

■ Orijinal Makale

Küçük hücreli akciğer kanserinde glutatyon S-transferaz polimorfizmlerinin araştırılması

Investigation of glutathione S-transferase polymorphisms in small cell lung cancer

Semih Kunak* 

Ordu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı , Ordu, Türkiye

Öz

Amaç: Bu çalışmada, küçük hücreli akciğer kanserinde (KHAK) glutatyon S-transferaz (GST); GSTM1, GSTT1 ve GSTP1 ile105Val polimorfizmlerini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmaya Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesinde KHAK tanısı konulan 28 hasta dahil edildi. GST polimorfizmleri, hastalardan alınan kan örneklerinden izole edilen DNA'larda PCR yöntemi kullanılarak çalışıldı.

Bulgular: GSTM1 null, GSTT1 null ve GSTP1 ile105Val varyant genotiplerin yüzdeleri sırasıyla %60,7, %3,6 ve %46,4 olarak bulunmuştur.

Sonuç: KHAK ile artmış GSTM1 null genotip yüzdesi ve azalmış GSTT1 null genotip yüzdesi arasında ilişki olabilir.

Anahtar Kelimeler: Glutatyon S-transferaz, polimorfizm, küçük hücreli akciğer kanseri

Abstract

Aim: In this study, we aimed to investigate GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Ile105Val polymorphisms in SCLC (Small Cell Lung Cancer).

Material and Method: Twenty-eight patients diagnosed with SCLC at the Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Training and Research Hospital were included in the study. GST polymorphisms were studied in DNA, isolated from blood samples taken from patients, using PCR method.

Results: The percentages of GSTM1 null, GSTT1 null, and GSTP1 Ile105Val variant genotypes were found to be 60.7%, 3.6%, and 46.4%, respectively.

Conclusion: There may be an association between SCLC and increased GSTM1 null genotype percentage and decreased GSTT1 null genotype percentage.

Keywords: Glutathione S-transferase, polymorphism, small cell lung cancer

Sorumlu Yazar*: Semih Kunak, Ordu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye

E-posta: csknk@yahoo.com

ORCID: 0000-0003-2231-3967

Doi: 10.18663/tjcl.1125416

Geliş Tarihi: 02.06.2022 Kabul Tarihi: 29.11.2022

Giriş

Kanser bütün dünyada yaygın olarak görülen bir hastalık ve her yıl yüksek oranda ölümlere neden olan ciddi bir sağlık sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün verilerine göre akciğer kanseri 2020 yılında tüm dünyada 2.206.771 yeni vaka görülmesiyle tüm kanserler arasındaki oranı %11,4 olmuştur. Ancak %18'lik mortalite oranı ile kansere bağlı ölümler arasında ilk sırada yer almaktadır [1]. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC)'nin 2020'de yayınladığı istatistiklere göre Türkiye'de yeni vakalar arasında akciğer kanseri görülme oranı %17,6 olarak bildirilmiştir [2].

Akciğer kanserleri histolojik olarak küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere iki tipe ayrılır [3]. Akciğer kanseri vakalarının yaklaşık olarak %20'sini KHAK oluşturmaktadır [4]. KHAK çok hızlı büyür, geniş infiltrasyon görülür ve erken metastaz yapar [5]. KHAK etiolojisinde sigara kullanımı ve meslek koşulları gibi çevresel faktörler en önemli risk grubunu oluşturmakla birlikte genetik yatkınlık da akciğer kanseri oluşumunda bir faktör olabilmektedir [6]. Sigara dumanı özellikle polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH)'lar, nitrozaminler ve aldehitler gibi kimyasal karsinojenleri içermektedir. Bu kimyasal karsinojenlerin DNA eklentilerini arttırdığı, tümör baskılayıcı genleri (p53 gibi) baskıladığı, mutasyonlarla agresif tümör oluşumuna neden olduğu bilinmektedir [7]. Sigara dumanında bulunan PAH'ların metabolik olarak aktivasyonu sonucunda karsinojenik metabolitler oluşur. Bu karsinojenik metabolitlerden birisi de benzo(a)pyrene 7,8-9,10 diol epoksit (BaPDE)'dir [8].

Glutasyon S-transferaz (GST) enzimleri ksenobiyotik metabolizmasının faz II evresindeki konjugasyon reaksiyonlarını katalizleyen bir enzim süper ailesidir. Özellikle PAH'ların metaboliti olan BaPDE gibi mutajenik ve karsinojenik aktivite gösteren DNA-reaktif molekülleri detoksifiye eder [9]. Ayrıca GST enzimleri kemoterapatik ilaçlar, çevresel karsinojenler ve endojen moleküller olmak üzere ksenobiyotiklerin geniş bir spektrumunu detoksifiye ederler [10]. Sitozolik GST enzim ailesi genetik ve biyokimyasal özelliklerine göre çeşitli alt ailelere ayrılmaktadır. Bunlar GSTA, GSTM, GSTP, GSTS, GSTT, GSTO ve GSTZ' dir. Ayrıca bu sınıflar içinde birçok izoenzimler tanımlanmıştır [11]. GST enzimlerinin gen ekspresyonu polimorfik bir dağılım gösterir. Bu da gerek çevresel karsinojenlerin detoksifikasyonunda gerekse de ilaçların metabolizmasında bireysel farklılıklara yol açar [12]. Erken başlangıçlı akciğer kanserlerinin patolojisinde genetik faktörlerin rolü ileri yaşta görülenlere

göre daha fazladır. Birçok çalışmada GST gen polimorfizminin genç yaşlarda kanser gelişim riski ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu bildirilmiştir [13-15].

GST' lerde görülen bazı polimorfizmler, enzim aktivitesinde değişiklik meydana gelmesine veya tamamen enzim aktivitesinin kaybolmasına neden olur. Örneğin, GSTM1 ve GSTT1 gen silinmeleri, bu enzimlerin aktivitelerinin tamamen kaybolmasıyla sonuçlanır. GSTP1 enziminin ekzon 5'te (Ile105Val) ve ekzon 6'daki (Ala114Val) tek nükleotid polimorfizmleri bu enzimin aktivitesini azaltır [16]. GST polimorfizmleri ile akciğer kanseri riski arasındaki ilişkiler çeşitli popülasyonlarda incelenmiştir. Bazı çalışmalar GSTM1, GSTP1 ve GSTT1 polimorfizmleri ile akciğer kanseri riski arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır [17-19]. Ayrıca, duyarlı GST genotiplerinin, daha agresif tümör fenotiplerinin ortaya çıkmasına ve hayatta kalma süresinin azalmasına yol açabilen p53 ve K-ras genlerindeki yüksek mutasyon frekanslarıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir [20]. Türk popülasyonunda yapılan bir çalışmada GSTP1, GSTM1 ve GSTT1 polimorfizmlerinin akciğer kanseri görülme riskini artırdığı öne sürülmüştür [21]. Yine Türk popülasyonunda yapılan diğer bir çalışmada KHAK gelişimi ile GSTP1 polimorfizmi arasında bir ilişki olduğu öne sürülmüştür [22].

Yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı bu çalışmada, KHAK hastalarında GSTM1, GSTT1 ve GSTP1 polimorfizmlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler

Hastalar

Bu çalışmaya Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde KHAK tanısı konulan 28 hasta dahil edildi ve çalışma lokal etik komitesi tarafından onaylandı. GST polimorfizmleri hastalardan alınan kan örneklerinde çalışıldı. Çalışma sırasında tüm uygulamalarda 1964 Helsinki Bildirgesi'nin ve ulusal/kurumsal bilimsel araştırma komitelerinin etik standartlarına uygun hareket edildi.

Tanı Yöntemleri

Çalışmamızda hastalara KHAK tanısı konulmasında direkt göğüs grafisi, bilgisayarlı akciğer tomografisi ve kemik sintigrafisi gibi görüntüleme yöntemleri kullanıldı. Ayrıca patolojik tanı için iğne aspirasyon biyopsisi, bronkoskopik biyopsi ve cerrahi olarak alınan biyopsi örnekleri kullanıldı.

DNA İzolasyonu

Yazılı onayları alındıktan sonra her bir hastadan yaklaşık 5 ml

venöz kan örneği alındı. Alınan kanlarla standart tuz çöktürme yöntemine göre [23] geliştirilmiş hazır kit kullanılarak (Promega, Madison WI, ABD) lenfositlerden DNA izolasyonu yapıldı. Elden edilen DNA'nın 260 nm dalga boyunda verdiği absorbanslar değerlendirilerek saflık ve miktar tayini yapıldı. İzole edilen DNA'lar kullanılıncaya kadar -20o C' de saklandı.

Genotiplerin Belirlenmesi

GSTM1 ve GSTT1 genotipleri multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile Abdel-Rahman ve ark.'larının (1996) açıkladığı metod kullanılarak belirlendi [24]. Kısaca, 1 µg izole edilmiş DNA, GSTM1 primerleri (sense 5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C, antisense 5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G) ayrıca GSTT1 (sense 5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC, antisense 5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA) primerlerinin her birinden 30 pmol içeren 30 µL reaksiyon karışımında amplifiye edildi. İnternal kontrol olarak ekzon 7'de bulunan CYP1A1 geni, uygun primerler (sense 5'-GAA CTG CCA CTT CAG C TG TCT, antisense 5'-CAG CTG CAT TTG GAA GTG CTC) kullanılarak birlikte amplifiye edildi. Reaksiyon karışımı ayrıca her bir dNTP'den 200 µmol, 3 µL 10XPCR tamponu (100 mM Tris-HCl pH 9.0 25°C, 500 mM KCl), 1.6 mM MgCl₂ ve 0,75 ünite DNA Taq polimeraz (Promega, Madison WI, ABD) içeriyordu. Amplifikasyon için Thermo Hybaid (Massachusetts-ABD) PCR cihazı kullanıldı. Reaksiyon koşulları 94°C'de 5 dakika ilk denatürasyon, ardından 2 dakika 94°C'de 35 PCR döngüsü erime, 1 dakika 59°C'de yapışma ve 72°C'de 10 dakika sentez basamaklarından oluştu. PCR ürünleri, %3 (w/v) agaroz jel elektroforezi ile ayrıldı.

GSTP1 genindeki İle105Val polimorfizmi PCR-RFLP yöntemi kullanılarak yapılmıştır [24]. Toplam 30 µL reaksiyon karışımı; 3 µL 10XPCR tamponu, (100 mM Tris-HCl pH 9.0 25°C, 500 mM KCl), 1.2 mM MgCl₂, 100 µmol dNTP karışımı, 25 pmol GSTP1 primerleri (sense, 5'- AAT ACC ATC CTG CGT CAC CT, antisense 5'- TGA GGG CAC AAG AAG CCC CTT), 0,75 ünite DNA Taq polimeraz (Promega, Madison WI, ABD) ve 0.6 µg DNA içeriyordu. Thermo Hybaid (Waltham, MA, ABD) PCR cihazında reaksiyon koşulları 95°C'de 2 dakikalık 1 döngü, 94°C'de 0,5 dakikalık 40 döngü, 55°C'de 0,5 dakikalık ve 72°C'de 0,5 dakikalık 1 döngü ve ardından 72°C'de 10 dakikalık sentez basamağı olacak şekilde ayarlandı. Elde edilen PCR ürünleri BsmAI (New England Biolabs, Ipswich, MA, ABD) enzimi ile kesildi ve kesim ürünleri %3 (w/v) agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırıldı.

Bulgular

Küçük hücreli akciğer kanseri tanısı almış 28 hastada belirlenen GSTM1, GSTT1 ve GSTP1 İle105Val polimorfizmlerine ait genotip frekansları Tablo 1'de gösterilmektedir. GSTM1 pozitif genotipe sahip bireylerin sayısı 11 (%39,3), GSTM1 negatif (null) genotipe sahip bireylerin sayısı 17 (%60,7), GSTT1 pozitif genotipe sahip bireylerin sayısı 27 (%96,4), GSTT1 negatif (null) genotipe sahip bireylerin sayısı ise 1 (%3,6) olarak bulunmuştur. GSTP1 ekzon 5 İle/İle (yabanıl tip) genotipe sahip bireylerin sayısı 15 (%53,6), GSTP1 İle/Val, Val/Val (varyant) genotipe sahip bireylerin sayısı ise 13 (%46,4) olarak belirlenmiştir.

Tablo 1. GST polimorfizmlerinin frekansları

	GSTM1		GSTT1		GSTP1 ekzon 5		
	Pozitif	Null	Pozitif	Null	İle/İle	İle/Val, Val/Val	
KHAK (Toplam n=28)	n	11	17	27	1	15	13
	%	39,3	60,7	96,4	3,6	53,6	46,4

Tartışma

Glutasyon S-transferazların işlevi, tütün dumanında bulunan polisiklik aromatik hidrokarbonları glutasyon konjugasyonu ile detoksifikasyonudur. Eksik veya azaltılmış aktiviteye sahip enzimleri kodlayan GSTM1, GSTT1 ve GSTP1 genlerindeki polimorfizmler, akciğer kanseri riskinin potansiyel değiştiricileri olarak incelenmiştir. Potansiyel duyarlılık gen polimorfizmleriyle ilişkili riskin, düşük maruziyet seviyelerinde en belirgin olabileceği varsayılmaktadır [26]. Beyaz ırka ait sağlıklı kontrol popülasyonlarında GSTM1 null genotipe sahip bireylerin yüzdesi yaklaşık

%50 civarındadır [12]. Bizim yaptığımız çalışmada GSTM1 null genotipe sahip bireylerin yüzdesi 60,7 olarak bulunduğu dikkate alındığında KHAK hastalarında bu genotipe sahip bireylerin yüzdesi sağlıklı kontrollere göre yüksektir. GSTM1 null genotip ile akciğer kanseri riski arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için bir dizi epidemiyolojik çalışma yapılmıştır. Bu risk, Afrikalı-Amerikalı ve Asyalı popülasyonlarda Kafkasyalılara göre daha fazla görülmektedir. Son araştırmalar, CYP1A1, NAT2 veya GSTP1 polimorfizmleriyle birleştirilmiş GSTM1 null genotipin, tek başına GSTM1 null genotipten daha büyük bir akciğer kanseri riski taşıdığını göstermiştir [27]. CYP1A1, CYP2D6 ve CYP2E1'deki ve

kusurlu GST ve N-asetiltransferaz enzimlerindeki değişen fenotipler ve genotipler, akciğer ve diğer kanserlerin gelişme riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. CYP1A1 ve GSTM1' de eş zamanlı olarak yüksek riskli genotipleri taşıyan popülasyonda akciğer kanseri riski çarpıcı biçimde artar [28]. Çin de yapılan bir meta analizde 46 çalışma ele alınmış, CYP1A1 varyant ile GSTM1 null genotipleri ve artmış akciğer kanseri riski arasında bir ilişki olduğuna dair kanıt bulunmuşlardır [29]. Yine yapılan başka bir çalışmada GSTM1 null genotipinin akciğer kanseri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. GSTM1 null genotipi ve CYP1A1 varyant genotipini taşıyan bireylerde akciğer kanseri riski, bu genotipleri taşımayan bireylere göre 2,75 kat daha fazla olduğu aynı çalışmada gösterilmiştir [30].

Çalışmamızda küçük hücreli akciğer kanseri tanısı alan hastalarda, GSTT1 null genotipe sahip bireylerin oranı %3,6 olarak belirlenmiştir. GSTT1 null genotipe sahip bireylerin beyaz ırktaki sağlıklı kontrol popülasyonlarındaki yüzdesinin yaklaşık %20 olduğu [12] göz önünde bulundurulduğunda KHAK ile GSTT1 null genotipin ters ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim GSTT1 null genotip ve KHAK riski arasındaki ilişkiyi inceleyen bazı çalışmalarda GSTT1 null genotipin düşük KHAK riski ile ilişkili olduğu belirlenmiştir [31].

Bu çalışmada KHAK hastalarında GSTP1 ekzon 5 İle/İle (yabanıl tip) genotip ve GSTP1 İle/Val, Val/Val (varyant) genotipe sahip bireylerin yüzdesi beyaz ırktaki sağlıklı kontrol popülasyonlarındaki GSTP1 ekzon 5 genotip yüzdeleriyle [12] uyumlu olduğundan GSTM1 ve GSTT1 polimorfizmlerine benzer bir ilişki GSTP1 ekzon 5 polimorfizmi için söz konusu değildir.

Sonuç olarak sağlıklı popülasyonlarla karşılaştırıldığında bu çalışma, artmış GSTM1 null genotip yüzdesi ve azalmış GSTT1 null genotip yüzdesi ile KHAK arasında bir ilişki olabileceğini ortaya koymaktadır. Ancak bunun ileriye dönük olarak yapılacak daha geniş ölçekli çalışmalarla teyit edilmesi gerekmektedir.

Etik Kurul Onayı

Bu çalışma lokal etik komitesi tarafından onaylanmıştır (Tarih: 12.09.2003, Karar No: 70).

Aydınlatılmış Onam: Çalışmaya katılan tüm hastalardan aydınlatılmış yazılı onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirme Süreci: Harici çift kör hakem değerlendirmesi.

Çıkar Çatışması Durumu

Yazar bu çalışmada herhangi bir çıkarı dayalı ilişki olmadığını beyan etmiştir.

Finansal Destek

Yazar bu çalışmada finansal destek almadığını beyan etmiştir.

Yazar Katkıları

Yazar; makalenin tasarımına, yürütülmesine, analizine katıldığını ve son sürümünü onayladığını beyan etmiştir.

Kaynaklar

1. World Health Organization. International Agency For Research On Cancer. 2020; Erişim tarihi: 05/03/2021, <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/15-Lung-fact-sheet.pdf>
2. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. 2020; Erişim tarihi: 05/03/2021, <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis>
3. American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Staging Manual 5th ed. Philadelphia Lippincott-Raven; 1997. p. 127- 37.
4. Oyama T, Sugio K, Isse T, et al. Expression of cytochrome P450 in non-small cell lung cancer. *Front Bio Sci* 2008; 13: 5787-93.
5. Yavşan DM, Pamuk G, Eren RM, Teke T, Maden E, Uzun K. Micronodular metastasis in lung cancer. *J Chest Diseases Critical Care* 2014; 1: 35-40.
6. Skarin AT, Herbst RS, Leong TL, Bailey A, Sugarbaker D. Lung cancer in patients under age 40. *Lung Cancer* 2001; 32: 255-64.
7. Ada AO, C Kunak S, Hancer F, et al. CYP and GST polymorphisms and survival in advanced non-small cell lung cancer patients. *Neoplasma* 2010; 57: 512-21.
8. Bartsch H, Castegnaro M, Rojas M, et al. Expression of pulmonary cytochrome P4501A1 and carcinogen DNA adduct formation in high risk subjects for tobacco-related lung cancer. *Tox Lett* 1992; 64-65: 477-483.
9. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione S-transferase family of enzymes. *Mutation Res* 2001; 482: 21-6.
10. Eaton DL, Bammler TK. Concise review of glutathione S- transferase and their significance to toxicology. *Toxicological Sciences* 1999; 49: 156-64.
11. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 51-88.
12. Ada AO, Kunak SC, Hancer F, et al. Association between GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and lung cancer risk in a Turkish population. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 5985-93.
13. Di Pietro G, Magno LA, Rios-Santos F. Glutathione S-transferases: an overview in cancer research. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010; 6: 153-70.



14. Nascimento H, Coy CS, Teori MT, et al. Possible influence of glutathione S-transferase GSTT1 null genotype on age of onset of sporadic colorectal adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 510-5.
15. Taioli E, Gaspari L, Benhamou S, et al. Polymorphisms in CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and lung cancer below the age of 45 years. *Int J Epidemiol* 2003; 32: 60-3.
16. Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* 1998; 19: 275-80.
17. Nazar-Stewart V, Vaughan TL, Stapleton P, Van Loo J, Nicol-Blades B, Eaton DL. A population-based study of glutathione S-transferase M1, T1 and P1 genotypes and risk for lung cancer *Lung Cancer* 2003; 40: 247-58.
18. Lewis SJ, Cherry NM, Niven RM, Barber PV, Povey AC. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms and lung cancer risk. *Cancer Lett* 2002; 180: 165-71.
19. Pinarbasi H, Silig Y, Cetinkaya O, Seyfikli Z, Pinarbasi E. Strong association between the GSTM1-null genotype and lung cancer in a Turkish population. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 146: 125-9.
20. Matsuzoe D, Hideshima T, Iwasaki A, et al. Glutathione S-transferase mu1 null genotype is associated with K-ras gene mutation in lung adenocarcinoma among smokers. *Carcinogenesis* 2001; 21: 1327-30.
21. Ada AO, Kunak SC, Hancer F, et al. Association between GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and lung cancer risk in a Turkish population. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 5985-93.
22. Vural B, Yakar F, Derin D, et al. Evaluation of glutathione S-transferase P1 polymorphisms (Ile105Val and Ala114Val) in patients with small cell lung cancer. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012; 16: 701-6.
23. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215-20.
24. Abdel-Rahman SZ, el-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett* 1996; 107: 229-33.
25. Park JY, Schantz SP, Stern JC, Kaur T, Lazarus P. Association between glutathione S-transferase pi genetic polymorphisms and oral cancer risk. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 497-504.
26. Wenzlaff AS, Cote ML, Bock CH, Land SJ, Schwartz AG. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms, environmental tobacco smoke exposure and risk of lung cancer among never smokers: a population-based study. *Carcinogenesis* 2005; 26: 395-401.
27. Cote ML, Kardia SLR, Wenzlaff AS, Land SJ, Schwartz AG. Combinations of glutathione S-transferase genotypes and risk of early-onset lung cancer in Caucasians and African Americans: a population-based study. *Carcinogenesis* 2005; 26: 811-9.
28. Watanabe M. Genetic and phenotypic polymorphisms in carcinogen-metabolizing enzymes and cancer susceptibility *Nihon Rinsho* 1996; 54: 2261-75.
29. Shi X, Zhou S, Wang Z, Zhou Z, Wang Z. CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and lung cancer risk in Chinese populations: a meta-analysis. *Lung Cancer* 2008; 59: 155-63.
30. Gu YF, Zhang ZD, Zhang SC, Zheng SH, Jia HY, Gu SX. Combined effects of genetic polymorphisms in cytochrome P450s and GSTM1 on lung cancer susceptibility. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007; 87: 3064-8.
31. Altinisik J, Balta ZB, Aydin G, Ulutin T, Buyru N Investigation of glutathione S-transferase M1 and T1 deletions in lung cancer. *Mol Biol Rep* 2010; 37: 263-267.