



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK
LİSANS
TEZİ**

**MEME KANSERLİ HASTALARDA GGT5 VE GGT7
EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ**

DİLEK GÜNGÖR

BİYOKİMYA (ECZ.) ANABİLİM DALI

ŞUBAT 2018



**MEME KANSERLİ HASTALARDA GGT5 VE GGT7
EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ**

Dilek GÜNGÖR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOKİMYA (ECZ.) ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

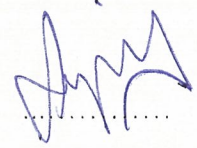
ŞUBAT 2018

Dilek GÜNGÖR tarafından hazırlanan “Meme Kanseri Hastalarda GGT5 ve GGT7 Ekspresyonlarının İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Sevgi AKAYDIN

Biyokimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Başkan : Prof. Dr. Fatma Meral TORUN

Biyokimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye : Prof. Dr. Fügen AKTAN

Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Tez Savunma Tarihi: 15/02/2018

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Mustafa ASLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Dilek GÜNGÖR

15/02/2018

MEME KANSERLİ HASTALARDA GGT5 VE GGT7 EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Dilek GÜNGÖR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2018

ÖZET

Gama-glutamyltransferaz (GGT) düzeylerinde yükselme olan bireylerde meme kanseri riskinde artış olduğu bildirilmiştir. Genom araştırmaları, GGT1'in yanı sıra, insan genomunun ek ilgili genler veya diziler içerdiğini göstermiştir. Amino asit dizileri açısından, GGT1'e önemli benzerlik gösteren genler (GGT5 ve GGT7) tanımlanmıştır. Bu çalışmanın amacı, meme kanserinin moleküler alt tiplerinde GGT5 ve GGT7 gen ekspresyonlarını değerlendirmektir. Bu amaçla, meme kanseri tanısı konmuş 58 hastadan meme dokusu örnekleri alındı. Bu hastalar, östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), İnsan epidermal büyüme faktör reseptör 2 (HER2) ve Ki67 antijeni moleküler belirteçleri kullanılarak; Luminal A, Luminal B, HER2(+), Luminal B-HER2(+) ve triple negatif olmak üzere beş alt gruba ayrıldı. Kontrol dokusu olarak, meme küçültme ameliyatı için kliniğe başvuran 8 sağlıklı kişiden alınmış meme dokuları da çalışmaya dahil edildi. Meme kanseri hastalarının ve sağlıklı kontrollerin normal ve tümörlü doku örneklerinde GGT5 ve GGT7 mRNA ekspresyonları qRT-PCR yöntemi ile incelenmiştir. Ayrıca, serum örneklerinde GGT aktivitesi ve glutatyon (GSH) düzeyleri sırasıyla spektrofotometrik ve ELISA yöntemleriyle ölçülmüştür. Tümör dokularının tamamında GGT5 ve GGT7'nin mRNA ekspresyonlarının aynı hastaların sağlıklı meme dokularındaki ekspresyondan fazla olduğu belirlendi (sırasıyla $p < 0.145$ ve $p < 0.003$). Moleküler alt tipler arasında, GGT7 ekspresyonlarının Luminal A grubundaki hastaların tümör dokularında normal dokularına göre anlamlı derecede yüksek olduğu anlaşılmıştır. ($p < 0.009$). Ayrıca, GGT enzim aktivitesi kontrollere göre hastalarda belirgin derecede yüksekti ($p < 0.05$) ve hem kontrollerde hem de hastalarda GSH düzeyleri ile pozitif olarak ilişkiliydi. (sırasıyla $p < 0.05$ ve $p < 0.0001$). Öte yandan, GGT genleri ile ne GGT ne de GSH arasında herhangi bir korelasyon bulunmamıştır. Bildiğimiz kadarıyla, çalışmamız meme kanserinde GGT5 ve GGT7 mRNA ekspresyonlarını gösteren ilk çalışmadır. Sonuçlarımıza göre, meme kanserinde, özellikle de luminal A grubunda, GGT7'nin marker potansiyeli gösterebileceğini öngörüyoruz. Bulgularımız, protein ekspresyonlarının ve bu genlerin olası işlevlerinin incelenmesi gerektiğini göstermektedir.

Bilim Kodu : 1010

Anahtar Kelimeler : Gama-Glutamil Transferaz, GGT5, GGT7, Meme Kanseri

Sayfa Adedi : 75

Danışman : Prof. Dr. Sevgi AKAYDIN

INVESTIGATION OF GGT5 AND GGT7 EXPRESSIONS IN BREAST CANCER
PATIENTS
(M. Sc. Thesis)

Dilek GÜNGÖR

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES
February 2018

ABSTRACT

An increased risk of breast cancer has been reported in individuals with elevated levels of gamma-glutamyl transferase (GGT). Genome research indicated that besides GGT1, the human genome contains additional related genes or sequences. From the perspective of amino acid sequences, genes with substantial similarity (GGT5 and GGT7) to GGT1 have been identified. The aim of this study was to evaluate the gene expressions of GGT5 and GGT7 in molecular subtypes of breast cancer. For that purpose, tissue samples were taken from 58 patients diagnosed with breast cancer. These patients were divided into five subgroups using molecular markers of estrogen receptor, progesterone receptor, human growth factor receptor 2, and Ki67 antigen: Luminal A, Luminal B, HER (+), Luminal B-HER (+) and triple negative. As controls, 8 healthy persons admitted to the clinic for breast reduction surgery were also included to the study. mRNA expressions of GGT5 and GGT7 in normal and tumour tissue samples of breast cancer patients and healthy controls examined by qRT-PCR method. In addition, GGT activity and glutathione (GSH) levels in serum samples were measured by spectrophotometric and ELISA methods, respectively. In totally, mRNA expressions of GGT5 and GGT7 increased in tumor tissues than those in normal tissues of the same patients ($p<0.145$ and $p<0.003$, respectively). Among molecular subtypes, GGT7 expressions were significantly higher in tumor tissues than those in normal tissues of the patients in Luminal A group ($p<0.009$). Also, GGT enzyme activity was significantly higher in patients than those in controls ($p<0.05$) and it was positively correlated with GSH levels in both controls and patients ($p<0.05$ and $p<0.0001$, respectively). On the other hand, we did not find any correlation between neither GGT nor GSH and GGT genes. As far as we know, our study is the first showing GGT5 and GGT7 mRNA expressions in breast cancer. According to our results, we suggest that GGT7 may have marker potency in breast cancer, especially in the luminal A group. Our results show that protein expressions and then potential functions of these genes need to be studied.

Science Code : 1010

Key Words : Gamma-Glutamyl Transferase, GGT5, GGT7, Breast Cancer

Page Number : 75

Advisor : Prof. Sevgi AKAYDIN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım ilk günden bu yana benden sabrını, hoşgörüsünü, bilgisini ve deneyimlerini esirgemeyen değerli hocam ve danışmanım Sayın Prof.Dr. Sevgi AKAYDIN'a,

Yüksek lisans tezimi hazırlama sürecinde desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, tezimin yürütülmesinde büyük pay sahibi olan Sayın Araştırma Görevlisi Ece MİSER SALİHOĞLU ve Araştırma Görevlisi Dr. Emel CAN'a,

Bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen ve üzerimde çok büyük emekleri olan Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine,

Tanımdan ve beraber çalışmaktan çok mutlu olduğum tüm asistan arkadaşlarıma,

Sabır, özveri ve sevgi ile hep yanımda olan, yüksek lisans süresince desteğini hep arkamda hissettiğim sevgili eşim Kutluhan GÜNGÖR' e,

Emek ve sevgisiyle bugünlere gelmemi sağlayan, haklarını asla ödeyemeyeceğim sevgili aileme,

teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Meme Kanseri	3
2.2. Meme Kanserinin Moleküler Belirteçleri.....	4
2.2.1. İyi tanımlanmış ve araştırmaların sürdüğü meme kanseri moleküler belirteçleri	5
2.3. Meme Kanserinin Sınıflandırılması	11
2.3.1. Meme kanserinin moleküler sınıflandırması	12
2.3.2. Meme kanserinde kullanılan diğer sınıflandırmalar	18
2.4. Gama Glutamil Transferaz (GGT)	20
2.4.1. GGT'nin yapısı	20
2.4.2. GGT'nin fonksiyonları	22
2.4.3. GGT'nin serum düzeyleri ve biyokimyasal önemi.....	26
2.4.4. GGT genleri	28
2.4.5. GGT ve kanser	34
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	37
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	37
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	37

	Sayfa
3.3. Kullanılan Biyolojik Materyal.....	38
3.4. Deneysel Yöntem	40
3.4.1. Gen ekspresyon analizi	40
3.4.2. Serum gama glutamil transferaz aktivite tayini	43
3.4.3. Total glutatyon analizi	45
3.5. Kullanılan İstatistiksel Yöntem	45
4. BULGULAR	47
5. TARTIŞMA.....	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	63
KAYNAKLAR	65
EKLER.....	73
EK-1. Klinik araştırmalar etik kurulu kararı.....	74
ÖZGEÇMİŞ.....	75

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Meme kanseri moleküler belirteçleri	5
Çizelge 2.2. Meme kanserinin sınıflandırılması	12
Çizelge 2.3. GGT homolog dizilerinin listesi, yeni onaylanan gen sembolleri ve kromozomal yerleşimleri	29
Çizelge 3.1. Hasta grubunun demografik özellikleri ve laboratuvar testleri	39
Çizelge 3.2. Meme kanseri hastaların sınıflandırılmasında kullanılan parametreler	39
Çizelge 3.3. Mikroplaka reaksiyon karışımı.....	42
Çizelge 4.1. Normal doku ve tümör dokudaki GGT5 ve GGT7'nin normal dağılım (Kolmogorov-Smirnov) testi sonuçları.....	47
Çizelge 4.2. Hasta grubunun normal ve tümör dokularında ve kontrol grubunun normal dokularında GGT5 geninin saptanan ekspresyon değerleri ve oranları.....	48
Çizelge 4.3. Hasta grubunun normal ve tümör dokularında ve kontrol grubunun normal dokularında GGT7 geninin saptanan ekspresyon değerleri ve oranları.....	50
Çizelge 4.4. Total ve moleküler alt tiplere göre hasta gruplarının normal ve tümör dokuda saptanan GGT5 ve GGT7 gen ekspresyonlarının ortalama değerleri	52
Çizelge 4.5. Total hasta grubunda normal doku (ND) ve tümör doku (TD) GGT5, GGT7 karşılaştırması (Wilcoxon Signed Ranks Test)	52
Çizelge 4.6. Meme kanseri moleküler alt gruplarında normal doku (ND) ve tümör doku (TD) GGT5, GGT7 karşılaştırması (Wilcoxon Signed Ranks Test)	53
Çizelge 4.7. Serumda GGT enzim aktivitesi ve total redükte glutatyon (GSH)'un normal dağılım testi (Kolmogorov-Smirnov) sonuçları	54
Çizelge 4.8. Total ve moleküler alt tiplere göre hasta gruplarının serum GGT enzim aktivitesi ve GSH düzeylerinin ortalama değerleri ve karşılaştırılması	54

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. İnsan GGT1 kristal yapısı	22
Şekil 2.2. GGT hidrolizi ve transpeptidasyon reaksiyonlarının illüstrasyonu	24
Şekil 2.3. Gama glutamil çevrimi	25
Şekil 2.4. Lökotrien sentezi	26
Şekil 2.5. İnsan GGT5 protein dizisi	30
Şekil 2.6. İnsan normal dokularında GGT5 mRNA ekspresyonu	31
Şekil 2.7. İnsan GGT7 peptid dizisi.....	33
Şekil 2.8. İnsan normal dokularında GGT7 mRNA ekspresyonu	33
Şekil 3.1. GGT standart grafiği.....	44
Şekil 4.1. Kontrol Grubu (a) ve total hasta grubunda GGT enzim aktivitesi ile GSH arasındaki ilişki.....	55
Şekil 4.2. Luminal A (a), Luminal B (b), HER2 (+) (c), Luminal B-HER2 (+) (d), Triple (-) (e) Grubunda GGT enzim aktivitesi ile GSH arasındaki ilişki.....	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklamalar
5-LO	5-Lipooksigenaz
ARA	Araşidonik Asit
BRCA1	Meme kanseri duyarlılık geni 1
BRCA2	Meme kanseri duyarlılık geni 2
CA15-3	Karsinoma antijen 15-3
cDNA	Komplementer DNA
CEA	Karsinoembriyonik antijenler
CK17	Sitokeratin 17
CK5	Sitokeratin 5
CK6	Sitokeratin 6
EGFR	Epidermal büyüme faktör reseptör
ER	Östrojen reseptörü
ES	Enzim- Substrat kompleksi
FISH	Floresan in situ hibridizasyon
GGCS	Gama Glutamil Sistein Sentetaz
GGT	Gama-glutamil transferaz
GGT1	Gama-glutamil transferaz 1
GGT5	Gama-glutamil transferaz 5
GGT7	Gama-glutamil transferaz 7
GpNA	Gama glutamil para nitro anilid
GSH	Glutatyon
GSSG	Okside glutatyon
GST	Glutatyon-S-transferaz
HA	Hiyalüronik asit
HABP1	İnsan hiyalüranan bağlayıcı protein 1
HER1	İnsan epidermal büyüme faktör reseptör 1
HER2	İnsan epidermal büyüme faktör reseptör 2

Kısaltmalar**Açıklamalar**

HGNC	İnsan Genom Adlandırma Komitesi
HpET	5-Hidroperoksieikozotetraenoik Asit
HUGO	İnsan Genom Organizasyonu
LT	Lökotrien
LTA4	Lökotrien A4
LTB4	Lökotrien B4
LTC4	Lökotrien C4
LTD4	Lökotrien D4
LTE4	Lökotrien E4
mM	Mili Molar
NIH	Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsü
PARP	Poli ADP-riboz polimeraz
PCNA	Çoğalan hücre çekirdek antijeni
PNET	Pirimitif nöroendodermal tümör
PR	Progesteron reseptörü
qRT-PCR	kantitatif Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SMA	Düz Kas Aktini
Thr	Treonin
TMHDF	Türkiye Meme Hastalıkları Dernekleri Federasyonu
TNM	Tümör-Nodül-Metastaz
TNMK	Triple (Üçlü) Negatif Meme Kanseri
UICC	Uluslararası Kanser Kontrol Birliği

1. GİRİŞ

Gama-glutamil transferaz (GGT, GGTP, gama-GT) bilimsel adlandırmada EC 2.3.2.2 ve sistematik adlandırmada (5-L-glutamil)-peptit: amino asit 5-glutamil transferaz olarak bilinen bir enzimdir. GGT, hücrelerin plazma membranlarının dış yüzeyinde yer alan, ekto aktiviteye sahip bir enzim olarak bilinmektedir. Literatürde ve klinik analizlerde GGT ifadesi, yaygın bir şekilde GGT1 (Gama-glutamil transferaz 1) yerine kullanılmaktadır. Hayvanlar ve bitkiler başta olmak üzere birçok organizmada bulunan GGT, prokaryotlarda ve ökaryotlarda, otokatalitik bir bölünme ile tek zincirli bir öncüden işlenmiş, kovalent olmayan bağlarla bağlanmış bir ağır ve bir hafif alt birimden oluşan dimerik bir glikoproteindir [1, 2, 3, 4]. GGT glutatyonun gama-glutamil kısmının bir amino asit, bir peptid veya su (glutamat oluşturan) olabilen bir alıcıya transferini katalize eder. Memeli ve bakteriyel GGT dizilerinde, yüksek benzerlik gösteren bazı bölgeler bulunmaktadır [4]. Proteinin aynı zamanda glutatyon hidrolaz (EC: 3.4.19.13) aktivitesi de vardır.

Literatürde çalışmaları, GGT1'e amino asit dizilişi benzer, olası aktif genler olduğu ön görülen ve GGT1'e açık bir şekilde homolog olan bir proteini kodlayan insan komplementer DNA'sı (cDNA) varlığını göstermektedir. Bu gen önce γ -glutamil lökotrienaz GGL ve GGT-rel/GGTLA1 olarak, daha sonraki çalışmalarda fare ve sıçanda da bulununca Gama-glutamil transferaz 5 (GGT5) olarak adlandırılmaktadır. Amino asit dizilimleri açısından GGT1'e önemli benzerlik gösteren diğer gen ise Gama-glutamil transferaz 7 (GGT7, eski GGTL3, GGTL5)'dir. GGT7 henüz tam aydınlatılamamış olup, bunların lökotrien sentezi, glutatyon metabolizması veya glutamil transferinin düzenlendiği enzimatik aktivitelerde görev aldığı düşünülmektedir. GGT5 ve GGT7, GGT1 ile benzer amino asit dizisine sahiptir ve bunların aktif genler olduğu kabul edilmektedir [4,5].

GGT ailesi; meme, rahim, akciğer kanseri ve lösemiye de içeren çok sayıda kötü huylu insan tümörlerinde ekspresyonları değişen ve glutatyon metabolizmasında görev alan 13 enzim içermektedir. GGT ailesi, antioksidan / anti-toksik savunma ve hücrel proliferatif / apoptotik denge gibi önemli redoksa duyarlı fonksiyonları değiştirdiğinden, GGT ailesinin tümör progresyonu, istilası ve ilaç direncinde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir [6].

GGT'nin; fetal karaciğer, böbrekler ve bağırsaklar gibi bazı organ sistemleri için önemli olduğu bilinmektedir. cDNA kütüphanesinden yapılan taramalarda normalde GGT5 adrenal bez, dalak, damarlar, timus ve mesane gibi normal dokularda yaygın olarak; GGT7 larenks, akciğer, pankreas ve prostat gibi normal dokularda yaygın olarak eksprese edilmektedir. Bununla birlikte, GGT5'in böbrek, glioma ve özofagus kanserlerinde; GGT7'nin ise mesane, glioma, baş-boyun, akciğer ve Primitif nöroektodermal tümörlerde (PNET) ekspresyonlarının arttığı bilinmektedir.

Bu çalışmada, meme kanserinde GGT ailesine ait, aktif olduğu bilinen ya da tahmin edilen GGT5 ve GGT7 genlerinin ekspresyonlarının incelenmesi amaçlanmaktadır. Gen ekspresyonları aynı hastadan alınan normal ve tümörlü dokularda incelenecektir. Ayrıca serumda GGT düzeyleri ve GSH düzeyleri analiz edilecek ve ekspresyon ile arasındaki ilişkiler değerlendirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Kanser, organlarda hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile oluşan, klinik görünümü, tedavisi ve yaklaşımı birbirinden farklı olan bir hastalıklar grubudur [7]. Kanser hücreleri normal hücrelere kıyasla yapıları ve işlevleri bakımından farklılık göstermektedir. Kanser hücresi, normal hücrenin yerine getirdiği işlevleri yapamazken, bazen de normal hücrelerin gerçekleştirmediği yeni işlevler kazanmaktadır. Anormal şekilde çoğalmaya başlayan bu hücreler, bulundukları doku ve organları işgal etmektedir. Ayrıca bu kanserli hücreler diğer dokulara da yayılabilmektedirler. Hücre kontrolünün bozulmasından bir hastalık olarak kanser tablosunun ortaya çıkmasına kadar geçen süre, kanser türlerine göre değişkenlik göstermekle birlikte ortalama 15-20 yıldır [8].

Birçok gelişmiş ülkede kanser, ölüm nedenleri arasında kalp ve damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır. Ülkemizde de, 0-1 yaş grubu hariç tutulduğunda, ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır ve her on ölümden birisi kanser nedeniyle oluşmaktadır [8].

Meme, kadınlarda süt üretimi için düzenlenmiş farklılaşmış bir salgı bezidir. Süt üreten lobül sistemi ile bunları meme başına aktaran duktus sisteminin birleşiminden oluşur [9]. Meme dokusu aynı zamanda yağ ve bağ dokusu, lenf düğümleri ve kan damarları içerir. Meme kanseri hem kadınlarda hem erkeklerde oluşmasına rağmen, erkeklerde çok nadir görülür. Her yıl erkeklerde 2300 meme kanseri vakası görülürken, kadınlarda bu rakam 23000'dir [10]. 2013 yılı verilerinin değerlendirildiği rapora göre Türkiye'de kadınlarda görülen kanser türleri arasında ilk sırayı meme kanserleri almaktadır. Kadınlarda en sık görülen kanserler arasında, her dört kadından bir tanesinde görülme oranıyla meme kanseri bulunmaktadır. 2013 yılı içinde toplam 17.531 kadına meme kanseri teşhisi konulmuştur [7]. Ülkemizde meme kanseri tanısı alan kadınların %45'inin 50- 69 yaş arasında olduğu, %40'ının ise 25-49 yaş aralığında yer aldığı görülmektedir [10].

2.2. Meme Kanserinin Moleküler Belirteçleri

Belirteç terimi, tümörler için yaygın olarak kullanılan bağlamda, tümörlerin gelecekteki davranışlarını öngören özellikler olarak belirtilebilir. Histopatolojinin tüm denemeleri bu bağlamda belirteç yorumu olarak düşünülebilir. Bu geleneksel yöntemin en yararlı olduğu kanıtlanmış özellikleri, tümör evresi ve derecesidir [11]. Genel olarak kullanılan evreleme sistemi Uluslararası Kanser Kontrolü Birliği (UICC) tarafından tavsiye edilen, anatomik temele dayanan birincil ve bölgesel nodül boyutunu, metastaz varlığını ve yokluğunu kaydeden, malign tümörlerin Tümör-Nodül-Metastaz (TNM) sınıflandırma sistemidir. Bu parametrelerin değerlendirilmesi ile TNM sınıflandırma sistemi evre 0'dan IV'e kadar değişen evrelemeye olanak tanımaktadır [12]. Meme kanserinde evre ve derece, bir kanser hastası popülasyonunun sonucunu tahmin etmede istatistiksel olarak başarılıdır, ancak bireyler için terapötik karar verme sürecine yardım etme konusunda yetersiz kalmaktadır. Tümörlerin önemli özelliklerini belirleme, tümörlerin ve biyolojik belirteçlerin moleküler özelliklerini tanımlama çalışmaları devam etmektedir. Kanser biyolojik belirteç çalışmaları ideal olarak beş başlık altında toplanabilir [11];

1) Kanser taraması

Kanser taramalarının nihai amacı; erken teşhis ile konakçı etkilenmeden ve en az maliyetle tanımlama yapmaktır [11, 13].

2) Kanser teşhisi

Erken teşhis, tedaviden alınan yanıt, nüks ve hayatta kalma süresini etkilemektedir [12, 13].

3) Tümör sınıflandırması

Sınıflandırma, patolojik tanıyı ve nihai olarak tedaviyi etkilemektedir.

4) Prognoz

Prognoztik belirteçler, terapötik hareketin belirleyicisi olarak kullanılırlar [11-13]. Meme kanserinde yaygın olarak kullanılan prognoztik belirteçlerden bir tanesi östrojen reseptörü (ER)'dür [11].

5) Terapötik yanıt görme

Erken ve geç evre meme kanserlerinde spesifik terapötik hedeflerin farklı sonuçlar doğurduğu bilinmektedir [11, 13]. Ayrıca meme kanserinde tümör belirteçlerinin belirlenmesi klinik yöntemin belirlenmesinde önem taşımaktadır [13].

ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) Çalışma Grubu ve Biyolojik Belirteç Konsorsiyumuna göre moleküler belirteç, patojenik veya normal süreçlerin bir göstergesi olarak objektif olarak ölçülen veya terapötik müdahaleye karşı bir farmakolojik tepki olarak tanımlanan bir özelliktir [12]. Biyolojik belirteçlere ilginin artmasının temelinde iki nedeni vardır. Birincisi, yüksek verimli yöntemler ile binlerce parametrenin aynı anda analizine imkan sağlaması, ikincisi ise; farmakoloji ve farmasötik için moleküler hedefleri belirlemektir [11]. Belirteçlerin çoğu protein olmasına rağmen, son zamanlarda tümör belirteçleri olarak gen ekspresyon kalıpları ve tümör dokusunda belirlenen DNA değişimleri de ön plana çıkmaktadır. Hastalığın klinik ilerlemesi göz önüne alındığında, tümörün davranışını öngören belirteçlerin belirlenmesi meme kanserinde özellikle önem taşımaktadır. Gen ekspresyonu profillemeye çalışmalarının sonuçları, meme kanserine bakışı değiştirmekte ve moleküler tanılama için yeni bir araç sağlamaktadır. Bu sayede moleküler alt grupların yakın ilişkileri gösterildi ve tanımlandı [12].

2.2.1. İyi tanımlanmış ve araştırmaların sürdüğü meme kanseri moleküler belirteçleri

Çizelge 2.1. Meme kanseri moleküler belirteçleri

İyi Tanımlanmış Moleküler Belirteçler	Araştırmaların Sürdüğü Moleküler Belirteçler
Hormon Reseptörleri (ER ve PR)	Tümör Protein p53
Ki67 antijeni	Karsinoma antijen 15-3 (CA15-3)
İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptör 2(HER2)	Karsinoembriyonik antijenler (CEA)
	Meme Kanseri Duyarlılık Genleri
	(BRCA1 ve BRCA2)
	Hücre Döngüsü Proteinleri
	Topo II proteini

İyi tanımlanmış meme kanseri moleküler belirteçleri

Hormon reseptörleri

Yılda 1 milyondan fazla kadına meme kanseri teşhisi konmaktadır ve bunların yaklaşık 700 bini hormon reseptör pozitifdir. Hormon reseptörleri, hem epitelyum hem de meme stromasında eksprese edilen reseptörlerdir ve fonksiyonlarını dolaşımdaki hormonlara bağlanarak ve bunların hücresel etkilerine aracılık ederek gösterirler. Meme kanserinde en iyi çalışan hormon reseptörleri, östrojen reseptörleri (ER) ve progesteron reseptörleri (PR)'dir [12].

ER ve PR'nin pozitif immünohistokimyasal ekspresyonu ile sınıflandırılan meme kanserleri, farklı klinik, patolojik ve moleküler özelliklere sahiptir [12]. Bu moleküller, kanser prognozunun tahmininde ve klinik tedavinin etkilerinin gözlenmesinde kritik rol oynamaktadır. Hormon ile ilişkili meme kanseri moleküler belirteçleri genellikle hormon ile ilişkili değişikliklerde ve klinik tedavi sırasında ortaya çıkmaktadır [14].

Östrojen reseptörü (ER)

Östrojen, hormon bağımlı transkripsiyon düzenleyicileri olarak işlev gören iki özel hücre içi reseptör, ER α ve ER β reseptör, aracılığıyla işlevlerini yerine getirir. ER yolağı insan meme kanserinin patofizyolojisinde kritik bir rol oynamaktadır. ER α 'nın aşırı ekspresyonu meme kanseri hastalarında iyi bilinen bir prognostik ve prediktif faktördür [15].

ER'nin immünohistokimyasal analizi standart değildir. Doku tedariki, korunması, antijen geri kazanımı ve daha da önemlisi pozitiflik tanımlaması farklı laboratuvarlar arasında farklılık gösterir [15].

Önceki çalışmalara göre, ER negatif meme kanseri hastaları, düşük düzeyde histolojik farklılıklar göstermektedir ve ER negatif tümörler ve in-vitro hücre hatları kemoterapiye daha hassastırlar. Bununla birlikte, ER pozitif meme kanserinde, uzun süre anti-hormon tedavisine karşı kazanılmış direncin sonucu olarak, östrojen etkisiyle apoptoz olduğu görülmektedir [14].

Progesteron reseptörü (PR)

PR'nin aşırı ekspresyonu fonksiyonel bir analiz olarak işlev görmektedir. Tümör, ER-negatif olarak rapor edilse bile, PR analizi ER yolağının bozulmamış olduğunu göstermek için yapılmaktadır [15].

PR östrojenin son ürünüdür ve temel işlevi ER'ye östrojen yanıtını sağlamak ve arttırmak, katalitik ve sinerjistik etkilere yol açmaktır. PR, ER'nin ekspresyonu temeline dayanır ve ER olmadan PR ekspresyonu meme kanseri dokusunda %1'den az görülmektedir [14].

PR, PR-A ve PR-B alt tiplerine ayrılabilir. Normal meme dokusunda bu iki reseptör eşit düzeylerde bulunurken erken dönem kanserde normal düzeyleri sıklıkla bozulmaktadır. Bu dengesi bozulmuş ekspresyon meme tümörlerinde hastalık sonucuna ve endokrin tedavisinin başarısına etki etmektedir [14].

Ki67 antijeni

İlk olarak 1983'te tanımlanan Ki67 antijeni; kararsız, histonsuz nüklear proteindir. Ki67 çoğalma sırasında çekirdek proteini ile reaksiyon gösterebilen monoklonal antikordur. Ki67 antijeni, hücre döngüsü bağlantılıdır ve çoğalan hücrelerin orta G1,S,G2 ve M fazlarında eksprese edilirken, ancak G1 fazından önce ve G0'da dinlenen hücrelerde eksprese edilmemektedir [12,14, 15]. Hiperplastik normal hücrelerde ya da tümör hücrelerinde gösterilmesi nedeniyle Ki67 özel bir hücre popülasyonunun çoğalmasına işaret etmektedir [14].

S fazı ile Ki67 arasında yüksek bir korelasyon belirlenmiştir. Böylece Ki67'nin kantitatif analizinin, tümör proliferasyon indeksinin tahmininde kullanılabileceği gösterilmiştir [12]. Ki67 ekspresyonunun ölçümü, meme kanseri örneklerinde hücre çoğalma miktarının belirlenmesi için önerilmektedir [14, 16]. 2011 Saint Gallen Konsensus Toplantısında alınan karara göre, Ki67 skoru, histolojik kesitlerde immünohistokimyasal metotlarda boyanan invaziv (invaziv) karsinoma hücrelerinin yüzdesi olarak tanımlanmaktadır. %14 ve daha az boyanan çekirdek olduğunda düşük veya negatif, daha fazla olduğunda yüksek veya pozitif olarak değerlendirilir [13, 17].

ER pozitif, lenf nodu negatif tümörlerin prognostik alt gruplara ayrılmasında kullanılan, 16 tanımlayıcı genin ekspresyonundan (kantitatif Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) analizlerinden) türetilen tekraralama skoru hesaplanırken, Ki67'yi kodlayan MKI67 geninin ekspresyonu, en fazla ağırlığa sahip olan bileşendir [16]. Yüksek düzeydeki Ki67, ER negatifliği ve HER-2 ekspresyonu hastalık ile ilişkilendirilmektedir [14]. Bununla birlikte bazı çalışmalar Ki67'nin tedavi değeri taşıdığını ve bu nedenle adjuvant kemoterapiye ihtiyaç duyan hastaların belirlenmesinde rol oynayabileceğini göstermektedir [14]. Ayrıca neoadjuvan endokrin tedaviden sonra Ki67 ekspresyonundaki değişikliklerin uzun vadeli neticeleri ön görebileceği belirtilmektedir [16]. Ki67'nin meme dokusunda değil de lenf düğümlerindeki yüksek ekspresyonunun kısa hayatta kalma süresi ile ilişkili olduğu gösterilmektedir. Böylece lenf nodu metastazlarında proliferatif etkinliği daha fazla olan hastalar daha agresif terapiye ihtiyaç duyulabilmekte ve hastalığın daha yakın klinik izlenmesi gerekmektedir [12].

İnsan epidermal büyüme faktör reseptör 2 (HER2)

Literatürde bu gen için birçok isim kullanılmaktadır ve bunlardan bazıları: HER2, c-erb-2, c-erbB-2, HER-2, HER-2/neu, ERBB2, erbB2, erbB-2, onkogen neu'dur. Kodladığı protein için neu protein ve HER2 gibi isimlendirmeler yapılmaktadır [12].

HER2, epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) ile yapısal olarak ilişkili olan, kromozom 17q21 üzerinde bulunan ERBB2/HER2 onkogenince kodlanan transmembran tirozin kinaz reseptörüdür [12, 15]. HER-2 geninin amplifikasyonu meme kanseri patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır [15]. Bu onkogenin, meme kanserlerinin %20-30'unda amplifiye olması, aşırı ekspresyonu; tümör hücrelerinin agresif bir fenotipi, antihormonal ve sitotoksik tedavilere direnç ve düşük sağkalım ile ilişkili olması, HER2'nin kötü prognoz belirteci olabileceğini düşündürmektedir [12].

HER2 reseptörlerinin homodimer veya heterodimer hale gelmesi hücre sinyalizasyonunda hücre içi tirozin kinazı aktive etmektedir. Böylece hayatta kalma ve hücrel çoğalmaya yol açan yolları da tetiklemektedir [12].

Meme kanserinde HER2 durumu ya primer tümör dokusundaki gen kopya sayısının floresan in situ hibridizasyon (FISH) analizi ile ya da HER2 proteininin immünohistokimyasal olarak analizi ile rutin olarak değerlendirilmektedir [12].

Araştırmaların sürdüğü diğer moleküler belirteçler

Tümör Protein p53

p53 hücre homeostazı ve genom bütünlüğünün korunması için esansiyel olan hücre döngüsünün durdurulması, apoptoz, DNA onarımı ve hücre yaşlanmayı içeren birçok kritik yolak ile ilişkilidir.

TP53 geninde veya p53'ün post translasyonel modifikasyondaki değişim, hücresel strese olan cevabı değiştirmektedir.

TP53 genindeki mutasyonlar, moleküler konformasyonun değişmesine ve protein yarılanma ömrünün uzamasına neden olmakta, böylece konformasyonu değişmiş p53 proteininin nükleer birikimi görülmektedir. İmmünohistokimyasal metotlar ile bu anormal birikim saptanmakta ve dolaylı olarak TP53 genindeki mutasyon belirlenmektedir.

Bu birikim meme kanseri hastalarında zayıf klinik sonucun bir göstergesidir ve bu belirtecin klinik bir değeri olmasına rağmen, hedef alan bir tedavi bulunmamaktadır [12].

Karsinoma antijen 15-3 (CA15-3) ve karsinoembriyonik antijenler (CEA)

CA15-3 peptidleri, stabil dimer yapılı iki alt birimden oluşan bir transmembran proteini olan MUC1'in dökülen veya çözülen formudur. MUC1 normal epitel hücrelerin apikal yüzeyinde heterojen olarak eksprese edilmektedir ve meme kanserlerinin %90'ında anormal ekspresyon görülmektedir.

CEA, bir glikoproteindir. CA15-3 ve CEA serum belirteç testlerine dayanan klasik yöntemlerle tespit edilebilmektedir.

Meme kanserinde CEA, nod tutulumu ve tümör boyutunun bir göstergesidir. Meme kanserinde serum CEA düzeyi ile subklinik metastaz ve prognoz arasında ilişkili

bulunmaktadır. Her iki belirtecin (CA15-3 ve CEA) eş zamanlı kullanımı, meme kanseri olan hastaların %60-80'inde metastazın erken teşhisine olanak tanımaktadır [12].

Meme kanseri duyarlılık genleri (BRCA1 ve BRCA2)

BRCA genleri tümör baskılayıcı genler olarak sınıflandırılmaktadır ve ailesel meme kanseri ile ilgili vakaların %80'i kalıtsal duyarlılık genleri olan BRCA1 ve BRCA2 genleri ile ilişkilidir [12]. BRCA, DNA'nın iki aşamalı kopma-onarılma mekanizmasında DNA stabilitesinin sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Poli ADP-riboz polimeraz (PARP) enzimleri DNA'nın kopma- onarılma mekanizmasının düzgün şekilde işleminde görevli enzimdir. Klinik öncesi araştırmalar, BRCA1 ve BRCA2 içermeyen tümör hücre hatlarının PARP inhibitörlerine duyarlı olduğunu göstermektedir [18].

BRCA proteinleri, aktivasyon ve transkripsiyonel regülasyon dahil DNA hasarının onarımında, hücre döngüsünün kontrolü dışındaki hücresel süreçlerde, hücre çoğalmasında ve farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır [12].

Hücre döngüsü proteinleri

Hücre döngüsündeki değişiklikler nihai olarak düzensiz hayatta kalmalara neden olmaktadır ve bu da tümör oluşumlarının temelini oluşturmaktadır. Kanser hücreleri normal mitotik hücre döngüsünü bypass ederek düzensiz çoğalmaya geçmektedirler. Siklin D1 insan meme kanserinde önemli bir moleküler yönlendiricidir. Östrojen ve ER yolağı, hücre döngüsü proteini siklin E ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Meme kanseri ile bozulan ER yolağı sonrası hücre döngüsü değişiklikleri görülmektedir. Bundan başka, tamoksifen tedavisi altında olan meme kanserli kadınlarda, siklin A ve siklin E'nin rahim iç zarı kanserine de dâhil oldukları bulunmuştur. Takipteki hastalarda, 12 aydan sonra bu iki belirtecin kullanımı önemle tavsiye edilmektedir. Bu nedenle meme kanseri tedavisinde hücre döngüsü proteinleri farklı moleküler işaretçiler olarak kullanılabilir [14].

Diğer hücre büyüme belirteçleri

Çoğalan hücre çekirdek antijeni (PCNA) bir çekirdek DNA polimerazıdır ve DNA sentezine, protein ekspresyonuna ve hücre çoğalmasına doğrudan katılmaktadır. PCNA düzeyi dinlenmedeki hücrelerde çok düşüktür ve çoğalmanın düzenlenmesinde pozitif bir faktör olarak yer almaktadır. PCNA indeksi hücre çoğalmasının daha nesnel ve kesin bir göstergesidir. PCNA'nın yüksek olduğu durumlarda aktif hücre çoğalması ve replikasyon zamanı kısa olmaktadır. İnsan Hiyalüranan Bağlayıcı Protein 1 (HABP1), Hiyalüronik Asite (HA) yüksek ilgi gösteren bir proteindir. Yüksek HABP-1 ekspresyonu meme kanseri hastalarındaki düşük yaşama oranı ile ilişkilidir ve önemli bir prognoz biyobelirleyicidir, çünkü HABP-1 meme kanseri hücrelerinin çoğalma ve göçünü düzenlemektedir [14].

Topo II proteini

Topo II organizmada DNA replikasyonunda, transkripsiyonda ve nükleik asidin ve fizyolojik fonksiyonlarının düzenlenmesinde yer alan önemli bir enzimdir. Çalışmalar Topo II'nin de moleküler bir işaret olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Meme kanserinde Topo II ve DNA tarafından biçimlendirilen ayrılma komplekslerini stabilize eden antrasiklin ilaçları bu yolla hücre çoğalmasını baskılamaktadır. Buna ek olarak kanser hastalarında prognoza yönelik bir işaret olarak Topo II kopya sayısı sınırlı bir değere sahiptir. Bu konuda bilinen; tümörlerin, mevcut kemoterapötiklere karşı dirençli küçük bir kanser kök hücre topluluğu tarafından yönetildiğidir. Yeni kanıtlar göstermektedir ki meme kanseri kök hücrelerindeki Topo II aktivitesindeki artış, bunların Topo II inhibitörlerine artan duyarlılığına neden olmaktadır. Bu da değerli bir prognoz belirteci olmasına neden olmaktadır [14].

2.3. Meme Kanserinin Sınıflandırılması

Meme kanserinin sınıflandırılmasında farklı yaklaşımlar kullanılmaktadır. Tümör histolojisine göre, klinik patolojik parametrelere göre, moleküler sınıflarına göre ve immünofenotipik vb. sınıflandırmalar yapılmaktadır.

Kadınlarda görülen meme tümörleri klinik ve histopatolojik görünüm olarak oldukça farklıdır. Bu tümörler histolojik tiplerine göre veya tümör belirteçlerinin ekspresyonlarına bakılarak da moleküler tiplerine göre sınıflandırılmaktadır.

Çizelge 2.2. Meme kanserinin sınıflandırılması

Histolojik Sınıflandırma	Moleküler Sınıflandırma	Yayılma Eğilimlerine Göre	Adenokarsinomlar	İnvasiv Karsinomlar
Sarkom	Luminal A	İn Situ	Duktal	İnvasive Lobüler
Karsinom	Luminal B	İnvaziv	Lobüler	Duktal/Lobüler
Hematopoetik Dokudan	HER2 Ekprese Eden		Diğerleri	Müsinöz(Kolloid)
Orjinlenenler	Bazal Benzeri			İnfiltratif Duktal
Sinir Dokudan	Null Tip			Tübüler
Orjinlenenler				Medüller
				Papiller

2.3.1. Meme kanserinin moleküler sınıflandırması

Kanserler, tümör belirteçlerinin ekspresyonlarına bakılarak moleküler tiplerine göre sınıflandırılmaktadırlar [19, 20].

Meme kanserlerinde moleküler alt gruplar, çoğunlukla duktal, az miktarda da lobüler karsinomanın gen ekspresyon profillerine dayanılarak geliştirilmiştir. Son dönemde yapılan bazı çalışmalar, meme kanserinin özel türleri ile belli biyolojik özellikler arasında bir ilişki olduğunu önermektedir. Ancak spesifik alt gruplardaki, her bir biyolojik özelliğin göreceli olarak oranı moleküler analiz yapmayı zorlaştırmaktadır. Nadir tümörleri tanımlamak için, moleküler sınıflandırmanın yararlılığı bilinmemektedir [20].

Meme kanserleri heterojen hastalıklardır [16, 21, 22]. Histolojik olarak benzer tümörler farklı hastalık seyrine sahip olabilmekte ve tedaviye farklı yanıtlar verebilmektedirler. Klinik davranıştaki bu farklılıkların histolojik olarak benzer tümörler arasındaki moleküler farklılıklardan kaynaklandığına inanılmaktadır [22]. DNA mikroyarray yöntemini kullanan gen ekspresyon analizleri, meme kanserlerinin geleneksel histopatolojik yöntemler ile belirlenemeyen [23], klinik özelliklerinden farklı olarak moleküler alt gruplara ayrılabilirliğini göstermektedir [21, 22, 24, 25] ve meme kanserini tek bir hastalık değil, en az dört farklı moleküler neoplastik bozukluk olarak tanımlamaktadır [26]. Tümör

dokudaki gen ekspresyon analizi meme kanserlerinin, ER pozitif iki alt gruba (Luminal A ve Luminal B), ER negatif üç alt gruba (HER2 eksprese edenler, bazal benzeri ve normal benzeri) ayrılabilceğini göstermektedir [16, 23, 24, 27, 28]. Çalışmalar bu grupların prognozda ve eksprese ettikleri törapatik hedeflerin birikiminde [28, 29], görülme oranlarında, hayatta kalma ve tedaviye cevaplarında belirgin bir şekilde farklı olduğunu göstermektedir [27]. Bu sınıflandırma farklı dizi platformları, tümör setleri ve istatistiksel analizlerin kullanıldığı bağımsız araştırmalarda oldukça tutarlı sonuçlar vermektedir [24]. Temel moleküler belirteçlerin, çoklu genomik çalışmalarda hem in situ hem de invaziv meme kanserleri için uygulanabilirliği ve farklı ırklarda tanımlanabilirliği gösterilmiştir [18]. Hormon terapilerinin gelişmesi, ER pozitif ve ER negatif meme kanserleri arasındaki farkları doğrulamaktadır. Başlangıçta tüm meme kanserleri için kullanılan tamoksifen ile tedaviye, daha sonra sadece hormon reseptörleri eksprese eden tümörlü hastaların yanıt verdiği görülmektedir. Meme kanserinin heterojen doğası hekimler ve hastalar için önem taşımaktadır [23]. Bu alt gruplar, hastalık seyri ve öngörü (belirleyicilik) değerine sahiptir. Hasta takip çalışmalarında, aynı biyolojik alt grup setlerinde, gen ekspresyonuna dayalı öngörülerin tutarlılığı, bu alt grupların, hasta sonuçlarını tahmin etmek için kullanılabileceği kanaati oluşturmaktadır [21]. PAM50 alt grup prediktörü olarak bilinen, gen ekspresyon temelli analiz, meme kanserinin alt moleküler gruplarını tanımlamakta ve tekrarlama riski skoru sağlamaktadır [30]. Ancak gen ekspresyon çalışmalarının gelişmesi ile tümörlerin yeni alt gruplarının oluşturulacağı beklenmektedir [27]. Seçilmiş immünohistokimyasal boyaları kullanan çalışmalar, klinik sonuçlarına göre tümörlerin benzer şekilde sınıflandırılmasını sağlamıştır. Bu durum moleküler sınıflandırmanın güçlü olduğunu göstermektedir [24]. Moleküler belirteçleri hedef alan tedavilerin kullanımı artarak devam etmektedir [23]. Son yıllarda özellikle klinik-onkolojik öngörüler doğrultusunda Ki67 proliferasyon indeksi de bu sınıflandırmaya ilave edilmiştir [16]. Gen ekspresyon analizi ile moleküler sınıflandırma temelde şu şekilde yapılmaktadır:

Luminal A meme kanseri [ER ve/veya PR (+)/ HER2 (-)], düşük Ki67

Luminal A tümörler, pozitif östrojen reseptör (ER)/progesteron reseptör(PR) ve negatif insan epidermal büyüme faktör reseptör-2 (HER2) ile karakterize edilmekte [24] ve luminal epitel hücre belirteçleri ile ayırt edilmektedirler [29]. Bu tümörler Ki67 geninin düşük ekspresyonu ve en iyi prognoz göstermeleri ile ayırt edilmektedir [16] ve beş alt grup arasında en fazla olumlu klinik özellikler gösteren tümörlerdir [24].

Luminal A ve luminal B tümörleri GATA3 (GATA3, meme epitelinin, ürotelyanın ve T-lenfosit alt gruplarının farklılaşmasında önemli bir transkripsiyon faktörüdür) genini ve bu genin regüle ettiği diğer genleri eksprese ederler [28, 31]. Luminal A tümörler Luminal B tümörlere göre daha yüksek seviyelerde östrojen reseptör ve GATA3 gen ekspresyonu gösterirler ve luminal A meme kanserlerinde daha olumlu hasta neticeleri gösterirler. Luminal B tümörler ise daha çok insan epidermal büyüme faktör reseptör 1(HER1), HER2 ve/veya siklin E1 (hücre döngüsü proteinlerinden siklin E izoformu) eksprese etmektedir [28]. Her iki siklin E izoformunun eksikliğinde; dinlenen hücreler hücre döngüsüne geçemezler. Hücre döngüsünün S evresinde ilerleyebilmesi ve DNA replikasyonunun başlayabilmesi için siklin E gerekmektedir [32].

Luminal B meme kanseri [ER ve/veya PR (+)/ HER2 (-)], yüksek KI-67

Luminal B tümörler pozitif ER/PR'ye ilaveten HER1 ve HER2 eksprese etmekte ve Luminal A'ya göre daha az olumlu klinik özellikler göstermektedirler [16, 21, 24].

Hormon reseptör pozitif olan Luminal A ve luminal B moleküler alt grubu, prognoz başlangıcında ve sitotoksik tedavilere karşı duyarlılıkta önemli farklılıklar göstermektedir [30].

Bazı luminal B tümörleri, HER2 ekspresyonu ile tanımlanabilmesine rağmen, Luminal A ve Luminal B arasındaki en büyük ayrım Luminal B'nin CCNB1 (siklin B1 kodlayan gen), MKI67 (Ki67 proteinini kodlayan gen) ve MYBL2 (transkripsiyon faktörü genlerini kodlayan MYB ailesinden olan, hücre döngüsü ilerlemesi ile ilgili bir nükleer protein) gibi proliferasyon işareti içeren genleri daha fazla eksprese etmesidir [16].

İmmünohistokimyasal olarak proliferasyon ölçümünü kolaylaştırmak için Ki67 için monoklonal antikor tekniği kullanılmaktadır. Böylece Ki67 etiketleme indeksi, luminal B alt grubunu belirleyen bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır [16].

Östrojen ve/veya progesteron reseptörleri pozitif olan meme kanserlerinin üçte ikisi için genellikle tamoksifen veya aromataz inhibitörleri ile endokrin tedavi tavsiye edilmektedir. Hormon reseptörü pozitif tümörlü hastalar adjuvan tamoksifen ile tedavi edildiğinde, nüksetme veya ölümlerle sonuçlanma risklerinde 30% oranından fazla azalma görülmektedir.

Ancak lenf nodu pozitif, ER pozitif meme kanseri olan bazı hastalarda adjuvan sistemik tedavi yeniden nüksü önleyemediği gibi, birçok düşük riskli hasta bu müdahalelerden fayda görmeksizin yan etkilere maruz kalabilmektedir. Bu nedenle, mevcut tedavi protokollerine rağmen, nüksetme riski yüksek olan hormon reseptörü pozitif tümörlü hastaları, tek başına adjuvan tedavinin yeterli olabileceği düşük riskli hastalardan ayırt etmek gerekmektedir [16].

Bazal benzer/Üçlü (triple) negatif meme kanseri (TNMK): En az bir bazal belirteç (SMA, SK5, SK14, SK17) ile pozitiflik gösteren, üçlü negative [ER(-) PR(-) HER2 (-)]

Bazal benzeri meme kanserleri, tüm meme kanserlerinin %10-20'sini oluşturmakta ve daha sık gençleri etkilemekle birlikte, Afrikalı-Amerikalı kadınlarda ve BRCA1 mutasyon taşıyıcılarında daha yaygın görülmektedir [18, 23, 24].

Bazal benzeri kategori neredeyse tamamen “triple negatif” (ER(-)/PR(-) ve HER2(-)) meme kanserlerinden oluşmaktadır. Bu nedenle bu üç standart immünohistokimyasal belirteç kullanılarak bazal benzeri meme kanserlerinin çoğunluğunun, bazal benzeri olmayanlardan kesin olarak ayrılması mümkündür [23].

Triple negatif tümörler genellikle daha büyük boyutludur, daha yüksek kanser derecesine sahiptir ve tanıda lenf nodu tutulumu göstermektedir ve biyolojik açıdan daha agresiftirler [18]. Bazal benzeri tümörlerin tedavisi, iyi tanımlanmış moleküler hedeflerin olmaması (ER, PR reseptörü ekspresyonu ve HER2 amplifikasyonu yapmaması) ve hastalığın heterojenliği nedeniyle zorlaşmaktadır [18]. Bazal benzeri tümörler düz kas aktini (SMA), sitokeratin 5/6 (CK5/6) ve sitokeratin 17 (CK17) ekspresyonu da dâhil olmak üzere bazal epitel hücre tabakasının karakteristik genlerini fazlaca eksprese etmektedir [24, 28, 33]. Bazal benzeri kanserlerin, ER/PR ve HER2'yi eksprese etmediği için, ne antiöstrojen hormonal tedavilerden ne de trastuzumab'tan fayda görmeleri beklenmemektedir [21]. Bu sebeple, TNMK hastaları genellikle sitotoksik özellikteki kemoterapötik ajanlarla tedavi edilmektedir. TNMK tedavisinde antrasiklinler, taksanlar, iksabepilon ve platin türevlerini içeren birçok kemoterapi ajanı kullanılmaktadır ve farklı çalışmalarda kemoterapi ajanlarının etkinliği gösterilmektedir. Tüm hastalar, pratikte kullanılan immünohistokimyasal belirteçlere göre sınıflandırıldığında, temel tedavi şekli olarak uygulanan yöntemlere, her bir grupta oldukça farklı yanıt oranları görülmektedir. Örneğin,

TNMK'li hastaların sadece %30'u kemoterapiye cevap vermektedir ve kemoterapiye cevap veren vakalarda 5-yıl hayatta kalma oranı %95'e kadar çıkmaktadır. Geri kalan %70'lik hasta grubu ise kemoterapiye cevap vermemekte ya da direnç göstermektedir ve 5 yıl hayatta kalma oranı %60'a kadar düşmektedir [29]. Tedaviye cevaptaki bu heterojenlik, meme kanserinin biyolojik ve dolayısıyla ilaç yanıtı farklı alt grupları olabileceğini düşündürmektedir. Böyle alt grupların tespiti için son yıllarda birçok çalışma yapılmış ve farklı alt gruplar olduğu tespit edilmiştir [18,29,34,35,36]. Cerrahi öncesi kemoterapiye (neoadjuvan) daha yüksek klinik cevap oranları olmasına rağmen, diğer meme kanseri alt grubu olan kadınlara göre TNMK hastalarının, uzak nüks oranları daha yüksektir ve bu hastalar daha kötü hastalık seyrine sahiptir [18]. Ayrıca daha kısa nüksüz sağkalım süresine sahip oldukları gösterilmiştir [23].

Metastatik triple negatif meme kanserli kadınların %30'dan azı ortalama 5 yıl yaşamaktadır ve tedavinin temel dayanağı olan adjuvan kemoterapiye rağmen hemen hemen hepsi hastalıklarından ölmektedir [18].

Tedavi edici ilerlemelere en çok ihtiyaç duyulan alt gruplar, tedavi direncinin yaygın olduğu bazal benzeri ve luminal B meme kanserleridir [26]. Açıkçası, bu agresif meme kanseri türlerine daha etkili tedaviler geliştirmek için triple negatif meme tümörlerinin temelini daha iyi anlamaya ihtiyaç vardır ve daha kapsamlı moleküler ve biyolojik analizleri gereklidir [18]. Son yıllarda etkene yönelik spesifik tedavi seçimleri ve ilaçlar ortaya çıktıkça tümör biyolojisini anlamaya yönelik söz konusu moleküler yöntemlerin önemi artmaktadır.

HER2 eksprese eden [ER ve PR (-)/ HER2 (+)]

HER2 eksprese eden ve bazal benzeri alt grupların her ikisinde de ER/PR negatiftir ve bu durum zayıf klinik özellikler ve zayıf hasta sağ kalımı ile ilişkilendirilmektedir [22, 25]. İmmünohistokimyasal olarak yapılan çalışmalarda, HER2 eksprese eden grubun, bazal benzeri gruba göre daha kötü neticelere sahip olduğu görülmektedir [16].

HER2 pozitif tümörler en az iki ayrı ekspresyon grubuna girmektedir. Bunlar; ER negatif olan (HER2 pozitif/ER negatif alt grup) ve tipik olarak bazal benzeri tümörler yakınında

kümelenenler ve ER pozitif (aynı zamanda PR pozitif) olan ve luminal B alt tipinin bir parçası olarak luminal hücre kökenli hücreler ile birlikte bulunanlardır [28].

Hormon reseptörü negatif olan iki alt grubun (bazal benzeri ve HER2 eksprese eden), hormon reseptörü pozitif luminal gruplar ile karşılaştırıldığında; kötü hastalık neticelerine sahip olduğu [16, 25], zayıf klinik özellikler gösterdiği, genel sağ kalım oranının kısa olduğu [21, 24] ve en kısa nüksüz süreye sahip olduğu belirtilmektedir [22]. Ancak geliştirilmiş adjuvan kemoterapiye ve neoadjuvan kemoterapiye yüksek patolojik yanıtlar verdiği de rapor edilmektedir [25].

Meme kanserinin yaklaşık 15%'ini oluşturan HER2 eksprese eden tümörlerde, HER2'yi hedef alan bir monoklonal antikor olan trastuzumab ve adjuvan kemoterapi uygulanmaktadır [16].

Null tip: Herhangi bir antijeni eksprese etmeyen tümörler

Meme kanserinde kişiselleştirilmiş kanser ilaçlarının etkinliği, temoksifenin yararının östrojen reseptörlerini eksprese eden hastalarla sınırlı olduğunun keşfedildiği 1980lerin sonlarından bu yana kabul görmektedir. Bu kişiselleştirilmiş tedavi HER2 gen ekspresyonunun keşfedilmesi ve bunun ardından trastuzumab ve lapatinib gibi hedefe yönelik tedaviler yoluyla ilerlemiştir. Yakın zamana kadar meme kanserindeki kişiselleştirilmiş ilaç tedavileri sadece iki öngörü belirtecine (ER ve HER2) dayanmaktayken gen ekspresyon profillemesinde meydana gelen gelişmeler, meme kanseri tedavisinde yaklaşım kaymasına yol açmıştır. Meme kanserinin moleküler olarak farklı alt gruplarının altında yatan genetik sapmaların belirlenmesi, yeni tedavi edici hedefler ortaya çıkarmıştır. Böylece meme kanseri klinik deneme tasarımı yeniden şekillendirmiştir [26].

Adjuvan sistemik tedavinin uygulanması, meme kanseri ölüm oranında son dönemdeki azalmaya katkıda bulunduğu belirtilmektedir [16].

2.3.2. Meme kanserinde kullanılan diğer sınıflandırmalar

Histopatolojik olarak hücre kökenine göre yapılan sınıflandırmada mezenkimal dokudan orjinlenen kötü huylu tümörler sarkom adını alır. Sarkom bağ doku, kemik, kıkırdak, yağ doku, kas, lenf ve kan damarı endoteli, mast hücreleri gibi hücrelerin anaplastik özellikler kazanması ile oluşmaktadır [37].

Epitel dokudan orjinlenen tümörler karsinom adını alırlar. Karsinomlar çok katlı yassı epitel, bez epiteli, karaciğer hücreleri, endokrin epitel, spermatojenik epitel gibi hücrelerin anaplastik özellik kazanması ile oluşmaktadır. Bez epitelinden başlayanlar özel olarak adenokarsinom olarak adlandırılmaktadır [37].

Hemopoiyetik (Hematopoetik) dokudan orjinlenenler tümörler lenfositler, plazma hücreleri, granülositler, eritrositler ve monositlerin anaplastik özellik kazanması ile olurmaktadır ve orjinlendiği hücreye göre lenfoma(lenfosittik lösemi), multipl miyelom, granülositik lösemi, eritrolösemi, monositik lösemi gibi yaygın olarak da lösemi terimi kullanılarak adlandırılmaktadır [37].

Sinir dokusundan orjinlenen tümörler, temel aldığı hücre tipine göre, astrositom, oligodendrogliom, schwannom olarak adlandırılmaktadır [37].

Meme kanserinde adenokarsinomlar yaygın görülmektedir. Bu nedenle süt bezlerinde başlayanlar lobüler, süt kanallarında başlayanlar duktal olarak sınıflandırılmaktadır [37].

Meme kanseri, başladığı doku ile sınırlı kalma ve dokudan ayrılma eğilimine göre, in situ ve invaziv olmak üzere iki ana gruba ve her grup da kendi içinde alt gruplara ayrılmaktadır [38].

İn situ karsinomlar, başladığı doku ile sınırlı kalan, benign (iyi huylu) tümörlerdir. Başladığı bölgeye göre, Duktal in situ karsinoma ve Lobular in situ karsinoma olarak gruplandırılmaktadır. Duktal in situ karsinomalar, Lobular in situ karsinomalara göre daha yaygın görülmektedir [38].

İnvasiv, malign bir tümörün ana tümör kütleli yanında primer odak ile bağlantısı kesilmeden bitişik dokuya yayılması, infiltrasyon oluşturması olarak tanımlanmaktadır [8,

37]. İnvaziv meme kanseri, yayılımı, patolojik sınıflandırması ve klinik çalışmaları dikkate alındığında heterojen hastalıktır. İnvaziv meme kanseri malign epitel tümörlerdir ve komşu dokuya veya uzak dokulara metastaz eğilimi ile karakterize edilmektedir [8, 39]. Meme dokusu gibi homojen olmayan dokularda malign tümörler infiltratif gelişim göstermektedir [37].

İnvaziv karsinoma, malign (kötü huylu) tümörler olarak bilinmekle birlikte, kendi içerisinde de alt gruplara ayrılmaktadır. Bu alt gruplar şunlardır:

- İnvaziv lobüler karsinom
- Duktal/Lobüler karsinom
- Müsinöz(kolloid) karsinom
- İnfiltratif duktal karsinom
- Tübüler karsinom
- Medüller karsinom
- Papiller karsinom [38].

İnvaziv kanserler içerisinde 70-80% oranında en yaygın görülen infiltratif duktal karsinomadır. İnfiltratif büyüme, tümör hücreesindeki çoğalmanın tümörün dış çevresindeki hücrelerde yoğunlaştığı büyüme tipidir [38]. İnfiltratif duktal karsinoma kendi içinde iyi farklılaşmış (seviye 1), kısmen farklılaşmış (seviye 2), zayıf farklılaşmış (seviye 3) olarak da ayrılmaktadır. Bu sınıflandırma; nükleer pleomorfizm (hücre çekirdeğinin düzensiz ve değişik biçimlerde görülmesi), glandüler/tübül oluşumu, mitotik oran (10 mikroskopik büyük büyütme alanında (BBA)-2 mm²) dikkate alınarak yapılmaktadır [38].

İnvaziv karsinoma teşhislerinin %75'ten fazlası invaziv duktal karsinoma, %5-15'i invaziv lobüler karsinomadır ve diğerleri de daha düşük oranlarda tespit edilmektedir [19, 40].

Bugünkü bilgilere göre meme kanseri (invaziv duktal kanser) oluşmadan önce duktus epiteli atipik duktal hiperplazi, duktal karsinoma insitu gibi evrelerden geçer ve sonunda meme kanseri oluşmaktadır. Bu dönüşüm on yıllarca sürebilmekte ve meme kanseri tedavi edilmezse biyolojik davranışına göre, uzak organ metastazları yapmakta ve sonunda ölüme neden olmaktadır. Meme kanseri hücrelerinin klinikte tespit edilmeden uzun yıllar önce

oluştugu düşünölmekle birlikte, klinik tanı konduktan sonra hastaların sağ kalma sürelerinin ortalaması 5 yıldır ve ölümlerin büyük çoğunluğu organ metastazlarından dolayı meydana gelmektedir [9]. Görölme sıklığı ve yüksek ölüm oranına ek olarak kanser tedavisinin pahalılığı da sosyo-ekonomik bazı sorunları ortaya çıkarmaktadır [8].

2.4. Gama Glutamil Transferaz (GGT)

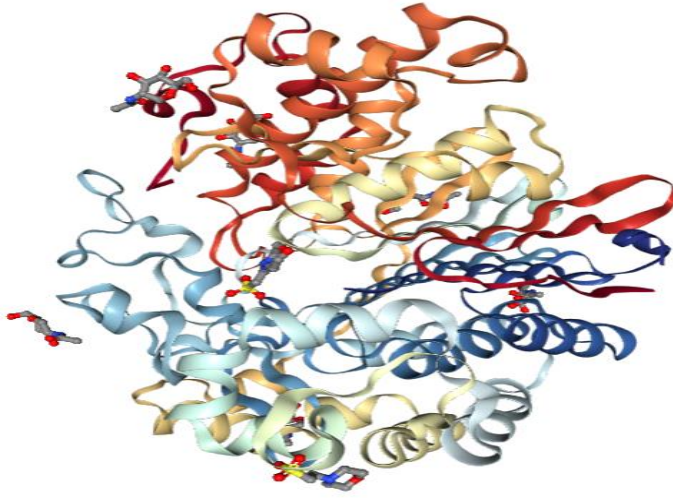
Gama-glutamil transferaz (GGT, GGTP, gama-GT) bilimsel adlandırmada EC 2.3.2.2 ve sistematik adlandırmada (5-L-glutamil)-peptit: amino asit 5-glutamil transferaz olarak bilinen bir enzimdir. GGT hücrelerin plazma membranlarının dış yüzeyinde yer alan, ekto aktiviteye sahip bir enzimdir. Hayvanlar ve bitkiler başta olmak üzere birçok organizmada bulunan GGT [2], prokaryotlarda ve ökaryotlarda, otokatalitik bir bölünme ile tek zincirli bir öncüden işlenmiş, kovalent olmayan bağlarla bağlanmış bir ağır ve bir hafif alt birimden oluşan dimerik bir glikoproteindir [1, 3, 4]. GGT, glutatyonun gama-glutamil kısmının; amino asit, peptid veya su olabilen bir alıcıya transferini katalize etmektedir. Memeli ve bakteriyel GGT dizilerinde, yüksek benzerlik gösteren bazı bölgeler gösterilmiştir [41]. Proteinin aynı zamanda glutatyon hidrolaz (EC: 3.4.19.13) aktivitesi vardır. Enzim, tek bir öncü polipeptidin proteolitik bölünmesiyle oluşan iki zincirden meydana gelmektedir. C-terminal alt-biriminin N-terminal L-treonini, hem bölünme hem de hidroliz reaksiyonları için aktif bölge olarak işlev görmektedir [42].

GGT, neredeyse tüm hücrelerin plazma zarında bulunan, ancak esas olarak salgı ya da emici fonksiyonlara sahip epitel dokularında yer alan bir enzimdir. Enzimin birçok organda varlığı gösterilmekle birlikte, en yüksek GGT aktivitesi böbrekte bulunmaktadır. Daha sonra sırasıyla onikiparmak bağırsağı, ince bağırsak ve safra kesesinde yer almaktadır. Erişkin karaciğerinde, GGT, hepatositlerin safra kolunda ve kolanjiyositlerde yer almakta ve bu nedenle safra içine salgılanmaktadır. Plazma GGT'nin karaciğer kaynaklı olduğu düşünülmektedir [3].

2.4.1. GGT'nin yapısı

Gama Glutamil transferaz katalitik olarak etkin olan ve post-translasyonel olarak bir ağır ve bir hafif zincir oluşturmak için işlenmiş olan, tek bir polipeptid olarak sentezlenmektedir [43]. GGT1 olarak bilinen, insan GGT'si 569 amino asit içeren öncül

peptit olarak sentezlenmekte ve bu öncül peptit enzimatik olarak inaktif özellik göstermektedir. Enzimin aktivasyonu, kullanılmadan önce iki alt üniteye parçalandıktan sonra gerçekleşmektedir. GGT, başka bir enzime gereksinim duymadan kendi yapısını kırma (bölme) işlevine sahiptir ve bu işlevi peptid dizisindeki nükleofilik treonin'e (Thr 381) bağlıdır. Belirtildiği gibi GGT, N- terminal nükleofilik hidrolaz ailesinin üyesidir ve bu aileye kendi yapısını kırma ve kinetik mekanizması bakımından benzerlik gösterir, ancak bu aile ile dizi homologluğu yoktur. İnsan GGT'sinin uygun katlanması, enzim kullanmadan kendi yapısını kırması ve aktivasyonu için N-glikozilasyon zorunludur. Olgunlaşmış yapıdan glikan ayrıldığı zaman enzimatik olarak aktif heterodimer oluşmakta ve enzim aktivitesini sürdürmektedir [41]. Ağır alt biriminin N-terminal bölümündeki hidrofobik alan, enzimin hücrenin plazma membranına bağlanmasını sağlamaktadır ve her iki alt birim hücre dışı alanda bulunmaktadır. GGT'nin aktif bölgesi hafif altbirim üzerinde bulunmakta ve glutatyon (GSH), lökotren C4, nitrosoglutatyon ve diğer GSH-konjugatları gibi ekstraselüler substratları etkilemektedir [3, 4]. GGT'nin ökaryotlardaki ilk kristal yapısı olarak, insan GGT'sinin yapısı çözülmüştür (Şekil 2.1.). Bu yapı, N-terminal nükleofilik hidrolaz ailesinde yaygın bulunan α - β - β - α çekirdek yapısının kümelenmesi ile oluşmuş bir heterodimer ortaya çıkarmaktadır [44]. Enzim yüzeyinin görünümü, büyük alt birimin küçük alt birimin etrafını sardığını göstermektedir. İnsan GGT'si yedi tane N-glikozilasyon bölgesine sahiptir ve GGT kristal yapısı bu yedi bölgenin hepsinin proteinin dış yüzeyine yerleştiğini göstermektedir. İlave çalışmalar, insan GGT'sinde, bölgeye özgü ve dokuya özgü glikan bileşimli yapıların varlığını kanıtlamıştır ve kristal yapı çalışmaları, yarıgın en derin kısmındaki katalitik nükleofil (Thr-381) ile substrat kanalını tanımlamıştır. İnsan GGT'sinde nispeten açık olan aktif bölge, daha kısıtlı erişim bulunan çoğu prokaryotik GGT'lerinden farklılık göstermektedir. İlaveten zincirdeki katalitik kalıntı (Thr-381) bölgesinde iki farklı konformasyon gözlemlenmiştir. Bu durum, zincirin bu bölgesinin substrat bağlanırken hareket ettiğini kanıtlamaktadır [41].



Şekil 2.1. İnsan GGT1 kristal yapısı [45]

2.4.2. GGT'nin fonksiyonları

İnsan GGT'si, aktif bölgesi ekstraselüler bölgeye uzanan, plazma membranı ile bütünleşmiş glikoprotein yapıdadır [42, 41, 44]. GGT, GSH 'ın hem yıkımında hem de kullanımında rol almaktadır. GGT temelde üç reaksiyonu katalizler;

- Transpeptidasyon: gama glutamil kalıntısının akseptöre transferini sağlamaktadır.

$$[\gamma\text{-glutamil-}\gamma\text{-GT}] + \text{R}'\text{-NH}_2 \rightarrow \gamma\text{-glutamil-NH-R}'$$
- Ototranspeptidasyon: gama glutamil kalıntısını GSH'a transfer etmekte ve Glutamil-GSH oluşturmaktadır.

$$[\gamma\text{-glutamil-}\gamma\text{-GT}] + \gamma\text{-glutamil-NH-R} \rightarrow \gamma\text{-glutamil-}\gamma\text{-glutamil-NH-R}$$
- Hidroliz: gama glutamil kalıntısının su ile hidrolizini sağlamaktadır.

$$[\gamma\text{-glutamil-}\gamma\text{-GT}] + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{glutamat} [46, 47].$$

GGT, N terminal nükleofil hidrolaz süperailisine bağlıdır. Bu enzim glutatyondaki gama glutamil amid bağı kırar ve sisteinilglisin oluşturur. Serbest kalan gama glutamil, suya (hidroliz), aminoasitlere veya kısa peptidlere transfer edilebilmektedir [1, 4, 41].

GGT1, gama glutamil kalıntısını, glutasyon ve diğer glutamil bileşiklerinden akseptörlere transfer reaksiyonlarını gerçekleştirmektedir. Lökotrien C4 (LTC4)'ün Lökotrien D4 (LTD4)'e dönüşümünde ve glutasyon metabolizmasında kritik fonksiyonlara sahiptir [2].

GSH metabolizması

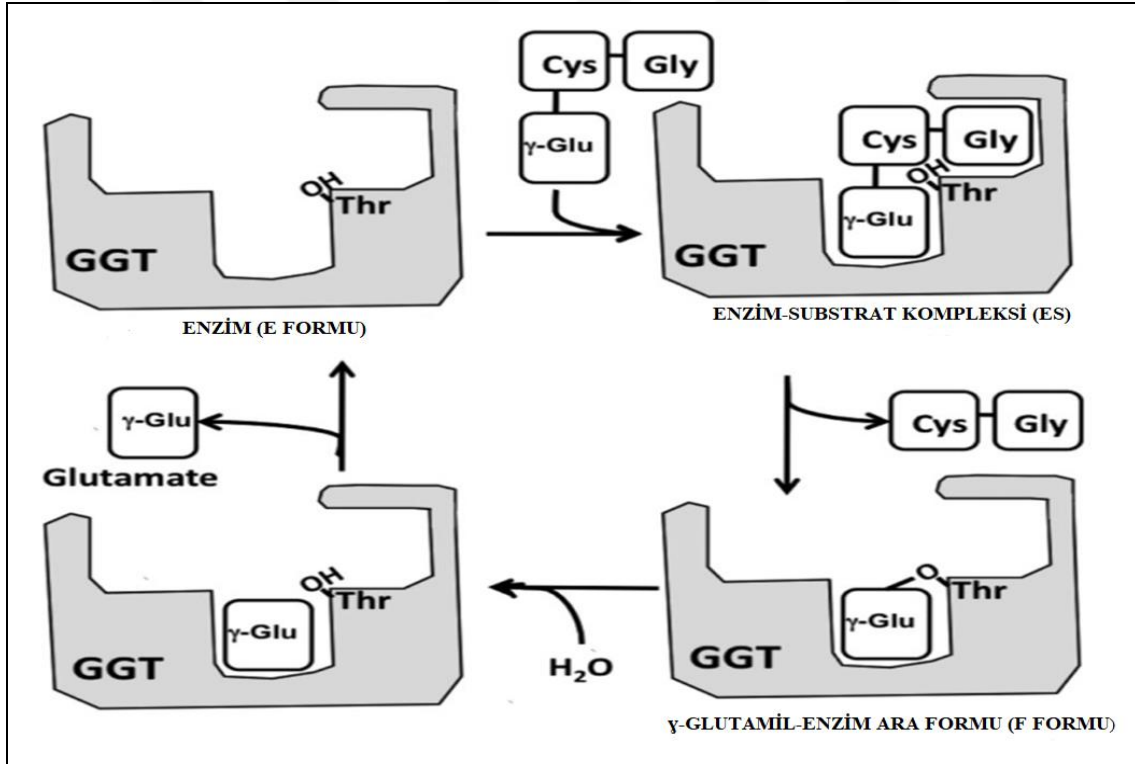
GSH, mikroorganizmalardan insanlara kadar birçok hücrede sentezlenen, intrasellüler alanda yüksek konsantrasyonda bulunan, düşük molekül ağırlıklı, non-protein tiyol yapısında olan önemli bir antioksidandır [46]. Glutasyon, peroksidaz enzim ailesinin bir kofaktörü olmasının yanı sıra, askorbik asit metabolizmasını, hücreler arası iletişimin sürdürülmesini sağlayan ve genel olarak proteinlerin sülfidril (-SH) gruplarının okside olmasını ve çapraz bağlanmasını engelleyen diğer birçok metabolik süreçte yer almaktadır. Ayrıca hücre içi bakır transportunda da işlev görmek ve bakır iyonları ile şelatlar oluşturmaktadır. Böylece bu iyonların serbest radikal oluşturma kapasitelerini azaltmaktadır. GSH, koruyucu bir ajan olarak lökoeritrin sentezinde yer alan enzimler için ve glioksilazları da içeren farklı metabolik yollarda çalışan bazı enzimler için kofaktör işlevi görmektedir. GSH protein katlanmasında ve insülin gibi disülfid bağları taşıyan proteinlerin yıkılmasında da rol almaktadır [47]. GSH'ın en önemli fonksiyonları redüksiyon ve konjigasyondur [46].

Hücre içerisinde sentezlenen glutasyon, GGT ile hücre dışına taşınmaktadır GGT, glutasyon ve diğer proteinlerdeki glutamil peptid bağını kesebilmekte ve glutamil kalıntısını bir akseptöre aktarabilmektedir. GGT'nin glutasyon sentezi için substrat sağlaması, glutasyon homeostazında anahtar rol aldığını kanıtlamaktadır. GGT ve glutasyon birçok organ sisteminde, özellikle fetal karaciğer, böbrek ve bağırsaklarda önem taşımaktadır [1, 2].

GSH ve okside GSH (GSSG) en bol bulunan fizyolojik subtratlardır. Ancak GGT, GSH S-konjüglatları dâhil olmak üzere hiçbir gama glutamil subtratını parçalayamamaktadır. Substratın glutamat fonksiyonel grubu, gama glutamil bağı hariç, sınırlandırılmamış olmalıdır. GGT, peptid veya glutamat bağı içeren herhangi diğer bileşikler bünyesinde barındıran, glutamat ile oluşmuş gama glutamil bağlarını koparamayacaktır.

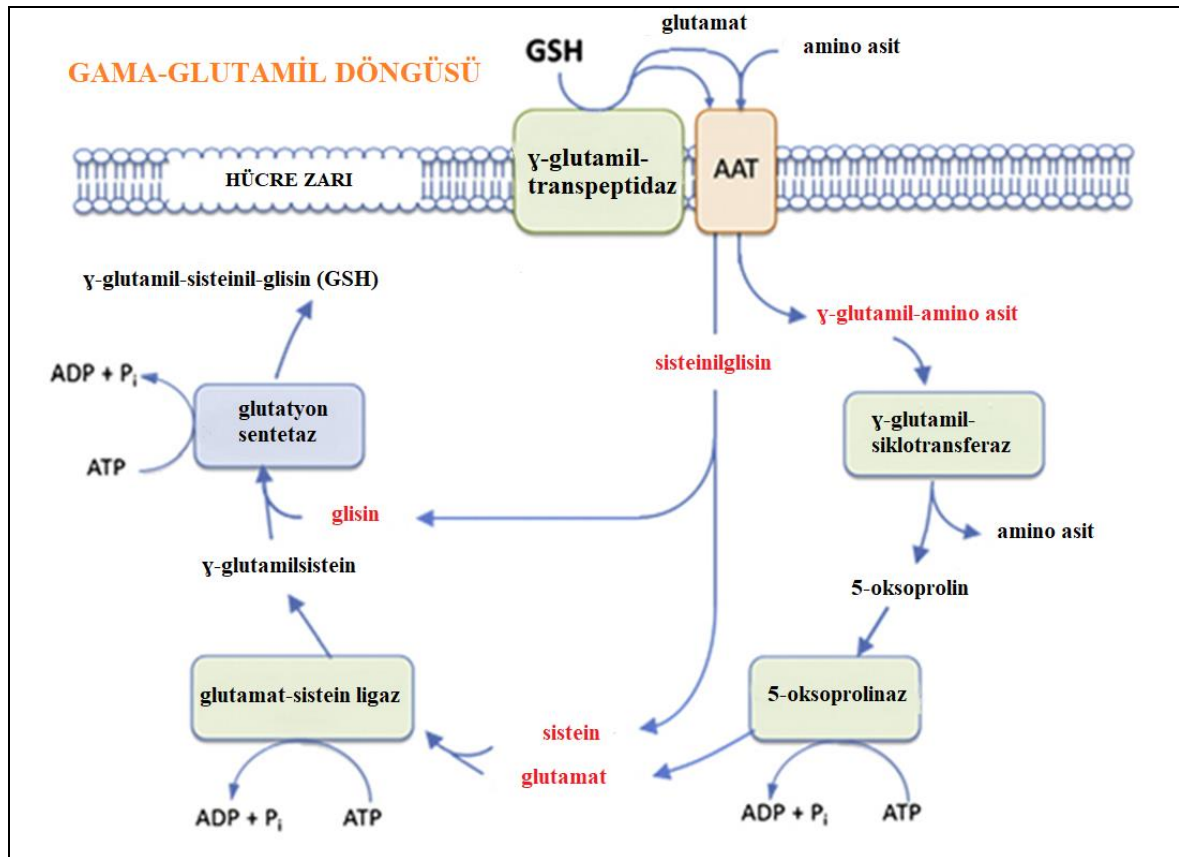
Glutasyon birçok hücre tarafından doğrudan alınamamakta, bu nedenle ilk olarak yapıtaşı olan amino asitlere hidrolize edilmesi gerekmektedir. GSH'ı parçalayabilen tek enzim GGT'dir ve oluşan amino asitler hücre membranındaki amino asit taşıyıcı proteinler tarafından hücrelere taşınabilmektedir [47]. GGT ile katalize edilen reaksiyonun ilk basamakları, substratın gama-glutamil bağının kırılması ve geçici bir enzim-substrat (ES)

kompleksinin oluşmasıdır. Substratın gama-glutamil grubu hariç hepsi serbest bırakılmıştır. ES kompleksinde, gama-glutamil substratın gama-karbonu, enzimin aktif bölgesindeki treonin (Thr)'nin yan zinciri ile açıl bağı oluşturur böylece esterlenmiş enzimin hidrolizi gerçekleşir. glutamat salınması ve serbest enzim rejenere olmaktadır (Şekil 2.2.). Akseptör amino asit ve peptidin yüksek konsantrasyonda varlığında transpeptidasyon reaksiyonu, gama glutamil grubunun akseptör amine transferi ve dolayısıyla yeni gama glutamil bileşiği, oluşmaktadır. Gama-glutamil grubunun bir dipeptid alıcıya aktarılması, modifiye edilmiş bir Ping-Pong mekanizması ile gerçekleşmektedir. GGT'nin katalizlediği transpeptidasyon reaksiyonunda hidrolizin derecesi, hem pH hem de akseptör aminoasit veya peptid varlığı ile etkilenmektedir [48, 49].



Şekil 2.2. GGT hidrolizi ve transpeptidasyon reaksiyonlarının illüstrasyonu [49]

Glutatyonun gama glutamil bağının ekstraselüler olarak parçalanması hücrenin sistein kaynağı olarak bu antioksidan bileşikler kullanmasına olanak tanımakta, böylece hücre içi glutatyon ve protein sentezi için zorunlu olan substratları sağlamaktadır [44, 48]. Gama glutamil çevrimi olarak adlandırılan bu reaksiyonlar hücreye lokal sistein kaynağı sağlamakta ve intraselüler GSH seviyesinin korunması için katkıda bulunmaktadır (Şekil 2.3) [42].



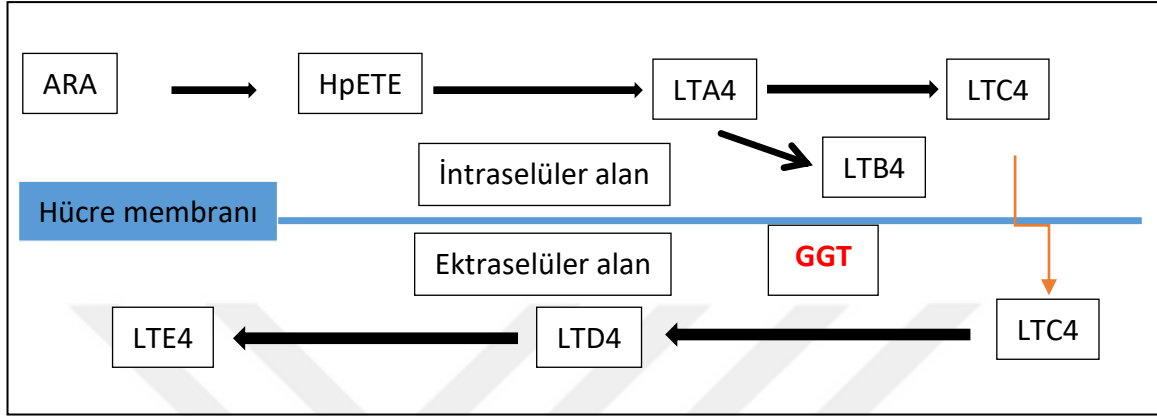
Şekil 2.3. Gama glutamil döngüsü [50]

Gama glutamil döngüsü, glutatyon, uyuşturucu ve ksenobiyotik detoksifikasyonu için önemli bir metabolik yol olarak rol oynamaktadır [4].

Lökotrien D4 (LTD4) oluşumu

Lökotrienlerin öncül molekülü fosfolipid yapısındaki araşidonik asittir. Araşidonik asit reseptör aktivasyonu, antijen-antikor etkileşimi, mikroorganizmalar ve fiziksel etkiler gibi çeşitli biyolojik sinyallere yanıt olarak fosfolipazlar tarafından fosfolipid tabakadan serbestleştirilmektedir. Lökotrienler araşidonik asit metabolizmasının lipooksijenaz yolağında 5-lipooksijenaz (5- LO) enziminin başlattığı metabolik süreç ile sentezlenmektedir [51]. Bu yolda ARA, 5-LO enzimi aracılığıyla önce 5-hidroperoksieikosotetraenoik asite (HpETE), ardından lökotrien (LT) A₄'e (LTA₄) dönüşmektedir. LTA₄'den, LTA₄ hidrolaz etkisiyle LTB₄ oluşmakta ve LTB₄'ün en önemli biyolojik aktivitesi lökositler ve nötrofiller üzerindeki kemotaktik etkisidir. LTA₄'e LTC₄ sentetaz enzimi aracılığıyla glutasyon eklenmesi sonucu LTC₄ meydana gelmekte ve LTC₄, eksport taşıyıcı sistemle hücre dışına salınmaktadır. Ekstraselüler alanda,

gama glutamil transpeptidaz yardımıyla LTC₄'den glutamik asitin uzaklaştırılması ile LTD₄ oluşmakta ve bazı ekstraselüler dipeptidazların etkisi ile LTD₄'den LTE₄ meydana gelmektedir. LT'lerden LTC₄, LTD₄, LTE₄ sistenil lökotrienler olarak bilinmektedir (Şekil 2.4) [52].



Şekil 2.4. Lökotrien sentezi

Lökotrienler lokal ya da sistemik etkileri ile genel olarak enflamatuvar yanıtta rol oynayan ve bazı kronik enflamatuvar hastalıkların gelişiminden sorumlu mediatörlerdir [51]. LTC₄ konsantrasyon artışı ile enflamatuvar, kardiovasküler ve astım hastalıkları ilişkisi bulunmuştur.

2.4.3. GGT'nin serum düzeyleri ve biyokimyasal önemi

GGT'nin fizyolojik rolü uzun yıllar açıklığa kavuşmamıştır. GGT glutatyonaz olarak keşfedilmiş ve onun gama glutamil bağının hidrolizi ilk kez 1948 yılında rapor edilmiştir. Fakat birkaç yıl sonra, yüksek konsantrasyonda bir dipeptid alıcısı varlığında, GGT'nin, gama glutamil grubunun substrattan bir alıcıya taşındığı ve yeni bir gama glutamil bileşiğinin oluştuğu, transpeptid reaksiyonunu katalizleyebildiği rapor edilmiştir. Başlangıçta glutatyonaz olarak adlandırılan enzim, gama glutamil transpeptidaz olarak 1952 yılında yeniden isimlendirilmiştir. Transpeptidasyon reaksiyonu temelinde GGT'nin Gama-Glutamil döngüsü adı verilen bir amino asit taşıma sisteminin merkezi bileşeni olduğu öne sürülmüş, ancak fonksiyonel ve kinetik çalışmalar, GGT'nin fizyolojik fonksiyonunun transpeptidazdan ziyade hidrolaz fonksiyonu olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte literatürdeki karışıklık devam etmektedir. Karışıklığa ek olarak bir gerçek var ki, o da, standart GGT biyokimyasal testi transpeptidasyon reaksiyonunu ölçmektedir.

Bu test, substrat olarak mili molar (mM) konsantrasyonda gama glutamil para nitroanilid (GpNA), akseptör olarak 10 ila 40 mM glisilglisin içermektedir. Ancak, bu fizyolojik reaksiyon değildir. Transpeptidasyon reaksiyonunun, sadece GGT tarafından katalizlendiği görülmektedir ve bu kolorimetrik test GGT miktarını kolayca tespit etmek için kullanılmaktadır [41].

İnsanda çeşitli işlevlere sahip birçok ekstraselüler gama-glutamil bileşiği belirlenmiştir. İnsan serumunda 10 ila 15 μ M aralığında bulunan glutatyon antioksidandır ve karaciğerden dokulara sistein transportunda görev almaktadır. Hem endojen hem de eksojen bileşiklerin metabolitleri GSH'ın S-konjüгатlarını oluşturmakta ve hücreden atılmaktadır [48].

Gama Glutamil Transferazın (GGT1, EC 2.3.2.2) kandaki aktivitesinin analizi, klinikte doku hasarının ölçümü için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [2]. Plazma GGT'nin karaciğer kaynaklı olduğu düşünülmekte ve önceki çalışmalar, bunun farklı molekül ağırlıkları, yoğunlukları ve yükleri olan birkaç taşıyıcı ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte bu taşıyıcıların salınma mekanizması, yapıları ve klinik önemi tamamen karakterize edilememiştir [3].

Antioksidan molekül olan glutatyonun hücresel seviyede düzenlenmesini sağlayan gama glutamil döngüsünde, GGT enzimi anahtar rol oynamaktadır. Bu nedenle GGT, hücresel redoks dengesinin sağlanmasında kritik enzimdir. İnflamasyon süresince ve insanda tümör bulunması durumunda GGT artmaktadır. Bu durum parkinson hastalığı, kardiyovasküler hastalıklar, metabolik sendrom ve diyabet gibi oksidatif stres ile bağlantılı birçok psikolojik hastalığı da kapsamaktadır [1, 3, 42, 48]. GGT ailesi, glutatyon metabolizmasında rol alan ve meme, rahim, akciğer kanseri ve lösemiye de içeren çok sayıda kötü huylu insan tümörlerinde ekspresyonu değişen, 13 enzim içermektedir. GGT ailesi, antioksidan / anti-toksik savunma ve hücresel proliferatif / apoptotik denge gibi önemli redoksa duyarlı fonksiyonları değiştirdiğinden, GGT ailesinin tümör progresyonu, istilas ve ilaç direncinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir [6].

Son 10 yılda yapılan çalışmalarda plazma GGT'sinin, karaciğer hastalıklarından ve alkol tüketiminden bağımsız olarak, referans aralığının maksimum değerinden (erkeklerde 29 U / L; kadınlar 19 U / L) yüksek değerlere sahip olması kardiyovasküler hastalık riski, Tip II diyabetin başlaması ve metabolik sendrom ile pozitif ilişkili bulunmaktadır. Ancak,

hâlihazırda kullanılan laboratuvar GGT testi, plazma GGT düzeyini etkileyen nedenler arasındaki ayırma izin vermediğinden, plazma GGT düzeyinin klinik değeri ve biyobelirteç spesifikliğini azaltmaktadır [3].

İnsanlarda GGT bozukluğu nadirdir ve bu zamana kadar birkaç hastada rapor edilmiştir, fakat bunlarda GGT1 mutasyonu tanımlanamamıştır. Bu hastalarda, idrarda salgılanmış glutatyon bulunur ve LTC4 metabolizması bozuktur [2].

2.4.4. GGT genleri

Genel olarak GGT enzimi dendiğinde GGT1 kastedilmekle birlikte, ön genom çalışmaları insan genomunun, GGT1 yanında ilave ilişkili gen veya sekanslar içerdiğini göstermektedir. Bu sekanslara, tutarsızlıklara ve karışıklıklara yol açan çok farklı isimler verilmiştir. GGT1 ile ilişkili bütün insan gen sekansları, genomik ve cDNA veri tabanlarında incelenmiş ve genişletilmiş GGT ailesine ait en az 6'sı aktif gibi görünen 13 gen belirlenmiştir. HUGO (Human Genom Organizasyonu) İnsan Gen Adlandırma Komitesi (HGNC) ile işbirliği içerisinde, GGT1'e nükleotid veya amino asit dizilişi benzer olası aktif genler belirlenmiştir (Çizelge 2.3.). Bunlar GGT5, GGT6 ve GGT7'dir. GGT'nin yalnızca hafif zincir bölümünü kodlama potansiyeline sahip iki bölge tespit edilmiştir ve bunlar GGTL1 ve GGTL2 olarak isimlendirilmiştir. GGT5, nükleotit özdeşliği yönünden önemli eksikliği olmakla birlikte amino asit seviyesinde GGT1 ile açık bir şekilde homolog olan bir proteindir. GGT6, amino asit dizilimleri açısından GGT1'e sınırlı benzerken, GGT7 önemli benzerlik göstermektedir ve bu nedenle bunlar ayrı aileler içine dâhil edilmiştir.

GGT6 ve GGT7'nin fonksiyonları henüz tam aydınlatılamamış olmakla birlikte, bunların lökotrien sentezi, glutatyon metabolizması veya gama-glutamil transferinin düzenlendiği enzimatik aktivitelerde görev aldığı düşünülmektedir. Deneysel olarak sadece, GGT1 ve GGT5'in enzimatik aktivite gösteren bir proteine dönüştüğü gösterilmiştir. Gerçek bir proteinin varlığı, GGT7 (eski adıyla GGTL3,GGT4) hariç, diğer genler için gösterilememiştir [2].

Çizelge 2.3. GGT homolog dizilerinin listesi, yeni onaylanan gen sembolleri ve kromozomal yerleşimleri [2]

Onaylanan gen sembolleri	Onaylanan gen isimleri	Önceki sembolleri ve diğer isimleri	Kromozomal Konumu	Fonksiyonel protein durumu
(olası) Tam uzunlukta Proteinler				
GGT1	Gamaglutamiltransferaz 1	Gen 6 GGT tip 1 Gen Kart: GGT1	Kr 22: 23.3	Fonksiyonel protein
GGT2	Gamaglutamiltransferaz 2 (varsayılan)	Klon F15 Gen 3 (L10396) GGT tip 2 Gen Kart: GGT2	Kr 22: 19.89	Olası fonksiyonel, GGT1'e yüksek derecede homolog
GGT3P	Gamaglutamiltransferaz 3 psödogen	Klon F11 Gen Kart: GGT3	Kr 22: 17.15	-
GGT4P	Gamaglutamiltransferaz 4 psödogen	Gen 12 (L10398) Klon F30	Kr 13: yerleştirilmemiş	-
GGT5	Gamaglutamiltransferaz 5	GGL, Gama-glutamil Lökotrienaz GGTLA1/GGTrel GGT5 prekürsör Gen Kart: GGTLA1	Kr 22: 22.95	Fonksiyonel protein
GGT6	Gamaglutamiltransferaz 6 (varsayılan)	Sıçan GGT6 homolog	Kr 17: 4.4	Olası
GGT7	Gamaglutamiltransferaz 7 (varsayılan)	GGTL3, GGT4, GGTL5 Gen Kart: GC20M032896	Kr 20: 32.9	Protein
GGT8P	Gamaglutamiltransferaz 8 psödogen	-	Kr 2: 91.3	-
Sadece hafif zincir genleri				
GGTLC1	Gamaglutamiltransferaz hafif zincir 1	GGTL6 GGTLA4; Gen Kart: GGTLA4	Kr 20: 23.92	Olası- sadece hafif zincir
GGTLC2	Gamaglutamiltransferaz hafif zincir 2	Gen 1 (L10394). GGTL4; Gen Kart: GGTL4	Kr 22: 21.31	Olası- sadece hafif zincir
GGTLC3	Gamaglutamiltransferaz hafif zincir 3 Gen Kart: LOC728226	Gen 11 (L10397)	Kr 22: 18.75	Olası- sadece hafif zincir
GGTLC4P	Gamaglutamiltransferaz hafif zincir 4 psödogen	Gen 2 (L10395)	Kr 22: 22.97	-
GGTLC5P	Gamaglutamiltransferaz hafif zincir 5 psödogen	Gen 13 (L10399)	Kr 22: 18.95	-

Aynı zamanda çoklu düzenleme mekanizmaları kontrolünde, insan GGT'sine transkripte olan çeşitli mRNA türleri tespit edilmiştir [2]. Birden fazla genin alternatif eklenmesi ve transkripsiyonu da transkript çeşitliliğine katkı sağlamaktadır. Bazı transkriptler protein yapısına girmek için kodlanmamaktadır, fakat bunlar protein formlarını oluşturmak, hem küçük alt birimi hem de büyük alt birimi içeren sekans dizilerini kesmek için kullanılmaktadırlar [44].

İnsan GGT genlerinin çoğu, sadece GGT1 proteininin fragmanları için kodlama bölgeleri içermektedir. Courtay ve arkadaşları dört insan GGT geninin mRNA'ya eksprese olduğunu buldular. Daha sonra, bunların hepsi GGT'nin sadece hafif zinciri kodlayan, GGTL2, GGTL3, GGTL4P ve GGTL5P olarak tanımlandılar. Aktivite için her iki alt birime de ihtiyaç duyulduğundan, bunlar enzimatik olarak aktif değildirler. Ancak kromozom 22'nin bu bölgesinde GGT1 ile yakından ilişkili olan GGT2 geni bulunmaktadır ve bu gen tam uzunluklu bir proteini kodlamaktadır. Evrimde daha sonra oluşan GGT2, muhtemelen GGT1 geninin bir kopyasıdır. GGT2, primatların da dâhil olduğu diğer hiçbir türde bulunmazken insan genomunda bulunmaktadır [41].

Bu çalışmada GGT gen ailesinde yer alan GGT5 ve GGT7 genleri incelenmiştir.

GGT5

Bu gen önce gama-glutamil lökotrienaz, GGL ve GGT-rel/GGTLA1 olarak adlandırılmış, daha sonra fare ve sıçanda da bulununca Gama-glutamil transferaz 5 (GGT5) olarak isimlendirilmiştir [2, 5]. GGT1 dışında gama-glutamil bağını kopardığı gösterilebilen tek ekstraselüler enzim GGT5'tir. Her iki enzim farelerde ve insanlarda eksprese edilmekte ve bu iki enzim için substratlara bağlı veriler büyük oranda GGT1'i ve GGT5'i susturulmuş farelerden elde edilmiştir [48]. Bu gen tarafından kodlanan Gama-glutamil transpeptidaz gen ailesinin üyesi olan protein tekli, katalitik olarak inaktif bir polipeptid olarak sentezlenmektedir. 586 amino asite sahip bu dizi transkripsiyonel olarak işlenmektedir (Şekil 2.5.). Küçük altbirimde bulunan katalitik aktivite sayesinde bu peptid dizisi kendi yapısını kesmekte ve böylece ağır ve hafif altbirim oluşturmaktadır. Alternatif ekleme, farklı izoformları kodlayan çoklu kopya türevleriyle sonuçlanabilmektedir [53].

```

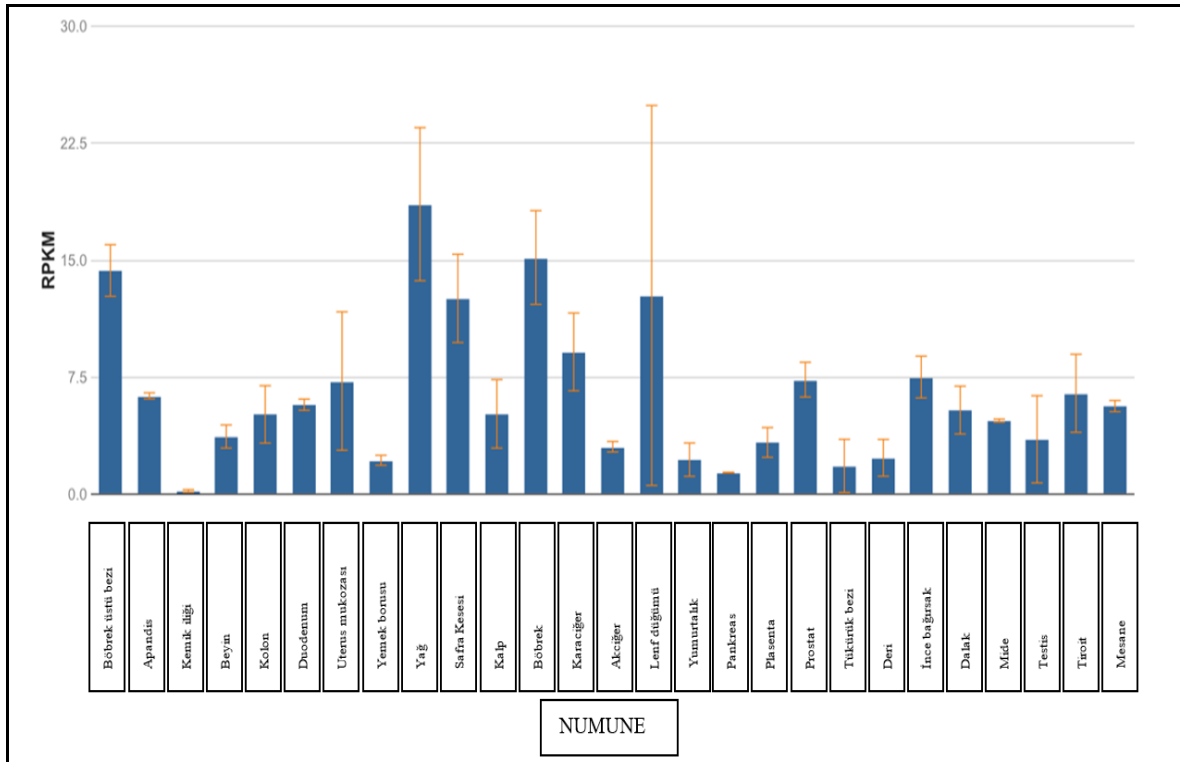
1 margygatvs lvllglglal avivlavvls rhqapcgpqa fahaavaads kvcsdigrai
61 lqqqgspvda tiaalvctsv vnpqsmglgg gviftiynvt tgkvevinar etvpashaps
121 lldqcaqalp lgtgaqwigv pgelrgyaea hrrhgrlpwa qlfqptiall rgghvvpvl
181 srflhnsilr pslqastlrq lffngteplr pqdplwpal attletvate gvevfytgrl
241 gqmlvediak egsqltlqdl akfqpevda levplgdytl ysppppagga ilsfilnvlr
301 gfnfstesma rpegrnvvyh hlvetlkfak gqrwrlgdpr shpklnasr dllgetlaql
361 irqqidgrgd hqlshyslae awghgtgtsh vsvlgedgsa vaatstintp fgamvysprt
421 giilnnelld lcercprgsg ttpspvsgdr vggapgrcwv pvpgerspss mvpsilinka
481 qgsklvigga ggeliisava qaimgklwlg fdlraaiaap ilhvnskgecv eyepnfsqev
541 qrqlqdrqgn qtqrpfflnv vqavsqegac vyavsdlrks geaagy

```

Şekil 2.5. İnsan GGT5 protein dizisi [54, 55]

GGT5, nükleotit özdeşliği yönünden önemli eksikliği olmakla birlikte amino asit seviyesinde GGT1 ile açık bir şekilde homolog olan bir proteindir [2]. İnsan GGT5 geni, GGT1 ile %40 amino asit benzerliğine sahiptir.

cDNA kütüphanesinden yapılan taramalarda GGT5 mRNA'sının böbrek üstü bezi, yağ doku, lenf düğümleri, böbrek ve safra kesesi gibi normal dokularda yaygın olarak eksprese edildiği günümüze kadar yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (şekil 2.6.).



Şekil 2.6. İnsan normal dokularında GGT5 mRNA ekspresyonu [53]

Gama-glutamil lökotriaz (GGT5), GGT1 dışında, bugüne kadar katalitik aktiviteye sahip olduğu gösterilen tek GGT enzimidir. GGT5, normal gama-glutamil transpeptidaz fonksiyonu ile gama-glutamil kalıntısının bir alıcıya aktarılmasını gerçekleştirmekte ve böylece glutatyon ve lökotrien metabolizmasında rol oynamaktadır [56, 57]. Bugüne kadar, GGT5'in kinetik analizi için geliştirilmiş bir test bulunmamaktadır. Birkaç araştırmacı, hem insan hem de farede GGT5'in, GGT1 standart analizindeki substrat olan GpNA'yı parçalayamayacağını bildirmiştir. Ancak GGT5'in aktivitesi dolaylı olarak GGT5'in fizyolojik substratlarının hidrolizini veya glutamat salınımını ölçen bir test ile ölçülebilmektedir. Gama-glutamil, substratın gama-karbonu ile GGT'nin Thr-381'in yan zincirindeki hidroksil (beta oksijen) arasında, kısa süreliğine kovalent açıl-bağ oluşturmaktadır. Bu durum substratın gama-glutamil grubunun tamamının serbest

bırakılmasına neden olmaktadır. Reaksiyonda hız sınırlayıcı basamak olan açıl bağının hidrolizi ile glutamat salınmaktadır. Substrat olarak GSH kullanıldığında oluşan ilk ürün sisteinilglisin, ikinci ürün glutamattır. Bu reaksiyonu kullanan test, L-glutamat belirleme sistemi üzerine geliştirilmiştir. Böylece bu test ile GGT1'in fizyolojik substratları için Km değeri ve GGT5'in insan serumunda bulunduğu konsantrasyon aralığı bulunmuştur. Fizyolojik substratlar ile in vivo koşullarda bu testin, GGT1 ve GGT5'in inhibisyonu çalışmalarında kullanılabileceği gösterilmiştir [41, 48].

GGT5 nakavt fareleri, fenotipik olarak normaldir. Ancak bu farelerin birçok organındaki gama-glutamil lökotriaz aktivitesi, vahşi tiplerdeki seviyesinin sadece % 10'u kadardır. Bu aktivitenin GGT1 aktivitesi olduğu çıkarımında bulunulmuştur. Çünkü GGT1/GGT5 genleri birlikte susturulduğunda bu aktivite de gözlenmemiştir [48]. Kodlanan enzim lökotrien C4'ü lökotrien D4'e dönüştürebilir, ancak gama-glutamil transpeptidaz ile karşılaştırıldığında farklı substrat özgüllüğüne sahip oldukları görülmektedir [53]. Carter ve arkadaşlarının çalışmaları sıçangillerdeki GGT5 için GSH ve GSSG'nin substrat olmadığını göstermiştir. Ancak Heisterkamp ve arkadaşlarının çalışmaları, insan GGT5'i için GSH'ın substrat olduğunu belirledi [41, 48].

GGT7

GGT7 geni, hem glutatyon metabolizması hem de amino asitlerin transpeptidasyonunda rol oynayan enzimleri kodlayan gama-glutamil gen ailesinin bir üyesidir [57, 58]. GGT7, 662 amino asit içeren peptidi kodlayan nükleotid dizisidir (Şekil 2.7.). Fonksiyonları henüz tam aydınlatılamamış olup, bunların lökotrien sentezi, glutatyon metabolizması veya glutamil transferinin düzenlendiği enzimatik aktivitelere görev aldığı düşünülmektedir.

Gerçek bir proteinin varlığı, GGT1, GGT5 ve GGT7 (eski adıyla GGTL3,GGT4) hariç, diğer genler için gösterilememiştir. GGT7, aile üyelerinden daha iyi karakterize edilmiş olan GGT1 ve GGT5'e sırasıyla 47% ve 52% aminoasit dizi benzerliği taşımaktadır.

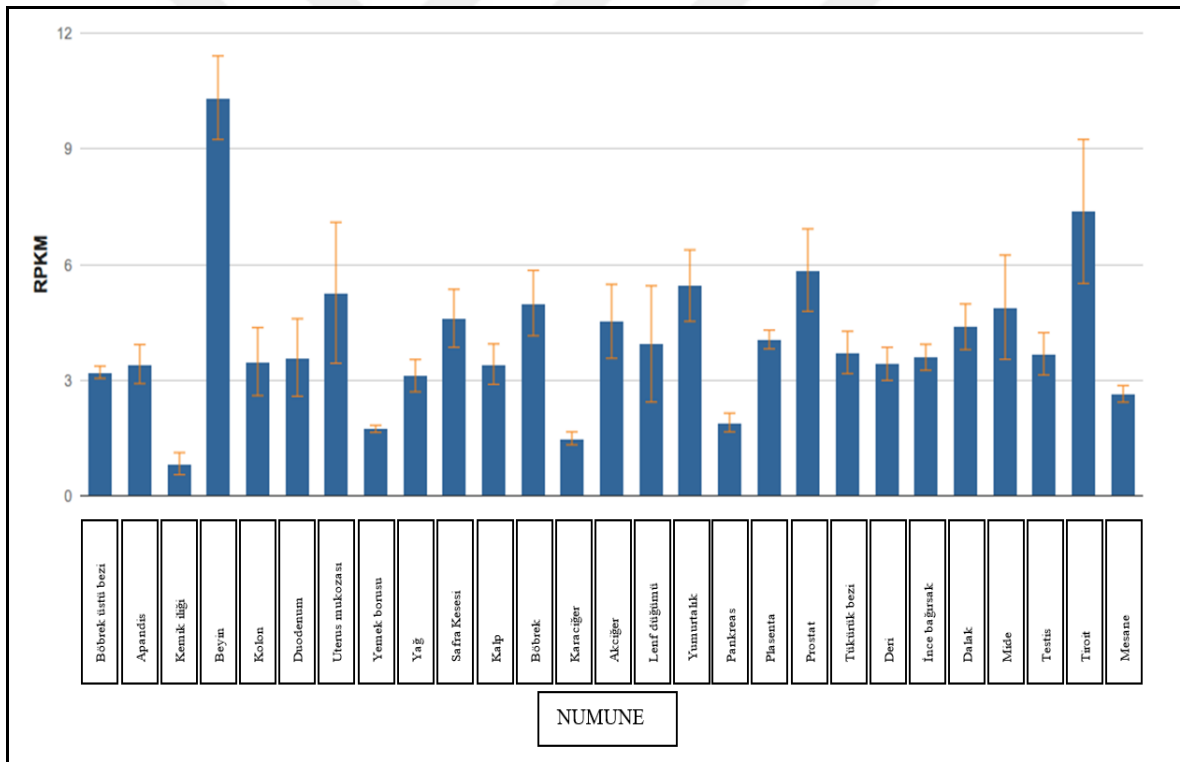
```

1 maaeneasqe salgayspvd ymsitslprl pedepapaap lngrkdedaf lgdpdtdpds
61 flksarlqrl psssemgsq dgsplretrk dpfsaaaaec scrqdgltvi vtacitfatg
121 vtvalvmqiy fgdpqifqqg avvtdaarct slgievlskq gssvdaavav alclgivaph
181 ssglggggvm lvhvirrnes hlidfresap galreetlqr swetkpgllv gvpgmvgklh
241 eahqlygrlp wsqvlafaaa vaqdgfnvth dlaralaeql pppmserfre tflpsgrppl
301 pgsllhrpdl aevldvlgtg gpaafyaggn ltlemvaeaq haggviteed fsnysalvek
361 pvcgvyrghl vlspppphtg palisalnil egfnltslvs reqalhwvae tlkialalas
421 rlgdpvydst itesmdmmls kveaaylrgh indsqaapap llpvyeldga ptaaqvlimg
481 pddfivamvs slnqpfsgsl itpsgillns qmldfswpnr tanhsapsle nsvqpgkrpl
541 sflldptvvrp aeglcgtyla lgangaargl sgltqvllnv ltlrnlsls largrlhpd
601 qsnllqvds fteeeiefle arghhvekvd vlswhgsrr tnnfiavkd prspdaagat
661 il

```

Şekil 2.7. İnsan GGT7 peptid dizisi [59, 60]

GGT7 beyin, tiroit, yumurtalık ve prostat gibi normal dokularda yaygın olarak eksprese edilmektedir (Şekil 2.8.)



Şekil 2.8. İnsan normal dokularında GGT7 mRNA ekspresyonu [57]

GGT5 ve GGT7' nin aminoasit dizisi aydınlatılmış ve buna paralel olarak birçok modelleme programları ile iki ve üç boyutlu görseller elde edilmiştir. Ancak henüz kristal yapısı ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır.

2.4.5. GGT ve kanser

GGT'nin; fetal karaciğer, böbrekler ve bağırsaklar gibi bazı organ sistemleri için önemli olduğu bilinmektedir. cDNA kütüphanesinden yapılan taramalarda normalde kan, böbrek üstü bezi, lenf, prostat gibi sağlıklı dokularda GGT1 geninin ekspresyonu gözlenirken; meme kanseri, lösemi, uterus ve akciğer kanserinde GGT1 geninin mRNA ekspresyonunda artış olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde, GGT5 böbrek üstü bezi, yağ doku, lenf düğümleri, böbrek ve safra kesesi gibi normal dokularda yaygın olarak; GGT6 ise özofagus, trake, böbrek, mesane, adrenal bez ve bağırsak gibi normal dokularda sınırlı olarak; GGT7 beyin, tiroid, yumurtalık ve prostat gibi normal dokularda yaygın olarak eksprese edilmektedir. Bununla birlikte, GGT5'in böbrek, glioma ve özofagus kanserlerinde; GGT6'nın adrenal, kolorektal ve meme; GGT7'nin ise mesane, glioma, baş-boyun, akciğer ve PNET kanserlerinde ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir [6].

İnsan GGT5 geni, GGT1 ile %40 amino asit benzerliğine sahiptir. Ancak GSH, GSSG ve lökotrien C4'ün hidrolizinde ikinci dereceden hız kinetiği ölçümü, insan GGT5'nin GGT1 aktivitesinin % 4'ünden daha az olduğunu göstermektedir. Tümörlerde GGT5 ekspresyonu hakkında (2014'e kadar) yayınlanmış bir bilgi bulunmamaktadır [41].

GGT7 (eski adıyla GGTL3, GGTL5), henüz kapsamlı bir şekilde çalışılmamış olan GGT ailesinin yeni bir üyesidir. GGT7, aile üyelerinden daha iyi karakterize edilmiş olan GGT1 ve GGT5'e sırasıyla 47% ve 52% aminoasit dizi benzerliği taşımaktadır. Amino asit dizisi benzer olmakla birlikte, GGT7, hafif zincirindeki yüksek varyasyonun bir sonucu olarak, GGT1 ve GGT5'e kıyasla yeni bir fonksiyona sahip olabilir ve bu da farklı substrat bağlanmasıyla sonuçlanabilir. Bu durum, GGT7'nin akciğer kanseri ile bağlantılı proteinlerle etkileşime girdiğinin tespit edilmesiyle kanıtlanmış oldu ve böylece GGT7'nin akciğer kanserinin ilerlemesinde rol oynayabileceğini gösterildi. GGT7 aynı zamanda diğer normal dokulara kıyasla beyinde yaklaşık 20 kat daha fazla mRNA ekspresyonuna sahip olan tek izoformdur ve bu özelliği ile diğer GGT izoformlarından farklıdır. Ayrıca GGT7'nin ekspresyonu normal beyin dokusuna göre gliomlarda daha azdır. Bu bulgular, GGT7'nin glioblastoma (GBM) tümöründe önemli rol oynayabileceğini göstermektedir [6].

GGT'nin kanserdeki rolü için çeşitli hipotezler vardır. Bunlardan biri, GGT tarafından başlatılan artmış GSH katabolizmasıdır. GGT tarafından ekstrasellüler GSH yıkımı, hücre

içinde GSH sentezi için hız sınırlandırıcı bir amino asit olan sisteini sağlamaktadır. Bu nedenle GGT GSH ve sistein homeostazisinde önemli bir rol oynamaktadır [5, 61-63]. GSH, hücreleri karsinojenlere karşı korumaktadır, böylece hücrelerin neoplastik dönüşümü ve canlılığını düzenleyebilir. Redükleyici özelliğinden dolayı, GSH bazı karsinojenleri inaktive edebilir, DNA'ya zarar veren serbest radikallere karşı koruyabilir, bağırsak epiteli gibi farklı dokuların bütünlüğünü koruyabilir ve lipid peroksidasyonunu önleyebilir [64]. Öte yandan, hücre dışı GSH'ın hücreye kazandırılmasına GGT'nin dâhil olması ve çeşitli GGT ifadelenen hücrelerde gözlenen prooksidan ilaçlara karşı direncin artması, GGT'nin hücrel savunma mekanizmalarında rol oynadığını öne sürmektedir [65]. Kanserde GGT'nin rolü için ikinci hipotez, lökotrienlerin sentezi ve metabolizmasındaki aktivitesidir. Kronik inflamasyon ve kanser arasındaki ilişkinin kısmen, prostagladin ve lökotrien gibi bir takım proinflamatuvar araçların salındığı inflamatuvar hücreleri vasıtasıyla, tümör mikro çevresinin infiltrasyonuna bağlı olduğuna inanılmaktadır [66, 67]. Ayrıca, GGT malign hücrelere demir sağlayan transferrinden, serbest demir salınımını desteklemektedir. Bu etkiye GGT, GGT türevi reaktif tiyollerin ve/veya prooksidant türlerin redoks etkileşimleri yoluyla aracılık ediliyor olabilir [68].



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışma kapsamında kullanılan kimyasal maddeler şunlardır;

cDNA sentez kiti: (Bioline)

Primerler (Oligomer)

Master mix (Bioline)

Total Glutasyon Mikroplaka Analiz Kiti (Oxford Biomedical Research)

GGT standart çözeltisi (Sigma)

GGT substrat çözeltisi L-Gama Glutamil p-nitroanilid (Sigma) glisilglisin (Merck) $MgCl_2$ (Merck)

HCl (Merck)

NaOH (Merck)

2-amino-2-metil-1,3propandiol (Sigma)

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Laboratuvarı bünyesinde çalışmada yararlanılan araç ve gereçler;

Buzdolabı: Bosch KDV42X03NE

Derin dondurucu (-20): Bosch

Derin dondurucu (-80): New Brunswick Scientific U410 Premium

Distile Su Cihazı: GFL-2012

Ultra saf su cihazı Thermo scientific Barnstead NANOpure, Milipore-Simplicity 185

Hassas terazi: And GR-200

Otomatik Pipetler: Eppendorf, Hirschman, Axygen-Axypet, Pipetus

Vorteks: Select Bio-Products Select Vortexer

Isıticılı manyetik karıştırıcı: FALC F-60

PH Metre: inoLab WTW

Real-Time PCR Cihazı: Agilent AriaMx Real-Time PCR System

Mini Santrifüj Cihazı: Grant-Bio PCV-3000

Mikroplaka Santrifüj: Kubota Plate Spin II

Bariyerli Pipet Uçları: Neptune Barrier Tip

3.3. Kullanılan Biyolojik Materyal

Çalışma Grubu

Çalışmada İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Klinik Onkoloji ABD, Onkolojik Cerrahi Ünitesi'ne başvuran ameliyat tarihinden önce onayı alınarak çalışmaya katılım için bilgilendirilmiş, gönüllü onamları alındıktan sonra hekimlerce zaten hastalıkları sebebiyle ameliyatlarına karar verilen meme kanseri tanısı almış 58 hastadan ameliyat öncesinde serum örnekleri ile ameliyat sırasında 1 cm³ büyüklüğünde (100 mg) tümör ve eşlenik normal meme dokusu örnekleri alındı. Ayrıca çalışmamızda sağlıklı kontrol olarak İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü, Klinik Onkoloji ABD, Onkolojik Cerrahi Ünitesi'ne makromasti nedeniyle başvuran ve meme küçültme ameliyatına zaten hekimlerce karar verilmiş, kendisi ve ailesinde benin veya malin hikayesi bulunmayan 8 sağlıklı kadından 1 cm³ boyutunda normal meme dokusu ile ameliyat öncesinde serum örnekleri alındı. Çizelge 3.1.'de hasta ve kontrol gruplarının başlıca özellikleri ve laboratuvar sonuçları yer almaktadır. Hastalardan ameliyat sırasında alınan normal meme ve tümör dokusunun eş zamanlı patolojik incelemesi yapılarak, -80°C'ye alınarak saklandı.

Çizelge 3.1. Hasta grubunun demografik özellikleri ve laboratuvar testleri

Değişken	Kontrol (n=8)	Hasta (n=58)
Yaş, ort (SS)	36,3 (9,6)	53,1 (12,0)
Menopoz Durumu		
Premenopoz, n (%)	6 (75)	33 (56,9)
Postmenopoz, n (%)	2 (25)	25 (43,1)
Kanser Evre, n (%)		
I	-	5 (8,6)
II	-	23 (39,7)
III	-	30 (51,7)
Lenf Nodül Bulunan, n (%)	-	5 (8,6)
Tümörün Bulunduğu Yer, n (%)		
Sağ	-	31 (53,5)
Sol	-	26 (44,8)
Sağ+Sol	-	1 (1,7)
Moleküler Alt Tip, n (%)		
Luminal A	-	16 (27,6)
Luminal B	-	8 (13,8)
Triple (-)	-	16 (27,6)
HER2 (+)	-	9 (15,5)
Luminal B-HER2 (+)	-	9 (15,5)
Laboratuvar testleri		
Östrojen Reseptör, ort (SS)	-	43,5 (43,3)
Progesteron Reseptör, ort (SS)	-	21,5 (32,8)
Ki67, ort (SS)	-	40,8 (26,2)

Hasta grubuna ait tümör dokuların moleküler sınıflandırması, aşağıda verilen östrojen/progesteron hormon reseptör, Ki67 ve cerB2 (HER2) değerlendirme kriterlerine göre yapılmıştır (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. Meme kanserli hastaların sınıflandırılmasında kullanılan parametreler

	N	Parametre
Luminal A	16	ER(+)/PR(+)/Ki67 25 den küçük
Luminal B	8	ER(+)/PR(+)/Ki67 25 den yüksek
Luminal B-Her2	9	ER(+)/PR(+)/cerbB2(+3)
HER2 pozitif	9	ER(-)/PR(-)/cerbB2(+3)
Triple (üçlü negatif)	16	ER(-)/PR(-)/cerbB2(-)

Dokulardan elde edilen RNA örneklerinde GGT5 ve GGT7 genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri ile serum örneklerinde GSH ve GGT aktivite ölçümleri yapılarak rol oynadıkları olası mekanizmaların araştırılması amaçlanmıştır.

Tez çalışması için, İ.Ü.İTF KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU'nun 25.03.2016 tarihli kurul toplantısında Etik Kurul oluru alınmıştır. İlgili kurul raporu EK-1'de sunulmuştur.

Kanserli Hastalardan eş zamanlı alınan tümör doku ve sağlıklı doku örneklerinde, ayrıca malign hikâyesi bulunmayan meme küçültme ameliyatı olan sağlıklı kadınların meme doku örneklerinde GGT5 ve GGT7 gen ekspresyon analizleri yapıldı.

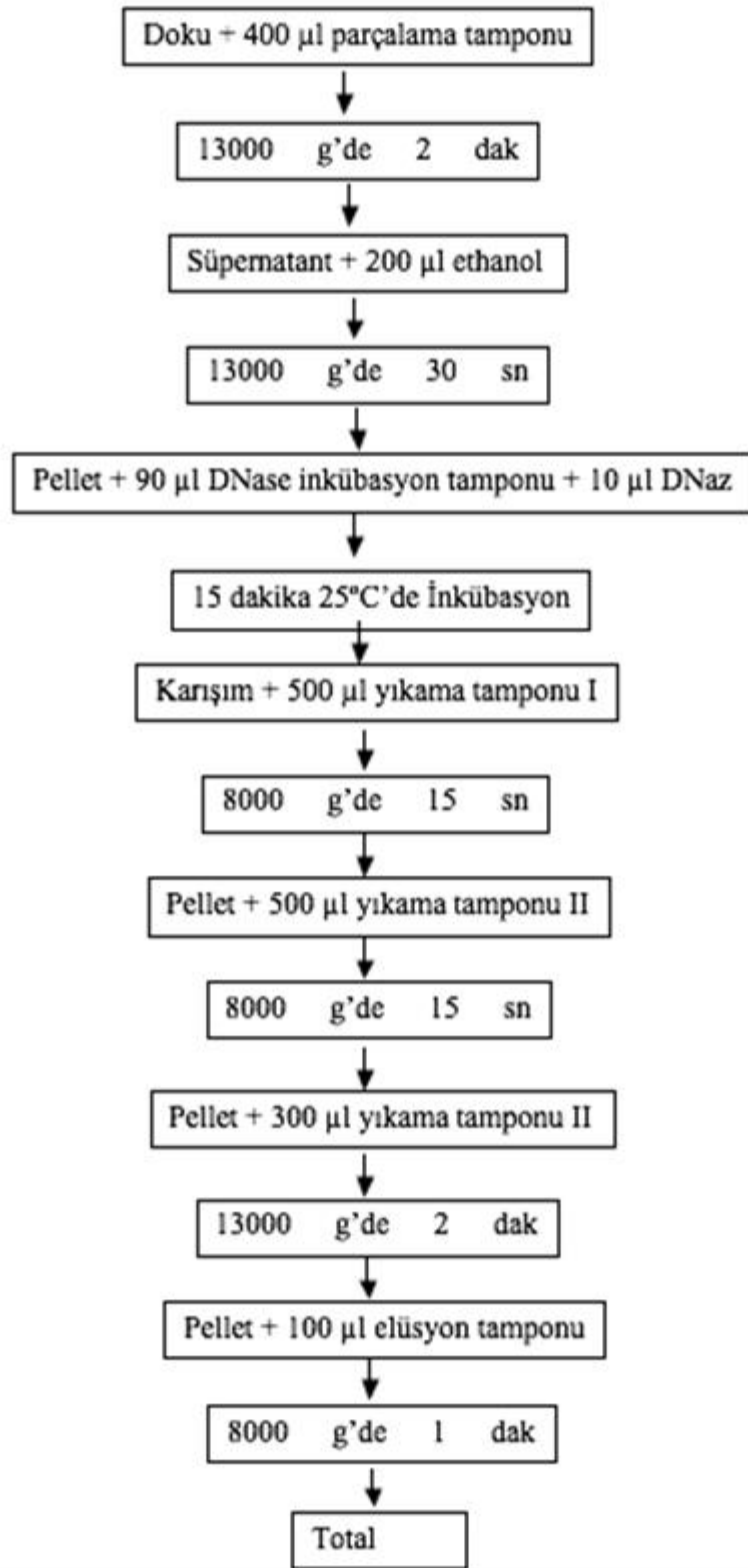
Kontrol grubunda bulunan meme küçültme ameliyatı olmuş kadınların ve hasta grubunda bulunan malign hikayesi bulunan kadınların serum örneklerinde GGT ve GSH miktarları analiz edildi.

3.4. Deneysel Yöntem

3.4.1. Gen ekspresyon analizi

Doku örneklerinden RNA izolasyonu

RNA izolasyon kiti kullanılarak aşağıdaki akım şemasında belirtildiği gibi RNA izolasyonu yapıldı.



Elde edilen RNAların spektrofotometre ile kalite ve miktar ölçümleri yapıldıktan sonra cDNA sentez kiti kullanılarak ekspresyon analizinde kullanılmak üzere cDNA elde edildi.

cDNA Sentezi

- 1 µl Oligo dT primer (0,5 µg/µl)
- 100 ng Total RNA
- dH₂O (Toplam 12 µl) İyice karıştırılır. 70°C’de 5 dakika inkübasyon
- 5X reaksiyon tamponu 4 µl
- Ribonükleaz inhibitörü (200 U) 1 µl
- dNTP karışımı (10 mM) 2 µl 37°C’de 5 dakika inkübasyon RT enzimi 200 U eklenir. (Toplam 20 µl) 42°C’de 1 saat inkübasyon 70°C’de 10 dakika inkübasyon

PCR için aşağıdaki Çizelge 3.3’e uygun şekilde bir reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışım 96 kuyulu, içerisinde seçtiğimiz genlere özgü primerleri içeren mikrolakalara her bir kuyucukta 10 µl olacak şekilde planlandı (Çizelge 3.3.). GGT5 ve GGT7 protein genlerinin ekspresyonu için uygun mikrolaka tasarımı ile reaksiyon incelendi. Kullanılacak 96’lık mikrolaka inceleyeceğimiz genlerin primerlerine ek olarak işaretli uygun nükleotid kombinasyonunu içeren light cycler sybr green master karışımı, deiyonize su ve cDNA içermektedir. Herbir örnek için, GGT5, GGT7 primerlerini içeren analiz kuyucuğu, housekeeping gen (β-Aktin) kuyucuğu ve cDNA yerine deiyonize su içeren negatif kontrol (NK) kuyucuğu olacak şekilde mikrolaka tasarlandı ve analiz edildi. Housekeeping genlerin primer setleri ayrıca mikrolaka içinde ve mikrolakalar arasında tutarlılığı belirlemek amacı ile de kullanıldı. PCR sonrasında genlerin relatif ekspresyon düzeyleri housekeeping genlerin ekspresyon düzeyleri ile normalize edilerek $\Delta\Delta C_t$ metodu ile incelendi.

Çizelge 3.3. Mikrolaka reaksiyon karışımı

Reaksiyon karışımı	96lık mikrolakanın 1 kuyucuğu için
2x light cycler sybr green master mix	5 µl
cDNA	1,5 µl
H ₂ O	1,5 µl
10 µM F primer	1 µl
10 µM R primer	1 µl
Toplam hacim	10 µl

Bağıl ekspresyon, hedef genin tümör ve normal doku örneklerinde referans bir gene göre rölatif kantifikasyonunun (RK) hesaplanmasıyla belirlendi. RK değeri,

$$2^{C_T(\text{tümör, referans gen}) - C_T(\text{tümör, hedef gen})}$$

$$2^{C_T(\text{normal, referans gen}) - C_T(\text{normal, hedef gen})}$$

formülünden hesaplandı. Hedef ve referans genler arasındaki Ct değerleri farkından, tümör ve normal dokudaki hedef gen ekspresyonları (oransal olarak) referans gen ekspresyonlarına kıyasla hesaplanmaktadır. RK değeri, hedef genin tümör dokusunda normal dokuya göre kaç kat daha fazla ifadelendiğini belirtmektedir.

3.4.2. Serum gama glutamil transferaz aktivite tayini

Serum GGT aktivite tayininde, transpeptidaz aktivitesinin ölçümüne dayanan kinetik metod kullanılmıştır. Szasz (1969)'ın geliştirdiği bu metod, çalışmamızda mikrolaka ile ölçülmek üzere modifiye edilmiştir. Analizin temel aldığı, GGT'nin katalizlediği reaksiyon, L-Gama-glutamyl-p-nitroanilid'in 405 nm dalga boyunda absorpsiyon özelliğine sahip olması ve reaksiyon sonucu oluşan p-nitroanilin bu dalga boyunda ışığı absorblamaması, reaksiyondaki substrat konsantrasyonuna bağlı olarak GGT aktivitesinin direkt kinetik analizine olanak tanımaktadır.

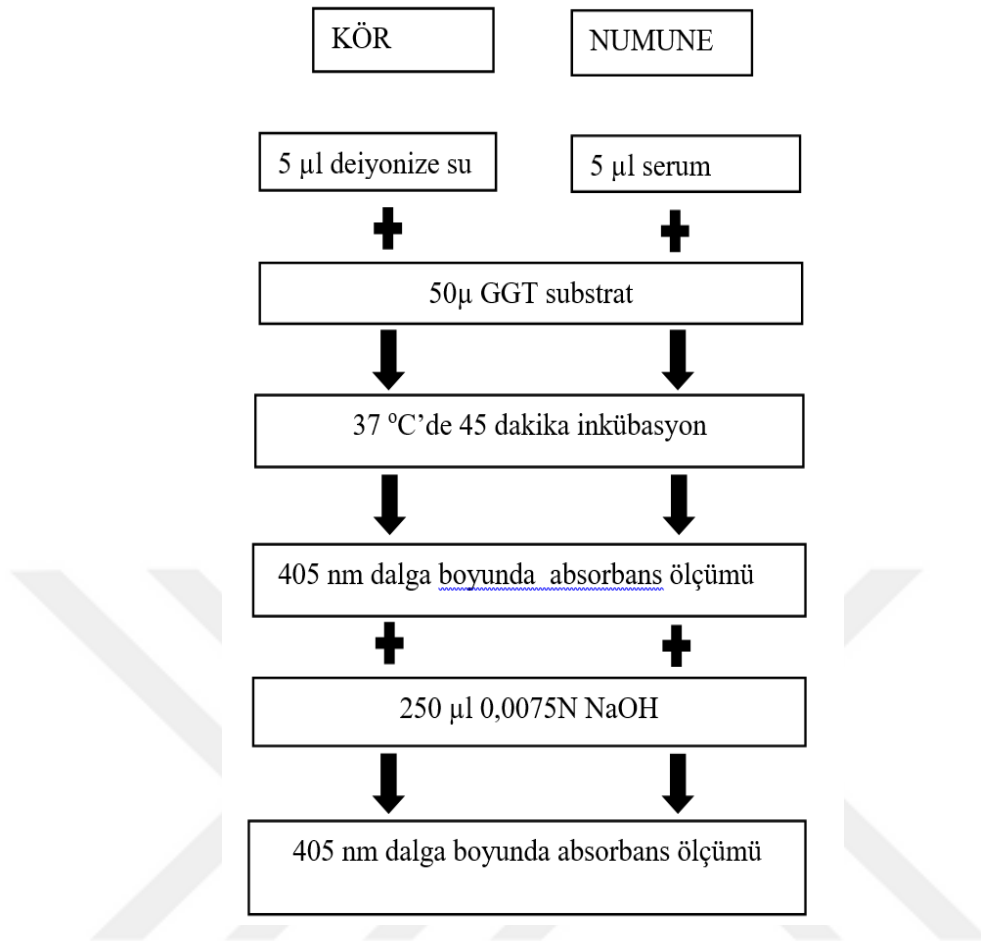


Örneklerin ve standartların hazırlanmasında kullanılmak üzere pH'sı 8,6 olan Ammediol (2-amino-2-metil-1,3propandiol)-HCl tamponu hazırlanmıştır.

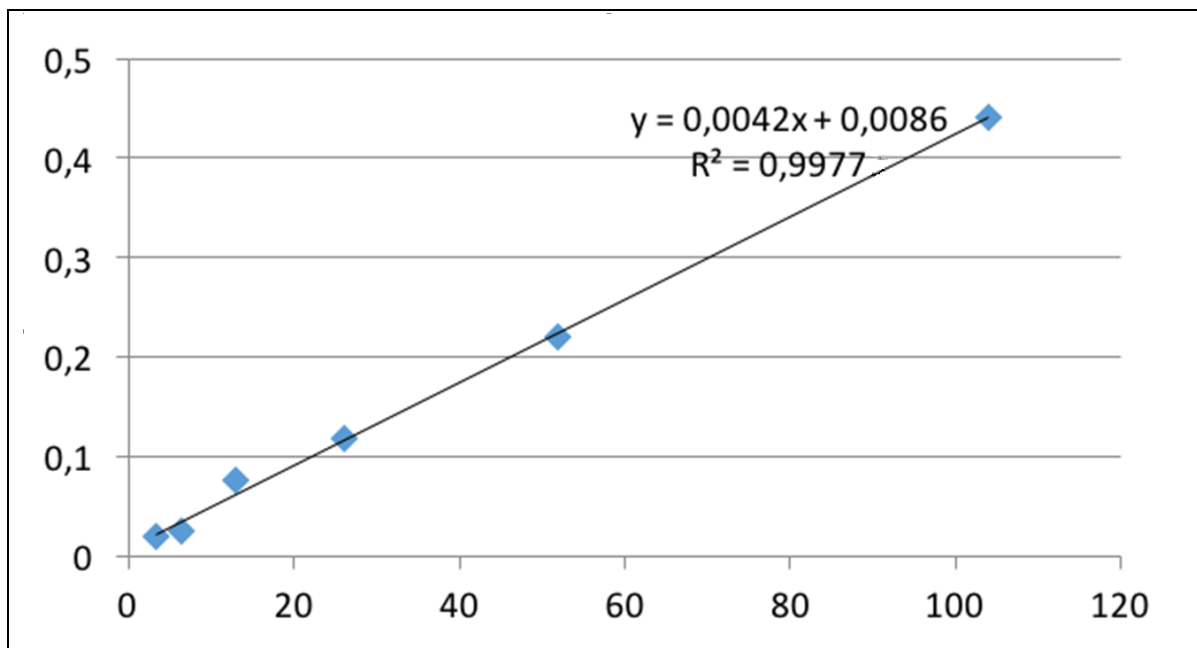
Substrat çözeltisinin hazırlanmasında, L-Gama Glutamil p-nitroanilid, glisilglisin, MgCl_2 bileşikleri kullanılmıştır.

Standart çözeltilerinin hazırlanmasında, Ammediol tamponu ile 104-3,25 U/L aralığında çözelti hazırlanmıştır.

Standart ve örneklerin analizi aşağıdaki deney prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir.



Serum GGT konsantrasyonunun belirlenebilmesi için standart çözeltiden 104-3,25 U/L aralığında çözeltiler hazırlandı, analiz yapılarak standart grafiği oluşturuldu (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. GGT standart grafiği

3.4.3. Total glutatyon analizi

Glutatyon (GSH)'un 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile oksidasyonunda kinetik enzimatik döngünün analizine dayanan kit kullanılarak serum total glutatyon (TGSH) analizi gerçekleştirilmiştir. Kitte bulunan 96 kuyucuklu mikrolakada kit prosedürüne uygun olarak hem standartların hem de örneklerin analizi yapılmıştır.

3.5. Kullanılan İstatistiksel Yöntem

Veriler ortalama (standart sapma, SS) olarak ifade edilmiştir. Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak verilerin homojenliği incelenmiştir. Homojen olmayan (normal dağılım göstermeyen) veriler için, parametrelerin normal doku ve tümör doku değişiklikleri Wilcoxon işaretli sıra testi ile analiz edildi. Verilerin hasta-sağlıklı kontrol karşılaştırmasında Mann-Whitney-U testi kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen veriler için, parametreler arasındaki ilişkiyi incelemek için Sperman-korelasyon testi kullanıldı. 0,05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analizler SPSS 22 Paket Programı (SPSS Inc, USA) kullanılarak yapılmıştır.



4. BULGULAR

Elde edilen verilerin normal dağılım gösterip göstermediklerinin test edilmesi için Kolmogorov-Smirnov testi uygulandı. Test sonuçlarına göre normal ve tümör doku GGT5 ve GGT7 ekspresyonlarının normal dağılım göstermediği tespit edildi ($p<0.001$) (Çizelge 4.1.). Bu sonuca bağlı olarak parametrelerin istatistiksel değerlendirmesinde parametrik olmayan testler uygulanmıştır.

Çizelge 4.1. Normal doku ve tümör dokudaki GGT5 ve GGT7'nin normal dağılım (Kolmogorov-Smirnov) testi sonuçları

		GGT5ND	GGT5TD	GGT7ND	GGT7TD
N		39	42	60	54
Normal Parametreler ^{a,b}	Ortalama	,0172	,0328	,1445	,2132
	Standart sapma	,03717	,13498	,20462	,24939
En aşırı farklılıklar	mutlak	,405	,404	,263	,196
	Pozitif	,405	,388	,263	,187
	Negatif	-,322	-,404	-,240	-,196
Kolmogorov-Smirnov Z		,405	,404	,263	,196
Asymp. Sig. (2-tailed)		0,0001^c	0,0001^c	0,0001^c	0,0001^c

a. Test dağılımı normaldir

b. verilerden hesaplandı

c. Lilliefors korelasyon değeri

Hasta ve kontrol grubunun GGT5 ekspresyon değerleri ve oranları Çizelge 4.2.'de verilmiştir. 13 hastada normal doku ekspresyonu gözlenmediğinden GGT5 RK ekspresyon oranı hesaplanamadı. Ayrıca 7 hastada tümör doku ekspresyonu gözlenmediğinden RK oranı hesaplanamadı. 9 hastada hem normal hem de tümör doku ekspresyonu gözlenmediğinden GGT5 RK ekspresyon oranı hesaplanamadı. Elde ettiğimiz verilere göre moleküler alt gruplarda genel olarak GGT5 ekspresyonu normal dokulara göre tümör dokularda düşük bulunmuştur ($RK < 1$).

Çizelge 4.2. Hasta grubunun normal ve tümör dokularında ve kontrol grubunun normal dokularında GGT5 geninin saptanan ekspresyon değerleri ve oranları

Hasta No	Moleküler alt tip	Evre	GGT5 Normal Doku Ekspresyonu	GGT5 Tümör Doku Ekspresyonu	GGT5 RK Ekspresyon Oranı
1	Kontrol		0,0063678		
2	Kontrol		0,0006556		
3	Kontrol		*		
4	Kontrol		0,002205		
5	Kontrol		*		
6	Kontrol		*		
7	Kontrol		*		
8	Kontrol		0,0052626		
9	Luminal A	1	0,0902456	0,0010724	0,0118826
10	Luminal A	2	*	0,8705506	-
11	Luminal A	2	0,0051543	0,0188407	3,6553258
12	Luminal A	2	*	0,0683934	-
13	Luminal A	2	2,4283898	0,1303082	0,0536603
14	Luminal A	3	0,0000569	0,0166308	**
15	Luminal A	3	*	*	-
16	Luminal A	2	0,0002617	*	-
17	Luminal A	1	0,0018097	0,0000087	0,0047925
18	Luminal A	1	*	*	-
19	Luminal A	1	0,0010987	0,0024381	2,2191389
20	Luminal A	2	*	0,0032508	-
21	Luminal A	2	*	0,0000374	-
22	Luminal A	2	0,0011613	0,0071393	6,1475007
23	Luminal A	2	0,0014101	*	-
24	Luminal A	3	0,1073207	0,000009	0,000084
25	Luminal B	2	*	0,0031509	-
26	Luminal B	2	*	*	-
27	Luminal B	2	0,0008155	0,0000666	0,0816178
28	Luminal B	2	*	0,0004355	-
29	Luminal B	3	*	*	-
30	Luminal B	3	0,0006159	*	-
31	Luminal B	2	0,0037994	0,0004295	0,1130474
32	Luminal B	3	*	*	-

Çizelge 4.2. (devam) Hasta grubunun normal ve tümör dokularında ve kontrol grubunun normal dokularında GGT5 geninin saptanan ekspresyon değerleri ve oranları

33	Luminal B-HER2(+)	1	*	0,0748424	-
34	Luminal B-HER2(+)	2	*	0,0577114	-
35	Luminal B-HER2(+)	3	0,0387409	0,0222508	0,5743492
36	Luminal B-HER2(+)	3	*	0,0012361	-
37	Luminal B-HER2(+)	2	0,0028007	0,0011573	0,4132252
38	Luminal B-HER2(+)	2	*	0,0016198	-
39	Luminal B-HER2(+)	2	0,0004049	0,0011296	2,7894873
40	Luminal B-HER2(+)	3	0,0025951	*	-
41	Luminal B-HER2(+)	3	*	*	-
42	Triple (-)	2	0,0748424	0,0488669	0,6529299
43	Triple (-)	3	*	0,0000277	-
44	Triple (-)	3	0,0000217	*	-
45	Triple (-)	3	0,0067776	0,0002247	0,0331465
46	Triple (-)	3	*	*	-
47	Triple (-)	3	0,0000026	0,0002924	112,5950817
48	Triple (-)	3	*	*	-
49	Triple (-)	3	0,0016142	0,0054106	3,3519485
50	Triple (-)		0,0000447	0,0007478	16,737359
51	Triple (-)	3	0,0067075	0,0033888	0,5052257
52	Triple (-)	2	0,0003405	0,0013811	4,0558379
53	Triple (-)	3	0,0061936	0,0003155	0,050942
54	Triple (-)	3	0,0142292	0,0047429	0,3333247
55	Triple (-)	3	0,0030436	*	-
56	Triple (-)	3	0,1593201	0,0011857	0,0074425
57	Triple (-)	3	*	*	-
58	Her2 (+)	3	0,0014397	0,0136024	9,4479413
59	Her2 (+)	3	0,1058432	*	-
60	Her2 (+)	3	0,0004251	0,0000047	0,0110485
61	Her2 (+)	2	0,0011735	0,0031076	2,6481778
62	Her2 (+)	2	0,0000011	0,0003112	**
63	Her2 (+)	2	*	0,0039471	-
64	Her2 (+)	3	0,0026496	0,0015538	0,5864175
65	Her2 (+)	3	*	0,0051187	-
66	Her2 (+)	3	0,0118415	0,0024894	0,2102241

*Ekspresyon gözlenmedi ** İstatistiksel değerlendirilmeye dahil edilmedi

Hasta ve kontrol grubunun GGT7 ekspresyon değerleri ve oranları Çizelge 4.3.'de verilmiştir. Bir hastada normal doku ekspresyonu gözlenmediğinden GGT7 RK ekspresyon oranı hesaplanamadı. Elde ettiğimiz verilere moleküler alt gruplarda GGT7 ekspresyonu genel olarak normal dokulara göre tümör dokularda daha yüksek bulunmuştur (RK>1).

Çizelge 4.3. Hasta grubunun normal ve tümör dokularında ve kontrol grubunun normal dokularında GGT7 geninin saptanan ekspresyon değerleri ve oranları

Hasta No	Moleküler alt tip	Evre	GGT7 Normal Doku Ekspresyonu	GGT7 Tümör Doku Ekspresyonu	GGT7 RK Ekspresyon Oranı
1	Kontrol		0,0011533		
2	Kontrol		0,0027813		
3	Kontrol		0,0371627		
4	Kontrol		0,0042894		
5	Kontrol		0,7244711		
6	Kontrol		0,2431637		
7	Kontrol		0,6350755		
8	Kontrol		0,0059826		
9	Luminal A	1	0,0842021	0,2482731	2,9485384
10	Luminal A	2	14,5707173	30,6964518	2,1067221
11	Luminal A	2	0,7684376	0,8293195	1,0792282
12	Luminal A	2	7,0128458	6,8685235	0,9794203
13	Luminal A	2	0,0257372	0,0587202	2,2815274
14	Luminal A	3	0,1486509	0,2348807	1,5800826
15	Luminal A	3	0,5358867	0,6241653	1,1647336
16	Luminal A	2	0,5069797	0,8066418	1,591073
17	Luminal A	1	0,0145282	0,1130474	7,7812396
18	Luminal A	1	0,0057989	0,3242099	55,9086653
19	Luminal A	1	0,0075464	0,0032172	0,4263174
20	Luminal A	2	0,0785633	0,0224833	0,286181
21	Luminal A	2	0,1713479	0,1416105	0,8264503
22	Luminal A	2	0,0395549	0,00734	0,1855654
23	Luminal A	2	0,3882344	0,9692898	2,4966611
24	Luminal A	3	0,1073207	0,7818696	7,2853587
25	Luminal B	2	46,688651	5,7757168	0,1237071
26	Luminal B	2	0,0000948	0,5396141	**
27	Luminal B	2	0,0095519	0,0000286	0,0029913
28	Luminal B	2	0,4730288	0,5176325	1,0942937
29	Luminal B	3	0,4863275	0,1842837	0,3789291
30	Luminal B	3	0,00346	0,1245675	36,0018715
31	Luminal B	2	0,0301855	0,0134151	0,4444213
32	Luminal B	3	0,2365144	0,5303439	2,2423322

Çizelge 4.3. (devam) Hasta grubunun normal ve tümör dokularında ve kontrol grubunun normal dokularında GGT7 geninin saptanan ekspresyon değerleri ve oranları

33	Luminal B-HER2(+)	1	0,2716837	0,3120826	1,1486984
34	Luminal B-HER2(+)	2	0,4292827	0,1830107	0,4263174
35	Luminal B-HER2(+)	3	0,0688691	0,0376815	0,5471469
36	Luminal B-HER2(+)	3	0,0337259	0,1088188	3,226567
37	Luminal B-HER2(+)	2	0,0134617	0,0065923	0,4897101
38	Luminal B-HER2(+)	2	0,4931164	0,0571145	0,1158235
39	Luminal B-HER2(+)	2	0,0107092	0,011164	1,0424658
40	Luminal B-HER2(+)	3	0,150726	0,0154099	0,1022378
41	Luminal B-HER2(+)	3	0,1486509	0,231647	1,5583292
42	Triple (-)	2	1,4489422	0,2389863	0,1649385
43	Triple (-)	3	0,1921094	0,2812646	1,4640857
44	Triple (-)	3	0,1126563	0,6417129	5,6962008
45	Triple (-)	3	0,0219445	0,0049788	0,2268798
46	Triple (-)	3	0,0579118	0,1988841	3,4342617
47	Triple (-)	3	0,4204482	0,4292827	1,0210121
48	Triple (-)	3	0,0020361	0,0014497	0,7120251
49	Triple (-)	3	0,0265527	0,0096517	0,3634931
50	Triple (-)		0,0045655	0,0315766	6,9162979
51	Triple (-)	3	0,0124303	0,1237071	9,9520932
52	Triple (-)	2	0,2561392	0,0973956	0,3802447
53	Triple (-)	3	0,0256482	0,0890031	3,4701547
54	Triple (-)	3	0,0044871	0,0441942	9,8491553
55	Triple (-)	3	0,0367783	0,3088547	8,3977335
56	Triple (-)	3	0,0028595	0,0081443	2,8481004
57	Triple (-)	3	0,0072139	0,0004401	0,061002
58	Her2 (+)	3	*	0,1321273	-
59	Her2 (+)	3	5,3517102	22,1617515	4,1410597
60	Her2 (+)	3	0,0033538	0,2332582	69,5510312
61	Her2 (+)	2	0,022328	0,0074683	0,3344819
62	Her2 (+)	2	0,0000209	0,0001012	4,8399764
63	Her2 (+)	2	0,0224056	0,0735567	3,2829664
64	Her2 (+)	3	0,0326902	0,0402463	1,2311444
65	Her2 (+)	3	0,0006533	0,1276265	195,3611787
66	Her2 (+)	3	0,0094859	0,3523302	37,1425253

*Ekspresyon gözlenmedi ** İstatistiksel değerlendirilmeye dahil edilmedi

Hasta grubunda ve moleküler alt gruplarda GGT5 ve GGT7 ekspresyonlarının ortalama değerleri incelendiğinde tümör dokudaki ekspresyonların normal dokuya göre genel olarak daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. Total ve moleküler alt tiplere göre hasta gruplarının normal ve tümör dokuda saptanan GGT5 ve GGT7 gen ekspresyonlarının ortalama değerleri

	Normal Doku Ekspresyonu (Standart Sapma)	Tümör Doku Ekspresyonu (Standart Sapma)
GGT5		
Total Hasta (n=58)	0,0187 (0,0390)	0,0328 (0,1350)
Luminal A (n=16)	0,0232 (0,04311)	0,0932 (0,2479)
Luminal B (n=8)	0,0017 (0,0018)	0,0010 (0,0014)
Triple (-) (n=16)	0,0228 (0,0478)	0,0061 (0,0143)
Her2 (+) (n=9)	0,0176 (0,0391)	0,0038 (0,0043)
Luminal B-Her2 (+) (n=9)	0,0111 (0,0184)	0,0228 (0,0310)
GGT7		
Total Hasta (n=58)	0,1349 (0,1872)	0,2132 (0,2500)
Luminal A (n=16)	0,2060 (0,2435)	0,3690 (0,3543)
Luminal B (n=8)	0,1770 (0,2228)	0,2728 (0,2480)
Triple (-) (n=16)	0,0789 (0,1211)	0,1568 (0,1843)
Her2 (+) (n=9)	0,0130 (0,0128)	0,1208 (0,1210)
Luminal B-Her2 (+) (n=9)	0,1800 (0,1805)	0,1071 (0,1109)

Hastaların normal ve tümör dokularındaki GGT5 ve GGT7 gen ekspresyonlarının karşılaştırılması Wilcoxon Signed Ranks testi uygulanarak yapılmıştır. Total hasta grubunda GGT7 geninin tümör dokudaki ekspresyonu normal dokuya göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur(Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. Total hasta grubunda normal doku (ND) ve tümör doku (TD) GGT5, GGT7 karşılaştırması (Wilcoxon Signed Ranks Test)

	N	Sıraların ortalaması	Sıraların Toplamı	Z	P
GGT5TD – GGT5ND	Negatif sıralar	16 ^d	16,69	-1,457	0,145
	Pozitif sıralar	12 ^e	11,58		
	Eşit	0 ^f			
	Total	28			
GGT7TD - GGT7ND	Negatif sıralar	18 ^a	20,17	-2,969	0,003
	Pozitif sıralar	34 ^b	29,85		
	Eşit	0 ^c			
	Total	52			

a. GGT7TD < GGT7ND, b. GGT7TD > GGT7ND, c. GGT7TD = GGT7ND, d. GGT5TD < GGT5ND, e. GGT5TD > GGT5ND, f. GGT5TD = GGT5ND.

GGT5 ve GGT7 genlerinin mRNA ekspresyonlarının meme kanserinin moleküler alt tiplerinde karşılaştırılması Çizelge 4.6.'da verilmiştir. Luminal A alt grubunda bulunan hastaların tümör dokularında normal dokularına göre daha yüksek GGT7 ($p= 0,009$) ekspresyonu görülmüştür. Diğer moleküler alt gruplarda elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Çizelge 4.6. Meme kanseri moleküler alt gruplarında normal doku (ND) ve tümör doku (TD) GGT5, GGT7 karşılaştırması (Wilcoxon Signed Ranks Test)

			N	Sıraların ortalaması	Sıraların toplamı	Z	P
Luminal A	GGT5TD - GGT5ND	Negatif sıralar	3	5,00	15,00	-0,169	0,866
		Pozitif sıralar	4	3,25	13,00		
		Eşit	0				
		Total	7				
	GGT7TD - GGT7ND	Negatif sıralar	4	2,75	11,00	-2,605	0,009
		Pozitif sıralar	10	9,40	94,00		
		Eşit	0				
		Total	14				
Luminal B	GGT5TD - GGT5ND	Negatif sıralar	2	1,50	3,00	-1,342	0,180
		Pozitif sıralar	0	,00	,00		
		Eşit	0				
		Total	2				
	GGT7TD - GGT7ND	Negatif sıralar	3	3,00	9,00	-,0845	0,398
		Pozitif sıralar	4	4,75	19,00		
		Eşit	0				
		Total	7				
Luminal B-HER2(+)	GGT5TD - GGT5ND	Negatif sıralar	2	2,50	5,00	-1,069	0,285
		Pozitif sıralar	1	1,00	1,00		
		Eşit	0				
		Total	3				
	GGT7TD - GGT7ND	Negatif sıralar	5	5,80	29,00	-0,770	0,441
		Pozitif sıralar	4	4,00	16,00		
		Eşit	0				
		Total	9				
Her2(+)	GGT5TD - GGT5ND	Negatif sıralar	3	3,33	10,00	-0,105	0,917
		Pozitif sıralar	3	3,67	11,00		
		Eşit	0				
		Total	6				
	GGT7TD - GGT7ND	Negatif sıralar	1	3,00	3,00	-1,859	0,063
		Pozitif sıralar	6	4,17	25,00		
		Eşit	0				
		Total	7				
Triple(-)	GGT5TD - GGT5ND	Negatif sıralar	6	7,33	44,00	-1,682	0,093
		Pozitif sıralar	4	2,75	11,00		
		Eşit	0				
		Total	10				
	GGT7TD - GGT7ND	Negatif sıralar	5	5,60	28,00	-1,817	0,069
		Pozitif sıralar	10	9,20	92,00		
		Eşit	0				
		Total	15				

a. GGT7TD < GGT7ND, b. GGT7TD > GGT7ND, c. GGT7TD = GGT7ND, d. GGT5TD < GGT5ND, e. GGT5TD > GGT5ND, f. GGT5TD = GGT5ND.

Serum GGT enzim aktivitesi ve GSH analizlerinden elde edilen verilerin normal dağılım gösterip göstermediklerinin test edilmesi için Kolmogorov-Smirnov testi uygulandı. Test sonuçlarına göre GGT enzim aktivitesi ve GSH verilerinin normal dağılım göstermediği tespit edildi ($p<0.001$) (Çizelge 4.7.).

Çizelge 4.7. Serumda GGT enzim aktivitesi ve total redükte glutatyon (GSH)'un normal dağılım testi (Kolmogorov-Smirnov) sonuçları

	GGTenzimaktivite	GSH
N	58	60
Normal Parametreler ^{a,b}		
Ortalama	26,1700	7,8000
Standart sapma	10,25747	5,52462
En aşırı farklılıklar		
mutlak	0,197	0,265
Pozitif	0,197	0,265
Negatif	-0,087	-0,158
Kolmogorov-Smirnov Z	0,197	0,265
Asymp. Sig. (2-tailed)	0,0001	0,0001^c

a. Test dağılımı normaldir

b. verilerden hesaplandı

c. Lilliefors korelasyon değeri

Serum GGT enzim aktivitesi ve GSH düzeylerinin total hasta grubu ve meme kanseri moleküler alt gruplarında ortalama değerleri Çizelge 4.8'de verilmiştir. GGT enzim aktivitesi kontrol gruplarına göre total hasta grubu ve moleküler alt gruplarda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Serum GSH düzeyleri kontrollere göre hasta gruplarında yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

Çizelge 4.8. Total ve moleküler alt tiplere göre hasta gruplarının serum GGT enzim aktivitesi ve GSH düzeylerinin ortalama değerleri ve karşılaştırılması

	N	Serum GGT Aktivite (U/L)	Serum GSH (μ mol/L)
Kontrol	8	18,8 (4,4)	5,8 (1,4)
Total Hasta	58	26,2 (10,3)*	7,8 (5,5)
Luminal A	16	25,3 (8,1)**	6,3 (3,7)
Luminal B	8	26,9 (9,8)**	10,1 (7,8)
Triple (-)	16	27,0 (10,0)***	8,1 (6,3)
HER2 (+)	9	32,9 (16,3)**	9,2 (7,1)
Luminal B-HER2 (+)	9	25,1 (6,4)	7,6 (4,2)

* $P<0.01$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

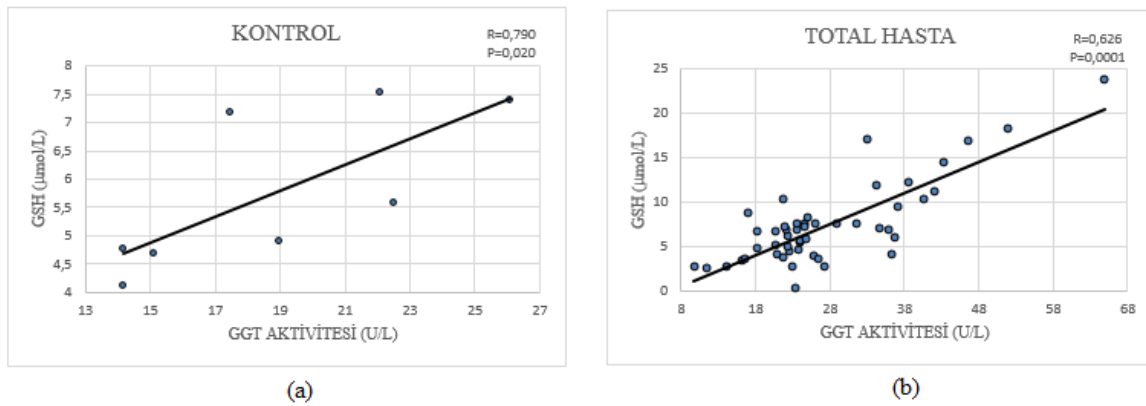
** $P<0.05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

*** $P<0.02$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

Meme kanseri moleküler alt gruplarının GGT enzim aktivitesi ve GSH düzeyleri, kontrol grubu GGT enzim aktivitesi ve GSH düzeyleri ile karşılaştırıldığında (Man-Whitney U testi ile) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir ($p>0,05$).

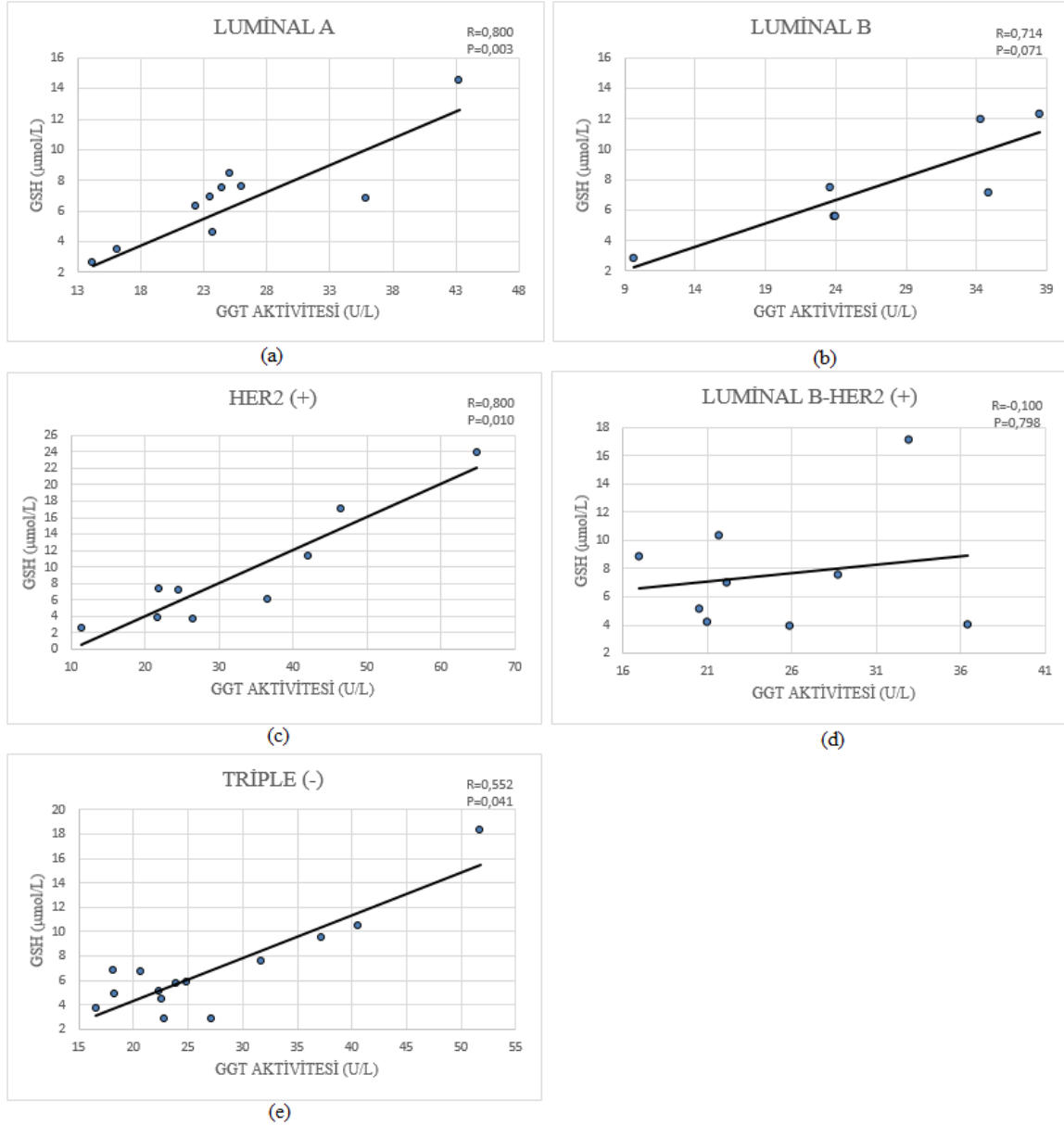
Kontrol grubu, total hasta grubu ve moleküler alt gruplarda serum GGT, GSH ve doku GGT5, GGT7 ekspresyonları arasındaki korelasyonlar incelendiğinde, GGT enzim aktivitesi ve GSH düzeyleri ile gen ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon gözlenmedi ($p>0,05$).

Total hasta ve kontrol grubunda serum GGT enzim aktivitesi ve GSH düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Kontrol Grubu (a) ve total hasta grubunda GGT enzim aktivitesi ile GSH arasındaki ilişki

Moleküler alt gruplarda serum GGT enzim aktivitesi ve GSH düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde; Luminal A, HER2 (+) ve Triple (-) hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı korelasyonlar gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). Luminal B ve Luminal B-HER2 (+) hasta grubunda ise GGT enzim aktivitesi ve GSH düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır ($p > 0,05$). (Şekil 4.2.)



Şekil 4.2. Luminal A (a), Luminal B (b), HER2 (+) (c), Luminal B-HER2 (+) (d), Triple (-) (e) Grubunda GGT enzim aktivitesi ile GSH arasındaki ilişki

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, dünyada en sık görülen kanser türlerinden biridir. Türkiye’de %20 insidans, 9/20 mortalite/indisans oranıyla kadınlarda en sık görülen ve en öldürücü kanser türüdür [7]. Son yıllarda meme kanserine yakalanma yaşı düşmekle (40 yaş ve altı) birlikte bu kanser türü kadınlardaki kanser nedeni ölümünün yaklaşık %15’ine tekabül etmektedir [69]. Türkiye Meme Hastalıkları Dernekleri Federasyonu (TMHDF)’nin yaptığı çalışmaya göre, meme kanseri ülkemizde en fazla 40 yaş altı kadınlarda (total meme kanseri vakalarının %17’si) görülmekte olup, hastalığın prognozu; tümörün çapı ve histolojik grad (derece) ile ilişkili görünmektedir [70].

Meme karsinomları gerek klinikte gösterdiği belirti/bulgular gerekse biyolojik davranışları ve tedavi yanıtları ile oldukça heterojen tümörlerdir. Son yıllarda yapılan çalışmaların ışığında immünofenotipik ve moleküler sınıflandırmanın, uzun yıllardır uygulanan morfoloji, tümör histolojik alt tipi, histolojik derece gibi temel klinikopatolojik parametrelere dayalı sınıflandırmalardan çok daha prognostik ve prediktif olduğu gösterilmiştir [22, 27, 28, 29]. Meme karsinomlarının ilk moleküler sınıflaması, 2000 yılında Perou ve arkadaşları tarafından DNA microarray (mikrodizi) yöntemi kullanılarak yapılmıştır [71]. Bu sınıflandırmaya göre karsinomlar 4 alt tipe ayrılmıştır; i. Luminal, ii. HER2 (+), iii. Bazal benzeri ve iv. Normal meme benzeri. Bu sınıflandırmadan farklı başka sınıflandırmalarda yapılmıştır, bunlarda küçük farklılıklarla birlikte yeni tanımlamalar yapılsa da günümüzde en çok kabul gören sınıflandırmaya göre meme karsinomları hormon (Östrojen, ER ve Progesteron, PR) ve HER2 ekspresyonları temel alınarak 5 alt gruba ayrılmıştır. Son yıllarda özellikle klinik-onkolojik öngörüler doğrultusunda KI-67 proliferasyon indeksi de bu sınıflandırmaya ilave edilmiştir.

GGT, hücrelerin plazma membranlarının dış yüzeyinde yer alan, ekto aktiviteye sahip bir enzim olarak bilinmektedir. GGT esas olarak, renal proksimal tübül hücreleri ve safra kanalı epitel hücreleri gibi, emici ya da salgılayıcı işlevleri olan epitel hücrelerde ifade edilmektedirler [72, 73]. Çeşitli fizyolojik ve patolojik faktörler GGT ekspresyonunu düzenlemektedir. Özellikle reaktif oksijen/nitrojen türlerini (ROS/RNS) meydana getiren ve/veya redoks dengesini bozan, aflatoksin B1, NO₂, kinonlar ve alkol gibi pek çok madde çeşitli hücre ve dokularda GGT ekspresyonunu artırabilmektedir [43, 41].

GGT aktivitesi ölçümü ile ilgili ilk çalışmalardan ilki 1956 yılında Ball ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. Üzerinden 60 yıldan fazla bir süre geçmesine rağmen, GGT hakkındaki araştırmalar sonuçlanmamıştır. İnsan genomunun açıklanmasından sonra, muhtemelen çakışan aktiviteye sahip başka genlerin var olduğunun tespit edilmesi, konuyu daha karmaşık hale getirmekle birlikte ilgi de uyandırmıştır. Gama Glutamil transferaz katalitik olarak etkin olan ve post-translasyonel olarak bir ağır ve bir hafif zincir oluşturmak üzere işlenmiş olan, tek bir polipeptid olarak sentezlenmektedir [43]. Sıçan ve fare GGT cDNA klonları izole edildikten sonra, bunların tek bir genin (GGT1'in) ürünü olduğu gösterilmiştir. Genom araştırmaları, GGT1'in yanısıra insan genomunun buna benzer başka genler veya diziler içerdiğini göstermiş ve GGT geniş gen ailesine ait 13 gen belirlenmiştir [6]. Bu genlerin en az altısının aktif olduğu görülmektedir. Nükleotit özdeşliği yönünden önemli eksikliği olan, ama amino asit seviyesinde GGT1 ile açık bir şekilde homolog olan bir proteini kodlayan, bir başka insan cDNA'sı tespit edilmiştir. GGT5 adlı bu gen (önce γ -glutamil lökotrienaz, GGL, GGT-rel/GGTLA1 olarak adlandırılmış) daha sonra fare ve sıçanda da bulunmuştur. Amino asit dizilimleri açısından GGT1'e sınırlı benzer olan (GGT6) veya önemli benzerlik gösteren (GGT7) başka genler de tespit edilmiştir ve bunlar ayrı aileler içine dahil edilmiştir. GGT5 (eski GGL, GGTLA1/GGTrel), GGT6 (eski GT6 homolog) ve GGT7 (eski GGTL3, GGTL5) GGT1'e benzer nükleotid ya da amino asit dizisine sahiptir ve bunların aktif genler olduğu kabul edilmektedir [2, 41].

Çalışmamızda GGT genlerinden GGT5 ve GGT7 mRNA ekspresyonları incelenmiştir. Genel olarak hem GGT5 hem de GGT7 ekspresyonlarının tümör dokularda aynı hastalara ait normal dokularla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte yalnız GGT7 ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir. Moleküler alt gruplar ayrı ayrı incelendiğinde GGT7 ekspresyonlarındaki farklılığın başlıca Luminal A grubu olmak üzere, Triple (-) ve Her2 (+) gruplardan kaynaklandığı gözlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte GGT5 ekspresyonlarında farklılık Triple (-) grubunda gözlenmiştir. Sürekli olarak ksenobiyotiklere ya da ilaçlara maruz kalan canlı organizmalarda enzimatik detoksifikasyonun ana fazı, glutatyon-S-transferaz (GST) ile katalizlenen indirgenmiş glutatyon (GSH) ile aktif ksenobiyotiklerin konjugasyonudur. Bazı bileşiklerin, bir kez glutatyon-S-konjugatlarına dönüştükten sonra, hücre için oldukça reaktif ve toksik son ürünler oluşturacak "*merkaptürik asit yolu*" na girdikleri bildirilmiştir. GGT, GST için tanımlanana benzer bir şekilde, ilaç direnç

fenotipinin bir parçası olarak kabul edilmektedir. Bunun temel nedeni, GGT'nin konjugasyon yoluyla ksenobiyotik detoksifikasyonu için hücrelerde uygun GSH seviyelerinin sürdürülmesinde oynadığı roldür [62, 74]. Kanser hücrelerinde yüksek seviyede GST ya da GGT aktivitesi, GSH-ilaç konjugatlarının hücre içinde birikerek ilaç direnci gelişmesine sebep olmaktadır. GSH sentezi ile ilişkili diğer enzimler de, gama-glutamil sistein sentetaz (GGCS) ve GGT, özellikle triple (-) meme kanserinin tedavisinde kullanılan platin içeren ilaçlara direncin düzenlenmesinde önemli rol oynayabilmektedir [75]. Öte yandan, yüksek seviyelerde tümör GST ve GGT ekspresyonu, seçici olarak GST ya da GGT ile aktive olan ilaçlarla tümörü hedeflemede kullanılmıştır. Luminal A grubunda tedavi uygulanmasında hedef molekülün bulunması (hormon reseptörleri), hormon tedavisi uygulanmasını mümkün kılmaktadır ve tedavide başarılı sonuçlar elde edilmektedir. ER(+) meme kanserleri, ER α sinyali durduran, seçici ER α düzenleyicileri (örneğin tamoksifen), ER α düşürerek düzenleyicileri (örneğin fulvestrant) ve postmenopoz evresindeki kadınlarda dolaşımdaki östrojeni düşüren aromataz inhibitörleri gibi hedeflenmiş inhibitörleri ile tedavi edilmektedir [76]. Hormon reseptörü negatif olan iki alt grup (bazal benzeri ve HER2 eksprese eden), hormon reseptörü pozitif luminal gruplar ile karşılaştırıldığında; kötü hastalık neticelerine sahip olduğu [16, 25], zayıf klinik özellikler gösterdiği, genel sağ kalım oranının kısa olduğu [21, 24] ve en kısa nüksüz süreye sahip oldukları belirtilmiştir [22]. Hormon reseptörü negatif olan alt gruplarda stotoksik özellikli ilaçlar kullanılmakta ve bu ilaçlar sağlıklı hücreleri de etkilemektedir. Bu nedenle yapmış olduğumuz çalışmada elde ettiğimiz GGT7 ekspresyonlarının Triple (-) (bazal benzeri) ve HER2 (+) alt gruplarda farklılık göstermesi; tedavi için yeni moleküler hedeflerin belirlenmesi ve yeni tedavi edici ajanların keşfedilmesi için önem taşımaktadır. GGT7 ekspresyonunda gözlenen bu artış, hormon reseptör negatif meme kanseri alt gruplarında tedavi sürecini etkileyebilir.

GGT7 larenks, akciğer, pankreas ve prostat gibi normal dokularda yaygın olarak eksprese edilmektedir ve mesane, glioma, baş-boyun, akciğer ve PNET kanserlerinde ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir. GGT7'nin agresif karakterli malign tümör olan glioblastomadaki ekspresyonlarının incelendiği çalışmada, yüksek GGT7 ekspresyon gösteren hastaların düşük ekspresyon gösteren hastalara göre daha iyi prognoz gösterdikleri belirlenmiştir [6]. Çalışmamızda ise en iyi prognoz gösteren moleküler alt grup olarak bilinen Luminal A grubunda bulunan hastaların tümör dokularında normal dokularına göre daha fazla GGT7 ekspresyonu görülmüştür.

Normal meme dokusunda ve meme kanserinde GGT7 artışı gösteren çalışma henüz bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamız meme dokusunda GGT7 ekspresyonlarını ve meme kanserli tümör dokularında artmış GGT ekspresyonlarını gösteren ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. GGT5 ekspresyonları ise daha önce laboratuvarımızda meme kanserli hastalardan oluşan küçük bir grupta yapılan bir çalışmada gösterilmekle birlikte [77], meme kanserinin moleküler alt tiplerinde incelendiği ilk çalışmadır.

Çeşitli kanser türlerinde, serum GGT aktivitesinin ve GSH düzeyinin incelendiği birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan kolorektal kanserli hastalarda yapılan araştırma sonuçlarına göre, kolorektal kanserde GGT aktivitesi ile genel hayatta kalma süresi arasında anlamlı bir ilişki olduğu ($p<0.05$) belirlenmiştir. Kemoterapi ajanlarında dahil olduğu zararlı bileşikler metabolize eden GSH artışı, kemoterapötik direnci ve GGT artışı ile açıklanmıştır. Aynı zamanda GGT ve GSH'nin kendisi çeşitli tümör oluşum fonksiyonları da dahil, serbest radikal üretimi ve lipid peroksidasyonuna neden olduğu, böylece GGT'nin ve GSH'nin hem kemoterapötik direnç hem de tümör oluşumu ile olan ilişkisi nedeniyle, GGT seviyesinin artışı kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir [78]. Benzer şekilde özofagusun skuamoz hücreli karsinomasında yapılan araştırma sonuçlarına göre; serum GGT aktivitesinin 23,1 değerinden uzaklaşması ile genel hayatta kalma süresi arasında anlamlı bir ilişki olduğu belirlenmiştir [79]. Staudigl ve arkadaşları tarafından meme kanserli hastalarda yapılan bir başka çalışmaya göre, serum GGT düzeyi, hormon reseptörü negatif olan hasta grubunda ve triple negatif hasta grubunda istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Ancak GGT seviyesinin HER2 durumuna göre değerlendirildiği hasta grubunda anlamlı bulunmamıştır [80].

Son dönemde Shackshaft ve arkadaşlarının meme kanseri alt gruplarında serum GGT aktivitesinin incelendiği ve uzun yıllara dayanan verilerin değerlendirildiği çalışmada, serum GGT aktivitesinin meme kanserli hastalarda kontrol grubuna göre biraz daha yüksek bulunduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar aynı zamanda hormon reseptör pozitif olan meme kanseri alt grupları ile kontrol grubu serum GGT aktivitesinin pozitif korelasyon gösterdiğini tespit etmiş, ayrıca hormon reseptör negatif alt grup ile kontrol grubu serum GGT aktivitesi arasındaki ilişkiyi zayıf bulmuştur [81]. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler, total hasta grubu ile kontrol grubunun serum GGT aktivitesi ortalamaları arasındaki ilişki bu çalışma sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Çalışmamızda kontrol grubu ile moleküler alt grupların serum GGT aktivitelerinin karşılaştırılmasında HER(+)-Luminal B

alt grubu hariç anlamlı bulunmuştur. İstatistiki olarak en fazla korelasyonun olduğu grup ise triple negatif alt gruptur. Ayrıca çalışmamızda GGT değerlerinin alt gruplara göre değerlendirildiğinde GGT enzim aktivitesi, HER(+) ve triple (-) moleküler gruplarında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Staudigl ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise GGT enzim aktivitesi ile hormon reseptör(+) hasta grubu arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki görülmemiştir [80]. Bu çalışma verilerinin aksine bizim çalışmamızda GGT enzim aktivitesi ile Luminal A (hormon reseptör (+) grup) alt grubu arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

Serum GGT düzeyi genel kanser riski ile ilişkili bulunan çalışmada, meme kanseri hariç diğer kanser türlerinde yapılan istatistik değerlendirmesinde sonuçlar anlamlı bulunmamıştır. Yüksek GGT düzeyleri olan bireylerde meme kanseri riskinde artış olduğu bildirilmiştir ve premenopozda olan kadınlarda istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Bu bulgulara göre meme kanseri ile serum GGT aktivitesinin ilişkili olduğu ve bu ilişkinin özellikle premenopoz dönemindeki kadınlarda belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir [82]. Çalışmamızda da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gerek total hasta grubunda gerekse ayrı ayrı moleküler alt gruplarda belirgin derecede yüksek GGT enzim aktivitesi bulunmuştur. Ancak moleküler alt gruplar arasında önemli farklılıklar gözlenmemiştir. Bu sonuçlar genel olarak meme kanserinde artmış GGT aktivitesinin risk faktörü olarak değerlendirilebileceğini öne süren çalışmaları desteklemektedir.

Çalışmamızda GGT aktivitesi ile GGT5 ve GGT7 mRNA ekspresyonları arasındaki ilişki incelendiğinde herhangi bir korelasyon gözlenmemiştir. Bununla birlikte transkribe edilen genlerin translasyona girmesi ve proteine dönüştürülmesi her zaman aynı oranda olmamaktadır. mRNA'dan protein sentezini etkileyen birçok faktör olması nedeniyle, çalışmamızda enzim aktivitesi ile mRNA ekspresyonları arasında ilişki olmaması tam olarak yorumlanamamaktadır. Öte yandan GGT5 ve GGT7 protein ekspresyonlarının incelenmesi, enzim aktivitesi ile GGT5 ve GGT7 arasındaki ilişki hakkında daha detaylı bilgi verecektir.

GGT'nin kanserdeki rolü için çeşitli hipotezler vardır. Bunlardan biri, GGT tarafından başlatılan artmış GSH katabolizmasıdır. GGT tarafından ekstrasellüler GSH yıkımı, hücre içinde GSH sentezi için hız sınırlandırıcı bir amino asit olan sisteini sağlamaktadır. Bu

nedenle, GGT, GSH ve sistein homeostazisinde önemli bir rol oynamaktadır [5, 61-63]. GSH, hücreleri karsinojenlere karşı kormakta ve hücrelerin neoplastik dönüşümünü ve canlılığını düzenleyebilmektedir. Redükleyici özelliğinden dolayı, GSH bazı karsinojenleri inaktive edebilmekte, DNA'ya zarar veren serbest radikallere karşı koruyabilmekte, bağırsak epiteli gibi farklı dokuların bütünlüğünü koruyabilmekte ve lipid peroksidasyonunu önleyebilmektedir [64]. Çalışmamızda GSH düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gerek total hasta grubunda gerekse ayrı ayrı moleküler alt gruplarda belirgin olmamakla birlikte yüksek bulunmuştur. Öte yandan GGT aktivitesi ile GSH düzeyleri arasında belirgin bir korelasyon gözlenmiştir. Bu sonuç GGT aktivitesindeki artış ile GSH düzeylerinin artması arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. GSH'ın antioksidan aktivitesi göz önüne alındığında çalışmamızdaki artmış GSH düzeylerinin kanser hücrelerinin de korunmasında rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Yüksek serum GGT aktivitesi, meme kanserinde GGT'nin risk faktörü olarak değerlendirildiği çalışmaları desteklemektedir.
- Serum GGT aktivitesi ile GGT5 ve GGT7 mRNA ekspresyonları arasında korelasyon gözlenmemesi; mRNA'dan protein sentezini etkileyen birçok faktör olması nedeniyle transkripsiyon sonrası mevcut GGT mRNA'larının proteine dönüştürülmemiş olabileceğine işaret edebilir. GGT5 ve GGT7'nin protein ekspresyonlarının incelenmesi, enzim aktivitesi ile GGT5 ve GGT7 arasındaki ilişki hakkında daha detaylı bilgi verecektir.
- Total hasta grubunda ve meme kanseri alt gruplarında, genel olarak, GGT5 ve GGT7 mRNA ekspresyonlarının tümörlü dokularda fazla olduğu belirlenmiş fakat GGT5 ekspresyonlarında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.
- Normal dokuya göre tümör dokudaki anlamlı derecede yüksek GGT7 mRNA ekspresyonları ise GGT7'nin meme kanserinde potansiyel bir belirteç olabileceğini göstermektedir.
- Ancak GGT5 ve GGT7 mRNA'sının proteine translasyonunun belirlenmesi ve protein miktarları ile meme kanseri alt grupları arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi önerilmektedir.



KAYNAKLAR

1. Protein. GGT. URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.mybiosource.com%2Fprods%2FProtein%2Fgamma-Glutamyl-Transferase%2FGGT1%2Fdatasheet.php%3Fproducts_id%3D173093&date=2017-12-24. Son Erişim Tarihi: 24.12.17.
2. Heisterkamp, N., Groffen, J., Warburton, D. and Sneddon, T. P. (2008). The human gamma-glutamyltransferase gene family. *Human Genetics*, 123, 321–332.
3. Fornaciari, I., Fierabracci, V., Corti, A., Elawadi, H. A., Lorenzini, E., Emdin, M., Paolicchi, A. and Franzini, M. (2014). Gamma-Glutamyltransferase Fractions in Human Plasma and Bile: Characteristic and Biogenesis. *PLoS ONE*, 9(2), e88532.
4. Protein. GGT. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.ebi.ac.uk%2Finterpro%2Fentry%2FIPR000101%3Fq%3Dgggt&date=2017-12-24>. Son Erişim Tarihi: 24.12.17.
5. Whitfield, J. B. (2001). Gamma Glutamyl Transferase. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 38(4), 263-355.
6. Bui, T. T., Nitta, R. T., Kahn, S. A., Razavi, S. M., Agarwal, M., Aujla, P., Gholamin, S., Recht, L. and Li, G. (2015). γ -Glutamyl transferase 7 is a novel regulator of glioblastoma growth. *BMC Cancer*, 15, 225.
7. T.C. Sağlık Bakanlığı. Kanser İnsidansları. URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fkanser.gov.tr%2FDosya%2F2016_Haberler%2FKANSER_iNSiDANSLARi_2013_kisa_rapor.pdf&date=2017-12-24 Son Erişim Tarihi: 24.12.17.
8. Sağlık Bakanlığı. (1992). Kanser Konusunda Genel Bilgiler. Ankara: Kanser ve Savaş Daire Başkanlığı.
9. Aydınтуğ, S. (2004). Meme Kanseriinde Erken Tanı. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*, 13(6), 226-228.
10. T.C. Sağlık Bakanlığı. (2017). Türkiye Kanser İstatistikleri. Ankara: Türkiye Halk Sağlığı Kurumu.
11. Winokur, T. (2005). Molecular Markers In Breast Cancer, Current Practice and Future Possibilities. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 563, 35-41.
12. Hirata, B. K. B., Oda, J. M. M., Guembarovski, R. L., Ariza, C. B., Oliveira, C. E. C. D. and Watanabe, M. A. E. (2014). Molecular Markers for Breast Cancer: Prediction on Tumor Behavior. *Disease Markers*, 2014, 1-12.
13. Kretschmer, C., Sterner-Kock, A., Siedentopf, F., Schoenegg, W., Schlag, P. M. and Kemmner, W. (2011). Identification of early molecular markers for breast cancer. *Molecular Cancer*, 10, 15.

14. Wang, D., Xu, J., Shi, G. and Yin, G. (2015). Molecular markers' progress of breast cancer treatment efficacy. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 11 (Special Issue 1), C11-C15.
15. Esteva, F. J. and Hortobagyi, G. N. (2004). Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Research*, 6, 109-118.
16. Cheang, M. C. U., Chia, S. K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P. S., Parker, J. S., Perou, C. M., Ellis, M. J. and Nielsen, T. O. (2009). Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 101, 736 – 750.
17. Bustreo, S., Osella-Abate, S., Cassoni, P., Donadio, M., Airolidi, M., Pedani, F., Papotti, M., Sapino, A. and Castellano, I. (2016). Optimal Ki67 cut-off for luminal breast cancer prognostic evaluation: a large case series study with a long-term follow-up. *Breast Cancer Research and Treatment*, 157, 363–371.
18. Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y. and Pietenpo, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2750-2767.
19. Ramírez-Expósito, M.J., Sánchez-López, E., Cueto-Ureña, C., Dueñas, B., Carrera-González, P., Navarro-Cecilia, J., Mayas, M.D., Arias de Saavedra, J.M., Sánchez-Agosta, R. and Martínez-Martos, J.M. (2014). Circulating oxidative stress parameters in pre- and post-menopausal healthy women and in women suffering from breast cancer treated or not with neoadjuvant chemotherapy. *Experimental Gerontology*, 58, 34–42.
20. Caldarella, A., Buzzoni, C., Crocetti, E., Bianchi, S., Vezzosi, V., Apicella, P., Biancalani, M., Giannini, A., Urso, C., Zolfanelli, F. and Paci, E. (2013). Invasive breast cancer: a significant correlation between histological types and molecular subgroups. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 139, 617–623.
21. Cheang, C. U. M., Voduc, D., Bajdik, C., Leung, S., McKinney, S., Chia, S. K., Perou, C. M. and Nielsen, T. O. (2008). Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. *Clinical Cancer Research*, 14(5), 1368-1375.
22. Rouzier, R., Perou, C. M., Symmans, W. F., Ibrahim, N., Cristofanilli, M., Anderson, K., Hess, K. R., Stec, J., Ayers, M., Wagner, P., Morandi, P., Fan, C., Rabiul, I., Ross, J. S., Hortobagyi, G. N. and Pusztai, L. (2005). Breast Cancer Molecular Subtypes Respond Differently to Preoperative Chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, 11(16), 5678-5685.
23. Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, I. K., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., Lickley, L. A., Rawlinson, E., Sun, P. and Narod, S. A. (2007). Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clinical Cancer Research*, 13(15), 4429-4434.
24. Yang, X. R., Sherman, M. E., Rimm, D. L., Lissowska, J., Brinton, L. A., Peplonska, B., Hewitt, S. M., Anderson, W. F., Szeszenia-Da Browska, N., Bardin-Mikolajczak,

- A., Zatonski, W., Cartun, R., Mandich, D., Rymkiewicz, G., Ligaj, M., Lukaszek, S., Kordek, R. and Garcí'a-Closas, M. (2007). Differences in Risk Factors for Breast Cancer Molecular Subtypes in a Population-Based Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 16(3), 436-443.
25. Carey, L. A., Dees, E. C., Sawyer, L., Gatti, L., Moore, D. T., Collichio, F., Ollila, D. W., Sartor, C. I., Graham, M. L. and Perou, C. M. (2007). The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes. *Clinical Cancer Research*, 13(8), 2329-2334.
 26. Prat, A., Parker, J. S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J. I., He, X. and Perou, C. M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 12 (R68).
 27. Tran, B. and Bedard, P. L. (2011). Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets. *Breast Cancer Research*, 13 (221).
 28. Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M. A., Tse, C. K., Edmiston, S., Deming, S. L., Geradts, J., Cheang, M. C. U., Nielsen, T. O., Moorman, P. G., Earp, H. S. and Millikan, R. C. (2006). Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Journal of the American Medical Association*, 295(21), 2492-2502.
 29. Banerji, S., Cibulskis, K., Rangel-Escareno, C., Brown, K. K., Carter, S. L., Frederick, A. M., Lawrence, M. S., Sivachenko, A. Y., Sougnez, C., Zou, L., Cortes, M. L., Fernandez-Lopez, J. C., Peng, S., Ardlie, K. G., Auclair, D., Bautista-Pinã, V., Duke, F., Francis, J., Jung, J., Maffuz-Aziz, A., Onofrio, R. C., Parkin, M., Pho, N. H., Quintanar-Jurado, V., Ramos, A. H., Rebollar-Vega, R., Rodriguez-Cuevas, S., Romero-Cordoba, S. L., Schumacher, S. E., Stransky, N., Thompson, K. M., Uribe Figueroa, L., Baselga, J., Beroukhi, R., Polyak, K., Sgroi, D. C., Richardson, A. L., Jimenez-Sanchez, G., Lander, E. S., Gabriel, S. B., Garraway, L. A., Golub, T. R., Melendez-Zajgla, J., Toker, A., Getz, G., Hidalgo-Miranda, A. and Meyerson, M. (2012). Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature*, 486.
 30. Prat, A., Cheang, M. C. U., Martín, M., Parker, J. S., Carrasco, E., Caballero, R., Tyldesley, S., Gelmon, K., Bernard, P. S., Nielsen, T. O. and Perou, C. M. (2013). Prognostic Significance of Progesterone Receptor-Positive Tumor Cells Within Immunohistochemically Defined Luminal A Breast Cancer. *Journal Of Clinical Oncology*, 31, 203-209.
 31. Miettinen, M., Cue, P. A. M., Sarlomo-Rikala, M., Rys, J., Czapiewski, P., Wazny, K., Langfort, R., Waloszczyk, P., Biernat, W., Lasota, J. and Wang, Z. (2014). Gata 3 – A Multispecific But Potentially Useful Marker In Surgical Pathology – A Systematic Analysis Of 2500 Epithelial and Non-Epithelial Tumors. *The American Journal of Surgical Pathology*, 38(1), 13–22.
 32. Aktuğ, H. (2014). Apoptosis ve hücre döngüsü. *Ege Journal of Medicine*, 53(1), 60-64.

33. Zaha, D. C. (2014). Significance of immunohistochemistry in breast cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, 5(3), 382-392.
34. Curtis, C., Shah, S. P., Chin, S. F., Turashvili, G., Rueda, O. M., Dunning, M. J., Speed, D., Lynch, A. G., Samarajiwa, S., Yuan, Y., Gräf, S., Ha, G., Haffari, G., Bashashati, A., Russell, R., McKinney, S., METABRIC Group, Langerød, A., Green, A., Provenzano, E., Wishart, G., Pinder, S., Watson, P., Markowitz, F., Murphy, L., Ellis, I., Purushotham, A., Børresen-Dale, A.-L., Brenton, J. D., Tavaré, S., Caldas, C. and Aparicio, S. (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 486(7403), 346–352.
35. Prat, A., Adamo, B., Cheang, M. C. U., Anders, C. K., Carey, L. A. and Perou, C. M. (2013). Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer. *The Oncologist*, 18, 123–133.
36. Prat, J. (2014). Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube and peritoneum. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 124, 1–5.
37. Erer, H. ve Kiran, M. M. (2005). *Veteriner Onkoloji* (Üçüncü Baskı). Türkiye: Damla Ofset, 5-7, 17-18.
38. Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H. and Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biology & Therapy*, 10(10), 955-960.
39. Tavassoli, F. A. and Devilee, P. (Editörler). (2003). *Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. International Agency for Research on Cancer Press.
40. Horlings, H. M., Weigelt, B., Anderson, E. M., Lambros, M. B., Mackay, A., Natrajan, R., Ng, C. K. Y., Geyer, F. C., van de Vijver, M. J. and Reis-Filho, J. S. (2013). Genomic profiling of histological special types of breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 142, 257–269.
41. Hanigan, M. H. (2014). Gamma-Glutamyl Transpeptidase: Redox Regulation and Drug Resistance. *Advances in Cancer Research*, 122, 103–141.
42. Enzim Veri Bankası. GGT. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.brenda-enzymes.org%2Fenzyme.php%3Fecno%3D2.3.2.2+%&date=2017-12-24> Son Erişim Tarihi: 24.12.17.
43. Okada, T., Suzuki, H., Wada, K., Kumagai, H. and Fukuyama, K. (2006). Crystal structures of γ -glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli*, a key enzyme in glutathione metabolism, and its reaction intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17), 6471–6476.
44. Castellano, I. and Merlino, A. (2013). Gamma-Glutamyl Transpeptidases. *SpringerBriefs in Biochemistry and Molecular Biology*, DOI: 10.1007/978-3-0348-0682-4_1
45. Protein Veri Bankası. GGT1 (İnsan) Kristal Yapı. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.rcsb.org%2Fpdb%2F>

ngl%2Fngl.do%3Fpdbid%3D4Z9O%26bionumber%3D1&date=2017-12-24 Son Erişim Tarihi: 24.12.17

46. Konukoğlu, D. ve Akçay, T. (1995). Glutasyon Metabolizması ve Klinik Önemi. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 15, 214-218.
47. Piner, P. (2005). Fenthion İçeren Ortamda BSO ve NAC'nin *Oreochromis Niloticus*'da Beyin Dokusunda Glutasyon Metabolizması, Lipid Peroksidasyonu ve Asetilkolinesteraz Aktivitesine Etkileri, Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
48. Wickham, S., West, M. B., Cook, P. F. and Hanigan, M. H. (2011). Gamma-Glutamyl Compounds: Substrate Specificity of Gamma- Glutamyl Transpeptidase Enzymes. *Analytical Biochemistry*, 414(2), 208–214.
49. Wickham, S., Regan, N., West, M. B., Thai, J., Cook, P. F., Terzyan, S. S., Li, P. K. and Hanigan, M. H. (2013). Inhibition of human gamma-glutamyl transpeptidase: development of more potent, physiologically relevant, uncompetitive inhibitors. *Biochemical Journal*, 15, 450(3).
50. Hansen, J. M. and Harris, C. (2015). Glutathione during embryonic development. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1850, 1527–1542.
51. Özer, F. ve Yosunkaya, Ş. (2005). Astım ve Lökotrienler. *Genel Tıp Dergisi*, 15(2).
52. Canbolat, E. (2015). Araşidonik Asit Metabolitlerinin Oluşum Mekanizması ve Bazı Hastalıklardaki Rolü. *Electronic Journal of Vocational Colleges*, 5 (6) , 20-29.
53. Gen Veri Bankası. GGT5. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.ncbi.nlm.nih.gov%2Fgene%2F2687&date=2018-01-10>. Son erişim tarihi: 10.01.2018
54. Protein Veri Bankası. GGT5. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.ncbi.nlm.nih.gov%2Fprotein%2FAAH11362.1&date=2018-01-10>. Son erişim tarihi: 10.01.2018
55. Gen Veri Bankası. GGT5. URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.genome.jp%2Fdbget-bin%2Fwww_bget%3Fec%3A3.4.19.14&date=2018-01-10. Son erişim tarihi: 10.01.2018.
56. Gen Veri Bankası. GGT5. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.genecards.org%2Fcgi-bin%2Fcarddisp.pl%3Fgene%3DGGT5&date=2018-01-10>. Son erişim tarihi: 10.01.2018.
57. Gen Veri Bankası. GGT7. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.ncbi.nlm.nih.gov%2Fgene%2F2686&date=2018-01-10>. Son erişim tarihi: 10.01.2018.

58. Nükleotid Veri Bankası. GGT7. URL: http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.ncbi.nlm.nih.gov%2Fnuccore%2FXR_001754243.1&date=2018-01-10. Son erişim tarihi: 10.01.2018.
59. Protein Veri Bankası. GGT7. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.ncbi.nlm.nih.gov%2Fprotein%2FAAI41844.1&date=2018-01-10>. Son erişim tarihi: 10.01.2018.
60. Genom Veri Bankası. GGT7. URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.genome.jp%2Fdbget-bin%2Fwww_bget%3Fmmu%3A207182&date=2018-01-10. Son erişim tarihi: 10.01.2018.
61. Corti, A., Franzini, M., Paolicchi, A. and Pompella, A. (2010). Gamma glutamyltransferase of Cancer Cells at the Crossroads of Tumor Progression, Drug Resistance and Drug Targeting. *Anticancer Research*, 30, 1169-1182.
62. Pompella, A., Corti, A., Paolicchi, A., Giommarelli, C. and Zunino, F. (2007). γ -Glutamyltransferase, redox regulation and cancer drug resistance. *Current Opinion in Pharmacology*, 7, 360–366.
63. Roomi, M. W., Gaal, K., Yuan, Q. X., French, B. A., Fu, P., Bardag-Gorce, F. and French, S. W. (2006). *Experimental and Molecular Pathology*, 81, 8–14.
64. Hanigan M. H. (1998). Gamma-Glutamyl Transpeptidase, A Glutathionase: Its Expression and Function in Carcinogenesis. *Chemico-Biological Interactions*, 333(42), 111-112.
65. Estrela, J. M., Ortega, A. and Obrador, E. (2006). Glutathione in Cancer Biology and Therapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 43(2), 143-181.
66. Coussens, L. M. and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860–867.
67. Wang, D. and DuBois, R. N. (2010). Eicosanoids and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10(3), 181–193.
68. Dominici, S., Pieri, L., Comporti, M. and Pompella, A. (2003). Possible role of membrane gamma-glutamyltransferase activity in the facilitation of transferrin-dependent and -independent iron uptake by cancer cells. *Cancer Cell International*, 3(7).
69. Colditz, G. A., Hankinson, S. E., Hunter, D. J., Willett, W. C., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Hennekens, C., Rosner, B. and Speizer, F. E. (1995). The Use of Estrogens and Progestins and the Risk of Breast Cancer in Postmenopausal Women. *The New England Journal of Medicine*, 333, 1355-1358.
70. Türkiye Meme Hastalıkları Dernekleri Federasyonu. URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.tmhdf.org.tr%2FUploads%2FEditor%2Ffiles%2FMeme_Hastaliklari_Kitabi_Baski2.pdf&date=2018-01-16. Son erişim tarihi: 16.01.2018.

71. Perou, C. M., Sorlie T., Eisen M. B., Rijn M., Jerøy S. S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lonning, P. E., Borresen-Dale, A.L., Brown, P. O. and Botstein, D.(2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747-52.
72. Akdur R. (1993). Kanser epidemiyolojisi ve kanserden korunma ilkeleri, *Sağlık ve Sosyal Yardım Vakfı Dergisi*, 3-4.
73. Owen A. D., Schapira A. H., Jenner P. and Marsden C. D. (1996). Oxidative stress and Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 786, 217–223.
74. Ramsay, E. E. and Dilda, P. J. (2014). Glutathione S-Conjugates as Prodrugs to Target Drug-Resistant Tumors. *Experimental Pharmacology and Drug Discovery-Frontiers*, 5 (181), 1-16.
75. Longley, D. B. and Johnston, P. G. (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. *Journal of Pathology*, 205, 275-292.
76. Williams, M. M., Lee, L., Werfel, T., Joly, M. M. M., Hicks, D. J., Rahman, B., Elion, D., McKernan, C., Sanchez, V., Estrada, M. V., Massarweh, S., Elledge, R., Duvall . and Cook, R. S. (2018). Intrinsic apoptotic pathway activation increases response to anti-estrogens in luminal breast cancers. *Official journal of the Cell Death Differentiation Association*, 9 (21), 1-14.
77. Yardım-Akaydın S., Deviren C., Miser-Salihoglu E., Çalışkan-Can E. and Atalay M. C. (2017). mRNA Expressions of Gamma-Glutamyl Transferase Genes in Different Types of Cancer. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42: 21-28.
78. He, W., Guo G., Yin C., Jiang C., Wang F., Qiu, H., Chen. X., Rong, R., Zhang, B. and Xia, L. (2013). Gamma-glutamyl transpeptidase level is a novel adverse prognostic indicator in human metastatic colorectal cancer. *Colorectal Disease*, 15, e443–e452.
79. Huang, H., Wang, X. P., Li, X. H., Chen, H., Zheng, X., Lin, J. H., Kang, T., Zhang, L. and Chen, P. S. (2017). Prognostic value of pretreatment serum alanine aminotransferase/aspartate aminotransferase (ALT/AST) ratio and gamma glutamyltransferase (GGT) in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, 17, 544.
80. Staudigl, C., Concin, N., Grimm, C., Pfeiler, G., Nehoda, R., Singer, C. F. and Polterauer, S. (2015). Prognostic Relevance of Pretherapeutic Gamma-Glutamyltransferase in Patients with Primary Metastatic Breast Cancer. *Plos One*, DOI:10.1371/journal.pone.0125317.
81. Shackshaft, L., Hemelrijck, M. V., Garmo, H., Malmström, H., Lambe, M., Hammar, N., Walldius, G., Jungner, I. and Wulaningsih, W. (2017). Circulating gamma-glutamyl transferase and development of specific breast cancer subtypes: findings from the Apolipoprotein Mortality Risk (AMORIS) cohort. *Breast Cancer Research*, 19 (22), 1-5.
82. Fentiman, I. S. and Allen, D. S. (2010). Gamma-Glutamyl transferase and breast cancer risk. *British Journal of Cancer*. 103, 90-93.





EK-1. Klinik araştırmalar etik kurulu kararı



Sayı : 430

Tarih : 28.03.2016

Konu : Prof. Dr. Sevgi Yardım AKAYDIN

Sayın Prof. Dr. Sevgi Yardım AKAYDIN
Biyokimya

İlgi :Onkoloji Enstitüsünün 21/03/2016 gün ve 106747 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz 2016/417 dosya numaralı "Meme kanserinin alt tiplerinde aktif GGT genlerinin ekspresyonlarının incelenmesi" başlıklı çalışma kurumumuzun 25/03/2016 tarih ve 06 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Güngör, Dilek
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 11/11/1985 Antalya
 Medeni hali : Evli
 e-posta : gelen_d@hotmail.com



Eğitim Derecesi

Okul/Program

Mezuniyet yılı

Yüksek lisans

Gazi Üniversitesi /
 Sağlık Bilimleri Enstitüsü/
 Biyokimya Bölümü

Devam ediyor

Lisans

Ege Üniversitesi/
 Biyokimya Bölümü

2009

Lise

Gazi Lisesi

2004

İş Deneyimi, Yıl

Çalıştığı Yer

Görev

2014- devam ediyor

Polis Akademisi

Araştırma Görevlisi

Yabancı Dili

İngilizce

Yayınlar

1. Güngör, D., Göksal, N. (2017). Struggle with new synthetic narcotic substances and police education. 6th INTERPA Conference “Drug Issue and New Approaches in Police Training in Combating Drugs”, Oral Presentation.
2. Yardım-Akaydın, S., Güngör, D., Salihoğlu, E., Karanlık, Hasan and Demokan, S. (2017). Investigation of GGT5 and GGT7 mRNA expressions in patients with breast cancer. Proteomics Bioinform. 10:12 (Suppl).



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

