

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİOKİMYA ANABİLİM DALI

107670

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

**NAD(P)H:KİNON OKSİDOREDÜKTAZ 1 GENETİK  
POLİMORFİZMİ İLE AKCİĞER KANSERİ  
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ**

T 107670

Yüksek Lisans Tezi

Ecz. Pınar AKSOY

Danışman: Prof.Dr. İnci KUŞÇU

İstanbul 2001

**107670**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

Proje No: T-755/251099

# İÇİNDEKİLER

<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b>	1-3
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	
2.1. Kanser	4-7
2.2. Akciğer kanseri	8-12
2.3. Ksenobiotik metabolizması	13-17
2.4. Kinon Oksidoredüktazlar	18-26
2.5. NQO1 polimorfizmi ve Akciğer kanseri	27-31
2.6. NQO1'nın etki mekanizmasına bağlı olarak ilaç geliştirilmesi	32-34
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEMLER</b>	
3.1. Örneklerin Toplanması	35
3.2. Kullanılan gereçler	36
3.3. Kullanılan Kimyasal maddeler	36
3.4. Kullanılan Çözeltiler	37-40
3.5. Yöntemler	41-49
3.5.1. DNA İzolasyonu	41
3.5.2. DNA Miktar Tayini	41
3.5.3. NQO1 Lokusunun Genotip Tayini	42-47
3.5.4. PCR Ürünlerinin Hinf1 restriksiyon enzimi ile kesimi	47-49
<b>4. BULGULAR</b>	50-57
<b>5. TARTIŞMA</b>	58-60
<b>6. ÖZET</b>	61
<b>7. SUMMARY</b>	62
<b>8. KAYNAKLAR</b>	63-71
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	72

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Geçmişte sadece hayal edebildiğimiz insan genom haritasının çıkarılması, günümüzde hayal olmaktan çıkmış ve genomun yaklaşık %96'sı tamamlanmıştır (66). Kuşkusuz ki bu gelişme bilim dünyasındaki büyük adımlardan biridir. Bu araştırmalar sonucunda insanların genetik olarak %100 aynı olmadıkları belli noktalarda farklılıklar gösterdikleri ortaya çıkmış ve bireyler arasındaki bu farklılığın bireyin bazı özelliklerinin ve bazı hastalıkların moleküler temelini oluşturduğu, hatta bu genetik farklılıklardan dolayı bireylerin hastalığa göre değil bireye göre tedavi uygulanması gerektiği gerçeği anlaşılmıştır. Tüm dünyada kanser kaynaklı ölümlerin arttığıda göz önünde tutulduğunda bu grup hastalıklar içerisinde kanserin küçümsenemeyecek bir öneme sahip olduğu da çok açıktır (62, 64).

Kanser oluşumunda özellikle yaş, cinsiyet, çevresel ve genetik faktörler belirgin bir rol oynamaktadır (63). Sigara kullanımı, alkol ve diyet gibi birtakım çevresel faktörler genetik faktörlerle etkileşerek bir bireyde diğer bir bireye göre kanser riskini azaltabilir yada arttırabilir (28). Bu bireyler arası farklılığın en önemli nedenlerinden biride ksenobiotik metabolizmasında rol oynayan enzimleri kodlayan genler üzerindeki polimorfizmlerdir (12, 16, 27, 39).

Zararlı ksenobiotiklerin birikmesi hücre için bir tehlike unsurudur organizma bu maddelerden süratle kurtulmak ister ve böylelikle ksenobiotikler için bir biotransformasyon süreci başlar. Bu proses boyunca belirli kilit noktalarında belirli enzimler anahtar rolü oynamaktadır. Ksenobiotik metabolizmasında anahtar rolü oynayan belli başlı enzim grupları içinde: Sitokrom P450, Glutation-S-transferazlar, N-asetiltransferazlar, Dehidrojenazlar, Oksidoredüktazlar sayılabilir.

Bu enzimleri kodlayan belli genler mevcuttur ve çoğu da polimorfik genlerdir. Enzimler üzerindeki polimorfizmler enzimlerin allelik varyantlarının oluşmasına neden olurlar. Ortaya çıkan genetik farklılıklar ksenobiotiğin metabolize olma kapasitesini etkiler. Ayrıca Enzimlerin çoğunun kimyasal prokarsinojenin aktivasyonundaki yada detoksifikasyonundaki önemli rollerinden dolayı araştırmalar enzimlerin polimorfik formları ile kansere yatkınlık arasındaki yakın ilişkiler üzerinde odaklanmıştır (27).

Polimorfizm toplumdaki bir organizmada birden fazla fenotip oluşturan aynı lokusdaki birden fazla allelin mevcudiyeti sonucu ortaya çıkan monogenik bir özelliktir. Polimorfizmlerin fenotipe yansması sonucunda protein veya enzimin ekspresyonunda farklılıklar, dolayısıyla enzim aktivitesinde değişiklikler meydana gelir. Farmakogenetik polimorfizmler ksenobiotik ve ilaç metabolizması ile yakından ilgilidirler (2). Bireylerin toksisiteye veya kansere genetik eğilimlerinde farklılığa neden olabilen en az beş düzine farmakogenetik polimorfizm tanımlanmıştır (42).

Bu çalışmada 94 akciğer kanserli ve 166 sağlıklı bireyde, kinonların ve kinon yapısındaki maddelerin bioaktivasyonu yada detoksifikasyonunda görev alan NAD(P)H:kinon oksidoredüktaz adlı enzimi kodlayan gen üzerindeki polimorfizmin Türk toplumundaki dağılımı ilk kez belirlenerek bu polimorfizm sonucunda meydana gelen wt/wt, wt/MT ve MT/MT genotiplerinin akciğer kanserine yakalanma riski üzerindeki etkileri incelenmiştir. Ayrıca akciğer kanseri ile ilişkisi bulununan bu polimorfizmin, Türk toplumundaki frekansının saptanmasıyla bu kanser ile ilgisi saptanan diğer polimorfizmler ile birlikte değerlendirilebilme imkanı sağlanacaktır. Bu çalışmadan elde edilecek veriler diğer bulgularla daha kapsamlı bir şekilde değerlendirilebilecektir.

Akciğer kanseri erkeklerde ikinci kadınlarda ise üçüncü sırada görülen bir tümördür. 1996 yılında 177.000 yeni vaka ve 159.000 ölüm tespit edilmiştir. Yeni kanser vakalarının % 15' ni , tüm kanser ölümlerinin % 18' ini oluşturmaktadır. Akciğer kanser insidansı kadınlarda erkeklerden daha hızlı bir artış göstermektedir. Bu da sigara içme alışkanlıklarının değişmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (63). Kansere bağlı ölümlerin bu derece artması nedeniyle bu konu üzerine araştırmalarda oldukça yoğunlaşmış olup kanserden korunma yolları geliştirilmeye başlanmıştır. Kanserden korunma üç başlık altında toplanmıştır. Karsinogenezi başlatabilecek karsinojenlerden uzak durmak birincil koruma, erken tanı ikincil korunma ve son olarakta mortaliteyi geciktirmek üçüncül korumayı oluşturmaktadır.

Tüm kanserlerin % 30'u sigaraya bağlanmaktadır. Sigara içimi ile Akciğer kanseri arasındaki etiyolojik ilişki, birçok ülkede yapılan epidemiyolojik çalışmalar ile ortaya konuldu. Akciğer kanseri riski sigara içmekte olanlarda 10 kat daha fazladır ve bu risk günde içilen sigara adedine bağlı olarak artar. Birincil korumada en önemli husus tütün kullanımını engellemektir. Birincil koruma yöntemleriyle kanser oluşumunu önlemek aslında görüldüğü kadar kolay değildir o nedenle günümüzde ikincil korunma yani erken tanı önem kazanmıştır (63).

Kanserle mücadelede başarıya ulaşmanın yolu hastalığın güçlü ve zayıf yanları hakkında mümkün olduğunca çok bilgi edinmektir. Bunun farkına varılmasıyla birlikte kanserin genetik sebepleri, bireylerin genetik yatkınlığı araştırılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada akciğer kanseriyle ilişkisi olduğu ileri sürülen NAD(P)H: kinon oksidoredüktaz 1 polimorfizmini inceleyerek akciğer kanserine yatkınlığı olan bireylerin akciğer kanserine yakalanma risklerini belirledik. Ve böylelikle bireylerin genetik yatkınlıklarının belirlenmesiyle erken tanı yapabilmeyi ve kanserle mücadele edebilme şansımızda arttırarak yaşam sürecimizi uzatabilmeyi hedefledik. Günümüzde yenidoğan bebekler bazı genetik hastalıklar için taramaya tabi tutulabiliyor ve yakın bir gelecekte aynı şekilde kanserinde genetik risk profili çıkartılarak erken tanı ve tedavi yapılabilecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

Kanser, geride bıraktığımız yirminci yüzyılda özellikle endüstrileşmiş ülkelerdeki hastalık ve ölümlerin en önemli nedenleri arasında yer almaktadır. Yüzyılın başlangıcında ölüme sebebiyet veren olgular içinde sekizinci sıradayken 20. yüzyılın sonunda ikinci sıraya yükselmiştir (21). Geçen yüzyıl süresince kanser insidansı ve mortalite oranındaki bu üzücü artış, kanserin nedenlerinin anlaşılmasının ve erken tanı yapılarak önlenmesi için yeni stratejiler geliştirilmesinin önemini bir kez daha gözler önüne sermektedir (68).

Kanser hücrel genlerde gerçekleşen somatik ve kalıtsal mutasyonlardan ve biriken genetik değişikliklerden kaynaklanan karmaşık ve uzun süreli bir işlemdir. Son yirmi yıl içinde hücrelerde kanserleşmeye neden olan genler ve işlevleri aydınlanmış, kanserin genetik bir hastalık olduğu ve normal bir hücrenin kanser haline dönüşebilmesi için multipl genetik lezyonların oluşması gerektiği anlaşılmıştır (62, 63, 64, 67). Hatta bazı kanser türlerinin kalıtsal özellik gösterdiği saptanmıştır. Her 100 kanserden 5 ya da 10 kadar kalıtsal yolla geçen hastalıklardan kaynaklanmaktadır. Kalıtsal yolla geçen bir gen bozukluğu bireylerin kansere yatkınlıklarını değiştirerek hasta olma riskini arttırmaktadır. Bununla beraber bozuk geni taşıyanların tamamı mutlaka kansere yakalanmak zorunda değildir fakat bu bireylerin yaklaşık %85-90 oranında kanser olma riskleri bulunmaktadır. Bugün tanımlanmış olan on kadar farklı gen (BRCA1, BRCA2, MSH2, MLH1, v.b.), değişik kanserlerin kalıtım yoluyla kuşaktan kuşağa geçmesinde rol oynamaktadır (62, 64).

Tümör hücrelerinin en belirgin özelliklerinden biri farklılaşma yeteneklerinin kaybolmasıdır. Farklılaşmanın bozulmasına paralel olarak kanser hücresi apoptozis (programlı hücre ölümü) yeteneğininide kaybeder ve normal hücreye kıyasla daha uzun yaşar. Bu nedenle kanserleşen bu hücrelere ölümsüz hücrelerde denilmektedir (62, 63). Tümörler sınırsız çoğalma yeteneği kazanan bu hücrelerin anormal çoğalmaları sonucu meydana gelir. Ancak başlangıçtaki bu ilk hücre sonuçtaki kanserli hücrenin tüm özelliklerini taşımaz. Hücreler yeni değişikliklere uğrayarak daha malign nitelik kazanırlar.

İlk basamağı oluşturan değişiklik (inisiyasyon) hücrenin anormal çoğalmasına olanak sağlar. İnisiyasyon kalıcı (DNA hasarı) olmasına karşın promosyon (başlangıçta) geri dönüşebilen epigenetik bir mekanizmayı simgeler. İnisiyasyon olarak etki eden maddeler genellikle DNA hasarına neden olurken 'promoter' olarak değerlendirilen maddeler tek başına test edildiğinde bunların karsinogenik etkisinin bulunmadığı görülür. İlk değişiklik gerçekleştiğinden sonra hücre klonunun çoğalması sırasında ortaya çıkan yeni mutasyonlar bu hücrelere selektif çoğalma avantajı kazandırır. Progresyon adı verilen bu aşamada, bir tür klonal seleksiyon sonucu çoğalma, invazyon, yayılma v.b. yetenekleri daha yüksek yeni klonlar gelişir. Bu olay tümör gelişimi boyunca devam eder ve tümörler böylece giderek daha malign nitelik kazanarak, daha hızlı çoğalırlar. Bütün bu aşamalarda onkogenlerin aktivasyonu ve protoonkogenlerin kaybı veya inaktivasyonu gibi değişiklikler görülür.

Tümör hücrelerinin diğer bir özelliğide programlı hücre ölümünün (apoptozis) bozulmasıdır. Apoptozisin kontrolünde hem onkogenler hemde tümör süpressör genler rol oynar. Hücre ölümünü indükleyen genlerin baskılanması veya sağkalımı uyaran genlerin aktivasyonu tümör gelişimine zemin hazırlar.

Karsinogenez moleküler düzeyde incelendiğinde, bu olayda değişik gen gruplarının rol oynadığı görülmektedir. Bu genler genel olarak üç kategoride toplanır. Onkogenler, tümör süpressör genler, DNA onarım genleri (63).

Onkogenler ilk olarak tümöre neden olan virüslerde keşfedildi daha sonra bu genlerin hayvan hücrelerindeki genlerin türevi yada onlara çok benzer oldukları anlaşıldı. Başta virüslere özgü kanser oluşturucu genler olarak bilinin retroviral genlerin bugün normal hücrelere ait hücresel genlerden türedikleri bilinmektedir. Büyümeyi regüle eden proteinleri kodlayan bu genlere protoonkogenler adı verilmiştir. Bu genler çoğalma, farklılaşma, ve hücre ölümü gibi önemli işlevlerden sorumlu olan genlerin değişikliğe uğramış şekilleridir (63).

Onkogenler genellikle mutasyon yada başka nedenlerle yeni bir işlev veya aktivite kazanarak otozomal dominant etki gösterirler. Onkogenlerde aktivite artışı değişik şekillerde ortaya çıkabilir. En çok rastlanılan değişiklikler kromozom translokasyonu sonucu gen aktivasyonu, gen amplifikasyonu sonucu gen ürününün aşırı derecede sentezlenmesi yada gende meydana gelen yapısal değişiklikler sonucu genin kodladığı proteinde aktivite artışıdır . Kanser türlerine en sık bozulmaya uğrayan onkogenler ras, myc, siklin D, ret, erb-B, bcl 2,mdm2, abl onkogenleridir. Tümör gelişiminde rol oynayan ikinci temel mekanizma ise proto-onkogenlerin tersi bir fonksiyona sahip genler olan tümör süpressör genlerin inaktivasyonudur (62, 63, 64). Tümör süpressör genler normal hücrede çoğalmanın kontrolü için gerekli olan ve hasara uğradıkları yada ortadan kalktıkları zaman hücrenin denetimsiz çoğalmasına neden olan genlerdir. Tümör süpressör genler otozomal ressesif özellik gösterirler. Onkogenler gen ekspresyonunu hızlandıran veya sentezlenen proteinlerin aşırı aktivitesine yol açan genetik değişiklikler aracılığıyla hücreyi denetimsiz çoğalmaya sevkederken, tümör süpressör genler tam aksine, hücre çoğalmasını ve tümör gelişimini baskılayıcı yönde hareket eder. Birçok tümör bu genlerde oluşan hasar veya delesyonlar nedeniyle genin işlevini yitirmesi sonucunda ortaya çıkar (63).

Tümör süpressör genler tarafından sentezlenen proteinler hücredeki önemli efektör proteinlere bağlanarak, bunların işlevini engellerler. Süpressör proteininin sentezlenmemesi veya inaktivaasyonu, bağlandığı proteinin serbest kalarak aktivitesini sürdürmesi şeklinde sonuçlanır. En tipik tümör süpressör genler BRCA1, BRCA2, Rb ve p53 genleridir (62, 63, 64).

DNA onarım genleri ise genomda oluşan hasarın onarımından sorumlu olan genlerdir Bu genlerin işlevi bozulduğunda ortaya çıkan mutasyonlar giderilmeden biriktiğinde, hücre karsinogenez yolunda ilerlemeye başlar. Onarım genlerine bağlı kusurlardan kaynaklanan tümörlerde genin iki kopyasında ortadan kalktığı (heterozigotluk kaybı) gözlenir (63).

Kanser fiziksel, kimyasal, genetik ve çevresel faktörler gibi birçok etkene bağlı olarak gelişebilir. Kanserlerin çoğu genetik ve çevresel etkenlerin etkileşimi sonucu vuku bulmaktadır. Genetik faktörlerin, tüm kanser vakalarının sadece %5'inin açıklayabildiği düşünülmektedir. Geri kalan kısmını ise genetik olmayan faktörler yani sigara dumanı , alkol, besinler içindeki maddeler, kirlilik, ilaçlar, radyasyon, güneş ışınları ve virüsler gibi çevresel faktörler oluşturmaktadır. Demek oluyor ki karsinogenezin oluşumundaki önemli fonksiyonları gereği çevresel faktörler, genetik faktörler ve kazanılan yatkınlık olgularının birbirinden bağımsız değil bir bütün değerlendirilmesi gerekmektedir (21, 29, 46, 63).

Karsinojenler hücre içersinde protein, lipid gibi birçok moleküle yanında DNA'ya da kovalan bağlarla bağlanabilirler. Kronik karsinojen maruziyeti sonucunda ise genetik materyalde hasar oluşmaktadır. DNA'da, hücreyi kanserleşmeye götüren hasarın temelinde, hücre çoğalmasını kontrol eden genlerdeki değişiklikler yatmaktadır; bu DNA hasarı, hücre çoğalmasını uyaran dominant onkogenlerin aktivasyonu yada hücre büyümesini baskılayan tümör süpressör genlerin inaktivasyonu sonucu oluşabilmektedir (64, 67).

Değişik ülkelerdeki kanser oranlarında geniş farklılıklar saptanmıştır. Buradan bireylerin kansere karşı eşit şansa sahip olmadıkları sonucuna ulaşabiliriz. Örneğin özellikle göç eden toplumlardaki kanser oranının diğer toplumlardakinden çarpıcı bir şekilde farklı olduğu gözlenmiştir. Bu farklılığın da toplumların yaşam tarzı ve yaşadıkları çevre ile doğrudan alakalı olabileceği düşünülmektedir (46, 47, 62, 64, 68).

Kanser insidansındaki belirgin artışa rağmen erken tanı yöntemleri henüz yeterince geliştirilememiştir (64, 68). Kanserle mücadelede başarıya ulaşmanın yolunun hastalığın güçlü ve zayıf yanları hakkında mümkün olduğunca çok bilgi edinmekten geçtiğinin anlaşılması üzerine kanserin genetik sebepleri üzerine olan çalışmalar daha da yoğunlaşmıştır (66).

Moleküler biyoloji alanında hızla devam eden gelişmeler sayesinde yakın zaman içinde kanserin nedenlerinin anlaşılacak ve risk grubu bireylerin belirlenerek erken tanı yönünde bir adım daha atılmış olacaktır.

## 2.2. Akciğer Kanseri

Tüm kanserler arasında mortalite oranı oldukça yüksek olan bir kanser tipide Akciğer kanseridir (1, 17, 18). Akciğer kanserinde yaşın önemli bir etkisi vardır. Kanser riski yaşla birlikte artmakta, genellikle de 40 yaşından sonra belirgin bir artış olmakta ve 60 - 70 yaşları arasında en yüksek düzeye çıkmaktadır (17, 63).

Akciğer kanseri kadınlarda erkeklere göre daha az görülen bir kanserdir ve bu görülme sıklığında sigara içme alışkanlığının, erkeklerde daha fazla olması ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Bununla beraber son 10 yıl içinde akciğer kanser insidensinde, erkeklerde önemsiz bir gerileme ile birlikte kadınlarda belirgin bir artış gözlenmiştir (18, 63, 64).

Dünya sağlık örgütü (WHO) Akciğer kanserini dört ana başlık altında toplamıştır ve WHO'nun 1997'deki klasifikasyonu bugün için halen geçerlidir.

Bu dört hücre grubu Skuamöz karsinom, Küçük hücreli karsinom, Adenokarsinom ve Büyük hücreli karsinomdur (63). Diğer bir sınıflandırmaya göre ise Akciğer kanseri Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve Küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK) olarak ikiye ayrılmıştır (64).

Epidermoid karsinom diğer bir adıyla Skuamöz karsinom Akciğer kanserleri arasında en çok görülen türdür ve tüm kanser vakalarının yaklaşık %50'sini oluşturur. Etiyolojisinde sigara içiminin, kullanılma miktarı ve süresi ile orantılı olarak önemi artmaktadır. Tümör çoğunlukla ana bronş ve santral yerleşimlidir ve diferansiyedir . Diğer üç major gruba üstünlüğü ise erken tanı, rezeksiyon endikasyonu, beş yıl yaşama şansı, uzak metastaz olasılığının en az olması ve diğer tiplere göre yavaş büyüme göstermesidir (17,63).

Küçük hücreli karsinom %20-25 oranında görülmektedir. Kökeni en sık tartışılan tümör tipidir. Küçük hücreli kanserler diğerlerine göre çok hızlı büyüme gösterirler ve gerek hematojen gerek lenfojen yolla çok erken metastaz yaparlar. Kanser kitlesinin 1 cm'den büyük olması için geçen süre epidermoid kanserde 7.5 yıl iken küçük hücreli kanserde 2.5 yıldır. Bu hastaların 5 yıl yaşama oranı %1'den azdır. Hücreler andiferansiyedir, ilgili doku hücrelerinden ve birbirlerinden ayrılmaları güçtür. Sigara içilmesiyle yakın ilişkisi vardır (17, 63).

Adenokarsinom kadın ve erkeklerde eşit oranda görülmekle birlikte kadın akciğer kanserleri arasında en çok görülenidir. Ayrıca sigara içimi ile daha az bağıntılı ve akciğer kanserlerinin %20-25'ini oluşturan bir tümör tipidir. Olguların %75'i periferik yerleşimlidir. Diferansiyonu bu karışık grupta belirlemek oldukça güçtür (17, 63, 64).

Büyük hücreli karsinom morfolojik özellikleri yanısıra, ultrastrüktürel ve immünohistokimyasal olarak da daha çok diğer tiplerin az diferansiye bir tipi olarak tanımlanır. Görülme sıklığı %10-20 arasındadır. Bu farklılığın diğer tiplere benzerliğinden dolayı yaşanan sınıflama zorluğuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Tümör hücreleri büyük olup ilgili doku hücrelerinden belirli bir ayrılık göstermezler yani andiferansiyedir. Büyük hücreli tümörlerin hücre yapısı, öncelikle ikinci derecede veya küçük bronşlarda oluşması, yayılış niteliği açısından genellikle adenokarsinomaya benzer. Dev hücreli ve berrak hücreli olmak üzere iki alt tipi tanımlanmıştır. Makroskobik olarak periferik ve bazen santral yerleşimlidir. Adenokarsinoma ve büyük hücreli karsinomanın büyüme hızları ve metastaz nitelikleri epidermoid ve küçük hücreli karsinoma arasındadır (17, 63, 64).

Sigara dumanı karsinojenler açısından oldukça zengin bir kaynaktır. Sigara dumanında mevcut olan karsinojenlerin önemli bir kısmını benzopiren gibi polisiklik aromatik hidrokarbonlar oluşturmaktadır. Fakat diğer önemli grup karsinojende nikotinden kaynaklanan nitrozaminlerdir. NNK (nikotin türevi nitrozaminoketon) ve NNN (N'-Nitrozonornikotin) spesifik Akciğer karsinojenleridir (64).

Yaygın epidemiyolojik çalışmalar Akciğer kanserinin major nedeninin sigara dumanı olduğunu göstermektedir. Birçok çalışmada Akciğer kanserinin %90' nından fazlasının sigara içimi ile yakından ilgili olduğu bildirilmesine karşın sigara içenlerin sadece %10' nunda bronşogenik karsinoma geliştiği saptanmıştır (1, 17, 69). Ayrıca sigaraya bağlı olarak gelişen akciğer kanserinde yaşa bağlı olarak farklılıklar olabilmektedir (18). Sigara adedinin artmasıyla birlikte kanserden ölüm oranında arttığı gözlenmiştir (17).

Sigara kullananlarda, Akciğer kanserinden ölüm riski, içmeyenlere oranla 10 kat daha fazladır ve ağır sigara kullanan bireylerde ise bu risk 15-25 kata kadar çıkabilir (1). Elde edilen veriler değerlendirildiğinde bireyin sigara kullanımına olan yatkınlığını bireysel faktörlerin etkili olduğu sonucuna ulaşılmaktadır (69).

Akciğer kanserli hastalar içerisinde %5-10'luk bir kesimin sigara hikayesine sahip olmadığı bildirilmiştir (1). Sigara kullanmayan bireylerde gelişen akciğer kanserinin etiyojisi çok iyi anlaşılamamıştır. Son yapılan çalışmalarda sigara kullanan ve kullanmayan kadınlar üzerinde çalışılmış onların p53 ve K-ras mutasyon spektrumları incelenmiştir. Sonuç olarak Akciğer kanser insidensinin sigara kullanmayan kadınlarda arttığı saptanmıştır. Bu trendin nedeni tam olarak açıklanamasada çevresel sigara dumanı, kömür dumanı gibi çevresel maruziyetler ile hormonal etkilerin sigara kullanmayan bireylerde akciğer kanseri için potansiyel bir risk faktörü olduğu ileri sürülmektedir (18).

Sigara kullanmayan aynı zamanda kanser olmayan bireyler ile yine sigara kullanmayan ama farklı olarak akciğer kanserli birinci derecede akraba olan bireyler arasında Ailesel kanser hikayesi incelenmiş ve ailesel kanser hikayesinin sigara kullanmayan bireylerde de Akciğer kanseri için bir risk faktörü olabileceği saptanmıştır (35).

Alkol tüketimi ile akciğer kanseri arasında bir ilişkinin varlığı çok açıklık kazanmamıştır. Ancak alkol tüketimi ile sigara kullanımı çok yakın ilişki içindedir ve bu nedenle Akciğer kanserinde alkolün etkisini sigaradan bağımsız olarak düşünmek oldukça zordur. Ayrıca D2 dopamin reseptör genindeki minör allelin kronik alkolizm ile ilgili olduğu ve nikotin bağımlılığının saptanmasında rol oynadığı saptanmıştır. Birçok çalışmada sigara içen bireyler kontrol edilmiş ve bu bireyler içinde ağır alkol tüketimi yapan bireylerde akciğer kanser insidensinin arttığı saptanmıştır(1).

Moleküler epidemiyolojik çalışmalarda, spesifik çevresel karsinojenler ile kanserdeki mutasyonel olaylar arasında bir ilişki kurulmuştur (1). Akciğer kanseri moleküler düzeyde incelendiğinde genomdaki bazı farklılıklarında kanser yatkınlığı etkilediği gözlenmiştir. Özellikle tümör süpressör gen ve onkogenlerdeki bazı mutasyonlar sonucu Akciğer kanseri gelişme riskide değişmektedir (64).

İnsan tümörlerinin çoğunda p53 tümör süpressör geni ve K-ras proto-onkogeni üzerinde mutasyonlar olduğu belirlenmiş olup özellikle sigaraya bağlı gelişen Akciğer kanserinde p53 ve K-ras mutasyonları tanımlanmıştır. Akciğer tümörlerinde özellikle K-ras mutasyonları görülmektedir. Bunun en çok görüldüğü tip ise adenokanserlerdir. Adenokarsinoma vakalarının yaklaşık %30'unda K-ras mutasyonları saptanmıştır. ras proteinlerindeki mutasyonlar en çok 12, 13 ve 61. kodonlarda görülmektedir. İçlerinde en sıklıkla rastlanılanı, bu mutasyonların yaklaşık %80-90'ı codon 12 deki G→T transversiyonudur. Ras mutasyonları adenokanserlerde kötü prognozla ilişkisi vardır. Bu nedenle ras genindeki değişikliklerin tümör oluşumundan değil progresyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir (17, 18).

Ras proto-onkogenlerinin H-ras, K-ras, ve N-ras olmak üzere üç tipi vardır. Bunların ürünü p21 adlı protein olup hücre membranının iç yüzünde lokalize olan ve büyüme sinyalinin iletiminde rol oynayan G-proteinleri ile ilişkilidir. G-proteinleri ya GTP'ye bağlı yada GDP'ye bağlı olarak bulunur. Bu iki form birbirine dönüşebilmektedir. Normal p21 GTPaz aktivitesine sahiptir ve GTP'nin GDP'ye dönüşümünü katalize eder (64).

p53 mutasyonları ise birçok kodonda oluşabilir. p53 mutasyonları çoğunlukla G→T transversiyonu daha az olarak G→C transversiyonu ve G→A transiyonu içerirler (17, 18).

Myc ailesine ait genlerinde akciğer kanseri ile ilgileri olduğu belirlenmiştir. Myc genlerinin aktivasyonu çoğunlukla amplifikasyon yada ekspresyon artışı sonucunda olmaktadır, mutasyon nadiren görülür. Myc gen ailesi amplifikasyonları özellikle küçük hücreli akciğer kanserlerinde görülmektedir, tümör oluşumundan çok tümör progresyonu ile ilişkilidir ve kötü prognoz faktörlerinden birisidir (64).

Mutasyonların çoğu hücrelerin karsinojenlere maruziyeti sonucu gelişir. Karsinojenler hücre içinde birçok moleküle ve DNA'ya kovalan bağlarla bağlanarak genetik materyalde hasar oluşmasına neden olur. Eğer bağlandıkları bölge p53 gibi bir tümör süpressör gen veya K-ras gibi bir proto-onkogen ise hücreyi kanserleşme sürecine sokmuş olur (18, 64).

Tümör süpressör ve onkogenlerde oluşan mutasyonların ana nedeni, toksik maddeye maruz kalma süresi, ksenobiotiklerin biotransformasyonundaki farklılıklar ve DNA tamir kapasitesindeki değişikliklerdir ( 62, 64).

Bireysel faktörler bireylerin çevresel karsinojenlere olan yatkınlıklarını etkileyebilir. Faz I ve faz II enzimlerini kodlayan genler bireysel faktörlerin en güzel örnekleridir. Karsinojen maddeler karsinojenik etkilerini ortaya çıkarabilmek için aktivasyona ihtiyaç duyarlar ki bu metabolik prosede enzimleri kodlayan genler tarafından regüle edilir. Herhangi bir mutasyon sonucu oluşacak olan varyant allel enzim aktivitesinde farklılığa neden olur. Bu da bireyin kansere yatkınlığını etkileyecek önemli bir değişikliktir (69).

Ksenobiotik metabolizmasında substrata bağlı olarak ya detoksifikasyon yada aktivasyon enzimi olarak görev yapan NQO1 birçok ksenobiotik yanında özellikle Akciğer kanseri ile sıkı bir ilişki içinde bulunan sigara dumanındaki bazı çevresel prokarsinojenlerin aktivasyonunu katalize ettiği için dikkatleri üzerinde toplamaktadır. Bu enzimi kodlayan gen zerindeki mutasyon sonucu oluşan varyant allel enzim aktivitesinin düşmesine neden olmaktadır. Mutant allelin akciğer kanser riskini azalttığı ileri sürülmekle birlikte elde edilen sonuçlar çelişkilidir (5, 69).

Gerçekten insan hayatını bu derece tehdit eden bir kanser olmasına karşın erken tanı ve tedavide sorunlar yaşanmaktadır. Özellikle sigara ile olan ilişkisi ve her geçen gün sigara içen kesimdeki artış araştırmacıları akciğer kanseri için yeni çözüm yollarının aranmasına yöneltmiştir. Moleküler biyolojideki son gelişmeler sayesinde yakın zaman içinde kanserin sırrının çözüleceği ve artık korkulacak bir olgu olmaktan çıkacağını ümid ediyoruz ve bizim yaptığımız taramalarında kanser araştırmaları için birer veri tabanı oluşturacağını düşünüyoruz.

## 2.4. Ksenobiotik Metabolizması

İnsanoğlunun biyolojik sistemde gelişen olaylara karşı duyduğu merak onu, organizmaya giren ksenobiotiklerin akibetlerinin araştırılmasına yöneltmiştir. İnsanlar gerek ilaçlar ve gıdalardaki katkı maddeleriyle gerekse çevre kirliliğine neden olan maddelerle olsun giderek artan bir biçimde çeşitli kimyasal maddelere maruz kalmaktadır. Ksenobiotikler adı verilen bu maddeler organizmaya yabancı olan organik bileşiklerdir. Bir başka deyişle ksenobiotikler eksojen kaynaklardan vücuda alınan kimyasal maddedir (27, 40, 43).

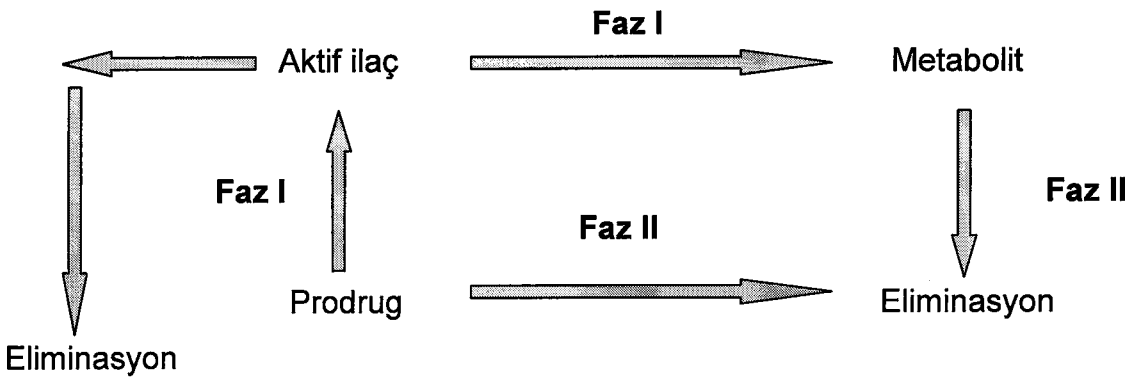
Vücuda alınan bileşiklerin atılımı canlı organizmalar için temel bir özelliktir. Hergün vücut tarafından büyük miktarda kimyasal madde alınır. Bu maddeleri organizmaya içtiğimiz su yada yediğimiz besinlerle olabildiğimiz gibi inhalasyon yoluyla yada transdermal olarakta alabiliriz (2). Bu maddelerin vücutta birikimi ciddi sorunlara neden olacağından suritle organizmadan dışarı atılmaları gerekir. Bir maddenin vücuttan atılımı için polarite şarttır. Bazı ksenobiotikler eliminasyon için yeterince polar olmalarına karşın çoğu yağdaki çözünürlükleri sudaki çözünürlüklerinden daha fazla yani lipofilik özelliğe sahip olan maddelerdir. Organizmadaki hücre membranları fosfolipid ve protein yapısında olduğundan lipofilik özelliğe sahip bu maddeler hücre membranlarını aşarak hedef bölgelere kolaylıkla ulaşırlarken bu maddelerin lipofilitelerinden dolayı eliminasyonlarında ciddi problemler ortaya çıkmaktadır. Lipofilik olan bu maddelerin atılımı için bir takım metabolizma reaksiyonlarına uğrayarak polar türevlerine dönüşmeleri gerekmektedir.

Ksenobiotik metabolizması ile ilgili bilgi, farmakoloji, toksikoloji, kanser araştırması ve ilaç alışkanlığının mantığa uygun bir biçimde anlaşılabilmesi için bir temel oluşturmaktadır . Vücuda alınana ksenobiotikler besin maddelerine ve endojen bileşiklere benzer şekilde bir seri biokimyasal tepkime sonucunda metabolize edilmektedir. Ksenobiotik metabolizması canlı organizmalardaki lipid, karbohidrat, protein ve nükleik asit gibi diğer aracı metabolizma yolları ile benzerlik gösterir ki bu da ksenobiotik metabolizmasının anlaşılabilmesi için büyük önem taşımaktadır (2, 40, 43).

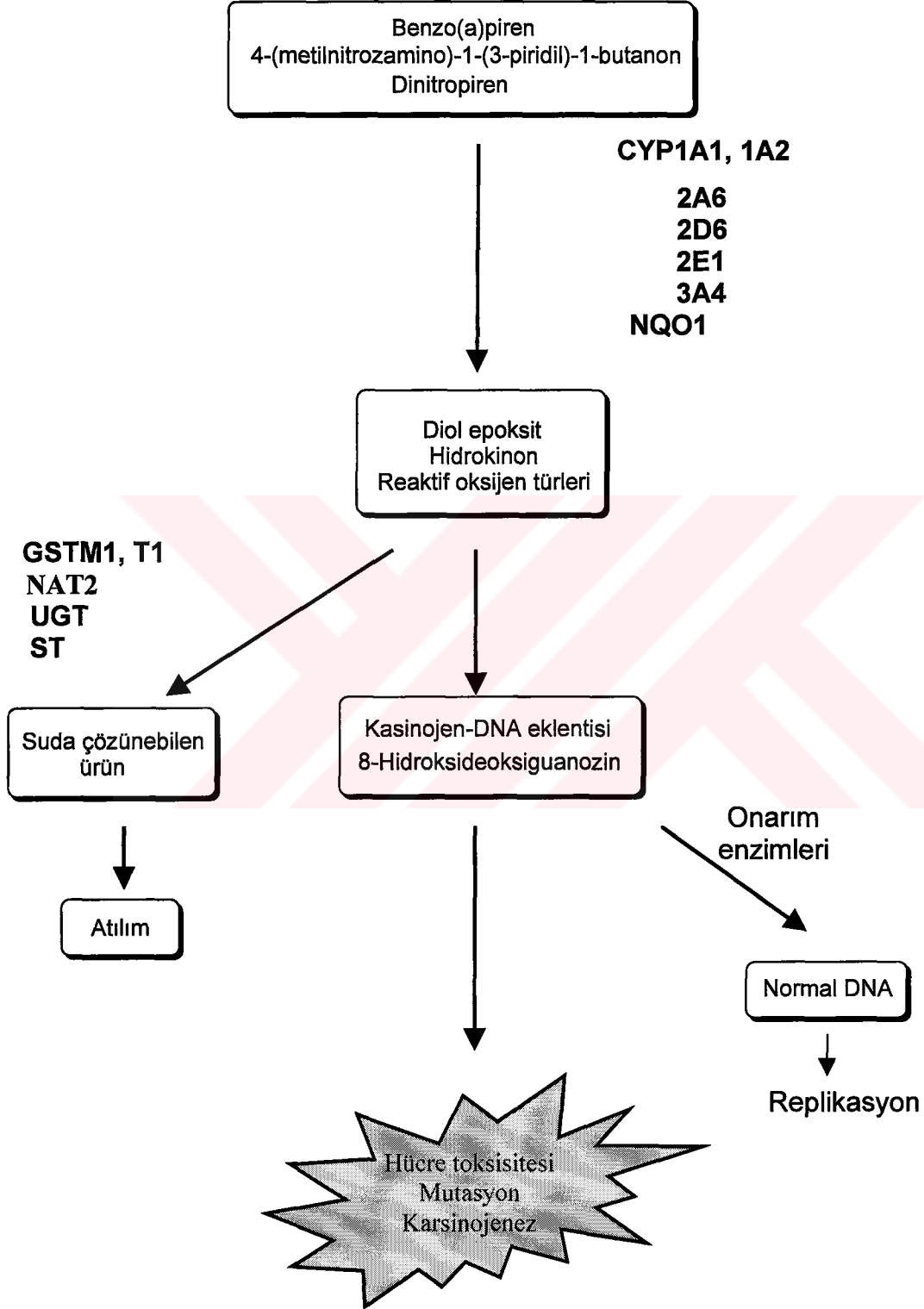
Ksenobiotik metabolizmasını Faz I ve Faz II olmak üzere iki grup altında toplayabiliriz (şekil 1). Faz I'e katılan temel reaksiyon, monoksijenazlar veya sitokrom p450 türleri olarak adlandırılan enzim sınıfının üyeleri tarafından katalizlenen hidroksilasyondur. Faz I'in diğer reaksiyonları redüksiyon ve hidrolizi içerirler. Faz I'de oluşmuş hidroksile veya diğer bileşikler Faz II'de spesifik enzimler aracılığıyla glukuronik asit , sülfat, asetat, glutatyon veya bazı aminoasitler ile konjugasyon veya metilasyon sonucu çeşitli polar metabolitlere dönüştürülür. Ksenobiotik metabolizmasındaki bu iki fazın baştan sona amacı, ksenobiotiklerin sudaki çözünürlüklerini arttırmak ve böylece vücuttan atılmalarını kolaylaştırmaktır (2, 40).

Organizmaya giren maddelerin oldukça az bir kısmı değişikliğe uğramadan doğrudan dışarı atılırken büyük çoğunluğu biotransformasyona uğrar. Biotransformasyon sırasında normalde bileşikler faz I reaksiyonları sonucunda daha az aktif veya inaktif formlarına dönüşürler ve faz iki reaksiyonları ile de konjugasyona uğrayıp atılır yani detoksifiye olurlar. Detoksifikasyon terimi ksenobiotik metabolizmasına katılan pek çok madde için kullanılmakla birlikte bu terim her koşul için uygun değildir, çünkü bazı durumlarda bileşikler faz I reaksiyonları sonucunda inaktif formlarından aktif formlarına dönüşerek biyoaktivasyona uğrarlar. Böylelikle bu metabolizma reaksiyonu sonucunda ksenobiotiğin biyolojik aktivitesi veya toksisitesi artabilir. İnaktif formdan aktif formuna dönüşen bu tip maddelere ön ilaç (prodrug) veya prokarsinojen denilmektedir (şekil 1).

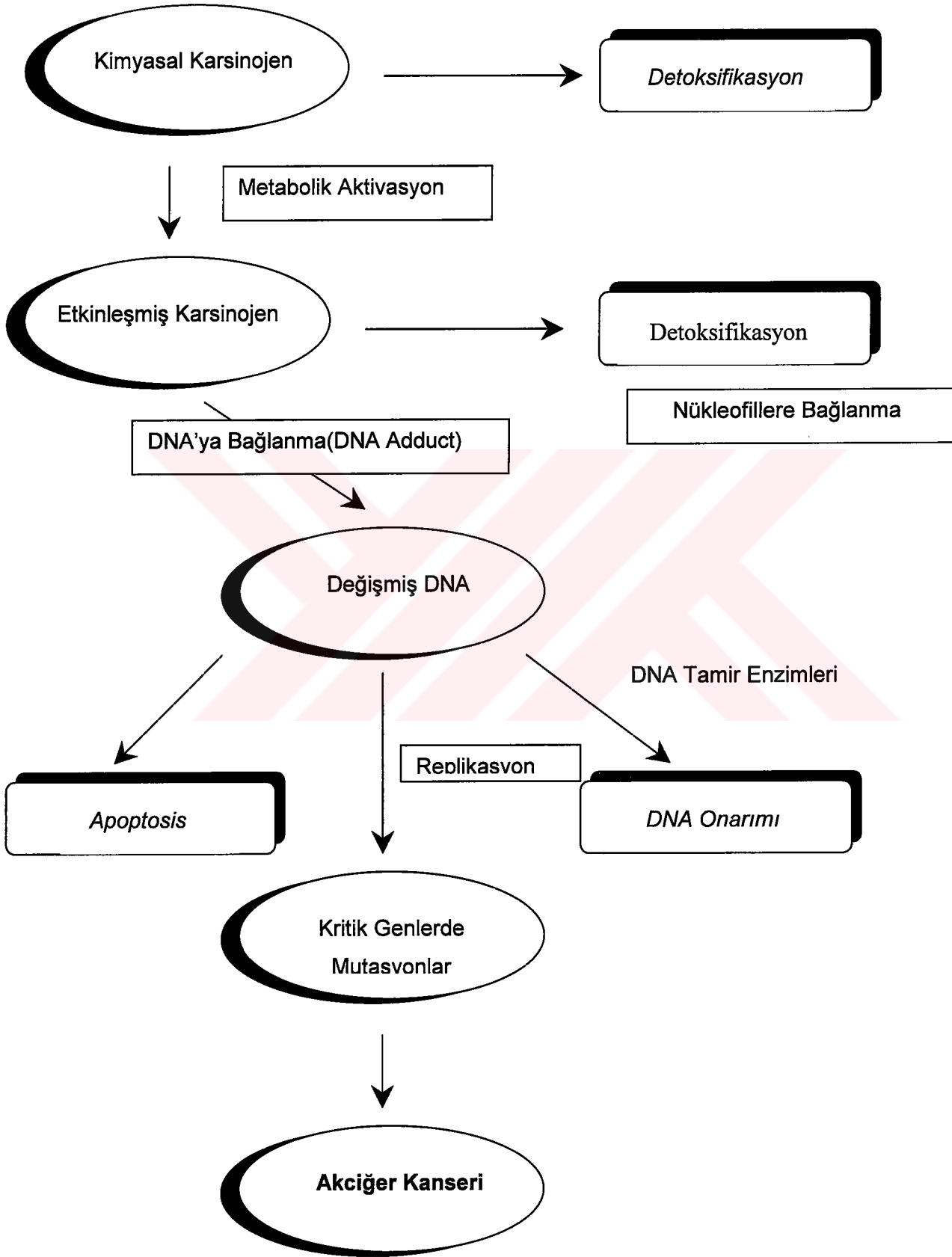
**Şekil 1.** Organizmaya giren ksenobiotiklerin akıbeti



**Şekil 2.** Karsinojenezde ilaç metabolize eden enzimlerin rolü



**Şekil 3. Karsinogenезin Basamakları**



Aynı enzim hem bir karsinojen hemde bir prokarsinojenin metabolizmasında rol oynuyorsa, ilgili enzim için düşük aktiviteli fenotipe sahip bir birey karsinojen maddeye maruz kaldığında dezavantaj prokarsinojene maruz kaldığında ise bir avantaj teşkil edecektir (2, 40). Herhangi bir karsinojen ile karşılaşıldığı zaman sırasıyla organizmada gelişen karsinojenez prosesi ve bu karsinojenezde enzimlerin fonksiyonları şekil 2 ve şekil 3 de ayrıntılı biçimde gösterilmiştir.

Şimdiye kadar ksenobiotiklerin biotransformasyonları gerçekleşirken birtakım enzimlerin bu reaksiyonlarda katalizör görevi gördüklerinden söz ettik. Bu metabolizmaya katılan faz 1 ve faz II enzimlerini kısaca aşağıdaki gibi sınıflandırabiliriz (Tablo1).

**Tablo 1:** Ksenobiotik metabolizmasına katılan enzimler

**FAZ I  
ENZİMLERİ**

**1.Oksidoredüktazlar**

1. Sitokrom P450
2. Flavin monooksijenazlar
3. Prostaglandin sentetaz
4. Dihidrodiol Dehidrojenazlar
5. DT-Diaforaz (NQO1)
6. Alkol dehidrojenazlar

**2.Hidrolazlar**

- 1.Epoksid hidrolazlar
- 2.Esterazlar/Amidazlar
- 3.Glukuronidazlar

**FAZ II  
ENZİMLERİ**

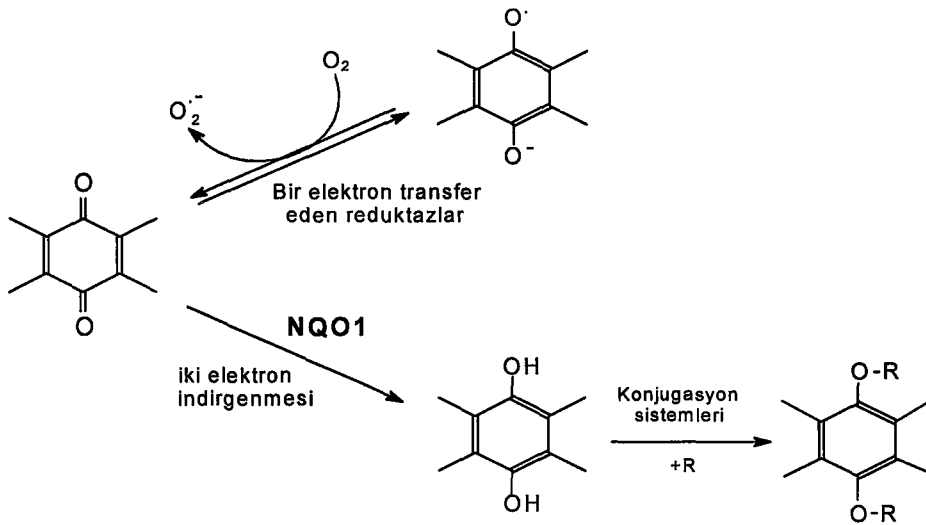
**1.Transferazlar**

1. Glutation S-transferazlar
2. UDP-Glukuronosiltransferlar
3. Sülfotransferazlar
4. Asetiltransferazlar
5. Metiltransferazlar
6. Aminoasiltransferazlar

## 2.4. Kinon Oksidoredüktazlar

Son derece reaktif bileşikler olan kinonlar doğada yaygın bir dağılıma sahip olduklarından insanların bu bileşiklere maruz kalma olasılıklarında bir o kadar fazla olmaktadır. Bu bileşikler otomobil eksozu, sigara dumanı ve şehir havası içinde bol miktarda bulunabildiği gibi yediğimiz çoğu yiyeceğin içinde de doğal olarak bulunabilmektedirler. Ksenobiotikler organizmada birtakım enzimler vasıtasıyla metabolize edilirler. Kinoid yapıdaki bileşiklere özgü enzimler kinonlarla reaksiyona girerek bu maddelerin bir veya iki elektronlarının indirgenmesine neden olurlar. Günümüzde kinon çekirdeği içeren bileşikler genellikle antitümör ajan olarak kullanıldıkları için kinon metabolizmasında yer alan enzimlerde oldukça önem kazanmıştır (22, 23).

Ksenobiotik metabolizmasına katılan enzimler içinde Sitokrom P450 (CYP1A1 ve CYP1A2), sitokrom P450 redüktaz, ubikinon oksidoredüktaz, ksantin oksidoredüktaz gibi enzimler kinon ve kinon türevlerinden bir elektronun indirgenmesini katalize ederek semikinon (serbest radikal) bileşiklerinin oluşmasına neden olurlar (şekil 4). Oluşan semikinon bileşikleride serbest oksijen varlığında redoks siklusuna girerler böylelikle elektrofilik ve oksidatif stres, DNA hasarı, lipid peroksidasyonu, membran hasarı, sitotoksisite ve neoplazi gibi olaylara neden olan yüksek derecede reaktif oksijen türlerini oluştururlar (22, 23).

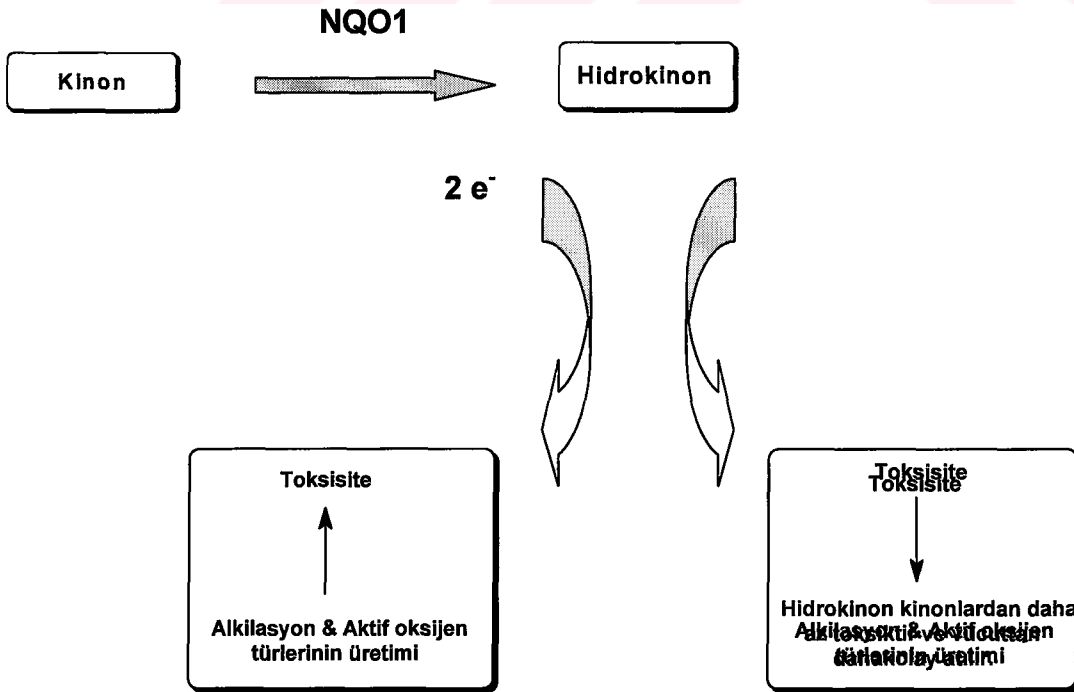


**Şekil 4.** Kinon yapısındaki bileşiklerden bir ve iki elektron indirgenme reaksiyonlarının şematik gösterimi.

Redoks siklusu reaktif türlerin oluşmasına neden olmasına karşın organizma bu durumu kompanse edebilmek için bir çeşit savunma mekanizması geliştirmiştir ki bunu da Süperoksit Dismütaz, Katalaz ve Glutation Peroksidaz gibi hücrel savunma elemanları tarafından bu ürünlerin toksisitelerini sınırlayarak gerçekleştirir.

Kinonlardan iki elektron indirgenmesini ise kinon oksidoredüktazlar katalize eder (Şekil 4). Kinon yapısındaki bileşiklerden iki elektronun indirgenmesi sırasında bir elektronun indirgenmesiyle oluşan semikinon bileşikleri ve reaktif oksijen türleri oluşmadığından dolayı hücreler kinon ve kinon bileşiklerinin zararlı etkilerine karşı korunmuş olur. Bununla beraber iki elektronun indirgenmesi sonucu oluşan bazı hidrokinon bileşikleri ise otoksidasyona girerek reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturabilir ve hücrel toksisiteye neden olabilir. Özetlersek kinon oksidoredüktazlar kinon ve kinon türevi bileşiklerin iki elektronlarını indirgemek suretiyle bu bileşiklerin deaktivasyonlarında olduğu gibi aktivasyonlarında da rol oynayabilmektedirler (23) ( Şekil 5 ).

**Şekil 5.** Kinonların aktivasyonu ve deaktivasyonu



İnsanlarda kinon oksidoredüktazların NAD(P)H:kinon oksidoredüktaz 1 (NQO1) ve NRH:kinon oksidoredüktaz 2 (NQO2) olmak üzere iki sitosolik formu mevcuttur (23). Son zamanlarda çalışmalar özellikle NQO1 üzerinde yoğunlaşmıştır. Enzim yaklaşık kırk yıllık bir geçmişe sahiptir. İlk olarak Lars Ernster tarafından 1960'da kısmi olarak saflaştırılıp bazı özellikleri tanımlanmıştır. Enzim önceleri NADH (DPN (difosfopiridin nükleotid)) ve NAD(P)H (TPN (trifosfopiridin nükleotid)) aracılığıyla kinonların ve diğer elektron akseptörlerinin indirgenme reaksiyonlarını katalize ettiği için DT-diaforaz olarak anılmaktaydı (8, 34). Daha sonra ise resmi olarak adlandırılarak NAD(P)H: (kinon-akseptör) oksidoredüktaz adını almıştır. Zaman içinde bu enzim için birçok isim kullanılmaya başlanmıştır bunlardan birkaçı aşağıda belirtilmiştir.

NAD(P)H: kinon oksidoredüktaz 1 (NQO1)

NAD(P)H: kinon akseptör oksidoredüktaz 1

NAD(P)H: kinon redüktaz1

Nikotinamid-kinon oksidoredüktaz 1

Kinon akseptör oksidoredüktaz (QOA)

NAD(P)H: menadion oksidoredüktaz (NMOR)

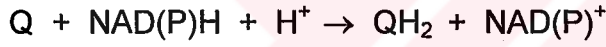
Menadion redüktaz

Vitamin K redüktaz v.b.(8)

NAD(P)H: kinon oksidoredüktaz 1 (NQO1)'ın keşfinin ardından yapısal olarak NQO1'a çok benzeyen flavoprotein yapısında olan ikinci bir enzim tanımlandı ve NRH: kinon oksidoredüktaz 2 (NQO2) olarak isimlendirildi. İlk kez 1960 yıllarının başlarında Liao ve William-Ashman tarafından keşfedilen bu enzim NQO1'dan farklı olarak NADH, NAD(P)H ve nikotinamid mononükleotid (NMNH) gibi fosforillenmiş hidrid donörlerini kullanmaksızın N-ribozil ve N-alkil-dihidronikotinamidler aracılığıyla menadion ve diğer kinonların indirgenmesini katalize eder. Ayrıca NQO1, bir antikoagülan olan Dikumarol tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilirken NQO2'nin Dikumarol tarafından inhibisyonu çok düşüktür. Buna karşın NQO2 polisiklik hidrokarbonlar ve östrojenler tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilir (8,13). NQO2, NQO1 ve diğer faz II enzimleriyle birlikte bir indüksiyon göstermez.

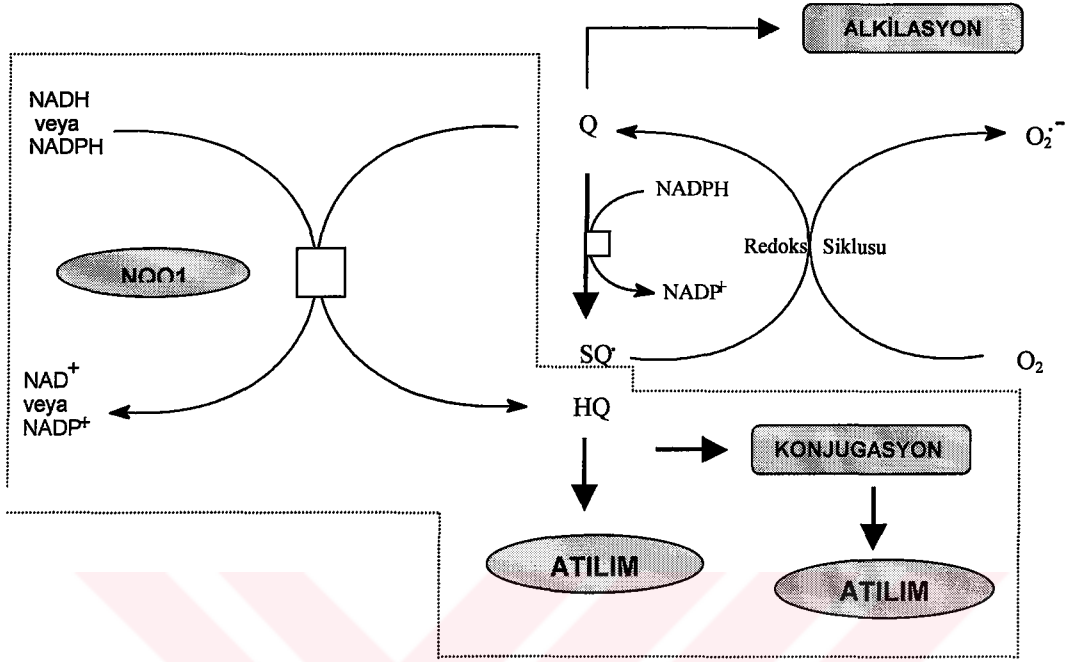
Diğer enzime olan üstünlükleri ve biyolojik fonksiyonları nedeniyle NQO'ların farklı sitosolik formları içerisinde en çok çalışılan enzim NQO1'dir. Kırk yılı aşkın süredir enzimin mekanizma reaksiyonları, biosentezi, indüksiyonu, kinon türevi oksijen radikallerinin mutajenitelerine ve sitotoksitelerine karşı koruyucu rolü ve vitamin K'ya bağlı protein karboksilasyonundaki fonksiyonları üzerine çalışılmıştır (34). Son zamanlarda ise enzim üzerindeki polimorfizm ve bu polimorfizmin kanser ile ilişkisi üzerinde çalışmalar oldukça yoğunlaşmıştır.

Kofaktör olarak FAD içeren bir flavoprotein olan NQO1, kinon ve kinon türevlerinden iki elektron indirgenmesini katalize etmek suretiyle bu maddelerin detoksifikasyon ve aktivasyon metabolizmalarına katılır. Enzim iki elektronun indirgenmesini, bir elektronun indirgenmesini katalize eden CYP P450 ve P450 redüktaz gibi enzimlerle yarışmak suretiyle gerçekleştirir. Oluşan stabil hidrokinon bileşikleri ise glutation ve UDP-glukuronik asid gibi maddelerle konjugasyona girerek kolaylıkla vücuttan dışarı atılır (22) (Şekil 6).

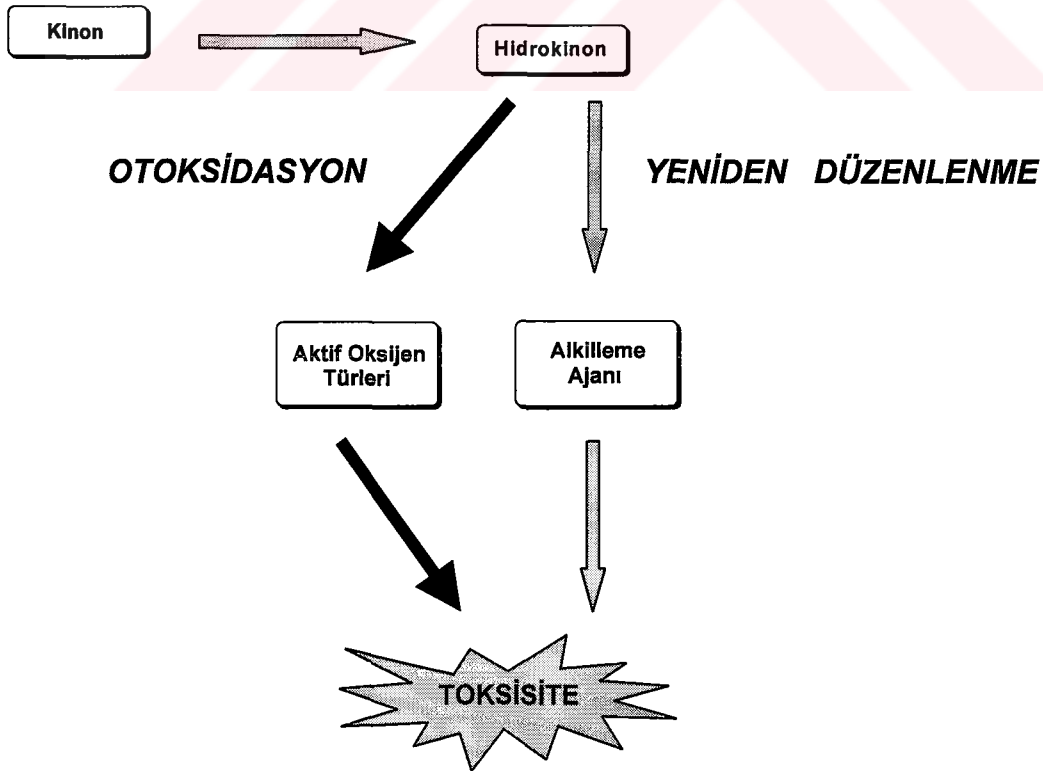


NQO1'in direkt olarak iki hidrid transferi ile kinonları indirgediği düşünülmektedir. İndirgenme bir hidridin NAD(P)H'dan FAD'a diğerinin ise FADH<sub>2</sub> 'den kinona aktarılmasıyla gerçekleşir (13). Reaksiyon sonucunda hidrokinon bileşikleri oluşur bu bizim için bir avantajdır çünkü semikinon bileşikleri (serbest radikaller) ve reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species (ROS)) oluşmadığından kinon ve kinon türevlerinin bu bileşiklerden kaynaklanan yan etkiler gözlenmez. NQO1'nin kimyasal toksisiteyi ve karsinogeniteye karşı koruyucu bir rol oynaması son zamanlarda ilgilerin odağı olmasına neden olmuştur. Yapılan aktivite çalışmaları sonucunda enzim aktivitesinin, yüksek derecede reaktif kinon metabolitlerinin oluşumunu önlediği, benzo(a)piren-kinonları detoksifiye ettiği ve krom toksisitesini azalttığına anlaşılmada koruyucu etkisinin varlığını desteklemektedir (22)

**Şekil 6.** Kinonların detoksifikasyonunda NQO 1'inin rolü



**Şekil 7:** Kinonların NQO1 tarafından aktivasyonu



Normal şartlar altında indirgenme sonucunda oluşan hidrokinonlar konjugasyona uğrayarak organizmadan atılırlar. Başka bir deyişle detoksifiye olurlar (Şekil 6). Fakat bazı durumlarda oluşan hidrokinonlar otoksidasyon reaksiyonlarına girerek reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına neden olurlar ve böylelikle doğrudan doğruya DNA'yı alkilleyebilirler. Demek ki NQO1 bileşiğinin detoksifikasyonunda etkili olabileceği gibi bileşiğinin toksik formunu oluşturmak suretiyle aktivasyonunda da etkili olabilmektedir (Şekil 7). Enzimin bazı bileşiklerin aktivasyonundaki önemi göz önünde tutularak yapılan çalışmalar sonucunda NQO1'nin belirli kanser tiplerinde normal dokulara oranla daha fazla eksprese edildiği saptanmıştır. Bu fonksiyonlarından dolayı bioredüktif kemoteropötik ajan olarak kullanılmaktadır. Ama yine de enzimin ilaçların metabolik aktivasyonundaki rolü tartışmaya açık bırakılmıştır.

Enzimin en güçlü inhibitörü DİKUMAROL'dur. Dikumarol'un yanısıra warfarin ve inandion gibi diğer antikoagülanlar tarafından da inhibe edilir ve bu inhibisyonu, elektron donörleri olan NAD(P)H ve NADH ile yarışmak suretiyle gerçekleştirir. Enzim vitaminK ile reaksiyona girip aktif formu olan hidrokinon formuna dönüştürerek protrombin sentezinde katalizör olarak rol oynar. Enzimin Dikumarol'a ve diğer antikoagülanlara karşı olan bu hassasiyeti, dikkatlerin enzimin Vitamin K' ya bağlı protrombin ve posttranslasyonel karboksilasyona katılan diğer proteinlerin biosenteziyle olası ilgisi üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur (34).

NQO1 polisiklik aromatik hidrokarbonlar, fenolik antioksidanlar, azo boyaları, oksidanlar, ağır metaller, UV ışık, iyonize radyasyon ve ksenobiotikler tarafından indüklenebilen bir enzimdir (8, 25, 34). İndüksiyon NQO1'a özgü bir olay değildir. Bu şekilde indüklenebilen iki düzineden fazla gen mevcuttur. Ksenobiotik organizmaya girdiği andan itibaren hücrel savunma mekanizması aktif olarak işlemeye başlar. İşte bu savunma mekanizması içinde NQO1'da önemli bir fonksiyona sahiptir.

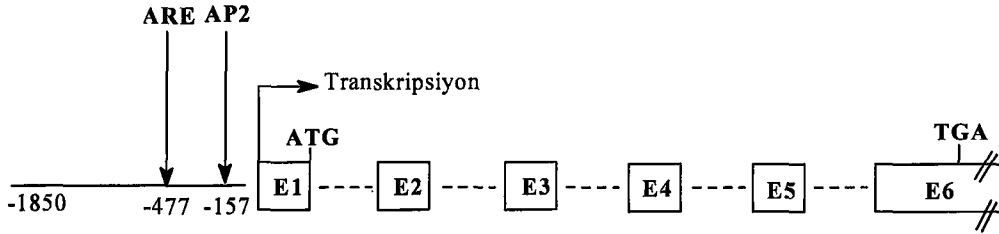
NQO1 ile koordine bir şekilde indüklenen genler içinde; glutation ile reaktif oksijen türleri ve hidrofobik elektrofiller arasındaki konjugasyonu katalize eden **Glutation-S-transferazlar (GST)**'ı kodlayan genler, vucuttan hızlı bir şekilde atılmaları için ksenobiotikler ve ilaçlar ile glukuronik asit konjugasyonunu katalize eden **UDP-glukuronosil transferazlar (UDP-GT)**'ı kodlayan genler, epoksitleri inaktif hale getiren epoksit hidrolaz'ı kodlayan genler ve glutation metabolizmasının düzenlenmesinde anahtar rolünü üstlenen  **$\gamma$ -glutamilsistein sentetaz ( $\gamma$ -GCS)**'ı kodlayan genler sayılabilir. Bu genlerin koordine olarak indüksiyonları sonucunda, serbest radikallerin zararlı etkilerine, oksidatif strese ve neoplaziye karşı hücre korunmuş olur. Enzimin indükleyicilerinden olan Fenolik antioksidanlar , polisiklik aromatiklerden, TCDD ve azo boyalarından radikal olarak farklıdır. Fenolik antioksidanlar monofonksiyonel bileşiklerdir ve fonksiyonel aril hidrokarbon reseptörlerine (Ahr) gereksinim duymaksızın faz II enzimlerinin indüksiyonuna neden olurlar. Aromatikler ise bifonksiyonel bileşikler olup fonksiyonel Ahr'lere bağlı olarak faz I ve faz II enzimlerinin indüksiyonunda görev yaparlar. Özellikle kanser tedavisinde kullanılacak chemoprotector seçiminde Ahr'ye bağlı Sitokrom P450 tarafından karsinojenin aktivasyonunda rol alması muhtemel olmadığı için monofonksiyonel indükleyiciler, bifonksiyonel indükleyicilere göre daha avantajlıdır.

NQO1 doğrudan doğruya kinon detoksifikasyonunda rol oynadığı gibi dolaylı olarak hücrelerin tüm antioksidan fonksiyonlarını desteklediği ileri sürülmektedir. NQO1 koenzimQ (ubikinon) redüktaz gibi etki göstererek doğal antioksidanları (Vitamin E ve Koenzim Q gibi) indirgenmiş formlarında tutar. Böylelikle hücre membranını serbest radikallerin etkilerinden korur.

Genin indüksiyonu ve ekspresyonu için genin promotor bölgesinde yer alan bir takım esansiyel cis-elementler tanımlandı. Bu elementlerden biri ksenobiotiklere, antioksidanlara ve oksidanlara maruz kalındığında genin indüklenmesi için ve bazal ekspresyon için gerekli olan Antioksidan Response Elementtir (ARE). Diğer elementler ise genin TCDD'ye maruz kalması sonucunda indüklenmesi için gerekli olan bir DNA fragmanıdır ve son olarak bazal bir element ve c-AMP indüksiyonu ile genin eksprese olması için esansiyel olan AP-2 elementidir (Şekil 8).

## Şekil 8. NQO1geni

### NQO1 Geni



### İnsan NQO1 Geni ARE bölgesi

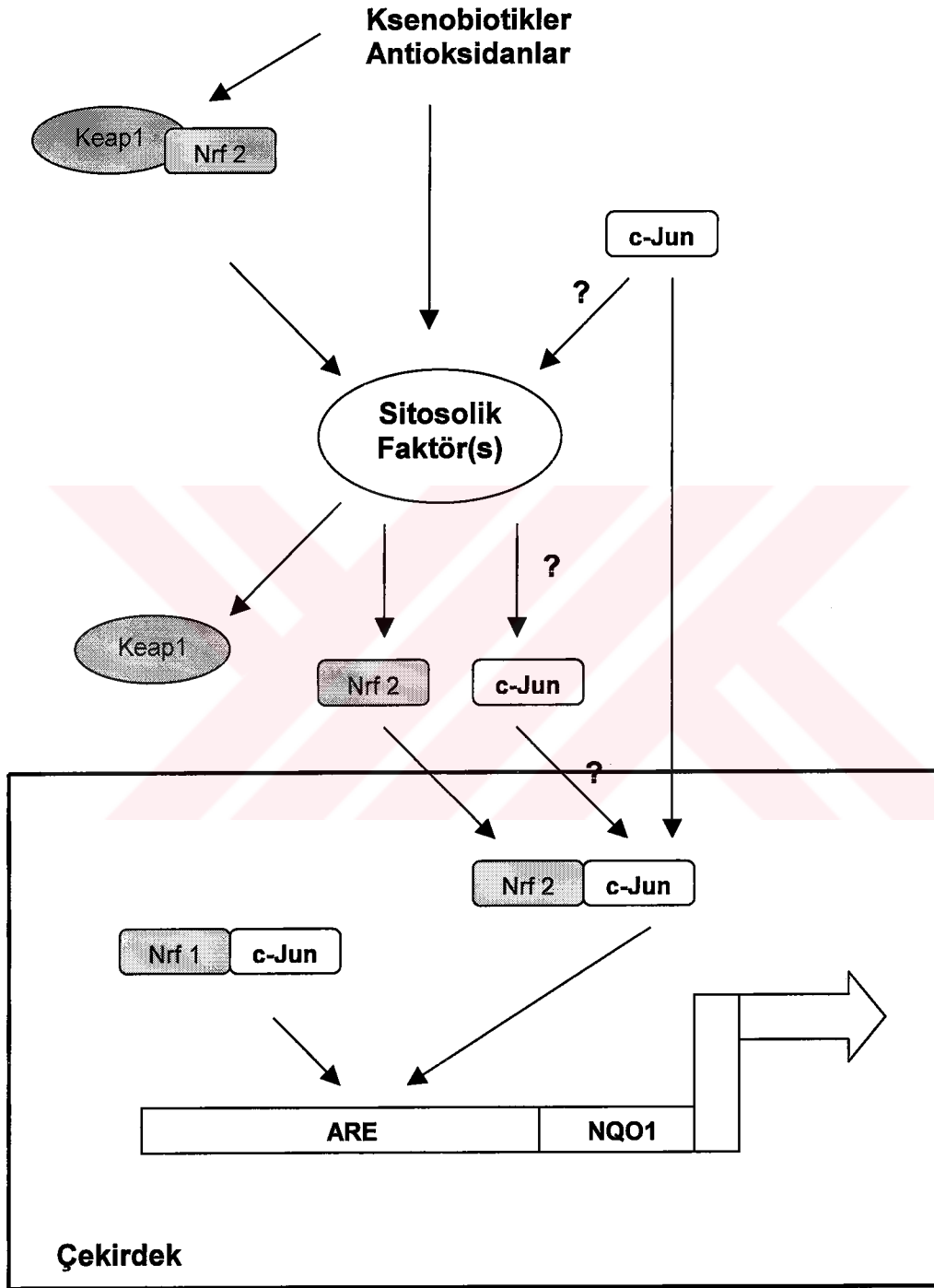
-477



-448

ARE'ler analiz edildiğinde nükleer bir protein kompleksine bağlanırlar. Oluşan ARE-nükleer protein kompleksi c-Jun, Jun B, Jun D, c-Fos, Fra1, Nrf1, Nrf2, YABP, ARE-BP1, Ahr ve östrogen reseptörleri gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerini içerir. Fakat bunlardan sadece c-Jun, Jun B, JunD, c-Fos, Fra1, Nrf1, Nrf2'nin insan NQO1 geninin ARE'sine bağlanabilmektedir. Organizma ksenobiotiklere ve antioksidanlara maruz kaldıktan sonra Nrf1 ve Nrf2 ARE aracılığıyla gen indüksiyonunu ve ekspresyonunu positif olarak regüle eder. Sitoplazmadaki Nrf2 normal şartlar altında Keap1 adlı sitosolik bir faktör tarafından alıkonmuş durumdadır. Hücre ksenobiotik yada antioksidana maruz kaldığında Nrf2 Keap1'den ayrılır ve Nrf2 çekirdek içinde translokasyona uğrar. Ardından c-Jun ile heterodimerize olup ARE'ye bağlanır ve genin ekspresyonuna yada indüklenmesine neden olur. C-Jun Nrf2 ile dimerize olmadan önce sitosolik faktörler tarafından bazı modifikasyonlara katılabilir fakat bu olay çok az olması muhtemel bir şeydir çünkü kimyasallara maruziyet sonucunda c-Jun ekspresyonu belirgin bir şekilde artmaktadır. Ayrıca diğer transkripsiyon faktörlerinden Nrf1'in Nrf2 gibi, JunB ve JunD'nin de c-Jun gibi benzer bir olayda rol oynadığı düşünülmektedir (22) (Şekil 9).

**Şekil 9.** Ksenobiotik ve antioksidanlar tarafından NQO1 gen ekspresyonunun aktivasyonu



## 2.5. NQO1 Polimorfizmi ve Akciğer Kanseri

Günümüzde kanser insan hayatını ciddi boyutta tehdit eden olguların başında gelmektedir. Özellikle gelişmiş ülkelerde ölüm nedenleri içinde geniş bir yüzdeye sahiptir (16, 33). Kanser oluşumunun nedenleri multifaktöryeldir. En büyük grubu, olguların %50'sini kapsayan diyet ile ilgili faktörlerin oluşturduğu ve bunu sigaranın (%35) izlediği bilinmektedir. Mesleki olarak karsinojenlere maruz kalma %5'lik bir oranı kapsarken %10'luk bölümü ise virüslerin, çeşitli genetik faktörlerin ve gelişen birçok spontan mutasyonel olayın sorumlu olduğu düşünülmektedir (63).

Yoğunlaşan kanser araştırmaları sırasında çevresel karsinojenlerin detoksifikasyon yada aktivasyon reaksiyonlarını katalize eden enzimleri kodlayan genler üzerinde bir takım genetik farklılıkların olduğu saptandı ve ardından bu genetik farklılıkların kanser oluşumu ile yakından ilgili olabileceği fikri ortaya atıldı. Bunun üzerine enzim aktivitesinde değişikliklere neden olan genetik polimorfizmler ile kanser arasındaki olası ilişki araştırılmaya başlanmıştır (5, 33).

Polimorfizm, bir populasyondaki aynı lokusda birden fazla allelin mevcudiyeti sonucunda birden fazla fenotipin ortaya çıkmasına neden olan monogenik bir özelliktir. Farmakogenetik polimorfizmler ksenobiotik metabolizmasıyla ilgilidirler ve genotipteki bu farklılaşmalar fenotipe yansındıklarında enzim aktivitelerinde değişikliklere neden olurlar.

Farmakogenetik çalışmalar 1950'li yıllarda Glukoz 6-fosfat dehidrojenaz, psödokolinesteraz enzimlerindeki değişiklikler ve izoniazid uygulanması sonucu N-asetiltransferaz eksikliğinin keşfiyle birlikte başlamıştır ve ardından 1957'de Vogel ilk kez farmakogenetik terimini kullanmaya başlamıştır (2). Klinik tıpta en azından beş düzine farmakogenetik polimorfizm tanımlanmıştır. Bu polimorfizmlerin çoğu bireylerin toksisite veya kansere genetik yatkınlıklarındaki farklılıklardan sorumludur (42). Özellikle ilaç metabolize eden enzimleri kodlayan genler üzerindeki polimorfizmler ilacın yan etkilerinin gözlenme riskini etkileyebilir veya bireyin ilaç ile tedavi etkinliğini değiştirebilir.

Genetik polimorfizmler birtakım ilaçların hızlı yada yavaş metabolize edilmelerine ve ilacın toksisitesinde değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Bu bilgi çerçevesinde, bazı bireylerde niçin ilacın etkinliğinin daha az veya toksisitesinin daha fazla olabileceği konusudaki belirsizlikler kısmen açıklanabilmektedir. Farmakogenetik çalışmalar sayesinde gelecekte ilaçla tedavi bireye göre optimize edilerek tedavide daha pozitif sonuçlar elde edilebilecektir (36).

Genetik polimorfizmler temel olarak aminoasit sübstütisyonları ile ilgilidirler. Bir aminoasit sübstütisyonu içeren genin ekspresyonu sonucunda normalden farklı bir ürün elde edilir. Örneğin eğer genin ürünü bir enzim ise genin yapısındaki bu değişiklik enzim aktivitesinin azalmasına yada aktivitenin tamamıyla kaybolmasına neden olabilir. Bunun sonucu olarak organizmaya giren ksenobiotiklerin biyotransformasyonlarında farklılıklar meydana gelir. Buradan yola çıkarak yapılan araştırmalarda genetik polimorfizmlerin bireylerin belirli kanser türlerine yatkınlıklarını belirleyebileceği ileri sürülmektedir .

Ksenobiotik metabolizmasını katalize eden enzimler arasında NQO1, Glutation S-transferazlar (GST), N-asetiltransferazlar(NAT), Sitokrom P450 (CYP450) enzim sistemleri sayılabilir. NQO1, 16. kromozomun 16q2.2 bölgesinde lokalize olmuş olan ve NQO1 geni tarafından kodlanan kofaktör olarak FAD ( flavinadenindinükleotid ) içeren bir flavoproteindir ( 6, 24, 55, 57, 69 ). Enzim, kinonların hidrokion bileşiklerine dönüşümünü katalize ettiği ve oksijen radikallerinin oluşumunu azaltarak kinon-DNA eklentilerinin oluşumunun önlediği için dikkatleri üzerinde toplamıştır.

İlk kez 1980'de Edwards ve arkadaşları ingiliz toplumunun yaklaşık %4'nün NQO1 enzim aktivitesinden yoksun olduğunu saptadılar (15, 65). Fakat o zamanlarda mevcut bilgiler ışığında bu genetik farklılığa mantıklı bir açıklama getirilemedi ve bunun üzerine enzim ile ilgili çalışmalar hız kazandı. İleriki yıllarda enzimatik aktivitedeki bu değişikliğin genetik bir farklılıktan kaynaklanabileceğini düşünerek gen üzerinde polimorfizm araştırmalarına başlandı.

Gen üzerinde bir polimorfizmin yer alabileceği başlıca üç bölge vardır: 5' ucunda ARE ve XRE'ler için bağlanma alanı içeren bölge, transle edilmeyen 3' bölgesi ve son olarakta gen içindeki herhangi bir bölge. 3' ve 5' bölgelerinde yapılan araştırmalar sonuçsuz kalmış olmasına karşın gen içinde yapılan araştırmalar olumlu sonuçlar verdi. İlk kez 1992'de Traver ve arkadaşları kolon karsinoma hücre gruplarında enzim aktivitesinin azalmasına neden olan ve genin 6. eksonunda yer alan bir nokta mutasyonu bildirdiler (15, 53). 6. eksonun 609. baz çifti üzerindeki bir C→T süstitüsüyonu sonucunda polipeptid zincirinin 187. aminoasidi olan prolin yerine serinin kodlanmakta ve bu aminoasit değişikliği enzim aktivitesinde değişmesine neden olmaktadır (15, 22, 33, 53).

1995 yılında ise Pan ve arkadaşları aynı genin 4. eksonu üzerinde ikinci bir C→T süstitüsüyonu belirlediler. Bu polimorfizm de diğer polimorfizm gibi enzim aktivitesini değiştirecek bir aminoasit değişikliğine sebebiyet vermektedir. Bu kez polipeptid zincirinin 139. aminoasidi olan arginin yerine triptofan sentezlenerek enzim aktivitesinde belirgin bir azalma olmaktadır. Aminoasit değişikliği enzim aktivitesinde belirgin bir azalmaya neden olmasına rağmen bu mutasyonun etkisini değerlendirmek oldukça zordur çünkü henüz toplumlara ait hiçbir allel frekansı bildirilmemiştir (15).

NQO1 geni üzerindeki bu iki mutasyon sonucunda üç allel oluşmaktadır. NQO1 allel nomenklatürü aşağıdaki gibidir:

NQO1\*1 → Arg 139/Pro 187

NQO1\*2 → Arg 139/Ser 187

NQO1\*3 → Trp 139/Pro 187

Son epidemiyolojik çalışmalar, akciğer kanser riski ile bu polimorfizmler arasında bir ilişkinin açığa kavuşmasında ve akciğer kanserine yatkınlığın belirlenmesinde NQO1'nin aktif bir rol oynadığı yönündedir. Kansere yatkınlıktaki olası rolü göz önünde tutularak yapılan epidemiyolojik çalışmaların hepsi aynı sonuca varmamasına rağmen lösemi, ürolojik bozukluklar ve akciğer kanserinde NQO1 polimorfizminin frekansında bir artış bulunduğunu göz ardı etmemek gerekir. Yine bazı çalışmalarda NQO1 enzim aktivitesinden yoksun yada enzim aktivitesi düşük olan bireylerin habis tümör gelişimine yatkınlıklarının daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (33).

Enzimin tüm dokularda bulunması enzimle ilgili çalışmalarında olumlu yönde etkilemiştir. Farklı bireylerdeki, aynı bireylerin farklı dokularındaki, normal ve tümör dokuları arasındaki enzim aktiviteleri ayrı ayrı incelendiğinde her örnek grubu için enzim aktivitelerinde belirgin farklılıklar gözlenmiştir. Özellikle hepatik ve kolon orijinli tümör dokularında aynı orijinli normal dokulara nazaran NQO1 gen ekspresyonunun daha yüksek düzeyde olduğu aynı zamanda tümör dokusunu çevreleyen normal dokularda da ekspresyonun artmış olduğu belirlenmiştir. Bu nedenlerden dolayı enzimin tümörün gelişiminde önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir.

Enzim aktivitesi farklı tümör dokularında incelenmiş ve karaciğer, kolon, göğüs, beyin ve akciğer tümör dokularında yüksek fakat mide ve böbrek tümör dokularında ise aktivitenin düşük olduğu saptanmıştır.

Epidemiyolojik çalışmalar akciğer kanserinin major bir nedeninde sigara dumanı olduğunu göstermektedir. Sigara dumanı polinükleer aromatik hidrokarbonlar, N-nitrosoaminler, aromatik aminler ve heterosiklik aminler gibi birçok karsinojen madde yönünden oldukça zengindir. NQO1 katalitik etkisi nedeniyle sigara dumanı içindeki karsinojen maddeleri metabolik olarak ya aktive eder yada detoksifiye eder. Genetik polimorfizmlerin akciğer kanserinin etiyolojisinde rol oynadığıda göz önünde tutulursa NQO1 üzerinde meydana gelebilecek herhangi bir polimorfizmde akciğer kanser riskini yakından ilgilendirecektir. Yapılan son çalışmalarda sigara dumanındaki prokarsinojenleri metabolizmasında görev alan enzimlerde bir aktivite değişikliğine neden olan polimorfizmlerin akciğer kanseri ile ilgili olduğunu göstermektedir.

NQO1 sigara dumanı içindeki önemli polinükleer aromatik hidrokarbonlardan biri olan benzo[a]pireni metabolize ederek benzo[a]piren kinon-DNA eklentisinin oluşumunu önlerken yine sigara dumanı içindeki 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]kinolin (IQ) ve 3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-b]indol adlı mutajenik ve karsinojenik heterosiklik amini metabolik olarak aktive eder. Bu açıdan bakıldığı zaman enzime bağlı olarak sigara dumanındaki maddelerin metabolize edilmesi sonucunda Akciğer kanser riskinin artıp artmadığı yada azalıp azalmadı daha doğrusu sigaraya bağlı olarak akciğer kanser riskini etkileyip etkilemediği belirsiz kalmaktadır.

Populasyon araştırmalarında her ne kadar farklı sonuçlar mevcut ise de bazı çalışmalar sonucunda  $^{609}C \rightarrow T$  polimorfizmi taşıyan bireylerin enzim aktivitelerinin düşük buna bağlı olarak akciğer kanser risklerinin de düşük ve Akciğer kanserli bireylerdeki mutant allel (NQO1\*2) frekansının kontrol grubuna oranla daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu verilere göre de NQO1 zerindeki bu genetik polimorfizmin bireyleri kanser riskine karşı koruduğu sonucuna ulaşılmaktadır.



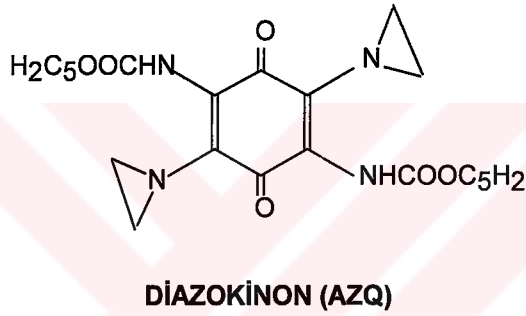
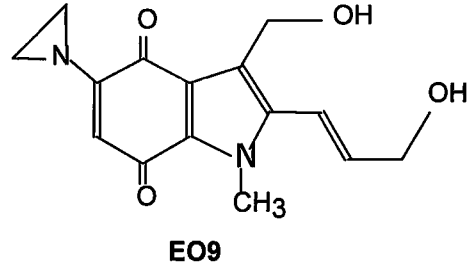
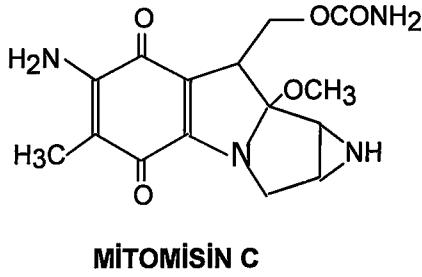
## 2.6.NQO1'nin etki mekanizmasına bağlı olarak ilaç geliştirilmesi

Alkilleme ajanları 1940'lardan bu yana kanser tedavisinde yoğun olarak kullanılmaktadır. Bu sınıfın bir üyesi olan kinon içeren alkilleme ajanlarına "Bioredüktif alkilleme ajanları" adı verilmektedir (3). Bioredüksiyonun sonucunda, enzimatik reaksiyona giren bileşiklerin kimyasal özelliklerine bağlı olarak ya alkilleme türleri yada aktif oksijen türleri oluşur (50). Kinon içeren alkilleme ajanlarının etkilerini gösterebilmeleri için mutlaka aktif şekillerine dönüştürülmeleri gereklidir. Bu noktada bu ilaçların aktivasyonunu sağlayan enzimler önem kazanmaktadır.

Enzime bağlı bioredüktif ilaç geliştirilmesi (enzyme-directed drug development) normal dokulara kıyasla tümör dokusunda daha fazla eksprese edilen redüktazların belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Bu konuda dikkat edilmesi gereken iki nokta vardır: bunlardan biri belirli redüktazlar tarafından indirgenerek aktive edilen yani bu enzim için bir substrat olan bileşiklerin tanımlanması diğeri ise tümör dokusunda yüksek miktarda bulunan redüktazın enzim profilinin belirlenmesidir (3).

Kinon içeren yeni alkilleme ajanlarının keşfi ve onların sonradan antikanser ilaç olarak geliştirilmesi uzun yıllar aktif bir araştırma alanı olmuştur. 1950'lerin sonlarında streptomyces türlerinden elde edilen mitomisinlerin izolasyonundan bu yana bileşiklerin yapıları çözümlenmiş, birçok analoğu sentezlenmiş, prelinik ve klinik çalışmaları yapılmıştır. Bu alandaki çalışmaların yoğun bir şekilde sürdürülmesine karşın mitomisinler ve onun analogları içinde sadece Mitomisin C klinik kullanıma sunulmuş durumdadır. Bioredüktif ilaçların prototipi olan Mitomisin C mide, pankreas, kolon ve meme kanserine karşı bir aktivite göstermekle birlikte asıl kullanım alanı ise küçük hücreli olmayan (non-small cell) akciğer kanserinin tedavisinde aktif olarak kullanılan tek ajandır. Ayrıca mesane kanserinde de lokal olarak kullanılmaktadır. Çok toksik bir bileşik olan Mitomisin C kemik iliği süpresyonuna neden olur. Bu nedenle toksik etkisi biraz olsun azaltılabilir ümidiyle aktif analoglarının araştırılması yoluna gidilmiş olup E09 (indolkinon), diazokinon (benzokinon (AZQ)) gibi birkaç analoğu sentezlenmiş ve bu analoglar halen klinik olarak çalışılmaktadır.

## Şekil 10. Mitomisin ve analogları



Bioredüktif ajan olarak geliştirilen bu ilaçların normal dokudan ziyade selektif olarak redüktaz düzeyinin yüksek olduğu tümör dokusu üzerine toksik olması istenir ve bu yönde iyileştirme çalışmaları yapılmaktadır. Bir flavoprotein olan ve kinonlardan iki elektron indirgenmesini katalize eden NQO1'nin özellikle akciğer, kolon ve meme tümör dokularında çok fazla eksprese edildiğinden antikanser ilaç gelişiminde özellikle NQO1 ile metabolize edilen yapılar baz alınarak çalışmalar ilerlemektedir. NQO1 kinonları, toksik semikinon radikallerinin oluşumunu engelleyerek hidrokinon formuna indirir. Fakat daha önceden de söz ettiğimiz gibi tüm hidrokinonlar redoks-stabil değildirler ve redoks-labil hidrokinonlar moleküler oksijen ile reaksiyona girerek semikinon ve reaktif oksijen türlerini oluşmasına neden olabilirler. Bu da eşittir hücrel toksisite!

NQO1'nın indirgeme özelliği kinon içeren alkilleme ajanlarının bioredüktif olarak aktive olmalarına neden olur. Biraz daha açarsak bu ilaçlar NQO1 tarafından indirgenerek aktif hale geçerler. NQO1 tarafından aktive olabilen bileşikler arasında mitomisin C, AZQ ve E09 gibi maddeleri sayabiliriz (Şekil10). Yapılan son çalışmalarda meme, Akciğer, kolon, CNS ve over tümör dokularındaki NQO1 aktivitesi ile antitümör kinonların sitotoksitesi arasında bir korelasyon olduğu bildirilmiştir.

NQO1 tarafından kinon içeren alkilleme ajanlarının güçlü bir şekilde aktivasyonu ve belirli kanser tiplerindeki NQO1 düzeyinin yüksek bulunması, araştırmacıları enzim ile etkin olarak aktive olabilen yeni ve daha az toksik bileşiklerin araştırılmasına teşvik etmektedir. Bugüne dek aktif olarak uygulamaya sunulan tek ajan Mitomisin C olmasına karşın bu konudaki çalışmalar halen devam etmektedir.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Örneklerin Toplanması

Bu çalışmada incelenen sağlıklı bireylere ait 166 kan örneği, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Fen Fakültesi Öğretim üyeleri, öğrencileri, çalışanları ve İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü çalışanları ile Türkiye'nin değişik bölgelerinden gelen bireylerden toplandı. Kan örnekleri 10ml'lik steril EDTA'lı tüplere aktarıldı ve DNA izolasyonu yapıldı. Çalışmaya dahil edilen bireylerin aralarında akrabalık ilişkisi bulunmamakta ve yaşları 18 ila 65 arasında değişmektedir. Türk Toplumunda genlerin frekanslarını en doğru şekilde belirlemek için cinsiyet dağılımında denge kuruldu ve Türkiye'nin her bölgesinden olabildiği kadar eşit sayıda denek çalışmaya dahil edildi. Tüm bireylere ait aile ağacı çizildi ve DNA bankası kurulması için gerekli bilgiler sigara kullanımı, ebeveynlerin doğum tarihi ve yerleri, kendilerinin ve aile fertlerinin geçirdiği kronik hastalıklara ait bilgiler toplandı. Bu çalışmada, 166 kontrol DNA örneği ile, İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü'nde teşhis ve/veya takip edilen akciğer kanserine yakalanmış 94 hastadan elde edilen kanlardan izole edilen DNA örnekleri incelenmiştir. Bütün hastalara Onkoloji Enstitüsü tarafından tutulan dosyalardan ayrı olarak, çalışma için gerekli bilgiler içeren bir form dolduruldu.

166 sağlıklı ve 94 akciğer kanserine yakalanmış hastaya ait, toplam 260 DNA örneğinde, NQO1 genindeki mutasyon, polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kullanılarak incelendi ve UV ile görüntülenerek değerlendirildi.

### **3.2. Kullanılan Gereçler**

1. Elektroforez için güç kaynağı (E-C Apparatus Corporation)
2. Görüntüleme Sistemi
3. Hassas terazi (Mettler AE 200)
4. Heat Block (Isı Bloğu) (VWR)
5. Manyetik karıştırıcı (ısıtıcılı)(Kermanlar)
6. Minijel elektroforez aleti (Stratagene)
7. Mikrosantrifuj (Eppendorf)
8. Orbital sallayıcı (Kermanlar)
9. PCR aleti (Thermal Cyclers) (Perkin Elmer)
10. pH metre (Corning)
11. Pipet takımı (Gilson)
12. Soğutmali santrifuj (Sorvall-1001,Bausch-Lomb)
13. Spektrofotometre (Jasco-7800,UV/VIS)
14. Su banyosu (Kermanlar)
15. UV transilüminatör (Foto-Dyne)
16. Vorteks (Kermanlar)
17. Polaroid kamera

### **3.3. Kullanılan Kimyasal malzemeler**

#### **3.3.1. Kimyasal Maddeler**

1. Agaroz (Sigma A-9539)
2. Amonyum asetat (Sigma A-8920)
3. Amonyum klorür (Sigma A-5666)
4. Asetik asit (Glasiyal) (Sigma A-6284)
5. Borik asit (Sigma B-3269)
6. Bromfenol mavisi (Sigma B-3263)
7. dNTP seti (MBI Fermantas)
8. Etilendiamintetraasetik asit dihidrat (EDTA-dihidrat) (Sigma E-5134)
9. Etanol (%95) (Merk-986)
10. Etidyum bromür (Sigma E-7637)

11. Hidrojen peroksit (%35) (Merk-8600)
12. Mineral yağ (Perkin Elmer)
13. Potasyum bikarbonat (Sigma P-4913)
14. Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma L-4340)
15. Sodyum hidroksit (Sigma S-5881)
16. Sodyum klorür (Sigma S-3014)
17. Tris baz (Sigma T-8524)

### 3.3.2. Kullanılan Enzimler:

1. Proteinaz-K (Boehringer Mannheim 1000144)
2. Taq polimeraz (MBI EPO 282)
3. Hinf 1 (MBI Fermentas)

### 3.3.3. Kullanılan Primerler:

PA-F : 5'-TCC TCA GAG TGG CAT TCT GC-3'

PA-R : 5'-TCT CCT CAT CCT GTA CCT CT-3'

PA-F, PA-R , kullanılan primerlere verdiğimiz isimlerdir ve Prizma ltd. tarafından sentez edilmiştir.

### 3.3.4. Kullanılan Diğer Maddeler:

DNA size Marker ( pUC mix 8, MBI Fermentas)

## 3.4. Kullanılan Çözeltiler

### 3.4.1. DNA izolasyon çözeltileri

#### 3.4.1.1. Kırmızı Kan Hücrelerini Parçalama Çözeltisi (Lysis buffer)

1. NH<sub>4</sub>Cl :8.74g  
KHCO<sub>3</sub>: 1g  
EDTA: 200µl(0.5 M'lik EDTA'dan alınır.)
2. Tartımları yapıp mezür içine konuldu ve su\* ile 1 lt'ye tamamlandı.
3. pH'sı 1N NaOH ile 7.4'e ayarlandı.
4. 120 °C'de, 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.
5. +4 derecede saklanır.

#### **3.4.1.2. EDTA Çözeltisi (0,5 M-pH 8.0)**

1. Disodyum etilendiamintetraasetat . 2H<sub>2</sub>O: 186.1g
2. Beher içine alındı ve su ile 800ml'ye tamamlandıktan sonra manyetik karıştırıcı yardımı ile çözündürüldü.
3. pH'sı NaOH ile 8.0'e ayarlandı(≈20 g NaOH) ve su ile 1000 ml'ye tamamlandı.
4. 120 °C'de, 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

#### **3.4.1.3. NaCl Çözeltisi (4M)**

1. NaCl : 233.6g
2. Tartıldıktan sonra mezür içine konuldu, 800 ml su ilave edildikten sonra tamamen çözülene kadar manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırıldı ve su ile 1 lt'ye tamamlandı.
3. 120 °C'de, 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Oda ısısında saklanır.

#### **3.4.1.4. Beyaz Kan Hücrelerini Parçalama Tamponu (White Blood Cell Lysis Buffer) (WBL)**

1. NaCl (4M) : 10 ml  
EDTA (0.5M) : 20 ml
2. Mezür içine konulur, su ile 400 ml'ye tamamlandı.
3. 120 °C'de, 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında saklanır.

#### **3.4.1.5. Proteinaz-K Çözeltisi**

1. Proteinaz-K: 0.02g, su ile 1 ml'ye tamalandı.

#### **3.4.1.6. Tris-HCl Tamponu (1M)**

1. Tris baz : 121.1g  
HCl : 42µl
2. Mezür içine aktarıldı ve su ile 1 lt'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözündürüldü.

#### **3.4.1.7. TE (Tris-EDTA) Tamponu**

1. Tris HCl(1M): 10 ml  
EDTA(0.5M): 20 ml
2. Mezür içine aktarıldı ve su ile 1 lt'ye tamamlandı.
3. 120 °C'de, 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

#### **3.4.1.8. Amonyum asetat çözeltisi (9.5M)**

1. Amonyum asetat : 73,226g
2. Beher içine alındı, su ile 100 ml'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözündürüldü. (Manyetik karıştırıcı'nın ısı ~ 40 °C olmalıdır.)
3. 0.22 mikron'luk filtreden geçirilerek sterilize edildi.
4. +4 derecede saklanır.

#### **3.4.1.9. %10 SDS Çözeltisi (Sodyum Dodesil Sülfat)**

1. SDS : 10g tartıldı.
2. Dikkatlice Beher içine alındı ve SDS tozlarını kaldırmamaya dikkat edilerek üzerine su eklenerek ve 100 ml'ye tamamlandı.
3. 56 °C'de bekletmek kaydı ile çözündürülür. [Ya da iyice solüsyona geçmesi için uzunca bir süre (1-2 saat) manyetik karıştırıcı'da çevrildi].
4. 0.22 mikron'luk filtreden geçirilerek sterilize edilir.
5. pH'sı 7.2'ye ayarlandı. Oda ısısında saklanır.

#### **3.4.2. Agaroz Jel Elektforezi Çözeltileri**

##### **3.4.2.1. Etidyum Bromür Çözeltisi**

Stok 10mg/ml olacak şekilde steril su ile 10ml hazırlandı.

##### **3.4.2.2. Agaroz Jel Yükleme Tamponu**

1. %0.25 bromfenol mavisi
2. %30 gliserol olacak şekilde steril su ile 10 ml hazırlandı.

### **3.4.2.3. 50 X TAE Tamponu (Tris-Asetik asid-EDTA)**

1. Tris baz : 242g  
Glasial asetik asid : 57.1ml  
EDTA(0.5M) : 100 ml
2. Mezür içine aktarıldı ve su ile 1 lt'ye su ile tamamlandı.
3. 120 °C'de, 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.
4. Oda ısısında saklanır.



### 3.5. Yöntemler

#### 3.5.1. DNA izolasyonu

10 ml venöz kan steril falkon tüpüne aktarıldı ve üzerine 1:3 oranında Lysis buffer (30ml) eklenerek, +4 derecede 15 dakika rotorda çevrildi. Rotordan alınan örnekler, +4 derecede 10 dakika, 1500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pelet tamamen süspansiyon edilerek üzerine 15-20ml Lysis buffer eklenip +4 derecede 10 dakika, 1500 rpm'de santrifüj edildi. Pelet tekrar süspansiyon edildi ve süspansiyon edilmiş örneğe %10'luk SDS'ten 500µl, 50 µl proteinaz-K ve 9.4ml WBL eklenerek 56 derecede bir gece inkübe edildi. Inkübasyon sonrası her bir milimetre solüsyon başına 0.37ml 9.5M Amonyum asetat eklenip (10ml örnek için 3.7ml 9.5 Amonyum asetat) iyice karıştırıldıktan sonra oda ısısında, 25 dakika, 3000 rpm'de santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü.

Süpernatant steril falkon tüplere aktarıldıktan sonra üzerine 1:2 oranında olacak şekilde %99'luk absölu alkol eklenerek DNA'nın çökmesi sağlandı. %70'lik alkol içinde yıkanan DNA örnekleri 1.5ml'lik Eppendorf tübünde bulunan 150-200 µl TE buffer içerisinde çözüldürüldü ve 56 °C'de bir saat bekletildi. Böylece bütünüyle çözeltiyeye geçen DNA +4 derecede saklandı.

#### 3.5.2. DNA Miktar Tayini

DNA örneklerinin saflık derecelerini belirlemek için, optik dansiteleri spektrofotometre de 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçüldü. Kör örnek olarak DNA'ların içinde çözüldürüldüğü TE kullanıldı. Her 15 µl'lik DNA örneği içinde 1485 µl TE bulunan eppendorf tüplere kondu ve pipet ile karıştırıldıktan sonra kuantal küvetlere aktarılarak spektrofotometrede ölçümleri yapıldı.

260/280 nm değerleri  $1.8 \pm 0.1$  olan örnekler polimeraz zincirleme reaksiyonunda kullanıldı. Ölçümleri yapılan DNA örneklerinin konsantrasyonları µg/ml olarak;

$A_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü} \times 50$  formülü ile hesaplandı.

Uygun DNA'lar ilgili lokusa spesifik primer dizileri kullanılarak Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile amplifiye edildi.

### 3.5.3. NQO1 Lokusunun Genotip Tayini

#### 3.5.3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

1980'li yıllarda California Üniversitesinde, bir grup bilimadamı toplanarak İnsan genom dizilişini bulmanın ne kadar uygulanabilir olduğunu tartıştılar ve bu toplantının akabinde Kary Mullis ve çalışma arkadaşları bilinen bir nükleotid dizisi yardımıyla bir genomun seçilmiş bir bölgesindeki DNA'nın milyonlarca kez çoğaltılmasına olanak sağlayan ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) olarak isimlendirilen bu tekniği geliştirdiler (66). Amerikalı bir biokimyacı olan Kary Mullis 1983 yılında yaptığı bu icatı sayesinde 1993 yılında nobel ödülü kazandı "Moleküler fotokopi (molecular photocopying)" olarak ta bilinen PCR 1985'te Cetus firması araştırmacıları tarafından geliştirilmesinin ardından temel moleküler biyolojik araştırmalarda (klonlama, dizi analizi ve DNA haritalaması gibi) ve birçok hastalığın DNA temeline dayalı tanısı içinde klinik tıpta hızla kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknik özellikle moleküler genetik , biyoteknoloji ve diğer bir çok alandaki çalışmalara ve araştırmalara yeni yaklaşımlar ve yeni bir bakış açısı getirmiştir. Moleküler genetikte devrim yapan bu teknik sayesinde gen araştırmalarındaki en büyük problemlerden biri olan yaklaşık 100.000 gen içeren memeli genomunda hedeflenen genin yakalanması ve daha yakından incelenmesi mümkün olmuştur. Kısaca tanımlarsak PCR metodu in vitro şartlarda enzimatik olarak spesifik bir DNA segmentinin milyonlarca kopyasının çıkarılmasına imkan sağlayan bir yöntemdir.

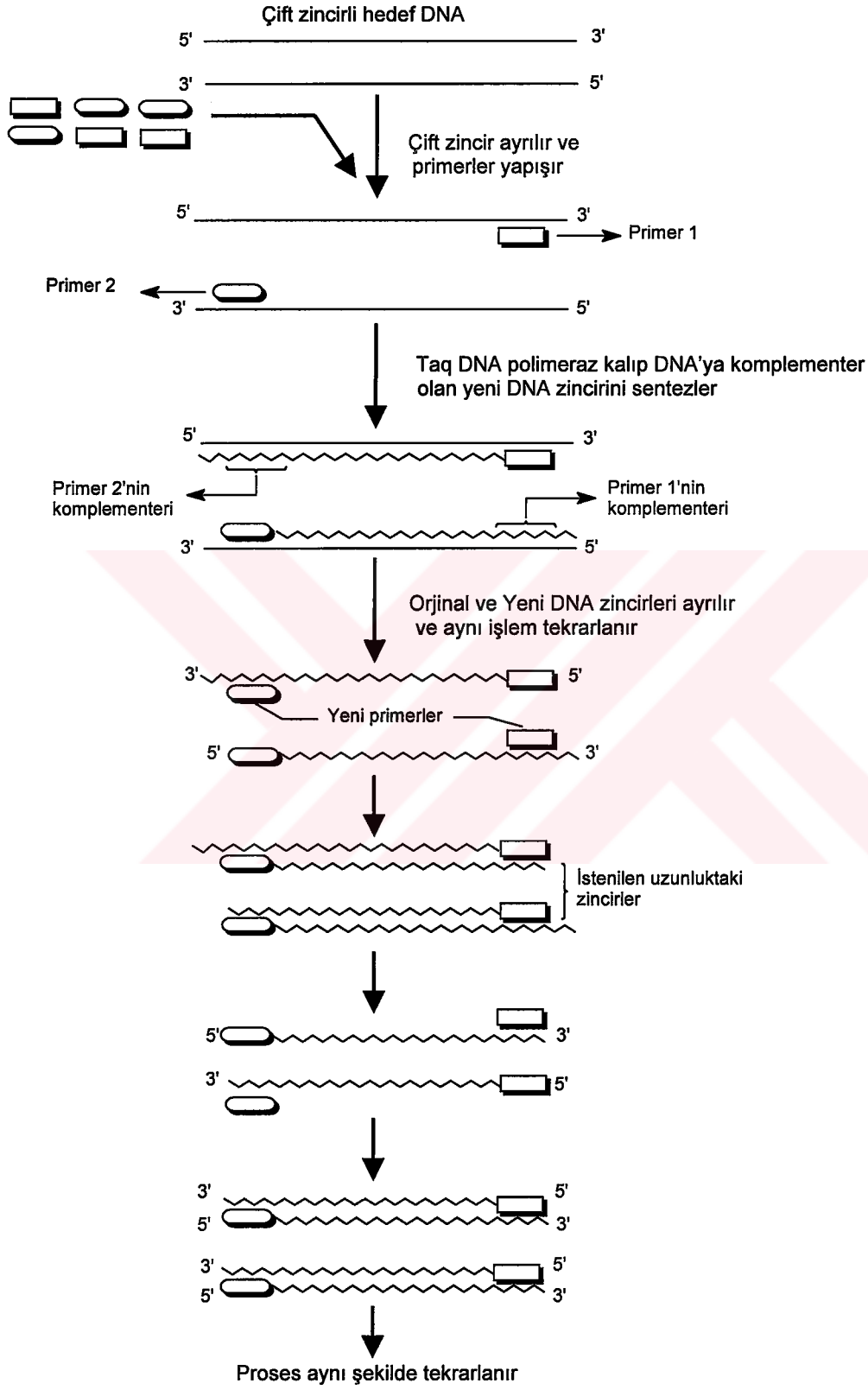
PCR, DNA replikasyonunun temel özelliklerine göre tasarlanmıştır. Bu nedenle DNA sentezinin gerçekleşebilmesi için ortamda kalıp DNA molekülü, primer, dNTPs, Taq DNA polimeraz, MgCl<sub>2</sub> gibi bazı komponentlerin bulunması gerekir. Bir PCR döngüsü denatürasyon, primerlerin bağlanması (annealing) ve yeni zincirin uzaması (extension) olmak üzere üç adımda gerçekleşir. Yeni komplementer zincirin sentezlenebilmesi için çift zincirli DNA ısı ile denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. DNA polimeraz senteze başlamak için primer (genellikle 16-24 nükleotidlik tek zincirli DNA dizileri) denilen kısa çift zincirli bir DNA parçasına ihtiyaç duyar. Primer dizileri kalıp DNA üzerindeki komplementer bölgelerine yapışırlar (annealing). Bu komplementer diziler kopyalama için başlangıç noktası olarak görev yaparlar.

DNA sarmalı üzerinde özgül oligonükleotid primerlerin bağlandığı bölge DNA sentezinin başlangıç noktasını oluşturur. Bu olay PCR'in en önemli yönüdür ve bu sayede DNA polimeraz enzimi DNA üzerinde aranan bölgeyi doğrudan sentezleyebilir. DNA zincirlerinin ikisi de sentez için kalıp görevi görür ve her iki ipliğe uygun oligonükleotid primerler dizayn edilir. PCR primerleri çoğaltılmak istenen DNA dizisinin her iki ucuna yakın bulunan dizilere uygun olarak seçilir. Her iki primerin bağlanma noktasından itibaren yeni DNA zinciri kalıp DNA'ya zıt yönde amplifiye edilir (extension). Bu sayede diğer primer için yeni bir bağlanma bölgesi sentez edilmiş olur. Reaksiyon karışımı orjinal kalıp sarmalın ve yeni sentezlenmiş DNA parçasının birbirlerinden ayrışması için tekrar ısıtılır. Primer hibridizasyonu, DNA sentezi ve zincir ayrışması işlemleri birbiri ardını izler ve PCR'da bu döngüler defalarca tekrar edilir (Şekil 11).

Herbir döngü sonucunda DNA miktarı bir öncekinin iki katına çıkar. Ardarda tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerin uzaması evreleriyle DNA fragmentleri üssel olarak artar. Bu artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primer için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PCR döngüsü DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır. Potansiyel olarak her döngünün %100 verimle gerçekleştiği varsayılırsa PCR'in net sonucu n sayıda tekrarlanan döngülerin sonunda reaksiyon teorik olarak  $2^n$  miktarda çift sarmallı DNA molekülü içerir.

PCR'in ihtiyaç duyduğu DNA miktarı oldukça azdır. DNA içeren tüp'e dört deoksiribonükleotid öncülleri (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP, dGTP) DNA polimeraz enzimi ve oligonükleotid primerlerinin eklenmesi ile DNA sentezi istenilen noktadan direkt olarak başlatılır. Toplam hacim genellikle 50µl veya 100µl'dir. PCR reaksiyonunda herbir adım farklı sıcaklıklarda gerçekleşir. Reaksiyon karışımı öncelikle 94°C'de yaklaşık 5 dakika ısıtılır. Bu sıcaklıkta çift zincirli DNA molekülü iki zincire ayrılır. İkinci adımda sıcaklık oligonükleotid primerlerin DNA molekülü üzerinde komplementer oldukları dizelere bağlanabilecekleri ısıya kadar düşer ve bu adımda her iki zincirde kalıp olarak kullanılır.

**Sekil 11. Polimeraz zincir reaksiyonunun şematik gösterimi**



Bu bağlanma sıcaklığı PCR'ın özgül olarak tanıdaki çeşitliliğinin anahtarıdır ve sıcaklık ile zaman , çoğaltılacak diziye bağlı olarak değişir. Aynı zamanda primerlerin nükleotid içeriği bağlanma ısısının (annealing temperature) tayininde de önemlidir. Üçüncü adımda sıcaklık DNA polimeraz enziminin optimum olarak çalıştığı ısıya yükseltilir. DNA polimeraz olarak genellikle Taq polimeraz (Thermus aquaticus DNA polimeraz ) kullanılır. Taq DNA polimeraz keşfedilmeden önce kullanılan enzim denatürasyon için gerekli olan yüksek sıcaklıkta stabil olmadığı için her döngüden sonra ortama tekrardan DNA polimeraz ilave edilmesi gerekiyordu fakat sorun 1987'de ısıya dayanıklı Taq DNA polimerazın keşfinden sonra çözüldü. Taq polimeraz enzimi sıcak sularda yaşayan ve replikasyona uğrayan bir organizma olan Thermophilic bacterium *Thermus aquaticus*'tan elde edilmiştir ve optimum çalıştığı ısı 72°C'dir.

72°C'lik ısıda Taq DNA polimeraz enzimi, kalıp DNA üzerinde çoğaltılmak istenen bölümün sentezini yapar. PCR'da her bir döngü yukarıdaki sırayı takip eder ve etkili bir DNA amplifikasyonu için reaksiyonun yaklaşık 30-40 döngü yapması gereklidir. Her bir döngüde sentezlenen DNA miktarı bir önceki DNA miktarının iki katına çıkar.

Polimeraz zincir reaksiyonunun basamaklarını; 94°C-96°C'de çift zincirli DNA molekülünün denatürasyonu, 50°C-64°C'de primerlerin kalıp DNA'ya bağlanması (annealing) ve 72°C'de ortamda bulunan dNTP'lerin DNA polimeraz enzimi ile primerden başlayarak yeni DNA zincirlerinin sentezlendiği uzama (elongasyon) aşamaları olarak özetleyebiliriz (62, 67).

PCR ürünlerine agaroz ve/veya poliakrilamid jel elektroforezi uygulandıktan sonra ilgili fragmanlar etidyum bromür veya gümüş nitrat boyama teknikleri ile boyandıktan sonra UV ışık altında görüntülenerek genotipleme yapılır. PCR metodu uzunluk polimorfizmleri ve tek nükleotid değişim polimorfizmlerinin belirlenmesinde kullanılabildiği gibi moleküler klonlama, patojen bulunması, genetik mühendisliği, moleküler marker'ların üretimi gibi pek çok alanda da yaygın olarak kullanılmaktadır.

### 3.5.3.2. PCR ile NQO1 genotip tayini

NQO1 lokusunun genotiplenmesi polimeraz zincir reaksiyonu metodu kullanılarak gerçekleştirildi. Sağlıklı ve akciğer kanserli bireylerden izole edilen DNA örneklerinin her birinin amplifikasyonu için total 50 µl'lik PCR karışımı hazırlandı. Bu PCR karışımı 100-200 ng DNA, her bir primerden 0.5µl, 0.2mM dNTP, 1.5mM MgCl<sub>2</sub> ve 1.5 U Taq DNA Polimeraz olacak şekilde hazırlandı.

Buffer 10x	5µl	(1x buffer olacak şekilde ayarlandı)
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	3µl	(1.5 mM)
DNTPs	5µl	(0.2 mM)
PA-F	2.5µl	(0.5 mM)
PA-R	2.5µl	(0.5 mM)
Taq Polimeraz (5U/µl)	0.3µl	(1.5 U)
ddH <sub>2</sub> O	30.7µl	
<b>TOPLAM</b>	<b>50µl</b>	

*PA-F ve PA-R NQO1 lokusu için hazırlanmış olan özel primer dizileridir.*

PA-F  $\longrightarrow$  5'-TCC TCA GAG TGG CAT TCT GC-3' (forward primer)  
PA-R  $\longrightarrow$  5'-TCT CCT CAT CCT GTA CCT CT-3' (revers primer)

*NQO1 lokusları için kullanılan amplifikasyon protokolü aşağıda gösterilmiştir.*

94°C	2 dakika	1 siklus
94°C	90 saniye	} 35 siklus
59°C	90 saniye	
72°C	90 saniye	
72°C	7 dakika	1 siklus

### 3.5.3.3. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile görüntülenmesi:

Amplifiye edilen DNA örnekleri %2'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu.

#### **50 ml'lik %3'lik agaroz jel hazırlanması:**

1.5 g agaroz tartılıp, bir beher içinde 1 x TAE ile 50 ml'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcı ısıtıcıda kaynatıldı. Sonra yaklaşık 60°C'ye kadar soğutuldu. Daha sonra üzerine son konsantrasyonu 0.5 µl/ml olacak şekilde etidyum bromür eklenip, karıştırıldı. Jel yeterince soğuduktan sonra tanka yerleştirilmiş jel yatağına döküldü ve jelin donması beklendikten sonra PCR ürünleri yüklendi.

#### **Elektroforez**

1. PCR ürünleri (10-15µl) jeldeki kuyucuklara yüklendi.
2. Örnekler kuyucuklardan jele girene kadar 150 V'ta daha sonra ise 80 -100 V'ta yürütüldü.
3. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel UV altında görüntülendi.

### 3.5.4. PCR Ürünlerinin Hinf1 restriksiyon enzimi ile kesimi:

Buffer 10x	4µl
Hinf1	1µl (12 U)
ddH <sub>2</sub> O	5µl
PCR ürünü	30µl

Herbir 30 µl'lik PCR ürünü için 4µl buffer, 5µl dd H<sub>2</sub>O ve 12 U olacak şekilde Hinf1 restriksiyon enzimi eklendi. 40 µl'lik karışım 37°C'de 3 saat inkübe edildi.

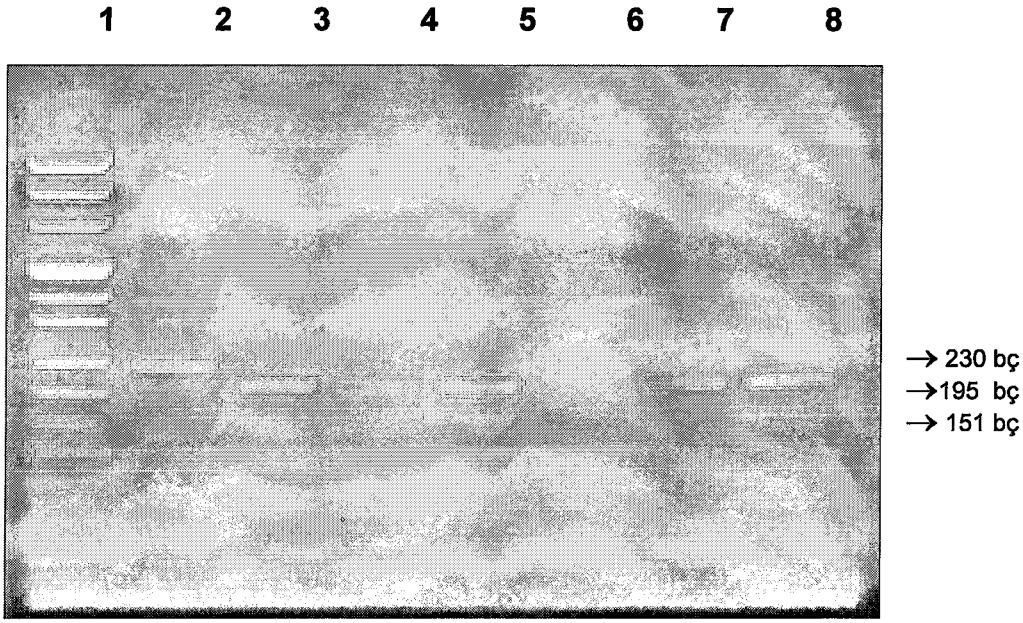
#### **Kesim sonucu oluşan fragmanların Agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi ve Genotip tayini:**

Amplifiye edilen örnekler Hinf1 enzimi ile kesime tabi tutulduktan sonra %2'lik agaroz jele yüklendi. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel UV altında görüntülendi.

**Genotip tayini:**

NQO1 genine ait amplifikasyon ürünleri 230 baz çifti uzunluğundadır. Kesim sonucunda 195 ve 151 baz çifti uzunluğunda iki kesim ürünü oluşur. Eğer 195 baz çifti uzunluğunda bir fragman oluşmuşsa bu homozigot normal bir allelin, 151 baz çifti uzunluğunda bir fragman ise homozigot mutant bir allelin varlığını hem 195 hem de 151 baz çifti uzunluğunda iki bantın gözlenmeside bu bireylerin heterozigot olduklarını göstermektedir (Şekil 12) .





**Örnek 1:** DNA size marker

**Örnek 2:** Kesilmemiş PCR ürünü

**Örnek 3:** wt/wt

**Örnek 4:** wt/MT

**Örnek 5:** wt/wt

**Örnek 6:** MT/MT

**Örnek 7:** wt/MT

**Örnek 8:** wt/wt

**Şekil 12.** NAD(P)H:kinon oksidoredüktaz 1 genotipinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi. Her jele DNA size marker (örnek 1) ve 230 bç uzunluğunda kesilmemiş PCR ürünü (örnek 2) yüklendi. Örnek 3,5,8'de 195 bç uzunluğunda normal allel (wt/wt), Örnek 4,7'de 195, 151 bç olmak üzere iki banttıan oluşan heterozigot allel (wt/MT) ve örnek 6'da 151 bç uzunluğunda homozigot mutant allel (MT/MT) gözlemlendi.

#### 4. BULGULAR

Çalışmamızda kontrol grubu olarak Türkiye'nin değişik bölgelerinden gelen ve aralarında akrabalık ilişkisi bulunmayan, yaşları 18 ila 65 arasında değişen 166 bireyden izole edilen DNA örnekleri ve hasta grubu olarak yaşları 33 ila 73 arasında değişen 94 akciğer kanserine yakalanmış bireye ait DNA örnekleri kullanıldı. Toplam 250 bireyin polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kullanılarak NQO1 genotipleri incelendi.

Türk toplumunda genlerin frekansını en doğru şekilde belirlemek için çalışmaya dahil edilen bireylerin cinsiyet dağılımında denge kuruldu ve Türkiye'nin her bölgesinden mümkün olduğu kadar eşit sayıda denek çalışmaya dahil edildi. Tüm bireylere ait aile ağacı çizildi ve DNA bankası kurulması için gerekli bilgiler sigara, alkol kullanımı, ebeveynlerin doğum tarihi ve yerleri, kendilerinin ve aile fertlerinin geçirdiği kronik hastalıklara ait bilgiler toplandı. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü'nde teşhis ve veya takip edilen akciğer kanserine yakalanmış 94 hastaya, Onkoloji Enstitüsü tarafından tutulan dosyalardan ayrı olarak, çalışma için gerekli bilgileri içeren bir form dolduruldu.

Kontrol ve Akciğer kanserli hasta grubunda ayrı ayrı NQO1 geninin allel ve genotip frekansları belirlendi ve daha sonra kontrol grubuna ait allel ve genotip dağılımları akciğer kanserli hastaların allel ve genotip frekansları ile karşılaştırıldı. Ayrıca Akciğer kanserinin histolojik tiplerine göre de allel ve genotip frekansları saptandı ve bu veriler kontrol grubu ile kıyaslandı. Fakat bu değerlendirmeye örnek sayısının yetersizliği nedeniyle Akciğer kanserinin bir diğer histolojik tipi olan büyük hücreli akciğer kanserli olgular dahil edilmemiştir.

Kontrol grubu içersinde wt/wt (normal) ve MT/MT (mutant) genotiplerinin dağılımları sırasıyla %56.63, %4.82 olarak, akciğer kanserli hasta grubu içinde ise bu değerler %62.77, %3.19 olarak hesaplandı. Ayrıca NQO1\*2 (mutant) allel frekansı Hasta ve kontrol grubunda sırasıyla 0.202, 0.241 olarak belirlendi (Tablo1). Tüm akciğer kanserli hastalarda belirlenen mutant allel frekansının kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel açıdan belirgin bir fark göstermediği saptandı. İstatistiksel hesaplamalar sonucunda elde edilen bulgular daha ayrıntılı biçimde tablolarda gösterilmiştir.

- I. Tablo 2: Bu tabloda NQO1 genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol gruplarındaki dağılımları verilmiştir. Hasta grubuna ait frekanslar kontrol grubu ile kıyaslandığı zaman değerlerin birbirine yakın olduğu ve istatistiksel açıdan belirgin bir farkın olmadığı belirlenmiştir.
- II. Tablo 3: NQO1 genotiplerinin dağılımları hasta ve kontrol grubunda ayrı ayrı incelenmiş olup hasta ve kontrol gruplarındaki genotip dağılımları karşılaştırıldığında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir farkın olmadığı saptanmıştır.
- III. Tablo 4. NQO1 allellerinin frekanslarının hasta ve kontrol gruplarındaki dağılımları hesaplanmış ve mutant allel frekansının hasta grubunda kontrol grubuna nazaran sayısal değer olarak daha yüksek olmasına karşın istatistiksel açıdan belirgin bir farkın olmadığı gözlenmiştir.
- IV. Tablo 5: Akciğer kanserli hastalar histolojik tiplerine göre sınıflandırılmış ve histolojik tiplerin NQO1 genotiplerine göre dağılımları incelenerek kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. İstatistiksel açıdan değerlendirdiğimizde ise anlamlı bir fark saptanamamıştır.
- V. Tablo 6: Bu tabloda NQO1 genotiplerinin farklı etnik gruplardaki dağılımı gösterilmektedir. Kelsey ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Afrika kökenli Amerikalılara ait frekans ile Avrupa toplumuna ait frekans arasında benzerlik gözlenmiş olup Asya toplumunda Mutant allel frekansının belirgin derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Bizim bulgularımız benzer diğer bulgular ile karşılaştırıldığında (Avrupa toplumunda yapılan diğer çalışmalarla) frekans değerlerimizin Chen ve arkadaşlarının Avrupa toplumunun mutant allel frekansına göre biraz yüksek olmakla birlikte Kelsey ve arkadaşlarının çalışmasından elde edilen mutant allel frekansına oldukça benzer olduğu gözlendi. Bu bulgular ışığında NQO1 allel frekansının belirgin bir etnik farklılık gösterdiğini söyleyebiliriz.

VI. Tablo 7. Kontrol ve Akciğer kanserli hasta gruplarında NQO1 genotiplerinin sigara alışkanlıklarına göre dağılımı yapıldı ve istatistiksel açıdan değerlendirildi fakat bu değerler arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

Çalışmamızda elde ettiğimiz diğer veriler şu şekildedir;

- NQO1 gen frekansları Hardy-Weinberg kuralına uymaktadır.
- NQO1 genotiplerinin cinsiyete göre dağılımları incelendiğinde, istatistiksel açıdan belirgin bir farklılık saptanmamıştır.
- NQO1 genotiplerinin yaşa göre dağılımları incelendiğinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir.
- NQO1 genotipleri ailesel kanser hikayesi olan ve olmayanlarda incelendiğinde bulguların istatistiksel açıdan anlamsız olduğu belirlenmiştir.

GENOTİP	HASTA GRUBU (n=94)	KONTROL GRUBU (n=166)
wt/wt	59 (%62.77)	94 (%56.63)
MT/MT	3 (%3.19)	8 (%4.82)
NQO1*1 allel frekansı	0.797	0.759
NQO1*2 allel frekansı	0.202	0.241

**Tablo 2.** Hasta ve kontrol gruplarında NQO1 genotip ve allel frekanslarının dağılımları

ALLEL	KONTROL GRUBU	HASTA GRUBU	OR (95% CI)	P	X <sup>2</sup>
NQO1*1	252 (%75.9)	150 (%79.79)	0.798 (0.516 – 1.234)	0.310	1.032
NQO1*2	80 (%24.1)	38 (%20.21)			

**Tablo 3:** NQO1\*1 ve NQO1\*2 allel frekanslarının akciğer kanserli hastalarda ve kontrol gruplarındaki Dağılımlarının karşılaştırılması

GENOTİP	KONTROL GRUBU	HASTA GRUBU	OR (95% CI)	P	X <sup>2</sup>
wt/wt	94 (%56.63)	59 (%62.77)	0.775 (0.461 – 1.301)	0.334	0.943
wt/MT, MT/MT	72 %47.37)	35 (%37.23)			

OR: Risk Oranı  
CI: %95 kesinlikle Güven Aralığı  
X<sup>2</sup>: Ki-Kare Testi

**Tablo 4:** Akciğer kanserli hastalarda ve kontrol grubunda NQO1 genotiplerinin karşılaştırılması

	wt/wt	wt/MT, MT/MT
<b>Kontrol grubu (n=166)</b>	94 (%56.63)	72 (%47.37)
<b>Hasta grubu (n=94)</b>	59 (%62.77)	35 (%37.23)
<b>OR (%95 CI)</b>	0.775 (0.461-1.301)	
<b>p</b>	0.334	
<b>Adenokarsinoma (n=21)</b>	15 (%71.43)	6 (28.57)
<b>OR (%95 CI)</b>	0.523 (0.195-1.413)	
<b>p</b>	0.289	
<b>Epidermoid (n=55)</b>	32 (%58.18)	23 (%41.82)
<b>OR (%95 CI)</b>	0.938 (0.506-1.740)	
<b>p</b>	0.840	
<b>Küçük hücreli (n=18)</b>	12 (%66.67)	6 (%33.33)
<b>OR (%95 CI)</b>	0.653 (0.234-1.823)	
<b>p</b>	0.570	

OR: Risk Oranı

CI: %95 kesinlikle Güven Aralığı

**Tablo 5.** NQO1 polimorfizminin akciğer kanserinin histolojik tiplerine göre dağılımı

Etnik grup	n	wt/wt	wt/MT	MT/MT
<b>Meksikalı-İspanyol</b>	161	52 (%32.3)	84 (%52.2)	25 (%15.5) Kelsey ve ark.
<b>Afrikanlı-Amerikalı</b>	136	83 (%61)	46 (33.8)	7 (%5.2) Kelsey ve ark.
<b>Asya Koreli</b>	118	37 (%31.4)	57 (%48.3)	24 (%20.3) Kelsey ve ark.
<b>Çinli</b>	69	23 (%33.3)	33 (%47.8)	13 (%18.8)
	49	14 (%28.6)	24 (%50.0)	11 (%22.4)
<b>Japon</b>	167	64 (%38.3)	78 (%46.7)	25 (%15.0) Chen ve ark.
<b>Hawaii</b>	102	60 (%58.8)	39 (%38.2)	3 (%2.9) Chen ve ark.
<b>Avrupa</b>	171	105 (%61.4)	62 (%36.3)	4 (%2.3) Chen ve ark.
<b>Avrupa</b>	114	64 (%56.1)	45(%39.5)	5 (%4.4) Kelsey ve ark.
<b>Avrupa</b>	166	94 (%56.6)	64 (%38.5)	8 (%4.8) Bu çalışma

**Tablo 6.** Farklı etnik gruplarda NQO1 Genotip frekanslarının incelenmesi

Genotip	Sigara içmeyen		OR (95% CI)	P
	Kontrol (n= 123)	Hasta (n=5)		
wt/wt	73 (%59.35)	3 (%60.0)	0.973 (0.157 – 6.040)	1.00*
wt/MT, MT/MT	50 (%40.65)	2 (%40.0)		

Genotip	Sigara içen		OR (95% CI)	P	X <sup>2</sup>
	Kontrol (n= 43)	Hasta (n=89)			
wt/wt	22 (%51.16)	56 (%62.92)	0.617 (0.296 – 1.290)	0.198	1.658
wt/MT, MT/MT	21 (%48.84)	33 (%37.08)			

\* Fisher's Exact Testi

OR: Risk Oranı

CI: %95 kesinlikle Güven Aralığı

X<sup>2</sup>: Ki-Kare Testi

**Tablo 7.** Kontrol ve akciğer kanserli hasta grubunda NQO1 genotiplerinin sigara kullanımına göre dağılımı

## 5. TARTIŞMA

Kanserle ilgili mevcut çalışmalar, kansere yatkınlığın iki farklı mekanizma ile çalışan genler aracılığıyla belirlendiğini ileri sürülmektedir. Birinci grup genler içinde doğrudan doğruya tümör oluşumuna katılan onkogenler ve tümör süpressör genler yer almaktadır. Bu grup genlerdeki kusurlar kanserin erken yaşta ve sıklıkla da birçok organda başlamasına neden olur. İkinci grup genler ise DNA tamirinde ve Faz I, Faz II detoksifikasyon reaksiyonlarında görev alan genlerdir ve bu ikinci sınıf genler akciğer kanserine yatkınlığın belirlenmesi için potansiyel aday genler olarak bilinirler (2).

Kişilerin kansere yatkınlıklarının belirlenmesindeki kilit mekanizmalarından birisi ksenobiotiklerin metabolizmasında rol oynayan enzimlerin gösterdikleri polimorfizmlerdir. Bu polimorfizmler neticesinde enzimlerin kalitatif ve kantitatif özellikleri, dolayısıyla enzimlerin biyolojik etkinlikleri ve toksikokinetikleri değişecektir. Aynı miktardaki toksik madde bireylerin sahip oldukları genotipe bağlı olarak farklı etki gösterecek ve bireylerin bazı kanser türlerine yatkınlıklarının belirlenmesinde önemli bir rol oynayacaktır (47, 48).

Bugüne dek farklı etnik gruplarda detoksifikasyon enzimlerini kodlayan genler üzerindeki polimorfizmler (GSTM1, CYP1A1, CYP2D6, NAT2 v.b.) ile akciğer kanseri arasındaki ilişkiyi araştıran bir çok çalışma yapılmıştır (2). Bu çalışmalarda özellikle ksenobiotiklerin, ilaç ve sigara dumanındaki bazı prokarsinogenlerin metabolizmasına katılan enzimlerin aktivitesini etkileyen genetik polimorfizmler ile akciğer kanseri arasında bir ilişki olabileceği araştırılmış ve bu polimorfizmlerin akciğer kanserinin etiyolojisinde bir rol oynayabileceğini ileri sürülmüştür (10).

Ksenobiotik metabolizmasında önemli bir yere sahip olan NAD(P)H:kinon oksidoredüktaz enzimini kodlayan gen üzerinde de aktivitede değişikliklere neden olan bir polimorfizm saptanmıştır. Bu polimorfizmin Kansere yatkınlığı etkileyebileceği düşünülerek gen üzerindeki çalışmalar yoğunlaşmıştır.

Çoğu dokuda eksprese edilen NQO1, ksenobiotiklerden iki elektron indirgenmesini katalize ederek semikinon ve serbest radikallerin oluşumunu engeller ve böylece hücreyi de oksidatif strese karşı korumuş olur. NQO1 geni üzerindeki mutasyona bağlı olarak enzim aktivitesindeki farklılıkların mutant genotipe sahip bireyin Akciğer kanserine yatkın hale gelmesine neden olabileceği ileri sürülmektedir. Bu nedenle özellikle son çalışmalar NQO1 geni üzerindeki polimorfizmin kansere yatkınlığın belirlenmesindeki önemi üzerine yoğunlaşmıştır.

Mutajenik ve karsinojenik maddelere karşı hücrel korunmada potansiyel bir role sahip olan NQO1'nın da diğer ksenobiotik ve ilaç metabolize eden enzimler gibi akciğer kanserine yatkınlığın belirlenmesi için aday bir gen olabileceği düşünülmektedir (2). Biz bu çalışmada 94 akciğer kanserli ve 166 sağlıklı bireyde NQO1 <sup>609</sup>C→T polimorfizminin dağılımını frekansını belirleyerek hasta grubundan elde edilen verileri kontrol grubu ile kıyaslayıp anlamlı bir fark olup olmadığını inceledik. Mutant allel frekansı, kanserli ve sağlıklı bireylerde sırasıyla % 3.19 , % 4.82 olarak bulundu. Sayısal değerler açısından bir fark gözlenmekle birlikte istatistiksel olarak belirgin bir farkın olmadığını gözledik (OR : 0.775, güvenlik aralığı: 0.461 – 1.301, df: 1). Elde edilen bulguların bazı toplumlarla benzerlik gösterdiği fakat bazı toplumlarla ise belirgin olmamakla birlikte farklılıklar gösterdiği saptanmıştır (Tablo 6).

NQO1 geni farklı etnik gruplarda çalışılmış olup bu genle ilgili olarak etnik farklılıkların olduğu ortaya çıkmıştır. Örneğin Japon toplumunda yapılan bir çalışmada Akciğer kanseri ile NQO1 polimorfizmi arasında istatistiksel olarak belirgin bir bağıntı olduğu saptanmış olup bu topluma ait mutant allel dağılımının Avrupa (Caucasian) popülasyonunun neredeyse iki katı olduğu belirlenmiştir. Yine aynı çalışma grubu bu kez bu polimorfizm dağılımını hawaii ve Avrupa popülasyonunda incelemiştir. Değerler Japonlarda olduğu kadar belirgin sapmalar göstermemesine rağmen üç etnik grup için genel bir değerlendirme yapıldığında mutant allel ile akciğer kanseri arasında ters bir orantının olduğunu yani mutant allel frekansının artmasıyla akciğer kanser riskinin azaldığını ortaya koymuşlardır (10).

Yine yapılan iki çalışmada NQO1 <sup>609</sup>C→T polimorfizmi ile akciğer kanseri arasında bir ilişki olduğu bildirilmesine rağmen elde edilen bulgular tartışmaya açıktır. 1995'te Rosvold ve arkadaşlarının Avrupa populasyonu üzerinde yaptıkları çalışmalar sonucu elde edilen bulgulara göre hasta grubunun mutant allel frekansı ( 0.22 ) kontrol grubunun ( 0.13 ) yaklaşık iki katı olduğu gözlenmiştir. Buna karşın 1997 Wiencke ve arkadaşları Meksikalı-Amerikalı'larda ve Afrikalı-Amerikalı'larda bu polimorfizmin wt genotip ile akciğer kanseri arasında özellikle de Meksikalı-Amerikalı'larda daha belirgin bir ilişki olduğunu rapor etmişlerdir. Taiwan'lılarda da meksikalı-Amerikalılardan elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Kısaca özetlersek farklı etnik gruplarda bu polimorfizm incelenmiş ve sonuçların etnik farklılıklar gösterdiği anlaşılmıştır.

Yaptığımız bu çalışma ile özellikle ilaç ve ksenobiotik metabolizmasında farklılıklara dolayısıyla bireylerin organizma için yabancı olan bu maddelere karşı gösterdikleri farklı tepkilere neden olan bu polimorfizmin o bireyin kansere yakalanma riskinin belirlenmesini ve bireyin sahip olduğu genotipe göre ilaç ile tedavinin uygulanabilmesini ve en önemlisi de elde edilen bulgular sayesinde erken tanıya olanak sağlanabilmesini amaçladık. İnanıyoruz ki bu çalışma sonucunda elde ettiğimiz bulgular akciğer kanseri ile ilişkisi olduğu ileri sürülen ksenobiotikleri metabolize eden diğer enzimler üzerindeki çalışmalardan elde edilen verilerle birlikte değerlendirildiği zaman bireye ait daha ayrıntılı bir genotip tablosu çıkartılabilecek ve böylelikle günümüzde büyük bir tehlike olarak görülen kansere karşı kısmen de olsa kendimizi savunabilme imkanı bulabileceğiz.

## 6. ÖZET

### **NAD(P)H: KİNON OKSİDOREDÜKTAZ 1 GENETİK POLİMORFİZMİ İLE AKCİĞER KANSERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN İNCELENMESİ**

Çoğu kanser genetik ve çevrenin etkileşimi sonucu ortaya çıkar. Kanseri kimyasal olarak indükleyen bireysel yatkınlıklar, ksenobiotiklerin detoksifikasyon ve aktivasyonundaki genetik farklılıklar ile kısmen açıklanabilir. Polimorfik bir enzim olan NAD(P)H: kinon oksidoredüktaz 1 (NQO1) substrata bağlı olarak ya detoksifikasyon enzimi yada aktivasyon enzimi olarak rol oynamaktadır. Ayrıca bu enzim sigara dumanındaki prokarsinojenik maddeleride bioaktif edebilmektedir. Yapılan geniş epidemiyolojik çalışmalar sigara dumanını akciğer kanserinin major bir nedeni olduğunu ortaya koymaktadır. Yine birkaç çalışmada NQO1 genetik polimorfizmi ile akciğer kanseri arasında bir ilişkinin olduğu saptanmıştır. Bu nedenle NQO1'nin akciğer kanserine yatkınlığın belirlenmesi için aday bir gen olabileceği ileri sürülmektedir.

Bu çalışmada, NQO1 genindeki genetik farklılık ve akciğer kanserine yatkınlık arasındaki ilişkiyi araştırıldı. 166 sağlıklı bireyde ve 94 akciğer kanserli bireyde NQO1 allelerinin dağılımı belirlendi. Polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak NQO1 genindeki mutasyon bu analiz edildi. PCR' ı takiben restriksiyon enzimi ile kesim yapıldı. wt/wt ve MT/MT genotiplerinin dağılımı sırasıyla, kontrol grubunda %56.63, %4.82 olarak, akciğer kanserli hastalar grubunda %62.77, %3.19 olarak ve enzimatik aktivitedeki azalma ile ilişkisi bulunan *NQO1\*2* allelinin frekansı akciğer kanserli hastalarda ve kontrol grubunda 0.202, 0.241 olarak saptandı. Bu bulguların Caucasion toplumlarındaki diğer bulgularla benzerlik gösterdiği belirlendi. Kontrol ve hasta grupları arasında sayısal değerler açısından ufak bir farklılık gözlenmekle birlikte bu fark istatistiksel açıdan belirgin değildir (OR: 0.755, %95 Güvenlik Aralığı 0.461-1.301).

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ileride ilgili gendeki polimorfizmler, kanser araştırmaları ve farmakogenetik konularında çalışma yapacak araştırmacılara ışık tutacaktır.

## 7. SUMMARY

### **NAD(P)H: QUINONE OXIDOREDUCTASE 1 GENETIC POLYMORPHISM AND ITS ASSOCIATION TO LUNG CANCER**

Most cancer results from the interaction of genetics and environment. Individual susceptibility to chemically induced cancer may be explained partly by genetic differences in the activation and detoxification of xenobiotics. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1), a polymorphic enzyme, may act as either a detoxification or activation enzyme, depending on substrate. However, NQO1 can also bioactivate procarcinogenic compounds in tobacco smoke. Extensive epidemiological data clearly establish cigarette smoking as the major cause of lung cancer. Several studies demonstrate the association between genetic polymorphism of NQO1 and lung cancer risk as well as that NQO1 is the candidate gene for susceptibility to lung cancer.

In this study, we investigated associations between genetic variability in NQO1 and susceptibility to lung cancer. The distribution of NQO1 alleles were determined in 166 healthy individuals and 94 patients with lung cancer. NQO1 polymorphism was studied using polymerase chain reaction (PCR)-based method, followed by digestion with restriction enzyme, was used to analyze the mutation in the NQO1 gene. The distribution of wt/wt and MT/MT genotypes were determined as 56.63%, 4.82% in the healthy control group, as 62.77%, 3.19% in lung cancer patients and the frequencies of NQO1\*2 allele which is associated with a reduced enzymatic activity in patients with lung cancer and control group was 0.202, 0.241, respectively. These findings are consistent with the findings in Caucasian population. Although it seems that there is a difference between control group and cases, it is not statistically significant (OR 0.755, 95% CI 0.461-1.301).

Our results will be important to examine further as investigators continue to study pharmacogenetics and interaction of these enzymes with environmental exposures and the putative role in cancer susceptibility.

## 8. KAYNAKLAR

1. Ahrendt SA, Chow JT, Yang SC, Wu L, Zhang M-J, Sidransky D: Alcohol Consumption and cigarette smoking increase the Frequency of p53 Mutations in Non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* (2000) 60:3155-3159.
2. Arinç E, Schenkman JB, Hodgson E: Molecular and applied aspects of oxidative drug metabolizing enzymes. NATO ASI Series (1997), *Life Sciences* 303:127-145.
3. Beall HD, Winski SL: Mechanisms of action of quinone-containing alkylating agents I: NQO1-Directed Drug development. *Frontiers in Bioscience* (2000) 5:629-638.
4. Caporaso N, Landi MT, Vineis P: Relevance of metabolic polymorphisms to human carcinogenesis:evaluation of epidemiologic evidence. *Pharmacogenetics* (1991) 1:4-9.
5. Chen H, Lum A, Seifried A, Wilkens LR, Marchand LL: Association of the NAD(P)H:Quinone oxidoreductase <sup>609</sup>C T Polymorphism with a decreased Lung Cancer Risk. *Cancer Research* (1999) 59:3045-3048.
6. Clairmont A, Sies H, Ramachandran, Lear JT, Smith AG, Bowers B, Jones PW, Fryer AA, Strange RC: Association of NAD(P)H:Quinone oxidoreductase (NQO1) null with numbers of basal cell carcinomas: use of a multivariate model to rank the relative importance of this polymorphism and those at other relevant loci. *Carcinogenesis* (1999) 20(7):1235-1240.
7. Cresteil T, Jaiswal AK: High levels of expression of the NAD(P)H:Quinone oxidoreductase (NQO1) Gene in tumor cells compared to normal cells of the same origin. *Biochemmical Pharmacology* (1991) 42(5):1021-1027.

8. Dinkova-Kostova AT, Talalay P. Persuasive evidence that quinone reductase type 1 (DT-Diaphorase) protects cells against the Toxicity of elektrophiles and reactive forms of oxygen: *Free Radical Biology & Medicine* (2000) 29(3/4):231-240.
9. Doughty SW, Phillips RM: Molecular modelling of human DT-Diaphorase for enzyme-directed Bioreductive drug design.
10. Eickelmann P, Ebert T, Warskulat U, Schulz WA, Sies H: Expression of NAD(P)H:Quinone oxidoreductase and Glutathione S-Transferases  $\alpha$  and  $\pi$  in human renal cell carcinoma and in kidney cancer-derived cell lines. *Carcinogenesis* (1994) 15(2): 219-225.
11. Eickelmann P, Schulz WA, Rohde D, Schmitz-Dräger B, Sies H: Loss of Heterozygosity at the NAD(P)H:Quinone oxidoreductase Locus Associated with Increased Resistance against Mitomycin C in a Human Bladder Carcinoma Cell Line. *Biol. Chem. Hoppe-seyler* (1994) 375:439-445.
12. Flader C, Liu J, Borch RF: Development of Novel Quinone Phosphorodiamidate Prodrugs targeted to DT-Diaphorase. *J. Med. Chem.* (2000) 43:3157-3167.
13. Foster CE, Bianchet MA, Talalay P, Faig M, Amzel M: Structures of mammalian Cytosolic quinone reductases. *Free Radical Biology & Medicine* (2000) 29(3/4):241-245.
14. Gaedigk A: Interethnic Differences of drug-metabolizing enzymes. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* (2000) 38(2): 61-68.

15. Gaedigk A, Tyndale RF, Jurima-Romet M, Sellers EM, Grant DM, Leeder JS: NAD(P)H:Quinone oxidoreductase: polymorphisms and allele frequencies in Caucasian, Chinese and Canadian Native Indian and Inuit populations. *Pharmacogenetics* (1998) 8:305-313.
16. Gazdar AF, Minna JD: Molecular Detection of Early Lung Cancer. *J.Natl. Cancer Inst* (1999) 91(4):299-301.
17. Gaziöglu K: Akciğer hastalıkları (1997) 7. Baskı , Nobel Tıp Kitapevi.
18. Gealy R, Zhang L, Siegfried JM, Luketich JD, Keohavong P: Comparison of mutation in the p53 and K-ras genes in lung carcinomas from smoking and nonsmoking women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* (1999) 8:297-302.
19. Guiterrez PL: The role of NAD(P)H:Quinone oxidoreductase (DT-Diaphorase) in the bioactivation of quinone-containing antitumor agents: A Review. *Free Radical Biology & Medicine* (2000) 29(3/4):263-275.
20. Harth V, Donat S, Ko Y, Abel J, Vetter H, Brüning: NAD(P)H:Quinone oxidoreductase 1 codon 609 polymorphism and its association to colorectal cancer. *Arch. Toxicol* (2000) 73:528-531.
21. Hiatt RA, Rimer BK: A new strategy for cancer control research. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* (1999) 8:956-7-964.
22. Jaiswal AK: Regulation of Genes Encoding NAD(P)H: Quinone oxidoreductases. *Free Radical Biology & Medicine* (2000) 29:254-262.
23. Jaiswal AK: Characterization and Partial Purification of Microsomal NAD(P)H:Quinone oxidoreductase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (2000) 375(1):62-68

24. Jaiswal AK, Bell DW, Radjendirane V, Testa JR: Localization of human NQO1 gene to chromosome 16q22 and NQO2-6p25 and associated polymorphisms. *Pharmacogenetics* (1999) 9:413-418.
25. Jaiswal AK: Human NAD(P)H:Quinone oxidoreductase (NQO1) gene Structure and Induction by Dioxin. *Biochemistry* (1991) 30:10647-10653.
26. Joseph P, Long II DJ, Klein-Szanto AJP, Jaiswal AK: Role of NAD(P)H:Quinone oxidoreductase 1 (DT-Diaphorase) in protection against Quinone Toxicity. *Biochemical Pharmacology* (2000) 60:207-214.
27. Kayaalp SO: Rasyonel Tedavi yönünden Farmakoloji. 1. cilt, Güneş Kitabevi.
28. Kelsey KT, Ross D, Traver RD, Christiani DC, Zuo Z-F, Spitz MR, Wang M, Xu X, Lee B-K, Schwartz BS, Wiencke JK: Ethnic Variation in the Prevalence of Common NAD(P)H:Quinone oxidoreductase polymorphism and its implications for anti-cancer chemotherapy. *British Journal of Cancer* (1997) 76(7): 852-854.
29. Kiyohara C: Genetic polymorphism of enzymes involved in xenobiotic metabolism and the risk of colorectal cancer. *J.Epidemiol* (2000) 10(5):349-360.
30. Knox RJ, Jenkins TC, Hobbs SM, Chen S, Melton RG, Burke PJ: Bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB 1954) by Human NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase 2: A novel Co-substrate-mediated Antitumor Prodrug Therapy. *Cancer res.*(2000) 60:4179-4186.

- 31.** Lafuente MJ, Casterad X, Trias M, Ascaso C, Molina R, Ballesta A, Zheng S, Wiencke JK, Lafuente A: NAD(P)H:Quinone oxidoreductase-dependent risk for colorectal cancer and its association with the presence of K-ras mutations in tumors. *Carcinogenesis* (2000) 21(10):1813-1819.
- 32.** Lang M, Pelkonen O: Chapter 3. Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. *IARC Sci publ* (1999) 148:13-22.
- 33.** Lin P, Wang H-J, Lee H: NAD(P)H:Quinone oxidoreductase Polymorphism and Lung Cancer in Taiwan. *J. Toxicology and Environmental Health* (1999) 58:187-197.
- 34.** Lind C, Cadenas E, Hochstein P, Ernster L: DT-Diaphorase: Purification, Properties and Function. *Methods in Enzymology* ( ) 186:287-301.
- 35.** Mayne ST, Buenconsejo J, Janerich DT: Familial cancer History and lung cancer risk in united states nonsmoking men and women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* (1999) 8:1065-1069.
- 36.** Meyer UA: Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet* (2000) 356:1667-1671.
- 37.** Meyer UA: The molecular basis of genetic polymorphisms of drug metabolism. *J. Pharm Pharmacol* (1994) 46 (suppl 1): 409-415
- 38.** Moran JL, Siegel D, Ross D: A potential mechanism underlying the increased susceptibility of individuals with a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) to benzene toxicity. *Proc. Natl.Acad.Sci* (1999) 96:8150-8155.

39. Muiswinkel FLV, Riemers FM, Peters GJ, LaFleur VM, Siegel D, Jongenelen CAM, Drukarch B: L-Dopa Stimulates expression of the antioxidant enzyme NAD(P)H:Quinone oxidoreductase (NQO) in Cultured Astroglial cells. *Free Radical Biology & Medicine* (2000) 29(5):442-453.
40. Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW: Harper'ın Biokimyası. Barış kitabevi (1993)
41. Naoe T, Takeyama K, yokozawa T, Kiyoi H, Seto M, Uike N, Ino T, Utsunomiya A, Maruta A, Jin-nai I, Kamada N, Kubota Y, Nakamura H, Scimazaki C, Horiike S, Kodera Y, Saito H, Ueda R, Wiemels J, Ohno R: Analysis of Genetic Polymorphism in NQO1, GST-M1, GST-T1, and CYP3A4 in 469 Japanese Patients with Therapy-related Leukemia/Myelodysplastic Syndrome and and de novo Acute Myeloid Leukemia. *Clin.Cancer Res.* (2000) 6:4091-4095.
42. Nebert DW: Role of Genetics and Drug Metabolism in Human Cancer Risk. *Mutation Research* (1991) 247: 267-281.
43. Onat T, Emerk K: Temel Biokimya. Saray Medikal Yayıncılık (1996)
44. Ozawa S, Schoket B, McDaniel LP, Tang Y-M, Ambrosone CB, kostie S, Vineze I, Kadlubar FF: Analyses of Bronchial bulky DNA adduct levels and CYP2C9, GSTP1 and NQO1 genotypes in Hungarian study population with pulmonary diseases. *Carcinogenesis* (1999) 20(6):991-995.
45. Pacifici GM, Fracchia GN: Advances in drug metabolism in man. European commission (1995) DG XII-Science, Research and development,407-460.
46. Perera FP: Enviroment and Cancer:Who are susceptible? *Science* (1997) 278:1068-1073.

47. Perera FP: Molecular Epidemiology: Insights Into Cancer Susceptibility, Risk Assessment, and Prevention. *J. Natl. Cancer Inst.* (1996) 88(8):496-509.
48. Perera FP: Molecular Epidemiology: On the Path to Prevention? *J. Natl. Cancer Inst.* (2000) 92(8):602-612.
49. Peters ES, Kelsey KT, Wiencke JK, Park S, Chen P, Miike R, Wrensch MR: NAT2 and NQO1 polymorphism are not associated with adult Glioma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* (2001) 10: 151-152.
50. Ross D, Kepa JK, Winski SL, Beall HD, Anwar A, Siegel D: NAD(P)H:Quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chemico-Biological Interactions* (2000) 129: 77-97.
51. Ross D, Siegel D, Beall H, Prakash AS, Mulcahy RT, Gibson NW: DT-Daphorase in Activation and Detoxification of Quinones. *Cancer and Metastasis Reviews* (1993) 12: 83-101.
52. Ross D, Traver RD, Siegel D, Kuehl BL, Misra V, Rauth AM: A polymorphism in NAD(P)H:Quinone oxidoreductase (NQO1): relationship of Homozygous mutation at position 609 of the NQO1 cDNA to NQO1 activity. *British Journal of Cancer + supplements* (1996) 74:995-996.
53. Rosvold EA, McGlynn KA, Lustbader ED, Buetow KH: Identification of an NAD(P)H:Quinone oxidoreductase polymorphism and its association with Lung Cancer and Smoking. *Pharmacogenetics* (1995) 5:199-206.
54. Schlager JJ, Powis GT: Cytosolic NAD(P)H:(Quinone-Acceptor) oxidoreductase in human normal and tumor tissue: effects of cigarette smoking and alcohol. *Int. J. Cancer* (1990) 45: 403-409.

55. Schulz WA, Krummeck A, Rösinger I, Eickelmann P, Neuhaus C, Ebert T, Schmitz-Dräger BJ, Sies H: Increased frequency of a null allele for NAD(P)H:Quinone oxidoreductase in patients with urological malignancies. *Pharmacogenetics* (1997) 7:235-239.
56. Siegel D, Franklin WA, Ross D: Immunohistochemical Detection of NAD(P)H:Quinone oxidoreductase in Human Lung and Lung Tumors. *Clin. Cancer Res.* (1998) 4:2065-2070.
57. Siegel D, McGuinness SM, Winski SL, Ross D: Genotype-phenotype relationships in studies of a polymorphism in NAD(P)H:Quinone oxidoreductase 1. *Pharmacogenetics* (1999) 9:113-121.
58. Smith MT: Benzene, NQO1, and genetic susceptibility to cancer: Proc. Natl. Acad. Sci (1999) 96:7624-7626.
59. Smith MT, Wang Y, Kane E, Rollinson S, Wiemels JL, Roman E, Roddam P, Cartwright R, Morgan G: Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity is associated with increased risk of acute leukemia in adults. *Blood* (2001) 97(5): 1422-1426.
60. Sultuybek G, Ulutin T, Sayhan N: polimeraz zincir reaksiyonu. *Rekombinant DNA Teknolojisi ve Tıpta kullanımı* (1995) 50-52.
61. Temizkan G, Yilmazer S, Öztürk M, Arı Ş, Ertan H, Olgun A, Sarıkaya AT, Arda N: DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması. *Moleküler Biyolojide kullanılan yöntemler* (1999) 57-71.
62. Thompson MW, Mc Innes RR, Willard HF: Thompson & Thompson Genetics in Medicine (1991), 5. baskı, HBJ Saunders

- 63.**Topuz E, Aydın A, Karadeniz AN: Klinik Onkoloji. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü yayınları (2000).
- 64.**Topuz E: Akciğer kanseri. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü yayınları 1 (1997).
- 65.**Traver RD, Siegel D, Beall HD, Phillips RM, Gibson NW, Franklin WA, Ross D: Characterization of a polymorphism in NAD(P)H: quinone oxidoreductase (DT-Diaphorase). *British Journal of Cancer* (1997) 75(1):69-75.
- 66.**Tübitak: insan Genomu. Bilim ve Teknik (2001) 400.
- 67.**Watson JD, Witkowski J, Gilman M, Zoller M: Recombinant DNA (second Ed). Scientific American Books (1992).
- 68.**Willett WC: Diet and cancer: One view at the start of the millenium. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* (2001) 10:3-8.
- 69.**Xu LL, Wain JC, Miller DP, Thurston SW, Su L, Lynch TJ, Christiani DC: The NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene polymorphism and lung cancer: Differential Susceptibility based on smoking Behavior. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* (2001) 10: 303-309.

## 9. ÖZGEÇMİŞ

**ADI SOYADI** : Pınar AKSOY

**EĞİTİM DURUMU** : 1998- İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Biokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans  
öğrencisiyim.

1994-1998 İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

1990-1993 Kocamustafapaşa Lisesi

1987-1990 Kocamustafapaşa Ortaokulu

1982-1987 Mehmet Akif İlkokulu

### **TECRÜBELER** :

1. Son çıkan II. Kuşak Antihistaminiklerin Farmakolojik özellikleri hakkında yaptığım araştırmaları VI. Eczacılık Kongresinde (1997) bir bildiri şeklinde sundum.
2. 1999 senesi içinde İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp ve Araştırma merkezinde 2 ay süreyle yeni moleküler bioloji ve genetik teknikleri üzerine staj yaptım.
3. Bilkent Üniversitesi Moleküler Bioloji ve Genetik bölümünde yeni moleküler teknikler üzerine 11.07.1999-09.08.1999 tarihleri arasında staj yaptım.