



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



# **TÜRK TOPLUMUNDA GSTP1 GEN POLİMORFİZMİNİN İNCELENMESİ**

**Emre SOYDAŞ**

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Mümtaz İŞCAN**

**2008- ANKARA**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRK TOPLUMUNDA GSTP1 GEN  
POLİMORFİZMİNİN İNCELENMESİ**

**Emre SOYDAŞ**

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Mümtaz İŞCAN**

**2008- ANKARA**

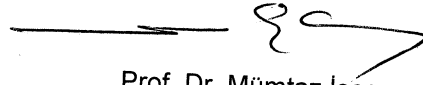
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Farmasötik Toksikoloji Yüksek Lisans Programı**

Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından


**Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24.10.2008




Prof. Dr. Mümtaz İşcan

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Jüri Başkanı  
(Danışman)



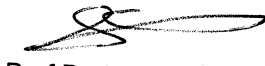
Prof. Dr. Benay Can Eke

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Jüri Üyesi




Prof. Dr. Sema Burgaz

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Jüri Üyesi



Prof. Dr. Tülay Çoban

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Jüri Üyesi



Prof. Dr. Sinan Süzen

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Jüri Üyesi

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Şekiller	vii
Çizelgeler	viii
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Toksik Maddelerin Metabolizması	1
1.2. Biyotransformasyonun Yer Aldığı Organlar	3
1.3. Glutatyon ve Glutatyon S-Transferazlar	4
1.3.1. Glutatyon	4
1.3.2. Glutatyon S-Transferazlar (GST)	6
1.3.2.1. Glutatyon S-Transferazların Detoksifikasyondaki Rolü	7
1.3.2.2. GST'ler Aracılı Aktivasyon	7
1.3.2.3. Glutatyon S-Transferazların Substratları	8
1.3.2.4. Glutatyon S-Transferazların Sınıflandırılması	9
1.3.2.5. Glutatyon S-Transferazların Gen Polimorfizmleri	10
1.4. Glutatyon S-Transferaz P1 (GSTP1)	10
1.4.1. GSTP1 ile İlaç Rezistansı Arasındaki İlişki	11
1.4.2. GSTP1 Polimorfizmi	13
1.4.2.1. GSTP1 Ekzon 5 Mutasyonu	13
1.4.2.2. GSTP1 Ekzon 6 Mutasyonu	14
1.4.3. GSTP1 Gen Polimorfizmi ve Enzim Aktivitesi Üzerine Yapılmış Çalışmalar	14
1.4.4. GSTP1 Gen Polimorfizmleri ve Kansere Oluşma Riski ile İlgili Çalışmalar	15
1.4.5. GSTP1 Gen Polimorfizmi ve Sağkalım Süreleri Arasındaki İlişkiyi İnceleyen Çalışmalar	17
1.4.6. GSTP1 Gen Polimorfizmlerinin Çeşitli Toplumlardaki Dağılımları	18
1.6. Çalışmanın Amacı	24

<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>25</b>
2.1. Kullanılan Gereçler	25
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler	25
2.1.2. Kullanılan Cihazlar	26
2.2. Kullanılan Yöntemler	26
2.2.1. Deney Kurgusu	26
2.2.2. DNA İzolasyonu	27
2.2.3. DNA Saflık ve Miktar Tayini	28
2.2.4. GSTP1 İle105Val Mutasyonunun Belirlenmesi	29
2.2.5. GSTP1 Ala114Val Mutasyonunun Belirlenmesi	30
2.2.6. Jel Hazırlanması ve Numunelerin Jele Uygulanması	31
2.2.7. GSTP1 Ala114Val Mutasyonu İçin RFLP Yöntemi	32
2.2.8. GSTP1 İle105Val Mutasyonu İçin RFLP Yöntemi	33
2.3. Kullanılan İstatistiksel Yöntem	33
<b>3. BULGULAR</b>	<b>34</b>
3.1. Çalışma Grubunun Genotip Özellikleri	34
3.2. GSTP1 Ekzon 5 Polimorfizmi Dağılımı	39
3.3. GSTP1 Ekzon 6 Polimorfizmi Dağılımı	40
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>42</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>46</b>
<b>ÖZET</b>	<b>47</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>48</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>49</b>
<b>EK</b>	<b>58</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>64</b>

## ÖNSÖZ

Bu tez, dünyada hergün biraz daha önem kazanan ksenobiyotik metabolizmasında rol oynayan enzimlerin polimorfik özelliklerinin incelenmesi konusunun sadece küçük bir parçası olmakla beraber, bu konuda Türk toplumunda yeterince araştırma olmaması nedeni ile büyük bir boşluğu da doldurmayı amaçlamıştır.

Bu tezin hazırlanması sırasında her ihtiyacım olduğunda yanımda olan, sorularıma sabır ve özveri ile yanıt veren, çalışmalarımın tıkanma noktasına geldiği zamanlarda motivasyonumu arttırmama yardımcı olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Mümtaz İŞCAN' a,

çalışmalarımın başından beri gerek yüz yüze gerekse telefonla hiç çekinmeden her türlü soruma yanıt veren ve bilgilerini bana aktarmaya çalışan değerli hocam Dr. Ecz. Ahmet Oğuz ADA' ya,

anabilim dalımızın bütün gülyüzlü öğretim üyeleri ve personellerine,

yüksek lisans dönemim boyunca benden sevgi ve desteklerini hiç esirgemeyen aileme ve Ecz. Zafer ERZURUM' a,

hem madden, hem de manevi olarak varlığı ile bana sonsuz destek olan sevgili nişanlım İtir REŞA' ya sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1.1.</b> Glutasyon Sentezi	5
<b>Şekil 1.2.</b> CDNB'nin GST' ler ile biyotransformasyonu	7
<b>Şekil 1.3.</b> Episülfonyum iyonu oluşumu	8
<b>Şekil 1.4.</b> GST' lerin sınıflandırılması	9
<b>Şekil 1.5.</b> GSTP1' in platin bazlı ilaçlarla indüksiyonu	12
<b>Şekil 1.6.</b> GSTP1 polimorfizmleri	14
<b>Şekil 3.1.</b> GSTP1 İle105Val genotipine ait jel elektroforez sonucu	39
<b>Şekil 3.2.</b> GSTP1 Ala114Val genotipine ait jel elektroforez sonucu	40

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 1.1.</b> I. Faz metabolizasyon reaksiyonları ve rol oynayan enzimler	2
<b>Çizelge 1.2.</b> II. Faz metabolizasyon reaksiyonları ve rol oynayan enzimler	3
<b>Çizelge 1.3.</b> Glutatyon S-transferazların substratları	9
<b>Çizelge 1.4.</b> Ile105Val polimorfizmi ve enzim aktivitesi ilişkisi (Watson ve ark., 1998)	15
<b>Çizelge 1.5.</b> Ile105Val polimorfizmi ve akciğer kanseri riski arasındaki ilişki (Ryberg ve ark., 1997)	16
<b>Çizelge 1.6.</b> GSTP1 ekzon 5 polimorfizmi ve pankreas kanserli hastalarda sağkalım süreleri arasındaki ilişki (Jiao ve ark., 2007)	18
<b>Çizelge 1.7.</b> GSTP1 ekzon 5 polimorfizminin Avrupa’da yaşayan beyaz ırk topluluklarındaki dağılımı	20
<b>Çizelge 1.8.</b> GSTP1 ekzon 5 polimorfizminin diğer toplumlardaki dağılımı	21
<b>Çizelge 1.9.</b> GSTP1 ekzon 6 polimorfizminin Avrupa’da yaşayan beyaz ırk toplumlarındaki dağılımı	22
<b>Çizelge 1.10.</b> GSTP1 ekzon 6 polimorfizminin diğer toplumlardaki dağılımı	23
<b>Çizelge 3.1.</b> Çalışma grubunun GSTP1 genotip özellikleri ve cinsiyetleri	34
<b>Çizelge 3.2.</b> GSTP1 ekzon 5 polimorfizmi dağılımı	39
<b>Çizelge 3.3.</b> GSTP1 ekzon 6 polimorfizmi dağılımı	40
<b>Çizelge 3.4.</b> GSTP1 polimorfizmlerinin cinsiyete göre dağılımları	41
<b>Çizelge 3.5.</b> Farklı genotip kombinasyonları ve frekansları	41



## 1. GİRİŞ

### 1.1. Toksik Maddelerin Metabolizması

Genel olarak metabolizma “hayatın devamı için gerekli olan ve organizmada oluşan tüm kimyasal reaksiyonlar” olarak tanımlanabilir. Diğer taraftan bir organizma için yabancı olan kimyasal maddelerin (ksenobiyotiklerin) kimyasal değişimleri de “metabolizma” olarak tanımlanırsa da biyotransformasyon bu anlamda daha uygun bir terim olmaktadır.

Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonu organizma için birçok önem taşımaktadır. Lipitte çözünen apolar kimyasal maddelerin enzimatik reaksiyonlarla daha polar metabolitlere dönüşmeleri ile atılımları kolaylaşır. Diğer taraftan yabancı kimyasal bir madde ancak organizmada enzimatik reaksiyonlar sonucu “aktif metabolit”e dönüşerek toksik etki de gösterebilir.

Yabancı kimyasal madde biyotransformasyona uğramadan önce ister biyolojik aktif ana madde olsun, isterse biyolojik aktivitesi olmasın organizmada değişik enzimatik reaksiyonlarla değişik etki gösteren metabolitlere dönüşür ve sonra da konjugasyonla inaktif hale geçerek atılır. Genel olarak bir ksenobiyotik veya metabolitlerinin bu son mekanizma ile biyotransformasyonları sonucu toksisitesi azalıyor veya ortadan kalkıyorsa bu olaya detoksikasyon veya detoksifikasyon denilmektedir. Bazen de yukarıda değinildiği gibi, kimyasal maddenin

biyotransformasyonu ile çok aktif ara metabolitler oluşabilir. Bu olaya toksikasyon veya biyoaktivasyon denir.

Ksenobiyotiklerin biyotransformasyon mekanizmaları iki fazda toplanabilir;

1- Birinci faz reaksiyonları

2- İkinci faz reaksiyonları

Birinci ve ikinci faz biyotransformasyon mekanizmalarında rol oynayan enzimler ve reaksiyon tipleri Çizelge 1.1 ve Çizelge 1.2' de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. I.Faz metabolizasyon reaksiyonları ve rol oynayan enzimler

<b>Reaksiyon Tipi</b>	<b>Enzimler</b>
1. Yükseltgenme	CYP' ler Ksantinoksidaz Peroksidazlar Aminooksidaz Dioksijenaz Superoksit dismutaz
2. İndirgenme	CYP' ler Ketoreduktaz Glutatyon peroksidazlar
3. Hidroliz	Epoksit hidrolaz Karboksiesteraz Amidazlar

Çizelge 1.2. II. Faz metabolizasyon reaksiyonları ve rol oynayan enzimler

Reaksiyon Tipi	Enzimler
1. Konjugasyon Reaksiyonları	Glukronil transferaz Sülfonil transferaz <b>Glutatyon S-transferaz</b> Glukozil transferaz Tiyol transferaz
2. Diğer Metilasyon Asetilasyon	O, N, S-metiltransferazlar N-asetiltransferaz Açıltransferaz Sülfürtransferaz

Birinci fazda genellikle lipitte çözünür ksenobiyotikler daha polar moleküller haline geçerler ve ikinci fazda ise endojen maddelerle birleşen bu polar metabolitler inaktif şekillerine dönüşürler.

### 1.2. Biyotransformasyonun Yer Aldığı Organlar

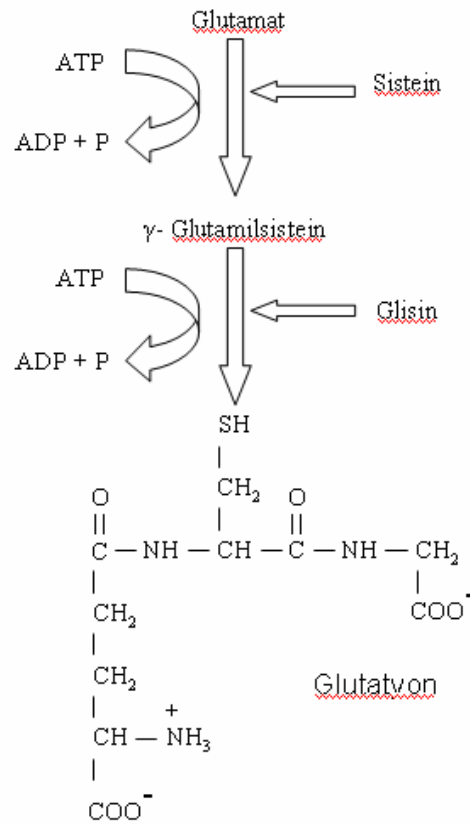
Yabancı kimyasal maddelerin biyotransformasyonunu kataliz eden başlıca enzimler karaciğerde yerleşmişlerdir. Bu nedenle karaciğerin, kan dolaşımı ile karaciğere gelen kimyasal maddeleri depolanma dağılım ve safra ile atılımlarından önce metabolize etme kapasitesi çok fazladır. Ayrıca biyotransformasyon karaciğer dışında sınırlı olmak üzere akciğer, böbrek ve barsakta; daha da sınırlı olarak deri, testis, plasenta ve adrenal bezde gerçekleşebilir.

### 1.3. Glutatyon ve Glutatyon S-Transferazlar

#### 1.3.1. Glutatyon

Glutatyon(GSH), glisin, sistein ve glutamik asitten oluşan bir tripeptiddir. Glutatyon ile konjugasyon sonucunda tiyoeter yapısında maddeler oluşur. Substratların elektrofilik karbon, oksijen, nitrojen veya sülfür atomları glutatyonun sülfidril grubu ile reaksiyona girmektedir. (Caserett ve Doull's, 2005)

Şekil 1.1' de görüldüğü gibi glutatyon sentezinin birinci basamağında glutamik asit ve sistein  $\gamma$ -glutamin sisteinsentaz enzimi aracılığıyla peptid bağı oluşturur. Bu şekilde  $\gamma$ -glutamin sistein yapısı oluşur. İkinci basamakta ise, oluşan bu yapıya glutatyon sentaz enzimi aracılığıyla glisin amino asidi peptid bağı ile bağlanır ve sonunda glutatyon oluşur. Glutatyon karaciğerde oluşur, safrayla veya merkaptürik aside dönüşerek böbreklerden atılır.



Şekil 1.1. Glutatyon Sentezi

GSH ayrıca, glutatyon peroksidaz için bir kofaktördür. Glutatyon eksikliğini lipid peroksidasyon artırır. Yapılan *in vivo* çalışmalarda, hepatositlerde GSH havuzunun tükenmesinden sonra, lipid peroksidasyonunun arttığı gözlenmiştir. Oluşan peroksitlere karşı GSH peroksidazların koruyucu etkisinin olduğu görülmüştür (Cantford ve Giegelen, 1975). Glutatyon eksikliği, total glutatyonun %20-30' u civarında olursa, hücre hasarı ve ölümüyle sonuçlanan olaylar görülebilir (Moldeus ve Quanguan. 1987; Reed,1984, 1990).

### 1.3.2. Glutasyon S-Transferazlar (GST)

GST' ler insanda birçok dokuda bulunup çok işlevli ve geniş spektrumlu substrat özgüllüğü olan enzimlerdir (Jacoby, 1980; Peters, 1988). Bu özelliği ile GST'ler hem eksojen, hem de endojen kaynaklı olabilen çok miktarda elektrofilik molekülün metabolizasyonunda görev alan önemli bir enzim ailesidir. GST' ler glutasyonun sülfidril grubunu aktive ederek elektrofilik substrat (ki bu elektrofilik substratın elektrofilik fonksiyonel grubu C, N veya S olabilir) üzerine nükleofilik atak etmesini katalize ederler. (Armstrong, 1997)

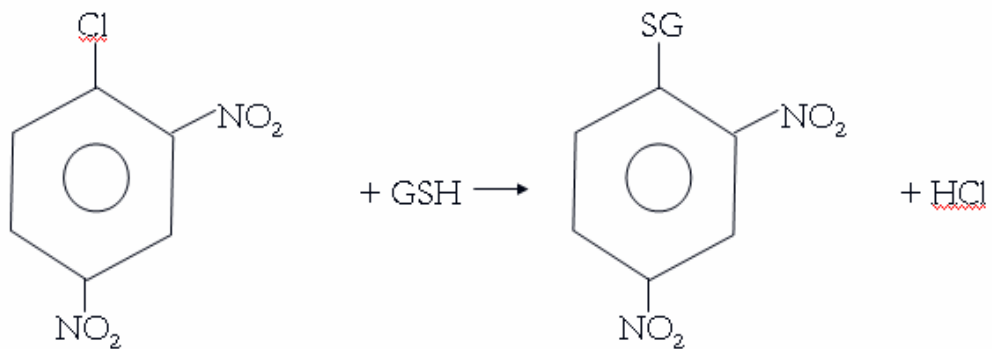
GST' ler memelilerde, böceklerde, balıklarda, bitki ve bakterilerde yaygın olarak bulunurlar (Hayes ve Pulford, 1995). Memelilerde en çok sitozollerde bulunsalar da, mitokondri ve mikrozoymda da buldukları gösterilmiştir (Andersson ve ark., 1994; Jakobsson ve ark., 1996; Pemple ve ark., 1996).

Sitozolik GST' ler her bir ünitesi 25 kDA moleküler ağırlığa sahip dimerik proteinlerdir. Bu dimerik enzimin her bir alt ünitesi iki ayrı fonksiyonel bölgeden oluşmuş bir aktif siteye sahiptir: fizyolojik substrat glutasyonun bağlandığı hidrofilik G-site ve ona komşu elektrofilik substratın bağlanması için hidrofobik ortam oluşturan H-site (Armstrong, 1997).

Enzimin en yüksek aktiviteye sahip olduğu organlar, testis, karaciğer, böbrek, barsak ve adrenal bezlerdir (Casarett ve Doull's, 1991).

### 1.3.2.1. Glutatyon S-Transferazların Detoksifikasyondaki Rolü

Glutatyon sentezi ve bu sistemde görev alan enzimler birçok anti-kanser ilacın inaktivasyonuna veya detoksifikasyonuna doğrudan karışmaktadır (Gulick ve ark., 1995; Shen ve ark., 1997). Platinyum bazlı bileşikler ve alkilleyici ajanlar kanser tedavisinde kullanılan önemli ilaçlardır. Bu ilaçlar başlıca glutatyon sistemi vasıtasıyla inaktive edilmektedir. Glutatyon S-transferazların katalizlediği en genel reaksiyon Şekil 1.2' de gösterilmektedir.



1-kloro-2,4-dinitrobenzen  
(CDNB)

Şekil 1.2. CDNB' nin GST' ler ile biyotransformasyonu

### 1.3.2.2. GST' ler Aracılı Aktivasyon

Detoksifikasyonda önemli rol oynayan GST' lerin dihaloalkanlar ve haloalkanlar gibi bazı karsinojenleri aktive ettikleri de bilinmektedir. Buna örnek olarak; 1,2-dibromoetan, metilenklorid ve heksakloro-1,3-

butadien verilebilir. 1,2-dibromoetan'ın GST aracılı aktivasyonu Şekil 1.3' te gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Episülfonyum iyonu oluşumu

Episülfonyum iyonunun oluşması su, GSH ve DNA'nın guanin bazı gibi nükleofillerle etkileşmesi anlamına gelir.

### 1.3.2.3. Glutasyon S-Transferazların Substratları

PGA2 gibi reaktif endojen moleküller, 4-hidroksi-2-nonenal gibi endojen yağ asidi oksidasyonu ürünleri, kanser kemoterapisinde kullanılan cis-platin, insektisit olarak kullanılan DDT ve etilenoksit gibi çok sayıda çevresel karsinojen ve toksik bileşik GST'lerin substratlarıdır. Çizelge 1.3. GST'lerin substratlarını göstermektedir (Eaton ve ark., 1999).

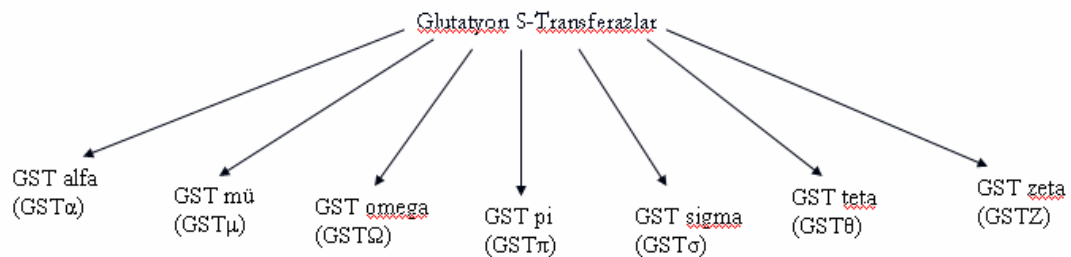


Çizelge 1.3. Glutasyon S-transferazların substratları

<b>Çevresel Karsinojenler</b>	<b>Pestisidler</b>	<b>İlaçlar</b>	<b>Endojen Moleküller</b>
BPDE	Lindan	Cis-platin	4-Hidroksi-2-nonenal
Stiren oksit	Alaklor	Klorambusil	Kolesterol-5,6-oksit
4-Nitrokinolin oksit	Atrazin	Siklofosfamid	Adenin propenal
Akroleyn	DDT	Tiyotepa	9-Hidropeksi-linoleik asit
Hekzaklorobutadien	Metil paration	Fosfomisin	Dopaminokrom
Trikloroetilen		EA	Kateşol estrojenleri
Metilen klorid		Nitrogliserin	
Etilen oksit		Adriamisin	

#### 1.3.2.4. Glutasyon S-Transferazların Sınıflandırılması

GST'lerin her bir sınıfı arasındaki aminoasit dizilimi benzerliği %50' den fazla, farklı sınıflar arasındaki aminoasit dizilimi benzerliği ise %30' un altındadır (Mannervick ve ark., 1992). Sitozolik GST'ler Şekil 1.4' te görüldüğü gibi yedi sınıfa ayrılırlar. Bunlardan GST alfa; 6. kromozomda, mü; 1. kromozomda, teta; 22. kromozomda, pi; 11. kromozomda, zeta; 14. kromozomda, sigma; 4. kromozomda, omega; 10. kromozomdadır (Strange ve ark., 2001).



Şekil 1.4. GST'lerin sınıflandırılması

### **1.3.2.5. Glutasyon S-Transferazların Gen Polimorfizmleri**

Yapılan biyokimyasal çalışmalar karsinojenik ve toksik bileşiklerin metabolizasyonunda bireysel farklılıklar olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Biyotransformasyonda ortaya çıkan geniş bireysel farklılıklar bu ksenobiyotiklerin metabolizmasında rol oynayan enzimlerin genetik polimorfizmleri ile açıklanmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar çeşitli hastalıklar ve kanser riskinin artması ile Glutasyon S-transferaz genlerinin spesifik allelleri arasında ilişki olduğunu göstermektedir (Ivaschenko ve ark., 2002; Matthey ve ark., 2002).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, insan sitozolik Glutasyon S-transferaz genlerinde GSTM1, GSTM3, GSTP1, GSTT1 ve GSTZ1 genlerinin polimorfik olduğunu ortaya çıkarmıştır (Risch ve ark., 2001).

### **1.4. Glutasyon S-Transferaz P1 (GSTP1)**

GSTP1' in, ilk olarak insan plasentasında bulunan anyonik GST olduğu bildirilmiştir (Guthenberg ve ark., 1979). Sonradan beyin, akciğer, kalp, testis, adrenal bez, böbrek, pankreas ve karaciğer olmak üzere dokuların büyük bir kısmında sentezlendiği görülmüştür (Eaton ve ark., 1999).

### 1.4.1. GSTP1 ile İlaç Rezistansı Arasındaki İlişki

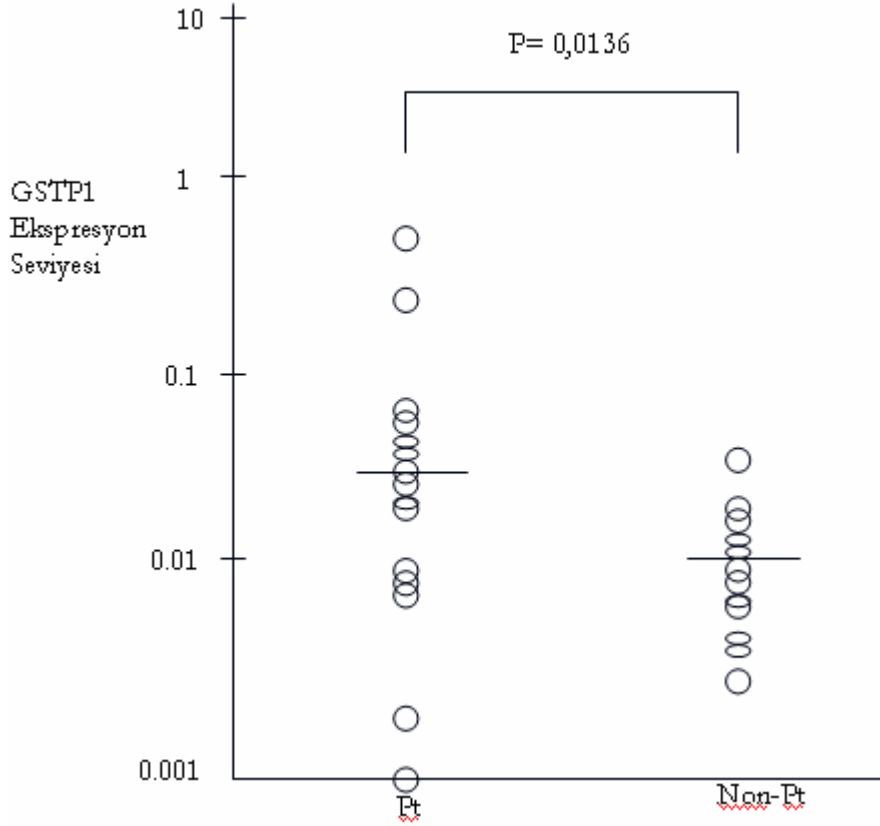
Kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçlara direnç gösteren tümörlerde GSTP1 seviyelerinde artış gözlenmiştir (Nakagawa ve ark., 1988; Okuyama, 1994; Tsuchida ve ark., 1992). Platinyum bazlı ilaçların detoksifikasyonunda önemli rol oynayan Glutatyon S-transferaz pi, bu bileşiklere karşı kazanılmış ve var olan rezistans oluşumunda da önemli rol oynamaktadır (Ban ve ark., 1996; Goto ve ark., 1999).

Mide (Boku ve ark., 1998), ovaryum (Cheng ve ark., 1997), baş-boyun (Shiga ve ark., 1999) ve epidermoid karsinoma (Inoue ve ark., 1995)' da yapılan çalışmalar platinyum bazlı bileşikler kullanılarak yapılan kemoterapide alınan düşük yanıtların, yüksek GSTP1 ekspresyonu ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. Ayrıca meme kanseri tümörlerinde de GSTP1 geninin varlığı kemoterapiye karşı oluşan rezistans ile ilişkili bulunmuştur (Fengxi-Su ve ark., 2003).

Etoposid, melfalan, sisplatin ve adriamisin gibi kemoterapötik ajanlara karşı tümör hücrelerinde oluşan rezistansla GSTP1'in ilişkili olduğu görülmüştür (Ban ve ark., 1996; Arai ve ark., 2000; Hida ve ark., 1994).

Platinyum bazlı ilaçlara maruziyet sonucunda GSTP1 düzeylerinde artışlar gözlenmektedir. Akciğer kanseri hastalarında platinyum bazlı ilaçlar ile yapılan tedavi öncesi ve sonrası GSTP1 ekspresyon seviyeleri ölçülmüş ve ilaç maruziyeti sonrasında protein düzeylerinin anlamlı bir

şekilde yükseldiği gözlenmiştir (Oguri ve ark., 2000). Bu da, GSTP1 enziminin indüklenebilir olduğunu ve bu indüksiyonun kazanılmış ilaç rezistansında önemli rol oynayabildiğini göstermektedir.



Şekil 1.5. GSTP1' in platin bazlı ilaçlarla indüksiyonu (Oguri ve ark., 2000)

İlaç rezistansı ve GSTP1 arasında ilişki saptayan çalışmaların varlığının yanı sıra GSTP1' in ilaç rezistansında önemli rol oynamadığını gösteren bazı çalışmalar da vardır. D'Incalci ve ark.'nın 1998 yılında yaptıkları çalışmada GSTP1 ile ilaç rezistansı arasında ilişki olmadığı gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalarda ulaşılan birtakım çelişkili sonuçların bu enzimi kodlayan genin polimorfik olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

### **1.4.2. GSTP1 Polimorfizmi**

GSTP1 geninde iki adet tek nükleotid polimorfizmi belirlenmiştir. Bu polimorfizmler ekzon 5 ve ekzon 6'da bulunan kodon 105 (İle-Val) ve kodon 114 (Ala-Val)' de aminoasitlerin yer değiştirmesi sonucu meydana gelmektedir (Board ve ark., 1989). Substrat seğiciliklerinin her iki mutasyondan da etkilendiği belirlenmiştir (Ali-Osman ve ark., 1997; Ji ve ark., 1999).

Genetik polimorfizme bağlı yapısal, fonksiyonel ve salınım seviyelerindeki farklılıklar bir yandan karsinojenik ve mutajenik kimyasallara karşı detoksifikasyonda kişiyi daha savunmasız bırakarak kanser riskinde olası artışlara sebep olurken, diğer yandan kemoterapötik ajanları inaktive etme yeteneğini azaltarak ilaç tedavisine verilen yanıtı olumlu yönde etkilemektedirler (Harris ve ark., 1998).

#### **1.4.2.1. GSTP1 Ekzon 5 Mutasyonu**

Bu mutasyon, ekzon 5' in 105. kodonunun 313. pozisyonunda izolösin (ATC) aminoasitinin, valin (GTC) aminoasitine dönüşmesiyle olur. Bu dönüşüme nokta mutasyonu sonucu adenin nükleotidinin (A), guanin nükleotidiyle (G) yer değiştirmesi neden olur (Coles ve ark., 2000; Ali Osman ve ark., 1997). Bu mutasyon İle105Val olarak ifade edilir.

### 1.4.2.2. GSTP1 Ekzon 6 Mutasyonu

Bu mutasyon ise ekzon 6' nın 114. kodonunun 341. pozisyonunda sitozin nükleotidi (C) ile timin nükleotidinin (T) yer değiştirmesi sonucu alanin (GCG) aminoasidinin valin (GTC) aminoasidine dönüşmesiyle oluşur (Coles ve ark., 2000; Ali Osman ve ark., 1997). Bu mutasyon ise Ala114Val olarak tanımlanır.

	<u>ekzon</u>	<u>kodon</u>	<u>pozisyon</u>	
İle105Val	5	105	313	ATC → GTC
Ala114Val	6	114	341	GCC → GTC

şekil 1.6. GSTP1 polimorfizmleri

### 1.4.3. GSTP1 Gen Polimorfizmi ve Enzim Aktivitesi zerine Yapılmış alışmalar

Bu iki polimorfizm de enzim aktivitesinde düşüşe neden olmaktadır (Zimniak ve ark., 1994; Ali Osman ve ark., 1997; Watson ve ark., 1998). Val homozigot geninin (Val/Val), Ile homozigot (İle/İle) gene oranla daha düşüş aktivite gösterdiği, heterozigot olanların ise (İle/Val) ortalama bir aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir (Hu ve ark., 1998; Watson ve ark., 1998; Srivastava ve ark., 1999).

Çizelge 1.4. Ile105Val polimorfizmi ve enzim aktivitesi ilişkisi (Watson ve ark., 1998)

Polimorfizm	Aktivite (CDNB )
İle/İle ( n=18 )	74,9 ± 3,8 nmol/mg/min
İle/Val ( n=13 )	62,1 ± 4,2 nmol/mg/min
Val/Val ( n=3 )	52,5 ± 4,5 nmol/mg/min

İle/İle genotipine sahip grubun enzim aktivitesi İle/Val genotipine sahip grubun enzim aktivitesinden anlamlı şekilde ( $p=0,03$ ) fazla bulunurken, bu fark İle/Val ve Val/Val genotiplerine sahip grupların kombinasyonu ile İle/İle genotipine sahip grup arasında daha da fazladır. ( $p=0,009$ ) (Watson ve ark., 1998)

#### 1.4.4. GSTP1 Gen Polimorfizmleri ve Kansere Oluşma Riski ile İlgili Çalışmalar

Ryberg ve arkadaşlarının 1997’de yaptıkları çalışmada Çizelge 1.5’ te görüldüğü gibi, hastalarda kontrol grubuna göre (9,1-51,5) anlamlı derecelerde Val/Val genotip frekansında artış (15,9), İle/İle genotip frekansında azalış (38,4) görülmüştür. Squamous Cell Kanseri hastalarında ise bu farklar daha da fazlalaşmıştır.

Çizelge 1.5. İle105Val polimorfizmi ve akciğer kanseri riski arasındaki ilişki (Ryberg ve ark., 1997)

Genotip	Kontrol Grubu	Akciğer Kanseri Hastaları		
	n (297)	Tüm Hastalar (138)	Skvamöz Cell	Adeno karsinom
İle/İle	153 (51,5)	53 (38,4) <sup>a</sup>	20 (29,9) <sup>c</sup>	17 (41,4)
İle/Val	117 (39,4)	63 (45,7)	34 (50,7)	20 (48,7)
Val/Val	27 (9,1)	22 (15,9) <sup>b</sup>	13 (19,4) <sup>d</sup>	4 (9,8)

a İle/İle'ya karşı İle/Val+Val/Val: p=0,011; OR=1,70; %95 CI; 1,13-2,57

b İle/Val+Val/Val'ya karşı GG: p=0,035; OR=1,90; %95 CI; 1,04-3,47

c İle/İle'ya karşı İle/Val+Val/Val: p=0,001; OR=2,50; %95 CI; 1,41-4,42

d İle/Val+Val/Val'ya karşı GG: p= 0,015; OR=2,41; %95 CI; 1,17-4,96

Akciğer kanseri olan 582 hasta ve 600 kişilik sağlıklı grup üzerinde Wang ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan çalışmada, GSTP1 Ala114Val mutasyonunun özellikle erkekler, sigara içen ve 62 yaş altı genç bireylerde kanser riskini arttırdığı belirlenmiştir. Fakat aynı risk artışı ekson 5 mutasyonuna sahip bireylerde saptanmamıştır.

Tayvan populasyonunda İle105Val polimorfizmine sahip bireyler arasında epidermoid karsinom görülme olasılığı yüksek bulunmuştur (Liang ve ark., 2005). Bir başka çalışmada küçük hücreli akciğer kanserine yakalanma olasılığının bu polimorfizme sahip bireylerde 3,6 kat artış gösterdiği saptanmıştır (Stucker ve ark., 2002). Bunların yanı sıra İle105Val polimorfizmi ile akciğer kanseri arasında bir ilişki olmadığını gösteren çalışmalar da vardır (Liang ve ark., 2005; Lewis ve ark., 2002; Saarikoski ve ark., 1998).

Harries ve arkadaşlarının 1997' de testis, mesane ve prostat kanseri oluşma riski üzerine yaptıkları çalışmada GSTP1 İle105Val



mutasyonuna sahip bireylerde testis ve mesane kanserleri için riskin arttığı, prostat kanseri oluşma riskinin ise yine bu polimorfizm ile arttığı gözlenmiştir. Prostat kanseri oluşma riski için çelişki yaratacak sonuçlar ortaya koyan çalışmalar da bulunmaktadır (Shepard ve ark., 2000; Debes ve ark., 2004).

#### **1.4.5. GSTP1 Gen Polimorfizmi ve Sağkalım Süreleri Arasındaki İlişkiyi İnceleyen Çalışmalar**

GSTP1 ekzon 5 mutasyonu ile akciğer kanseri arasındaki ilişkiyi hastaları histolojilerine göre ayırmadan değerlendiren Sweeney ve arkadaşları (2003) İle105Val polimorfizminin sağkalım süreleri üzerine bir etkisi bulunmadığını saptamışlardır. Aynı polimorfizm ile yine akciğer kanseri arasında ilişki olmadığı sonucuna ulaşmış birkaç çalışma daha vardır (Lu ve ark., 2006; Kunak, 2005). GSTP1 Ala114Val polimorfizmi ile akciğer kanserli hastalarda sağkalım süreleri üzerine Lu ve arkadaşlarının 2006'da yaptıkları çalışmada 3. ve 4. aşama küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastaların GSTP1 ekzon 6 genotiplerinden heterozigot (Ala/Val) ve mutant (Val/Val) genotipe sahip bireyler birlikte değerlendirilmişler ve (Ala/Ala) genotipine sahip olanlara oranla daha uzun sağkalım süreleri gözlenmiştir. ( $p=0,037$ )

Jiao ve arkadaşlarının 2007' de 5-fluorourasil ile tedavi gören 138 pankreas kanserli hastada yaptıkları sağkalım analizinde görülmüştür ki, mutant genotipe sahip bireyler diğerlerinden daha uzun sağkalım göstermişlerdir. Hazard oranı= 0,45 (%95 CI 0,22-0,94)

Çizelge 1.6. GSTP1 ekzon 5 polimorfizmi ve pankreas kanserli hastalarda sağkalım süreleri arasındaki ilişki (Jiao ve ark., 2007)

Genotip	Sağkalım Süresi	%95 CI
İle/İle	15,8 ay	13,1-20,9 ay
İle/Val	22,2 ay	16,0-37,9 ay
Val/Val	35,8 ay	14,4-Ulaşılmamış

#### 1.4.6. GSTP1 Gen Polimorfizmlerinin Çeşitli Toplumlardaki Dağılımları

Çeşitli toplumlardaki ekzon 5 ve ekzon 6 polimorfizmlerinin dağılımları çizelge 1.7., 1.8., 1.9., ve 1.10.' da gösterilmiştir. İncelenen toplumlarda polimorfik genlerin frekanslarının çeşitli etnik guruplarda farklı oldukları bildirilmektedir. İlaveten, etnik grup içinde de farklılıklar gözlenmektedir (Garte ve ark., 2001). Örneğin, Avrupa ülkelerinde GSTP1 ekzon 5 İle105Val ve Val105Val genotip frekansları sırasıyla % 36.0- 47.8 ve % 5.5 – 46.0 aralıklarında değişmektedir (Carstensen ve ark' ları, 1999; Steinhoff ve ark' ları, 2000; Whyatt ve ark' ları 2000; Sarmanova ve ark' ları, 2001; Abbas ve ark' ları, 2004; Sorensen ve ark' ları, 2004; van der Loght ve ark' ları, 2004; Rodriguez ve ark' ları,2005). Ekzon 5 için Avrupa haricindeki bazı toplumlarda yapılan çalışmaların bazılarında Avrupa'da elde edilen sonuçlarla uyumluluk gözlenirken bazılarında mutant ve heterozigot frekanslarında gözle görülür bir artış meydana gelmektedir (F. Al-Dayel ve ark. 2007; Watson ve ark. 1998). Avrupa' da yaşayan beyaz ırk toplumlarında GSTP1 ekzon 6 Ala114Val ve Val114Val mutasyon frekansları sırasıyla % 7.3 -14.3 ve % 0 -1.5

aralıklarında (Carstensen ve ark' ları, 1999; Sorensen ve ark' ları, 2004; Garcia-Closas ve ark' ları, 2005) değişmekteyken özellikle F. Al-Dayel ve arkadaşlarının 2007' de yaptıkları çalışmada bu frekansların anlamlı şekilde arttığı görülmektedir.

Türk toplumunda GSTP1 ekzon 5 polimorfizmini irdeleyen çalışmalar oldukça az olup bulgular da çelişkilidir (Toruner ve ark' ları, 2001; Aynacıoğlu ve ark' ları, 2004; Ates ve ark' ları, 2005; Ada ve ark' ları, 2006). Toruner ve ark' ları (2001) ile Ada ve ark' ları (2006) inceledikleri sırasıyla 121 ve 133 kişide Val105Val mutant frekansını % 4,1 ve % 6,0 olarak gözlerken Aynacıoğlu ve ark' ları (2004) ile Ateş ve ark' ları (2005) inceledikleri sırasıyla 265 ve 204 kişide Val105Val mutant frekansını % 12,1 ve % 19,6 olarak saptamışlardır.

Diğer taraftan, Türk toplumunda GSTP1 ekzon 6 polimorfizminin dağılımı konusunda ise yapılmış tek çalışma mevcuttur. Ada ve ark' ları (2006) yaptıkları çalışmada Ala114Ala, Ala114Val ve Val114Val genotip frekanslarını sırası ile %85,0 , %14,3 ve %0,7 olarak bulmuşlardır. Türkiye'de yapılmış tek çalışmada elde edilmiş olan bu sonuçlar Arap ırkında yapılan çalışmalarla benzerlik göstermezken Avrupa toplumları ile uyum göstermektedir.

Çizelge 1.7. GSTP1 ekzon 5 polimorfizminin Avrupa'da yaşayan beyaz ırk topluluklarındaki dağılımı

Ülke	n	İle10Sİle	İle105Val	Val105Val	Referans
Çek Cumhuriyeti	455	49,2	40,4	10,3	Sarmanova ve ark. 2001
Danimarka	268	43,3	47,8	9,0	Sorensen ve ark. 2004
Fransa	124	47,6	45,2	7,3	Abbas ve ark. 2004
Almanya	127	55,0	36,0	9,0	Steinhoff ve ark. 2000
Hollanda	414	42,0	44,7	13,3	van der Logt ve ark. 2004
Polonya	142	46,0	41,0	13,0	Whyatt ve ark. 2000
İspanya	198	48,9	44,4	6,6	Rodriguez ve ark. 2005
İsveç	55	54,5	40,0	5,5	Carstensen ve ark. 1999
Türkiye	121	68,6	27,3	4,1	Toruner ve ark. 2001
Türkiye	265	50,6	37,4	12,1	Aynacıoğlu ve ark. 2004
Türkiye	204	44,1	36,3	19,6	Ateş ve ark. 2005
Türkiye	133	58,7	35,3	6,0	Ada ve ark. 2006

Çizelge 1.8. GSTP1 ekzon 5 polimorfizminin diğer toplumlardaki dağılımı

Ülke/İrk	n	ile105İle	ile105Val	Val105Val	Referans
Hindistan	200	52	46	2	Singh ve ark. 2008
Hindistan	200	55,7	37,8	6,5	Pandey ve ark. 2006
Kore	213	62,4	34,3	3,3	Yoon ve ark 2007
Tayvan	116	67	30	3	Watson ve ark. 1998
Suudi Arabistan	160	33,5	53,5	13	Al-Dayel ve ark. 2007
Afrika'lı Amerika'lı	137	35	46	19	Watson ve ark. 1998

Çizelge 1.9. GSTP1 ekzon 6 polimorfizminin Avrupa'da yaşayan beyaz ırk toplumlarındaki dağılımı

Ülke	n	Ala114Ala	Ala114Val	Val114Val	Referans
Danimarka	266	84,2	14,3	1,5	Sorensen ve ark. 2004
İspanya	1032	88,9	8,2	0,5	Garcia-Closas ve ark. 2005
İsveç	55	92,7	7,3	0,0	Carstensen ve ark. 1999
Türkiye	133	85,0	14,3	0,7	Ada ve ark. 2006

Çizelge 1.10. GSTP1 ekzon 6 polimorfizminin diğer toplumlardaki dağılımı

Ülke/İrk	n	Ala114Ala	Ala114Val	Val114Val	Referans
Suudi Arabistan	145	76,3	22,2	1,5	Al-Dayel ve ark 2007
Afrika'lı Amerika'lı	112	95	5	0	Watson ve ark 1998

## **1.6. Çalışmanın Amacı**

GSTP1 geninde gözlenen her iki polimorfizm için de Türk toplumunda yapılmış yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır, yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar ise birbirleri ile çelişki göstermektedirler. Bu çalışmada erkek ve kadın Türk toplumunda GSTP1 ekzon 5 (İle105Val) ve ekzon 6 (Ala114Val) polimorfizmlerinin araştırılması amaçlanmıştır.



## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Kullanılan Gereçler

#### 2.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler

DNA izolasyon kiti (Promega Corporation, ABD)

İzopropanol (Merck, Almanya)

Etanol (Merck, Almanya)

Borik asit (Merck, Almanya)

Tris (AppliChem, Almanya)

EDTA (AppliChem, Almanya)

NaOH (Merck, Almanya)

SYBR Green (Roche, Almanya)

Agaroz (Lonza, ABD)

PCR master mix (Fermentas, Litvanya)

Primerler (IDT, ABD)

PCR marker (Promega Corporation, ABD)

Restriksiyon enzimleri (New England Biolabs, İngiltere)

### **2.1.2. Kullanılan Cihazlar**

-80' lik derin dondurucu (Sjniders Scientific)

-20' lik derin dondurucu (Bosch)

Rotatör (Labinco)

Vortex (Labinco L46)

Mikrosantrifüj (Hermle Z 160 M)

Spektrofotometre (Shimadzu UV-160 A)

Otoklav (Sanyo, MAC-235 EX)

Steril kabin (Bilser)

Thermal cycler (Thermo Hybaid)

pH-metre (Jenway 3320)

Mikrodalga Fırın (Arçelik MD55I)

Mini Elektroforez Tankı (Thermo EC)

Midi Elektroforez Tankı (Thermo EC)

Elektroforez Güç Kaynağı (E-C Apparatus Corp. EC250-90)

Jel görüntüleme sistemi (Vilber-Lourmat, TCP-20-MX)

Isıtıcı blok (Grant Boekel)

## **2.2. Kullanılan Yöntemler**

### **2.2.1. Deney Kurgusu**

Çalışmada, 78 erkek ve 155 kadın olmak üzere çoğunluğu İç Anadolu Bölgesi' nden toplam 233 sağlıklı gönüllüden alınan kan örnekleri ile çalışıldı. Çalışmaya katılan kadınların yaşları 21 ile 84 arasında

değişmekteydi ve yaş ortalamaları  $46 \pm 13$  (ortalama  $\pm$  SH) idi. Erkeklerin yaşları ise 21 ve 71 arasında değişmekte ve ortalamaları ise  $46 \pm 12$  (ortalama  $\pm$  SH) idi. Gönüllülerin onayı alındıktan sonra, dirsek ön yüzü toplardamarlarından bir seferde 2 ml'lik kan örneği araştırma grubumuz içinde bulunan doktor gözetiminde alındı. Sonuçların ayrıntılı bir biçimde değerlendirilebilmesi için her bir bireye ait beslenme, sigara ve kahve alışkanlıkları, geçirdiği hastalıklar ve gerekli diğer bilgileri içeren bilgilendirilmiş gönüllü onay formları ve anket formları dolduruldu (Gönüllü onay formu ve anket ektedir). Bu işlemlerden sonra, örnekler buz içinde laboratuvarımıza getirildi.

### **2.2.2. DNA İzolasyonu**

Kan numuneleri, homojen hale gelene kadar yaklaşık 10 dakika rotatörde çevrilmeye bırakıldı. 1,5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüpüne 900  $\mu$ l Hücre Lizis Solüsyonu konuldu, rotatörde homojen hale gelen kan numunesinden 300  $\mu$ l alınarak bu solüsyonun içine eklendi ve pipetle 4–5 kez karıştırıldı. Hazırlanan karışım oda sıcaklığında 10 dakika rotatörde çevrildi ve 13 000–16 000  $\times$  rpm 'de 20 saniye santrifüj edildi. Dibe çöken beyaz peletin bozulmamasına özen gösterilerek süpernatant kısım tüpten uzaklaştırıldı. Dipte 10–20  $\mu$ l sıvı bırakıldı.

Beyaz kısım (akyuvarlar) dağılana kadar tüp vortekste karıştırıldı. 300  $\mu$ l Nüklei Lizis Solüsyonu eklendi ve akyuvarların parçalanması için iyice

pipetlendi. Bu işlem sonunda oluşan viskoz çözelti üzerine 100 µl protein çöktürücü solüsyon ilave edildi ve protein parçaları görünür hale gelene kadar vortekslendi, 13 000–16 000 × rpm’ de 3 dakika santrifüj edildi ve bu işlem sonunda koyu kahverengi protein çökeleği görünür bir hal aldı.

Süpernatant kısım, içinde 300 µl izopropanol (oda sıcaklığında) bulunan, 1,5 ml’lik yeni steril mikrosantrifüj tüplerine alındı. Solüsyon, elle altüst edilerek, DNA iplik halinde görünene kadar karıştırıldı. 13 000–16 000 × rpm’ de 1 dakika santrifüj işlemi yapıldı ve DNA beyaz pellet halinde dibeye çöktürüldü. DNA’ya zarar vermeden süpernatant kısım, dikkatlice dökülerek veya pipet yardımıyla, tüpten uzaklaştırıldı. Daha sonra oda sıcaklığındaki 300 µl % 70’ lik etanol DNA’ ya eklendi ve tüpün kenarları iyice temizlendi. 13 000–16 000 × rpm’ de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi bittikten sonra, yine DNA’ya zarar vermeden etanol de tüpten, dikkatlice dökülerek veya pipet yardımıyla, uzaklaştırıldı ve yaklaşık 15 dakika tüplerin kurumaması beklendi. Daha sonra 100 µl DNA Rehidratasyon Solüsyonu eklendi. DNA’ lar 1 gece oda sıcaklığında bekletildi ve kullanılmaya kadar –20 °C’ lik buzdolabında saklandı.

### **2.2.3. DNA Safılık ve Miktar Tayini**

DNA’ lar kandan izole edildikten sonra miktarlarının tayini için her bir DNA çözeltisi 1’ e 20 oranında seyreltilti. Hazırlanan seyreltik DNA

çözeltilerinin spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda verdikleri absorbanslar saptanarak aşağıdaki formül yardımıyla içerdikleri DNA miktarı  $\mu\text{g/ml}$  olarak belirlendi.

$$\text{DNA miktarı } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times d \times 1 \times 50$$

Bu formülde;

A<sub>260</sub>: 260 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunan değer,

d: Seyreltme faktörü,

1: Spektrofotometre küvetinin uzunluğu,

50: Sabit değer.

DNA çözeltilerinin saflıkları ise spektrofotometrede 260 nm' de okunan absorbans değerinin 280 nm' de okunan absorbans değerine bölünmesi ile tespit edildi. Buna göre 1,7 ile 2,0 arasındaki değerlere sahip olan DNA' ların yeterli saflıkta izole edildiği saptandı.

#### **2.2.4. GSTP1 İle105Val Mutasyonunun Belirlenmesi**

GSTP1 genindeki İle105Val mutasyonu, PCR ve RFLP yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir (Park ve ark., 1999).

50  $\mu\text{l}$  toplam PCR reaksiyonu karışımı 24  $\mu\text{l}$  PCR master mix( 0,05 u/ $\mu\text{l}$  *Taq* DNA polimeraz, reaksiyon tamponu, 4mM  $\text{MgCl}_2$  , 0,4 mM dNTP karışımı), 24 $\mu\text{l}$  nukleaz içermeyen su, 50' şer pmol GSTP1 primerleri sense-ileri (5'- AAT ACC ATC CTG CGT CAC CT-3') ve antisense-

geri (5'- TGA GGG CAC AAG AAG CCC CTT -3'), ve 700 ng DNA içermektedir.

PCR koşulları, 95° C' de 2 dakikalık 1 PCR döngüsünü takiben, 40 PCR döngüsü erime (94°C 30 saniye), yapışma (58°C 30 saniye) ve sentez (72°C 30 saniye)' dir.

GSTP1 genine ait PCR ürününün (568 bp) %3' lük Nusieve agaroz jelde elektroforezi 2.2.6' da ayrıntılı anlatıldığı gibi yapılmıştır.

### **2.2.5. GSTP1 Ala114Val Mutasyonunun Belirlenmesi**

GSTP1 genindeki Ala114Val mutasyonu, PCR ve RFLP yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir (Park ve ark., 1999).

50 µl toplam PCR reaksiyonu karışımı 24 µl PCR master mix( 0,05 u/µl *Taq* DNA polimeraz, reaksiyon tamponu, 4mM MgCl<sub>2</sub> , 0,4 mM dNTP karışımı), 24µl nukleaz içermeyen su, 50' şer pmol GSTP1 primerleri sense-ileri (5'-ACA GGA TTT GGT ACT AGC CT-3' ) ve antisense-geri (5'-AGT GCC TTC ACA TAG TCA TCC TTG CGC-3' ) ve 300 ng DNA içermektedir.

PCR koşulları, 95° C’ de 2 dakikalık 1 PCR döngüsünü takiben, 40 PCR döngüsü erime (94°C 30 saniye), yapışma (48°C 30 saniye) ve sentez (72°C 30 saniye) ayrıca son olarak 72°C de 10 dakikalık 1 PCR döngüsüdür.

GSTP1 genine ait PCR ürününün (170 bç) %3’ lük Nusieve agaroz jelde elektroforezi 2.2.6’ da ayrıntılı anlatıldığı gibi yapılmıştır.

### **2.2.6. Jel Hazırlanması ve Numunelerin Jele Uygulanması**

Stok TBE (1×10)’ den 30 ml alındı ve toplam hacim 300 ml olacak şekilde distile su ilave edildi. Hazırlanan çözeltilerden 40 ml alınarak erlenmeye konuldu. 1,2 gram % 3’ lük nusieve agaroz jel hassas terazide tartıldı ve üzerine 40 ml’ lik çözelti eklenerek çalkalandı.

Mikrodalga fırında yaklaşık 2 dakika jel berrak bir hal alana kadar ısıtıldı. Daha sonra jel elektroforez kalıbına döküldü ve hemen tarak yerleştirildi. Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çıkartılarak elektroforez tankına yerleştirildi ve geriye kalan 260 ml’ lik TBE tamponu üzerine döküldü. PCR ürünleri, ve marker 13 000–16 000 × rpm’ de santrifüj edildi. Yeni hazırlanan steril 0,5 ml’ lik tüplere 10’ ar µl PCR ürünü (geri kalanı RFLP için kullanılır) ve marker tüpüne de 3 µl marker konuldu, marker’ in üzerine 2 µl yükleme solüsyonu ilave edildi ve 13 000–16 000 × rpm’ de santrifüj edildi. Tüplerdeki ürünler jele uygulandı ve 100 Volt, 0,5 amperlik akımda yaklaşık 65 dakika

yürümleri beklendi. Elektroforez işlemi sonrasında PCR ürünlerinin UV ışığında görünür hale gelmeleri için jel tanktan çıkarıldıktan sonra 1/10.000 oranında seyreltilmiş SYBR Green nükleik asit jel boyası içeren bir kapta düşük hızdaki çalkalayıcı yardımıyla 30 dakika inkübe edildi. Görüntüleme sisteminde çekilen fotoğrafta, GSTP1 Ala114Val genine ait PCR ürünü için 170 bç' de bant GSTP1 İle105Val genine ait PCR ürünü için ise 568 bç' de bant izlendi ve görülmesi halinde RFLP yönteminin uygulamasına geçildi.

### **2.2.7. GSTP1 Ala114Val Mutasyonu İçin RFLP Yöntemi**

Bir tüp için toplam reaksiyon karışımı 5 µl olacak şekilde; 2 µl steril su, 2 µl buffer ve 1 µl 10 U BstUI enzimi konularak bir karışım hazırlandı. 15 µl PCR ürünlerinin üzerine 5'er µl karışım konuldu ve 16 saat 60°C' de kesilmesi beklendi. Kesim işlemi tamamlandıktan sonra jel 2.2.6' da açıklandığı gibi tekrar hazırlandı ve jel görüntüleme sisteminde fotoğrafı çekildi.

Yapılan elektroforetik analiz sonucunda 144 bç' ndeki tek bant Ala114Ala genotipini, 170, 144, bç' lik iki bant Ala114Val genotipini, 170 bç' lik tek bant ise Val114Val genotipini göstermektedir.



### **2.2.8. GSTP1 İle105Val Mutasyonu İçin RFLP Yöntemi**

Bir tüp için toplam reaksiyon karışımı 5 µl olacak şekilde; 2 µl steril su, 2 µl buffer ve 1 µl 10 U BsmA1 enzimi konularak bir karışım hazırlandı. 15 µl PCR ürünlerinin üzerine 5'er µl karışım konuldu ve 16 saat 55°C' de kesilmesi beklendi. Kesim işlemi tamamlandıktan sonra jel 2.2.6'da açıklandığı gibi tekrar hazırlandı ve jel görüntüleme sisteminde fotoğrafı çekildi.

Yapılan elektroforetik analiz sonucunda 305, 138 ve 125 bp' lik üç bant İle105İle genotipini, 305, 222, 138, 125 ve 83 bp' lik beş bant İle105Val genotipini, 222, 138, 125 ve 83 bp' lik dört bant ise Val105Val genotipini göstermektedir.

### **2.3. Kullanılan İstatistiksel Yöntem**

Hesaplanan GSTP1 ekzon 5 ve ekzon 6 genotip frekanslarının Hardy-Weinberg eşitliğine uygunluğunu kontrol etmek için ki-kare testi kullanıldı. Aynı test GSTP1 ekzon 5 ve ekzon 6 genotip frekanslarının kadın ve erkeklerde karşılaştırılması için de kullanıldı. Hesaplamalarda SPSS programının 11.0 sürümü kullanılmıştır.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Çalışma Grubunun Genotip Özellikleri

Çalışmada yer alan 233 sağlıklı gönüllünün GSTP1 genotip özellikleri ve cinsiyetleri Çizelge 3.1.' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışma grubunun GSTP1 genotip özellikleri ve cinsiyetleri

	İsim-Soyisim	Cinsiyet	Ekzon 5	Ekzon 6
1	E. Ö.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
2	S. Y. K.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
3	A. K.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
4	F. D.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
5	H. B.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
6	N. Y.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
7	S. K.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
8	Ç. P.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
9	H. K.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
10	S. T.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
11	M. Ş	kadın	İle/Val	Ala/Ala
12	A. T.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
13	Y. D.	kadın	Val/Val	Ala/Ala
14	F. G.	kadın	Val/Val	Ala/Val
15	Ö. Ş.	kadın	İle/Val	Ala/Val
16	G. O.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
17	S. A.	kadın	İle/Val	Ala/Val
18	E. K.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
19	N. K.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
20	Y. A.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
21	E. A.	erkek	Val/Val	Ala/Ala
22	A. K.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
23	Z. K.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
24	E. K.	erkek	İle/Val	Ala/Ala
25	G. K.	kadın	Val/Val	Ala/Ala
26	O. K.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
27	R. D.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
28	R. A.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
29	H. A.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
30	V. T.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
31	G. G.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
32	F. Ç.	kadın	Val/Val	Ala/Ala
33	F. Y.	erkek	İle/Val	Ala/Ala
34	D. Ş.	kadın	Val/Val	Ala/Ala

35	A. K. D.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
36	D. K.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
37	H. K.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
38	M. T.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
39	A. D.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
40	N. A.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
41	M. Y.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
42	G. A.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
43	Ş. A.	kadın	İle/Val	Val/Val
44	M. G.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
45	N. K. K.	erkek	İle/Val	Ala/Ala
46	A. B.	erkek	İle/Val	Ala/Ala
47	A. Ç.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
48	G. Ç.	kadın	Val/Val	Ala/Ala
49	E. Y.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
50	N. Y.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
51	R. N.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
52	S. S.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
53	F. K.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
54	Z. G.	kadın	Val/Val	Ala/Val
55	F. S.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
56	H. G.	kadın	Val/Val	Ala/Val
57	C. U.	kadın	İle/Val	Ala/Val
58	T. S.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
59	S. O.	kadın	İle/Val	Ala/Val
60	A. S.	kadın	Val/Val	Ala/Val
61	T. K.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
62	S. Y. Y.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
63	F. G.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
64	D. Ö.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
65	E. A.	erkek	İle/Val	Ala/Ala
66	A. F. G.	erkek	İle/Val	Ala/Val
67	Ş. N. K.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
68	A. R. Y.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
69	İ. P.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
70	Y. İ.	erkek	İle/Val	Ala/Val
71	E. G. T.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
72	N. T.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
73	S. İ. Ç.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
74	G. K.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
75	H. Ç.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
76	S. T.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
77	G. E.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
78	H. A.	kadın	İle/Val	Ala/Val
79	N. S. C.	kadın	İle/Val	Ala/Val
80	H. A.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
81	F. T.	erkek	İle/Val	Ala/Ala
82	N. B.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
83	E. T. B.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
84	İ. G.	kadın	İle/İle	Ala/Ala

85	A. S.	erkek	İle/Val	Ala/Ala
86	G. S.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
87	O. B.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
88	H. K.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
89	S. Y.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
90	A. D.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
91	M. A.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
92	T. A.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
93	S. A.	erkek	İle/Val	Ala/Ala
94	N. U.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
95	E. G.	kadın	İle/İle	Ala/Val
96	Y. Ö.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
97	G. C.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
98	G. D.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
99	G. E.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
100	A. İ.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
101	M. Ş. N. I.	erkek	Val/Val	Ala/Val
102	E. K.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
103	A. A.	erkek	İle/Val	Ala/Ala
104	H. E.	erkek	Val/Val	Ala/Ala
105	F. G.	kadın	Val/Val	Ala/Ala
106	R. İ.	erkek	İle/Val	Ala/Ala
107	Y. Ö.	erkek	İle/Val	Ala/Val
108	F. S.	kadın	Val/Val	Ala/Val
109	H. K.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
110	A. K.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
111	Y. Z. S.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
112	K. K.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
113	M. T.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
114	J. B.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
115	N. T.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
116	G. K.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
117	A. T.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
118	K. T.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
119	Z. Ö.	kadın	Val/Val	Ala/Ala
120	S. S.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
121	İ. Y.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
122	N. Ş.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
123	S. M.	kadın	Val/Val	Ala/Val
124	M. T.	erkek	İle/Val	Ala/Ala
125	S. K.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
126	S. Z. M.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
127	R. G.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
128	F. Ç.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
129	N. Ç.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
130	N. E.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
131	H. A.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
132	F. T.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
133	G. D.	kadın	İle/Val	Ala/Val
134	Z. Y.	kadın	İle/İle	Ala/Ala

135	Ü. Ö.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
136	T. K.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
137	R. A.	erkek	İle/Val	Ala/Ala
138	M. G.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
139	M. N. E.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
140	L. Ü.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
141	S. G.	erkek	İle/Val	Ala/Ala
142	B. T.	kadın	Val/Val	Ala/Ala
143	F. D. Ö.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
144	S. E.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
145	S. G.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
146	M. Ö.	erkek	İle/Val	Ala/Ala
147	S. Ö.	kadın	İle/Val	Ala/Val
148	H. Ö.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
149	F. K.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
150	E. K.	erkek	İle/Val	Ala/Val
151	A. B.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
152	M. B.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
153	N. A.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
154	A. Ö.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
155	E. K.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
156	A. B.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
157	S. B.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
158	M. Ö.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
159	Ü. Ü.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
160	M. K.	erkek	İle/Val	Ala/Ala
161	M. K.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
162	A. G. Ç.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
163	B. G.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
164	H. Y.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
165	A. K.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
166	U. Y.	erkek	Val/Val	Ala/Ala
167	S. K.	kadın	Val/Val	Ala/Ala
168	H. K.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
169	F. Ö.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
170	M. İ.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
171	N. İ.	kadın	İle/Val	Ala/Val
172	F. Ö.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
173	Z. Ö.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
174	H. A.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
175	A. K.	kadın	Val/Val	Ala/Val
176	A. Y.	erkek	İle/Val	Ala/Ala
177	K. Y.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
178	A. Ö.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
179	M. K.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
180	E. G.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
181	E. Ö.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
182	F. Ş.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
183	S. M.	erkek	İle/Val	Ala/Ala
184	G. A. K.	kadın	İle/İle	Ala/Ala

185	Y. Y.	erkek	İle/Val	Ala/Ala
186	G. Y.	kadın	Val/Val	Ala/Val
187	C. S. E.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
188	A. M. Ö.	kadın	İle/Val	Val/Val
189	G. Ş.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
190	M. T.	kadın	Val/Val	Val/Val
191	Ö. C. Ü.	kadın	İle/Val	Val/Val
192	M. E.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
193	G. A.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
194	T. S.	kadın	İle/Val	Ala/Val
195	E. A.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
196	E. S.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
197	F. A.	erkek	Val/Val	Ala/Val
198	Y. Ç.	erkek	İle/Val	Ala/Val
199	Z. A.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
200	Ş. A.	erkek	İle/Val	Ala/Val
201	Ö. S.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
202	R. T.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
203	G. Ö.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
204	C. E.	kadın	İle/Val	Ala/Val
205	Ş. T.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
206	E.A.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
207	E. D.	kadın	İle/Val	Ala/Val
208	M. T.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
209	S. S.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
210	A. K.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
211	İ. T.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
212	İ. B.	kadın	Val/Val	Ala/Val
213	B. C. E.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
214	S. S.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
215	V. G.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
216	F. Ü.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
217	N. B.	kadın	İle/Val	Ala/Val
218	D. K.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
219	F. K.	erkek	İle/Val	Ala/Ala
220	T. T.	erkek	İle/Val	Ala/Ala
221	N. Ş.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
222	G. D.	erkek	İle/Val	Ala/Ala
223	S. K.	kadın	İle/Val	Ala/Val
224	Z. B.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
225	M. K.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
226	F. C.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
227	V. K.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
228	M. İ.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
229	A. D. Ü.	kadın	İle/İle	Ala/Ala
230	D. A.	kadın	İle/Val	Ala/Ala
231	A. O. A.	erkek	İle/İle	Ala/Ala
232	S. B.	erkek	İle/Val	Ala/Val
233	E. S.	erkek	İle/Val	Ala/Ala

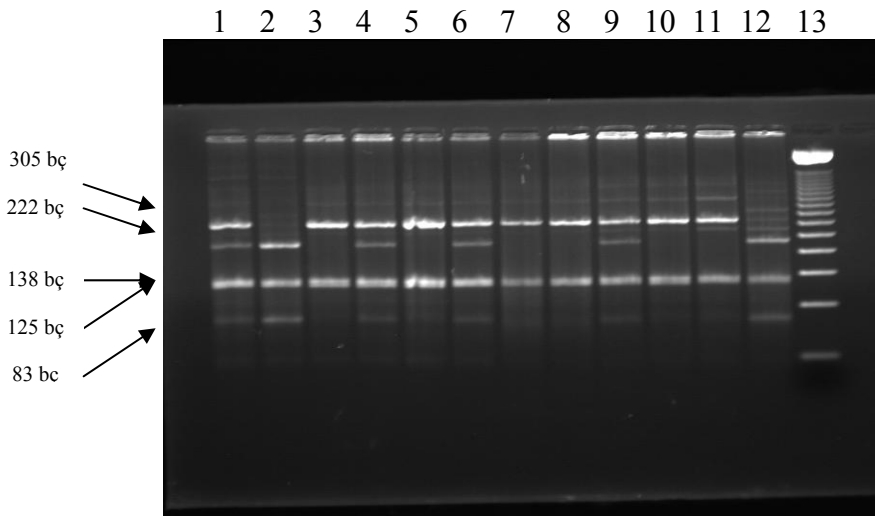
### 3.2. GSTP1 Ekzon 5 Polimorfizmi Dağılımı

Çizelge 3.2.' de görüldüğü gibi; çalışmaya katılan 233 sağlıklı gönüllüden 126' sı (%54,1) İle105İle genotipine, 83' ü (%35,6) İle105Val genotipine ve 24' ü (%10,3) Val105Val genotipine sahiptir.

Çizelge 3.2. GSTP1 ekzon 5 polimorfizmi dağılımı

GENOTİP	n (233)	GÖZLENEN FREKANS(%)	BEKLENEN FREKANS(%) (Hardy- Weinberg Eşitliği'ne göre)( $\chi^2=3,277$ )
İle105İle	126	54,1	51,7
İle105Val	83	35,6	40,4
Val105Val	24	10,3	7,9

RFLP işlemi sonucunda yapılan jel elektroforezinde elde edilen sonuçlar şekil 3.1' de gösterilmiştir. Buna göre 1., 4., 6. ve 9. sütunlardaki 83, 125, 138, 222 ve 305 bç' lik 5 bant İle105Val genotipini, 2., ve 12. sütunlardaki 83, 125, 138 ve 222 bç' lik 4 bant Val105Val genotipini, 3., 5., 7., 8., 10., ve 11. sütunlardaki 125 138 ve 305 bç'lik 3 bant ise İle105İle genotipini göstermektedir. 13. sütunda ise 50 bç' lik marker bulunmaktadır.



Şekil 3.1. GSTP1 İle105Val genotipine ait jel elektroforez sonucu

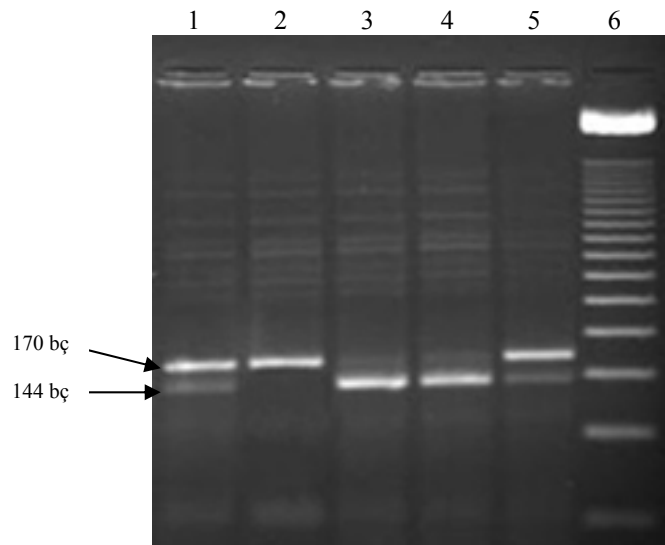
### 3.3. GSTP1 Ekzon 6 Polimorfizmi Dağılımı

Çizelge 3.3.' de görüldüğü gibi; çalışmaya katılan 233 sağlıklı gönüllüden 196'sı (%84,1) Ala114Ala genotipine, 33' ü (%14,2) Ala114Val genotipine ve 4' ü (%1,7) Val114Val genotipine sahiptir.

Çizelge 3.3. GSTP1 ekzon 6 polimorfizmi dağılımı

GENOTİP	n (233)	GÖZLENEN FREKANS(%)	BEKLENEN FREKANS(%) (Hardy- Weinberg Eşitliği'ne göre)( $x^2=3,161$ )
Ala114Ala	196	84,1	83,1
Ala114Val	33	14,2	16,1
Val114Val	4	1,7	0,8

RFLP işlemi sonucunda yapılan jel elektroforezinde elde edilen sonuçlar şekil 3.2' de gösterilmiştir. Buna göre 3. ve 4. sütunlardaki 144 bç' lik tek bant Ala114Ala genotipini, 1. ve 5. sütunlardaki 170 ve 144 bç' lik iki bant Ala114Val genotipini ve 2. sütündeki 170 bç' lik tek bant ise Val114Val genotipi göstermektedir. 6. sütunda ise 50 bç' lik marker bulunmaktadır.



Şekil 3.2. GSTP1 Ala114Val genotipine ait jel elektroforez sonucu



Kadınlarda ve erkeklerde GSTP1' in her iki polimorfizmi için de ayrı ayrı yapılan incelemelerde cinsiyetin polimorfizm frekansları açısından anlamlı bir faktör olmadığı belirlenmiştir (Ekzon 5 için  $p= 0,212$ , ekzon 6 için  $p= 0.241$ ). Erkek ve kadınlarda GSTP1 polimorfizmi dağılımları Çizelge 3.4.' de gösterilmiştir

Çizelge 3.4. GSTP1 polimorfizmlerinin cinsiyete göre dağılımları

	Ekzon5(n,%)			Ekzon6(n,%)		
	<i>İle105İle</i>	<i>İle105Val</i>	<i>Val105Val</i>	<i>Ala114Ala</i>	<i>Ala114Val</i>	<i>Val114Val</i>
<b>Erkek</b>	44(56,4)	29(37,2)	5(6,4)	69(88,5)	9(11,5)	0(0,0)
<b>Kadın</b>	82(52,9)	54(34,8)	19(12,3)	127(81,9)	24(15,5)	4(2,6)

GSTP1 geninin her iki ekzonunda sahip olabileceği farklı genotiplerin kombinasyonları, sayıları ve bu kombinasyonların çalışılan gruptaki dağılımları Çizelge 3.5.' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. Farklı genotip kombinasyonlarının sayısı ve frekansları

Genotip	Sayı	Frekans(%)
İle/İle , Ala/Ala	125	53,6
İle/İle , Ala/Val	1	0,4
İle/İle , Val/Val	0	0
İle/Val , Ala/Ala	59	25,3
İle/Val , Ala/Val	19	8,1
İle/Val , Val/Val	3	1,3
Val/Val , Ala/Ala	12	5,3
Val/Val , Ala/Val	13	5,6
Val/Val , Val/Val	1	0,4

#### 4. TARTIŞMA

GSTP1 sayısız karsinogenik bileşimin inaktivasyonunda rol alan GST süper ailesinin bir üyesidir. Genetik polimorfizmlere bağlı olarak enzimde oluşan fonksiyon değişikliği bu enzimin karsinogenleri inaktive etme kapasitesini değiştirebilmekte ve kanser riskini arttırabilmektedir. Çeşitli araştırmalar GSTP1 ekzon 5 (İle105Val) ve ekzon 6 (Ala114Val) genetik polimorfizmlerinin enzim aktivitesini azalttığını göstermiştir (Zimniak ve ark., 1994; Ali-Osman ve ark., 1997; Watson ve ark., 1998). Bu nedenle bu varyant GSTP1 genotipine sahip GST enzim aktivitesi düşük bireylerin, karsinogenik ve mutajenik bileşikleri inaktive etme kapasitelerinin azalmasına bağlı olarak, akciğer gibi farklı kanserlere yakalanma riskleri daha yüksek olabilmektedir (Wang ve ark., 2003).

Son zamanlarda ilaç rezistans mekanizmaları üzerindeki çalışmalar oldukça yoğunluk kazanmış ve kanser hücrelerinin kemorezistansında çeşitli faktörlerin rol oynadığı saptanmıştır. GST' ler toksik ve karsinogenik elektrofilik moleküllerin glutatyon ile konjugasyonunu katalizleyerek hücrel makromolekülleri hasarlardan korurlar (Boyer ve Kenney, 1985). Artan veriler GST' lerin çeşitli kemoterapötik ilaçların sitotoksik etkisini de belirlediğini göstermektedir (Nakagawa ve ark., 1988, Hoban ve ark., 1992). Ayrıca bu enzimlerin polimorfik oluşlarının, hastaların kemoterapiye yanıtlarını ve sağ kalım sürelerini etkileyebildiği gösterilmektedir. Bu işlevi kemoterapötik ilaçların inaktivasyonunu yavaşlatarak yapabildiği gibi, eksikliği halinde ilaç tedavisinde yüksek doza bağlı gelişen toksisitesini arttırarak, ani ölümlere neden olması

(Sweeney ark., 2003) veya buna bağlı olarak oluşabilen toksik yan etkileri azaltma adına doz kısıtlaması veya ilacın uygulamasındaki gecikmeler sonucu etkisiz tedaviye neden olarak gösterebilmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar da meme (Sweeney ve ark., 2000), lösemi (Allan ve ark., 2001), kolon (Stoehlmacher ve ark., 2002) ve akciğer (Yang ve ark., 2002; Lu ve ark., 2006; Hançer, 2006) kanserlerinde GSTP1 polimorfizmlerinin sağ kalım üzerinde olumlu etkileri olduğu bulunmuştur.

Dolayısıyla gerek toksik bileşikleri metabolize etme yeteneğindeki dūřuřler nedeni ile çeşitli kanser tūrlerine yakalanma riskinde değişikliklere neden olması, ve gerekse kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçları metabolize etme yeteneğindeki değişiklikler nedeni ile tedaviye karşı alınan yanıtı ve saę kalım sūrelerini etkilemeleri, GSTP1 gen polimorfizmleri üzerinde yapılan çalışmaları önemli kılmakta ve toplumlardaki dağılımlarının incelenmesi gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır.

Tūrkiye’de İle105Val polimorfizmi ile ilgili yapılan çalışmalar, hem az sayıda hem de kendi ilerinde eliřkilidirler. 233 sağlıklı gönüllūde yapılan bu çalışmada; GSTP1 ekzon 5 polimorfizm frekansları, İle105İle için %54,1; İle105Val için %35,6 ve Val105Val için %10,3 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar Aynacıoğlu ve ark.’nın (2004) ulaşmış olduğu sonuçlarla benzerlik gōstermekte ancak Toruner ve ark.(2001), Ateř ve ark.(2005) ve Ada ve ark.’nın (2007) sonuçları ile örtüşmemektedir.

Türk toplumunda yapılan çalışmalarda bu polimorfizmde saptanan farklılıkların nedeni/leri konusunda bu aşamada bir şey söylemek zordur. Ancak bunun nedenleri arasında çalışılan grupların farklı etnik grupları içermesi, kullanılan yöntemin farklılığı, ve/veya örnek sayılarının farklı ve yetersiz oluşu sayılabilir. Ancak bunlar da ayrıntılı irdelendiğinde (Ada ve ark., 2007) farklılığın nedenleri konusunda tam aydınlanma sağlanamamaktadır. Dolayısıyla görünen o ki resim oldukça karışıktır. Benzer etnik orijinli ve daha yüksek örnek sayısı ile yapılacak çalışmalar daha sağlıklı sonuç verebilir. Ancak bu çalışmada irdelenen bireylerdeki genotiplerin saptanan ve gözlenen sıklıklarının (Hardy-Weinberg eşitliğine uyması) benzer olması bu topluluğun etnik açıdan homojen olduğu izlenimini vermektedir. Bugün için bu veriler Türk toplumunun GSTP1 Val105Val sıklığının, diğer Avrupa beyaz ırkı toplumlarına benzer olduğunu göstermektedir. Bu genin Türk toplumundaki homozigot mutant sıklığı Avrupa dışındaki toplumlarla karşılaştırıldığında ise Hindistan, Kore ve Tayvan'dan daha yüksek, Suudi Arabistan'a yakın ancak Afrikalı Amerikan (siyah ırkı) toplumundan biraz daha düşük olduğu görülmektedir.

Yine bu çalışmada GSTP1 ekzon 6 polimorfizm frekansları, Ala114Ala için %84,1; Ala114Val için %14,2 ve Val114Val için %1,7 olarak saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar ülkemizde daha önce ekzon 6 ile ilgili erkeklerde yapılmış tek çalışma olan Ada ve ark. (2007)'nin yaptıkları çalışmada elde ettikleri sonuçlarla uyum göstermektedir. Bu çalışmada da gösterildiği gibi cinsiyetin polimorfik dağılıma etkisi yoktur. Bu gen polimorfizminin dağılımı oldukça az sayıda toplumda çalışılmıştır (Çizelge 1.9 ve Çizelge 1.10). Bu konudaki çalışmalar 3

ayrı Avrupa beyaz ırkı (Danimarka, İspanya ve İsveç) toplumunda ve Suudi Arabistan ile Afrikalı Amerikan (siyah ırktan) toplumlarında yapılmıştır. Bu çalışmada elde edilen homozigot mutant gen sıklıklarının Avrupa, Suudi Arabistan ve Afrikalı Amerikan toplumlarında gözlenen sıklıktan farklı olmadığını da göstermektedir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışma:

- GSTP1 gen polimorfizmi sıklıklarının genelde Avrupa Beyaz ırkı toplumlarındaki sıklıklardan farklı olmadığını,
- GSTP1Ile105Val geninin Türk toplumundaki homozigot mutant sıklığı Avrupa dışındaki toplumlarla karşılaştırıldığında Hindistan, Kore ve Tayvan'dan daha yüksek ve Suudi Arabistana yakın ancak Afrikalı Amerikan (siyah ırktan) toplumundan biraz daha düşük olduğunu, ve
- GSTP1Ala114Val geninin Türk toplumundaki homozigot mutant gen sıklığı Avrupa dışındaki toplumlarla karşılaştırıldığında Suudi Arabistan ve Afrikalı Amerikan toplumlarından farklı olmadığını ortaya koymaktadır.

Öneriler;

Bu polimorfizmlerin incelenmesi, toplumda çeşitli kimyasallara maruziyette ve kanser gibi çeşitli hastalıklarda olası riskleri veya koruyuculukları irdelenerek duyarlı bireylerin saptanmasına ve özellikle onkoloji kliniklerinde etkili bireysel tedavinin yapılmasına katkı sağlayabilir.

## ÖZET

### Türk Toplumunda GSTP1 Gen Polimorfizminin İncelenmesi

Glutasyon S-transferazlardan biri olan GSTP1, ksenobiyotik metabolizmasında ve ilaç rezistansında rol oynamaktadır. GSTP1' in İle105Val ve Ala114Val gibi polimorfizmleri enzim kodlanma fonksiyonunda değişikliklere ve böylelikle kişiler arasında çeşitli kanser türlerinde ve kemoterapiye yanıtta farklılıklar meydana getirmektedir. Türk popülasyonunda bu polimorfizmlere ilişkin çalışmalar az sayıda olup bazıları çelişkilidir. Böylelikle Türk popülasyonunda GSTP1 gen polimorfizmlerinin frekanslarını belirlemeyi amaçladık. GSTP1 polimorfizm frekansları 233 sağlıklı gönüllüden alından kan örneklerinden izole edilen DNA' larda yürütülen polimeraz zincir reaksiyonu ve restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemleri kullanılarak saptandı.

Ekzon 5 polimorfizm frekansları, İle105İle için %54,1; İle105Val için %35,6 ve Val105Val için %10,3 olarak; GSTP1 ekzon 6 polimorfizm frekansları ise, Ala114Ala için %84,1; Ala114Val için %14,2 ve Val114Val için %1,7 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar Türk popülasyonunda daha önce yapılmış bazı çalışmalarla uyum, Avrupa beyaz ırk toplumlarında yapılmış çalışmalardan bazılarıyla benzerlik göstermektedir. Bununla beraber bu çalışmada elde edilen ekzon 5 polimorfizmi frekansı sonuçları, Hindistan Kore ve Tayvan gibi doğu Asya toplumlarından farklı(azdır).

**Anahtar sözcükler:** Kanser, Genetik Polimorfizm, Glutasyon S-transferaz, GSTP1, Türk Popülasyonu

## SUMMARY

### **The investigation of the GSTP1 gene polymorphism in a Turkish population**

GSTP1, one of Glutathione S-transferases, is involved in xenobiotic metabolism and drug resistance. Polymorphism of GSTP1 Ile105 Val and Ala114 Val may account for the alteration function of the coding enzyme and thus cause interindividual differences in certain types of cancers and response to chemotherapy. Studies regarding these polymorphisms in Turkish population is rare and some of them are contradictory. Thus, we aimed to clarify the frequencies of GSTP1 gene polymorphisms in a Turkish population. The frequencies of GSTP1 polymorphisms were determined by using the polymerase chain-reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in the DNAs isolated from the blood samples of 233 healthy volunteers.

The frequencies of GSTP1 exon 5 polymorphism were Ile105Ile: 54,1%, Ile105Val: 34,3%, Val105Val: 11,6% and GSTP1 exon6 polymorphism were Ala114Ala: %84,1, Ala114Val: %14,2 and Val114Val: %1,7. These results are consistent with some of the previous studies performed in Turkish population and similar to those of European Caucasian populations. However the results of this study regarding the frequency of exon 5 polymorphism is different (lower) from east asia countries such as India, Korea and Taiwan .

**Key Words:** Cancer, genetic polymorphism, Glutathione S-transferase, GSTP1, Turkish population.



## KAYNAKLAR

- ABBAS, A., DELVINQUIERE, K., LECHEVREL, M., LEBAILLY, P., GAUDUCHON, P., LAUNOY, G., SÍCHEL, F. (2004). GSTM1, GSTT1, GSTP1 and CYP1A1 genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer in a French population: different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* **10**: 3389-93.
- ADA, A.O., SUZEN, H.S., ISCAN, M. (2007). Polymorphisms of microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase P1 in a male Turkish population. *Int. J. Of Toxicology*, **26**: 41-46.
- AL-DAYEL, F., AL-RASHEED, M., IBRAHIM, M., BU, R.,BAVI, P., ABUBAKER, J., AL-JOMAH, N., MOHAMMED, G., H., MOORJI, A., UDDIN, S., SIRAJ, A., K., AL-KURAYA,K.(2008). Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP1A1, GSTT, GSTP contribute to the development of diffuse large B-cell lymphoma risk in the Saudi Arabian population. *Leukemia & Lymphoma*, **49(1)**:122-129.
- ALÍ-OSMAN, F., AKANDE, O., ANTOUN, G., MAO, J., BUOLAMWINI, J. (1997). Molecular cloning, characterization and expression in Escherichia coli of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. *J.Biol. Chem.*, **15**: 10004-10012.
- ALLAN, J.M., WILD, C.P., ROLLINSON, S., WILLETT, E.V., MOORMAN, A.V., DOVEY, G.J. (2001). Polymorphism in glutathione S-transferase P1 is associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukemia. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **98**: 11592–11597.
- ANDERSSON, C., MOSIALOU, E., WEINANDER, R., AND MORGENSTERN, R. (1994). Enzymology of microsomal glutathioneS-transferase. *Adv. pharmacol.* **27**: 19-35.
- ARAI, T., YASUDA, Y., TAKAYA, T., HAYAKAEA, K., TOSHIMA, S., SHIBUYA, C., KASHIKI, Y., YOSHIMI, N., SHIBAYAMA, M. (2000). Immunohistochemical expression of glutathion s-transferase pi in untreated primary non small cell lung cancer. *Cancer detect. Prev.*, **24**: 252-257.
- ARMSTRONG, R.N. (1997). Structure, catalytic mechanism and evolution of the glutathione transferases. *Chem.Res.Toxicol.* **10**: 2-18.
- ATES, N.A., TAMER, L., ATES, C., ERCAN, B., ELİPEK, T., OCAL, K., CAMDEVİREN, H. (2005). Glutathione S-transferase M1, T1, P1 genotypes and risk for development of colorectal cancer. *Biochem. Genet.* **43**: 149-163.

- AYNACIOGLU, A.S., NACAĞ, M., FİLİZ, A., EKİNCİ, E., ROOTS, I. (2004). Protective role of glutathione S-transferase P1 (GSTP1) Val105Val genotype in patients with bronchial asthma. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **57**: 213-217.
- BAI, F., NAKANISHI, Y., KAWASAKI, M., TAKAYAMA, K., YATSUNAMI, J., PEI, XH., TSURUTA, N., WAKAMATSU, K., HARA, N. (1996). Immunohistochemical expression of glutathione S-transferase -Pi can predict chemotherapy response in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* **78**: 416-421.
- BAN, N., TAKAHASHI, Y., TAKAYAMA, T., KURA, T., KATAHIRA, T., SAKAMAKI, S., NIITSU, Y. (1996). Transfection of glutathione S-transferase (GST)-pi antisense complementary DNA increases the sensitivity of colon cancer cell line to adriamycin, cisplatin, melphalan and etoposide. *Cancer res.*, **56**: 3577-3582.
- BOKU, N., CHIN, K., HOSOKAWA, A., OHOTSU, H., TAJIRI, S., YASHIDA, T., YAMATA, H., KONDO, K., SHIRAO, D., SAITO, T., HASEBE, K., MUKAI, S., SEKI, H., SAITO, P.G. (1998). Biological markers as a predictor for response and prognosis of unresectable gastric cancer patients treated with 5-fluorouracil and cisplatin. *Clin cancer res.*, **4**: 1469-1474.
- BOYER, T.D., KENNEY, W.C. (1985). Preparation, characterization and properties of glutathione S-transferases. In: *Biochemical Pharmacology and Toxicology*, Eds Vessey ZD, John Wiley & Sons, New York.
- CANTFORD, J., V., GIEGELEN, J. (1975) Organ specificity of aryl hydrocarbon hydroxylase induction by cigarette smoking in rats and mice. *Biol pharm* **24**: 1253-56.
- CARSTENSEN, U., HOU, S. M., ALEXANDRIE, A. K., HOGSTEDT, B., TAGESSON, C., WARHOLM, M., RANNUG, A., LAMBERT, B., AXMON, A., HAGMAR L. (1999). Influence of genetic polymorphisms of biotransformation enzymes on gene mutations, strand breaks of deoxyribonucleic acid, and micronuclei in mononuclear blood cells and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine in potroom workers exposed to polyaromatic hydrocarbons. *Scand J Work Environ Health*, **25**: 351-60.
- CASARETT AND DOULL' S TOXICOLOGY, (1991)
- CHENG, X., KIGAWA, J., MINAGAWA, Y., KONAMORI, Y., ITAMACHI, H., OKADA, M., TERAOKA, N. (1997). Glutathione S-transferase pi expression and glutathione concentration in ovarian carcinoma before and after chemotherapy. *Cancer*, **79**: 521-527.

- COLES, B., YANG, M., LANG, N.P., KADLUBAR, F.F. (2000). Expression of hGSTP1 alleles in human lung and catalytic activity of the native protein variants towards 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, 4-vinylpyridine and (+)-anti benzo(a)pyrene-7,8-diol-9,10-oxide. *Cancer Letters*, **156**: 167-175.
- D'INCALCI, M., BONFANTI, M., PIFFERI, A., MASCELLANI, E., TAGLIABUE, G., BERGER, D., FIEBIG, H.H. (1998). The antitumor activity of alkylating agents is not correlated with the levels of glutathione, glutathione transferase and O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase of human tumor xenografts. *Eur. J. Cancer*, **34**: 1749-1755.
- DEBES, J.D., YOKOMIZO, A., McDONNELL, S.K., HEBBRING, S.J., CHRISTENSEN, G.B., CUNNINGHAM, J.M., JACOBSEN, S.J., TINDALL, D.J., LIU, W., SCHAID, D.J., THIBODEAU, S.N. (2004). Glutathione S-transferase P1 polymorphism I105V in familial and sporadic prostatic cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **155**: 82-86.
- EATON, D.L. AND BAMMLER, T.K. (1999). Concise review of glutathione S-transferase and their significance to toxicology. *Toxicological sciences*, **49**: 156-164
- FENGXI SU, M.D., XIAOGU HU, M.D., WEIJUAN JIA, M.D., CHANG GANG, M.D., ERWEI SONG, M.D., Ph.D., PETER HAMAR, MD., Ph.D. (2003). Glutathione S-transferase pi indicates chemotherapy resistance in breast cancer. *Journal of surgical research*, **113**: 102-108.
- GARCÍA-CLOSAS, M., MALATS, N., SILVERMAN, D., DOSEMECÍ, M., KOGEVINAS, M., HEIN, D. W., TARDON, A., SERRA, C., CARRATO, A., GARCÍA-CLOSAS, R., LLORETA, J., CASTANO-VINYALS, G., YEAGER, M., WELCH, R., CHANOCK, S., CHATTERJEE, N., WACHOLDER, S., SAMANIC, C., TORA, M., FERNANDEZ, F., REAL, F.X., ROTHMAN, N. (2005). NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet*. **366**: 649-59.
- GARTE, S., GASPARÍ, L., ALEXANDRIE, A. K., AMBROSONE, C., AUTRUP, H., AUTRUP, J. L., BARANOVA, H., BATHUM, L., BENHAMOU, S., BOFFETTA, P., BOUCHARDY, C., BRESKVAR, K., BROCKMOLLER, J., CASCORBI, I., CLAPPER, M.L., COUTELLE, C., DALY, A., DELL'OMO, M., DOLZAN, V., DRESLER, C. M., FRYER, A., HAUGEN, A., HEIN, D. W., HILDESHEIM, A., HIRVONEN, A., HSIEH, L. L., INGELMAN-SUNDBERG, M., KALINA, I., KANG, D., KIHARA, M., KIYOHARA, C., KREMERS, P., LAZARUS, P., LE MARCHAND, L., LECHNER, M. C., VAN LIESHOUT, E. M., RESA, I., LONDON, S., MANNÍ, J. J., MAUGARD, C. M., MORITA, S., NAZAR-STEWART, V., NODA, K., ODA, Y., PARL, F. F., PASTORELLI, R., PERSSON, I., PETERS, W. H., RANNUG, A., REBBECK, T., RÍSCH, A., ROELANDT, L., ROMKES, M., RYBERG, D., SALAGOVIC, J., SCHOKET, B., SEIDEGARD, J., SHIELDS,

- P. G., SİM, E., SİNNET, D., STRANGE, R. C., STUCKER, I., SUGİMURA, H., TO-FÍGUERAS, J., VİNEİS, P., YU, M. C., TAİOLİ, E. (2001). Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev.* **10**: 1239-48.
- GOTO, S., IEDA, T., CHO, S., OKA, M., KOHNO, S., KONDO, T. (1999). Overexpression of glutathione S-transferase pi encahnces the adduct formation of cisplatin with glutathione in human cancer cells. *Free radic res.*, **31**: 549-558.
- GULICK, A.M., FAHL, W.E. (1995) Mammalian glutathione S-transferase: regulation of an enzyme system to achieve chemotherapeutic efficacy. *Pharmacol. Ther.*, **66** : 237-257
- GUTHENBERG, C., AKORFELDT, K., MANNERVICK, B. (1979). Purification of glutathiobe S-transferase from human placenta. *Acta chem. Scand. Ser. B*, **33**: 595-596
- HANÇER, F., Akciğer kanserinde metabolik polimorfizmin(GSTP1 Ala114Val) ilaç rezistansındaki rolü. Yüksek lisans tezi.
- HARRIES, L.W., STUBBINS, M.J., FORMAN, D., HOWARD, G.C., WOLF, C.R. (1997). Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-tranferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*, **18**: 641-644.
- 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 supergen family: regulation of GST and contribution of izoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit rev. Biochem. Mol. Biol.*, **30**:445-600.
- HIDA, T., KUWABARA, M., ARIYASHI, Y., TAKAHASHI, T., SUGIURA, T., HASODA, K., NIITSU, Y., UEDA, R. (1994). Serum glutathione S-transferase-pi level as a tumor marker for non-small cell lung cancer.potential predictive value in chemotherapeutic response. *Cancer*, **73**:1377-1382.
- HOBAN PR, ROBSON CN, DAVIES SM, HALL AG, CATTAN RA, HICKSON ID (1992) Reduced topoisomerase II and elevated alpha class glutathione S-transferase expression in a multidrug resistant CHO cell line highly cross-resistant to mitomycin C. *Biochem Pharmacol* **43**: 685- 693
- HOWIE AF, FORRESTER LM, GLANCEY MJ, SCHLAGER JJ, POWIS G, BECKETT GJ (1990) Glutathione S-transferase and glutathione peroxidase expression in normal and tumor human tissues. *Carcinogenesis* **11**: 451-458.

- INOUE, T., ISHIDA, T., SUGIOI K., MAEHARA, Y., SUGIMACHI, K. (1995). Glutathione S-transferase pi is a powerful indicator in chemotherapy of human lung squamous-cell carcinoma. *Respiration*, **62**: 223.
- IVASCHENKO, E., SIDELEVA, G., BARANOV, S. (2002). Glutathione S-transferase micro and theta gene polymorphisms as new risk factors of atopic bronchial asthma. *J. Mol. Med.*, **80**: 39-43.
- JAKOBSSON, P.J., MANCINI, J.A., AND FORD-HUTCHINSON, A.W. (1996). Identification and characterization of a novel human microsomal glutathione S-transferase with leukotriene C4 synthase activity and significant sequence identity to 5-lipoxygenase-activating protein and leukotriene C4 synthase. *J. Biol. Chem.* **271**: 22203-22210.
- JACOBY, W.B. (1980). Glutathione S-transferases: an overview enzymatic basis of detoxication. *Vol 1 and 2 Academic Press New York*
- JIAO, L., BONDY, M.L., HASSAN, M.M., CHANG, D.Z., ABBRUZZESE, J.L., EVANS, D.B., SMOLENSKY, M.H., LI, D. (2007). Glutathione S-transferase gene polymorphisms and risk and survival of pancreatic cancer. *Cancer*, **109(5)**: 840-848.
- JOHANSSON, A.S., STENBERG, G., WIDERSTEN, M., MANNERVIK, B. (1998). Structure-activity relationships and thermal stability of human glutathione transferase P1-1 governed by the H-site residue 105. *J. Mol. Biol.*, **278**: 687-698.
- KUNAK, C.S. (2005). Akciğer kanserinde metabolik polimorfizmin ilaç rezistansındaki rolü. Doktora tezi.
- LEWIS, S.J., CHERRY, N.M., NIVEN, R., BARBER, P.V., POVEY, A.C. (2002). GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms and lung cancer risk. *Cancer Letters*, **180**: 165-171.
- LIANG, G., PU, Y., YIN, L. (2005). Rapid detection of single nucleotide polymorphisms related with lung cancer susceptibility of Chinese population. *Cancer Letters*, **223**: 265-274
- LU, C., SPITZ, M.R., ZHAO, H., DONG, Q., TRUONG, M., CHANG, J.Y., BLUMENSCHEN, G.R., HONG, W.K., WU, X. (2006). Association between glutathione S-transferase P polymorphism and survival in patients with advanced nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*, **106**: 441-447.
- MANNERVIK, B., AWASTHI, Y.C., BOARD, P.G., HAYES, J.D., DI ILIO, C., KETTERER, B., LISTOWSKY, I., MORGENSTERN, R., MURAMATSU, M., PEARSON W.R., PICKETT, C.B., SATO, K., WIDERSTEN, M., WOLF.

- C.R. (1992). Nomenclature for human glutathione S-transferases. *Biochem. J.*, **282**: 305-306.
- MATTEY , D.L., HUTICNSON, D., DAWES, P.T. (2002). Smoking and disease severity in rhematoid arthritis: association with polymorphism at the glutathione S-transferase M1 locus . *Arthritis Rheum*, **46**: 640-646.
- MILLER S.A., DYKES D.D., POLEYSKY H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.*, **16**: 1215-18.
- MOLDEUS J.A.,FAÏRCHILD C.R. , MADDEN M.J.(1989). Expression of anionic glutathione S-transferase and P-glycoprotein genes in human tissues and tumors. *Cancer res.* **49**:1422-1428.
- NAKAGAWA, K., YOKOTA, J., WADA, M., SASAKI, Y., SAKAI, M., MURAMATSU,M.Ī TERASAKO, T., TSUNOKAWA, Y., TERADA, M., SAIJO, N. (1988) levels of glutathione S-transferase p mRNA in human lung cancer cell lines correlate with the resistance to cisplatin and carboplatin. *Jpn. J. Cancer res.*, **79**: 301-304.
- OGURI, T., FUJIMARA, Y., KATOH, O., DAGAI H., ISHIKAWAI N., FUJITAKA, K., YAMASAKI, M., YOKOZAKI, M., ISOBE, T., ISHIAKA, S., YAMAKIDO, M. (2000). Glutathione S-transefrase-pi gene expression and platinum drug exposure in human lung cancer. *Cancer letters*, **156**: 93-99.
- OKUYAMA, T., MAEGAHARA, Y., ENDO, K., BABA , H., ADECHI, Y., KUWANO, M. (1994). Expressionof glutathione S-transferase pi and sensitivity of human gastric cancer cells to cisplatin. *Cancer*, **74**: 1230-1236.
- PANDEY, S., N., JAIN, M., NIGAM, P., CHOUDHURI, G., MITTAL, B. (2006). Genetic polymorphisms in GSTM1, GSTT1, GSTP1, GSTM3 and the susceptibility to gallbladder cancer in North India. *Biomarkers*, **11(3)**: 250-261.
- PARK, J. Y., SCHANTZ, S. P., STERN, J. C., KAUR, T., LAZARUS, P. (1999). Association between glutathione S-transferase pi genetic polymorphisms and oral cancer risk. *Pharmacogenetics.* **9**: 497-504.
- PEMPLE, S. E., WARDLE, A. F., AND TAYLOR, J. B. (1996). Glutathione S-transferase calass kapa: characterization by cloning of ratmitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochem. J.* **319**: 749-754.
- PETERS, W.H. (1988). Purification and partial characterization of human intestinal glutathione S-transferases. *Biochem. Pharmacol.*, **37**:2288-2291.
- REED D.J. FARRIS M.W.(1984). Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol. Rev.*,**36**:255-230.

- RISCH, A., WIKMAN, H., THIEL, S., SCHMEZER, P., EDLER, L., DRINGS, P. ET. AL. (2001). Glutathione S-transferase M1, M3, T1 and P1 polymorphisms and susceptibility to nonsmall cell lung cancer subtypes and hamatomas. *Pharmacogenetics*, **11**: 757-764.
- RODRÍGUEZ, F., DE LA ROZA, C., JARDÍ, R., SCHAPER, M., VIDAL, R., MÍRAVÍTLES, M. (2005). Glutathione S-transferase P1 and lung function in patients with alpha1-antitrypsin deficiency and COPD. *Chest*. **127**:1537-43.
- RYBERG, D., SKAUG, V., HEWER, A., PHILIPS, D.H., HARRIES, L.W., WOLF, C.R., OGREID, D., ULVIK, A., VU, P., HAUGEN, A. (1997). Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis*, **18**: 1285-1289.
- SAARIKOSKI, S.T., VOHO, A., REINIKAINEN, M., ANTILLA, S., KARJALAINEN, A., MALAVEILLE, C., VAINIO, H., PUSIAMEN, K.H., HIRVONEN, A. (1998). Combined effect polymorphic GST genes on individual susceptibility to lung cancer. *Ind. J. Cancer*, **77**: 516-521.
- SARMANOVA, J., BENESOVA, K., GUT, I., NEDELICHEVA-KRISTENSEN, V., TYNKOVA, L., SOUCEK, P. (2001). Genetic polymorphisms of biotransformation enzymes in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Hum Mol Genet*. **10**: 1265-73.
- SHEA, T.C., KELLEY, S.L., HENNER, W.D. (1988) Identification of an anionic form glutathione transferase present in many human tumors and human tumor cell lines. *Cancer res.*, **48**: 527-533.
- SHEN, H., KAUVAR, L., TEW, K.D. (1997). Importance of glutathione and associated enzymes in drug response. *Oncol. Res.*, **9**: 253-302.
- SHEPARD, T.F., PLATZ, E.A., KANTOFF, P.W., NELSON, W.G., FSAACS, W.B., FREIJE, D., FEBBO, P.G., STAMPFER, M.J., GIOVONNUCCI, E. (2000). No association between the I105V polymorphism of the glutathione S-transferase P1 gene (GSTP1) and prostate cancer risk: a prospective study. *Cancer Epidemiol, Biomarkers Prev.*, **9**: 1267-1268.
- SHIGA, H., HEATH, E.I., RASMUSSEN, A.A., TROCK, B., JOHNSTON, P.G., FORASTIERE, A.A., LANGMACHER, M., BAYLOR, A., LEE, M., CULLEN, K.J. (1993). Prognostic value of P53, glutathione S-transferase pi and thymidylate synthase for neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in head and neck cancer. *Clin. Cancer res.*, **5**: 4097.

- SINGH, M., SHAH, P., P., SINGH, A., P., RUWALI, M., MATHUR, N., PANT, M., C., PARMAR, D. (2008). Association of genetic polymorphisms in glutathione S-transferases and susceptibility to head and neck cancer. *Mut. Res.*, **638**: 184-194
- SORENSEN, M., AUTRUP, H., TJONNELAND, A., OVERVAD, K., RAASCHOU-NIELSEN, O. (2004). Glutathione S-transferase T1 null-genotype is associated with an increased risk of lung cancer. *Int J Cancer*. **110**: 219-24.
- SRIVASTAVA, S.K., SINGHAL, S.S., HU, X., AWASTHI, Y.C., ZIMNIAK, P., SINGH, S.V. (1999). Differential catalytic efficiency of allelic variants of human glutathione S-transferase Pi in catalyzing in glutathione conjugation of thiotepa. *Arch. Biochem. Biophys.*, **366**: 89-94.
- STEINHOFF, C., FRANKE, K. H., GOLKA, K., THIERI R., ROMERI H. C., ROTZELI C., ACKERMANNI R., SCHULZI W. A. (2000). Glutathione transferase isozyme genotypes in patients with prostate and bladder carcinoma. *Arch Toxicol*. **74**: 521-26.
- STOEHLMACHER, J., PARK, DJ., ZHANG, W., GROSHEN, S., TSAO-WEI, DD., YU, MC., LENZ, HJ (2002). Association between glutathione S-transferase P1,T1, and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* **94**: 936-942.
- STRANGE, R.C., SPITERI, M.A., RAMACHANDRAN, S., FRYER, A.A. (2001). Glutathione S-transferase family of enzymes. *Mutation res.*, **482**:21-26
- STUCKER, I., HIRVONEN, H., DEWAZIERS, I., CABELGUENNE, A., MITRUNEN, K., CENEE, S., KOUM-BESSON, E., HEMON, D., BEAUNE, P. (2002). Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase as modulators of lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, **23**: 1475-1481.
- SWEENEY, C., NAZAR-STEWART, V., STAPLETON, P.L., EATON, D.L., HAUGHAN, T.L. (2003). Glutathione S-transferase M1, T1 and polymorphisms and survival among lung cancer patients. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prev.*, **12**: 527-533.
- TORUNER, G.A., AKYERLI, C., UCAR, A., AKI, T., ATSU, N., OZEN, H., TEZ, M., CETINKAYA, M., OZCELIK, T. (2001). Polymorphisms of glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and bladder cancer susceptibility in the Turkish population. *Arch. Toxicol*. **75**: 459-464.
- TSUCHIDA, S., SATO, K. (1992). Glutathione S-transferases and cancer. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **27**: 337-384.



- UNSAI, M., AKPOLAT, I., KANDEMIR, B(2003). Glutathione-S transferase-pi expression in non small cell lung cancer in the assessment of response to chemotherapy. *Saudi. Med. J.* **24**: 493-498.
- VAN DER LOGT, E. M., BERGEVOET, S. M., ROELOFS, H. M., VAN HOOIJDONK, Z., TE MORSCHE, R. H., WOBBS, T., DE KOK, J. B., NAGENGAST, F. M., PETERS, W. H. (2004). Genetic polymorphisms in UDP-glucuronosyltransferases and glutathione S-transferases and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis*. **25**: 2407-15.
- WANG, Y., SPITZ, M.R., SCHABATH, M.B., ALI-OSMAN, F., MATA, H., WU, X. (2003). Association between glutathione S-transferase P1 polymorphisms and lung cancer risk in Caucasians: A case-control study. *Lung Cancer*, **40**: 25-32
- WATSON, M.A., STEWART, R.K., SMITH, G.B., MASSEY, T.E., BELL, D.A.(1998). Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: Relationship to lung tissue enzyme activity and populations frequency distribution. *Carcinogenesis*, **19**: 275-280.
- WHYATT, R. M., PERERA, F. P., JEDRYCHOWSKI, W., SANTELLA, R. M., GARTE, S., BELL, D. A. (2000). Association between polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct levels in maternal and newborn white blood cells and glutathione S-transferase P1 and CYP1A1 polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **9**: 207-12.
- YANG, P., YOKOMIZO, A., TAZELAAR, HD., MARKS, RS., LESNICK, TG., MILLER, DL., SICAN, JA., EDELL, ES., MEYER, RL., JETT, J., LIU, W (2002). Genetic determinants of lung cancer short-term survival: the role of glutathione-related genes. *Lung Cancer* **35**: 221- 229.
- YOON, K., KIM, J., H., GIL, H., HWANG, H., HWANGBO, B., LEE, J., S. (2007). CYP1B1, CYP1A1, MPO and GSTP1 polymorphisms and lung cancer risk in never-smoking Korean women. *Lung Cancer*. Doi: 10.1016
- ZIMNIAK, P., NANDURI, B., PIKULA, S., BANDOROWIES-PIKULA, J., SINGHAL, S.S., SRIVASTAVA, S.K., AWASTHI, S., AWASTHI, Y.C. (1994). Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur. J. Biochem.*, **224**: 893-899.

## EK

### BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (“Türk toplumunda bazı bireylerde GSTP1 gen polimorfizminin incelenmesi” konulu araştırma için)

1. Çalışmanın amacı:

Türk toplumundaki bazı kadın ve erkek gönüllülerde ilaç ve çevresel kimyasalların vücuttan atılmasında önemli görevi olan GSTP1 enziminin genindeki değişiklikler incelenerek bu genin toplumumuzdaki dağılımı konusunda ön veri elde edilecektir.

2. Gönüllü için beklenen yarar:

Normalden farklı GSTP1 gen tipinde GSTP1 enzim aktivitesi düşüktür dolayısıyla ilaç ve kimyasalların vücuttan atılmaları daha yavaştır. Gönüllülerin hangi GSTP1 gen tipine sahip oldukları belirlenerek ilaç ve diğer kimyasal maddelere maruz kaldıklarında nasıl etkilenebilecekleri konusunda bilgilendirileceklerdir.

3. İzlenecek Yöntemler

Bu amaçla dirsek ön yüzü toplar damarlarından bir seferde olmak üzere bir tatlı kaşığı kadar kan alınacaktır. İşlem sonrasında nadiren işlem yerinde morarma gelişebilmektedir. Gönüllüye kendisi ile ilgili bilgileri içeren bir anket doldurulacaktır. Eğer bu çalışmada yer almak istemiyorsanız bunu belirtmeniz yeterlidir. Çalışmaya katılmaya karar verirsiniz, araştırmadan istediğiniz zaman çekilme hakkınız vardır, ancak bu kararı ilgiliye bildirmeniz gerekmektedir.

4. Verilerin Gizliliği:

Araştırmaya katılmanız halinde araştırmadan elde edilen bilgi ve bulguların istendiğinde ilgili makamlara verilebileceği ve tıp alanında yayımlanan yurt içi veya yurt dışı dergilerde yayınlanabileceğini kabul etmek durumundasınız.

5. Etik Komite Onayı

Etik kurulu bu araştırma programını onaylamıştır.

6. Çalışmayı Bırakmak

Yalnızca serbest iradenizle çalışma programına katılabilirsiniz. Çalışmaya katılmamakta serbestsiniz. Diğer taraftan kendi rızanıza bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma harici bırakılabilirsiniz

7. İstemli Katılım:

Bu çalışma programına katılım kararınız tamamen kendi isteğinize bağlı olacaktır. Eğer çalışmaya katılırsanız herhangi bir anda hiçbir kayba uğramaksızın çalışma programından ayrılabilirsiniz.

8. Araştırmaya katılan gönüllü sayısı:

Çalışmadaki gönüllülerin sayısı 75 erkek ve 75 kadın olmak üzere toplam 150 kişidir.

9. Çalışmada uygulanacak testlerle ilgili olarak siz ve sosyal güvencenizi sağlayan kurum mali yük altına girmez.

10. Çalışma Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik toksikoloji Anabilim Dalında Prof. Dr. Mümtaz İşcan'ın sorumluluğunda yürütülecektir.

**Gönüllü Olur (Rıza) Formu:**

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni önceden okudum. Bunlar hakkında bana sözlü ve yazılı açıklamalar yapıldı. Çalışma ile ilgili tüm sorularıma tatmin edici cevaplar aldım. Bu söz konusu çalışmaya kendi rızamla , baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

**Gönüllünün Adı, Soyadı:**

Tarih:

İmzası:

Tel:

**Doktor Adı, Soyadı:**

Tarih:

İmzası:

**Tanıklık eden Kurum****Yetkilisi Adı, Soyadı:**

Tarih:

İmzası:

**ANKET FORMU**

**(Türk toplumunda bazı bireylerde GSTP1 gen polimorfizminin  
incelenmesi)**

1. Adı Soyadı : .....
2. Yaşı : .....
3. Cinsiyeti : E  K
4. Kilosu , Boyu : .....
  
5. Doğum Yeri : .....
6. Yaşadığınız Yerler (İLİ, İLÇESİ , KÖYÜ , SÜRESİ)
  - 1).....
  - 2).....
  - 3).....
  - 4).....
7. Meslek : .....
- Meslekte Çalışma Süresi (Yıl Olarak) : .....
- Bundan Önce Çalıştığınız İş ve İşyerleriniz?  
.....  
.....  
.....  
.....

8. Sigara İçme Alışkanlığınız;

Hiç İçmedim  Halen İçiyorum  Eskiden İçiyordum   
Günde .... Paket / ....Yıl Bırakalı .... Yıl Oldu

9. Bulduğunuz Ortamda ( Ev / İş )

Sigara İçiliyor  Sigara İçilmiyor

10. Alkol Kullanıyor musunuz?

Evet  Hayır

Hangi Sıklıkta :.....

11. Kahve İçme Alışkanlığınız Var mı?

Var  Yok

Günde 1 Bardak  Günde 2 Bardak  3 ve Daha Fazla

12. Aile Bireylerinizde ve Sizde Herhangi bir Genetik Hastalık Var mı?

(Şeker Hastalığı, Kanser gibi)

Nedir ?.....

13. Başka Sağlık Sorunlarınız Var mı?

Var  Yok

Neler ?.....

14. Son Bir Yıldır Kullandığınız İlaçlar (Vitamin dahil) Nelerdir, Ne Kadar Süredir Alıyorsunuz?

.....  
.....  
.....

15. Beslenme Alışkanlığınız? (En Fazla Tercih Edilene 1 PUAN olmak üzere, En Aza Doğru 1'den 5'e kadar Numara Veriniz)

Et haşlama  Izgara  Kızartma  Sebze  Meyve

TEŞEKKÜRLER

## ETİK KURUL RAPORU

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ETİK KURULU  
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, ANKARA UNIVERSITY  
ANKARA-TÜRKİYE  
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	
	PROTOKOL ADI	Türk toplumunda bazı bireylerde GSTP1 polimorfizminin incelenmesi
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Prof.Dr.Mümtaz İşcan
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı
	DESTEKLEYİCİ FİRMA	

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BİLGİLER	Belge Adı	Değişiklik No. / Tarihi	Dili
	PROTOKOL		
	ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ		
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLURU		
	OLGU RAPOR FORMU		

ÇALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALARI KLAVUZU
---------------	---------------------------------

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:110-2887	Tarih: 02 Nisan 2007
	Araştırma protokolüne tamamen uyulmak, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Yönergesinde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve Yönergenin 11/h maddesi gereği sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere klinik araştırmanın yürütülmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan öğretim üyelerinin oybirliği ile karar verildi.	

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. İsmail Hakkı Ayhan Başkan	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	E	
Prof. Dr. Efser Kerimoğlu Başkan Yardımcısı	Çocuk Psikiyatrisi	Ankara Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Özden Palaoglu Sekreter	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	Toplantıda

16 Nisan 2007

16 Nisan 2007

Ankara Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Akademi

Prof. Dr. Işık Sayıl Üye	Psikiyatri	Ankara Tıp Fakültesi	K	Raporlu
Prof. Dr. Sevim D.Cengiz Üye	Kadın Doğum	Ankara Tıp Fakültesi	K	
Prof.Dr. Nermin Mutluer Üye	Nöroloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	
Prof.Dr. Sumru Beder Üye	Göğüs Hastalıkları	Ankara Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Nurten Girgin Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Ankara Tıp Fakültesi	K	Derste
Prof. Dr. Ragıp Çam Üye	Genel Cerrahi	Ankara Tıp Fakültesi	E	
Prof. Dr. Ali Rıza Uysal Üye	Endokrinoloji	Ankara Tıp Fakültesi	E	
Prof. Dr. Birsal Erdem Üye	Mikrobiyoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Ahmet Demirkazık Üye	Tıbbi Onkoloji	Ankara Tıp Fakültesi	E	
Prof. Dr. Günhan Gürman Üye	Hematoloji	Ankara Tıp Fakültesi	E	
Prof. Dr. Ajlan Tüktin Üye	Tıbbi Genetik	Ankara Tıp Fakültesi	K	Yurtdışında
Prof. Dr. Işın Kuzu Üye	Patoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Özer Kendi Üye	Adli Tıp	Ankara Tıp Fakültesi	E	Rahatsız
Prof.Dr. Erdal Onar Üye	Hukuk	Ankara Üniv. Hukuk Fakültesi	E	
Prof.Dr.Yasemin Oğuz Üye	Deontoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr.Serenay Elgün Ülkar Üye	Biyokimya	Ankara Tıp Fakültesi	K	Raporlu
Ecz. Funda Aytun Üye	Eczacılık	Ankara Tıp Fakültesi	K	

*Handwritten signature and date:*  
 6 Mayıs 2007

## ÖZGEÇMİŞ

### 1. BİREYSEL BİLGİLER

Adı	Emre
Soyadı	Soydaş
Doğum yeri ve tarihi	Konya 1982
Uyruğu	T.C.
Medeni durumu	Bekar
Telefon numarası	0 312 481 2627
E-posta adresi	asmin_73@hotmail.com

### 2. EĞİTİMİ

2004	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
2000	Fethiye Kemal Mumcu Anadolu Lisesi