

T. C.
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

GASTROİNTESTİNAL SİSTEM
KANSERLİ HASTALARDA
NORMAL ve TÜMÖRLÜ DOKUDA
REDÜKTE GLUTATYON ve GLUTATYON
REDÜKTAZ ENZİM AKTİVİTESİ

Dr. Ömer ÇOLAK /

UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR, 1990

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım süresince devamlı yardım ve destekle-
rini gördüğüm Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı hocam
Sayın Prof.Dr. Mine ERDEN ve hocam Sayın Doç.Dr. Ekin
ÖNDER, hocam Sayın Y.Doç.Dr. Kural GÜLBAHAR ve tüm
Anabilim Dalı elemanlarına teşekkür etmekten mutluluk
duyarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	12
BULGULAR.....	17
TARTIŞMA.....	22
SONUÇLAR.....	28
ÖZET.....	29
SUMMARY.....	30
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	31
KAYNAKLAR.....	32

GİRİŞ

Üzerinde yoğun araştırmaların devam ettiği kanser, kesin tedavisinin yönlendirilmemiş olması nedeni ile insan yaşamında önemini korumaktadır. İleri yaşlarda daha sık olmak üzere, her yaşta görülebilen kanserin dokulara yayılma eğiliminde olduğu da bilinmektedir. Gastrointestinal sistem (GİS) kanserleri, genel olarak malign tümörlerdir ve akciğer kanserinden sonra en sık görülen kanser türüdür. 1986 yılında ABD'de yapılan çalışmaların istatistikleri kolorektal kanserli 140.000 kişiden 60.000 nin bu hastalıktan yaşamını yitirdiğini göstermiştir (1).

Kanser hücreleri şu özellikleri ile karakterize edilir (2):

1. Büyümenin kontrolünün azalması veya ortadan kalması.
2. Lokal dokulara yayılması.
3. Vücudun diğer dokularına yayılması.

Benign tümörlerin hücrelerinde de büyümenin kontrolünde azalma olur, fakat lokal dokulara veya vücudun diğer dokularına yayılma olmaz.

Biyokimyasal laboratuvar testleri kanserli hastaların tanısında ve prognozlarının belirlenmesinde yararlı

olmaktadır. Hücreslerdeki malign dağışıklıklar sonucu çeşitli hormonların, enzimlerin ve proteinlerin miktarı değişmekte ve bunlar kanserli hastalarda ölçülebilmektedir.

Bir çok çalışmada intrasellüler redükte glutatyon (GSH) miktarının kemoterapiye yanıtta önemli olduğu ileri sürülmüştür (3-7). Bu çalışmada GİS kanserli hastaların normal ve tümörlü dokularında serum GSH miktarını ve glutatyon redüktaz (GSSGR) enzim aktivitesini ölçmeyi amaçladık. Ayrıca hastaların tedavilerinin izlenmesinde, doku ve organ metastazlarının saptanmasında faydalı olan serum laktat dehidrogenaz (LDH), alkalen fosfataz (ALP), aspartat aminotransferaz (AST) aktivitelerini ölçtük.

GENEL BİLGİLER

Son yıllarda en çok araştırma yapılan hastalıklar arasında kanser ilk sırayı almaktadır. Kanseri oluşturan nedenlerin bilinmesi ve erken tanı, hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde önem taşımaktadır. Kanseri oluşturan ajanlar başlıca üç ana grupta toplanabilir (2,8):

1. Radyasyon enerjisi.
2. Kimyasal bileşikler.
3. Viruslar.

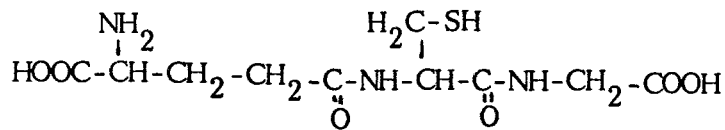
Ultraviyole ışınları, X-ışınları, γ -ışınları mutajenik ve karsinojeniktir. Bu ışınlar çeşitli yollarla DNA'da yapısal bozukluğa neden olur. Radyasyon diğer karsinojenlerden farklı olarak hemen hemen bütün malignensileri oluşturabilir, epitelyal doku tümörleri, sarkomalar ve hematolojik malignensiler başlıcalarıdır (8,9). Radyasyonun karsinogenezisi başlatması, nükleik asit materyali ile serbest radikallerin etkileşmesi sonucu ortaya çıkar. İyonize radyasyon, ultraviyole ışınları ve pek çok kimyasal madde, hücrede DNA üzerine direkt olarak etki edebilir. Ayrıca hücrede oluşturdukları OH^{\cdot} , $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve diğer serbest radikallerin DNA molekülünü etkilemesi sonucu, DNA moleküllerinde bulunan bazlar değişikliğe uğrayabilir veya yok olabilir, fosfodiester bağı kırılabilir yahut sarmallar çapraz olarak bağlanabilir. Serbest radikallerin, DNA

ve diğer makromolekülleri etkilemesi sonucu, radyasyon enerjisinin karsinojenik etkisinde artışa ve moleküler bozukluklara yol açabileceği ileri sürülmüş fakat bu mekanizma tam olarak açıklanamamıştır (9).

Radyasyonun hücreler üzerine etkisi hücre kültürü yöntemi ile oluşturulan tümör hücrelerinde incelenmiştir (9). Son yıllarda yapılan çalışmalarda in vivo ve in vitro malign değişikliklerin başlamasında ve gelişmesinde serbest radikallerin etkisine ait bulgular elde edilmiştir (3,8,9).

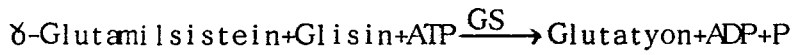
Radyasyon ve kemoterapötik ilaçları içeren çeşitli ajanların sitotoksitesinden hücrelerin korunmasında redükte glutatyonun (GSH) rolünün önemli olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından ileri sürülmüştür (3-7). GSH'nin serbest radikallerin direkt olarak inaktivasyonunda ve radyasyon tarafından oluşturulan DNA bozukluğunun giderilmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (7,8,10-12).

GSH aktif bir sülfhidril (-SH) grubu taşıyan, çeşitli hücresel fonksiyonlarda rol oynayan, intrasellüler protein olmayan, γ -glutamilsisteinilglisin yapısında bir tripeptiddir (4,13-15).



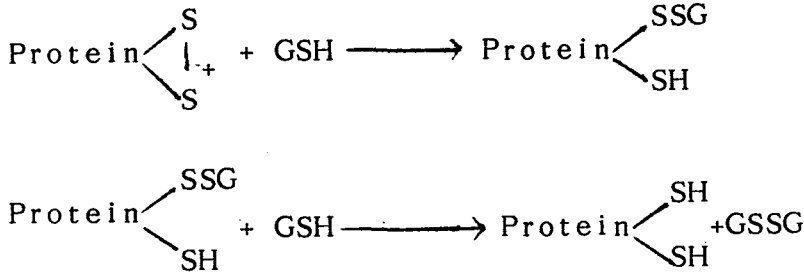
Redükte Glutatyon

Hücrelerde yaygın olarak bulunan GSH'nın biyosentezi ATP gerektiren birbirini izleyen iki basamakta oluşur (4). Birincisi, γ -glutamilsistein sentetazın (γ -GCS) katalizlediği glutamat ve sisteinin γ -karboksili arasında amid bağı oluşumudur. Sonra glutatyon sentetaz (GS) γ -glutamilsisteinin sistein karboksili ile glisin reaksiyonunu katalizler.



Normal koşullar altında glutatyon, redükte formda bulunur. GSH'nın oksidasyonu hem non enzimatik olarak hem de glutatyon peroksidazın (GPer) aktivasyonu ile, okside glutatyonu (GSSG) oluşturur. Daha sonra bu molekül pentoz fosfat yolundan sentezlenen redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfatı (NADPH) kullanarak glutatyon redüktazla (GSSGR) redüklenir ve GSSG'nin intrasellüler konsantrasyonunun en düşük düzeyde bulunması sağlanır (4,13).

Üçüncü formda GSH, hem protein hemde protein olmayan sülfhidrillerle karışık disülfidleri oluşturur (4,13). Bir çalışmada GSH, proteinlere ait (-SH) grupları ve proteinle GSH'dan oluşan karışık disülfid konsantrasyonlarının hücrede "diürinal" bir değişim gösterdiği, buna bağlı olarak proteinlerdeki disülfid/sülfhidril oranının değişerek, proteinlerdeki oksitlenme ya da redüklenmeye karşı koruduğu ileri sürülmektedir (13,15).



Ehrlich ascit tümör hücre dizilerinde total hücresele GSH'nin yaklaşık % 35 nin proteinin disülfid bağlarına bağlı olduğu bulunmuştur (17).

Hücresele GSH'nin bir başka önemli formu tiyol esterlerindeki GSH'dır. Bu tiyol esterlerinin oluşması ve metabolizmaları tam olarak araştırılmamış olmasına rağmen Uotila tarafından en az üç farklı tiyol esterazın fonksiyonel önemi belirtilmiştir (18).

Hücrelerdeki GSH'nın çeşitli reaksiyonları tripeptidin δ -glutamil kısmına karşı, sülfhidril gruplarını ilgilendirmektedir. Bu reaksiyonlarda redükte sülfhidril bir elektrophil ile reaksiyona girerek tiyoeter formunu oluşturur. Bu çeşit tiyoeterlerin oluşturulması yolu ile hücre zararlı bileşikleri detoksifiye edebilir (4,19).

Hücresele GSH'nın reverzibl ve irreverzibl kayıpları sonucu konsantrasyonunda azalma meydana gelir. GSSG oluşumu, karışık disülfidler ve tiyol esterlerini oluşturan reaksiyonlar reverzibl kayıplardır. Bu reaksiyonlar sonucu, hücre GSH düzeyinin korunması için aminoasitlerden resentezi gerekli değildir. GSH'nın irreverzibl kayıpları şu reaksiyonlar sonucu oluşur; tiyol konjugasyonu oluşumu,

örneğin merkapturik asit yolu ve GSH' nin hücre dışına çıkarılması. Bu reaksiyonlarda GSH, γ -glutamil siklusunun bir kısmını oluşturan γ -glutamiltranspeptidaz enzimi tarafından eksternal olarak parçalanır. İrreverzibl kayıplara cevap olarak hücre sel GSH düzeylerinin tekrar artırılması için senteze gereksinim vardır (4,6,19).

GSH'nin çeşitli hücrelerde bazı enzimleri, proteinleri ve hücre zarındaki lipoproteinlerin sülfhidril gruplarını oksidatif strese karşı koruyarak hücre içi savunma mekanizmalarında önemli rol oynadığı gösterilmiştir (3,10,13,15). O halde, birçok hücrede GSH, oksidasyon-redüksiyon siklusu ile aerobik metabolizma sonucu ortaya çıkan endojen olarak yapılmış O_2 ara maddelerine veya akut oksidan hasara karşı hücrenin yapısal ve fonksiyonel yaşayabilirliğini düzenlemede yardımcı olur. Oksidasyon-redüksiyon siklusunun kapasitesi hücre sel GSH, GSSGR ve/veya GPer miktarı ile ilişkili olabilir. Bunun yanısıra hücrenin pentoz fosfat yoluyla NADPH üretimi de aynı şekilde etkili olur (4,5,10). Benzer şekilde protein olmayan -SH gruplarının aşırı miktarda ortaya çıkmasıyla GSH, tiyoeter oluşumuyla, toksik elektrofollere karşı hücreyi korur. Bu yolun etkisi intrasellüler GSH konsantrasyonuna, glutatyon S-transferazın uygun oranda bulunmasına ve/veya hücrenin yeniden GSH sentezleme kapasitesine bağlı olabilir (4,7,11).

Kemoterapiye cevapta GSH'nin rolü:

Çeşitli yollarla GSH'nin kemoterapideki önemi,

terapötik etkinliğin belirlenmesinde dört yönden etkili olabilir (4,5):

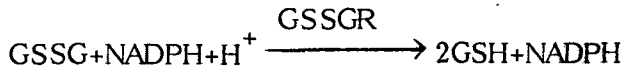
1. H_2O_2 ve/veya organoperoksitlerin GPer vasıtasıyla detoksifikasyonu (20).

2. GSH ve ilaçların katalize edilmeyen nükleofilik reaksiyonları.

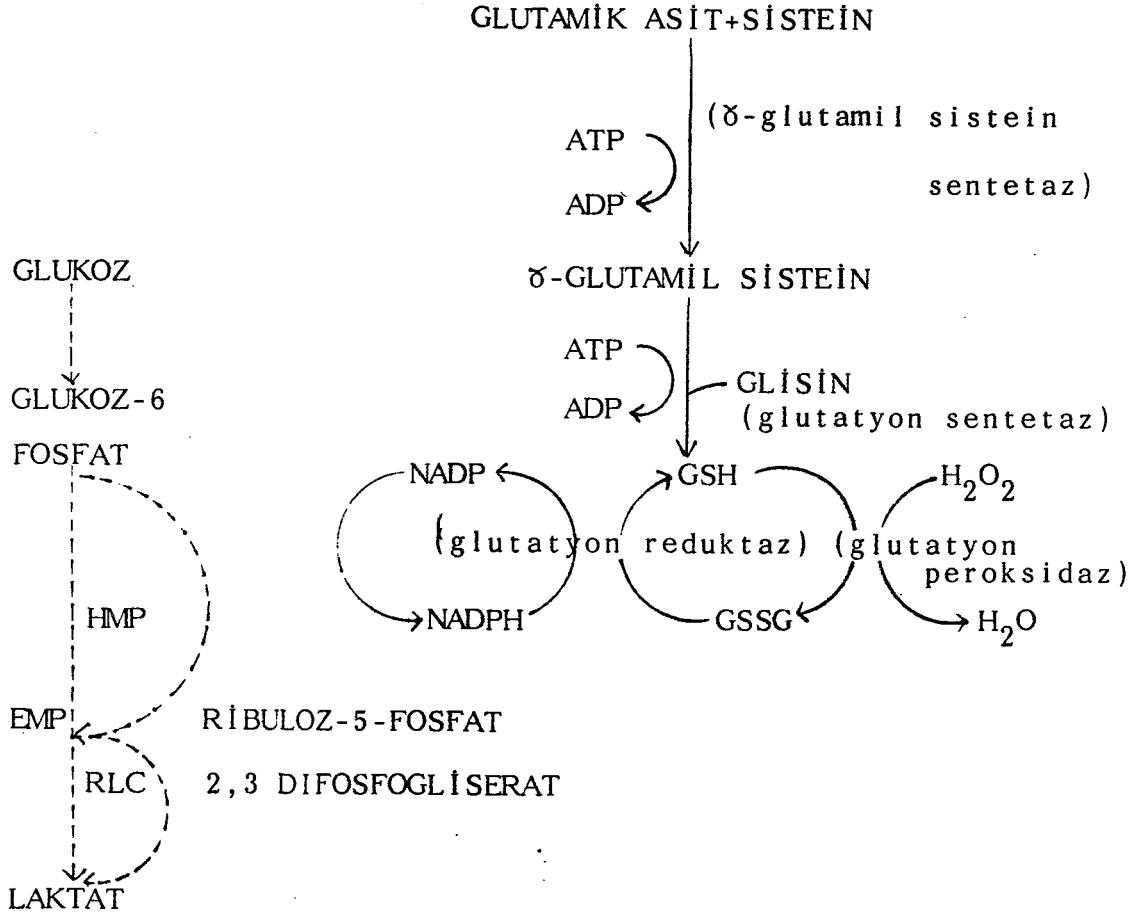
3. GSH ile bağlanan ilaçların GSH transferaz ile katalizlenmesi.

4. Belirli ilaçların toksik türlerinin GSH ile aktivasyonu.

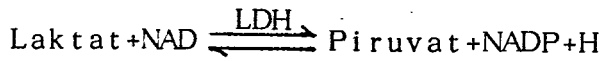
GSSGR (NADPH: Okside glutatyon oksido redüktaz, E.C. 1.6.4.2) okside glutatyon ile redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) arasındaki reaksiyonu katalizler (13,14,21).



GSSGR enziminin fonksiyonu, hücre içindeki GSH'ı yüksek bir düzeyde tutmaktır. Ayrıca, hücre bölünme siklunda ve hücre içinde oluşacak streslere karşı adaptasyonda olduğu gibi diğer görevleri de vardır (4,14). Bir flavoprotein yapısında olan GSSGR enzimi bu tepkimeyi kataliz ederken kofaktör olarak NADPH kullanır. Bu tepkime için gerekli olan NADPH, heksoz monofosfat yolunun ilk kademelelerini oluşturan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve 6-fosfoglu konat dehidrogenaz enzimlerinin aktivasyonu ile sağlanır (4,10,13).



Laktat dehidrogenaz (E.C.1.1.1.27, L-laktat: NAD oksido redüktaz) laktatın piruvata oksidasyonunu katalize eder, kofaktörü nikotinamid adenin dinükleotid (NAD)'dir.



Laktat dehidrogenaz (LDH), H ve M tiplerinden oluşan 4 peptid zincirinden meydana gelir. LDH'nin 5 izoenzimi vardır: LDH₁ (H₄), LDH₂ (H₃M), LDH₃ (H₂M₂), LDH₄ (HM₃), LDH₅ (M₄). Son yıllarda altıncı LDH izoenzimi olan LDH-X bulunmuştur.

LDH vücudun hemen tüm hücrelerinde bulunur. Özellikle myokard infarktüsü ve bazı karaciğer hastalıklarında LDH aktivitesinde artış gözlenir (22). Malign tümörlü hastaların serumlarında da LDH aktivitesinin arttığı saptanmıştır. Kanserli hastalardan karaciğer metastazı olanların %70 inde, olmayanların %20-60 ında serum LDH aktivitesinin arttığı gözlenmiştir, artmış aktivite değerleri Hodgkin lenfoma, batin ve akciğer kanserlerinde bulunmuştur (23). Kanserli hastalarda görülen LDH aktivite artışı klinik tanı bakımından çok yarar sağlamaz. Bununla beraber tümörlü hastaların izlenmesinde faydalıdır. Malign tümörlerin oluşturduğu eksudatif effüzyonlarda LDH aktivitesinin ölçümü klinik tanıda daha çok yararlıdır (22).

Alkalen fosfataz (ALP) ın (E.C. 3.1.3.1, ortofosforik asit monoester fosfohidrolaz) serumda bulunan şekilleri karaciğer, kemik, barsak, plasenta ve seyrek olarak böbrek dokusunda bulunan spesifik şekillerinin özelliklerine sahiptir. Normal serumda en fazla bulunan ALP izoenzim şekilleri karaciğer ve kemik çeşitleri olarak tanımlanabilir (23).

ALP hemen hemen bütün dokularda, özellikle hücre ve hücre zarında bulunur. Barsak epitelyumunda, böbrekte, kemikte, karaciğerde ve plasentada yüksek düzeyde meydana gelir (22).

Serum ALP aktivitesinin ölçülmesi iki grup hastalığın incelenmesinde özel bir önem taşımaktadır. Bunlar hepatobiliyer hastalıklar ve osteoblastik aktivitenin

artmasıyla beraber olan kemik hastalıklarıdır. Primer veya metastatik tümör gibi nedenlerle intrahepatik safra yollarının tıkanmasında da serum ALP aktivitesi artar. Kolorektal kanserli hastalarda karaciğer metastazının saptanması için preoperatif olarak serum ALP aktivitesinin tayininin tedaviyi yönlendirmede ve prognozunun belirlenmesinde yararlı olduğu ileri sürülmüştür (24).

Aspartat aminotransferaz (E.C. 2.6.1.1, L-aspartat oksoglutarat aminotransferaz) amino gruplarını transfer ederek aminoasitlerle oksoasitlerin birbirlerine dönüşümünü katalize eder.

Primer veya metastatik karaciğer kanserli hastalarda aspartat aminotransferaz (AST) aktivitesi 5-10 kat artar, AST da alanin aminotransferaza nazaran daha fazla aktivite artışı olur. Fakat karaciğerin malign infiltrasyonunun erken devrelerinde bu iki enzimin aktiviteleri genellikle normal düzeylerdedir (23).

GEREÇ ve YÖNTEMLER

A- GEREÇ

Çalışmada yapılan santrifüjleme işlemlerinde Cool-spin 2 Model soğutmalı santrifüj ve Hettich Universal Model santrifüj kullanıldı.

Dokuları homojenize etmek için Ultraturrax T 25 Model homojenizatör kullanıldı.

Glutasyon redüktaz (GSSGR) enzim aktivitesi, redükte glutasyon (GSH) ve protein miktarları Shimadzu UV-120-02 spektrofotometresinde ölçüldü. Laktat dehidrogenaz (LDH), alkalen fosfataz (ALP) ve aspartat aminotransferaz (AST) aktiviteleri Perkin-Elmer spektrofotometresinde okundu.

Dokular ve serumlar Heraeus Vötsch Model derin dondurucuda -40°C de saklandı.

Tris, etilendiamintetraasetik asit (EDTA), metafosforik asit, 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB), okside glutasyon (GSSG), GSH, redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) gibi kimyasal maddeler ve protein ölçümleri için kullanılan kit, Sigma Chem. Comp.'dan, LDH kiti Wako Chem. GmbH'dan, ALP ve AST kiti Knickerbocker S.A.E.'den temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan diğer bileşikler kimyasal saflıkta idi.

Bu çalışma Ekim 1989 ile Mart 1990 tarihleri arasında Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Kliniğinde gastrointestinal sistem kanseri tanısı almış 17 hasta üzerinde yapılmıştır. Olguların 6 sına mide, 11 ne kolorektal kanser tanısı konmuştu. Hastalardan ameliyat öncesi sabahı, serum enzim aktivitelerini ölçmek için 10 ml kan alındı. Alınan kanlar hemen santrifüjlenerek serumları ayrıldı ve çalışılincaya kadar -40°C de dondurularak saklandı. İki hasta uzak metastaz saptandığı için ameliyat edilmedi. Diğer hastalardan ameliyat esnasında çalışmada kullanılacak kadar sağlam ve tümörlü dokularından parça alındı. Alınan dokular hemen soğutulmuş serum fizyolojikle yıkandıktan sonra çalışılincaya kadar -40°C de derin dondurucuda saklandı.

B- YÖNTEMLER

Redükte Glutasyon Miktarının Ölçümü:

Beutler ve arkadaşları (25) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanıldı. 0.15 M potasyum klorür tamponu içinde doku homojenize edildi. Deproteinizasyon için NaCl, metafosforik asit, EDTA içeren çözelti kullanıldı. Proteinler santrifüjlenerek ayrıldıktan sonra supernatan, Na_2HPO_4 ve DTNB içeren ortamda oluşan rengin optik dansitesi 412 nm de spektrofotometrede okundu.

Standart olarak GSH kullanıldı.

GSH miktarının hesaplanmasında kullanılan protein miktarları Lowry (26) yöntemi ile ölçüldü. GSH miktarı

bir miligram protein başına düşen nmol GSH miktarı olarak belirlendi.

Glutatyon Redüktaz Enzim Aktivitesinin Saptanması:

Racker (27) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. 1 M tris-HCL tamponu pH 8 içeren ortamda doku homojenize edildi. Santrifüj işleminden sonra supernatan, 1 M tris-HCL pH 8, 0.2 M EDTA, 0.033 M GSSG ve 2 mM NADPH içeren bir ortamda, 37 °C de NADPH nin oksitlenmesi, 340 nm de optik dansite azalışı 5 dakika izlenerek ölçüldü.

Enzim Ünitesi: pH 8 ve 37 °C de, dakikada 1 µmol NADPH yı oksitleyen enzim miktarı olarak tanımlandı.

Spesifik Aktivite: 1 miligram protein başına düşen enzim ünitesi olarak tarif edildi.

Serum GSSGR aktivitesi ölçümü için Delides ve arkadaşlarının (28) geliştirdiği yöntem kullanıldı. Sonuçlar IU/L olarak verildi.

Laktat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesinin Saptanması

Cobaud-Wroblewski (29) tarafından geliştirilen yönteme dayanan kit kullanılarak enzim aktivitesi ölçüldü. Serum, piruvik asit ve NADH içeren tampon ortamına katıldı. 37 °C de 15 dakika inkübe edildi. Reaksiyon karışımına renk reaktifi (2,4 dinitrofenilhidrazinin hidroklorik asit solüsyonu) katıldı. Enzim aktivasyonu oluştuktan sonra geriye kalan piruvik asit 0.4 N sodyum hidroksit solüsyonu eklenmesiyle alkali ortamda hidrazona dönüştürülerek oluşan rengin spektrofotometrede optik dansitesi

500 nm de okundu ve enzim reaksiyonu içermeyen piruvik asit miktarı ölçüldü. LDH aktivitesi kalan piruvik asit miktarı ile ters orantılı olarak değişir. LDH aktivitesi, daha önce hazırlanan kalibrasyon grafiğinden değerlendirildi.

Enzim Ünitesi: 1 ünite/ml, 25°C de dakikada 0.001 hızla NADH'nin 340 nm de indirgenmesine neden olan 1 ml serumdaki LDH miktarı olarak tanımlandı.

Normal Değer: 50-400 ünite

Alkalin Fosfataz Enzim Aktivitesinin Saptanması:

Bessey-Lowry (30) tarafından uygulanan yöntemeye dayanan kit kullanılarak enzim aktivitesi belirlendi. Alkalin fosfataz (ALP), Mg^{++} bulunan ortamda p-nitrofenil fosfat hidrolizini katalize eder, p-nitrofenol ve inorganik fosfat açığa çıkarır. Spektrofotometrede 405 nm de okunan p-nitrofenol oluşum hızı numunedeki ALP aktivitesini verir.

Enzim Aktivitesinin Hesaplanması: 1 mmol/L p-nitrofenol standardı, litrede 50 IU ALP aktivitesi içerir

$$\frac{\text{Serum A.}}{\text{Standart A.}} \times 50 \text{ U/L}$$

Enzim Ünitesi: 1 IU dakikada 1 μ mol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır. Katalitik konsantrasyon serumun litresinde ünite olarak belirtildi (U/L).

Normal Değer: Yetişkinlerde: 13-50 U/L

Çocuklarda : 38-138 U/L

Aspartat Aminotransferaz Enzim Aktivitesinin Saptanması:

Reitman-Frankel (31) tarafından uygulanan yönteme dayanan kit kullanılarak enzim aktivitesi ölçüldü. Aspartat Aminotransferaz (AST) glutamik asitten oksalasetik aside amino grubunun transferini reverzibl olarak katalizler. AST aktivitesi belirli bir zaman içinde oluşan oksalasetat miktarı ile doğru orantılıdır ve aktivite alkali solüsyon içindeki 2,4-dinitrofenilhidrazinin reaksiyonu ile belirlenir. Spektrofotometrede 505 nm de okunarak hazırlanan kalibrasyon grafiğinden enzim aktivitesi hesaplanır.

Enzim Ünitesi: Bir Reitman-Frankel ünitesi, 25 °C de dakikada 4.82×10^{-4} μmol glutamat oluşturan enzim miktarı olarak tanımlandı.

Normal Değer: 8-40 U/ml

İstatistiksel analizler, eşleştirilmiş iki grup arasında "t" testi ve bağımsız iki grup arasında uygulanan "t" testi ile yapıldı (32).

BULGULAR

Redükte Glutasyon Miktarı:

Gastrointestinal sistem (GİS) kanserli 15 hastadan alınan normal ve tümörlü dokuların GSH miktarının ortalama değeri, standart sapması ve eşleştirilmiş iki grup arasında uygulanan "t" testi sonuçları Tablo I'de verilmiştir. Normal dokularda GSH miktarı 95.60 ± 33.24 nmol/mg protein, tümörlü dokularda ise 171.99 ± 79.40 nmol/mg protein olarak bulundu. GSH miktarı, normal dokularla karşılaştırıldığında, tümörlü dokularda istatistiksel olarak anlamlı miktarda artmış bulundu ($p < 0.01$).

Tablo I : GİS kanserli hastaların normal ve tümörlü dokularındaki GSH miktarının karşılaştırılması.

Grup	n	Ortalama değer	Standart sapma	Standart hata	p değeri
Normal	15	95.60	33.24	8.58	
Tümör	15	171.99	79.40	20.50	$p < 0.01$

GİS kanserli hastaların normal ve tümörlü dokularında belirlenen doku GSH miktarı ile birlikte, aynı hastaların serum GSH miktarı da ölçüldü. Hasta grubunun ortalama serum GSH miktarı 2.85 ± 0.58 μ mol/L, sağlıklı kişilerden oluşan kontrol grubunun ortalama serum GSH miktarı ise

2.78 \pm 0.64 μ mol/l bulundu. Hasta ve kontrol grubunun serum GSH miktarı arasında bağımsız iki grup arasında uygulanan "t" testi sonuçları Tablo II'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre hasta ve kontrol grubunun serum GSH miktarı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$).

Tablo II : Kontrol grubundaki sağlıklı denekler ile GİS kanserli hastaların serum GSH miktarının karşılaştırılması

Grup	n	Ortalama değer	Standart sapma	Standart hata	p değeri
Kontrol	14	2.78	0.64	0.17	
Hasta	15	2.85	0.58	0.15	$p>0.05$

Glutasyon Redüktaz Enzim Aktivitesi:

GİS kanserli 14 hastadan alınan normal ve tümörlü dokularda GSSGR aktivitesi belirlendi. Bir hastadan alınan normal ve tümörlü dokuda aktivite saptanamadı. Belirlenen GSSGR aktivitesinde hastalar arasında bireysel farklılık gözlemlendi. Normal ve tümörlü dokulardaki GSSGR enzim aktivitesinin ortalama değeri, standart sapması ve eşleştirilmiş iki grup arasında uygulanan "t" testi sonuçları Tablo III'de verilmiştir. Normal dokularda GSSGR aktivitesi 0.0345 \pm 0.0150 IU/mg protein, tümörlü dokularda ise 0.0679 \pm 0.0172 IU/mg protein bulundu. GSSGR aktivitesi normal dokularla karşılaştırıldığında, tümörlü dokularda istatistiksel olarak anlamlı miktarda artmış olarak bulundu ($p<0.001$).

Tablo III : GİS kanserli hastaların normal ve tümörlü dokularındaki GSSGR aktivitesinin karşılaştırılması.

Grup	n	Ortalama değer	Standart sapma	Standart hata	p değeri
Normal	14	0.0345	0.0150	0.0040	
Tümör	14	0.0679	0.0172	0.0046	$p < 0.001$

Normal ve tümörlü dokularında GSSGR aktivitesi saptanan hastaların serum GSSGR aktivitesi de ölçüldü. Hasta ve kontrol grubunu oluşturan sağlıklı kişilerin serum GSSGR aktivitesinin ortalama değeri ve bağımsız iki grup arasında uygulanan "t" testi sonuçları Tablo IV'de verilmiştir. Kontrol grubunda ortalama serum GSSGR aktivitesi 60.76 ± 14.09 U/L, hasta grubunda ise 78.14 ± 19.22 U/L olarak belirlendi. Serum GSSGR aktivitesi kontrol grubuna göre, hastalarda istatistiksel olarak anlamlı miktarda artmıştı ($p < 0.01$).

Tablo IV : Kontrol grubundaki sağlıklı denekler ile GİS kanserli hastaların serum GSSGR aktivitesinin karşılaştırılması.

Grup	n	Ortalama değer	Standart sapma	Standart hata	p değeri
Kontrol	15	60.76	14.09	3.64	
Hasta	15	78.14	19.22	4.96	$p < 0.01$

Laktat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi:

GİS kanserli hastalarda belirlenen serum LDH aktivitesi ile sağlıklı kişilerden oluşan kontrol grubunun serum LDH aktivitesinin ortalama değeri ve iki grup arasında uygulanan "t" testi sonuçları Tablo V'de verilmiştir. Kontrol grubunda ortalama serum LDH aktivitesi 124.67 ± 15.97 WU/ml, hasta grubunda ise 194.67 ± 116.90 WU/ml olarak ölçüldü. Serum LDH aktivitesi kontrol grubuna göre, hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı miktarda artmış bulundu ($p < 0.01$).

Tablo V : Kontrol grubundaki sağlıklı denekler ile GİS kanserli hastaların serum LDH aktivitesinin karşılaştırılması.

Grup	n	Ortalama değer	Standart sapma	Standart hata	p değeri
Kontrol	15	124.67	15.97	4.12	
Hasta	15	194.67	116.90	30.18	$p < 0.01$

Alkalen Fosfataz Enzim Aktivitesi:

GİS kanserli hastaların ve kontrol grubunu oluşturan sağlıklı kişilerin serum ALP enzim aktivitesinin ortalama değeri ve bağımsız iki grup arasında uygulanan "t" testi sonuçları Tablo VI'da verilmiştir. Kontrol grubunda ortalama serum ALP aktivitesi 19.68 ± 2.44 U/L, hasta grubunda ise 31.13 ± 14.78 U/L olarak belirlendi. Serum ALP aktivitesi

kontrol gurubuna göre, hasta gurubunda istatiksels olarak anlamlı miktarda artmıştı ($P < 0.01$).

Tablo VI : Kontrol gurubundaki sağlıklı denekler ile GİS kanserli hastaların serum ALP aktivitesinin karşılaştırılması.

Gurup	n	Ortalama değer	Standart sapma	Standart hata	P değeri
Kontrol	15	19.68	2.44	0.63	
Hasta	15	31.13	14.78	3.81	$p < 0.01$

Aspartat Aminotransferaz Enzim Aktivitesi:

GİS kanserli hastaların ve kontrol gurubunu oluşturan sağlıklı kişilerin serum AST enzim aktivitesinin ortalama değeri ve bağımsız iki gurup arasında uygulanan "t" testi sonuçları Tablo VII'de verilmiştir. Kontrol gurubunda ortalama serum AST aktivitesi 19.60 ± 5.91 U/ml, hasta gurubunda ise 20.00 ± 9.76 U/ml olarak belirlendi. Hasta ve kontrol gurubunun AST aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkı yoktur ($p > 0.05$).

Tablo VII: Kontrol gurubundaki sağlıklı denekler ile GİS kanserli hastaların serum AST aktivitesinin karşılaştırılması.

Grup	n	Ortalama değer	Standart sapma	Standart hata	P değeri
Kontrol	15	19.60	5.81	1.52	
Hasta	15	20.00	9.76	2.52	$p > 0.05$

TARTIŞMA

Bu çalışmada gastrointestinal sistem kanserli hastaların tümörlü dokularında belirlenen GSH miktarı ve GSSGR enzim aktivitesi, aynı hastaların normal dokuları ile karşılaştırıldı. Hastaların ve kontrol grubunun serum GSH miktarı ve GSSGR, LDH, ALP, ve AST aktiviteleri ölçüldü.

Hücre içi savunma mekanizmalarında fonksiyon gösteren GSH miktarı çalışmada, normal dokularda 95.60 ± 33.24 nmol/mg protein, tümörlü dokularda 171.99 ± 79.40 nmol/mg protein olarak belirlendi. Hem normal hem de tümörlü dokularda belirlenen GSH miktarı arasında bireysel farklılık gözlenmesine rağmen GSH miktarının normal dokulara göre, tümörlü dokularda istatistiksel olarak anlamlı miktarda arttığı belirlendi ($p < 0.01$, Tablo I).

Kanser için önemli bir biyokimyasal parametre olan doku GSH miktarı çeşitli kanserli olguların tümörlü dokularında ölçülmüştür (13,33,34). Murray ve ark.ı geliştirdikleri histofluoresans tekniği ile insan meme dokusunun benign ve malign lezyonlarında GSH miktarını semi-kantitatif olarak belirlemişlerdir (33). Normal epitelyum ve fibroadenomada GSH miktarını normal, apokrin metaplazi, epitelyozis ve intraduktal karsinomada GSH miktarının arttığını göstermişlerdir. Tümörün evreleri ile GSH miktarındaki artış arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır.

Engin, deri kanserli hastalarda yaptığı çalışmada, tümörlü dokularda ölçülen GSH miktarının tümör büyüme hızı ile pozitif bir korelasyon gösterdiğini ileri sürmüştür (34).

Bu konuda yapılan çalışmalarda genellikle normal dokulara göre, tümörlü dokularda GSH miktarının artmış olduğu gözlenmiştir (33,34). Tümörlü dokularda GSH miktarının artmasının nedeni henüz tam olarak açıklanamamış olmakla beraber tümör hücrelerinde heksoz monofosfat yolunun hızının ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesinin artışına bağlı olarak NADPH ve GSSGR ile GSSG den, GSH oluşumunun arttığı ileri sürülmüştür (13,33).

Bizim çalışmamızda GİS kanserli hastaların serum GSH miktarı $2.85 \pm 0.64 \mu\text{mol/L}$, kontrol grubunda ise $2.78 \pm 0.58 \mu\text{mol/L}$ olarak ölçüldü. Hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0.05$, Tablo II).

Beutler ve ark.ı sağlıklı ve kanserli hastaların plazmasında total glutatyon miktarını ölçmüşlerdir. Sağlıklı kişilerin plazma total glutatyon miktarına göre, kanserli hastalarda plazma total glutatyonunun azaldığını göstermişlerdir (35).

GSSGR, hücre fizyolojisinde son derece önemli olan GSH/GSSG oranını kontrol eden bir enzimdir (36). Bu çalışmada, GSSGR aktivitesi normal dokularda 0.0345 ± 0.0150 IU/mg protein, tümörlü dokularda ise 0.0679 ± 0.0172 IU/mg

protein olarak bulundu. GSSGR aktivitesinde de bireysel farklılık gözlemlendi. Normal dokulara göre, tümörlü dokularda GSSGR aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı miktarda artmıştı ($p < 0.001$, Tablo III).

Di Ilio ve ark.1, normal ve neoplastik insan göğüs dokusunda GPer, glutatyon S-transferaz ve GSSGR aktivitelerini belirlemek için yaptıkları çalışmada her üç enzimin de, normal ve fibroadenomalı dokulara göre, neoplastik dokularda attığını bildirmişlerdir (37). Farelerde yapılan çalışmada normal doku ile karşılaştırıldığında, hem pre-neoplastik hem de neoplastik meme dokusunda GSSGR aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (38).

Ehrlich ascit tümör hücreleri ile yapılan çalışmada heksoz monofosfat yolu (HMP) aktivitesinin arttığı saptanmıştır. HMP aktivitesinin GSSGR-GPer çifti ile üretilen NADP yapımına bağlı olduğu ve GSSGR enzimi ile regüle edildiği gösterilmiştir (13,33). Meme kanserli dokularda GSH'nın tüketimindeki artış nedeni ile GSSGR aktivitesinde artış olduğu ileri sürülmüştür (37).

Delides ve ark.1 serum GSSGR aktivitesini tayin etmek için yarı otomatik yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem ile normal serum GSSGR aktivitesi 47-79 IU/L olarak belirlenmiştir (28). Çalışmamızda serum GSSGR aktivitesi kontrol grubunda 60.76 ± 14.09 IU/L, kanserli hastalarda 78.14 ± 19.22 IU/L olarak bulundu. Serum GSSGR aktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kanserli

hastalarda istatistiksel olarak anlamlı miktarda artmıştı ($p < 0.01$, Tablo IV).

Kanserli hastaların serum GSSGR enzim aktivitesinin sağlıklı kişilere göre, %33 artmış olduğu bulunmuştur. Buna rağmen Delides ve ark.ı kanserli hastalarda diğer enzimlere göre, GSSGR aktivite artışının prognostik indeksi belirlemede fazla bir yarar sağlamadığı görüşünü ileri sürmüşlerdir. Kanserli hastalarda serum GSSGR aktivitesinin ölçülmesinin toplum taramalarında yararlı olabileceğini belirtmişlerdir (28). Karaciğer hastalıkları ve kan diskrazilerinde de serum GSSGR aktivitesinin artmasından dolayı bu enzimin kansere spesifik bir test olmayacağı, fakat multifazik biyokimyasal değerlendirmede LDH'nin yerini alabileceği ileri sürülmüştür (28).

Laktat dehidrogenaz, kanser olgularının tanısında ve tedavilerinin izlenmesinde yararlı bir enzim olmakla birlikte, belirli bir kanser olgusuna özgül bir enzim değildir (23). Çalışmamızda, serum LDH aktivitesi kontrol grubunda 124.67 ± 15.97 WU/ml, hasta grubunda ise 194.67 ± 116.90 WU/ml olarak bulundu. Bir hastada normal değer üzerinde, bir hastada normal değer üst sınırında LDH aktivitesi belirlendi. Diğer hastaların serum LDH aktivitesi normal değerler içinde olmasına rağmen, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı miktarda artmış bulundu ($p < 0.05$, Tablo V).

Finc ve ark.ı mide kanserli ve intestinal metaplazi-

li hastaların doku LDH aktivitesinin, sağlam dokulara göre arttığını belirlemişlerdir. Mide sıvısında da kanserli hastalarda LDH aktivitesinin arttığını göstermişlerdir. Serum ve mide sıvısında LDH aktivitesinin ölçülmesinin, mide kanserli hastaları belirlemek için yapılan taramalarda yararlı olacağını ileri sürmüşlerdir (39).

ALP enziminin özellikle kemik ve karaciğer kanserlerinde aktivitesinin arttığı belirtilmiştir (23). Kanserli hastalarda serum ALP aktivitesinin tayini, karaciğer ve kemik metastazlarını belirlemede yararlı olmaktadır. Çalışmamızda kontrol grubunda serum ALP aktivitesi 19.68 ± 2.44 U/L, hasta grubunda ise 31.13 ± 14.78 U/L olarak ölçüldü. Yaygın metastaz saptanıp operasyona alınmayan iki hastada normal değerin üzerinde serum ALP aktivitesi saptandı. Diğer hastaların ve kontrol grubunun serum ALP aktivitesi normal değerler içinde idi. Buna rağmen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hasta grubunda serum ALP aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı miktarda arttığı belirlendi ($p < 0.01$, Tablo VI).

Klompje ve ark.ı kolorektal kanserli hastalarda serum ALP aktivitesini belirlediler. Karaciğer metastazı olan hastalarda serum ALP aktivitesinin daha fazla arttığını ileri sürmüşlerdir. Kolorektal kanserli hastalarda preoperatif olarak serum ALP aktivitesinin ölçümünün karaciğer metastazının saptanması açısından yararlı olduğunu ileri sürmüşlerdir (24).

Aspartat aminotransferaz aktivitesinin, kanserin ilerlemiş evrelerinde artış gösterdiği belirlenmiştir (22). Bu çalışmada serum AST aktivitesi kontrol grubunda 19.60 ± 5.91 U/ml, hastalarda ise 20.00 ± 9.76 U/ml olarak ölçüldü. Kontrol grubuyla kanserli hastaların serum AST aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p > 0.05$, Tablo VII).

Bir çalışmada serum AST aktivitesi artmış olan hastaların prognozunun iyi olmadığı ileri sürülmüştür (28).

SONUÇLAR

Bu çalışmada GIS kanserli hastalardan alınan normal ve tümörlü dokularda GSH miktarı ve GSSGR enzim aktivitesi ile serum GSH miktarı ve GSSGR, LDH, ALP ve AST aktiviteleri ölçüldü. Bulunan değerler istatikselsel olarak değerlendirildiğinde aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. GSH miktarı normal dokular ile karşılaştırıldığında tümörlü dokularda önemli derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.01$). Serum GSH miktarı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında önemli bir farklılık gözlenmedi ($p > 0.05$).

2. GSSGR enzim aktivitesi normal dokular ile karşılaştırıldığında önemli derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). Serum GSSGR aktivitesi kontrol grubuna göre, önemli derecede artmıştı ($p < 0.01$).

3. Serum LDH, ALP aktiviteleri hastalarda, kontrol grubuna göre önemli derecede artmıştı ($p < 0.01$, $p < 0.01$). AST aktivitesinde hasta ve kontrol grubu arasında önemli bir fark yoktu ($p > 0.05$).

ÖZET

Çalışma 17 gastrointestinal sistem kanserli hastada yapıldı. Bu hastalardan 6 sına mide, 11 ine kolorektal kanser tanısı konmuştu. 15 hastadan alınan normal ve tümörlü dokularda redükte glutasyon (GSH) miktarı ve glutasyon redüktaz (GSSGR) enzim aktivitesi ölçüldü. Hastalardan alınan normal dokular ile karşılaştırıldığında, tümörlü dokularda GSH miktarı istatistiksel olarak önemli miktarda artmış bulundu ($p < 0.01$). Okside glutasyonu (GSSG) redükte forma çeviren GSSGR enzim aktivitesi de normal dokularla karşılaştırıldığında, tümörlü dokularda istatistiksel olarak önemli miktarda artmış bulundu ($p < 0.001$). Hastaların serum GSH miktarı ve GSSGR, laktat dehidrogenaz (LDH), alalen fosfataz (ALP) ve aspartat aminotransferaz (AST) aktiviteleri ölçüldü. GİS kanserli hastalarda serum GSSGR, LDH, ve ALP aktiviteleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli miktarda artmıştı (sırasıyla $p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.01$). GİS kanserli hastalarda serum GSH miktarı ve AST aktivitesi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamadı ($p > 0.05$).

SUMMARY

This study had been done with 17 patients who had GIS cancer. Six of them were stomach, 11 of them were colorectal cancer. The glutathion reductase activity and reduced glutathion level were established in normal and tumor tissues which were taken from 15 patients. The GSH level of the tissues with tumor were significantly higher as compared with the same patients' normal tissues ($p < 0.01$). The activity of the GSSGR enzyme, which converts the oxidized glutathion to reduced form, were significantly higher in the tissues with tumor as compared with the normal tissues ($p < 0.001$). We also determined the ALP, AST, LDH and GSSGR enzyme activities and GSH level in sera of the patients. The patients with cancer had significantly higher sera GSSGR, LDH and ALP activities as compared with the normal patients ($p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.01$ respectively). But there was not any difference between the patients and control groups sera GSH level and AST activity ($p > 0.05$).

SİMGELER ve KISALTMALAR

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
ADP	Adenozin difosfat
ALP	Alkalen fosfataz
AST	Aspartat aminotransferaz
ATP	Adenozin trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
γ-GCS	γ-Glutamil sistein sentetaz
GPer	Glutatyon peroksidaz
GSH	Redükte glutatyon
GSSG	Okside glutatyon
GSSGR	Glutatyon redüktaz
GS	Glutatyon sentetaz
L	Litre
HMP	Heksoz monofosfat yolu
LDH	Laktat dehidrogenaz
mg	miligram
ml	mililitre
Mg	Magnezyum
mmol	milimol
μmol	mikromol
nmol	nanomol
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
U	Ünite

KAYNAKLAR

1. Carmichael, J., Park, J.G., Degraff, W.G., Gamson, J., Gazdar, A.F., ve Mitchell, J.B.: Radiation Sensitivity and Study of Glutathione and Related Enzymes in Human Colorectal Cancer Cell Lines. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 24:1219-24, 1988.
2. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., ve Rodwell, V.W.: *Harper's Biochemistry*. California, 1988.
3. Crook, T.R., Souhami, R.L., Whyman, G.D., ve McLean, A.E.M.: Glutathione Depletion as a Determinant of Sensitivity of Human Leukemia Cells to Cyclophosphamide. *Cancer Res.* 46:5035-8, 1986.
4. Arrick, B.A., Nathan, C.F.: Glutathione Metabolism as a Determinant of Therapeutic Efficacy: A Review. *Cancer Res.* 44:4224-32, 1984.
5. Mitchell, J.B., Russo, A.: The Role of Glutathione in Radiation and Drug Induced Cytotoxicity. *Br. J. Cancer.* 55:Suppl.VIII 96-104, 1987.
6. Romine, M.T., Kessel, D.: Intracellular Glutathione as a Determinant of Responsiveness to Antitumor Drugs. *Biochem. Pharmac.* 35:3323-26, 1986.

7. Wolf, C.R., Lewis, A.D., Carmichael, J., Adams, D.J., Allan, S.G., ve Ansell, D.J.: The Role of Glutathione in Determining the Response of Normal and Tumour Cells to Anticancer Drugs. *Biochem. Soc. Trans.* 15:728-30, 1987.
8. Borek, C.: Radiation and Chemically Induced Transformation: Free Radicals, Antioxidants and Cancer. *Br.J. Cancer* 55:Suppl.VIII 74-86, 1987.
9. Adams, G.E.: Radiation and Cancer: A Two-edged Sword: *Br. J. Cancer* 55:Suppl.VIII 11-18, 1987.
10. Cohen, G.M., Doherty, M.d'A.: Free Radical Mediated Cell Toxicity by Redox Cycling Chemicals. *Br. J. Cancer* 55:Suppl.VIII 46-52, 1987.
11. Carmichael, J., Adams, D.J., Ansell, J., ve Wolf, C.R.: Glutathione and Glutathione Transferase Levels in Mouse Granulocytes Following Cyclophosphamide Administration. *Cancer Res.* 46:735-9, 1986.
12. Lee, F.Y.L., Siemann, D.W., Turner, M.J.A., ve Keng, P.J.: Glutathione Contents in Human and Rodent Tumor Cells in Various Phases of the Cell Cycle. *Cancer Res.* 48:3661-5, 1988.
13. Erden, M., Bor, M.N.: Redükte Glutatyon ve Glutatyon Redüktaz Enziminin Klinik Önemi. *Doğa.* 4:24-32, 1980.
14. Erden, M., Bor, M.N.,: Changes of Reduced Glutathione, Glutathione Reductase and Glutathione Peroxidase After Radiation in Guinea Pigs. *Biochem. Med.* 31:217-27, 1984.

15. Oka, J.M., Djukanović, L., ve Marković, B.: Erythrocyte and Plasma Glutathione Levels in Patients with Chronic Renal Insufficiency. *Biochem. Med. and Metabolic Biology*. 39:48-54, 1988.
16. Isaacs, J., Binkley, F.: Glutathione Dependent Control of Protein Disulfide-Sulphydryl Content by Subcellular Fractions of Hepatic Tissue. *Biochim. Biophys. Acta*. 497:192-204, 1977.
17. Modig, H.: Celluler Mixed Disulfides between Thiols and Proteins and Their Possible Implication for Radiation Protection. *Biochem. Pharmacol.* 17:177-86, 1968.
18. Uotila, L.: Preparation and Assay of Glutathione Thiol Esters. Survey of Human Liver Glutathione Thiol Esterases. *Biochemistry*. 12:3938-43, 1973.
19. Devlin, M.T. (ed): *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. Second edition America, 1986.
20. Gaetane, G.F., Galiano, S., Canepa, L., Ferraris, A.M., ve Kirkman, H.N.: Catalase and Glutathione Peroxidase are Equally Active in Detoxification of Hydrogen Peroxide in Human Erythrocytes. *Blood* 73(1):334-9, 1986.
21. Smith, E.L., Hill, R.L., Lehman, I.R., Lefkowitz, R.J., Handler, P., White, A.: *Principles of Biochemistry: General Aspect*. Seventh Edition 1988.
22. Aras, K., Erşen, G.: *Teorik ve Klinik Enzimoloji*. Ankara Üniversitesi Basımevi. Ankara, 1988.

23. Lawrence, M.S., Tietz, N.W. (ed) : Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Co Canada, 1986.
24. Klompje, J., Petrelli, N.J., Herrere, L., ve Mittelman, A.: The Prognostic Value of Preoperative Alkaline Phosphatase for Resection of Solitary Liver Metastasis from Colorectal Carcinoma. Eur. J. Surg. Oncol. 13:345-7, 1987.
25. Beutler, E., Robson, M.J., Bittenweiser, E.: The Glutathione Instability of Drug-sensitive Red Cells. J. Lab. Clin. Med. 49:84-95, 1957.
26. Lowry, O.H., Rosebrough, M.J., Farr, A.L.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193:265-75, 1951.
27. Racker, E.: GSSGR from Bakers Yeast and Beef Liver. J. Biol. Chem. 217:855-65, 1955.
28. Delides, A., Spooner, R.J., Goldberg, D.M., ve Neal, F.E.: An Optimized Semi-automatik Rate Method for Serum Glutathione Reductase Activity and its Application to Patients with Malignant Disease. J. Clin. Path. 29:73-7, 1976.
29. Cabaud, P.G., Wroblewski, F. Am. J. Clin. Path. 30:234-40, 1958.
30. Bessey, O.A., Lowry, O.H., ve Brock, M.J.: A Method for the Rapid Determination of Alkaline Phosphatase with Five Cubic Millimeters of Serum. J. Biol. Chem. 164:321-9, 1946.

31. Reitman, S., Frankel, S.: J. Clin. Pathol. 28:56-62, 1957.
32. Özdamar, K., Dinçer, S.: Bilgisayarla İstatistiksel Veri Analizi. Bilim Teknik Yayınevi. İstanbul, 1987
33. Murray, G.I., Burke, M.D., ve Ewen, S.W.B.: Glutathione Localization in Benign and Malignant Human Breast Lesions. Br. J. Cancer 55:605-9, 1987.
34. Engin, A.: Glutathione Content of Human Skin Carcinomas Arch. Derm. Res. 257:53-6, 1976.
35. Beutler, E., Gelbart, T.: Plasma Glutathione in Health and in Patients with Malignant Disease. J. Lab. Clin. Med. 105:581-4, 1985.
36. Williams, C.H.Jr.: Flavin-Containing Dehydrogenases. The Enzymes. Academic Press, Inc., Newyork, Cilt XIII, 3.Baskı, 1976.
37. Illo, C.D., Sacchetta, P., Boccio, G.D., Rovere, G.L., ve Federici, G.: Glutathione Peroxidase, Glutathione S-Transferase and Glutathione Reductase Activities in Normal and Neoplastic Human Breast Tissue. Cancer Let. 29:37-42, 1985.
38. Hilf, R., Ickowicz, R., Bartley, J.C. ve Abraham, S.: Multiple Molecular Forms of Glucose-6-Phosphate in Normal, Preneoplastic and Neoplastic Mammary Tissues of Mice. Cancer Res. 35:2109-16, 1975.
39. Finch, P.J., Rogers, K., ve Williams, G.T.: Beta-Glucuronidase LDH ve LDH Isoenzyme Levels and Screening for Gastric Cancer. Eur. J. Surg. Oncol. 12:253-6, 1986.