

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LÖSEMİLERDE GSTM1 VE GSTT1 POLİMORFİZMİNİN
ROLÜ

107616

Nur ÖZTEN

107616

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS TEZİ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

2001, ANKARA

DOKTORA
YÜKSEK LİSANS TEZ SINAV TUTANAĞI

Öğrencinin Adı Soyadı : Nur Öztekin
Öğrenci No :
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji
Programı : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Tez Konusu : Lösemilerde GSTM1 ve GSTT1
polimorfizminin Rolü
Sınav Tarihi : 23.02.2001
Sınav Başlama Saati : 14:00
Sınav Bitiş Saati : 15:20

Karar : Tez sınavı sonucunda, yukarıda konusu belirtilen tezin, aşağıdaki gerekçeler doğrultusunda;

☒ Kabulüne

☐ Düzeltilmesine

☐ Reddine

Oybirliği / ~~oyçokluğu~~ ile karar verilmiştir.

Gerekçe :

Hayat Prof. Dr. Aykut Kence
Jüri Başkanı
Dr. Hayat Yurtcu Üye

Prof. Dr. Isık Bokesoy
Üye

Üye

Üye

Dr. Asuman Süngüoğlu

Dr. Doç. Dr. Timur Tuncel

Ekler:

- Tez jürisi bireysel raporları
- Dinleyici listesi.

İÇİNDEKİLER

İçindekiler	i
Kısaltmalar	iv
Şekiller	vi
Çizelgeler	vii
1.GİRİŞ	
1.1 Kimyasal Karsinogenler	1
1.2 Ksenobiyotikler ve Metabolizmaları	2
1.3 Glutasyon ve Ksenobiyotik İlişkisi	4
1.4 Glutasyon S-Transferaz Enzimleri	8
1.5 Glutasyon S-Transferaz Enzimleri ve Karsinogenez	14
1.6 GST Polimorfizminin Kaynağı	15
1.7 Karsinogenler ve Lösemi	18
2. GEREÇ VE YÖNTEM	20
2.1 Çalışma Grubu	20
2.2 Polimorfik Özelliklerin Belirlenmesi	20
2.2.1 DNA İzolasyonu ve Kantitasyonu	20
2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu	22
2.3 Sonuçların Değerlendirilmesi	24
3.BULGULAR	25
3.1 Çalışma Grubu	25
3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu	26
3.3 Polimorfik Özellikler	26
3.3.1 GSTM1 Genotipi	26
3.3.2 GSTT1 Genotipi	28

4.TARTIŞMA	30
4.1 GSTM1 Genotipi	32
4.2 GSTT1 Genotipi	33
5.SONUÇLAR	35
ÖZET	36
SUMMARY	37
KAYNAKLAR	38
EKLER	
EK 1.	43
EK 2.	44



KISALTMALAR

ADP:	Adenozin Difosfat
ALL:	Akut lenfoblastik lösemi
AML:	Akut myeloblastik lösemi
ATP:	Adenozin Trifosfat
bç:	Baz çifti
cGST:	Sitoplazmik Glutasyon S-Transferaz
CYP450:	Sitokrom P-450
dH₂O:	Distile su
DNA:	Deoksiribonükleik asit
dNTP:	Deoksinükleotid trifosfat
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit
GSH:	Glutasyon
GST:	Glutasyon S-Transferaz
KHCO₃:	Potasyum bikarbonat
KML:	Kronik myeloblastik lösemi
MDS:	Myelodisplastik sendrom
mRNA:	Messenger Ribonucleic Acid
NAA:	Nükleik aside bağlanan bileşikler
NaCl:	Sodyum klorür
NAT:	N-Asetil Transferaz
NH₄Cl:	Amonyum klorür
PAH:	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
PCR:	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RNA:	Ribonükleik asit
rpm:	Revolutions per minute
RX:	Elektrofilik bileşik
SDS:	Sodyum dodesil sulfat
STE:	Salt –Tris – EDTA

TBE: Tris – Borik asit – EDTA

UV: Ultraviolet



ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.1** Elektrofilik bileşiklerin biyomakromoleküllerle olan ilişkisi
- Şekil 1.2** Ksenobiyotiklerle başlatılan karsinogenez
- Şekil 1.3** Glutasyon molekülünün yapısı
- Şekil 1.4** Bir ksenobiyotiğin metabolizması
- Şekil 1.5** Glutasyonun elektrofilik bileşiklere bağlanması
- Şekil 1.6** Biyotransformasyon enzim polimorfizmleri için farklı moleküler
- Şekil 3.2** PCR reaksiyonu ile amplifiye edilen bölgeler
- Şekil 3.3** PCR ürünlerin agaroz jeldeki görüntüsü

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	İnsan Glutasyon S-Transferazları için sınıflandırma
Çizelge 1.2	Çeşitli organ ve dokulardaki sıçan glutasyon (GSH) ve enzimlerinin dağılımları
Çizelge1.3	Farklı GST sınıfları için substratlar
Çizelge 2.1	GSTM1, GSTT1 ve β -globin genleri için kullanılan primer dizileri
Çizelge 3.1	Lösemilerde GSTM1 ve GSTT1 genotipleri ile sigara, alkol kullanımı, aile öyküsü, yaş, cinsiyet karşılaştırması.
Çizelge 3.3	Hasta grubu ve kontrol grubu arasında GSTM1 genotip sonuçları
Çizelge 3.4.	Hasta grubu ve kontrol grubu arasında GSTT1 genotip sonuçları
Çizelge 4.1	GSTM1(-) ve GSTT1(-) genotiplerinin çeşitli kanserlerle olan ilişkisi

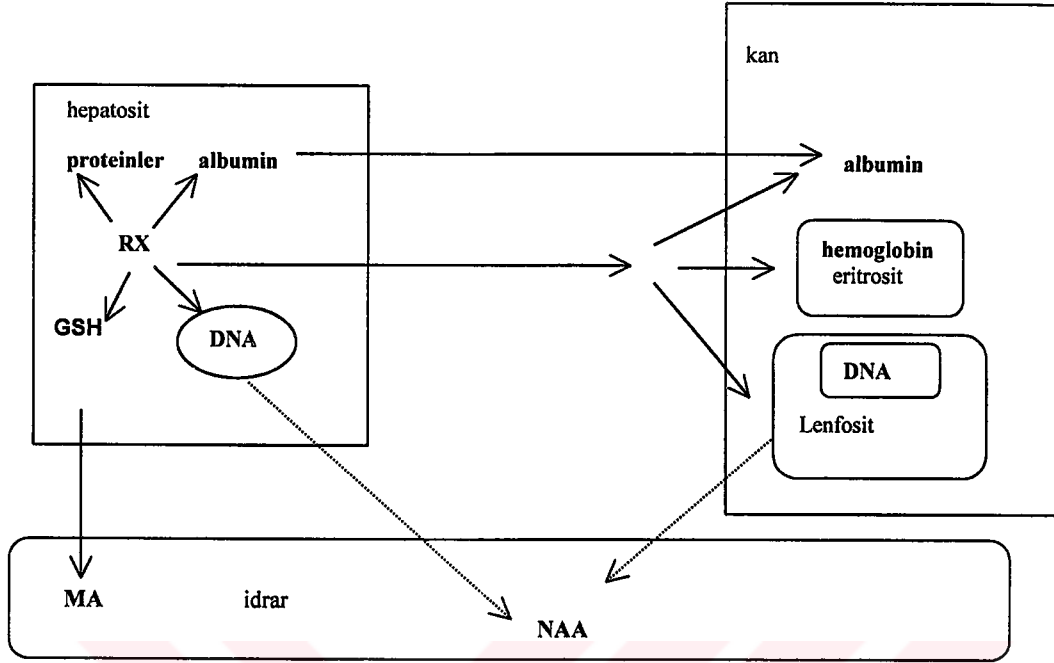
1.GİRİŞ

1.1. Kimyasal Karsinojenler

İnsanlarda kanser yapıcı nedenler arasında sıralanan sigara dumanı, hava, su, yiyecekler ve ilaçlardaki kimyasal maddeler, radyasyon ve enfeksiyöz ajanlar gibi çeşitli çevresel faktörlerin, genetik faktörlerle birlikte etkili olduğu bilinmektedir (Perera, 1996).

Kimyasal karsinojenler, genetik maddeyle ilişkiye geçmeden önce metabolik aktivasyona ihtiyaç duyarlar (Rollinson ve ark. , 2000). Bu kimyasallara karşı verilen hücresel yanıt ise, hücrelerin spesifik ajanlara maruz kalması durumunda bazı genlerin aktivasyona uğraması ve karsinojen etkiden korunma şeklinde gerçekleşmektedir (Wormhoud ve ark. , 1999). Hücresel yanıtta bireyler arasındaki farklılıkları yaratan, vücut ağırlığı, yaş, cinsiyet, genel sağlık durumu ve genetik yapı gibi biyolojik faktörlerdir (Kamrin, Bölüm 2, 1988).

Genelde hücreler, hücresel ajanlar olarak adlandırdığımız elektrofilik bileşiklere maruz kalmaktadırlar. Bu bileşikler etkilerini farklı nükleofilik bölgelere sahip hücre içindeki protein ve DNA'ya bağlanarak göstermektedirler. Örneğin bir hepatik metabolizma sırasında elektrofilik bileşiklerin biyomakromoleküllerle olan ilişkisi ele alındığında; bu ajanların hepatosit içindeki proteinler, DNA, GSH veya albumine bağlanmaları, süreklilik arzettikleri durumlarda ise kendilerine başka hedefler (örneğin, kan albumini, hemoglobin ve lenfosit DNA'sı gibi) seçerek toksik elektrofilik etkilerini göstermeleri sözkonusudur (Şekil 1.1) (Rooij ve ark. , 1998).



Şekil 1.1. Elektrofilik bileşiklerin biyomakromoleküllerle olan ilişkisi

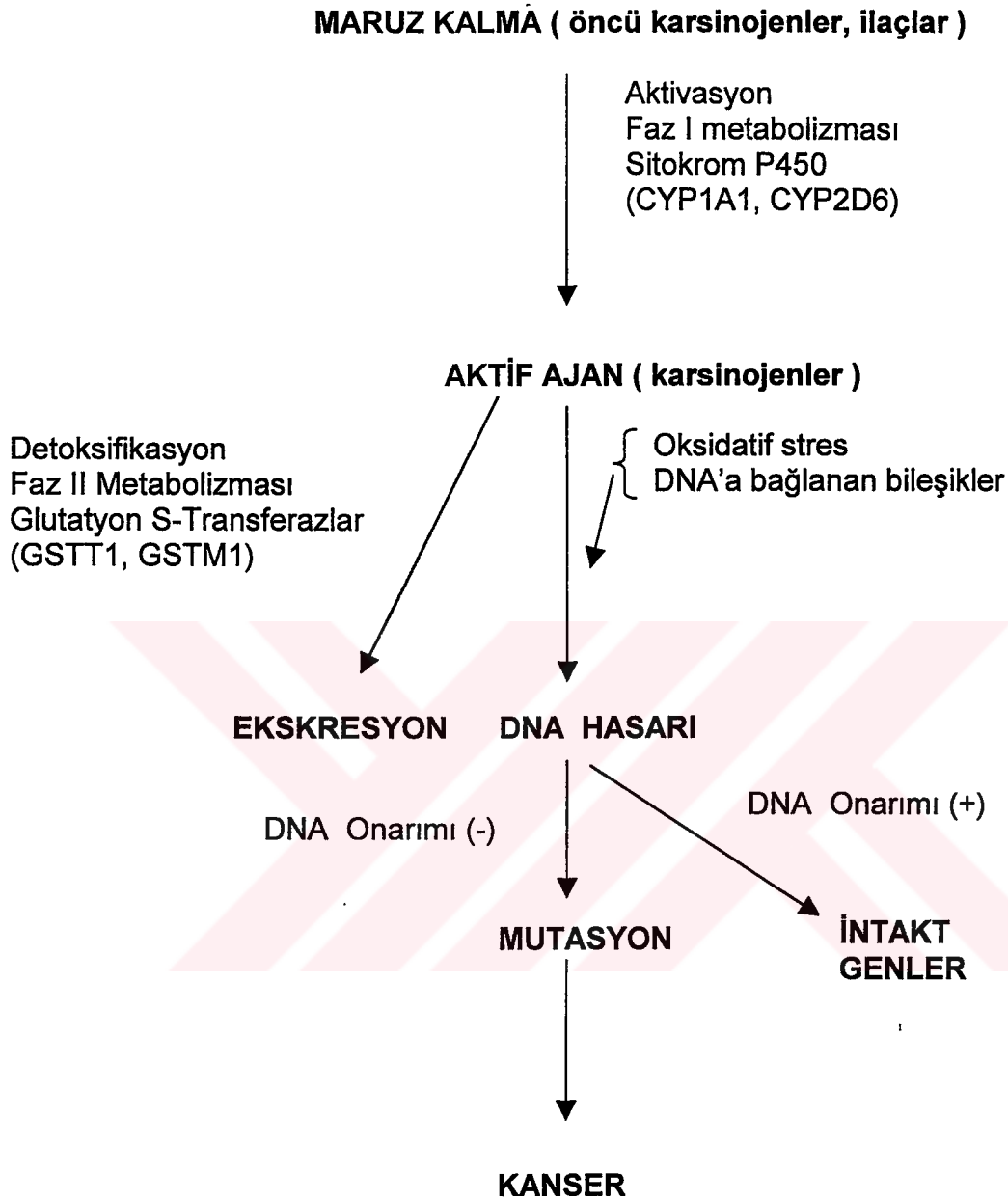
RX: Elektrofilik bileşik, GSH: Glutathione, MA: Metabolit, NAA: N-Asetilmetamfetamin, DNA: Deoksiribonükleik asit, Lenfosit: Lenfosit, Eritrosit: Eritrosit, Albumin: Albumin, Proteinler: Proteinler, Hepatosit: Hepatosit, Kan: Kan, Idrar: İdrar

Faz I'e katılan temel reaksiyon, monooksijenazlar veya sitokrom P-450 olarak adlandırılan enzimlerce katalizlenen hidroksilasyondur. Faz I'in diğer reaksiyonları redüksiyon ve hidrolizdir.

Faz I'de oluşan hidroksile bileşikler faz II'de çeşitli polar metabolitlere dönüştürülmektedir.

Ksenobiyotik metabolizmasındaki bu iki fazın baştan sona amacı, ksenobiyotiklerin sudaki çözünürlüklerini (polarite) artırmak ve bu şekilde vücuttan atılımlarını kolaylaştırmaktır (Murray, 1990, Bölüm 6).

Ksenobiyotikler sitokrom P-450 metabolizmasıyla aktifleştikten sonra faz II reaksiyonları olarak bildiğimiz glukoronidasyon, sulfasyon, metilasyon, asetilasyon ve glutatyon ile konjugasyon reaksiyonlarından biriyle metabolize edilmektedir. Böylece aktive maddeler reaktif olmayan ve suda çözünebilir ürünler olarak safra ya da idrarla atılmak üzere organizmadan uzaklaştırılır. Faz I ve Faz II enzim aktiviteleri arasındaki denge ksenobiyotiklerin organizma cevabında önemlidir (Şekil 1.2) (Sinnett ve ark., 2000).

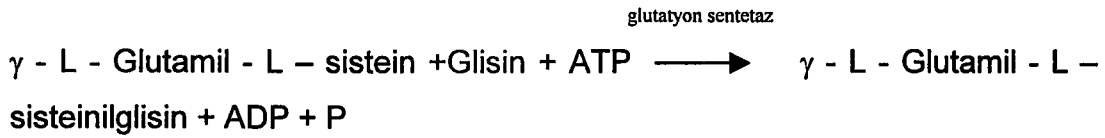
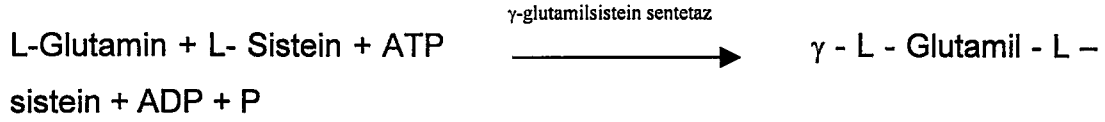


Şekil 1.2. Ksenobiyotiklerle başlatılan karsinogenez (Sinnett ve ark., 2000, modifiye)

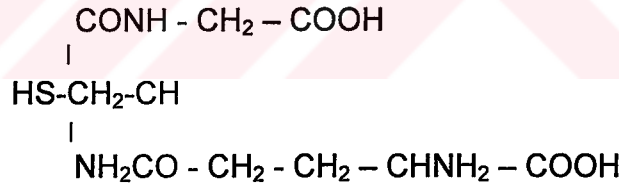
1.3. Glutasyon ve Ksenobiyotik İlişkisi

Glutasyon (γ glutamil sisteinil glisin) glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptiddir (Şekil 1.3) (Sipes ve ark. , 1997). İlk defa 1888'de

izole edilmiş, fakat yapısı 40 sene sonra açıklanmıştır (Commandeur ve ark. , 1995). Glutatyon (GSH), organizmada L-glutamik asid, L-sistein ve glisinden, γ -glutamilsistein sentetaz ve glutatyon sentetaz enzimlerinin etkisiyle iki aşamada meydana gelmektedir (Rooij ve ark. , 1998).



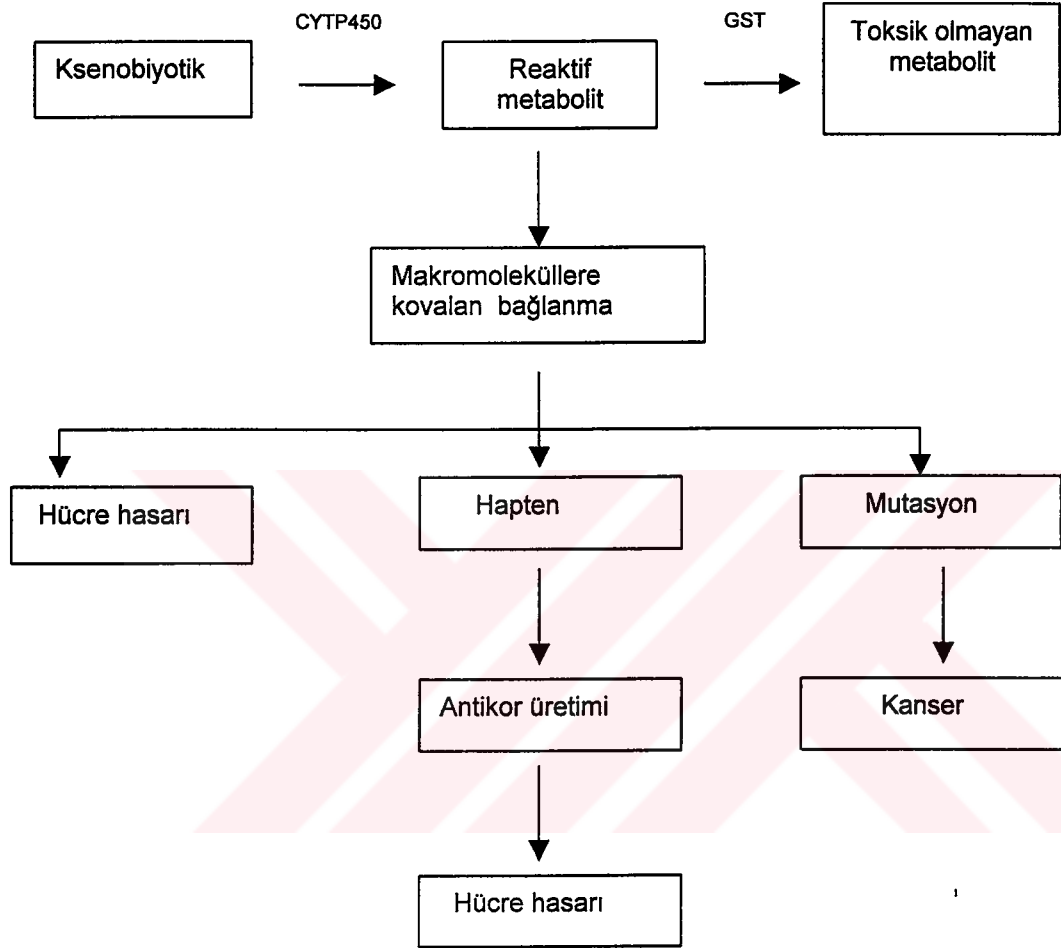
Glutatyon genelde GSH olarak kısaltılır; SH, sisteinin sülfidril grubuna işaret eder ve molekülün alışveriş yapan kısmıdır. Glutatyon ile ksenobiyotiklerin reaksiyonlarını katalizleyen enzimlere “glutatyon S-transferazlar”, kısaca “GST” denir (Hayes ve Pulford. , 1995)



Şekil 1.3. Glutatyon molekülünün yapısı

GST 'lar ve onların merkaptürik asit biyosentezindeki rolleri ilk kez 1961'de Booth ve ark. tarafından tanımlanmıştır (Hayes ve Pulford, 1995). Ksenobiyotik metabolizmasında glutatyonun rolü; faz I enzimlerince oluşturulan reaktif türlerin glutatyon ile konjugasyona girmesi ve sonuçta hücre makromolekülleri (DNA, RNA, protein) ile bağlanmasını engelleyerek hücre hasarını önlemesi şeklinde gerçekleşmektedir. Ksenobiyotiğin reaktif

türleri, bir proteine bağlanıp onu değişikliğe uğratıp antijenik özelliğini değiştirebilir. Ksenobiyotik bir hapten yani tek başına antikor sentezini uyarmayan bir molekül gibi davranıp, antikorla birleşip hücreyi hasara götürebilir (Şekil 1.4) (Murray, 1990, Bölüm 6).

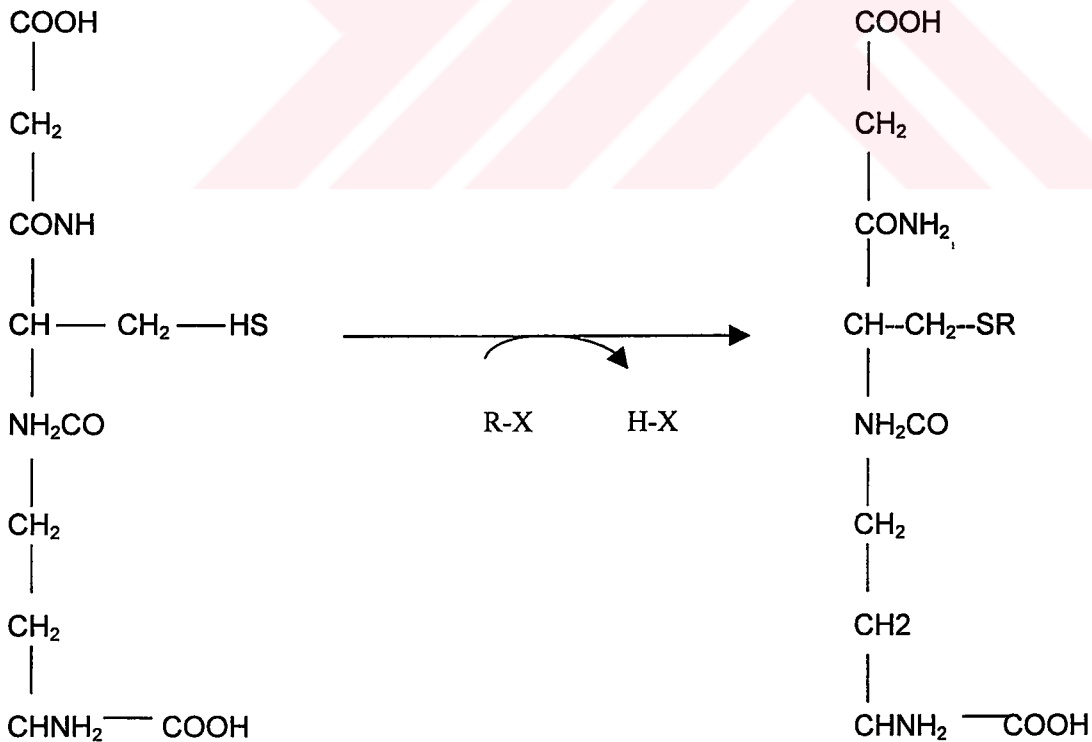


Şekil 1.4. Bir ksenobiyotiğin metabolizması (Murray, 1990, s. 248)

Glutasyon S-Transferazlar (GST) elektrofilik ksenobiyotikleri inaktive ederek vücuttan atılmak üzere konjugasyonunu sağlayan dimerik enzimlerdir (Ketterer ve ark. , 1992). Glutasyon konjugasyonu elektrofilik merkezi bulunan bir bileşikle glutasyonun bir tiyoeter bağı oluşturması esasına dayanır (Sipes ve ark.,1997,s. 61).

GST, elektrofilik merkez içeren bileşiklerle GSH'ı bağlama kabiliyetindedir (Kato ve ark. , 1998). Konjugasyon reaksiyonu için gerekli elektrofilik fonksiyonel grupta bir C, bir N veya bir S atomu yer almalıdır. GST aynı zamanda pestisidlerin, çevresel kirlenmelerin, oksidatif stres ürünlerinin, kemoterapide kullanılan ilaçların detoksifikasyonunda yer alır (Stroombergen ve Waring, 1999). GSH ve elektrofiller arasında bir bağ oluşumu ana bileşikten daha az reaktif bir konjugat oluşturur ve böylece detoksifikasyon gerçekleşir (Whalen ve ark. , 1998) .

Reaktif elektrofiller, nükleik asitler ve selüler proteinlerde bulunan nükleofilik gruplarla kovalan bağ yaparak toksik etkilere, yani doku zedelenmesi, kanser oluşumu, gen yapısında bozukluk ve teratojenik etki gibi durumların ortaya çıkmasına neden olurlar (Rooij ve ark. , 1998). Glutasyon nükleofilik sülfidril grubu ile bileşiklere bağlanarak organizmayı reaktif kimyasal bileşiklere karşı korur (Şekil 1.5) (Commandeur ve ark. , 1995).



Şekil 1.5. Glutasyonun elektrofilik bileşiklere bağlanması

Çoğu dokularda mevcut olan tripeptid yapısındaki glutatyon ksenobiyotiklere bağlandıktan sonra daha ileri bir biyotransformasyonla karaciğer ve böbreklerde bulunan mikrozomal γ -glutamiltanspeptidaz ve sisteinilglisinaz enzimleri yardımı ile peptid bağları açılır. Peptid (amid) bağlarının hidrolizi sonucu sadece sistein kalır, sisteinin mikrozomal asetilasyonu ile merkaptürik asid konjugatı oluşur (Rooij ve ark. ,1998).

1.4. Glutatyon S-Transferaz Enzimleri

GST'lar doğada bakteriler, maya, küf, yumuşakçalar, kabuklular, solucanlar, kurbağalar, böcekler, bitkiler, balıklar, kuşlar ve memelilerde bulunur. En çok sıçanlarda ve insanlarda çalışılmıştır (Hayes ve ark., 1995).

GST genleri tarafından kodlanan glutatyon S-transferaz enzimleri, çevresel kaynaklı kimyasallar ve doğal olarak oluşan birçok metabolitin detoksifikasyonundan sorumludurlar (Dawyer ve ark. , 1995; Rooij ve ark. , 1998; Murray ve ark. , 1991, Bölüm 6; Nebert ve ark. ,1999; Sipes ve ark. , 1997).

GST'lar membrana bağlı ve sitosolik olmak üzere iki grupta incelenmektedirler (Whalen ve ark. , 1998; Hayes ve Pulford.' , 1995). Vertabralılarda yedi sınıf sitosolik GST tespit edilmiştir: alfa, mu, kappa, pi, sigma, theta ve zeta. Bu sınıf ayrımları yapısal farklılıklara dayanılarak yapılmaktadır. Bir sınıf içinde farklı GST'lar en az % 40, sınıflar arası ise en az % 30 aminoasit benzerlikleri gösterirler. Türlerle göre özel sınıflara dayandırılarak yapılan insanlar ve diğer memeliler için sınıflandırma belirtilmiştir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. İnsan Glutasyon S-Transferazları İçin Sınıflandırma

<i>Proteinler</i>			<i>Genler</i>	
Kullanılan isimleri	Sınıf	Önceki adlandırma	Lokus	Kromozom lokalizasyonu
GSTA1-1	Alfa	ϵ , B1B1, GST2-tip 1 Ha(alt birim 1), axax	GSTA 1	6p12
GSTA2-	Alfa	γ , B2B2, GST2 tip2	GSTA 2	6p12
GSTA3-	Alfa	Ha (alt birim 2), ayay	GSTA 3	
GSTA4-	Alfa		GSTA 4	
GSTM1a-1a	Mu	μ , GST1-tip 2 Hb (alt birim 4), M3M3, N1N1	GSTM1	1p13
GSTM1b-1b	Mu	ψ , GST1- tip 1	GSTM1	1p13
GSTM2-2	Mu	GST4, N2N2	GSTM2	1p13
GSTM3-	Mu	GST5	GSTM3	1p13
GSTM4-4	Mu		GSTM4	1p13
GSTM5-5	Mu		GSTM5	1p13
GSTK1-1	Kappa		GSTK1	,
GSTP1-1	Pi	π , GST3, λ	GSTP1	11q13
GSTT1-1	Theta	θ	GSTT1	22q11.2
GSTT2-2	Theta		GSTT2	22q11.2
GSTZ1-1	Zeta		GSTZ1	14q24.3

cGST'lar (Sitoplazmik GST) iki aynı alt üniteden homodimerler veya farklı alt üniteden heterodimerlerden oluşmuşlardır. Sınıflandırma olarak Mannervik ve ark. (1992)'nin önerdikleri sınıflandırma kullanılmaktadır. Bu sınıflandırmada türlerin belirtilmesi için bir ön ek (örneğin, insan için h), kullanılırken, A, P, M, S veya T harfleri sırasıyla alfa, pi, mu, sigma ve thetayı işaret etmektedir. Bir çizgi ile ayrılan iki rakam alt üniteleri belirtmektedir.

Bir GST'nin üç boyutlu yapısı domuz akciğerinden pi sınıf enzimi için 1991'de belirlenmiştir. İnsandaki GSTP1-1'in yapısı 1992'de plasentadan purifiye edilmiştir. Daha sonra da insan GSTA1-1 ve GSTM2-2 enzimlerinin yapıları tanımlanmıştır.

GST'lar herbir altbirim için katalitik bölgeye sahip globular dimerik proteinlerdir. 23.000- 29.000 dalton moleküler ağırlığındadır. Her bir alt birim 200-240 aminoasitten oluşur.

Herbir GST altbiriminin polipeptid zinciri kısa bağlayıcı bölgelerce birleştirilen iki domainden oluşur. N-terminal domain bir β -sheet ve üç α -heliks yapısında düzenlenmiş aşağı yukarı 80 aminoasitten oluşan GSH'nun bağlanma bölgesi (G bölgesi) ve hidrofobik elektrofillerin bağlanmaları için olan H bölgesinden oluşmaktadır. C-terminal domain kalan 5 veya 6 α -heliks yapısındaki amino asidi içerir (Whalen ve ark. , 1998).

Sıçanlar, fareler ve insanlardan izole edilen tüm sınıf α genleri 11-12 kb uzunluğunda ve 7 ekzon içerir. Sınıf μ genleri popülasyonda polimorfiktir, aşağı yukarı 5kb uzunluğunda ve 8 ekzon içerir. Hamster 9 ekzona sahiptir. Beş alt ünitesi vardır ve aminoasit seviyesinde birbirlerine %80 benzerdir. Sınıf π genleri aşağı yukarı 3kb uzunluğunda ve 7 ekzon içerir. Birçok ekstrahepatik organdan purifiye edilmiştir. Sınıf θ genleri insanda polimorfiktir ve 5 ekzona sahiptir.

GST aktivitesi insanda tüm dokularda bulunmaktadır. Sıçanlarda yapılan çalışmalarda cGST'ların birçok dokuda bulunmamasıyla birlikte en yüksek konsantrasyonları testislerde ve karaciğerde tespit edilmiştir (Çizelge 1.2). cGST'ların seviyeleri üzerinde birçok enzim indükleyicisinin küçük artırıcı etkileri bulunmaktadır. Örneğin benzo(a)piren, etanol ve fenobarbitol gibi. Herbir dokuda spesifik GST izoenzim grubu mevcuttur. Buna ek olarak, çeşitli izoenzimler farklı miktarlarda ifade edilmektedir. Bir dokudaki hücre tiplerinde GST alt ünite profilleri özellikle gelişme döneminde değişebilmektedir. Örneğin, insan ve sıçanların fetal hepatositlerinde GSTP1-1 oldukça yüksek seviyede ifade edilirken yetişkin hepatositlerinde normal olarak dahi ifade edilmemektedir (Whalen ve ark. , 1998) .

Çizelge 1.2. Çeşitli Organ ve Dokulardaki Sıçan Glutatyon (GSH) ve Enzimlerinin Dağılımları

Doku	GSH	GSH S-transferaz	
		Sitozolik	Mikrozomal
eritrositler	8,3	-	-
karaciğer	7,7	1400	126
böbrek	4,1	336	8,5
ince bağırsak	2,9	429	60
akciğer	1,5	79	15
beyin	2,1	190	7,9
dalak	3,4	56	9
testis	-	3850	129
adrenal	-	253	52
kalp	1,1	93	7,2
timus	-	46	4,4
pankreas	1,8	-	-
kas	0,8	-	-
kemik iliği	-	-	-
plazma	0,018	-	-

Tüm GST'lar 1-kloro-2,4-dinitrobenzenden substrat olarak faydalanırlar ve GST'ların karakterizasyonunda bir araç görevi yaparlar. 2-kloro-5-nitrobenzonitrilin de GST'lar için substrat görevi yaptığı bulunmuştur. GSTT1 için diğer spesifik substrat p-nitrobenzil klorid, dikloromethan, etilen oksid ve metilbromid'dir. Dikloromethan boyalarda çözücü, temizlik maddelerinde, soğutucularda, kahve dekafeinizasyonunda kullanılan önemli bir endüstriyel bileşiktir. Bu bileşiğin toksisitesinde geniş türsel farklılıklar bulunur. Farelerde bu bileşiğin GSH konjugasyonu ile aktive edilerek akciğer ve karaciğer kanserlerine neden olduğu belirtilmiştir (Çizelge 1.3) (Hayes ve Pulford. , 1995; Whalen ve ark. , 1998) .

Çizelge 1.3 Farklı GST Sınıfları İçin Substratlar

<u>Model Substrat</u>	<u>Sınıf</u>
Δ^5 - androstene-3,17-dione	alpha
4-hydroxynonenal	alpha
cumene hydroperoxide	alpha ve theta
1,2-dichloro-4-nitrobenzene	mu
4-nitrobenzyl chloride	mu
trans-4-phenyl-3-buten-one	mu
1,2-epoxy-3-(p-nitrophenox) propane	alpha ve theta
1-menaphthyl sulfate	theta

1.5. Glutatyon S-Transferaz Enzimleri ve Karsinogenez

GST'lar genotoksik bileşiklerin detoksifikasyonunda yer aldığı gibi kimyasal karsinogenezde de önemli koruyucu rolleri vardır. Bu enzim ailesinde GSTM1, GSTT1 ve GSTP1 genlerinin kodlandığı üç polimorfik gen ailesi

vardır. GST'lar gibi ksenobiyotik enzimlerinin genetik polimorfizmleri spesifik tipte belli bazı kanserlere daha yüksek yatkınlık gösterirler.

İnsan glutatyon S-transferaz T1-1 (GSTT1-1)'i kodlayan gen 22.kromozom üzerinde konumlanmıştır. GSTT1 geni ve çeşitli kanserler arasında ilişki saptanmakla birlikte sınırlı sayıda yayın vardır. 1,3-butadien, metil bromid, etilen oksid gibi çeşitli karsinojenlerin metabolizmasında görev alırlar (Chen ve ark. , 1996). GSTT1 geninin kısmi ya da tamamının delesyonu GSTT1 null genotip olarak adlandırılır (Pemble ve ark. , 1994). İnsan mu sınıf glutatyon S-transferaz M1-1 (GSTM1-1) enzimini kodlayan gen 1. kromozom üzerinde konumlanmıştır (Hayes ve Pulford. , 1995). GSTM1 için iki fonksiyonel GSTM1*A ve GSTM1*B alelleri ile bir nonfonksiyonel GSTM1*0 null alel tanımlanmıştır. Karsinogenezin fonksiyonel GSTM1 alellerinin bulunmayışıyla ilişkili olduğu ve sonuçta karsinojenlerin detoksifikasyonunun gerçekleştirilemeyeceği düşünülmektedir (Brockmöller ve ark. , 1993). GSTM1-1 anti benzo(a)piren-7,8-diol-9,10 oksid gibi epoksidlerin detoksifikasyonunda önemlidir (Brockmöller ve ark. , 1993; Katoh ve ark. , 1998; Wormhoudt ve ark. ,1999; Snyder ve Hedli. , 1996). Karsinojenleri metabolize edebilme yetersizliğinin birçok kanser için risk oluşturduğu bilinmektedir (Snyder ve Hedli. , 1996; Sugimura ve ark. , 1996; Bartsch ve Hietanen. , 1996; Zahm ve Devesa. , 1995).

1.6. GST Polimorfizminin Kaynağı

Polimorfik yapıda olan ve çok sayıda maddeyi metabolize edebilme kabiliyetlerinden dolayı oldukça fazla ilgi çeken üç gen ailesi bilinmektedir: Sitokrom P450, N–asetiltransferaz ve glutatyon – S transferaz (Sinnett ve ark . , 2000).

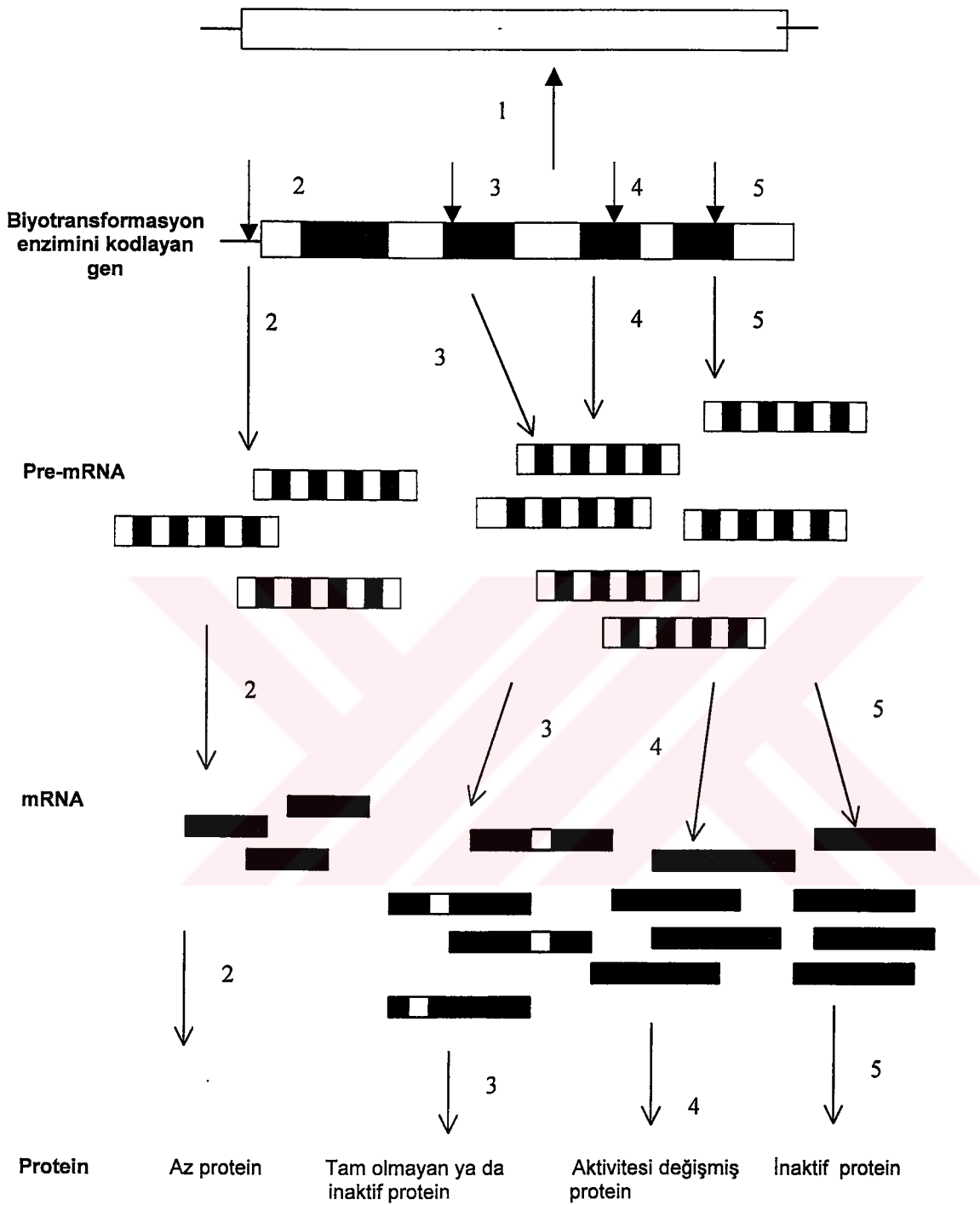
Polimorfizm, popülasyonda bir lokus için iki ya da daha fazla alelin mutasyonla oluşabileceğinden daha yüksek sıklıkla birlikte bulunmasıdır. Bu

sıklığın 0.01'den fazla olması durumunda bu lokus polimorfik olarak kabul edilmektedir (Thompson ve ark., 1991, Bölüm 6).

Kimyasal karsinojenlerin aktivasyonu ya da detoksifikasyonunda yer alan enzimler biyotransformasyon enzimleri olarak adlandırılır (Bartsch ve Hietanen., 1996).

Biyotransformasyon enzimlerinde polimorfizmlere sebep olan moleküler genetik mekanizmalar çeşitli şekillerde olabilir (Şekil 1.6):

- 1) Biyotransformasyon enzimini kodlayan genin bulunmaması,
- 2) Genin regülör kısımlarında olan mutasyonlardan dolayı genin kaybolması ya da zarar görmesi,
- 3) İntron-ekzon sınırlarındaki mutasyonlardan dolayı pre-mRNA'nın uçlarının yanlış olarak eklenmesi,
- 4) Proteindeki önemli olmayan aminoasitlerin mutasyona uğramış olması ve bunun sonucunda enzimin aktivitesinin değişmesi,
- 5) Proteindeki önemli aminoasitlerin mutasyona uğramış olması ve bunun sonucunda inaktif enzimin oluşması gibi modeller öngörülmektedir (Wormhoudt ve ark . ,1999).



Şekil 1.6. Biotransformasyon enzim polimorfizmlerinin farklı moleküler mekanizmalarının şematik olarak gösterimi. İntronlar açık, ekzonlar koyu kutularla gösterilmiştir. Genin regülatör bölgesi genin yanındaki çizgiyle belirtilmiştir. Biotransformasyon enzimini kodlayan genin bulunmaması, proteinin tamamen yok olmasına neden olabilir(1). Genin regülatör bölgesi mutasyona uğramış olabilir, bu da daha az (pre)mRNA ve daha az proteinin oluşmasına neden olabilir(2). İntron-ekzon sınırındaki bir mutasyon, pre-mRNA uçlarının yanlış olarak eklenmesine ve tam olmayan ya da inaktif proteinin oluşmasına neden olabilir(3). Ekzon bölgesinde bir mutasyon (enzimatik aktivitedeki önemine göre) proteinde bir aminoasit değişikliğine neden olarak proteinin aktivitesini değişikliğe uğratabilir(4) ya da inaktif bir proteinin oluşmasını sağlayabilir(5). (Wormhoudt ve ark., 1999)

İnsanlarda GSTM1'in polimorfik olduğu ve bireylerin % 35-60'nda bulunmadığı gösterilmiştir. Bu enzim beyaz populasyonun % 50-60'nda bulunmazken, Kuzey Amerikalı siyahların % 28'nde ve Nijeryalılarda ise % 22 gibi daha düşük yüzdelerde bulunur. Benzer şekilde GSTT1 de polimorfiktir ve insan populasyonlarının % 10-65'inde bulunmamaktadır. Amerikalı beyazların % 17'si, Nijeryalıların % 39'u, Hindistan'da yaşayan İngilizlerin % 32'si GSTT1-1 enzim aktivitesi bulundurmazlar. GSTM1 ve GSTT1 aktivitesinin yokluğu (null genotip) bu genlerin homozigot olarak delesyona uğramasından kaynaklanmaktadır (Whalen ve ark. , 1998; Chen ve ark. ,1996).

1.7. Karsinojenler ve Lösemi

Lösemi, hematopoietik pluripotent stem hücrelerinin neoplastik dönüşümü ile oluşan klonal myeloproliferatif bir hastalıktır. Akut lösemiler pluripotent stem hücrelerinden kaynaklanan proliferasyonun ya lenfoid seride (ALL) ya da myeloid seride (AML) ifade edilmesidir. Akut lösemilerin erişkin insidansı yaklaşık senede 100 000 kişide 3.5 vakadır. 35 yaş altı kanser ölümlerinin nedenleri içinde yer alan akut lösemiler tüm kanserlerin yaklaşık %10'unu oluşturur. Erişkinlerde AML'nin insidansı ALL'den daha yüksektir. Akut lösemi hastalarının çoğunluğunda nedeni tam olarak bilinmemesine rağmen, birçok faktörün insidansın artmasıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Hiroshima ve Nagasaki'deki atom bombası faciasından sonra radyasyona maruz kalınma sonucu o bölgenin halkında lösemi artışı dikkat çekmiştir. Hodgkin's hastalığı ve ankylosin spondiliti gibi hastalıklar için tedavi amaçlı radyoterapiden sonra lökomogenez izlenmiştir. Kimyasal karsinojenlerden benzen, fenilbutazon, arsenik ve kloromfenikola maruz kalmanın lösemi geliştirebileceği belirtilmiştir. Melphalan, klorombusil ve siklofosfamid gibi özellikle alkilleyici ajanlarla olan sitotoksik terapinin de lösemi riskini artırdığı belirtilmiştir. Riskin alınan alkilatörlerin total dozuyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Hayvan

lösemilerinin etiyolojisinde RNA virüslerinin önemli olduğu belirtilmektedir. Konjenital faktörler ve immünolojik yetersizlikler de löseminin patogeneğinde önemli yer tutmaktadır (Mazza, 1995).

KML, myeloid hücrelerin proliferasyonu ile karakterize bir klonal hematopoietik kök hücre hastalığıdır. KML, batı ülkelerinde tüm lösemi vakalarının % 20'sini oluşturmaktadır. Yaşamın dördüncü ya da beşinci dekadında erkeklerde biraz daha fazla bir insidansla pik gösterir. KML'nin klinik seyri her iki cinsiyette de benzerdir, fakat kadınlarda erkeklerden daha uzun yaşama dönemi gözlenebilir (Mazza, 1995). Genel olarak lösemilerin oluşumunda genetik özellikler, bazı çevresel etkenler ve çeşitli karsinojenlere maruz kalmanın etkili olduğu bildirilmektedir (Sinnett ve ark. , 2000), (Irons ve Stillman. , 1996), (Zahm ve Devesa., 1995).

Bu tez çalışmasında,

- GSTT1 null genotipi ve AML, ALL, KML arasındaki ilişkinin
- GSTM1 null genotipi ve AML, ALL, KML arasındaki ilişkinin
- GSTT1 ve GSTM1 null genotipleri ile lösemi arasındaki ilişkinin
- Sigara ve alkol tüketimi, aile öyküsü, yaş, cinsiyet parametreleri ile GSTT1 ve GSTM1 genotipleri arasında bir ilişkinin,

var olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Çalışma Grubu

Çalışma kapsamında 100 hasta ve 100 kontrol grubu olmak üzere 200 örnek incelenmesi öngörülmüştür. Ancak çalışma süresi içinde daha az örnek çalışılabilmiştir.

Bu çalışmaya, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bölümü'ne başvuran ve lösemi tanısı almış 22 ALL, 38 AML, 23 KML ve 9 farklı tanı almış toplam 92 hasta ile kontrol grubunu oluşturan 87 kanser şüphesi olmayan birey dahil edilmiştir.

Kan örnekleri alınan kişiler çalışmanın amacı ve yöntemi hakkında bilgilendirilmiş, ayrıca yeterince bilgilendirildikleri ve kendi iradeleriyle bu çalışmaya katıldıklarını gösteren bir onam formu kişiler tarafından imzalanmıştır, kişisel bilgilere yönelik anket formu doldurulmuştur ve gerekli bilgiler alınmıştır (bkz. Ek 1 ve Ek 2).

2.2 Polimorfik Özelliklerin Belirlenmesi

2.2.1. DNA İzolasyonu ve Kantitasyonu

DNA izolasyonu, 5ml periferik kandan aşağıda tanımlanan standart fenol-kloroform yöntemiyle yapılmıştır (Sambrook ve ark., 1982, s. 458).

- EDTA (100 µl, 0,5 M) 'lı tüpe 5 ml periferik kan alınır.
- 3500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilip (lonetics medical products, Centurion 6000) serum uzaklaştırıldıktan sonra üzerine 10 ml lizis tamponu (0.154 M NH₄Cl [Sigma, A9434], 0.0092M KHCO₃ [Sigma, P4913], 0.0001 M EDTA [Sigma, E5134]) eklenir ve 1 saat buz üzerinde bekletilir.
- 3500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilir.
- Süpernatant atılır, pelet üzerine 5 ml 1x STE (0.1 M NaCl [Merk, 1.06400], 0.01 M Tris pH=8,0[Sigma, T8524], 0.001 M EDTA) eklenir ve karıştırılır.
- 3500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilir.
- Süpernatant atılıp pelet üzerine 4.5 ml 1x STE, 0.5 ml %10 SDS (Sodium Lauryl Sülfat [Sigma, L4390]) ve 50 µg/ml Proteinaz K (Sigma, P4914) eklenir, yavaşça karıştırılır ve bir gece 37°C'de etüvde (Heraeus, FB 420) inkübe edilir.
- Ertesi gün solüsyon üzerine eşit hacimde doymuş fenol (Sigma, P4557) eklenip karıştırıldıktan sonra 3500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilir.
- Süpernatant temiz bir tüpe alınıp üzerine eşit hacimde kloroform:izoamil alkol (24:1) (Sigma, C2432:Sigma, I9392) eklenir ve karıştırılır.
- 3500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilir ve süpernatant temiz bir tüpe aktarılır.
- Solüsyon üzerine eşit hacimde saf etanol (Carlo Erba, 414608) ilave edilir ve yavaşça karıştırılarak DNA'nın presipite olması beklenir. Presipite olan DNA mikropipet ile 1.5 ml'lik mikrofüj tüpüne aktarılır.
- Bir kez saf etanol, bir kez de % 70 etanol ile 10 dakika 13000 rpm'de santrifüj (Herolab, MikroCen 13D) edilir, süpernatant atılır ve DNA kurumaya bırakılır.
- Kurutulan DNA 500 µl dH₂O ile çözülür.

Elde edilen DNA' nın miktar ve saflığının tespit edilmesi için spektrofotometrik ölçüm aşağıdaki gibi yapılmıştır.

- Çözülmüş DNA örneğinden 20 µl alınıp quartz küvet içinde dH₂O ile hacmi 2 ml'ye tamamlanır, iyice karıştırılır.
- Spektrofotometrede OD₂₆₀ ve OD₂₈₀ değerleri ölçülür (Jasco UV/VIS Spectrophotometer, V-530).
- 260 ve 280 nm'deki optik dansite değerlerinin oranı hesaplanarak DNA' nın saflığı belirlenir.
- Aşağıdaki formül kullanılarak elde edilen DNA'nın konsantrasyonu belirlenir.

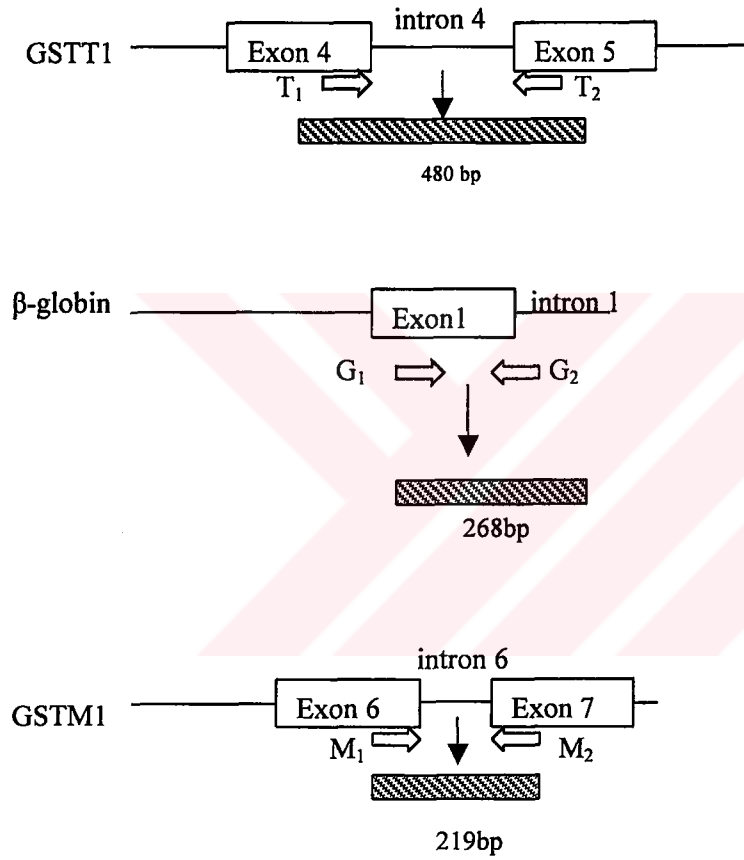
$$\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{260} \times 0,05 \times 100 \text{ (sulandırma katsayısı)}$$

2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu:

Bu çalışma kapsamında, öngörülen GSTM1 ve GSTT1 lokusları için uygun primerler ve internal kontrol olarak da β-globin geni primerleri (lontek) kullanılarak multipleks PCR uygulanmıştır (Chen, Liu ve ark., 1996). Kullanılan primer dizileri Çizelge 2.1'de ve amplifiye edilen bölge Şekil 3.2'de sunulmaktadır.

Herbir PCR uygulaması, 1Ü Taq Polimeraz (Sigma, D4545), 5 µl 10xPCR tamponu (100mM TrisHCl (pH 8,3), 500mM KCl [Sigma, P2317]), 1.5 mM MgCl₂ (Sigma, M8787), 0,1 µM her bir primer (lontek), 0.25mM her bir dNTP (Sigma, dNTP-100), 2.2µl DMSO ve 200-500 ng genomik DNA içeren toplam 50µl reaksiyon karışımında üzeri mineral yağı (Sigma M5904) ile kaplanmış ve thermocycler'da (Biometra Personel Cycler TM, 050-500) gerçekleştirilmiştir (Chen, Liu ve ark. , 1996). Kullanılan PCR protokolü aşağıdaki gibidir:

Başlangıç denatürasyonu	95°C, 4 dakika	
Denatürasyon	94°C, 1 dakika	
Bağlanma	55°C, 45 saniye	35 döngü
Uzama	72°C, 1 dakika	
Son uzama	72°C, 10 dakika	



Şekil 3.2. PCR reaksiyonu ile amplifiye edilen bölgeler

PCR işlemi bittikten sonra ürünün varlığını kontrol etmek amacıyla % 2'lik agaroz jelde elektroforez yapılmıştır. Jel, 1xTBE (0.089M Trizma base [Sigma, T8524], 0.089M Borik asit [Sigma, B6768], 0.002M EDTA) içinde 0.1 µg/µl Etidyum bromid (Sigma, E8751) içerecek şekilde hazırlanmıştır. PCR ürünlerinden 10 µl alınarak agaroz jelde 90 V'da 1 saat yürütüldükten sonra

(Biometra-Agagel Mini, 020-000), UV-transilüminatör üzerinde reaksiyon sonuçları değerlendirilmiştir.

GSTM1 geni için; GSTM1*A / GSTM1*B alellerinin bulunduğu "GSTM1 pozitif genotip", her iki alellin de bulunmadığı genin tamamen delete olduğu "GSTM1 null genotip" tanımları bilinmektedir.

GSTT1 geni için; GSTT1 genin kısmi ya da tamamının delesyona uğradığı "GSTT1 null genotipi" ve genin bulunduğu "GSTT1 pozitif genotip" tanımları kullanılmaktadır.

Bu çalışmada GSTM1 ve GSTT1 genlerinin delesyona uğradığı bölgelerde null genotip gözlenmiştir.

Çizelge 2.1. GSTM1, GSTT1, β -globin genleri için kullanılan primer dizileri

GEN	Ön (forward) primer (5'-3')	Ters (revers) primer (5'-3')
GSTM1	GAAGTCCCTGAA AAGCTAAAGC	GTTGGGCTCAAATATACGCTGG
GSTT1	TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC	TCACCGGATCATGGCCAGCA
β -Globin	CAACTTCATCCACGTTCCACC	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC

2.3. Sonuçların Değerlendirmesi

Lösemi grupları ile kontrol gruplarında GSTT1 ve GSTM1 genlerinin null ya da pozitif olarak bulunma oranları ile, sigara ve alkol kullanıp kullanmama, aile öyküsünde kanser bulunup bulunmama ve cinsiyet karşılaştırılmasında Ki-kare (χ^2) testi, lösemi ve kontrol gruplarının yaş ortalamasının karşılaştırılmasında Student's testi kullanılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Çalışma Grubu

Çalışma grubu 38 AML, 22 ALL, 23 KML, ve 9 farklı tanı almış toplam 92 lösemi ve 87 kanser şüphesi olmayan bireyden oluşan kontrol grubunu içermektedir. Vakaların % 55.4'ü erkek, % 44'ü kadın; kontrol grubunun ise, % 44.8'i erkek, % 55.2'si kadınları oluşturmaktadır. Ortalama yaş değerleri lösemi 39.2 ± 26.6 , kontrollerde 34.3 ± 11.3 olarak bulunmuştur.

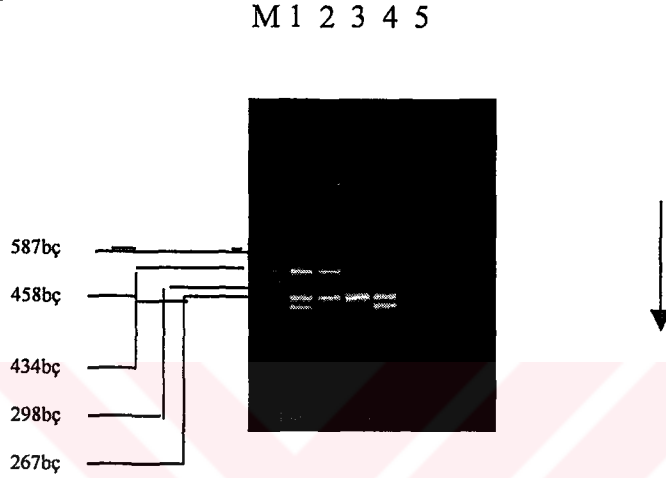
Lösemilerde GSTM1, GSTT1 null ve pozitif genotipler ile sigara ve alkol kullanımı, aile öyküsü, yaş, cinsiyet arasında farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$) (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Lösemilerde GSTM1 ve GSTT1 genotipleri ile sigara, alkol kullanımı; aile öyküsü; yaş; cinsiyet karşılaştırması

	SİGARA		ALKOL		AİLE ÖYKÜSÜ		CİNSİYET		YAŞ
	-	+	-	+	-	+	K	E	ortalama
n	6	9	13	2	10	5	10	18	37,33
GSTT1(-)	%40	%60	%86,7	%13,3	%66,7	%33,3	%35,7	%64,3	
n	17	15	29	3	20	12	31	33	40,06
GSTT1(+)	%53,1	%46,9	%90,6	%9,4	%62,5	%37,5	%48,4	%51,6	
n	12	7	18	1	11	8	19	17	36,42
GSTM1(-)	%63,2	%36,8	%94,7	%5,3	%57,9	%42,1	%52,8	%47,2	
n	11	17	24	4	19	9	22	34	41,03
GSTM1(+)	%39,3	%60,7	%85,7	%14,3	%67,9	%32,1	%39,3	%60,7	

3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA örnekleri üzerinde primerlerle gerçekleştirilen multipleks PCR sonunda elde edilen ürünlerin agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 3.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3 PCR ürünlerinin 0.1 µg / µl ethidium bromide içeren %2 agaroz jeldeki görüntüsü ve sırasıyla GSTT1, β-globin, ve GSTM1 alellerin 480, 268, ve 219 bç'lik fragman boyları; M: Marker, pUC18/HaeIII kesimi; 1 nolu kuyu: GSTT1 ve GSTM1 pozitif, 2 nolu kuyu: GSTM1 null, 3 nolu kuyu: GSTT1 ve GSTM1 null, 4 nolu kuyu: GSTT1 null, 5 nolu kuyu: negatif kontrol.

Elektroforez sonrasında jelde görülen DNA bandlarının beklenen uzunlukta olması, öngörülen primerler ile uygulanan PCR'ın gerçekleştiğini ve istenilen ürünün elde edildiğini göstermiştir. Bu reaksiyonlar sonucunda GSTM1 için 219 bç; β-globin için 268 bç; ve GSTT1 için 480 bç'lik bölgeler çoğaltılabildiği görülmüştür.

3.3. Polimorfik Özellikler

3.3.1. GSTM1 Genotipi

Toplam 38 AML'nin 13'ünde (% 34.2) GSTM1 null genotip, 25'inde (% 65.8) GSTM1 pozitif genotip; 22 ALL'nin 11'nde (% 50) GSTM1 null genotip, 11'nde (% 50) GSTM1 pozitif genotip; 23 KML'nin 10'nda (% 43.5) GSTM1 null genotip. 13'nde (% 56.5) GSTM1 pozitif genotip tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise; 87 kişinin 37'sinde (% 42.5) GSTM1 null genotip gözlenirken, 50'sinde (% 57.5) GSTM1 pozitif genotip saptanmıştır. Tüm lösemilerin değerlendirilmesi birlikte yapıldığında ise; 92 vakanın 36'sında (% 39.1) GSTM1 null genotip, 56'sında (% 60.9) GSTM1 pozitif genotip tespit edilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır ($\chi^2=0,52$).

AML, ALL, KML grupları ve kontrol grubu ile GSTM1 null genotip, GSTM1 pozitif genotip arasında bir değerlendirme yapıldığında; anlamlı bir fark saptanamamıştır (AML-Kontrol ($\chi^2=0,76$), ALL-Kontrol ($\chi^2=0,40$), KML-Kontrol ($\chi^2=0,007$)). Bu gruplar (AML, ALL, KML) yine kendi arasında GSTM1 null ve GSTM1 pozitif genotipler ile değerlendirildiğinde anlamlı bir sonuç saptanamamıştır (AML-ALL ($\chi^2=1,45$), AML-KML ($\chi^2=0,52$), ALL-KML ($\chi^2=0,76$)) (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Hasta grubu ve kontrol grubu arasında GSTM1 genotip sonuçları

	GSTM1		TOPLAM
	-	+	
AML	13 (%34.2)	25 (%65.8)	38
ALL	11 (%50)	11 (%50)	22
KML	10 (%43.5)	13 (%56.5)	23
DİĞER	2 (%22,2)	7 (%77,8)	9
TOPLAM LÖSEMİ	36 (%39.1)	56 (%60.9)	92
KONTROL	37 (%42.5)	50 (%57.5)	87

3.3.2. GSTT1 GENOTİPİ

Toplam 38 AML vakasının 11'nde (% 28.9) GSTT1 null, 27'sinde (% 71.1) GSTT1 pozitif genotip, 22 ALL'nin 7'sinde (% 31.8) GSTT1 null, 15'nde (%68.2) GSTT1 pozitif genotip, 23 KML'nin 6'sında (% 26.1) GSTT1 null genotip, 17'sinde (% 73.9) GSTT1 pozitif genotip saptanmıştır. Tüm lösemi grupları olarak ele alındığında ise; toplam 92 vakanın 28'nde (% 30.4) GSTT1 null genotip, 64'nde (% 69.6) ise GSTT1 pozitif genotip tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise; 87 kişinin hepsinde GSTT1 pozitif genotip saptanırken, bu değer tüm lösemiler ile kontrol grubu arasında değerlendirme yapıldığında, istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılığa yol açmıştır ($p<0.001$). AML, ALL, KML grupları ile kontrol grupları GSTT1 null ve pozitif genotipleri açısından kıyaslandığında anlamlı farklar saptanabilmiştir. AML ve kontrol grubu arası $\chi^2=24,12$; ALL ve kontrol grubu arası $\chi^2=24,52$; KML ve kontrol grubu arasında $\chi^2=19,21$ değerleri bulunmuştur.

AML ve ALL, AML ve KML, ALL ve KML grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde ise sonuçların anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (AML-ALL ($\chi^2=0,004$), AML-KML ($\chi^2=0,003$), ALL-KML ($\chi^2=0,009$)) (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Hasta grubu ve kontrol grubu arasında GSTT1 genotip sonuçları

	GSTT1		TOPLAM
	-	+	
AML	11 (%28,9)	27 (%71,1)	38
ALL	7 (%31,8)	15 (%68,2)	22
KML	6 (%26,1)	17 (%73,9)	23
DİĞER	4 (%44,4)	5 (%55,6)	9
TOPLAM LÖSEMİ	28(%30,4)	64(%69,6)	92
KONTROL	-	87(%100)	87

4.TARTIŞMA

İlaçları metabolize eden enzimlerdeki polimorfizmin kansere bireysel yatkınlıkta önemli bir faktör olduğu belirtilmektedir (Katoh ve ark. , 1998). DNA'yı endojen ve eksojen hasardan koruyan birçok mekanizma bulunmaktadır. GST'lar bu sistemde yer alan önemli enzimlerden biridir. GST'lar birçok çevresel kirleticilerin, karsinojenlerin, kemoteropötik ajanların ve reaktif oksijen türlerini içeren çok geniş sayıda ksenobiyotiklerin metabolizmasında görev almaktadırlar (Rollinson ve ark. ,1999; Rebbeck ve ark. , 1997). GST polimorfizmi ve kanser ile ilgili, çok sayıda araştırma yapılmıştır (Stroomborgen ve ark., 1999; Helzlsouer ve ark., 1998; Trizna ve ark., 1995; Yengi ve ark., 1996; Basu ve ark., 1997; Atoyebi ve ark., 1997; Sinnnett ve ark., 2000; Stanulla ve ark., 2000; Chen ve ark., 1997; Krajnovic ve ark., 1999; Preudhomme ve ark., 1997; Rollinson ve ark., 2000; Chen ve ark., 1996; Heagerty ve ark., 1994; Zhong ve ark., 1991; Ophius ve ark., 1998; Nakachi ve ark., 1993; Seidegard ve ark., 1986; Deakin ve ark., 1996) (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. GSTM1 null ve GSTT1 null genotiplerinin çeşitli kanserlerle olan ilişkisi

Kanser	İlişki		Referanslar
	GSTM1 null	GSTT1 null	
ALL	+		Sinnett ve ark., 2000
ALL	+	+	Stanulla ve ark., 2000
ALL	-	+	Rollinson ve ark., 2000
ALL	+	-	Krajinovic ve ark., 1999
MDS		-	Basu ve ark., 1997
MDS		-	Preudhomme ve ark., 1997
MDS		+	Chen ve ark., 1996
MDS	-	-	Atoyebi ve ark., 1997
AML	+	+	Rollinson ve ark., 2000
AML		-	Basu ve ark., 1997
Gastrik ve kolorektal adenokarsinom	+	-	Kato ve ark., 1996
Ürogenital kanser	+	-	Kato ve ark., 1996
Mesane kanseri	+	+	Brockmöller ve ark., 1996
Mesane kanseri	+		Bell ve ark., 1993
Akciğer kanseri	+	-	Zhong ve ark., 1991
Baş ve boyun kanserleri	+	+	Trizna ve ark., 1995
Baş ve boyun kanserleri	-	+	Ouphuis ve ark., 1998
Meme kanseri	+	+	Helzlsouer ve ark., 1998
Akciğer, oral, gastrik, kolorektal kanserler	-	-	Deakin ve ark., 1996

Bizim çalışmamızda GSTT1 ve GSTM1 genotiplerinin 92 lösemi hastası ve 87 kontrol üzerindeki dağılımı araştırılmıştır. GSTT1 null genotipi, lösemili hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir. Bu sonuç literatürde bildirilen populasyon çalışmaları ile uyumluluk göstermektedir. (Chen ve ark., 1997; Chen ve ark., 1996; Rollinson ve ark., 2000). GSTM1 null genotipinin hasta ve kontrol grubu arasındaki karşılaştırması yapıldığında ise anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Bu sonuç literatürdeki bir grup çalışmayı desteklerken (Chen ve ark., 1996) diğer bir grubun çalışması ile farklılık göstermektedir (Krajinovic., 1999; Sinnett., 2000; Chen ve ark. , 1997).

Cinsiyet ile GSTM1 ve GSTT1 genotip değerlendirmesi arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır ($\chi^2= 0.156$). Değerlendirmeler sigara, alkol tüketimleri, aile öyküsü ve yaş parametreleri baz olarak yapıldığında sonuçların yine anlamlı olmadığı saptanmıştır. Bu sonuç Chen ve ark.'nın, Rollinson ve ark.'nın yaptıkları çalışmalar ile uyumludur.

4.1. GSTM1 Genotipi

Bizim çalışmamızda GSTM1 null genotipinin tüm lösemiler (AML, ALL, KML) ile kontrol grubu arası ilişkisinde anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Amerika ve İngiltere'de yapılan çalışmalarda lösemi ve GST genotipi arasındaki ilişkide gözlenen farklılıkların etnik heterojeniteye bağlanabileceği bildirilmiştir. Bu yüzden istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmayan lösemilerde farklı etkenlerin rolü üzerinde durulmaktadır (Atoyebi ve ark., 1997; Basu ve ark., 1997).

Bu çalışmadaki kontrol grubunda GSTM1 null genotipinin % 42.5 olması bildirilen ara sınır değerler (%35 - %60) (Bell ve ark., 1993; Groppi ve ark., 1991) arasında yer almaktadır.

Çalışmamızda GSTM1 null genotipi ile ayrı ayrı AML, ALL, KML ve kontrol grubu arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Krajnovic ve ark. 177 ALL'li çocuk ve 304 kontrol grubunda GSTM1 polimorfizm çalışması sonuçları bizim sonuçlarımızla uyumlu gözükmemektedir. Ancak Sinnett ve ark.'nın ALL'li çocuklarda yaptıkları çalışmada GSTM1 null genotipi ile anlamlı bir ilişki bildirmektedirler. Bizim hastalarımızın erişkin grupta yer alması ile sonuçlarımızın farklı çıkması açıklanabilir.

GSTM1 null genotipinin her üç lösemi grubunda kontrol grubu ile anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bu sonuçlar hasta ve kontrol grubu sayısının artırılmasının uygun olacağını düşündürmektedir.

4.2. GSTT1 Genotipi

GSTT1 null genotipin birçok kanserde risk faktörlerinden biri olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmektedir (Rollinson ve ark., 2000; Chen ve ark., 1996; Katoh ve ark., 1996; Basu ve ark., 1997; Wormhoudt ve ark., 1999). Çalışmamızda GSTT1 null genotip oranı hastalarda artmış olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda GSTT1 null genotipi saptanamamıştır. Bu sonuç beyaz ırk için şu ana kadar tespit edilmiş değerlerin altındadır. GSTT1 null genotipi etnik farklılıklar göstermektedir. Beyaz ırkta prevalans % 10-20 arasında değişebilmektedir (Hirvonen,1999). İnsan popülasyonlarında % 10-65'inde gözlemlendiği bildirilmektedir (Whalen ve ark., 1998). Öke ve ark.'nın

(Öke ve ark.,1998) yapmış olduğu çalışmada ise Türk populasyonunda GSTT1 frekansı % 20 olarak belirtilmektedir.

Bizim çalışmamızda kontrol grubunda null genotip saptanamamış olması, kontrol grubumuzun yaş ve cinsiyet eşleştirilmesi yapılarak seçilmiş olması ile açıklanabilir gözükmemektedir.

Çalışmamızda GSTT1 null genotipinin lösemilerde kontrollere göre yüksek olması lösemilerde yapılan birçok çalışma ile uyumluluk göstermektedir (Preudhomme ve ark., 1997; Rollinson ve ark., 2000; Chen ve ark., 1996; Stanulla ve ark., 2000).

Literatürde AML ile yapılan sadece iki çalışmaya rastlanmıştır. Bunlardan Rollinson ve ark'nın yaptıkları çalışma bizim sonuçlarımızı desteklerken, Basu ve ark'nın MDS ve AML'lilerde yaptıkları çalışma sonuçlarımızla uyumlu gözükmemektedir. Rollinson ve ark. AML'de GSTT1 ve GSTM1 null genotipinin ALL'ye göre daha düşük oranda birliktelik gösterdiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda AML ve ALL'de GSTT1 null genotipinin gözlenme oranında farklılık bulunmamaktadır. Ancak Rollinson ve ark'nın çalışmasında 557 akut lösemili hasta ve 952 yaş ve cinsiyet eşleştirilmesi yapılmış kontrol grubu kullanılmıştır.

KML'li hasta grubunda GSTT1 null genotipi kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ancak, literatürde KML ve GST polimorfizmi ile ilgili çalışma bulunamamıştır. Bu yüzden KML'li hasta sonuçlarımızın literatürle kıyaslanması yapılamamıştır.

Çalışmamızın sonucunda GSTT1 null genotipinin hem tüm lösemiler bazında ve hem de alt gruplarında (AML, ALL, KML) lösemiye yatkınlıkta önemli rolü olabileceğini destekler gözükmemektedir.



4. SONUÇLAR

- GSTT1 null genotipi ALL, AML, KML arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır.
- GSTM1 null genotipi ile lösemiler arasında birliktelik bulunmamaktadır.
- Sigara ve alkol tüketimi, aile öyküsü, yaş ve cinsiyet ile GSTM1 ve GSTT1 genotipleri arasında birliktelik saptanmamıştır.

Bu çalışmada daha önce literatürde çalışılmayan KML'li hasta grubu ile ilgili ilk GST genotip sonuçları elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre KML'de de diğer lösemi gruplarında olduğu gibi GSTT1 null genotipi ile anlamlı bir ilişki saptanmıştır.

ÖZET

Lösemilerde GSTM1 ve GSTT1 Polimorfizminin Rolü

İnsanlarda kanser yapıcı nedenler arasında sigara dumanı, hava, su, yiyecekler ve ilaçlardaki kimyasal maddeler, radyasyon ve enfeksiyöz ajanlar gibi çeşitli çevresel faktörlerin, genetik faktörlerle birlikte etkili olduğu bilinmektedir. Ksenobiyotikler olarak adlandırılan bu yabancı bileşiklerin zararlı etkilerinden korunmak için hücrelerde biyotransformasyon enzimleri görev alırlar. Bu enzimlerden biri olan GST lar karsinogenlerin de içine girdiği farklı maddelerin detoksifikasyonundan sorumludurlar. GSTM1 ve GSTT1 lokuslarındaki polimorfizmler birçok kanser ile ilişkili bulunmuştur.

Çalışmamızda GSTM1 ve GSTT1 polimorfizmlerinin lösemiye yatkınlıktaki rolü araştırılmıştır. Bu amaçla 38 AML, 22 ALL, 23 KML, toplam 92 lösemi hastası ve 87 kontrol çalışmaya dahil edilmiştir. GSTT1 ve GSTM1 polimorfizmi açısından değerlendirmeler yapılmıştır.

Çalışma sonucunda GSTT1 null genotip ve AML, ALL, KML arasında bir ilişki bulunduğu, GSTM1 null genotipi ile lösemi hastalığı arasında birliktelik bulunmadığı saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Glutatyon S-Transferaz , polimorfizm, lösemi, ALL, AML, KML, GSTT1, GSTM1, karsinogenler

SUMMARY

The Role of GSTM1 and GSTT1 Polymorphisms in Leukemia

The most carcinogens are the chemicals in smoke air, air, water, nutrients and drugs , radiation, radon, infectious agents in the workplace and general environment. Risk from these environmental exposures is modulated by genetic and acquired susceptibility factors. Biotransformation enzymes are encountered in cells in order to be protected from the hazardous effects of the chemicals which are called xenobiotics.

One of these enzymes , GSTs are implicated in the detoxification of different substances including carcinogens. The genetic polymorphisms in GSTM1 and GSTT1 locus are associated with a lot of cancer types. In our study the possible role of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms are evaluated in the role of susceptibility to leukemia. For this purpose, 38 AML, 22 ALL, 23 CML, total 92 leukemia patients and 87 controls are included in this study. The detections are done for GSTM1 and GSTT1 polymorphisms.

It is found that an association between GSTT1 null genotype and AML, ALL, CML but, there is no association between GSTM1 null genotype and leukemia disease.

Key Words: Glutathione S-Transferase , polymorphism, leukemia, ALL, AML, CML, GSTT1, GSTM1, carcinogens

KAYNAKLAR

ATOYEBI W., KUSEC R., FIDLER C., PETO T.E.A., BOULTWOOD J., WAINSCOT J. S. (1997). Glutathione S-transferase gene deletions in myelodysplasia. *Lancet*, Vol.349, May 17.

BASU T., GALE R.E., LANGABEER S., LINCH D.C. (1997). Glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1) gene defect in myelodysplasia and acute myeloid leukaemia.. *Lancet*, Vol.349, May 17.

BELL A.D., TAYLOR A.J., PAULSON D.F., ROBERTSON C.N., MOHLER J.L., LUCIER G.W. (1993). Genetic Risk and Carcinogen Exposure: a Common Inherited defect of the Carcinogen-Metabolism Gene Glutathione S-Transferase M1 (GSTM1) That Increases Susceptibility to Bladder Cancer. *Jour Nat Cancer Ins*, Vol.85, No.14, July 21.

BROCKMÖLLER J., KERB R., DRAKOULIS N., NITZ M., ROOTS I. (1993). Genotype and Phenotype of Glutathione S-Transferase Class μ Isoenzymes μ and ψ in Lung Cancer Patients and Controls. *Cancer Res*, 53, 1004-1011, March 1.

BROCKMÖLLER J., CASCORBI I., KERB R., SACHSE C., ROOTS I. (1998). Polymorphisms in xenobiotic conjugation and disease predisposition. *Toxic Lett*, 102-103, 173-183.

BROCKMÖLLER J., CASCORBI I., KERB R., ROOTS I. (1996). Combined Analysis of Inherited Polymorphisms in Arylamine N-Acetyltransferase 2, Glutathione S-Transferases M1 and T1, Microsomal Epoxide Hydrolase, and Cytochrome P450 Enzymes as Modulators of Bladder Cancer Risk. *Cancer Res*, 56, 3915-3925, September 1.

BOARD P., COGGAN M., JOHNSTON P., ROSS V., SUZUKI T., WEBB G. (1990). Genetic Heterogeneity Of The Human Glutathione Transferases: A Complex of Gene Families. *Phar Ther*, Vol.48, 357-369.

BOER D.M.L., PIETERS R., KAZEMIER K.M., SCHAUB G.E.J., HENZE G., CREUTZIG U., KASPERS G.J.L., KEARNS P.R., HALL A.G., PEARSON A.D.J., VEERMAN A.J.P. (1999). Different expression of glutathione S-transferase α , μ and Π in childhood acute lymphoblastic and myeloid leukaemia. *Brit Jour Haem*, 104, 321-327.

COMMANDEUR J.N.M., STIJNTJES G.J., VERMEULEN N.P.E. (1995). Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. *Phar Rev*, 47, 271-330.

CHEN C.L., LIU Q., RELLING V.M. (1996). Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. *Pharmacogenetics*, 6,187-191.

CHEN C.L., LIU Q., PUI C.H., RIVERA G.K., SANDLUND J.T., RIBEIRO R., EVANS W.E., RELLING M.V. (1997). Higher Frequency of Glutathione S-Transferase Deletions in Black Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*, Vol.89, No.5, March 1, 1701-1707.

CHEN H., SANDLER D.P., TAYLOR J.A., SHORE D.L., LIU E., BLOOMFIELD C.D., BELL D.A. (1996). Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (GSTT1) gene defect. *Lancet*, 347:295-97.

CONDE A.R., MARTINS G., SARAIVA C., RUEFF J., MONTEIRO C. (1999). Association of p53 genomic instability with the glutathione S-transferase null genotype in gastric cancer in the Portugese Population. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 52:131-134.

DEAKIN M., ELDER J., HENDRICKSE C., PECKHAM D., BALDWIN D., PANTIN C., WILD N., LEOPARD P., BELL D.A., JONES P., DUNCAN H., BRANNIGAN K., ALLDERSEA J., FRYER A.A., STRANGE R. (1996). Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis*, Vol.17, No.4, 881-884.

HARRIS M.J., COGGAN M., LANGTON L., WILSON S.R., BOARD P.G. (1998). Polymorphism of the Pi class glutathione S-transferase in normal populations and cancer patients. *Pharmacogenetics*, 8:27-31.

HAYES J.D., PULFORD D.J. (1995). The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 30(6):445-600.

HEAGERTY A.H.M., FITZGERALD D., SMITH A., BOWERS B., JONES P., FRYER A. A., ZHAO L., ALLDERSEA J., STRANGE R.C. (1994). Glutathione S-transferase GSTM1 phenotypes and protection against cutaneous tumours. *Lancet*, 343:266-68.

HELZLSOUER K.J., SELMIN O., HUANG H.Y., STRICKLAND P.T., HOFFMAN S., ALBERG A.J., WATSON M., COMSTOCK G. W., BELL D. (1998). Association Between Glutathione S-Transferase M1,P1 and T1 Genetic Polymorphisms and Development of Breast Cancer. *J Nat Cancer Ins*, Vol.90, No.7., Apr 1.

HIRVONEN A. (1999). Polymorphisms of xenobiotic-metabolizing enzymes and susceptibility to cancer. *Environ. Health Perspect*, Feb;107 Suppl 1:37-47.

GROPPI A., COUTELLE C., FLEURY B., IRON A., BEGUERET J., COUZIGOU P. (1991). Glutathione S-transferase class μ in French alcoholic cirrhotic patients. *Hum. Genet.*,87, 628-630.

GOTO I., YONEDA S., YAMAMOTO M., KAWAJIRI K. (1996). Prognostic Significance of Germ Line Polymorphisms of the CYP1A1 and Glutathione S-Transferase Genes in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res*, 56, 3725-3730, Aug 15.

KATOH T., INATOMI H., KIM H., YANG M., MATSUMOTO T., KAWAMOTO T. (1998). Effects of Glutathione S-Transferase (GST) M1 and GSTT1 genotypes on urothelial cancer risk. *Cancer Lett*, 132,147-152.

KATOH T., NAGATA N., KURODA Y., ITOH H., KAWAHARA A., KUROKI N., OOKUMA R., BELL D.A. (1996). Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and (GSTT1) genetic polymorphism and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, Vol.17,No.9,1855-1859.

KETTERER B., HARRIS J.M., TALASKA G., MEYER D.J., PEMPLE S.E. TAYLOR J.B., LANG N.P., KADLUBAR F.F. (1992). The Human Glutathione S-Transferase Supergene Family, Its Polymorphism, and Its Effects on Susceptibility to Lung Cancer. *Env Health Persp*, Vol.98, 87-94.

KRAJINOVIC M., LABUDA D., RICHER C., KARIMI S., SINNETT D. (1999). Susceptibility to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 Genetic Polymorphisms. *Blood*, Vol.93,No.5, March 1, 1496-1501.

MAZZA J.J. (1995). Manual of Clinical Hematology. Second Edition, Marshfield Clinic.

NAKACHI K., IMAI K., HAYASHI S.I., KAWAJIRI K. (1993). Polymorphisms of the CYP1A1 and Glutathione S-Transferase Genes Associated with Susceptibility to Lung Cancer in Relation to Cigarette Dose in a Japanese Population. *Cancer Res*, 53,2994-2999, July 1.

O'DWYER P.J., HAMILTON T.C., YAO K.S., TEW K.D., OZOLS R.F. (1995). Modulation Of Glutathione And Related Enzymes In Reversal Of Resistance To Anticancer Drugs. *Drug Res Clin Onc Hem*, Vol.9,No.2, April.

OKE B., AKBAS F., AYDIN M., BERKKAN H. (1998). GSTT1 null genotype frequency in a Turkish population. *Arch Toxicol*, 72:454-455.

PEMPLE S., SCHROEDER K.R., SPENCER S.R., MEYER D.J., HALLIER E., BOLT H.M., KETTERER B., TAYLOR J.B. (1994). Human glutathione S-transferase Theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J*, 300, 271-276.

PERERA F.P (1996). Molecular Epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention. *J Natl Cancer Inst*, Apr 17; Vol. 88 (8), pp. 496-509.

PREUDHOMME C., NISSE C., HEBBAR M., VANRUMBEKE M., BRIZARD A., LAI J.L., FENAUX P. (1997). Glutathione S transferase theta 1 gene defects in myelodysplastic syndromes and their correlation with karyotype and exposure to potential carcinogens. *Leuk*, 11, 1580-1582.

ROLLINSON S., RODDAM P., KANE E., ROMAN E., CARTWRIGHT R., JACK A., MORGAN G.J. (2000). Polymorphic variation within glutathione S-transferase genes and risk of adult acute leukaemia. *Carcinogenesis*, Jan, 21(1):43-7.

ROSS V.L., BOARD P.G., WEBB G.C. (1993). Chromosomal Mapping of the Human Mu Class Glutathione S-Transferases to 1p13. *Genomics*, 18, 87-91.

SAMBROOK J., FRITSCH E.F. AND MANIATIS T. (1989). Molecular cloning a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

SEIDEGARD J., PERO R., MILLER D.G., BEATTIE E.J. (1986). A glutathione transferase in human leukocytes as a marker for the susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis*, Vol.7, No.5, 751-753.

SHEN J., LIN G., YUAN W., TAN J., BOLT H.M., THIER R. (1998). Glutathione transferase T1 and M1 genotype polymorphism in the normal population of Shanghai. *Arch Toxicol*, 72:456-458.

SHIELDS P.G., BOWMAN E.D., HARRINGTON A.M., DOAN V.T., WESTON A. (1993). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-DNA Adducts in Human Lung and Cancer Susceptibility Genes. *Cancer Res*, 53, 3486-3492.

SIPES I.G., McQUEEN, GANDDFI A.J., BOND J.A. (1997). Comprehensive Toxicology, 13-Volume Set: General Principles.

SINNETT D., KRAJINOVIC M., LABUDA D. (2000). Genetic Susceptibility to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leuk Lym*, Vol.38(5-6), 447-462.

STANULLA M., SCHRAPPE M., BRECHLIN A.M., ZIMMERMANN M., WELTE K. (2000). Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor

acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Blood*, 15 Feb, Vol.95, No.4.

STROOMBERGEN M.C.M.J., WARING R.H. (1999). Determination of glutathione S-transferase μ and θ polymorphisms in neurological disease. *Hum Exp Toxicol*, 18, 141-145.

TRIZNA Z., CLAYMAN G.L., SPITZ M.R., BRIGGS K.L., GOEPFERT H. (1995). Glutathione S-Transferase Genotypes as Risk Factors for Head and Neck Cancer. *Am Jour Sur*, Vol.170, Nov.

YENGI L., INSKIP A., GILFORD J., ALLDERSEA J., BAILEY L., SMITH A., LEAR J.T., HEAGERTY A.D., BOWERS B., HAND P., HAYES J.D., JONES P.W., STRANGE R.C. (1996). Polymorphism at the Glutathione S-Transferase Locus GSTM3: Interactions with Cytochrome P450 and Glutathione S-Transferase Genotypes as Risk Factors for Multiple Cutaneous Basal Cell Carcinoma. *Cancer Res*, 56, 1974-1977, May 1.

WHALEN R., BOYER T.D. (1998). Human Glutathione S-Transferases. *Sem Liver Dis*, Vol.18, No.4.

WOLF C.R., SMITH G., SMITH A.G., BROWN K., HENDERSON C.J. (1999). Adaptive responses to environmental chemicals. *Biochem Soc Symp*, 64, 129-139.

WORMHOUDT L.W., COMMANDEUR J.N.M., VERMEULEN P.E. (1999). Genetic Polymorphisms on Human N-Acetyltransferase, Cytochrome P450, Glutathione-S-Transferase, Epoxide Hydrolase Enzymes: Relevance to Xenobiotic Metabolism and Toxicity. *Crit Rev Toxicol*, 29(1):59-124.

ZHONG S., HOWIE A.F., KETTERER B., TAYLOR J., HAYES J.D., BECKETT G.J., WATHEN C.G., WOLF C.R., SPURR N.K. (1991). Glutathione S-transferase mu locus: use of genotyping and phenotyping assays to assess association with lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, Vol.12, No.9, 1533-1537.

EK 1

Gönüllülerle İlgili Bilgiler

- Adı Soyadı:
- Cinsiyeti : K ☐ E ☐ Yaşı:
- Doğum Yeri :
- Mesleği :
- Adres , Telefon :
- Tanı Tarihi :
- Hastalığın Evresi :
☐ Yeni tanı ☐ Remisyon ☐ Relaps ☐ Diğer
- Tedavi : ☐ Alıyor (Belirtiniz) ☐ Almıyor
- Sitogenetik çalışma sonucu ?
Yapıldığı Tarih :
- Ailede kanser olgusu var mı ?
Hastaya Yakınlığı ?
- Sigara Kullanımı :
- Alkol Kullanımı :
- Son 10 yıldır sürekli kullandığı ilaç var mı ? ☐ Evet ☐ Hayır
İlacın Adı :

EK 2

HASTA ONAM FORMU

Bu form, katılmanız önerilen araştırma ile ilgili olarak sizi bilgilendirmek amacıyla düzenlenmiştir. Formun düzenlenmesinde araştırmaya katılıp katılmama konusunda karar vermenizi kolaylaştırılması hedeflenmiştir.

Araştırmanın Adı: ALL'li ve KML'li hastalarda GSTM1 ve GSTT1 Polimorfizminin Rolü

Araştırmanın Amacı: Bu çalışmada GST enzimlerinin lösemiye olan etkisini test etmek üzere GSTM1 ve GSTT1 gen düzeyinde araştırılması planlanmıştır .

Çalışma Protokolü: Araştırmaya katılacak bireylerden 5 ml kan alınacak ve genotip çalışması bu kandan izole edilecek DNA ile yapılacaktır. Kanserojen maddeleri parçalayan enzimlerin (GST) erişkin akut ve kronik lösemili hastalarda varlığı araştırılacaktır. Toplam 200 kişi ile sınırlandırılan bu araştırmada isimler gizli (anonim) tutulacaktır. Projenin mali kaynağı Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu'ndan sağlanacaktır. Hastalar açısından herhangi bir mali yük getirmeyecektir. Araştırmaya katılmak isteyen hastalar, araştırmanın herhangi bir aşamasında, bu araştırmaya katılmaktan vazgeçebilirler. Böyle bir durum söz konusu olduğunda hastanın tedavisine devam edilecektir. Ayrıca bu araştırmada elde edilecek veriler anonim kalmak kaydıyla başka araştırmalarda da kullanılabilir.

Ankara Üniversitesi Tıp FakültesiAna Bilim Dalı
Hematoloji-Onkoloji Kliniğininprotokol numaralı hastasıyım
(hastasının velisiyim).

Hastalığımın (velisi bulunduğum hastanın) tedavisinde nasıl bir yöntem uygulanacağı ve uygulanacak yöntemin içediği riskler, Dünya Hekimler Kongrelerinde alınıp Helsinki Deklarasyonu başlığı altında metinleştirilmiş ilke ve önerilere uygun biçimde tanı koyucu ya da hastalığın etyolojisini ve patogenezi anlamak amacıyla yapılacak çalışmalar , araştırmalar ve riskler etrafı bir biçimde tarafıma anlatılmıştır.

Ben....., bu araştırma ile ilgili yeterli bilgiye sahibim. Araştırma ile ilgili sorularımı Biolog Nur Özten'e sorarak açık ve doyurucu yanıtlar aldım. Bu bilgiler ışığında çalışmaya kendi isteğimle katılıyorum.

Beyanı Kaydeden

Şahit

Beyanda Bulunan

**T.C. YERLİ VE YERLİLERİNE
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**