1.1.1. Epidemiyoloji	7
1.1.2. Etiyoloji	7
1.1.3. Patoloji	11
1.1.3.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri	13
1.1.3.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri	13
1.1.3.2.1. Epidermoid (Skvamoz Hücreli) Karsinom	13
1.1.3.2.2. Adenokarsinom	14
1.1.3.2.3. Büyük Hücreli Karsinom	14
1.1.4. Evrelendirme	14
1.2. Ksenobiyotik Mekanizması	16
1.2.1. I. Faz Reaksiyonları ve Sitokrom P450 (CYP) Enzim Ailesi.....	17
1.3. Akciğer Kanserinde CYP Enzimlerinin Gen ve Protein İfadeleri	21
2. Materyal ve Yöntem	24
2.1. Kullanılan Malzemeler	24
2.1.1. Kullanılan Laboratuvar Cihaz ve Malzemeleri	24
2.1.2. Kullanılan Kitler ve Kimyasal Malzemeler	25
2.1.3. Kullanılan Primer Gen ve Antikorlar.....	25
2.2. Materyal	26
2.2.1. Hasta Dokularının Toplanması ve Klinik Bilgiler	26
2.3. Yöntem	27
2.3.1. Parafine Gömülü Dokulardan Gen Ekspresyonu	27
2.3.1.1. Dokuların Deparafinizasyonu	27

2.3.1.2. Deparafinize Edilmiş Dokulardan mRNA İzolasyonu.....	28
2.3.1.3. İzole Edilen mRNA'ların Kantitasyonu	28
2.3.1.4. cDNA Sentezi	29
2.3.1.5. Real Time PCR ile Gen İfadelerinin Rölatif Kantitasyon Analizi	29
2.3.2. Parafine Gömülü Dokulardan Protein Ekspresyonu.....	31
2.3.2.1. İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi	31
2.3.3. İstatistiksel Analiz	31
3. Bulgular	32
3.1. Dokulardan İzole Edilen mRNA Miktarları	32
3.2. CYP Enzimlerinin Gen İfadelerinin Sonuçları	32
3.2.1. CYP Enzimlerinin Gen İfadeleri ve Klinik Hasta Bilgileri ile Karşılaştırılması.....	32
3.2.2. CYP Enzimlerinin Protein İfadeleri ve Klinik Hasta Bilgileri ile Karşılaştırılması	38
4. Sonuçlar ve Tartışma	56
KAYNAKLAR	64
EK 1b.	73

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. 1999 yılında WHO tarafından yapılan akciğer kanserinin patolojik sınıflandırması	12
1.2. Akciğer kanserinin TNM Sınıflandırması	15
1.3. Akciğer kanserinin evrelendirilmesi	16
1.4. I. Faz ve II. Faz reaksiyon tipleri ve görev alan enzimler	19
2.1. Çalışmaya konu olan hastaların klinik bilgileri	27
3.1. mRNA miktarları	32
3.2. CYP izozimlerinin gen ifadelerinin görüldüğü hasta sayıları	35
3.3. Tümör evrelerine göre CYP izozimlerinin mRNA'larının ifade olduğu hasta sayıları	36
3.4. Sigara içim durumuna göre CYP izozimlerinin mRNA'larının ifade olduğu hasta sayıları	37
3.5. Yaş gruplarına göre CYP izozimlerinin mRNA'larının ifade olduğu hasta sayıları	37
3.6. Cinsiyete göre CYP izozimlerinin mRNA'larının ifade olduğu hasta sayıları	38
3.7. KHDAK'da tümörlü ve normal dokular eşleştirildiğinde CYP izozimlerinin protein ifadelerinin yüksek olduğu tümörlü dokuların sayıları ve yüzde oranları	39
3.8. KHDAK hastaların tümörlü ve normal dokularında CYP izozimlerinin protein ifadeleri	44
3.9. Tümör evrelerine göre CYP izozimlerinin protein ifadeleri	49
3.10. Sigara içim durumlarına göre CYP izozimlerinin protein ifadeleri	51
3.11. Yaş gruplarına göre CYP izozimlerinin protein ifadeleri	53
3.12. Cinsiyete göre CYP izozimlerinin protein ifadeleri	55

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. Ksenobiyotik Mekanizması	17
2.1. Real Time PCR koşulları	30
3.1. CYP1A1 izoziminin gen ifadesinin görüldüğü hastalarda rölatif gen ifadelerinin oranı	33
3.2. CYP1B1 izoziminin gen ifadesinin görüldüğü hastalarda rölatif gen ifadelerinin oranı	34
3.3. CYP2E1 izoziminin gen ifadesinin görüldüğü hastalarda rölatif gen ifadesinin oranı	35
3.4. KHDAK’lı hastaların tümörlü ve normal dokularında CYP1A1 izoziminin protein ifadesi	41
3.5. KHDAK’lı hastaların tümörlü ve normal dokularında CYP1B1 izoziminin protein ifadesi	42
3.6. KHDAK’lı hastaların tümörlü ve normal dokularında CYP2E1 izoziminin protein ifadesi	43
3.7. Tümörlü ve normal dokularda immunohistokimyasal CYP1A1 proteini..	45
3.8. Tümörlü ve normal dokularda immunohistokimyasal CYP2E1 proteini..	46
3.9. Tümörlü ve normal dokularda immunohistokimyasal CYP1B1 proteini..	47

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 hızlarına
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 nükleer translokotör
MAPEG	Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism
DNA	Deoksiribonükleik asit
RT-PCR	Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
cDNA	komloment 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
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

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KARSİNOMUNDA SİTOKROM P450 (CYP) İZOZİMLERİNİN GEN VE PROTEİN EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ

Özet

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. Bu çalışmada, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomu (KHDAK)'da CYP 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 ve CYP2E1 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 ifade olduğu görüldü. İmmunohistokimyasal incelemelerde; CYP1B1 izoziminin tümörlü ve normal dokularda aşırı ifade olduğu görülürken, CYP1A1 izoziminin akciğer adenokarsinomlu dokularda, normal dokulara oranla; CYP2E1 izoziminin, KHDAK'lı hastaların tümörlü dokularında normal dokularına oranla daha fazla ifade edildiği istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Sonuç olarak, Hastaların tümörlü ve normal dokuları arasında görülen CYP 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, RT-PCR, İmmunohistokimya

INVESTIGATION OF GENE AND PROTEIN EXPRESSIONS OF CYTOCHROME P450 (CYP) ISOENZYMES IN NON-SMALL CELL LUNG CARCINOMA

Abstract

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. This study aimed to evaluate mRNA and protein expressions of CYP 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 and CYP2E1, 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 out of 39 NSCLC patients. In immunohistochemical examinations, CYP1A1 isoenzyme expression was significantly higher in lung adenocarcinoma tissues than normal tissues, CYP2E1 isoenzyme expressions were significantly higher in tumor tissues than normal tissues in NSCLC patients ($p<0,05$) whereas CYP1B1 isoenzyme overexpressed in both tumors and normal tissues. As a conclusion, the differences in gene and protein expressions of CYP isoenzyme 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, RT-PCR, Immunohistochemistry

1. Giriş ve Amaç

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 gelişi güzel 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 ölümlü 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) ölürlür. 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.

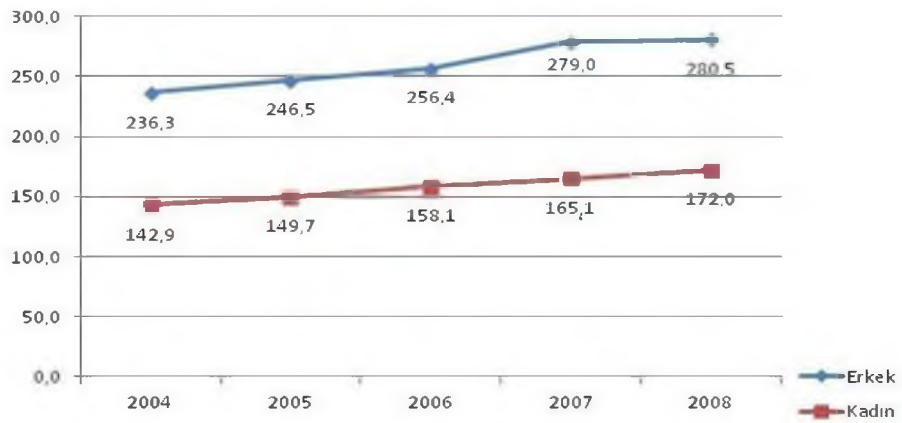
Yukarıda genel ifade ile verilen kansere neden olan etmenleri sınıflandıracak olursak karsinojenler; fiziksel karsinojenler (güneş ışınları, UV, radyasyon vb.), kimyasal karsinojenler (polisiklik aromatik hidrokarbonlar, nitrozaminler, asbest, radon, alkol, sigara vb.) ve biyolojik karsinojenler (virüsler, 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 kanserin görülme sıklığı toplumlarda, yaş, cinsiyet, kanserin türü ve 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 nedenli 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) izlemiştir. Gelişmiş ülkelere nazaran, yeni kanser vakalarının %53'ü ve ölümlerin

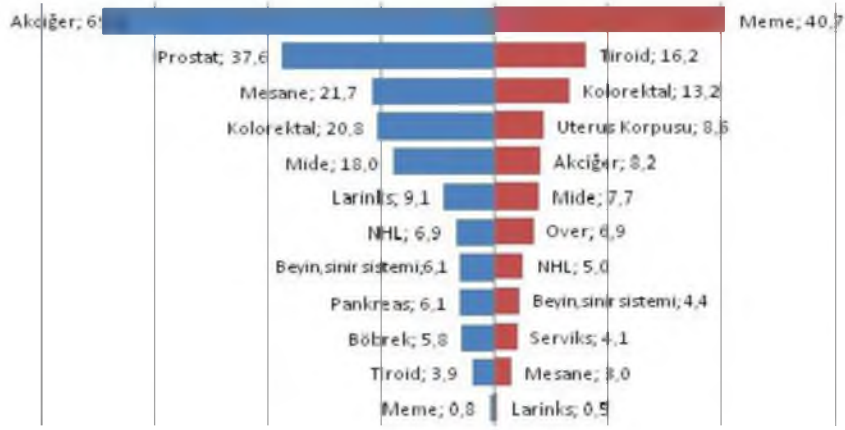
%60'ı az gelişmiş ülkelerde meydana gelmektedir. Erkeklerde prostat kanseri, gelişmiş bölgelerde en fazla teşhis edilen kanser türü haline gelirken (643.000 vaka, yeni vakaların toplamının %20,2'si), az gelişmiş ülkelerde birinci sıradaki akciğer kanserinin (538.000 vaka, %15,3) oldukça gerisinde, altıncı 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].



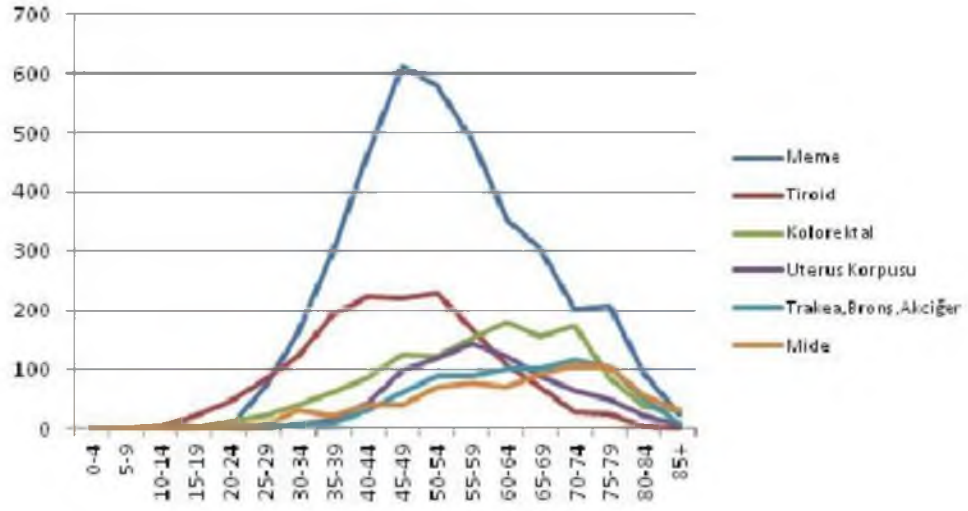
Şekil 1.1. Türkiye’de kanserin görülme sıklığı, 2008 [2]

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 akciğer kanserleri izlemektedir (Şekil 1.2.) [2].

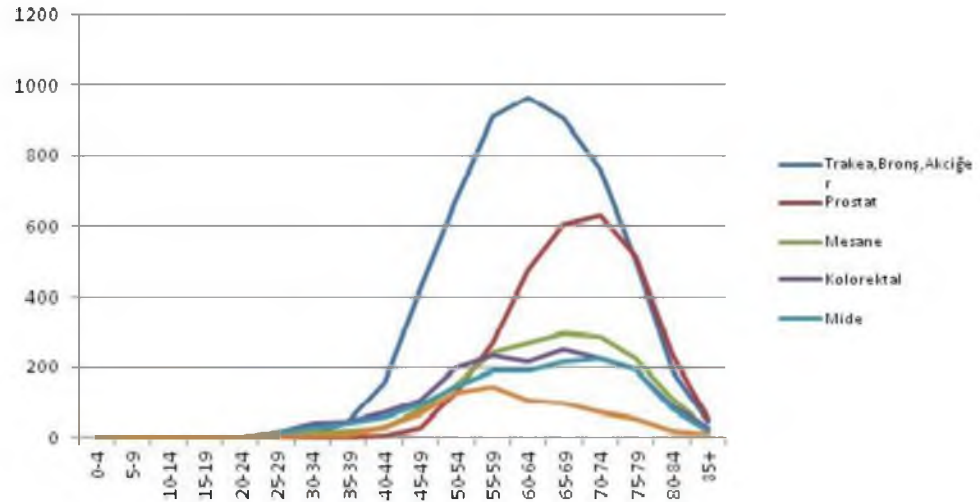


Şekil 1.2. Ülkemizde en sık görülen kanser türlerinin yaşa standardize insidans hızları (YSH), 2008 [2]

Ülkemizde görülen kanser türlerinin ve kanser sıklığının yaşa göre özel hızları (YÖH) incelendiğinde, 0-4 yaş grubu başta 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 detoksifikasyon metabolizması 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 detoksifikasyon metabolizmasında; 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 çalışma kapsamında da, detoksifikasyon metabolizmasının I. Faz reaksiyonlarını katalizleyen, Sitokrom P450 (CYP) enzim sisteminin üyelerinden CYP1A1, CYP1B1 ve CYP2E1 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 (kendileri karsinojen olmayan ancak diğer maddelere karsinojen özellik kazandıran) ve tümör promotörleri (karsinojenezisi reversibl olarak potansiyalize eden ve kendileri karsinojen olmayan maddeler) 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].

Sigara dumanının etkisi, karsinojenlerin DNA'ya kadar ulaşması, DNA'da hatalı kodlama ve mutasyon oluşturması yoluyla olmaktadır. 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. Karsinoma in-situnun invaziv kanser halini alması için 4-5 yıllık bir sürenin geçtiği gösterilmiştir [5].

Dünyanın herhangi bir coğrafik bölgesinde, o bölgenin jeolojik yapısına bağlı olarak çevreye yayılım gösteren radon, sigaradan sonra akciğer kanserlerinin oluşumunda ve etiolojisinde sigaradan sonra ikinci sırayı almaktadır. Doğal olarak oluşan ve radyoaktif özellikte 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 [9,10].

Son araştırmalar göstermiştir ki, akciğer kanserinin etiyolojisinden %10-14'nden radonun sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir [6]. 75 yaşına kadar sigara içmeyenlerin konsantrasyon oranı 100 Bq/m³ (Becquerels) olan radona maruz kaldıkları taktirde 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 [11,12].

Akciğer kanserinin bir başka etiyolojik faktörü ise erkeklerde %15, kadınlarda %5 oranlarında mesleki maruziyetler olarak bildirilmektedir. Mesleki maruziyetin başında asbest gelmektedir. Madenciler, imento, yapı malzemeleri, fren balatası yapımı, tekstil, izolasyon, tersane gibi iş sektörlerinde çalışan işçilerde sigara içmeyenlerde akciğer kanseri riski %5 iken, sigara içen bu sektör alışanlarında akciğer kanserine yakalanma riski %92 olduğu bildirilmiştir. Asbest maruziyetinden sonra ikinci mesleki maruziyet etmeni uranyum madeni alışanlarında uranyum madenine maruziyet gelmektedir. Yine bu sektörde sigara içmeyenlerde akciğer kanserine yakalanma riski %7 iken, sigara içen uranyum madeni alışanlarında mesleki maruziyet sonucu akciğer kanserine yakalanma riski %38 olarak bildirilmiştir. Havağazı 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, bcekldrcler, şarapılar, 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 [13,14].

Etiyolojik 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 oranınının yüksek olduğu gıdaların tkutilmesinin insanlarda akciğer kanseri riskini %40 oranlarında azalttığı bildirilmiştir [13]. Sebze ve

meyvelerde bulunan flavonoidlerce ve omega-3 ve -6 gibi yağasitlerince zengin diyetin akciğer kanserini azalttığı tespit edilmiştir [6,15]. Sigara içiminin diyetle alınan vitaminlerin seviyesini özellikle de vitamin C'nin seviyesini düşürdüğü bilirse de, sigara içenlerde ve içmeyenlerde, taze sebze ve meyve tüketimiyle alınan; vitamin C, karonetoidlerin (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 [6,15,16].

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 [17].

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 olan CYP1A1, CYP2D6, CYP2A6, CYP2C9, CYP3A4, CYP2E1 ve II. Faz genleri olan GSTM1, GSTT1, GSTP olup en çok suçlanan genler ise CYP1A1, CYP2D6 ve GSTM1'dir [18,19].

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 [5,13].

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 [20,21].

Çizelge 1.1. 1999 yılında WHO tarafından yapılan akciğer kanserinin patolojik sınıflandırması [20].

<p>Malign Epitelyal Tümörler Skuanöz hücreli karsinom Papiller Berrak hücreli Küçük hücreli Bazoloid Küçük hücreli karsinom Kombine küçük hücreli karsinom Adenokarsinom Adenokarsinoma, mikst tip Asiner adenokarsinoma Papiller adenokarsinoma Bronkoalveolar Non-müsinöz Müsinöz Miks müsinöz ve non-müsinöz ya da balırsız hücre tipi Müsin salgılayan solid adenokarsinoma Fetal adenokarsinoma Müsinöz (kolloid) karsinom Müsinöz kistadenokarsinoma Taşlı yüzük adenokarsinoma Berrak hücreli adenokarsinoma Büyük hücreli karsinom Büyük hücreli nöroendokrin karsinom Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinom Bazoloid karsinom Lenfoepitelyoma benzeri karsinom Berrak hücreli karsinom Rabdoid fenotipinde büyük hücreli karsinom Adenokuanöz karsinom Sarkomatoid karsinom Pleomorfik karsinom İğ hücreli karsinom Dev hücreli karsinom Karsinosarkom Pulmoner blastom Karsinoid tümörler Tipik karsinoid Atipik karsinoid Tükürük bezi tipindeki karsinomlar Mukoepidermoid karsinom Adenoid kistik karsinom Epitelyal-myoepitelyal karsinom Premiaziv lezyonlar Skuanöz hücreli in situ karsinom Atipik adenomatöz hiperplazi</p>	<p>Diffüz idyopatik pulmoner nöroendokrin hücre hiperplazisi Mezenkimal tümörler Epiteloid hemangioendotelyoma Anjiyosarkom Pteroguinoma; blastom Kondroma Konjenital peribronşiyal miyofibroblastik tümör Diffüz pulmoner lenfanjiyomatosis İnflamatuvar miyofibroblastik tümör Lenfanjiyoleiyonmiyomatosis Sinovyal sarkom Monofazik Bifazik Pulmoner arter sarkomması Pulmoner ven sarkomması Benign epitelyal tümörler Papillomalar Skuanöz hücreli papillom Ekzofitik Tars yerleşimli Glandüler papilloma Mikst skuanöz hücreli ve glandüler papilloma Adenomalar Alveolar adenoma Papiller adenoma Tükürük bezi tipi adenom Müköz gland adenomu Pleomorfik adenom Diğerleri Müsinöz kistadenoma Lenfoproliferatif tümörler MALT tipi marjinal zon B hücre lenfomasi Diffüz büyük B hücreli lenfoma Lenfositoid granülamatozis Langehanz hücreli histiyositosis Çeşitli tümörler Hamartoma Sklerozan hamartiyoma 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 [22].

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 [23,24].

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 [22].

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 [6,23,24].

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 [6,23,24].

1.1.3.2.3. Büyük Hücreli Karsinom

Histolojik olarak büyük çekirdekli ve çekirdekçiği belirgin olan ve kötü diferensiyasyon özelliği gösteren büyük hücreli Karsinom, tüm akciğer kanserlerinin % 9'unu oluşturmaktadır. Santral veya periferik yerleşim gösterebilir. Büyük hücreli nöroendokrin tümörler, KHAK'lerine benzemekte ve periferik palizasyon, rozet formasyonu gibi nöroendokrin özellik taşıyanları kötü prognoz göstermektedir [6,23,24].

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 [25]. 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 [25]. 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 [26].

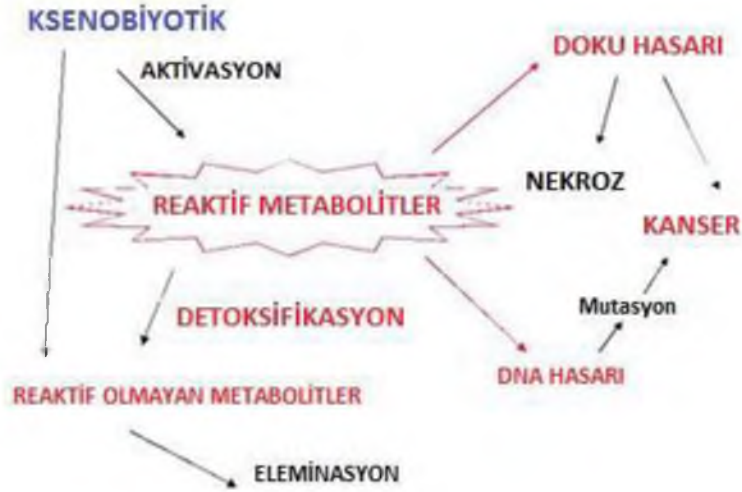
x	Tümörün büyüklüğü değerlendirilememiştir.
T0	Primer tümör kanıtı yok.
Tis	Karsinoma insitu.
T1	En geniş çapı ≤ 3 cm, akciğer veya visseral plevra ile çevrili, bronkoskopik olarak lob bronşundan daha proksimale (ana bronşa) invazyon göstermeyen tümör.
T2	Tümörün aşağıdaki özelliklerden en az birine 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 (superior 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 satellit 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	Karşı 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 [26].

Okült karsinom	Tx	N0	M0
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre 1A	T1	N0	M0
Evre 1B	T2	N0	M0
Evre 2A	T1	N1	M0
Evre 2B	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre 3A	T1-T2-T3	N2	M0
	T3	N1	M0
Evre 3B	Herhangi bir T	N3	M0
	T4	Herhangi bir N	M0
Evre 4	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

1.2. Ksenobiyotik Mekanizması

Karsinojenik maddelerin oluşturduğu etkilerden hücrenin korunmasında detoksifikasyon 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.) [27].



Şekil 1.5.Ksenobiyotik Mekanizması (Hücre içine giren ksenobiyotikler, ya non-reaktif metabolitlere (reaktif olmayan metabolitlere) katalize edilip vücuttan dışarı atılırlar; ya da aktive olarak reaktif metabolitlere dönüştürülürler. Reaktif metabolitlerin hücre ve/veya dokularda birikmesi ile DNA hasarı, Doku hasarı, nekroz, mutasyonlar ve bunların sonucunda da kanser gibi hastalıklar oluşur. Mekanizmanın bu safhasında aktive olan reaktif metabolitler detoksifiye edilerek non-reaktif metabolitlere dönüştürülürler ve vücuttan dışarı atılırlar.) [28].

Ksenobiyotiklerin mekanizması iki ana reaksiyonda toplanır. Bunlar;

- **I. Faz reaksiyonları:** Yükseltgenme, indirgenme ve hidroliz reaksiyonlarının gerçekleştiği fazdır (Çizelge 1.4.).
- **II. Faz reaksiyonları:** Konjugasyon, metilasyon, asetilasyon reaksiyonlarının gerçekleştiği fazdır (Çizelge 1.4.).

1.2.1. I. Faz Reaksiyonları ve Sitokrom P450 (CYP) Enzim Ailesi

I. Faz reaksiyonları detoksifikasyonun 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 ise CYP enzim sistemidir. Başlıca Yükseltgenme (oksidasyon) reaksiyonlarında, demir grubu içeren CYP enzimleri, alifatik

hidroksilasyon, alifatik epoksidasyon, aromatik epoksidasyon ve hidroksilasyon, N-, O- veya S-oksidadasyon (dealkilasyon), N-hidroksilasyon, Deaminasyon, S-oksidadasyon, P-oksidadasyon, 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 ksenobiotiğe 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 [27,29].

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 [29].

Hidroliz reaksiyonlarını kataliz eden enzimler hücrede, hem granüllü endoplazmik retikulumda, hem de mitokondrielerde 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 [27].

Çizelge 1. 4. I. Faz ve II. Faz reaksiyon tipleri ve görev alan enzimler [27].

	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)

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 olduğu için Sitokrom P450 denilmiştir. CYP enzimlerinin hepatic ve ekstrahepatik dokularda, hedef dokuyla ilgili ksenobiyotik bileşiklerin metabolik aktivasyonunda çoğunlukla belirleyici bir rolleri vardır [30,31].

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 [30,31].

İnsanlarda bulunan 53 CYP formunun yarısı daha çok ksenobiyotik metabolizmasından aktif olan ilk üç CYP ailesine (CYP1, CYP2,CYP3) aittir [32]. Genelde karaciğerde daha fazla olmakla birlikte, akciğer, deri gibi diğer dokularda da ifade edilen CYP'ler, eksojen kaynaklı bileşiklere savunma görevi yapmaktadırlar [33,34].

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 [35,36]. PAH metabolizmasının DNA'ya bağlanma aşamasında aktiftirler. DNA'da hasar meydana gelir ve tamir edilmezse neoplazmik transformasyonlar oluşmaktadır. Bu yüzden kimyasal kaynaklı kanserlerle ilişkilendirilmektedirler [37].

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 [38,39].

CYP2E1 geni, CYP2E1 alt ailesine ait tek gendir [38]. CYP2E1 enzimi, etanol metabolizmasındaki önemli rollerinin bulunması ve kimyasal karsinojenlerin aktivatörü olmalarının yanında [40], tütündeki en önemli nitrozamin olan

Nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) dışında, bazı spesifik nitrozaminleri de aktive etmektedir [41-43]. Parasetamol, klorzoksan, enfluran, halothan vb. hidrofobik bileşikler CYP2E1'in substratlarını oluşturmaktadır. [44]. CYP2E1 substratları aynı zamanda CYP2E1 uyarıcı ajanlardır; örnek olarak aseton, etanol, piridin, pirazol ve isoniazid verilebilir [45]. CYP2E1 prokarsinojenleri aktive ettiği gibi doku zedelenmesine yol açan serbest radikaller de oluşturur ve bu radikaller substrat varlığından etkilenmezler [40].

CYP3 ailesi CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 ve CYP3A43 genlerini içermektedir [38]. 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 [43,45].

1.3. Akciğer Kanserinde CYP 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 dâhil 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 addüktlerinin ve CYP1A1

seviyelerinin yüksek olduğunu vurgulanmıştır [46]. Mc Lemore ve ark. (1990), akciğer kanserli 56 hasta ile northern blotlama yöntemi ile yaptıkları çalışmada, 10 hastada CYP1A1 mRNA'sını [47], immunohistokimyasal yöntemle 12 akciğer kanserli hastada da Taussaint ve ark. (1993), CYP1A1 izoziminin protein ifadesini göstermişlerdir [48]. 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 [49]. Akciğer tümörlü ve normal dokularında Kivisto ve ark. (1996), CYP3A ifadesini immunohistokimyasal yöntemle belirttiklerini bildirmişlerdir [50]. 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 [51]. Spivack ve ark. (2001), RT-PCR ve western blotlama teknikleri ile yaptığı çalışmada CYP1B1'in akciğer kanserli ve normal dokularında ifadelerini göstermiştir [52]. Czerwinski ve ark. (1994), RNase protection assay yöntemiyle CYP2B7 ve CYP4B1 mRNA'larının akciğer kanserinde normal ve tümörlü dokularda belirttiğini rapor etmiştir [53]. 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 [54]. 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 [55]. 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 [56]. İmmunohistokimyasal yöntemlerle, Oyama ve ark. (2007), 48 akciğer adenokanserli hastanın %48'inde [57], Chang ve ark. (2007), 107 akciğer adenokanserli hastaların %37'sinde CYP1A1 izoziminin protein ifadesini göstermişlerdir [55]. Lin ve ark. (2003), 89 KHDAK'lı hastayla yaptığı çalışmada hastaların dokularında %47 oranında CYP1B1'in protein ifadesinin olduğunu vurgularken [58], Chang ve ark. (2007), 107 hastanın %49'unda bu

izozimin protein ifadesinin pozitif olduğunu bildirmiştir [55]. Kivisto ve ark. (1995), 28 akciğer kanserli hastanın %46'sında CYP2E1 izoziminin protein ifadesini belirtirken [59], Oyama ve ark. (2007) yaptığı çalışmada 48 hastadan %48'inin dokularında bu izozimin protein ifadesini göstermiştir [57].

Yapılan bu çalışmada da; vücutta kanser oluşum mekanizması ve ilaç dirençliliğinde önemli rolü olan detoksifikasyon mekanizmasının I. Faz reaksiyonlarını katalizleyen, CYP1A1, CYP1B1 ve CYP2E1 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 detoksifikasyon 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 Cyclers 480)
- Thermal Cyclers 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)
- Ocak (Arçelik021)
- Düdüklü Tencere (Hisar)
- Boyama tablası (Biogen)
- Mikrotom bıçağı (Shandon MB35)
- Lamel (Isolab)
- Poly-L-lysin kaplı lamlar (Thermo)
- -80 °C Buzdolabı (GFL6485)

- Mezür, beher, erlenmayer, balon joje (isolab)
- Multiwell plate (Roche)

2.1.2. Kullanılan Kitler ve Kimyasal Malzemeler

- Prafine 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)
- 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.)

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 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.)

Çizelge 2.1. Çalışmaya konu olan hastaların klinik bilgileri

		KHDAK		Adenokarsinom		Squamoöz H. K.	
		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				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, parafine 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 günün ardından pelletler filtreli eppendorf tüplere aktarılarak üzerlerine 325 µl Binding Buffer ve 325 µl etanolle karışımdan 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 [60].

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 [61].

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 reverstrankripsiyonu işlemi sonlandırılmıştır [62].

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) 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 Şekil 2.1.'de verilen PCR koşullarında, Light Cycler 480 Real Time PCR cihazında, monocolor Hydrolysis/UPL Probe'da 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) 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 Software'ında otomatik olarak hesaplandı [63].

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 (CYP1A1 1/50; CYP1B1 1/400; CYP2E1 1/300) uygulandı. Aralarda PBS tamponla 3 kere yıkanmak şartıyla örneklerle 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 mikroskopunda, 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 [64].

2.3.3. İstatistiksel Analiz

Yapılan çalışmada 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

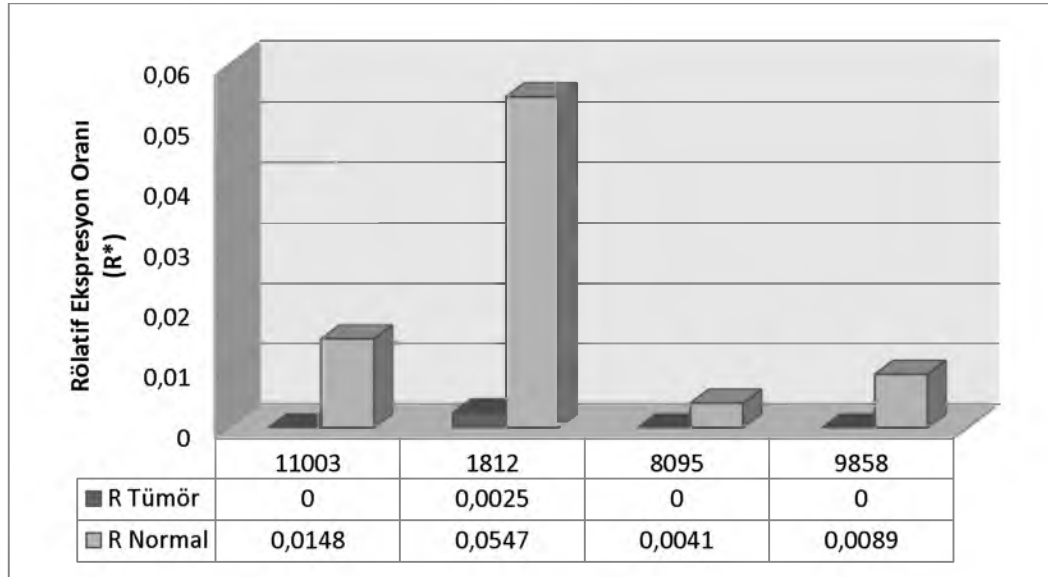
Hasta No	Tümör (µg/ml)	Normal (µg/ml)	Hasta No	Tümör (µg/ml)	Normal (µg/ml)
10023/10	1,53	1,21	13336/11	1,41	<20 ng
10485/11	<20 ng*	<20 ng	13754/11	2,83	0,41
10584/11	1,65	2,28	13957/11	1,31	<20 ng
10565/10591	1,31	<20 ng	14462/11	2,55	0,78
10963/11	4,61	0,634	14464/11	2,96	0,86
11000/11	0,934	0,808	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 Enzimlerinin Gen İfadelerinin Sonuçları

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

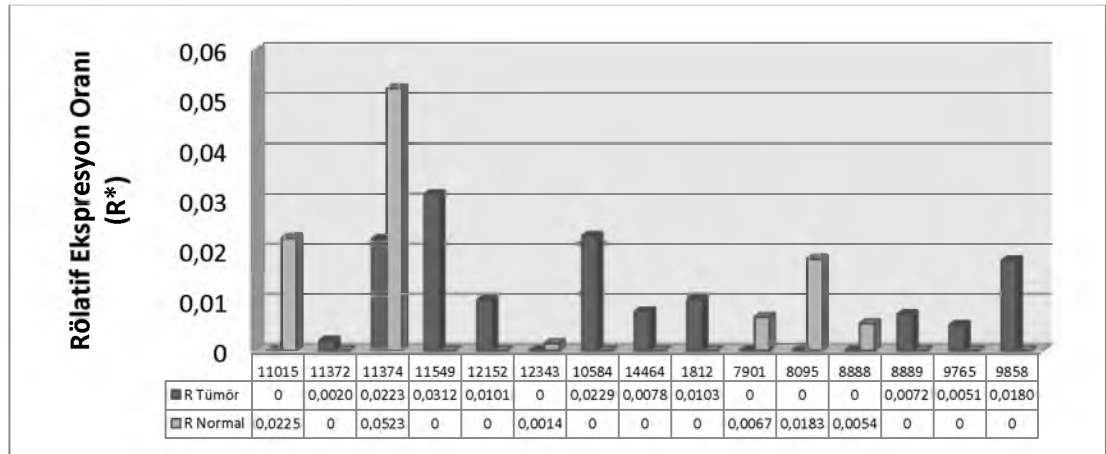
Hastaların CYP1A1 mRNA düzeylerine bakıldığında; 39 hastadan 2'si akciğer adenokarsinomlu, 2'si de squamoz hücreli karsinomlu hasta olmak üzere toplamda 4 hastada (%10,3) CYP1A1 izoziminin gen ifadesine rastlanmıştır. Bu hastaların 1'inin hem tümör hem de normal dokularında CYP1A1 izoziminin rölatif 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.

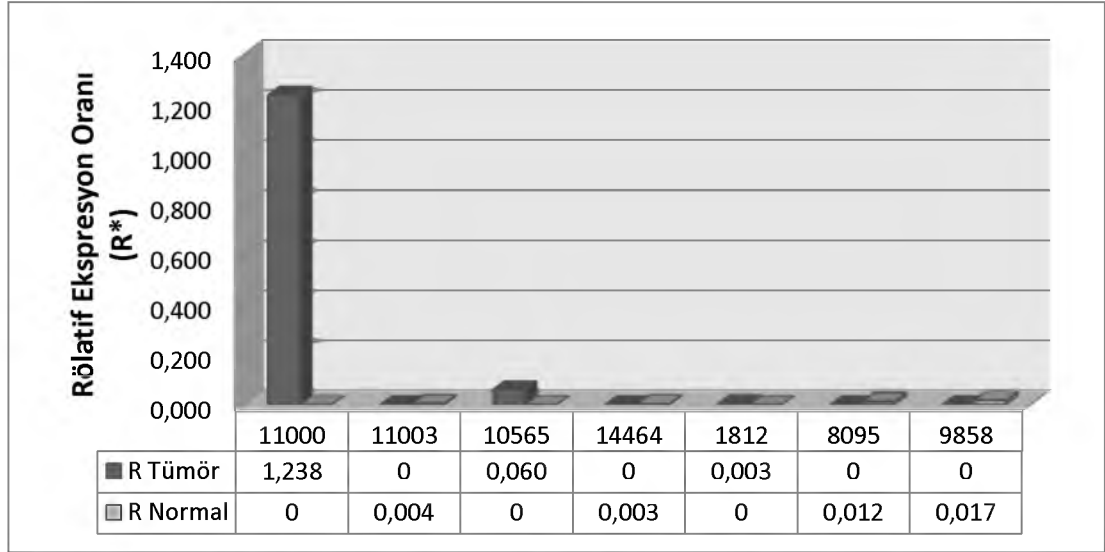


*R: Roche Light Cycler 480 Software programında relative quantification metoduna göre hesaplanmış rölatif gen ifadelerinin oranıdır.

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 Cycler 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 satırlara 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) rölâtif 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. 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 3.4.), CYP1B1 izoziminin 39 hastanın tamamında (%100) (Şekil 3.5.); CYP2E1 izoziminin 39 hastanın 25 (%64,1)'inde (Şekil 3.6.) 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 3.7.).

Çizelge 3.7. KHDAK'da tümörlü ve normal dokular eşleştirildiğinde CYP izozimlerinin protein ifadelerinin yüksek olduğu tümörlü dokuların sayıları ve yüzde oranları

	Total (n)	CYP1A1		CYP1B1		CYP2E1	
		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
Squamos 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.

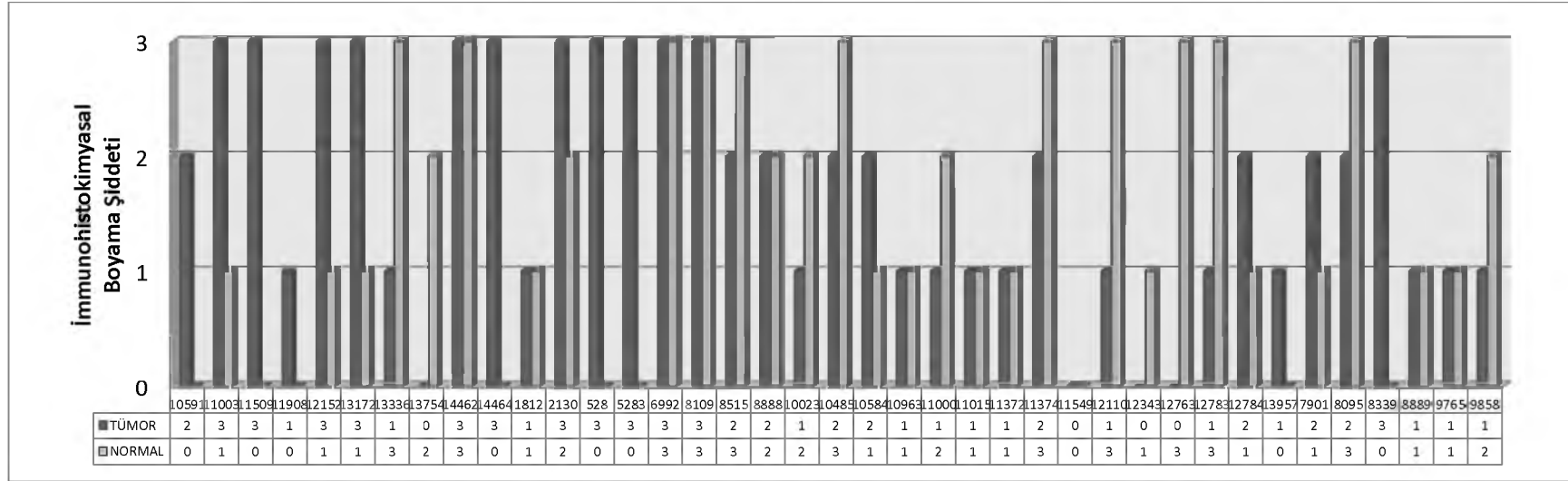
İmmunohistokimyasal skorlamalarının ortalamalarına göre KHDAK'lı hastalarda tümörlü ve normal dokular arasındaki protein ifadelerinin farklılıkları incelendiğinde; CYP1A1 ve CYP2E1 izozimlerinin protein ifadelerinin tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu; CYP1B1 izoziminin ise protein 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 3.8.)

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.

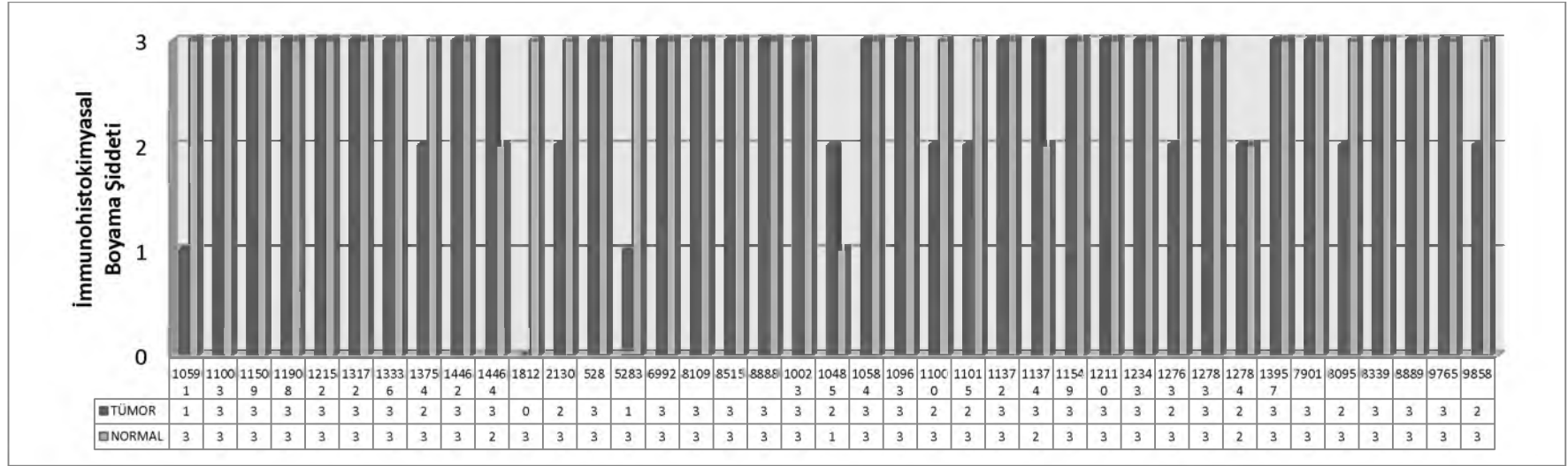
Adenokarsinomlu hastaların immunohistokimyasal skorlamalarına bakıldığında; CYP1A1 ($p=0,02$) (Şekil 3.7) ve CYP2E1 ($p=0,04$) (Şekil 3.8.) izozimlerinin protein ifadelerinin tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu görülürken, CYP1B1 izoziminin protein ifadesinin normal dokularda tümörlü dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. Ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p>0,05$) (Çizelge 3.8.).

Squamos hücreli karsinomlu ($n=21$) hastalara genel olarak bakıldığında, CYP1A1 izoziminin 21 hastadan 20 (%95,2)'sinde, CYP1B1 izoziminin 21 hastanın tamamında (%100) (Şekil 3.9.); CYP2E1 izoziminin 21 hastanın 17 (%81)'sinde tümörlü ve normal dokularının birinde yada her ikisinde protein ifadelerinin olduğu görüldü.

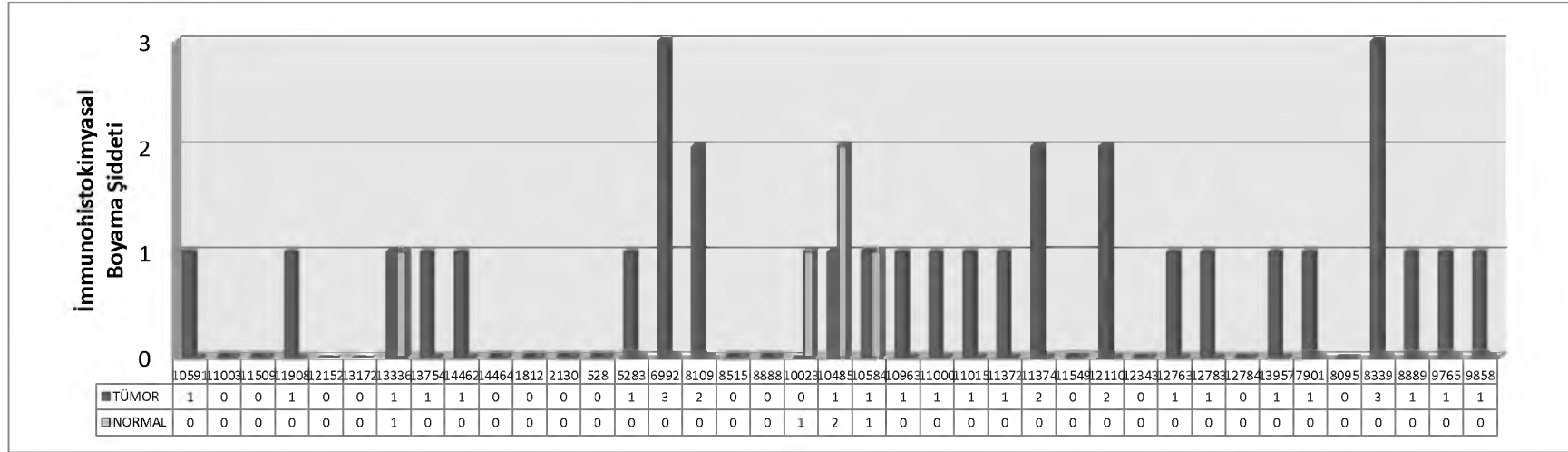
Squamos hücreli karsinomlu hastaların immunohistokimyasal skorlamalarına bakıldığında, normal dokularda CYP1A1 ve CYP1B1 izozimlerinin protein ifadeleri tümörlü dokulara oranla daha fazla iken; CYP2E1 izoziminin protein ifadesi ise tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha fazla olduğu görüldü. İstatistiksel 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 3.8.).



Şekil 3.4. KHDAC'lı hastaların tümörlü ve normal dokularında CYP1A1 izoziminin protein ifadesi



Şekil 3.5. KHDAC'lı hastaların tümörlü ve normal dokularında CYP1B1 izoziminin protein ifadesi



Şekil 3.6. KHDAK'lı hastaların tümörlü ve normal dokularında CYP2E1 izoziminin protein ifadesi

Çizelge 3.8. 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		1,74±0,16 ^a	1,49±0,18	1,16	2,59±0,12	2,87±0,07	0,9	0,80±0,13	0,13±0,07	6,15
Total	39	(0-3) ^b	(0-3)	0,3128	(0-3)	(1-3)	0,1190	(0-3)	(0-2)	0,0001
Adenokarsinom		2,33±0,23	1,39±0,29	1,67	2,5±0,22	2,94±0,06	0,9	0,61±0,2	0,06±0,06	10,16
	18	(0-3)	(0-3)	0,0279	(0-3)	(2-3)	0,2417	(0-3)	(0-1)	0,0445
Squamos Hücreli Karsinom		1,24±0,17	1,57±0,24	0,79	2,67±0,11	2,81±0,11	0,95	0,96±0,74	0,19±0,11	5,05
	21	(0-3)	(0-3)	0,3924	(2-3)	(1-3)	0,3391	(0-3)	(0-2)	0,0008

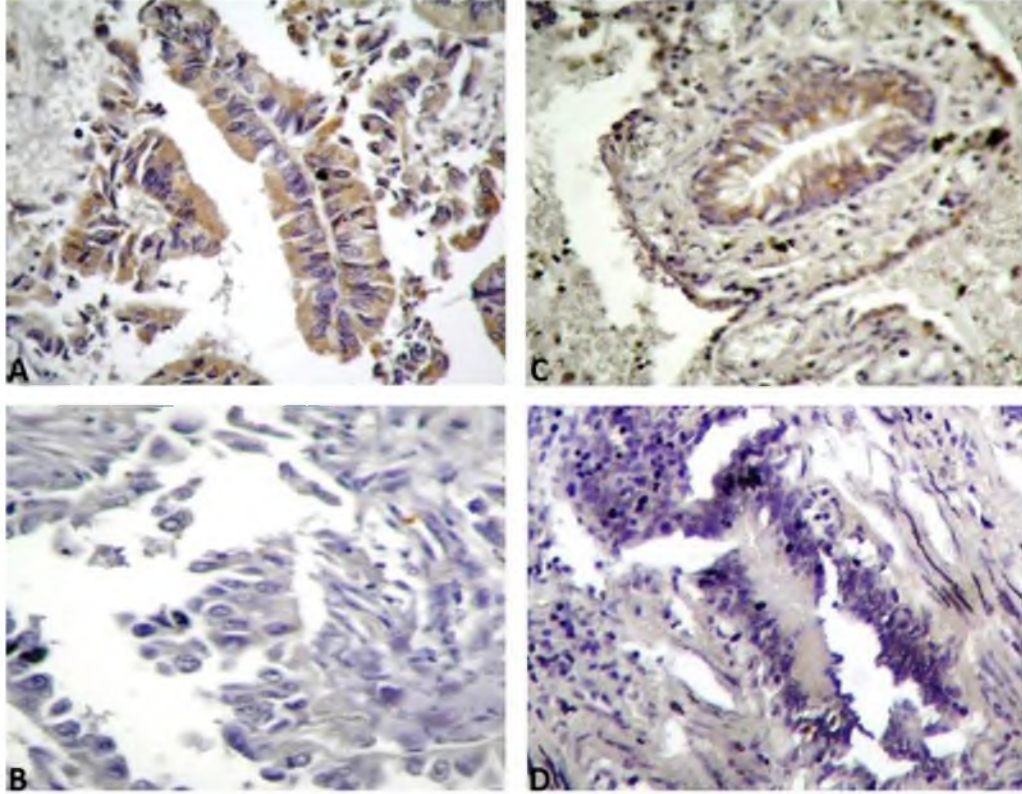
Boyanma skorları, pozitif boyanmış neoplastik (tümör dokusu) ve non-neoplastik (kontrol; akciğer bronş ve alveol epitel dokuları) hücrelerin boyanma şiddetine göre hesaplanmıştır. Buna göre 0; protein ifadesi görülmeyen, 1; hafif şiddette protein ifadesi, 2; orta şiddette protein ifadesi ve 3; şiddetli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

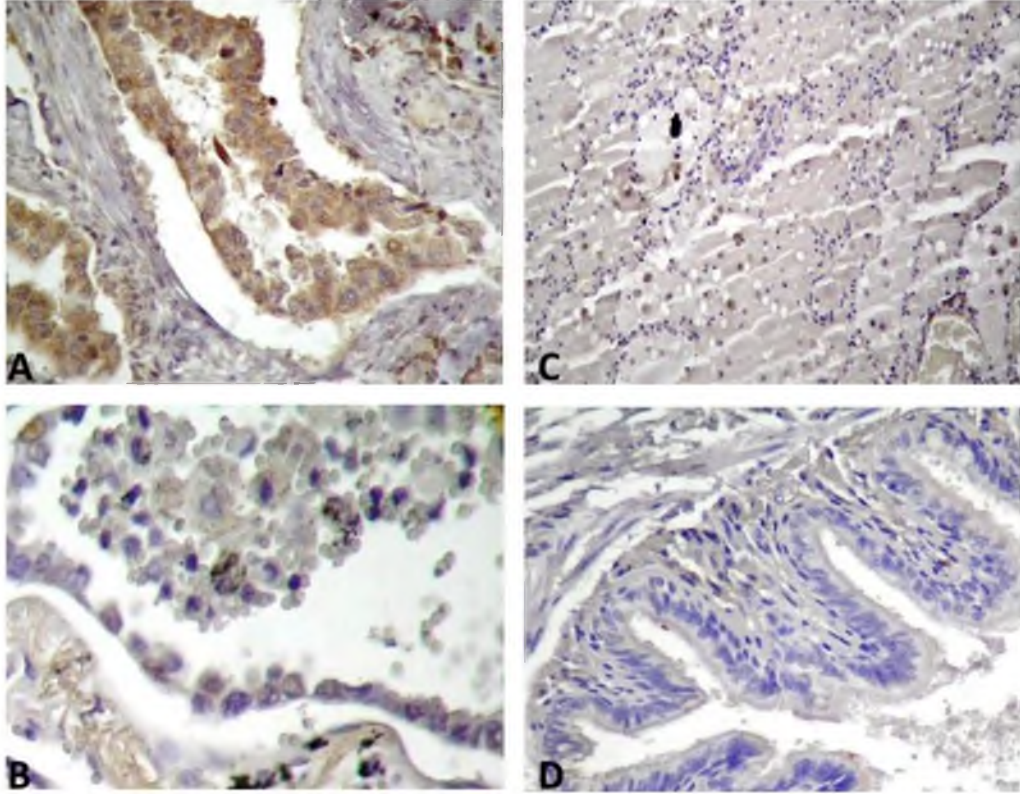
a: ortalama değer±standart hata

b: minimum ve maksimum boyama şiddeti

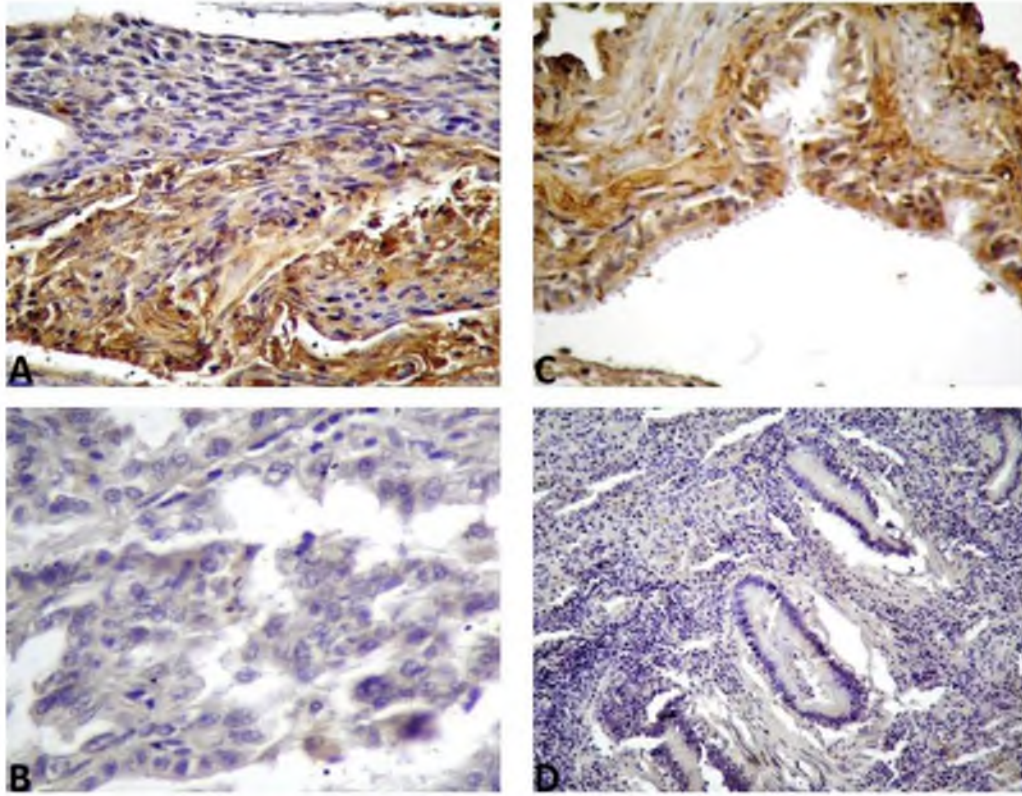
*: Tümör/Normal oranı



Şekil 3.7. 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 3.8. 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 3.9. 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 3.9.).

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 3.9. 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 görülmeyen, 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 ($p>0,05$) (Çizelge 3.10.). 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 3.10.). 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 3.10.) 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 3.10.). 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 3.10. 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
Adenokarsinoma	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

Boyama skorları, pozitif boyanmış neoplastik (tümör dokusu) ve non-neoplastik (kontrol; akciğer bronş ve alveol epitel dokuları) hücrelerin boyama 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 3.11.)

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 3.11.).

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 3.11.).

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

Çizelge 3.11. 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 görülmeyen, 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 3.12.).

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 3.12. 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 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

4. Sonuçlar ve Tartışma

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 yaşadığımız boyunca, başta PAH'lar olmak üzere, 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD), nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pridyl)-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 [35,36,41,43,45] 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'ununda 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 [56]. 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 [56].

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 ifadesinde hastalarda arttığını istatistiksel olarak doğrulamışlardır [58].

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 [55]. Mollerup ve ark. (1999)'nın normal akciğer dokularında yaptıkları çalışmada, erkek sigara içicileri ile kadın sigara

içicileri karşılaştırıldığında, kadınların akciğerinde, aromatik/hidrofobik DNA addüktlerinin ve CYP1A1 seviyelerinin yüksek olduğunu vurgulanmıştır [46].

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 [57].

Mc Lemoire ve ark. (1990), akciğer kanserli 56 hasta ile nothern blotlama yöntemi ile yaptıkları çalışmada, 10 hastada CYP1A1 mRNA'sını [47], immunohistokimyasal yöntemle 12 akciğer kanserli hastada da Taussaint ve ark. (1993), CYP1A1 izoziminin protein ifadesini göstermişlerdir [48]. 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 [49].

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 [51].

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 [50].

Yapılan bu çalışmada, KHDAK'lı hastaların tümörlü ve normal dokularında, ksenobiyotik mekanizmasında I. Faz reaksiyonları katalizleyen CYP enzimlerinden, CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1 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 CYP1B1 ve 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.

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.

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.

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 ($p<0,05$).

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 ($p<0,05$).

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 ($p<0,05$).

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.

Çalışmada CYP izozimlerinin gen ifadeleri, diğer floresans boyar maddeleri barındıran problardan daha özgül olan ve Roche Diagnostic firmasının geliştirdiği ve diğer patent isimlerince TaqMan prob olarak da bilinen hidroliz problarla 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 [65], 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 [66], bu çalışmada da arşiv dokularından CYP 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 izozimleri sadece çevresel ve prokarsinojenlerin metabolizmasında 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 [67].

Yapılan bu çalışmada 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 izoziminin 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 ya da 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 [68].

Özetle söylenecek olursa, yapılan bu çalışmada KHDAK'lı 39 hastanın tümörlü ve normal dokuları arasında CYP1A1, CYP1B1 ve CYP2E1 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 düşünülmektedir.

aradaki farkın belirtilmesi gerekmektedir. İmmunohistokimyasal açıdan incelendiğinde literatür verilerine uygun olarak çalışmamızda yaklaşık olarak hastaların tamamında normal ve tümörlü dokularında CYP1B1 izoziminin protein ifadelerinin aşırı yüksek olduğu görülmektedir. Bu enzimlerin aşırı ifadelerin yanında CYP1A1, CYP2E1 izozimlerinin protein ifadelerinin tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha yüksek olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Çalışma kapsamında incelen hastalar ilaç almayan hastalar olduğundan, bu izozimlerin ifadelerinin ilaç etkileşimleriyle olan ilişkisi bu çalışmada belirtilemese de, literatür verilerine göre bu izozimlerin substratı olan ilaçlarının özellikle CYP1B1 protein ifadeleri yüksek olan hastalara verilip verilmemesi hususunda klinik açıdan bir ön bilgi oluşturmaktadır. Kemoterapik açıdan incelendiğinde, bu enzimlerin KHDAK'da kullanılan anti kanser ilaçları ile ilişkilendirildiği ve ilaç direncine yol açan yolların 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., Kırıñoğlu C.E., Sigara ve Akciğer Kanseri. Solunum. 5:139-145, 2003.
- [6] G. Uçar, Akciğer Kanselerinde Siklooksijenaz-2, Vasküler Endotelial 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] Cooke B., T. F. Indoor Air Pollutants, A. Literatüre Review, Reviews on Environmental Health. 9. 3. 1991.
- [10] 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.

- [11] Last, J. M., Wallace. R. B. Maxcy - Rosens - Last Public Health And Preventive Medicine, Appleton Lange, Newyork, 1992.
- [12] Ç. Akdoğan, Radon Kirliliği Ve Halk Sağlığı İlişkisi, Ege Üniversitesi Bitirme Tezi. İzmir, 2010.
- [13] 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.
- [14] İtil O. Akciğer kanserlerinin epidemiyolojisi ve etiolojisi. In:Haydaroğlu A. Akciğer kanserleri; tanı ve tedavi. 1. Baskı. İzmir, Ege Üniversitesi Basımevi. 15-34, 2000.
- [15] 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.
- [16] Alkoçlu A, Özkurt S. Akciğer kanserini önleyici ilaç tedavisi. Ed. Hastürk S, Yüksel M. Akciğer kanseri, Özlem Grafik Matbaacılık, 351–358, İstanbul, 2000.
- [17] 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.
- [18] Bouchardy C, Benhamou S, Jourenkova N, Dayer P, Hirvonen A. Metabolic genetic polymorphisms and susceptibility to lung cancer. *Lung Cancer*, 32: 109–112, 2001.
- [19] 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.

- [20] World Health Organization. Histological typing of lung and pleural tumors. World Health Organization, Copenhagen, 1999.
- [21] Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavi Rehberi, Türk Toraks Dergisi. (7):2, s:001-035, 2006.
- [22] Trends in Lung Cancer Morbidity and Mortality American Lung Association epidemiology and statistics unit research and program services, 2005.
- [23] Zeren EH. Akciğer Kanserine Patolojik Yaklaşım. In: Hastürk S, Yüksel M, Eds. Akciğer Kanseri. Bilmedya Grup, 2: 29–45 İstanbul, 2000.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. Chest. 111:1710-7, 1997.
- [27] Vural, N., Toksikoloji, A.Ü. Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 73, 2005
- [28] Jamieson D., BCM1.2 Molecular Toxicology **Xenobiotic metabolism**. http://web.sls.hw.ac.uk/teaching/Derek_J/mol_tox/lectures/files/xenobiotic_metalabolism/index.html, Erişim Tarihi: 15.06.2013
- [29] 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.

- [30] Guengerich, F.P., *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*. Edited by Ioannides C. John Wiley and Sons Ltd, USA, 2002.
- [31] Cantürk P., *Mide Antrum Mukoza Örneklerinde Sitokrom P450 Gen Ekspresyonunun mRNA Düzeyinde Belirlenmesi*, Ege Üniversitesi. Yüksek Lisans Tezi. İzmir, 2008.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] Schmidt, J.V., Bradfield, C.A., Ah receptor signalling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 55-89, 1996.
- [36] 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.

- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] Lieber, C.S., Cytochrome P-4502E1: Its physiological and pathological role. *Physiol Rev.*, 77:517-544, 1997.
- [41] Hecht, S.S., Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl. Cancer Inst.* 91:1194-1210, 1999.
- [42] 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.
- [43] Yamazaki, H., Inui, Y., Yun, C.H., Guengerich, F.P., 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.

- [44] 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.
- [45] Thummel, K.E., Wilkinson, G.R., *In vitro* and *in vivo* drug interactions involving human CYP3A. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:389-430, 1998.
- [49] Figen HANÇER, Akciğer Kanserinde Metabolik Polimorfizmin (GSTP1 Ala114Val) İlaç Rezistansındaki Rolü, Ankara Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi. Ankara, 2006.
- [46] 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.
- [47] 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.
- [48] 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.

- [49] 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.
- [50] 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.
- [51] 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.
- [52] 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.
- [53] 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.
- [54] 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.
- [55] 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.

- [56] 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.
- [57] 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.
- [58] 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.
- [59] 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.
- [60] 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.
- [61] 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.
- [62] 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.

- [63] Michael W. Pfaffl, Quantification strategies in real-time PCR, Chapter 3 pages 87 - 112 in: *A-Z of quantitative PCR* (Editor: S.A. Bustin) International University Line (IUL) La Jolla, CA, USA, 2004.
- [64] 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.
- [65] 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
- [66] 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.
- [67] Purnapatre K., Khattar S.K., Saini K.S., Cytochrome P450s in the development of target-based anticancer drugs, *Cancer Letters* 259: 1–15, 2008.
- [68] 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.

Ek 1b. Sunumlar-Bildiriler

Yapılan bu çalışmanın bulguları, yürütücülüğünü Kırıkkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Serpil Oğuztüzün'ün yaptığı, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen 2011/16 proje numaralı “Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri CYP ve GST Polimorfizlerinin Mrna ve Protein Ekspresyonları Üzerine Olası Etkilerinin Ortaya Konması” başlıklı çalışmanın bazı bulguları ile birleştirilerek, Moleküler Kanser araştırma Derneğinin, 13-16 Aralık 2012 tarihleri arasında, Uludağ Üniversitesi Prof. Dr. Mete Cengiz Kültür Merkezi, Bursa’da düzenlediği IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi’nde SB09 numarası ile projenin yardımcı araştırmacılarından biri olan Dr. Murat KILIÇ tarafından çalışma ekibi ve üniversite adına, sözlü bildiri olarak sunulmuştur. Bildiri kitapçığı kapak sayfası ve bildiri kitapçığında özet metinler aşağıda verilmiştir.

Bildiri Künyesi: Murat Kılıç, Serpil Oğuztüzün, Sezgin Çelik, Funda Demirağ, Latif Öztürk, Pınar Bıçakçıoğlu, Ahmet Oğuz Ada, Mümtaz İşcan. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomunda (KHDAK) Sitokrom P450 (CYP) ve Glutatyon 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

Ek 1b.

Bildiri Kitapçığı Kapak Sayfası

IV. MULTİDİSİPLİNER KANSER ARAŞTIRMA KONGRESİ



13 - 16 Aralık 2012
Prof. Dr. Mete Cengiz Kongre ve Kültür Merkezi, Bursa



ANA KONULAR

- Karsinogenez
- Kanser hücresinde sinyal ileti
- Yeni kanser ilaç keşfi ve geliştirme
- Kanserde hayvan Modelleri
- Epigenetik
- Tümör kemosenitivite testi
- Preklinik sitotoksosite Testleri
- Anjlojeniz
- Kanserde mikroçevre
- Kanserde bireye özgü tedavi
- Doğal antikanser bileşikler
- Klinisyenlerin laboratuardan beklentisi
- Nanoteknoloji ve kanser
- Kanser Kök Hücre
- Yeni biyobelirteçler
- miRNA ve Kanser

BİLİMSEL SEKRETERYA
Doç. Dr. Serap Çelikler

Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü 16059 Görükle - Bursa
T. 0224 2941796
e-posta: scelikler@uludag.edu.tr

www.kanserarastirma.org

SB-9

**Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomunda (KHDAK)
Sitokrom P450 (CYP) ve Glutasyon S Transferaz (GST)
İzozimlerinin Gen ve Protein Ekspresyonlarının
İncelenmesi**

Murat Kılıç^{1,2}, Serpil Oğuztüzün², Sezgin Çelik³, Funda Demirağ⁴, Latif Öztürk⁵,
Pınar Bıçakçıoğlu⁶, Ahmet Oğuz Ada⁷, Mümtaz İşcan⁷

¹Pamukkale Üniversitesi Acıpayam Meslek Yüksekokulu, Denizli

²Kırıkkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Kırıkkale

³Kırıkkale Üniversitesi Eğitim Fakültesi İlköğretim Bölümü, Fen Bilgisi Eğitimi Ana Bilim Dalı, Kırıkkale

⁴Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü, Ankara

⁵Kırıkkale Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Ekonometri Bölümü İstatistik Anabilim Dalı, Kırıkkale

⁶ Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göğüs Cerrahisi Bölümü, Ankara

⁷ Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Bölümü, Ankara

Özet

Akciğer kanserlerinin, başlıca çok sayıda polisiklik aromatik hidrokarbonlara ve sigara dumanında bulunan karsinojenlere maruziyet sonucu oluştuğu bilinmektedir(1). Ksenobiyotiklerin etkilerinin, enzim ya da çeşitli moleküller yardımıyla zararsız hale getirilerek vücuttan atılması, detoksifikasyon mekanizmaları ile sağlanır. Detoksifikasyon mekanizmasında, CYP izozimlerinin katalizlediği Faz I reaksiyonlarında, lipofilik ksenobiyotikler genelde daha polar türevlerine dönüştürülürler ve Faz II reaksiyonları ile konjugasyona uğrayıp vücuttan atılırlar. Ksenobiyotiklerin özellikle karsinojenik etkilerinden korunmada, beş farklı Faz II reaksiyonlarından biri olan glutasyon ile konjugasyonda, glutasyon-S-transferaz (GST) izozimleri önemli rol oynar (2). Murray(1997), akciğer tümörleri dahil çeşitli tümörlerde CYP1B1 izoziminin aşırı eksprese olduğunu rapor etmiştir(3). Oğuztüzün (2010), GST izozimlerinin KHDAK'da normale göre fazla eksprese olduğunu bildirmiştir (4). Bu çalışmada, KHDAK'da CYP ve GST izozimlerinin mRNA ve protein ekspresyonlarının incelenmesi amaçlanmıştır. Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü'nden alınan 39 hastanın KHDAK'li normal ve kanserli parafine gömülü dokuları çalışma grubu olarak belirlendi ve Faz I enzimler için CYP1A1, CYP1B1 ve CYP2E1 izozimleri, Faz II enzimlerinden GSTM1, GSTP ve GSTT1 izozimlerinin gen ekspresyonlarını incelemek için kesitler alındı. Parafine gömülü dokulardan RNA izolasyonu ve cDNA reverstranskripsiyonu yapıldı ve belirtilen genlerin primer problemleri ile mRNA

düzeyleri hidroliz proba RT-PCR da incelendi. Protein ekspresyonları için parafin bloklardan alınan kesitlere belirtilen antikorlar ile immunohistokimyasal inceleme yapıldı(4). Gen ekspresyon sonuçlarına bakıldığında, CYP1A1'in için, 4 hastanın normal dokularında eksprese edildiği, 35 hastada edilmediği görüldü. CYP1B1'in; 10 hastanın normal dokusunda, 6 hastanın tümörlü dokusunda fazla eksprese olduğu, 23 hasta da ekspresyon olmadığı görüldü. CYP2E1'in; 4 hastanın normal, 3 hastanın tümörlü dokusunda fazla eksprese olduğu 32 hastada ekspresyon olmadığı görüldü. GSTM1'in; 8 hastanın normal, 5 hastanın tümörlü dokularında fazla eksprese olduğu 26 hastada ekspresyon olmadığı, GSTP'nin; 10 hastanın tümörlü, 5 hastanın normal dokularında fazla eksprese olduğu 24 hastada ekspresyon gözlenmediği ve GSTT1'in; 16 hastanın normal, 11 hastanın tümörlü dokularında ekspresyonun fazla olduğu, 12 hastada ekspresyon gözlenmediği görüldü. İmmunohistokimyasal incelemelerde; CYP1B1, CYP2E1, GSTM1 izozimlerinin ekspresyonlarının tümörde normal dokuların bronş, alveol ve interstisyum bölgelerine göre daha fazla eksprese olduğu ($p<0,05$); CYP1A1, GSTP ve GSTT1 izozimlerinin ise tümörde, normal dokuların alveol ve interstisyum bölgelerine göre daha fazla eksprese olduğu ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Ayrıca dokulara göre ekspresyonlar değerlendirildiğinde; tümörde, CYP1B1 ve GSTP izozimleri CYP2E1 ve GSTM1 izozimlerine göre daha fazla eksprese olduğu ($p<0,05$) görüldü. Normal dokuların bronşlarında, CYP1A1, CYP1B1 ve GSTP izozimlerinin CYP2E1 ve GSTM1 izozimlerine göre daha fazla eksprese olduğu; alveollerinde, CYP1B1'in, diğer izozimlerin tamamına göre daha fazla eksprese olduğu; interstisyumda ise, CYP1B1 ve GSTP izozimlerinin CYP1A1, CYP2E1, GSTM1 ve GSTT1 izozimlerine göre daha fazla eksprese gösterdiği ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Sonuç olarak özetle, detoksifikasyon ve ilaç metabolizmasında görevli Faz I ve Faz II enzimlerinin ekspresyonların bu hastalıkta farklılık göstermesi, diğnostik ve terapötik açıdan önemlidir.

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

Kaynaklar

1. Isao Goto, Shuichi Yoneda, Mitsunobu Vaniamolo, Kaname Kawajiri, Prognostic Significance of Germ Line Polymorphisms of the CYP1A1 and Glutathione S-Transferase Genes in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer, (Cancer Research 56. .1725-3730. 1996.
2. Duygu EROL, Tiroid Papiller Ve Folliküler Karsinom, Nodüler Hiperplazi Ve Folliküler Adenomalarda Sitokrom P450 (Cyp) Ve Glutatyon S-Transferaz (Gst) İzozimlerinin Protein Ekspresyonlarının İncelenmesi Ve Klinik-Serolojik Parametrelerle Karşılaştırılması, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Y. Lisans Tezi, Haziran 2012
3. Murray GI, Taylor MC, McFadyen MC, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD, Melvin WT. Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. Cancer Res. 57(14):3026-31, 1997
4. Serpil Oğuztüzün, Mehtap Aydın, Funda Demirağ, Ülkü Yazıcı, Müzeyyen Özhavzalı, Murat Kılıç, Mesude İşcan. The Expression of GST Isoenzymes and p53 in Matched Lung Tissue from Normal and Carcinoma. Folia Histochemica et Cytobiologica, 2010; 48(1):122-127, 2010

Investigation of Gene and Protein Expressions of Cytochrome P450 (CYP) and Glutathione S Transferase (GST) Isoenzymes in Non Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC)

Murat Kılıç^{1,2}, Serpil Oğuztüzün², Sezgin Çelik³, Funda Demirağ⁴, Latif Öztürk⁵,
Pınar Bıçakçıoğlu⁶, Ahmet Oğuz Ada⁷, Mümtaz İşcan⁷

¹Pamukkale University Acıpayam Vocational School, Denizli

²Kırıkkale University Faculty of Art and Sciences Department of Biology, Kırıkkale

³Kırıkkale University Faculty of Education Department of Elementary Science
Education, Kırıkkale

⁴Atatürk Chest Diseases and Chest Surgery Education and Research Hospital,
Department of Pathology, Ankara

⁵Kırıkkale University Faculty of Economics and Administrative Sciences Departmen
of Econometrics and Departments of Statistics, Kırıkkale

⁶Atatürk Chest Diseases and Chest Surgery Education and Research Hospital,
Department of Pathology, Ankara

⁷Ankara University Faculty of Pharmacy Department of Pharmaceutical Toxicology,
Ankara

Abstract

Lung cancer is known to occur as a result of the main exposure to carcinogens in cigarette smoke and many polycyclic aromatic hydrocarbons (1). Effects of xenobiotics, enzyme or with the help of various molecules to be taken out of the body by making a harmless event is provided with detoxification mechanisms. In Phase I reaction catalyzed by CYP isoenzymes in the detoxification metabolism, lipophilic xenobiotics are generally converted to more polar derivatives and are conjugated by Phase II reactions are eliminated from the body. Particularly, in the prevention of carcinogenic effects of xenobiotics, in conjugation with glutathione which is one of five different Phase II reaction, Glutathione S Transferase plays an imported role (2). Murray (1997) reported that CYP1B1 are overexpressed in a variety of tumors, including lung tumors (3). Oğuztüzün (2010) reported that GST isozymes expressed in NSCLC more than normal (4). In this study, mRNA and protein expressions of CYP and GST isozymes in NSCLC were investigated. Paraffin-embedded normal and cancerous tissues from 39 patients with NSCLC were identified as the study group which is taken from Atatürk Chest Diseases and Chest Surgery Education and Research Hospital, Department of Pathology and were sectioned to examine gene and protein expression of CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1 isoenzymes for Phaes I enzymes and GSTM1, GSTT1, GSTP isoenzymes for Phase II enzymes. RNA was extracted and cDNA was reverstranscribed from paraffin-embedded tissues and mRNA levels with primer-probes of specified genes were analyzed by hydrolysis probes at RT-PCR. Protein expression was evaluated by immunohistochemistry using specified antibodies for taken paraffine-embedded

tissues. According to the results of gene expression, CYP1A1 was expressed in normal tissues of 4 patients, but not expressed in 35 patients. CYP1B1 was expressed in normal tissue of 10 patients, tumor tissue of 6 patients, but 23 patients showed no expression. CYP2E1 was expressed in normal tissue of 4 patients, tumor tissue of 3 patients, but 32 patients showed no expression. GSTM1; was expressed in normal tissue of 8 patients, tumor tissue of 5 patients, but 26 patients showed no expression. GSTP; was expressed in normal tissue of 10 patients, tumor tissue of 5 patients, but 24 patients showed no expression. GSTT1; was expressed in normal tissue of 16 patients, tumor tissue of 11 patients, but 12 patients showed no expression. In immunohistochemical examinations, CYP1B1, CYP2E1, GSTM1 isozymes expressions were higher in tumor than bronchial, alveolar and interstitial region of normal tissues ($p < 0.05$); CYP1A1, GSTP and GSTT1 isozymes expressions were statistically significant higher in tumor than alveolar and interstitial of normal tissues ($p < 0.05$). In addition, by the expression of tissue were assessed in the tumor was observed CYP1B1 and GSTP isozymes expressions was higher than CYP2E1 and GSTM1 isoenzymes ($p < 0.05$). In bronchial of normal tissues, CYP1A1, CYP1B1 and GSTP isoenzymes' expressions were higher than CYP2E1 and GSTM1 isoenzymes. In alveolar region of normal tissues, CYP1B1 isozyme expression more higher than the other isoenzymes; In interstitial of normal tissues were observed, CYP1B1 and GSTP isozymes expressions were higher than CYP1A1, CYP2E1, GSTT1 and GSTM1 ($p < 0.05$). As a result, in summary, differ in this disease of expressions of Phase I and Phase II enzymes in detoxification and drug metabolizing is imported point of view diagnostic and therapeutic.

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

References

1. Isao Goto, Shuichi Yoneda, Mitsunobu Vaniamolo, Kaname Kawajiri, Prognostic Significance of Germ Line Polymorphisms of the CYP1A1 and Glutathione S-Transferase Genes in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer, (Cancer Research 56. 1725-3730. 1996.
2. Duygu EROL, Tiroid Papiller Ve Folliküler Karsinom, Nodüler Hiperplazi Ve Folliküler Adenomalarda Sitokrom P450 (Cyp) Ve Glutatyon S-Transferaz (Gst) İzozimlerinin Protein Ekspresyonlarının İncelenmesi Ve Klinik-Serolojik Parametrelerle Karşılaştırılması, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Y. Lisans Tezi, Haziran 2012
3. Murray GI, Taylor MC, McFadyen MC, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD, Melvin WT. Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. Cancer Res. 57(14):3026-31, 1997
4. Serpil Oğuztüzün, Mehtap Aydın, Funda Demirağ, Ülkü Yazıcı, Müzeyyen Özhavzalı, Murat Kılıç, Mesude İşcan. The Expression of GST Isoenzymes and p53 in Matched Lung Tissue from Normal and Carcinoma. Folia Histochemica et Cytobiologica, 2010; 48(1):122-127, 2010