

**T.C.**  
**MERSİN ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**MANGANEZ SÜPEROKSİD DİSMUTAZ (MnSOD) GENİNİN**  
**ALA-9VAL POLİMORFİZMİYLE MEME KANSERİ RİSKİ**  
**ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Nazan ERAS**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Yrd. Doç. Dr. Etem AKBAŞ**

**MERSİN – 2006**

**T.C.**  
**MERSİN ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**MANGANEZ SÜPEROKSİD DİSMUTAZ (MnSOD) GENİNİN**  
**ALA-9VAL POLİMORFİZMİYLE MEME KANSERİ RİSKİ**  
**ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Nazan ERAS

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Etem AKBAŞ

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
BAP –SBE TBG(NE) 2005-1 YL kodlu proje olarak desteklenmiştir.

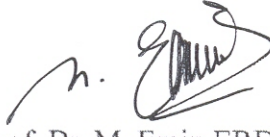
Tez No: 68


MERSİN – 2006

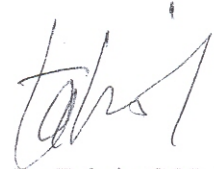
Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Manganez Süperoksit Dismutaz (MnSOD) Geninin Ala-9Val Polimorfizmiyle Meme Kanseri Riski Arasındaki İlişkinin Araştırılması” başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 06/07/ 2006

  
Prof. Dr. M. Emin ERDAL  
Jüri Başkanı

  
Yrd. Doç. Dr. Etem AKBAŞ  
Jüri Üyesi

  
Doç. Dr. Tahsin ÇOLAK  
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun..12..07...2006....tarih ve 2006/159 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

  
Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Murat ÇELİK  


## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, akademik açıdan yetişmemde büyük katkısı olan, danışman hocam Sn.Yrd. Doç. Dr. Etem AKBAŞ'a, tezimin hazırlanması boyunca gösterdiği titizlik, özveri ve bilimsel katkıdan dolayı teşekkür ederim.

Anabilim Dalı Başkanımız, Sn. Prof. Dr. M. Emin ERDAL'a, anabilim dalımızın diğer değerli hocaları; Sn. Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ'e ve Sn. Yrd. Doç. Dr. İ. Ömer BARLAS'a yüksek lisans eğitimim boyunca yaptıkları bilimsel ve akademik katkıdan dolayı teşekkür ederim.

Tezimde yer alan hasta gruplarının toplanması sırasındaki yardımlarından dolayı, ME.Ü. Tıp Fakültesi Onkoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn. Prof. Dr. Ertuğrul SEYREK'e, Genel Cerrahi Anabilim Dalı Sn. Doç. Dr. Tahsin ÇOLAK'a, tezimin istatistikleri ve bulguların değerlendirilmesi konusundaki yardımlarından dolayı Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn. Doç. Dr. Handan ANKARALI'ya teşekkür ederim. Tezimin moleküler analizi sırasındaki yardımlarından dolayı Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn. Doç. Dr. Muradiye NACAĞ'a teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim boyunca, her türlü desteğini esirgemeyen laboratuvarıda birlikte çalıştığım arkadaşlarıma, diğer anabilim dallarındaki çalışma arkadaşlarımla birlikte teknik ve idari personele teşekkürlerimi sunarım. Desteğini ve yardımını esirgemeyen Sn. Nevzat ORANSAL'a teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, maddi ve manevi destekleriyle, eğitimimin akademik yönde devam etmesini sağlayan aileme sonsuz teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

<b>KABUL ve ONAY</b> .....	iii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iv
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	v
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	viii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	ix
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	x
<b>ÖZET</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
<b>2.1. MEME KANSERİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1.1. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi.....	3
2.1.1.1. Meme Kanserinde Mortalite.....	3
2.1.1.2. Türkiye’de Kanser Mortalitesi.....	4
2.1.2. Meme Kanserinin Etyolojisi.....	5
2.1.2.1. Genetik ve Aile Öyküsü.....	5
2.1.2.2. Endokrin nedenler.....	8
2.1.2.2.1. Reprodüktif Faktörler.....	8
2.1.2.2.2. Hormonal Faktörler.....	9
2.1.2.3. Çevresel Faktörler.....	10
2.1.2.3.1. Sigara.....	10
2.1.2.3.2. Besinlerdeki Yağ Miktarı.....	11
2.1.2.3.3. Vücut Ağırlığı.....	11
2.1.2.3.4. Vitaminler.....	12
2.1.2.3.5. Alkol.....	13
2.1.2.4. Diğer Risk Faktörleri.....	13

2.1.3 Meme Kanserinin Morfolojisi.....	14
2.2. SÜPEROKSİD DİSMUTAZ (SOD).....	15
2.2.1. Cu/ZnSOD.....	15
2.2.2. ECSOD.....	15
2.2.3. MnSOD.....	16
2.3. MnSOD ve SERBEST RADİKALLER.....	21
2.4. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TEKNİĞİ (PCR) .....	23
2.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Oluşum Mekanizması.....	24
2.4.2. PCR'ın Temel Bileşenleri.....	25
2.4.2.1. Kalıp DNA.....	25
2.4.2.2. Polimerazlar.....	26
2.4.2.3. Primerler.....	27
2.4.2.4. Deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP).....	27
2.4.2.5. Tamponlar ve MgCl <sub>2</sub> .....	27
2.4.2.6. PCR Engelleyicileri (İnhibitörleri) ve Artırcıları.....	28
2.5. ELEKTROFOREZ.....	29
2.6. RESTRİKSİYON PARÇA UZUNLUK POLİMORFİZMLERİ (RFLP).....	31
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....</b>	<b>32</b>
3.1. HASTA ve KONTROL GRUPLARININ TOPLANMASI.....	32
3.2. KULLANILAN ARAÇ ve GEREÇLER.....	33
3.2.1. Kullanılan Cihazlar.....	33
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	33
3.2.3. Kullanılan Tampon Çözeltileri.....	34
3.2.3.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Çözeltiler.....	34
3.2.3.2. Elektroforez İçin Kullanılan Çözeltiler.....	35
3.3. DNA'NIN İZOLASYONU.....	35
3.3.1. DNA İzolasyonunun Yapılışı.....	36
3.4. MOLEKÜLER ANALİZ.....	37
3.4.1. PCR İşlemi.....	37
3.4.2. Elektroforez İşlemi.....	39
3.4.3. Genotiplendirme.....	39
3.5. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME.....	40

<b>4.BULGULAR</b> .....	41
4.1. MEME KANSERİNİN YAŞ GRUPLARINA GÖRE DAĞILIMI.....	43
4.2. MnSOD GENİ ALA-9VAL POLİMORFİZMİNE AİT ALLEL ve GENOTİP ORANLARIYLA MEME KANSERİ İLİŞKİSİ.....	43
4.2.1. MnSOD Geni Ala-9Val Polimorfizmine Ait Allellerin Kontrol Grubu ve Meme Kanserlilere Göre Dağılımı.....	43
4.2.2. MnSOD Geni Ala-9Val Polimorfizmine Ait Genotiplerin Kontrol Grubu ve Meme Kanserlilere Göre Dağılımı.....	44
4.3. MEME KANSERİ OLUŞUMUNDA ETKİLİ OLAN RİSK FAKTÖRLERİ.....	46
<b>5.TARTIŞMA</b> .....	50
<b>6.SONUÇ ve ÖNERİLER</b> .....	57
<b>7.KAYNAKLAR</b> .....	59
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	65

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Manganez Süperoksid Dismutaz geninin şematik görünümü.....	16
Şekil 2.2. Manganez Süperoksid Dismutaz geninin promotor bölgesi.....	16
Şekil 2.3. MnSOD'ın alt ünitesinin zincir yapısı.....	17
Şekil 2.4. MnSOD'ın tetramer yapısı.....	18
Şekil 2.5. Mitokondri içzarında elektron taşıma zinciri.....	22
Şekil 4.1. MnSOD Ala-9Val polimorfizmine ait DNA fragmentlerinin RFLP öncesi... görüntüsü.....	42
Şekil 4.2. MnSOD Ala-9Val polimorfizmine ait genotiplerin RFLP sonrası görüntüsü..	42



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> Kadın ve erkeklerde en sık karşılaşılan kanser türleri.....	4
<b>Çizelge 2.2.</b> Serbest radikallerin oluşumuna neden olan ekzojen kaynaklar.....	21
<b>Çizelge 4.1.</b> MnSOD geni Ala-9Val polimorfizminin allel frekansları.....	44
<b>Çizelge 4.2.</b> MnSOD geni Ala-9Val polimorfizminin genotip frekansları.....	44
<b>Çizelge 4.3.</b> Premenopozal ve Postmenopozal kadınlarda MnSOD geni Ala-9Val polimorfizminin allel ve genotip oranlarının Kontrol Grubu ve Meme Kanserlilerde dağılımı.....	45
<b>Çizelge 4.4.</b> Meme kanserinde rol oynadığı düşünülen risk faktörlerinin Kontrol ve Meme Kanserli Gruplarına göre değerlendirilmesi.....	47
<b>Çizelge 4.5.</b> Meme kanserinde rol oynadığı düşünülen risk faktörlerinin Kontrol Grubu ve Meme Kanserlilerde Menopoz durumuna göre dağılımı.....	49

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Ala</b>	Alanin
<b><math>\alpha</math></b>	Alfa
<b>A<sup>0</sup></b>	Angström
<b>AP-2</b>	Aktivatör Protein-2
<b>bç</b>	Baz çifti
<b>BMI</b>	Beden kitle indeksi (“Body mass index”)
<b><math>\beta</math></b>	Beta
<b>BRCA</b>	Meme kanseri yatkınlık geni (“Breast cancer susceptibility gene”)
<b>C</b>	Sitozin
<b>cDNA</b>	Komplementer DNA
<b>COMT</b>	Katekol-O-metiltransferaz
<b>Cu</b>	Bakır
<b>Cu/ZnSOD</b>	Bakır/Çinko Süperoksit Dismutaz
<b>CYP1A1</b>	Sitokrom P4501A1
<b>CYP19</b>	Sitokrom P45019
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>DMSO</b>	Dimetilsülfoksit
<b>dATP</b>	Deoksiadenozin trifosfat
<b>dCTP</b>	Deoksisitidin trifosfat
<b>dGTP</b>	Deoksiguanozin trifosfat
<b>dNTP</b>	Deoksiribonükleozid trifosfat
<b>dTTP</b>	Deoksitimidin trifosfat
<b>ECSOD</b>	Ekstrasellüler Süperoksit Dismutaz
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraasetik asit
<b>EGF</b>	Epidermal büyüme faktörü (“Epidermal growth factor”)
<b>ER</b>	Östrojen reseptörü (“Estrogen receptor”)
<b>FAD</b>	Flavin adenin dinükleotid
<b>FMN</b>	Flavin mononükleotid
<b>G</b>	Guanin
<b>G<sub>0</sub> Fazı</b>	Bölünmeyen hücrelerdeki faz
<b>G<sub>1</sub> Fazı</b>	Sentez öncesi faz
<b>GDP</b>	Guanozin difosfat
<b>GSH</b>	Glutatyon
<b>GST</b>	Glutatyon S-Transferaz
<b>HAA</b>	Heterosiklik aromatik aminler
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen peroksit
<b>HER</b>	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü (“Human epidermal growth factor receptor”)
<b>HRT</b>	Hormon replasman tedavisi
<b>IL-1</b>	İnterlökin-1
<b>İle</b>	İzolösin
<b>Kb</b>	Kilo baz
<b>KCl</b>	Potasyum klorür
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LDL</b>	Düşük dansiteli lipoprotein (“Low density lipoprotein”)

<b>MDA</b>	Malondialdehit
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnezyum klorür
<b>µg</b>	Mikrogram
<b>µl</b>	Microlitre
<b>mg</b>	Miligram
<b>ml</b>	Mililitre
<b>Mm</b>	Milimol
<b>Mn</b>	Manganez
<b>MnSOD</b>	Manganez Süperoksid Dismutaz
<b>NaCl</b>	Sodyum klorür
<b>NaClO<sub>4</sub></b>	Sodyum perklorat
<b>NAD</b>	Nikotiamid adenin dinükleotid
<b>NADP</b>	Nikotiamid adenin dinükleotid fosfat
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>	Sodyum-2-etilendiamintetraasetik asit
<b>NAT</b>	N-Asetil transferaz
<b>NF-1</b>	Nükleer faktör-1
<b>NF-κB</b>	Nükleer faktör kappa
<b>nL</b>	Nanolitre
<b>NO</b>	Nitrik oksit
<b>O<sup>-</sup><sub>2</sub></b>	Süperoksit radikal
<b>OH</b>	Hidroksil radikali
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroksinitrit radikali
<b>PAH</b>	Polisiklik aromatik hidrokarbon
<b>PCB</b>	Poli klorinat bifenil
<b>PCR</b>	Polimeraz Zincir Tepkimesi
<b>PR</b>	Progesteron reseptörü (“Progesterone receptor”)
<b>pRb</b>	Rb gen ürünü
<b>RE</b>	Restriksiyon Endonükleazı
<b>RFLP</b>	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>ROS</b>	Serbest oksijen türleri
<b>rpm</b>	Dakikadaki devir sayısı
<b>RT-PCR</b>	Geri Transkripsiyon Polimeraz Zincir Tepkimesi
<b>S fazı</b>	Sentez fazı
<b>SDS</b>	Sodyum dodesil sülfat
<b>SP</b>	Selektif promotör faktör
<b>T</b>	Timin
<b>TBE</b>	Tris-Borat-EDTA
<b>TE</b>	Tris-Etilendiamintetraasetik asit
<b>Thr</b>	Threonin
<b>TNFα</b>	Tümör Nekroz Faktörα
<b>Tris-HCl</b>	Tris-Hidroklorid
<b>UV</b>	Ultraviyole
<b>Val</b>	Valin
<b>XME</b>	Ksenobiyotik metabolizma enzimi
<b>Zn</b>	Çinko
<b>ZnSOD</b>	Çinko Süperoksid Dismutaz
<b>8-OH-dG</b>	8-Hidroksi-deoksi Guanosine

## ÖZET

### **Manganez Süperoksid Dismutaz (MnSOD) Geninin Ala-9Val Polimorfizmiyle Meme Kanseri Riski Arasındaki İlişkinin Araştırılması**

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında görülen en yaygın kanser türüdür. 40-44 yaş arasında kadınlarda kansere bağlı ölümlerde birinci sırada yer almaktadır. Etiyolojisinde; genetik faktörler, endokrin nedenler ve çevresel faktörler rol oynamaktadır.

Bir tümör süpresör gen gibi fonksiyon gösteren Manganez Süperoksid Dismutaz (MnSOD) geni kromozom 6q25.3'de lokalizedir. SOD2 adıyla da bilinen MnSOD geni 5 ekson ve 4 introndan oluşur. MnSOD geni insanlarda polimorfiktir. Bu polimorfizmde Timinin Sitozine değişikliği sonucu Valin amino asidi Alanine aminoasidine dönüşür. Serbest radikallerden gelen zarara karşı koruyucu hücrelerde kritik bir rol oynayan MnSOD'daki bu dönüşümün meme kanserine yakalanma riskini arttırdığı şeklinde görüşler bulunmaktadır.

Bu çalışmada MnSOD geninin Ala-9Val polimorfizminin meme kanseri gelişiminde risk faktörü olup olmadığını araştırmak amaçlandı. 104 kontrol ve 83 meme kanserli olmak üzere toplam 187 bireyden alınan kanlardan DNA izolasyonu yapıldıktan sonra genotipler PCR ve RFLP yöntemi ile belirlendi. Ala-9Val polimorfizmi için T ve C allel frekansları genel olarak kontrol grubu ve meme kanserli grupta fark göstermedi. Premenopozal ve postmenopozal alt grupta da meme kanserine yakalanma riskini etkilemediği saptandı. Genotip oranlarıyla meme kanseri gelişimi riski arasındaki ilişki incelendi. TT genotipinin artışı, TC genotipinin düşmesinin, meme kanserine yakalanma riskinin artışından sorumlu olduğu sonucuna varıldı. Göğüs kanserinde etkili olduğu düşünülen risk faktörlerinden aile öyküsünde meme kanserli yakını olmanın meme kanserine yakalanmada bir risk faktörü olduğu belirlendi.

**Anahtar Sözcükler; Manganez Süperoksid Dismutaz (MnSOD) Geni, Meme Kanseri, Genetik Polimorfizm**

## **ABSTRACT**

### **The Relationship Between The Risk of Breast Cancer and The Ala-9Val Polymorphism of Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) Gene**

The breast cancer is a kind of cancer which is seen the most widespread among the women in the world. Breast cancer is the first death reason which depend on cancer among the 40-45 aged women. Genetic factors, endocrine reasons and environmental factors have a role in its etiology.

MnSOD gene which functions as a tumor supressor is located in chromosome 6q25.3. MnSOD gene which is also known as SOD2 is formed of 5 exon and 4 intron. MnSOD gene is polymorphic in human beings. In this polymorphism, Valin aminoacid is transformed into Alanine aminoacid as a result of alteration of timin into sitozin. There are opinions that the transformation in MnSOD, which has a critical role in protective cells against the damage that comes from free radicals, increases the risk of getting the breast cancer.

In this study, it was aimed to investigate whether Ala-9Val polymorphism of MnSOD gene is a risk factor in the development of breast cancer. Genotypes were determined with PCR and RFLP methods after DNA had been isolated from the blood samples which were collected from total 187 people (104 control and 83 breast cancer patients). T and C allele frequency for Ala-9Val polymorphism didn't show difference in the control group and breast cancer group in general. It was determined that in premenopausal and postmenopausal subgroups, T and C allele frequency didn't affect the risk of getting breast cancer. The relation between the rates of genotype and the risk of breast cancer development was investigated. Increase in TT genotype and decrease in TC genotype have been concluded responsible for increased risk of getting the breast cancer. It is determined that among the putative risk factors, family history of breast cancer is one of the risk factors in getting the breast cancer.

**Key words: Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) Gene, Breast Cancer, Genetic Polymorphism**

# 1. GİRİŞ

Meme kanseri kadınlar arasında en sık görülen malign tümör olup kadınlardaki kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır (1). Meme kanseri kadınlarda sık görülmekle birlikte, seyrek oranda da erkeklerde görülür. Ancak görülme sıklığı kadınlardaki oranının %1'i kadardır (2). Bu lezyonlar genellikle palpe edilebilir. Bazen ağrılı nodül ya da kitleler şeklindedir. Bunların çoğu masum olmakla birlikte, 1986 yılında yerini akciğer kanseri alana kadar, meme kanseri ABD'de kadınlarda kanser ölümlerinin önde gelen nedeni olmuştur (3).

Meme kanserinin oluşumundan bir çok mekanizma sorumlu tutulmuştur. Meme kanserinin başlamasına birikmiş genetik hasarlar sonucunda meydana gelen değişikliklerin neden olduğu ve buna bağlı olarak da bu değişikliklerin proto-onkogen aktivasyonu veya tümör supressör genlerin inaktivasyonuna neden olduğuna inanılmaktadır. Bunu sırasıyla kontrolsüz hücresel proliferasyon ve/veya normal olmayan programlanmış hücre ölümleri yani apoptozis izler (4).

Çeşitli hücrelerde mitojenik olduğu için kanserin etyolojisinde reaktif oksijen türlerinin rolü de bulunmaktadır. Östrojen metabolizmasında üretilen semiquinonlar moleküler oksijenle etkileşerek, Serbest Oksijen Türlerini (Reactive Oxygen Species, ROS) oluşturabilirler. Ayrıca ROS; poliansature yağ asitleri, etanol ve sigara dumanı metabolizması ile de oluşur (4, 5). Toksik ajanlara maruz kalmasına bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin fazla oluşumu veya savunma mekanizmalarında oluşabilecek yetersizlikler hücre membranları, DNA ve proteinlere oksidatif stres hasarı verir (6).

Süperoksid dismutazlar (SOD) bir metalloenzim ailesidir. Metalloenzimler süperoksid anyonlarını ( $O_2^-$ ) hidrojen peroksid ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijen ( $O_2$ )'e çevirirler. Bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanan serbest radikallerin neden olduğu zararlardan hücreleri korurlar (7, 8). Aktif bölgede bulunan metallere bağlı intrasellüler iki tür SOD bildirilmiştir: Bakır ve çinko içeren SOD (Cu-SOD ve Zn-SOD=SOD1, sitoplazmik) ve manganez içeren SOD (Mn-SOD=SOD2, mitokondrial). Diğer Cu ve Zn içeren form (EC-SOD, SOD3) ise ekstrasellüler yerleşimlidir (9). Antioksidan defans enzimlerinin başında yer alan fonksiyonel

MnSOD'un oksidatif hasara karşı hücrel savunmada özel bir öneme sahip olduğu düşünölmektedir (10). MnSOD'deki bir polimorfizmin ise meme kanseri oluşum mekanizmasında rol oynayabileceği düşünölmektedir (11).

Hücrede aerobik solunum için gerekli oksijenin %90'dan fazlasının mitokondride tüketilmesi dolayısıyla, hücrede açığa çıkan süperoksid radikallerinin en yoğun açığa çıktığı yerlerin de buralar olduğuna işaret etmektedir. Mitokondrideki MnSOD oksidatif hasara karşı major koruma sağlar. Son zamanlarda çalışmalar MnSOD'un mitokondrideki hedef parçası içindeki polimorfizmi ile meme kanseri birlikteliği üzerine yoğunlaşmaktadır. Meme kanseri ile ilişkilendirilen sigara kullanımı, alkol ve aşırı yağ tüketimi içeren diyet etmenlerinin olası kanserojen etkisinin ROS yoluyla olabileceğinin ortaya konması, MnSOD gen polimorfizmlerinin bu konudaki önemini ortaya koymaktadır. Bu çalışmada yukarıdaki bilgiler kapsamında Mersin ili örneğinde MnSOD geni Ala-9Val polimorfizmi ile meme kanserine yakalanma riski arasındaki ilişki araştırılmıştır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. MEME KANSERİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER**

#### **2.1.1. Meme Kanserinin Epidemiyolojisi**

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında görülen en yaygın kanser türü olup, her yıl dünyada 1 milyon yeni olguya tanı konmaktadır. Kadınlarda görülen yeni kanser olgularının yaklaşık %20'sini oluşturur (12, 13). Yaşa bağlı en yüksek görülme oranı yılda her 100.000 kadında 86.3 ile Kuzey Amerika'da, en düşük oran ise 11.8 ile Çin'de görülmektedir. Meme kanseri sıklığı ülkeler arasında farklılık göstermekte ve bu fark özellikle menopoz sonrası kadınlarda daha belirgin şekilde ortaya çıkmaktadır (14). Meme kanseri 50 yaşına kadar yaş artışına paralel olarak dik eğimle yükseliş gösterirken daha sonra bu artış oranı azalır. Meme kanseri görülme sıklığı 1973'den itibaren dünyanın çeşitli ülkelerinde %1-2 oranında bir artış göstermektedir (15). Görülme sıklığındaki yıllık artış, düşük riskli toplumlarda daha belirgindir. Bu nedenle zaman içinde Batı ülkelerinde yaşayan kadınlarla, Doğu toplumlarındaki kadınlar arasındaki meme kanseri sıklığı farkının kapanacağı öngörülmektedir (1). İnsidans en büyük artış Kanada, ABD, İspanya ve İsveç'te (1960-1975 yılları arasında %1.8) ortaya çıkmıştır. Amerikalı bir kadında yaşam süresi boyunca meme kanseri gelişme olasılığı %12.5, meme kanserinden ölüm olasılığı %3.4 olarak hesaplanmıştır (16).

#### **2.1.1.1. Meme Kanserinde Mortalite**

1950'den beri bir yandan meme kanser insidansı artarken diğer yandan bu artışa paralel olarak mortalite oranı da artmış ve kadınlarda kansere bağlı ölümler %18'e ulaşmıştır. İnsanlarda genel olarak meme kanserine bağlı ölümler, akciğer kanseri ve kolorektal kanserlerden sonra üçüncü sırayı almaktadır. Kadınlarda kansere bağlı ölüm nedenleri ile yaş grupları arasındaki ilişki araştırıldığında 40-44 yaş arasında meme kanserinin birinci sırayı aldığı görülmektedir. Görülme sıklığı yanında mortalite de yaşa



bağlı olarak artmakta ve 80 yaşındaki 100.000 kadından 155'i meme kanserinden ölmektedir (1). Menopoz sonrası yıllarda mortalite, nedeni açıklanamamakla beraber; Japonya'da azalırken, Yugoslavya'da sabit kalmakta, ABD'de ise giderek artmaktadır (14). Göç eden insanlarda zaman içinde oluşan mortalite değişikliği meme kanseri oluşumunda çevresel etkenlerin ve yaşam tarzının önemli faktörler olduğu görüşünü desteklemektedir. ABD'de ve Hawai'de doğan veya yaşayan Japonlarda meme kanserine bağlı mortalitenin, Japonya'da doğan veya yaşayan Japonlara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (1). Meme kanserinde mortalite oranı 1973'den 1990'a kadar yaklaşık sadece %1.5 artışla sabit kalırken 1991'den itibaren meme kanseri mortalitesinde yıllık %1 azalma olmuştur. Bu iyileşme taramaya; tedaviye ve yaş, hormonal durum ve karsinogen teması gibi toplumdaki demografik değişikliklere bağlanabilir (14).

### 2.1.1.2. Türkiye'de Kanser Mortalitesi

Gelişmiş ülkelerde olduğu gibi Türkiye'de de 1990-1995 yılları arasında en sık ölüm nedeni kardiovasküler sistem olup ikinci sırada kanser yer almaktadır. Süreç içinde enfeksiyon hastalıkları daha iyi kontrol altına alınmıştır. Çünkü tanınan olanaklar ve toplumsal bilinç artmıştır. Sağlık Bakanlığı kanser kayıt verilerine göre; 1994'de 12.124 erkek ve 7976 kadın olmak üzere toplam 20.100 kanser olgusu bildirilmiştir. Erkeklerde en sık karşılaşılan üç kanser türü akciğer kanseri, lösemi- lenfoma ve mide kanseri iken kadınlarda ise meme kanseri, lösemi-lenfoma ve uterus kanseridir (Tablo 1).

**Çizelge 2.1.** Kadın ve erkeklerde en sık karşılaşılan kanser türleri (17)

ERKEK		KADIN	
Kanser Türü	Oran (%)	Kanser Türü	Oran (%)
Akciğer	27.7	Meme	14.9
Lösemi-lenfoma	13	Lösemi-Lenfoma	12.7
Mide	8.5	Uterus	10.8
Prostat	6.3	Akciğer	7.2
Larinks	6	Mide	6.8
Kolon-Rektum	4	Kolon-Rektum	3.7
Oral	3.1	Cilt	2.7
Cilt	2.6	Ağız	2.4
Özofagus	2.1		
Diğer	26.7	Diğer	35

1975-1978 ile 1994 yıllarına ait kanser istatistikleri kıyaslandığında; akciğer kanseri %14'den %28'e yükselirken, kadınlarda meme kanseri %11.5'den %14.5'e yükselmiştir. Kadınlarda meme kanseri mortalitesi 1980'den 1995 yılına kadar olan dönemde giderek artmış ve akciğer kanserinden sonra ikinci sıraya yükselmiştir (17).

### **2.1.2. Meme Kanserinin Etyolojisi**

Meme kanserinin etyolojisinde aydınlatılmamış pek çok nokta bulunmakla beraber; genetik ve çevresel koşulların rol oynadığı düşünülmektedir. Karsinojen metabolizması için biyosentetik yollarda ve steroid hormon metabolizmasında kişiler arasında önemli farklılıklar vardır (18). Bu farklılıklar ksenobiyotik metabolizmasındaki enzimleri (XME) kodlayan genlerdeki polimorfizmlerden kaynaklanmaktadır. XME gen polimorfizmleri; yaşamı boyunca östrojen, östrojen metabolitleri ve diğer karsinojenlerden etkilenen kadınların alt popülasyonunu belirleyebilir (19). Bu gibi değişiklikler reproduktif olaylar, hormon maruziyeti ve bununla beraber yaşam şekli ve çevresel risk faktörleri gibi diğer risk faktörlerinin de meme kanseri ile ilişkisini kısmi olarak açıklamaktadır (7).

#### **2.1.2.1. Genetik ve Aile Öyküsü**

Genetik faktörler meme kanserinin etyolojisinin yaklaşık dörtte birini oluşturmaktadır (20). İsveçli, Danimarkalı, Finlandiyalı mono ve dizogotik ikizler üzerinde yapılan bir çalışmada; genetik faktörler tüm meme kanserli olguların %27'sini açıklayabilmiştir (7). Macklin meme kanserli bir kişinin annesinde toplumdaki kadınlara göre meme kanseri gelişme olasılığının 2 kat fazla, kız kardeşinde ise 2.5 kat fazla olduğunu göstermiştir. Atipik hiperplazi saptanan kadınlarda meme kanseri oluşma riski %4.4 artarken atipik hiperplazi ile birlikte ailevi meme kanseri öyküsü olanlarda meme kanseri oluşma riski %9 artmıştır (1).

Meme kanserinin etyolojisinde; tek başına meme kanser riskini yükselten allelik varyantlı genler (yüksek penetranslı genler) ve tek başına kanser riskinde daha az etkili olan genler (düşük penetranslı genler) olmak üzere iki grup gen vardır. Yüksek

penetranslı genlerin hastalığa neden olan allelik varyantları genel popülasyonda beklenenden azdır. Popülasyonda bu genotiplerle açıklanabilecek meme kanserini oranı düşük penetranslı genlerden çok daha azdır (21).

BRCA1 (“Breast cancer susceptibility gene”-meme kanserine yakınlık geni), BRCA2 ve p53 (tümör baskılayıcı gen) yaygın olan yüksek penetranslı genler olup tümör supresör gen grubundandırlar. Çalışmış olduğumuz MnSOD geni de tümör süpresör gen grubu içinde yer almaktadır. Bu genlerin erken dönemde görülen meme kanserlerinin familyal grubunun aşağı yukarı yarısını kapsadığı tahmin edilmektedir. Bu genler hem hastalığın erken başlangıçlı olmasına, hem de mültifokal tümörlere yakınlığa neden olur (7). BRCA1 ve BRCA2 proteinleri genomik stabilitenin korunmasında, DNA zararlarına hücrel yanıtta, transkripsiyonel regülasyonda ve hücrel proliferasyonda rol oynar (22). BRCA1 geninin lokalizasyonu 17q12-21. şeklindedir ve otozomal dominant özellik gösterir. Bu gen kalıtsal meme kanserlerinin büyük bir kısmından (%42) sorumludur (7). Erken meme kanserlilerde BRCA1’de erken protein sonlanmasına neden olan bir mutasyon (1200 insA), bir yanlış anlam mutasyonu (2080A→G) ve gen dizi farklılaşması bulunmuştur. BRCA2 13q12-13 kromozom bölgesinde yer alır. BRCA2 genindeki mutasyonlar, kalıtsal kadın meme kanser vakalarının %32’sini ve erkeklerdeki meme kanserlerinin çoğunu açıklar. İki adet birinci derece akrabasında meme kanseri olanlarda erken protein sonlanmasına neden olan (6880 insG) ve (3034 delAAAC) BRCA2 mutasyonu saptanmıştır. Bu genlerin kalıtsal meme kanseri ile ilişkisini belirlemek amacıyla yapılan popülasyon genetiği çalışmalarında değişik toplumlarda BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının sıklıklarının önemli farklılıklar gösterdiği görülmüştür. Yapılan çalışmalarda BRCA1 mutasyon sıklığı İzlanda’da %9 iken Rusya’da %79 olarak bulunmuştur. Yine BRCA2 geni için de önemli farklılıklar saptanmıştır. Finlandiya’da %8, İzlanda’da %64 oranında mutasyon tespit edilmiştir (23).

p53 tümör süpresör geni 17. kromozomun p12-13.3 gen bölgelerinde bulunan ve hücrede proliferasyonu düzenleyen 53 KD’luk bir fosfoprotein kodlayan gendir. Bu protein hücrenin S fazına girmesini pRb fosforilasyonunu engelleyerek meydana getirirler. p53 geni, insanlarda gözlenen birçok kalıtsal ve sporadik form kanserde aktif olarak rol oynamaktadır. Bu gendeki mutasyonlar kanserde en sık rastlanan genetik değişikliklerdir. Mutasyonlar hücre proliferasyonundaki en önemli baskılayıcı

mekanizmayı ortadan kaldırırlar ve hücrede genetik bir instabilite oluştururlar. Bu olay tümör proliferasyonunun artmasına yol açar (3, 24). Hücre bölünmesini durduran ve DNA hasarının düzeltilmesini sağlayan genlerin transkripsiyonunu aktive eden bir transkripsiyon faktörü olmasının yanı sıra p53 onarılmayan DNA hasarlı hücrelerde de apoptozu sağlayan bir role sahiptir (25).

MnSOD içeren mitokondrial antioksidan enzim bir tümör süpresör geni gibi fonksiyon gösterir. Kanserli hücre bölgelerinde bulunan MnSOD ekspresyonu malignansinin gerilemesine yol açmaktadır. TNF ve hiperterminin sitotoksik etkilerine dirençli fenotipe neden olmaktadır. MnSOD overekspresyonu yapan hücrelerdeki bu fenotipik değişikliklerin altında yatan sinyal yollar, QP-1 ve NF- $\kappa$ B 'yi içeren birkaç redoks-duyarlı transkripsiyon faktörlerin aktivitesindeki değişimler incelenmiş olmasına rağmen tam olarak bilinmemektedir (26).

Endojen faktörler veya yaşam şekli ile birlikte hareket eden yaygın genler (düşük penetranslı genler) henüz tam olarak tanımlanmamıştır (27). Düşük penetranslı genler üzerindeki bilgilerimiz meme kanseri üzerine etkisi olduğu düşünülen biyokimyasal ve fizyolojik yollara dayanmaktadır. Substrata bağlı olarak enzimler bu yolda ya inaktif yada aktif role sahip olabilirler. Yapılan çok geniş çaplı çalışmalarda, meme kanserine ilişkin düşük penetranslı genlerin CYP, GST, NAT ve COMT'u kodladığı saptanmıştır (3, 7).

Meme kanserlerinin yaklaşık %30'unda meme epitelinde mutasyonlar sonucu protoonkogen overekspresyonu gözlenmektedir. Bunlar arasında en karakteristik olan HER-2 (Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü) protoonkogeninin overekspresyonudur. HER-2 geni epidermal büyüme faktör reseptör ailesinin (HER-1, HER2, HER3, HER4) bir üyesidir (3). HER-2 geni 17q12-q21 kromozom bölgesinde lokalizedir. Yaklaşık 3 kb uzunluğundadır ve 27 ekson içermektedir. HER-2 185 kd ağırlığında tirozin kinaz aktivitesi gösteren bir reseptör kodlar. Aşırı HER-2 ekspresyonu hücre yüzeyinde homodimer (HER2-HER2) ve heterodimer (HER2-HER1) oluşumu artışına yol açmaktadır (28). HER-2'nin oluşturduğu dimerler diğer aile üyelerinin birleşmesiyle ortaya çıkan dimerlerden daha aktiftir. Dimerler oluşuktan sonra; Ras/MAP Kinaz, PI-3K/Akt, JAK/STAT, PLC- $\gamma$ , src ve strese bağlı aktifleşen kinaz gibi değişik sinyal yollarının uyarılabildiği gösterilmiştir. Östrojen reseptörü negatif tümörlerde HER-2 ekspresyonu daha sık görülürken reseptör pozitif tümörlerde ekspresyonun daha ender

gözlenmesi HER-2 ile östrojen reseptörü arasında endokrin ve parakrin sinyallerin etkileşimi ile birbirini baskılayan bir çevrimin bulunduğunu düşündürmektedir (29).

### **2.1.2.2. Endokrin Nedenler**

**2.1.2.2.1. Reprodüktif Faktörler:** Son yapılan çalışmalar endojen hormon seviyesi ve meme kanserine yakalanma riski arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir (7, 30). Bu bağlamda en azından östron, östrodiol, östriol, androstenedion, testesteron, dihidroepiandrosteron, progesteron, seks hormonu bağlayan globulin ve prolaktin serum düzeylerinin önemli faktörler olduğu düşünülmektedir. Yaşam boyunca kadınlar; menarşta, ilk gebelik döneminde, çok sayıdaki gebelik ve menopoz çağını içeren bazı dönemlerde endojen seks hormonlarına maruz kalmaktadır. Çok erken dönemde başlayan düzenli menstrual siklus, menarştan sonraki birkaç yıl çok yüksek düzeydeki östrojen seviyesi sonucu meme epitelinin sürekli östrojene maruz kalması ile kadınlarda meme kanserine yakalanma riski artmaktadır (7). Genel olarak menarşın her bir yıl gecikmesi ile meme kanseri riskinin %20 azaldığı kabul edilmektedir. Ancak, meme kanseri riski yönünden menstruasyonun başlama yaşı yanında ilk düzenli (önceden tahmin edilebilen) menstruasyon yaşı da önemlidir (1).

Benzer şekilde, menopozun ileri yaşlara kadar sarkması ovulator siklusların sayısını arttırmakta ve bu da riskin artmasına neden olmaktadır (7). 45 yaşından önce menopoza giren kadınlarda meme kanseri riski, 55 yaşından sonra menopoza girenlerin yarısı kadardır. Menopoz yaşında her bir yıllık artış için meme kanserine yakalanma riski yaklaşık olarak %3 artmaktadır (1). Yüksek parite ve erken doğum yaşı gibi faktörlerin her ikisi de yaşam boyunca meme kanser insidansının düşük kalmasında etkilidir (7). İlk çocuğunu 20 yaşından önce yapma, ilk çocuğunu 30 yaşından sonra yapmaya göre meme kanserine yakalanma riskini yarı yarıya düşürmektedir. Paritenin koruyucu etkisi ve mekanizması tam olarak anlaşılmamakta ancak meme bezi hücrelerini erken dönemde tam olarak farklılaştırdığı ve onları karsinojenik transformasyonlara daha az duyarlı hale getirdiği düşünülmektedir (31). Ayrıca sürekli emzirme de meme kanserine yakalanma riskini azaltmaktadır (32). Uzun süren laktasyonların toplam ovulatuvar dönem sayısını azaltarak koruyucu etki yapması

beklenmektedir. Çin’de yapılan bir çalışmada toplam 5 yıllık bir emzirme süresinin meme kanseri riskini %30, 4-12 ay arasında emziren kadınlarda riski %11; iki yıl veya daha fazla emzirenlerde ise %25 oranında azalttığı gösterilmiştir (1). Östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) pozitif olanlar negatif olanlarla karşılaştırıldığında yukarıda bahsedilen hormonla ilişkili faktörlerin bu kişilerde daha etkili olduğunu göstermiştir (33, 34).

**2.1.2.2.2. Hormonal Faktörler:** Cinsiyet hormonları kadınlar arasında yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. Bu da onların güvenilirliğini arttırmaktadır. Genellikle, hormonların zararlı etkilerini ayrı ayrı çalışmak mümkün değildir. Çünkü bunların birçoğu ya kombinasyon şeklindedir ya da aynı hastada arka arkaya kullanılmaktadır. Örneğin; oral kontraseptif veya hormon replasman tedavisi (HRT) (7). Epidemiyolojik olarak yapılan 54 çalışmanın sonuçları toplu olarak analiz edildiğinde; oral kontraseptif kullanımı süresi artışıyla meme kanserine yakalanma riskini arttırdığı saptanmıştır. Premenopoz ve uzun süreli oral kontraseptif kullanmış kadınlarda rölatif risk bir meta analizde 1.5 bir değerinde ise 1.4 olarak bulunmuştur. Genellikle 35 yaş ve altındaki kadınlarda daha belirgin risk artışı gözlenmektedir. 45 yaş altındaki genç kadınlarda uzun süreli oral kontraseptif kullanımının etkisini araştıran yedi çalışmanın tümünde meme kanseri riskinin %3.1 arttığı hesaplanmıştır. Buna göre 10 yıl boyunca oral kontraseptif kullanan genç bir kadında hiç oral kontraseptif kullanmayan bir kadına göre meme kanseri oluşma riski %36 artmaktadır (1). Oral kontraseptiflerin kullanımının kesilmesinden sonraki 10 yıllık süreçte meme kanserine yakalanma riski üzerindeki etkisi ortadan kalkmaktadır.

Yapılan 51 çalışmanın analizi; HRT kullanan kadınlarda meme kanserine yakalanma riskinin azda olsa artığını göstermiştir (7). 5 yıl veya daha uzun süreli HRT kullanan kadınlarda riskte %35 oranında bir artış gözlenmiştir. Bu artış hormon kullanımına son vermeyi izleyen 5 yılda çoğunlukla ortadan kalkmaktadır. Geçmişte hormonlar özellikle östrojenlerden oluşmasına karşın günümüzde östrojen ve progesteron kombinasyonundan oluşmaktadır. Kombine kullanım, östrojenin tek başına kullanımına göre riski daha da arttırmaktadır (35). Östrojen–progestin kullanımıyla ilgili (5 yıllık kullanım için) kontrollü olarak yapılan çalışmalarda meme kanserinde

%26'lık bir artış saptanmıştır (36). Daha önce HRT kullanan kadınlarda kanserin hiç kullanmayanlara göre daha az agresif olma eğiliminde olduğu gösterilmiştir, ancak bununla çelişkili olan sonuçlarda vardır. HRT kullanıcılarında mortalite oranının düşük olduğu fakat uzun süreli kullanımlarda sağlanan yararın azaldığı gösterilmiştir (7).

Böcek zehirleri (pestisid), boyalar, kirleticiler ve gıda koruyucularını içeren, östrojene benzer etkileri olan kseno-östrojenlerin meme kanserinin etyolojisinde önemli bir role sahip olabileceği gösterilmiştir. Örneğin; PCB (polychlorinate biphenyl)'nin katekol metabolizmasının karsinojenik östrojen metabolitlerini inhibe ederek östrojen metabolizmasını değiştirdiği gösterilmiştir (37).

### 2.1.2.3. Çevresel Faktörler

**2.1.2.3.1. Sigara:** Sigara ve meme kanserine yatkınlık üzerine yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Meme kanserinin gelişme riskinin sigara içiciliği ile ilişkisinin zayıf olduğu bilinmektedir. İstatistiksel olarak önemli etkileriyse; erken yaşlarda başlayanlarda, aşırı kullananlarda ve pasif içicilerde gözlenmiştir. Öte yandan tütün dumanında bulunan bazı ajanlar antiöstrojenik etkilere sahiptirler. Örneğin; nikotinin CYP19 enzimlerini inhibe ettiği gösterilmiştir (7). Bu nedenle sigara kullananlarda menopoz kullanmayanlara göre daha erken gerçekleşmektedir.

Sigara katranı 3000'den fazla bileşik içermektedir. Bunların 30 tanesinin karsinojen olduğu bilinmektedir. Sigara dumanındaki en önemli karsinojenler; polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), aril aminler, heterosiklik aromatik aminler (HAA) ve N-nitrosaminlerdir (7, 38). Sigara dumanı ile vücuda alınan PAH'lar ilk evrede: Sitokrom P4501A1 (CYP1A1), ikinci evrede ise Glutasyon S transferaz (GST) enzimleri tarafından detoksifiye edilerek suda çözünebilir türevlerine dönüştürülür. PAH'lar meme hücreleri için mutajenik etkiye sahiptirler ve lipofilik bileşikleri memeyi de içeren adipoz dokularda depo edilir. Bu nedenle, PAH-DNA hasarı normal meme dokusunda meme kanserli dokuda belirlenmiştir. Aromatik aminler, N-asetiltransferaz (NAT) enzimi ile N asetilasyon katalizasyonu yoluyla detoksifiye olurlar. NAT yoluyla O-asetilasyonu bunların aktivasyonu ile sonuçlanır (7, 39).

Sigara dumanı oksijen radikalleri bakımından zengindir. Sigara dumanı MnSOD gibi bazı antioksidan enzimleri indükler. Sigara dumanındaki semiquinon radikalleri

oksijene indirgendiğinde süperoksidler oluşur. Bu şekilde hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri (OH)'nin üretimi stimüle olur (40, 41). Hidroksil radikalleri reaktif olduklarından DNA'da endojen oksidasyon oluşması için başlıca adaylardır (42). Maternal PAH'e maruz kalma, düşük doğum ağırlığı ve erken doğum riskini artırmaktadır. Annenin çevredeki tütün dumanından etkilenmesiyle neonatal üriner 8-OH-dG derişimi artarak, hücrel oksidatif stres yoluyla kötü hamilelik sonucunun belirleyicisi olur (6).

**2.1.2.3.2. Besinlerdeki Yağ Miktarı:** İnsanların aldığı günlük besinler çok çeşitli doğal karsinojenler ve anti-karsinojenleri içerir (43). Bu bileşiklerin bir çoğu DNA hasarına neden olan oksijen radikalleri oluşumuna neden olur. Bu nedenle aşırı yağ kullanımı özellikle poliansature edilmiş yağ asitlerinin alınımı meme kanser riskini artırmaktadır (7). Eritrositlerde, kolesterolle beslenme, malondialdehit (MDA) ve katalaz düzeylerini değiştirmemiş, SOD ise artmıştır. Torasik aorta dokusunda kolesterolle beslenen tavşanlarda katalaz değişmezken SOD aktivitesi artmıştır (44). Geniş bir grubun ele alınarak izlendiği bir çalışmada ise meme kanseri gelişen kadınların beslenme şekliyle aynı gruptaki meme kanseri gelişmeyen kadınların beslenme biçimi kıyaslandığında; yağ alımı ile meme kanseri arasında ilişki bulunamamıştır (1).

**2.1.2.3.3. Vücut Ağırlığı:** Obezite postmenopozal kadınlarda hem aşırı endojen östrojen seviyesi hem de meme kanserine yakalanma riski ile ilişkilidir. Obez olan postmenopozal kadınlarda sirküle olan östrojenin büyük çoğunluğu adipoz dokularda androjenin östrojene dönüşümüyle oluşur (45). Bu durum sitokrom P45019(CYP19)'la katalize olan in situ aromatisasyonun dokularda östradiol seviyesini, sirkülasyon yoluyla üretilen östrojene göre daha etkili bir şekilde arttırmasıyla gerçekleşmektedir. Buna zıt olan bir ilişki obez ve premenopozal meme kanserliler arasında gösterilmiştir. Bu kadınlarda anovulasyon seviyesinin yüksek olması daha düşük östrojen miktarıyla sonuçlanmaktadır.



Fiziksel aktivitenin meme kanserine yakalanma riskini azalttığı belirlenmiştir. Fiziksel aktivitenin düzenli ovulator siklusu azaltan ve metillenmiş katekol östrojen miktarını arttıran bir mekanizmayı içerdiği gösterilmiştir (7).

**2.1.2.3.4. Vitaminler:** Antioksidanlar, hem direkt, hem de dolaylı olarak ksenobiyotiklerin, ilaçların, karsinojenlerin ve toksik radikallerin istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir (8). Doğal antioksidan kaynağı olan vitamin ve sebzelerin kullanımının meme kanser riskini azalttığı gösterilmiştir (7). Askorbik asit,  $\alpha$ -tokoferol ve karotenoidleri içeren antioksidan besinlerin yüksek tüketimi ile ters ilişkilendirilmesi kadar, meyve ve sebze alımı ile meme kanseri riski arasındaki ilişkiyi destekleyen nispeten tutarlı bilgiler de vardır (46, 47). Bu besinlerin prooksidan hücre aktivitesi ve antioksidan savunmaları arasındaki dengeyi değiştirerek oksidatif stres ve ROS üretimini etkilediğine dair bir hipotez vardır. ROS'lar normal hücre solunumu, hücre stresi ve inflamasyonu sonucu üretilir (48). Toksik ajanlardan etkilenim veya patolojik süreçte savunma mekanizmasındaki yetersizlik ROS'un yoğun üretimine neden olduğundan oksidatif stres oluşabilir. Lipit peroksidasyon, protein değişikliği, membran hasarı ve mitokondrial hasar ve de kırılmalarına kadar varan DNA hasarı ile sonuçlanır (11). Karotenoidlerden A vitamini hücre farklılaşmasında regülatör olarak rol oynadığı için hücrelerin malign forma geçişini önleyebilir. Retinol in vitro koşullarda insan meme kanseri hücrelerinin büyümesini önlemiştir (1). Diyetle alınan  $\alpha$ -tokoferol lipid peroksidasyona karşı korur ve steroidlerin neden olduğu karaciğer hücre hasarı ve tümör gelişimine karşı kullanılabilir. Ancak; Vitamin C ve E'nin artmış lipid peroksidasyon ve serbest radikallere karşı savunmada yetersiz kaldığı belirtilmiştir (8).

Riboflavin, niasin suda eriyen vitaminlerdir. Flavin mononükleotid (FMN) gibi aktif koenzim formlarında ve flavin adenin dinükleotid (FAD) halinde hazır bulunan riboflavin, solunum zinciri yoluyla enerji üretiminde ve sayısız metabolik yolda oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarına katılır (49). Niasin ve onun kofaktörü olan nikotiamid adenin dinükleotid (NAD) ve nikotiamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) doku solunumunu kapsayan oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarının bir çeşidi olarak önemlidir. Nikotinamidin koruyucusu etkisi bir serbest radikal artıkcısı olmasından ve poli ADP-riboz sentetazın inhibisyonundaki etkisinden ya da hücredeki NAD düzeyinin yüksekliğinden kaynaklanabilir (50). Tamoksifenin antiproliferatif etkileri protein

kinazın inhibisyonuyla ve DNA sentezinde rol oynayan protein olan kalmodulinin bağlanması ile ilgili olabilir (49). Ek olarak, Tamoksifen programlanmış hücre ölümüne doğrudan neden olabilir (51).

**2.1.2.3.5. Alkol:** Günlük olarak alınan bir ile beş bardak arasında alkolün meme kanserine yakalanma riskini arttırdığı gösterilmiştir (7). Alkolik kadınlarda yapılan çalışmada ise meme kanserine yakalanma riskinin yalnızca %15 oranında arttığı gösterilmiştir (52). Alkol kullanımının özellikle yetişkinlik çağının erken dönemlerinde zararlı olduğu gösterilmiştir (53). Alkolün karsinojenik etkisinin mekanizması tam anlaşılmamıştır. Ancak alkol kullanan kadınlarda östrojen seviyesinin arttığını gösteren görüşler vardır. Bir diğer görüş; alkol ile indüklenen ROS'un oluşması ve adduct oluşumunun artmasını, bu nedenle detoksifikasyon enzimlerinin protein ekspresyonlarındaki azalmaları kapsamaktadır (7).

#### **2.1.2.4. Diğer Risk Faktörleri**

İyonizan radyasyonun kadın uçuş görevlilerinde, hemşirelerde ve kimyagerler arasında meme kanser riskini arttırdığı gösterilmiştir (7, 54). Elektromagnetik alanların melatonin üretimini baskılayarak meme kanser riskini etkilediğine dair güçlü olmayan kanıtlar mevcuttur. Yüksek sosyo-ekonomik durum ve meme kanseri arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur (55). Adolesan ve erişkin dönemde yapılan egzersizlerin meme kanseri riski üzerine etkisini araştıran bir çalışmada egzersizin 40 yaşın altındaki kadınlarda meme kanseri riskini azalttığı gösterilmiş ve haftada 4 saat veya daha fazla egzersiz yapan kadınlarda kanser riskinin hiç egzersiz yapmayanlara göre %60 daha az olduğu bildirilmiştir (1).

### 2.1.3. Meme Kanserinin Morfolojisi

Meme kanseri sol memede sağ memeye göre daha sık görülür. Hastaların %4'nde iki taraflı birincil tümörler vardır ya da sonradan ikinci bir primer tümör gelişir. Meme içinde tümör en sık üst dış kadranda yerleşir. Çoğu kanserler (%90) duktal epitelinden, geri kalan küçük bir kısmı ise lobül epitelinden köken alır. Duktal ve lobüler kanserlerin her ikisi de ayrıca sınırlayıcı bazal membranı penetre etmeyenler (infiltrate olmayan) ve penetre edenler (infiltrate olan) olmak üzere ikiye ayrılırlar.

#### A. İnfiltre olmayan

1. İnaduktal karsinom (komedokarsinom)
2. Paget hastalığıında intraduktal karsinom
3. Lobüler karsinoma insitu

#### B. İnfiltre olan (invaziv) duktal karsinom

- 1a. Skir karsinom
- 1b. Paget hastalığı içeren invaziv duktal karsinom
2. İnvaziv lobüler karsinom
3. Medüller karsinom
4. Kolloid (müsinöz) karsinom
5. Tubuler karsinom
6. Diğer nadir tipler

Bunlar içinde invaziv duktal karsinom en sık görülenidir. Çoğu kez yoğun fibröz bir stroma içerdiğinden, skir karsinom olarak da adlandırılır (3).

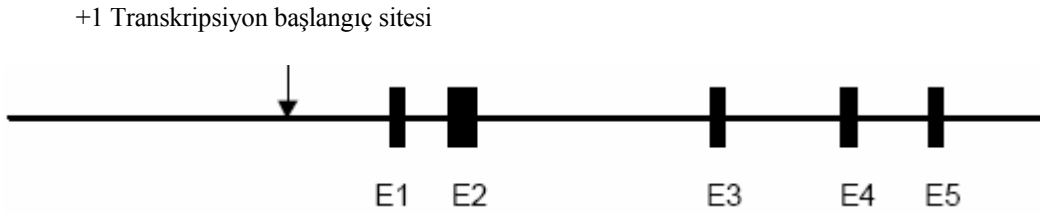
## 2.2. SÜPEROKSİD DİSMUTAZ (SOD)

Antioksidan defans enzimlerinin başında yer alan süperoksit dismutaz (SOD) serbest radikallerden gelen zarara karşı koruyucu hücrelerde kritik bir rol oynar. SOD üç izoform içerir; intrasellüler SOD (Cu/ZnSOD), ekstrasellüler SOD (ECSOD) ve mitokondrial SOD (MnSOD) (56).

**2.2.1. Cu/ZnSOD:** SOD1 adıyla da bilinir. CuSOD ve ZnSOD olmak üzere iki çeşittir. Moleküler ağırlığı 32000 olan bir homodimerdir ve sitozolde sentezlenir. Cu/ZnSOD ayrıca nükleus ve peroksizomlarda da bulunur (57). SOD1 geni kromozom 21q22.1'de lokalizedir ve beş ekson içerir (58) Sağlıklı insan akciğerinde bronş epitelinde bulunur. Ayrıca; karaciğer, eritrosit, beyin ve nöronda yüksek seviyelerde bulunur (57).

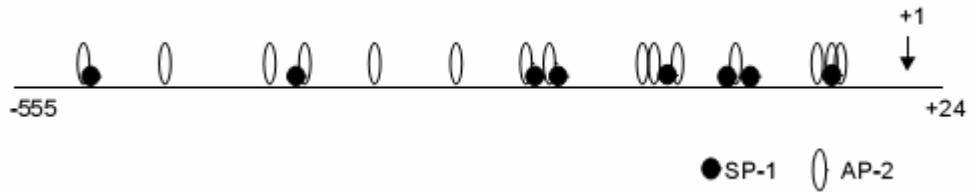
**2.2.2. ECSOD:** SOD3 adıyla da bilinen ECSOD bir bakır ve çinko içeren homotetramerik glikoproteindir. Ekstrasellüler matrikste (plazma, lenf ve sinovya) bulunur. ECSOD geni kromozom 4p15.3-15.1'de lokalizedir ve üç ekson içerir. ECSOD, TNF $\alpha$  benzeri sitokinler ile aktive edilir. Direk antioksidan stres ECSOD'i MnSOD gibi etkilemez. ECSOD sağlıklı akciğerde, pulmoner damarlarda ve hava yolunda bulunur. Pulmoner hücre tiplerinden bronşial epitel, alveolar makrofaj ve endotel hücrelerinde bulunur. ECSOD sistemik arterlerde de bulunmaktadır. Kansere hücrelerindeki rolü ve regülasyonu bilinmemektedir (57, 58).

**2.2.3. MnSOD:** Kromozom 6q25.3’de lokalize olan, SOD2 adıyla da bilinen MnSOD geni 5 ekson ve 4 introndan oluşur (58, 59, 60).



**Şekil 2.1.** Manganez Süperoksid Dismutaz geninin şematik görünümü (59)

MnSOD geninin 5’ promotor bölgesi TATA veya CAAT kutusu olmaksızın, %78’i GC’den oluşur. MnSOD’ın promotor bölgesi multipl SP-1 ve AP-2 bağlayıcı bölgeden oluşur. SP-1 ve AP-2 bölgeleri üst üste gelir (Şekil 2.2.).



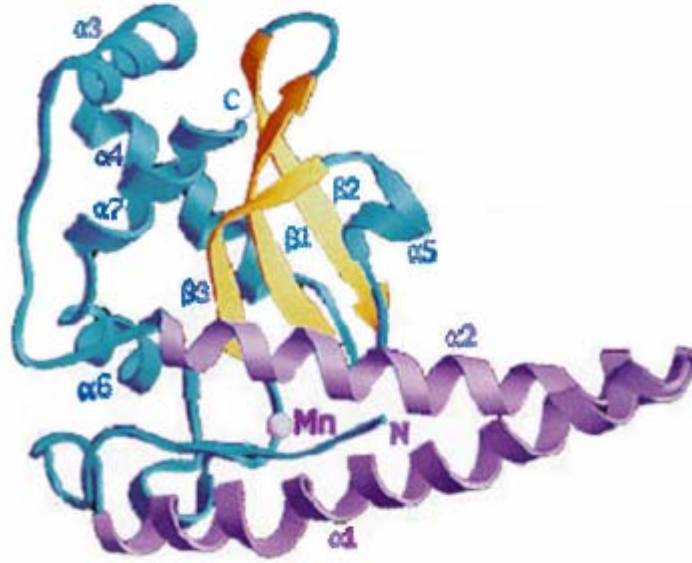
**Şekil 2.2.** Manganez Süperoksid Dismutaz geninin promotor bölgesi (59)

SP-1 ve AP-2 bağlayıcı bölgeleri, DNAaz I footprinting analizleri ile promotor bölge(-555/+24)’de saptanmıştır. SP-1 transkripsiyon oluşumunda pozitif rol oynarken AP-2 negatif rol oynar. AP-2 proteinleri promotor aktiviteyi baskılar. Promotordeki mutasyonlar bazı kanser hücrelerinde insan MnSOD geninin ekspresyonunun azaltılmasına neden olabilir. MnSOD geni oksidatif stresin neden olduğu çeşitli ajanlar ve koşullar ile aşırı aktive olur (59).

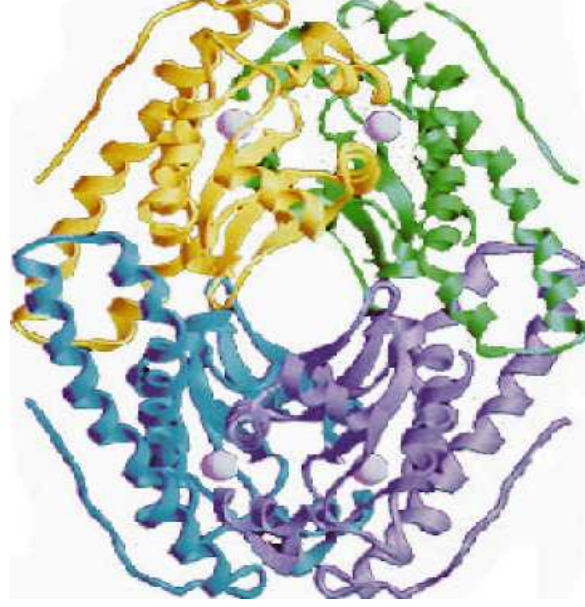
MnSOD geninin promotor bölgesinde Sp3, AML-1a, MZF1, C/EBP-1, -2, -X, NF-κB ve NF-1 gibi transkripsiyon faktörleri için de bağlayıcı alanlar mevcuttur (51, 59, 61, 62).

İntron 2'de 1741-2083 arasındaki bir bölge MnSOD geninin TNF ve IL-1 ile indüksiyonu ile ilgilidir (61). MnSOD indüksiyonunda rol oynayan ROS; NF-kB, AP-1, AP-2 ve SP-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin MnSOD geni üzerinde bulunan cis elementlerine bağlanmasını etkilemektedir (63).

Ökaryotik ve prokaryotik enzimlerden MnSOD'un yapısı homologdur. İnsan MnSOD proteini 96 kDa'lık bir homotetramer yapıdadır (64). İnsan MnSOD proteininde her bir alt ünite 198 aminoasit içerir (65). Her alt ünitenin bölümlerini N-terminal ve C-terminal bölge oluşturur. N-terminal bölge: N-terminal loop,  $\alpha_1$  ve  $\alpha_2$  sarmaldan oluşur. C-terminal bölge ise beş  $\alpha$ -sarmal ( $\alpha_3$ - $\alpha_7$ ) ve üç  $\beta$ -ipliğinden ( $\beta_1$ - $\beta_3$ ) oluşur (64).



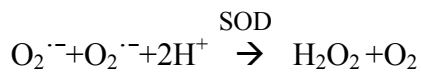
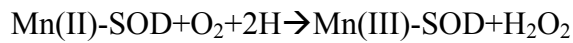
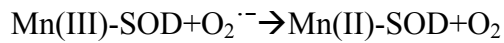
Şekil 2.3. MnSOD'ın alt ünitesinin zincir yapısı (66)



Şekil 2.4. MnSOD'ın tetramer yapısı (66)

Manganez aktif bölgesi  $\beta$  düz yapısal elementler ve helikal kıvrımlı yapı arasında lokalizedir. Dinlenme halinde, aktif bölge metal iyonu +3 değerliktedir (64). Birçok organizma Mn yerine MnSOD'u kullanır. Bunun olası nedenleri:

- 1) MnSOD dismutaz süperoksidleri mangandan daha etkilidir
- 2) Kompleks yapılı SOD proteini, hücredeki diğer elementlere manganın bağlanmasını engeller.
- 3) Fizyolojik koşullar altında süperoksidler Mn(II) ve Mn (III)'e okside olur. Fakat Mn(III) diğer hücrel redüktantlar tarafından özel olarak azaltılırken Mn(II)SOD ve Mn(III)SOD süperoksidlere çevrilir.



Hücrelerin manganı yalnızca MnSOD proteinlerinin aktif bölgelerinin katalizinde değil ayrıca MnSOD ekspresyonunun düzenlenmesinde de kullandığı gösterilmiştir. (8, 63). Kadınlardaki günlük 15 mg kadar Mn alımı lenfosit MnSOD aktivitesini artırmıştır (67). *Escherichia coli* ve *Basillus subtiliste* manganın MnSOD aktivitesine neden olduğu gözlenmiştir. Mangan bakımından fakir diyetin rat, fare ve tavukta MnSOD aktivitesini azalttığı belirlenmiştir. MnSOD aktivitesi için gerekli olan manganın fetal gelişimde de yer aldığı gösterilmiştir. Neonatal farelerde mangan absorpsiyonunun oldukça fazla olduğu gösterilmiştir. Dokuların normal gelişimi ve aktiviteleri için gerekli bir eser element olan Mn; piruvat karboksilaz, arginaz ve manganez içeren MnSOD proteinlerine sıkı bir şekilde bağlanarak çeşitli reaksiyonlarda kofaktör olarak fonksiyon yapar. Protein kinaz ve fosfataz içeren çeşitli enzimleri aktive eder.  $Mn^{2+}$  süperoksid radikalleri ( $O_2^{\cdot-}$ ) ve hidrojen peroksidi ( $H_2O_2$ ) temizleyebilir ve Mn'in bu özelliği MnSOD'un fonksiyonlarında önemli rol oynar ( $Mn^{2+}+O_2^{\cdot-}+2H^+ \rightarrow Mn^{3+}+H_2O_2$ ) (8, 63, 65). Hidrojen peroksid ve süperoksid radikaller onkogen *c-fos*, *c-myc* ve *c-jun*'un ekspresyonuna neden olur.  $H_2O_2$ , katalaz ve glutatyon peroksidaz tarafından su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır ve böylece onkogen ekspresyonları önlenir (26, 65).

Mn baskısına rağmen yaşamını sürdüren hücrelerde adaptif bir yanıt olarak yüksek miktarda MnSOD oluşmaktadır. Bu da hücrelerdeki MnSOD'un Mn toksisitesine karşı koruma sağladığını göstermektedir (63). Toplam intrasellüler SOD aktivitesinin yaklaşık %15'i MnSOD'dan oluşmaktadır. Ökaryotik hücrelerde MnSOD gen regülasyonu kompleks bir olaydır. Hücrelerin oksidatif strese durumu MnSOD ekspresyonunun regülasyonunda esastır. MnSOD sitokin Tümör Nekroze Faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) tarafından arttırılır. MnSOD indüksiyonuna neden olan diğer faktörler; hiperoksi, radyasyon, LDL, interlökin-1, interferon- $\gamma$ , lipopolisakkaritler,  $H_2O_2$  ve asbest fiberleridir. Bazı MnSOD gen indüksiyonu çalışmalarında hiperoksiye direnç, oksidan stresi takiben oksidan hasardan korumak için enzimin etkilemesi şeklinde açıklandı.

MnSOD kalp, beyin, karaciğer ve böbreklerde yüksek oranlarda bulunur. Akciğer MnSOD'ı tip II pnömositler, bronş epitel hücreleri ve alveolar makrofajlarda bulunur. MnSOD geninin rolü insan malignensilerinde tartışmalıdır. Karsinogeneziste antioksidan-oksidan dengesizliği düşünülür. Proteindeki konformasyonel değişimden



dolayı mitokondriye MnSOD'un transportundaki değişimle sonuçlanan MnSOD geninin polimorfizmi akciğer ve göğüs kanserinin gelişimi için en azından bir risk faktörüdür. MnSOD aktivitesinin kanser aktivitesinde düşük olduğunu gösterilmiştir (57). Hiperoksi, sitokinler ve invivo/invitro bazı sitotoksik ilaçlara karşı dokular ve hücrelerin korunmasında MnSOD'un önemini vurgulanmıştır. Tümör hücrelerine MnSOD geninin aktarılmasından sonra mitotik aktivitenin yavaşladığı gösterildiğinden, MnSOD geninin meme kanserinde tümör baskılayıcı bir gen olarak düşünülmesine neden olmuştur (68). MnSOD'yi aşırı eksprese eden hücreler tümör süpresör etkilerini; azaltılmış kaplama yeteneği, hücre popülasyonunda miktar artışının iki katına çıkma süresinde uzama, yumuşak agarda düşük kolonogenik bölüm ve tam bir inhibisyon veya farede tümör oluşumunun gecikmiş başlangıcı şeklinde kendini gösterir (65). Mitokondrial DNA'nın kaybı kültüre edilmiş göğüs tümör hücrelerinin tümör oluşturuocu fenotipini etkileyebildiği belirtilmektedir (69). Belki daha da önemlisi MnSOD'nin aşırı ekspresyonu göğüs kanserinde TNF- $\alpha$ 'dan sitotoksositeye direnci ve apopitozisi artırır. MnSOD'ın indüksiyonu katalazı da artırır. Mitokondride oluşmakla beraber süperoksitlerin DNA hasarına neden olabilmesi ve MnSOD'un ise mitokondride süperoksid radikallerini etkisizleştirmesi göz önüne alındığında; MnSOD genindeki genetik polimorfizmlerin meme kanserinde risk faktörleri olarak ilişkilendirilmesine neden olmaktadır (11).

MnSOD polimorfiktir ve insanda iki fonksiyonel varyantı bulunmaktadır (70). Bizim de çalışmış olduğumuz ilk varyant olan Ala-9Val ekson-2'de yer almaktadır. Bir baz çiftinin (T $\rightarrow$ C) transisyonu ile oluşmakta ve 9. pozisyondaki Valinin-Alanine dönüşümünü içermektedir. Timinin Sitozin ile yer değişimi intrasellüler trafiği hatalı yönlendirir. Bu değişim proteinin ikincil yapısını  $\alpha$ -sarmal yapıdan  $\beta$ -plaka şekline dönüştürebilir ve mitokondri iç membranındaki reseptörün bu protein ile daha az etkileşime girmesine, mitokondriye transportunun yavaşlamasına neden olabilir (9, 56, 60, 71). İkinci varyant olan (İle58Thr) ise Ekson 3'de yer alır ve 339'uncu nükleotidi C $\rightarrow$ T dönüştürerek 58. amino asit olan izolösinin threonine değişimine neden olur. Bu değişim enzimin tetramerik ara yüzünün stabilitesini etkiler ve MnSOD'un enzimatik aktivitesini azaltır. İle58Thr varyantı popülasyonda nadir olarak görülür (%0.05) ve insan meme kanser hücrelerinde tümör süpresör kapasitesinin azalmasıyla ilişkilidir. Ancak meme kanseri ile Ala-9Val polimorfizmi kadar ilişkilendirilememiştir (70).

### 2.3. MnSOD ve SERBEST RADİKALLER

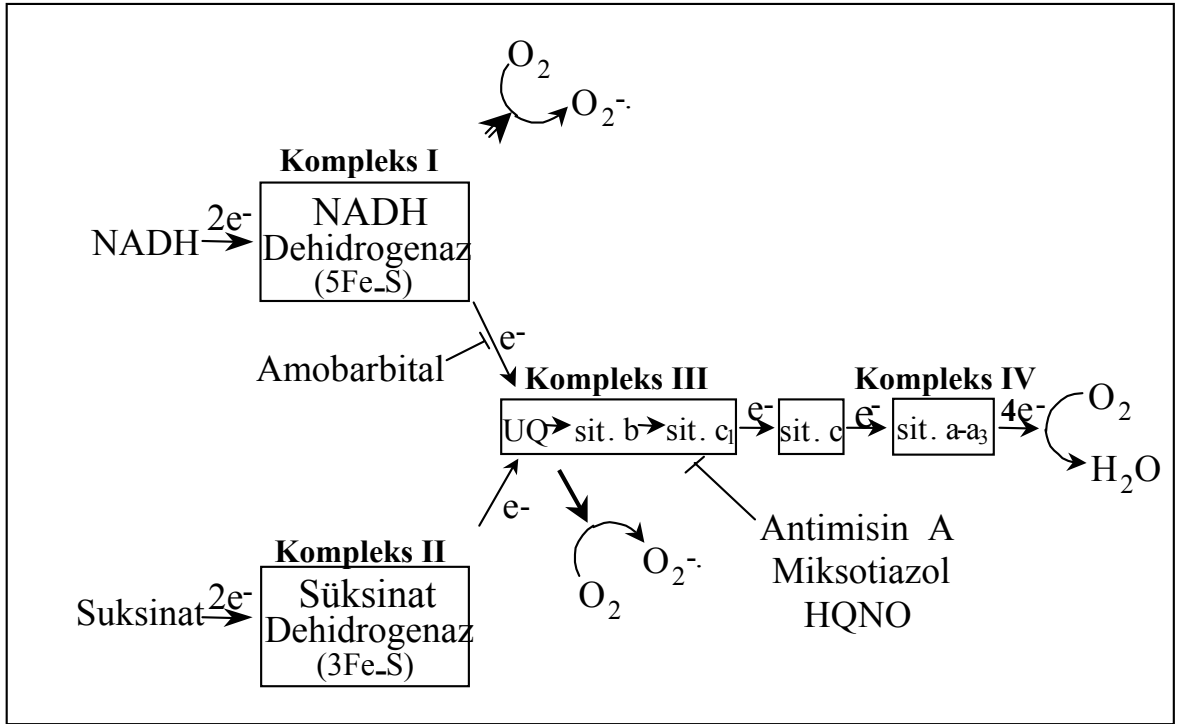
Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır. Çoğu olayda serbest radikal üretimi, pato-mekanizmanın bir parçasıdır ve pek çok ksenobiyotiğin toksisitesi, serbest radikal üretimi ile ilgilidir. Oksidatif stres kısaca; vücudun antioksidan savunması ile hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanabilir. Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Ekzojen etmenler arasında parakuat, alloksan gibi kimyasalların etkisi altında kalma, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksifikasyonları, iyonize ve ultraviyole ışın, hava kirliliği yapan kimyasal maddeler, sigara dumanı, solventler (organik çözücüler), nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin (antineoplastik ajanlar), alkol ve uyuşturucular (bağımlılık yapıcı maddeler) bulunması nedeniyle serbest radikaller toksikolojik açıdan da önemlidir.

Çizelge 2.2. Serbest radikallerin oluşumuna neden olan ekzojen kaynaklar (8)

İlaçlar	Metal İyonları	Kirleticiler	Radyasyon
Aminotriazol, asetaminofen, bleomisin, doksorubisin, hiperbarik oksijen, klonazin, klozapin, 3,4-metilendioksümetamfetamin, nitrofurantoin, siprofloksasin, siklosporin, trisiklik antidepresanlar, troglitazon.	Demir, bakır, kadmiyum, nikel, krom, Civa	Asbest lifleri, mineral tozlar, karbon monoksit, nitrik oksit, nitrojen dioksit, silika, bazı solventler, ozon, toksinler,hipoklorit, kükürt dioksit, yangın, PCB, plumbagin, juglone, dikuat, parakuat	Ultraviyole, x-ray, gamma radyasyon

Serbest radikaller hidroksil radikal ( $\text{OH}^\cdot$ ), süperoksit radikal ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), nitrik oksit ( $\text{NO}^\cdot$ ) ve peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) radikalleri gibi değişik türlere ayrılır (10). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, süperoksit grubuna ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir. Ökaryotik hücreler; mitokondrideki elektron transfer reaksiyonlarından aralıksız bir şekilde  $\text{O}_2^{\cdot-}$  üretilirler (Şekil 2.5.)(8, 63, 72).

Dietilditiyokarbamat gibi süperoksit dismutazın etkinliğini engelleyen maddeler, süperoksit gruplarının zararsız hale getirilmesini sınırlandırırken, lipid peroksidasyonunu hızlandırırlar. Ayrıca katalazın etkinliğini engelleyen maddeler (aminotriazol gibi herbisidler) de etkin oksijen gruplarına veya bu grupları oluşturan maddelere duyarlılığı artırır (8, 73).



Şekil 2.5. Mitokondri iç zarında elektron taşıma zinciri (72)

Serbest oksijen türlerinin, ilaç ve toksinle oluşan reaksiyonlar, kurşun zehirlenmesi, aminoglikozit nefrotoksisitesi, ağır metal nefrotoksisitesi, karbon tetraklorüre bağlı karaciğer hasarı, glomerulonefritis, hepatitis B, iskemi ve reperfüzyon, vitamin E eksikliği, kanser, amfizem, hiperoksi, bronkopulmoner displazi, arteroskleroz, pankreatitis ve romatoid artrit gibi pek çok hastalığın patogenezisinde etkili oldukları öne sürülmektedir (8).

Süperoksit gruplarının hızlı bir şekilde oluşturduğu singlet oksijen, hücre zarlarının fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli

lipid peroksidasyon ürünlerini oluşturur. Lipid peroksitler, indirgenmiş glutatyona (GSH) bağımlı selenyumlu bir enzim olan GS-peroksidaz tarafından lipid alkollere çevrilerek inaktive edilirse de, gerek süperoksit gruplarıyla fazla miktarda lipid peroksitlerin şekillendirilmesi, gerekse selenyum eksikliği ve de ortamdaki GSH'nın tükenmesine neden olabilen dietilmaleat, dioksin gibi maddelerin bulunması, lipid hidroperoksitlerinden serbest lipid grupların oluşumunu sağlar. Serbest lipid grupları doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna neden olur. Lipid hidroperoksitlerin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak aktif olan aldehidler ya hücre düzeyinde metabolize olurlar ya da başlangıçtaki etki alanlarında diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarak sekonder bozuklukların da göstergesi olabilirler. Beyin, oksidatif hasara en duyarlı bölgedir. Serbest radikaller, santral sinir sisteminin patolojik durumlarının pek çoğunda, direkt olarak doku hasarı meydana getirirler. Serbest oksijen türleri, ekzitotoksisite, metabolik disfonksiyon ve kalsiyumun intraselüler hemostazisinde bozulma gibi çoğul mekanizmalarla doku hasarı oluştururlar (8).

#### **2.4. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TEKNİĞİ (PCR)**

Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) yöntemi; bir organizma veya mutant gene ilişkin normal ya da parçalanmış DNA ya da RNA'nın invitro çoğalmasına olanak veren bir yöntemdir. Kary Mullis ve arkadaşlarınca 1985'de ortaya atılmış, daha sonra Saiki ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. PCR yöntemi avantajları nedeniyle moleküler biyoloji, tıp, arkeoloji gibi değişik alanlarda uygulanabilen bir yöntem olmuştur (74). PCR 1 µg'dan daha az DNA örneği istenilen miktarda çoğaltılarak DNA analizinin saatlerle ifade edilen bir sürede yapılmasına olanak sağlar (75). Ayrıca bu yöntemde DNA amplifikasyonu in vitro koşullarda gerçekleştirilmekte, belirli bir noktada amplifikasyon durdurulduğu zaman onun devam etmediğinden emin olunmaktadır (74).

### 2.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Oluşum Mekanizması:

PCR çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Amplimer olarak da adlandırılan oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle melezlenirler. Primerlerin spesifik olarak hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur (76).

Bir PCR döngüsü üç evreden oluşmaktadır:

1. Denatürasyon evresi,
2. Primerlerin bağlanması (annealing) evresi,
3. Uzama (extension) evresi

1- DNA'nın denatürasyonu: Bu evrede çoğaltılması istenen çift sarmal DNA; sarmalları bir arada tutan hidrojen bağlarını ayırmak üzere denatüre edilerek tek sarmal haline getirilir. DNA sarmallarının birbirinden ayrılması için uygulanabilecek fiziksel ve kimyasal yöntemler olmasına karşın 95-100<sup>0</sup>C'ye kadar ısıtmak en basit ve etkin bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Ancak PCR sırasında genellikle en etkin denatürasyon sıcaklığı 92-95<sup>0</sup>C'dir (74).

2- Primerlerin bağlanması (annealing): Bu evrede primer adı verilen ve çoğaltılması istenen DNA için spesifik olan sentetik oligonükleotid; ilk evrede elde edilen DNA tek sarmalı üzerinde kendisine komplementer olan nükleotid dizisi ile annealing yapar. Primerler, hedef DNA sarmalının amplifikasyonunu başlatmak amacıyla kullanılırlar. Primerler minimum 17-19 nükleotidden oluşmuş oligomerlerdir. Primerlerin bağlanması aşamasında deney ortamının ısısı 40-60<sup>0</sup>C'ye düşürülür.

3- Primerlerin uzatılması (extension) ve amplifikasyon: Annealing tamamlandıktan sonra primer hibridleştiği tek sarmalın karşılığını sentezler. Bu sentez için termostabil olan ve *Thermus aquaticus* adlı bakteriden elde edilen Taq polimeraz enzimi kullanılır. Nükleotidleri orijinal DNA sarmalına komplementer olacak biçimde primere ekler ve uzatır. Oluşan yeni DNA sarmalları bir sonraki döngüde primerler için kalıp olarak rol

oyunlar. Primerlerin uzatılması aşamasında 70-75<sup>0</sup>C'lerde ısı uygulanır. 72<sup>0</sup>C'de nükleotid eşleşme hızı; tampon, pH, tuz konsantrasyonu ve DNA kalıbının yapısına bağlı olarak saniyede 35-100 nükleotid olarak gerçekleşir. 72<sup>0</sup>C'de bir dakikalık uzama süresi 2 kb uzunluğundaki bir amplifikasyon ürünü için yeterli kabul edilir.

PCR uygulamasında üç evre bir döngü olarak kabul edilir, bir döngü 3-5 dakika sürer ve 20-40 kez tekrarlanır. Her döngü sonunda DNA miktarı geometrik dizi şeklinde iki katına çıkar. Döngü sayısı "n" olarak kabul edilirse "2<sup>n</sup>" çoğaltılmış DNA materyali miktarını verir (74). Termostabil DNA polimerazları ve farklı sıcaklık derecelerini istenilen süreler için otomatik olarak ayarlanabilen PCR aletlerinin ("thermal cyclers") kullanıma sunulması, PCR'nin verimi ve kullanımında önemli gelişmelere yol açmıştır (76). PCR yönteminin uygulanabilmesi için öncelikle tam doğru bir baz dizisi bilgisine ihtiyaç bulunmaktadır. Yöntemin son derece duyarlı olması nedeniyle çok küçük miktarlardaki kontaminasyon bile yanlış sonuçlara neden olur. PCR çalışmalarında diğer bir dezavantaj ise her primer çiftinin kendine özgü annealing ve uzama koşullarının olmasıdır. Bu koşullar; ısı, siklus uzunluğu, primer yoğunluğu, Mg<sup>++</sup> konsantrasyonu, enzim ve DNA miktarı olarak sıralanabilir (74).

#### **2.4.2. PCR'ın Temel Bileşenleri**

PCR'ın temel bileşenleri, kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon ve MgCl<sub>2</sub>'dir.

**2.4.2.1. Kalıp DNA:** PCR'de genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. PCR 'da kalıp olarak tek ya da çift iplikli DNA'nın yanı sıra RNA da kullanılabilir. Kalıp olarak RNA kullanılacaksa total RNA ya da poli(A)<sup>+</sup> RNA'dan önce klasik yolla cDNA elde edilir, ya da *Thermus thermophilus* kaynaklı rekombinant Tth DNA polimeraz enzimi kullanımıyla aynı tüpte RNA'dan DNA ürününün elde edilmesi tek kademeli olarak yapılabilir. Eğer yüksek molekül ağırlıklı genomik DNA kalıp olarak kullanılacaksa,

DNA kısmi kesim yapan NotI ya da SfiI gibi restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra kullanılmalıdır.

**2.4.2.2. Polimerazlar:** DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orijinal iplikteki baz bilgisini kullanarak dNTP'lerden uzun polinükleotid zincirin sentezini kataliz ederler. Bu enzimler, sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan primerlere gerek duyarlar. Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır. Termostabil DNA polimerazlardan PCR'de en yaygın olarak kullanılanı *Thermus aquaticus*'dan elde edilen Taq DNA polimerazdır. Taq DNA polimerazın polimerizasyon oranı (nükleotid/saniye) enzim için en uygun sıcaklık olan 70-80°C'de 35-100'dür.

Taq DNA polimeraz ve Amplitaq® zincirin uzayan ucundan nükleotidleri uzaklaştıran 5'→3' eksonükleaz aktivitesine sahiptir. Amplitaq®, Taq DNA polimerazın *E. coli*'de klonlanmış ve modifiye edilmiş rekombinant formudur. Amplitaq®'ın özellikleri Taq DNA polimerazınki ile aynıdır, ama Amplitaq rekombinant olduğundan saflığı Taq DNA polimerazdan daha fazladır ve PCR'da tercih edilir. Amplitaq'ın değiştirilmiş tipi olan Stoffel fragmenti 5'→3' eksonükleaz aktivitesi taşımamaktadır; Taq ve Amplitaq®'dan iki kat daha termostabil olup aynı zamanda magnezyum konsantrasyonunun daha geniş sınırlarında optimum aktivite gösterir. Stoffel fragmenti yüksek termostabilitesi nedeniyle yüksek denatürasyon sıcaklıklarının kullanılmasını gerektiren, özellikle G-C çiftleri bakımından zengin olan ya da kompleks sekonder yapıya sahip olan kalıp DNA'ların çoğaltılması için tercih edilir. 5'→3' eksonükleaz aktivitesinin bulunmayışı plazmid DNA'sı gibi halkasal kalıpların çoğaltılmasının daha etkin bir şekilde gerçekleşmesi için önemlidir. Vent<sup>TM</sup> DNA polimeraz geni *E. coli*'de klonlanmıştır. Vent<sup>TM</sup> DNA polimerazın termostabilitesi Taq DNA polimerazdan daha fazladır ve 8-13 kilobaz çiftlik ürün oluşturma yeteneğindedir. Vent<sup>TM</sup> DNA polimeraz hata düzeltme özelliği olan 3'→5' eksonükleaz aktivitesi göstermesi nedeniyle yanlış baz eşleşmelerinin oluşumunu engellediğinden Taq DNA polimerazdan 5-15 kat daha fazla doğrulukta ürün oluşturur. 3'→5' eksonükleaz aktivitesi nedeniyle primerlerin yok

edilmesi sorununun ortadan kaldırılması için enzim reaksiyona en son eklenmeli ve 3'-fosforotioat içeren primerler kullanılmalıdır. Pfu DNA polimeraz hem 5'→3' hem de 3'→5' eksonükleaz aktivitelere sahiptir. Pfu DNA polimerazın polimerizasyon doğruluğu Taq DNA polimerazdan 12 kat fazladır. Tht DNA polimeraz 70<sup>0</sup>C dolayında etkin bir şekilde revers transkriptaz aktivitesi gösterir. Bu nedenle Tht DNA polimerazın RNA (RT) PCR'de kullanımı, klasik RNA PCR (çift enzimli)'sine göre daha avantajlıdır. UITma<sup>TM</sup> DNA polimeraz Amplitaq®, DNA polimerazdan çok daha yüksek bir termostabilite gösterir. Bu enzim 5'→3' eksonükleaz aktivitesi göstermezken, 3'→5' eksonükleaz hata düzeltme aktivitesine sahiptir (76).

**2.4.2.3. Primerler:** Hedef dizinin her iki ucuna uyan oligonükleotiddir. Bu iki oligonükleotidden biri, çift zincirli bir DNA molekülünün zincirlerinden birinin ucundaki hedef diziyeye, diğeryse, diğer uçtaki diziyeye tamamlayıcı olarak uyması için tasarlanmıştır (25). Genel olarak kullanılan kalıp ile yüksek oranda bağlanma sağlamak üzere primerler 20-30 nükleotid uzunluğundadır. Primer tasarımı yapılırken çoğaltılması istenen DNA dizisinin iki ucundaki dizisi bilinen kısımlar dikkate alınır. Bu bölgelere tamamlayıcı olan primerler tasarlanır. Tasarım yapılırken mümkün olduğunca dört bazın eşit sayıda kullanımına dikkat edilir.

**2.4.2.4. Deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP):** Deoksiribonükleaz trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta ya tek tek ya da dörtlü karışım halindedir. Taq DNA polimeraz düşük dNTP konsantrasyonlarında (10-100 µM) kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılı olmakla birlikte, normal koşullarda PCR 100 µM dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir. Ayrıca optimal dNTP konsantrasyonu; MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonuna, reaksiyon koşullarına, primer konsantrasyonuna, çoğaltılmış ürünün boyuna, PCR döngü sayısına bağlıdır (76).

**2.4.2.5. Tamponlar ve MgCl<sub>2</sub>:** PCR'da kullanılan çeşitli tamponlar arasında en çok kullanılanı Taq/Amplitaq enzimlerine özgü olan tampondur. MgCl<sub>2</sub>'ün reaksiyon



karışımındaki final konsantrasyonu değişebilmekle birlikte genellikle 0.5-5.0 mM'lık değerler arasında çalışılır.  $Mg^{+2}$  iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini stimüle ederler ve çift iplikli DNA'nın \*Tm değerini artırır, ayrıca primer/kalıp etkileşimini sağlarlar (\*Tm Değeri: çift iplikli nükleik asit moleküllerindeki baz çiftlerinin yarısının ortadan kalkmasına yol açan sıcaklık derecesi). Bu nedenle  $MgCl_2$ 'ün PCR'nin özgülüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. Genellikle optimum  $MgCl_2$  konsantrasyonu olarak 1.0-1.5 mM'lık değerler tercih edilir. Düşük  $Mg^{+2}$  konsantrasyonu, ürün oluşumunda azalmaya, yüksek  $Mg^{+2}$  konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün birikimine yol açar.  $MgCl_2$  içeren tamponlar kullanılıyorsa, ayrıca  $MgCl_2$  kullanımına gerek yoktur. Bu standart PCR tamponu 50 mM KCl, 10 mM Tris.Cl (oda ısısında pH 8.3), 1.5 mM  $MgCl_2$  ihtiva eder. PCR'da Mg konsantrasyonunun etkilediği komponentler şunlardır:

1. Primer yapışması
2. PCR ürünü ve kalıpların ayrılması
3. PCR ürünün spesifitesi
4. Primer-dimer artefakların oluşması
5. Taq polimeraz enzim aktivitesi (Taq-polimeraz enziminin çalışabilmesi için serbest Mg olması gereklidir) (76, 77).

**2.4.2.6. PCR Engelleyicileri (İnhibitörleri) ve Artırıcıları:** Çok sayıda değişik biyolojik örnek (hayvan dokuları ve vücut sıvıları, bakteri örnekleri, adli tıp ve arkeolojik materyaller) PCR'de DNA kaynağı olarak kullanılır. Bu doğal kaynaklar çok çeşitli bilinmeyen engelleyicileri içerirler. Bu nedenle inhibisyonun olmadığına ilişkin olarak PCR kontrolleri yapılmalıdır. DNA izolasyonu için kullanılan materyallerden biri kandır. Kanın pıhtılaşmasını önlemek için kullanılan heparin PCR için potansiyel bir inhibitördür. Bunun dışında kanda bulunan porfirin gibi diğer maddeler de PCR için kuvvetli inhibitör etki gösterirler, bu nedenle DNA izolasyonu sırasında lizis ve santrifüjleme aşamalarında uzaklaştırılırlar. DNA izolasyon işlemlerinde hücre parçalanması ve denatürasyon için kullanılan deterjanlardan Triton X-100, Tween 20, Nonidet P40 gibi iyonik olmayan deterjanların %5'in üzerindeki konsantrasyonları PCR'ı pek engellemezler. Diğer yandan sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi iyonik

deterjanlar sadece son derece düşük konsantrasyonlarda kullanıldıklarında tolere edilebilirler. Bu nedenle PCR'den önce fenol ekstraksiyonu ve etanol çöktürmesi ile uzaklaştırılmalıdır. Taq DNA polimeraz, protein yıkımına duyarlı olduğu için proteinleri parçalayan proteinaz K uzaklaştırılmalı ya da inhibe edilmelidir. 95<sup>0</sup>C termal denatürasyon bu inhibisyon için yeterlidir. Ardışık olarak uygulanan santrifüjleme DNA'nın sıvı fazda kalmasını sağlarken, proteazı da fenol fazına ayırır. Kalan fenol, kloroform: izoamil alkol veya eter ekstraksiyonu ya da DNA'nın etanol ile çöktürülmesi ile uzaklaştırılır (76).

## **2.5. ELEKTROFOREZ**

Elektroforez yüklü moleküllerin bir elektriksel alandaki hareketlerinin izlendiği bir tekniktir. Çözünmüş durumdaki moleküllerin elektrik yüklerinin kitlelerine oranıyla belirlenen hızlarda elektriksel alanda hareket etmeleri prensibine dayanır. Bu sistemde analizi yapılacak örnek bir destek ortamı olan jellere uygulanır. Jeller, içerisinde uygun bir tampon bulunan bir elektroforez aygıtına yerleştirilerek işlem gerçekleştirilir. Analiz edilecek örnek jelle bir leke ya da ince bir bant halinde uygulanır. Katı jel desteği ile ayırımı yapılacak moleküllerin hareketi, moleküllerin yüküne, boyutuna, biçimine, kimyasal içeriğe ve uygulanan elektriksel alana bağlıdır. Oldukça hızlı ve kullanışlı bir teknik olan elektroforezin bir homojenattaki farklı molekülleri ayırma kapasitesi genellikle fazla yüksek değildir. Bu nedenle bu teknikten sınırlı ölçüde yararlanılmaktadır. Buna karşılık az miktardaki protein ya da nükleik asit karışımlarını (ayrıca nükleoprotein ve polisakkarit karışımlarını) saflaştırmakta ve analizlerini yapmakta geniş ölçüde kullanılmaktadır. Tüm elektroforez tiplerinin temeli elektriksel eşitliklere dayanır. Aralarındaki temel fark destek ortamının başlıca tipi ve konumudur. Dikey ya da yatay konumdaki destek ortamı selüloz ya da ince (poliakrilamid veya agaroz) jellerden hazırlanmış olabilir.

Selüloz, aminoasitler ve karbonhidratlar gibi düşük molekül ağırlıklı olan moleküller için, jeller ise daha büyük olanlar (nükleik asitler ve proteinler) için destek ortamı olarak kullanılır.

Akrilamidin polimerizasyonuyla hazırlanan poliakrilamid jellerin elektroforetik ayırımlarda çeşitli üstünlükleri vardır: Küçük ya da orta boydaki (yaklaşık  $1 \times 10^6$  Da'ya kadar) nükleik asitler ve proteinler için yüksek ayırıştırma gücüne sahiptir; oldukça büyük boyuttaki örnekler için uygundur; göç eden moleküllerle destek materyali arasındaki etkileşim en düşük düzeydedir; destek materyali fiziksel olarak oldukça kararlı ve dayanıklıdır. Poliakrilamid jelle yapılan elektroforez örnekteki bileşenlerin daha iyi ayrışmalarına yol açar. Poliakrilamid jel elektroforezi daha çok proteinlerin ve küçük (350.000 Da'ya yani 500 bç'ye kadar) DNA parçalarının ayırımı ve analizi için kullanışlıdır. Poliakrilamid jeldeki küçük por boyutları büyük DNA molekülü parçalarının ayırımı için uygun değildir. 200-50.000 bç boyutları arasındaki DNA ve RNA moleküllerini tanımlamakta kullanılan standart yöntem destek ortamı olarak agarozun kullanıldığı elektroforezdir. Agaroz jel elektroforezi ile, özellikle değişik kökenli (örneğin, kromozoma, plazmide, organelle ait) DNA'ların izole edildikleri ve/veya restriksiyon enzimleri ile kesildikleri durumda molekül ağırlıkları ve miktarları belirlenebilir. Aynı şekilde, bu teknik RNA'ya ait küçük (<500 nükleotid) parçaların ayrılması için çok kullanışlı bir sistem sağlarlar. Agaroz jel elektroforezi proteinlerin yüklerine göre ayrılmasında da kullanılmaktadır. Değişken alanlı ("Pulsed Field") jel elektroforezi ile çok büyük DNA molekülleri (örneğin, maya kromozomlarının 200-300 kb boyutundaki DNA'ları) ayrılabilir. Değişken alanlı jel elektroforezinin standart jel elektroforezinden en belirgin farkı, uygulanan elektrik alanının sabit olmaması, ayırma sırasında yönünün ve şiddetinin tekrarlanan bir biçimde değiştirilmesidir. İki boyutlu jel elektroforezde SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile proteinlerin ayırımının molekül boyutuna göre yapılmasına karşılık izoelektrik odaklama ile ayırım yüke dayanır. İki boyutlu elektroforez bu iki yöntemin bileşimidir. Kılcal elektroforez çok az miktardaki (5-10 nL) örneğin, yüksek çözünürlükte ayırımını ve attomol ( $10^{-18}$ ) düzeyinde duyarlılıkta analizini sağlar. Bu nedenle, aminoasitlerin, peptidlerin, proteinlerin, nükleik asitlerin analizinde geniş çapta kullanılan bir teknik olmaya başlamıştır. İmmünoelektroforez yönteminde, önce protein karışımı küçük cam tabakada hazırlanmış agaroz jelde elektroforezle ayrılır. Daha sonra, ayrılmış proteinler özel antikor uygulamasında bırakılırlar. Uygulanmış antikorların jelde yayılması sağlanır. Eğer bu antikorların proteinlerinden birine ilgisi varsa antikor ve antijen protein arasında suda çözünmeyen bir kompleks oluşur ve gözle

görülebilen bir çökelme meydana gelir. Bu teknik, bir proteinin saflığının, kompozisyonunun ve antijenik özelliğinin analizi için çok yararlıdır (76).

## **2.6. RESTRİKSİYON PARÇA UZUNLUK POLİMORFİZMLERİ (RFLP)**

DNA sarmalı özgül restriksiyon enzimi ile kesildiği zaman farklı uzunluklarda fragmentler oluşur ve jel elektroforezinde gözlenir. Bu fragmentler restriksiyon parça uzunluk polimorfizmleri (Restriction Fragment Length Polimorphism, RFLP) olarak adlandırılırlar. RFLP'ler bir çok hastalıkta kalıtsal marker olarak kullanılır. Gözlenen RFLP'lerin iki türü bulunmaktadır:

1. Restriksiyon bölge polimorfizmleri (Restriction Site Polimorphism): Bu tür RFLP'ler daha önce var olan enzim kesme bölgesini değiştiren ya da yeni kesim bölgesi oluşturan tek baz değişimleridir. Bunlar iki alele sahip olup özgül enzimlerle tanımlanabilirler.

2. Eksilme araya girme polimorfizmleri (delesyon, insersiyon polimorfizmleri): Bu tür RFLP'ler de iki allele sahip olup birçok enzimle tanımlanabilirler.

PCR ürünlerinin restriksiyon enzimi (RE) ile kesilmesi sonucu oluşan elektroforetik paterne bakılarak oluşan RFLP fragmentlerine dayanarak PCR-RFLP formatı: RE tanıma bölgesinin değişmesi, kaybolması veya başka bir restriksiyon enzimine ait tanıma bölgesinin ortaya çıkması sonucu elektroforetik patern tanıya yönelik olarak kullanılabilir (74).

RFLP'nin yararları şu şekilde sıralanabilir:

- Kalıtım çalışması için gereklidir.
- Yapısal heterozigotluğun kaybının incelenmesi.
- Doku tiplmesinde/ prenatal tanıda/ babalık tayininde kullanılabilir.
- Gen klonlanmasında kullanılabilir.
- Enfeksiyon ajanların (bakteriler, virüsler) birbirlerinden farklılıklarının belirlenebilmesinde kullanılabilir (77).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu araştırma popülasyonu, meme kanseri tanısı konulmuş 83 bireyden deney grubu ve aynı yaş grubundan 104 sağlıklı bireyden kontrol grubu oluşturularak gerçekleştirildi. Bireylerden detaylı anamnez alındı ve anamnez kağıtlarına alınan bilgiler kaydedildi. Bireylerden alınan 7-8 ml kan örnekleri %2'lik 1 ml etilen dimetil tetra asetik asit (EDTA) içeren tüplere bırakıldıktan sonra Miller'in tuz çöktürme yöntemine göre (78) DNA'lar izole edildi. Manganez Süperoksit Dismutaz geninin Ala-9Val polimorfizmine ait gen bölgesi PCR ile amplifiye edilip elektroforezle görüntülendi. Elde ettiğimiz DNA PCR'a dayalı RFLP'de bir kalıp olarak kullanıldı ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

#### 3.1. HASTA ve KONTROL GRUPLARININ TOPLANMASI

26-78 yaşları arasında meme kanserli kadından oluşan deney grubu ve aynı bölgede yaşayan 32-75 yaşları arasında sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubu ile toplam 187 bireyden oluşan bir araştırma popülasyonu oluşturuldu. Bireylerden anamnez alındı. Bireylerin yaş, kilo, boy, sigara tüketimi, alkol tüketimi, ilk doğum yaşı, menarş yaşı, menopoz yaşı, geçirilen operasyonlar, kullanılan ilaçlar, kronik hastalıklar, meme kitle öyküsü, aile meme kanseri öyküsü, eğitim durumu hakkında bilgiler alınarak anamnez kağıdına kaydedildi. Bireylerin beden kitle indeksi (BMI): kilo ve boy verileri ile hesaplandı:

$$\text{Beden kitle indeksi} = \text{Beden ağırlığı(kg)} / \text{Boy(m)}^2$$

Hasta ve kontrol grubundaki bireylerden DNA izolasyonu için alınan 7-8 ml venöz kan %2'lik EDTA içeren, 15 ml'lik santrifüj tüplerine konuldu. DNA izolasyonuna kadar -20<sup>0</sup>C buzdolabında saklandı.

## 3.2. KULLANILAN ARAÇ ve GEREÇLER

### 3.2.1. Kullanılan Cihazlar

- Mikropipet Seti (Eppendorf)
- Santrifüj (Nüve NF-800)
- Mikrosantrifüj (Hermle. Z 160M)
- Otoklav (Nüve OT 4060 V)
- Etüv (Nüve EN-500)
- Buzdolabı (Arçelik-8188 NF)
- Derin Dondurucu (Arçelik-2031 D)
- Vorteks (VELP)
- Termal Cycler (Techne Flexigene, Cambridge, UK)
- Hassas Terazı (AND)
- Mikrodalga Fırın (Alaska)
- Manyetik Karıştırıcı (Nüve MK-418)
- Elektroforez Tankı (Midicell EC-350)
- Elektroforez Güç Kaynağı (EC-135-90)
- Jel Görüntüleme (Vilber Lourmat Marne La Vallee, France)

### 3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Tris-Hidroklorid (Sigma T-7149)
- Sodyum Klorür (Riedel-de Haen)
- EDTA (Sigma E-5134)
- Sodyum Dodesil Sülfat (Sigma L-5750)
- Sodyum Perklorat (Sigma S-3546)
- Proteinaz K (Sigma P-2308)
- Etanol (Riedel-de Haen 32221)
- Tris Base (Sigma T-6066)

- Borik Asit (Carlo Erba 302177)
- Agaroz (Prona Agarose Plus, E.U)
- Etidyum Bromid (Sigma E-1510)
- Orange G (Sigma O-3756)
- Gliserol (Merck 4091)
- Taq DNA Polimeraz (Promega M2665)
- NgoM IV (Promega R7171)
- Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Promega G2101)
- dNTP Mix (Promega U1515)
- 10×PCR Buffer (Fermantes EP0402)
- Bidistile Su (Sigma W-3500)
- DMSO (Sigma D8418)
- Ala-9Val polimorfizmi için primer çifti:  
Forward 5'-ACC AAC CAG CAG GCA GCT GGC GCC GG-3' (SOD A1)  
Reverse 5'- GCG TTG ATG TGA GGT TCC AG-3' (SOD S1)

### 3.2.3. Kullanılan Tampon Çözeltileri

#### 3.2.3.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Çözeltiler

##### • Nüklei Lizis Buffer

- Tris HCl.....1.576 g
- NaCl.....23.4 g
- Na<sub>2</sub>EDTA.....0.7 g

1 litre distile suya tamamlanıp çözüldükten sonra otoklavda steril edildi ve +4<sup>0</sup>C'de saklandı.

• **%10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi:** 10 g SDS, 100 ml distile suda çözüldü.

• **5 M Sodyum Perklorat Çözeltisi:** 61.2 gr sodyum perklorat (NaClO<sub>4</sub>) 1 lt distile suyla tamamlanıp, çözüldükten sonra otoklavda sterillendi ve +4<sup>0</sup>C'de saklandı.

• **6 M NaCl Çözeltisi:** 35.5 g NaCl, 100 ml distile suda çözüldü.

- **TE Buffer**

- Tris-HCl.....0.394 g

- Na<sub>2</sub>EDTA.....0.093 g

250 ml distile suya tamamlanıp çözüldükten sonra otoklavda steril edildi ve +4<sup>0</sup>C’de saklandı.

- **Proteinaz K:** Liyofilize 100 mg proteinaz-K, 10 ml steril distile su ile çözümlenerek 10 mg/ml’lik konsantrasyona getirildi ve -20<sup>0</sup> C’de saklandı.

### 3.2.3.2. Elektroforez İçin Kullanılan Çözeltiler

- **10×TBE (Tris-Borat-EDTA)**

- Tris Base.....10.8 g

- Borik Asit.....54.8 g

- Na<sub>2</sub>EDTA.....5.44 g

Distile su ile 1 litreye tamamlanarak çözüldü.

- **Elektroforez Yürütme Tamponu:** 10×TBE Buffer’den distile su ile seyreltilerek hazırlanmış olan 1×TBE içerisine 0.5µg/ml konsantrasyonunda etidyum bromid konulduktan sonra karıştırıldı.

- **Agaroz Jel Çözeltisi (% 3’lük):** 140 ml 1×TBE Buffer içerisine 4,2 g agaroz bırakılıp mikrodalga fırında 4 dakika süren eritme işlemi gerçekleştirildikten sonra konsantrasyonu 0.5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromid eklendi.

- **Orange G Çözeltisi**

- Na<sub>2</sub>EDTA .....2.232 g

- Orange G.....200 mg

60 ml gliserol ve 40 ml distile sudan oluşan solüsyon içerisinde çözüldü.

### 3.3. DNA’NIN İZOLASYONU

Doğadaki canlıların tümüne yakın kısmında genetik materyal DNA’dır. Bu nedenle, genetik materyalle yapılacak çeşitli çalışmalarda moleküler biyoloji



tekniklerinin uygulanabilmesi için öncelikle yüksek molekül ağırlıklı DNA molekülünün saf bir şekilde elde edilmesi gerekmektedir.

DNA izolasyon yöntemlerinde birbirini izleyen üç temel aşama bulunmaktadır:

1. Hücrenin parçalanması ile yüksek molekül ağırlıklı DNA'nın açığa çıkması,
2. Denatürasyon veya proteoliz ile DNA-protein kompleksinin ayrılması ve DNA'nın çözünür duruma getirilmesi,
3. DNA'nın basit enzimatik ve/veya kimyasal yöntemlerle proteinler, RNA ve diğer makromoleküllerden ayrılması.

Bu aşamalardan sonra da farklı kaynaklı ya da farklı özellikteki DNA moleküllerinin ayrılması gerekmektedir. Genomik DNA'yı hücre lizatından ayırmada olduğu gibi, tek ve çift zincirli DNA moleküllerini ve plazmid DNA'sı ile genomik DNA'yı birbirinden ayırmada da, kromatografik tekniklerden yararlanılabilir. Bununla beraber jel elektroforezi yöntemi daha yüksek ayırma gücü nedeniyle nükleik asitleri ayırmada en yaygın kullanılan yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (76).

Bu çalışmada DNA izolasyonu için makro bir yöntem olan Miller'in tuzla çöktürme yöntemi kullanılmıştır. Yöntemin esası, lökositlerde bulunan DNA dışındaki tüm yapıların bozularak parçalanması, yoğun bir tuz çözeltisi ile çöktürülmesi ve üstte kalan sıvı kısmında bulunan DNA'nın etil alkol yardımı ile yoğunlaşması sağlanarak izole edilmesidir (78).

### **3.3.1. DNA İzolasyonunun Yapılışı**

Hasta ve kontrol grubuna ait bireylerden DNA izolasyonu için 7-8 ml venöz kan alınıp içinde 1 ml EDTA bulunan 15 ml'lik polipropilen santrifüj tüplerine konularak +4°C'de saklandı. İki gün sürecek olan işlemde, ilk gün tüplerdeki kanların üzerine otoklavlanarak steril edilmiş distile soğuk su ilave edilerek 14 ml'ye tamamlandı. Kapakları kapatıldıktan sonra elle yaklaşık 2-3 dk hızlı olarak aşağı yukarı karıştırıldı. Çalkalama işlemine tüp içerisindeki çökelti homojen şekilde dağılına kadar devam edildi. 15 dk 2000 rpm'de ilk santrifüjleme gerçekleştirildikten sonra santrifüjlenen tüplerin süpernant kısımları transfer pipetiyle alınarak atıldı. Tüplere tekrar soğuk distile su ilave edilerek 14 ml'ye tamamlandı ve çalkalama işlemi tekrarlandı. İkinci ve sonraki

santrifüjlemeler 10 dk ve yine 2000 rpm'de yapıldı. Supernatant kısım berrak bir görüntü alana kadar tüplerdeki çalkalama ve santrifüjleme işlemleri tekrarlandı. Son santrifüjleme ve supernatantın atılması işleminden sonra pelet üzerine lökositlerin nükleuslarının parçalanmasını ve serbest hale gelmesini sağlayan 3 ml nüklei lizis buffer ilave edildi. Tüplerin kapakları kapatıldıktan sonra birkaç saniye elle çalkalandı. Daha sonra tüplere %10'luk SDS'den 200 µl, 5 M'lık sodyum perklorattan 500 µl veya 10 mg/ml proteinaz-K'dan 25 µl eklendikten sonra tüpler kapatılarak aşağı yukarı altüst edildi. Tüpler bir gece 37°C'ye ayarlanmış etüvde inkübe edildi. Ertesi gün son bir saat 55°C'de bekletildi ve işlemin ikinci aşamasına geçildi.

Etüvden çıkarılan tüplere 2'şer ml, 6 M'lık NaCl çözeltisi ilave edildi. Yaklaşık 20 defa aşağı yukarı karıştırıldıktan sonra 10 dk oda ısısında bekletildi. Daha sonra 15 dk 3500 rpm'de santrifüjleme işlemine geçildi. Santrifüjlemeden sonra tüplerdeki supernatantlar transfer pipetiyle boş bir tüpe aktarıldı. DNA'nın yoğunlaşmış görünür bir hale gelmesi için tüplere soğuk absolu etanol ilave edildi. Görünür hale gelen DNA yumağı mikropipet ucuyla çekmeden, uca dikkatlice sarılarak alındı. Daha önce 500 µl TE buffer konulan ependorf tüplere aktarıldı. 37°C etüvde bir gece bekletilerek DNA'ların TE buffer içerisinde çözünüp homojen hale gelmesi sağlandı. Saklama ortamı olarak +4°C'deki buzdolabına kondu. Sonra moleküler analiz işlemine geçildi.

### **3.4. MOLEKÜLER ANALİZ**

#### **3.4.1. PCR İşlemi**

MnSOD geninin ekson 2'deki Ala-9Val polimorfizmini belirlemek için primer çifti olarak:

Forward 5'-ACC AAC CAG CAG GCA GCT GGC GCC GG-3' (SOD A1)

Reverse 5'- GCG TTG ATG TGA GGT TCC AG-3' (SOD S1)

kullanıldı. 107 bp PCR ürünü, kullanılan spesifik primerlerle çoğaltıldı. Bir örnek için PCR ortamında kullanılan malzeme ve miktarları şu şekildedir:

- ☐ Bidistile Su.....17 µl
- ☐ 10×PCR Buffer (NH<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)).....2,5 µl
- ☐ 2 Mm dNTP mix.....2,5 µl
- ☐ Primer (Forward).....0,8 µl
- ☐ Primer (Reverse).....0,8 µl
- ☐ MgCl<sub>2</sub>.....1,5 µl
- ☐ DMSO.....10,0 µl
- ☐ Taq DNA polimeraz.....0,2 µl

Çalışılacak örnek sayısına göre miktarlar hesaplandıktan sonra steril ependorf tüpe yukarıdaki sıra ile malzemeler bırakıldı. Karışım vortekslendikten sonra her bireye ait protokol numarasını içeren, 0.5 ml'lik steril ependorf tüplere eşit miktarlarda dağıtıldı. Her tüpe ait olduğu bireyin DNA'sından 1'er µl eklendi. Ependorf tüpleri thermal cyclers cihazına yerleştirildi. En iyi sonuç aldığımız thermal cyclers koşulları şu şekilde idi:

İlk Denatürasyon	→ 95 °C	5 dakika	1 döngü
Denatürasyon	→ 95 °C	1 dakika	} 35 döngü
Annealing (Primer Bağlanması)	→ 67 °C	1 dakika	
Sentez (Extension)	→ 72 °C	2 dakika	
Son Uzama (Final Extension)	→ 72 °C	7 dakika	1 döngü

PCR reaksiyonu bittikten sonra ependorf tüpleri thermal cyclersden çıkarıldı. PCR ürünleri restriksiyon endonükleaz enzimi olan NgoM IV (G↓CCGGC) ile kesildi. Bunun için reaksiyon karışımı hazırlandı. Bir örnek için karışım şunları içerdi:

- Bidistile Su .....9,5 µl
- Storage Buffer B.....2,5 µl
- Enzim (NgoM IV).....(10 U/µl) 0,2 µl

Çalışılacak örnek sayısına göre hazırlanan karışım vortekslendikten sonra eşit miktarda PCR ürünlerinin üzerine bırakıldı. Mikrosantrifüjde kısa süre çevrilen örnekler 37<sup>0</sup>C'lik etüvde 16 saatlik inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda örnekler %3'lük agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutuldu ve RFLP yöntemi ile genotipler belirlendi.

### 3.4.2. Elektroforez İşlemi:

Amplifiye edilen gen bölgelerinin uzunluğunu belirlemek için agaroz jel elektroforez tekniği kullanıldı. %3'lük agaroz jel aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı:

4.2 g agaroz ve 140 ml 1×TBE solüsyonu beher içine konulup, mikrodalga fırında homojen hale gelmesi için 4 dk ısıtıldı. Daha sonra elektromanyetik karıştırıcıda 200 devir/dk ile yaklaşık 5 dk karıştırıldı. Karıştırma işlemi devam ederken jel içerisine 10 mg/ml'lik Etidyum Bromid 14 µl eklendi. Jel uygun ısıya düşünce jel kalıbına döküldükten sonra yaklaşık 2 dk daha beklendikten sonra taraklar takıldı. Jel katılaştıktan sonra taraklar çıkarıldı ve bir süre buzdolabında bekletilerek kullanıma hazır hale getirildi.

Buzdolabından çıkarılan jel elektroforez tankına yerleştirildi. Ependorf tüplerindeki PCR ile amplifiye edilen ve NgoM IV enzimi ile kesilen örnekler üzerine 10 µl Orange-G katıldıktan sonra birkaç saniye mikrosantrifüjde 3500 rpm'de çevrildi. Bu işlemi takiben tankın içindeki jelin kuyucuklarına örnekler sırayla bırakıldı. Kuyucuklardan birine 2 µl 100 bp'lik marker bırakıldı. Elektroforez tankının kapağı kapatılarak elektroforez cihazı, güç kaynağından 120 volt akım geçecek şekilde ayarlandı ve örnekler 30-33 dk yürütüldü.

### 3.4.3. Genotiplendirme

MnSOD geninde meydana gelen Timinin Sitozine değişim polimorfizmi, NgoMIV enzimi kullanılarak belirlenmiştir. Elektroforez işlemi sonucunda yürütülen bantların uzunluklarını belirlemek için 100 bp'lik marker kullanıldı. Bunun için örneklerin yürütüldüğü jel, görüntüleme sistemine konuldu ve 260 nm dalga boyunda UV ışığı altında görünür hale gelen bantların uzunlukları marker ile karşılaştırıldı.

MnSOD geninin Ala-9Val polimorfizmi için yapılan elektroforez sonucunda gözlenen bantların uzunlukları; 107 bp, 89 bp ve 18 bp olarak belirlendi ve bu bant uzunluklarına göre yapılan değerlendirmede;

- 107 bp'lik tek bantın görüldüğü bireylerin genotipi→TT  
(Homozigot Yabancıl Tip)
- 107 bp ve 89 bp'lik iki ayrı bantın görüldüğü bireylerin genotipi →TC  
(Heterozigot Tip)
- 89 bp'lik tek bantın görüldüğü bireylerin genotipi→CC  
(Homozigot Mutant Tip)

olarak tanımlandı. 18 bp'lik bant agaroz jelde görünemeyecek kadar küçük olduğu için gözlenemedi ve değerlendirme ona göre yapıldı.

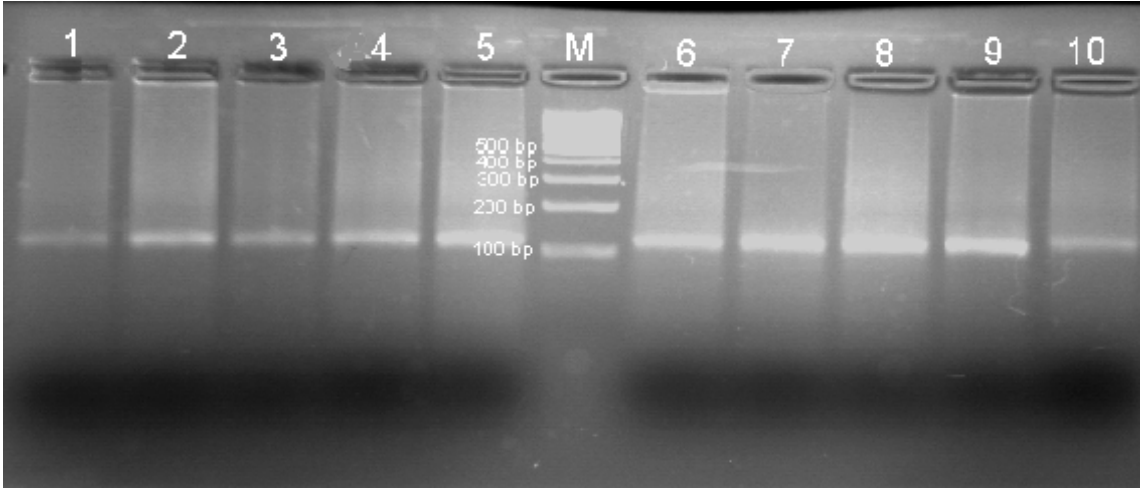
### **3.5. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME**

MnSOD geninin ekson 2'de meydana gelen Ala-9Val polimorfizmi ile meme kanseri riski arasındaki ilişki SPSS (Statistical Package for Social Sciences, version 10.0) paket programı, çoklu lojistik regresyon modeli ile kullanılarak değerlendirildi.

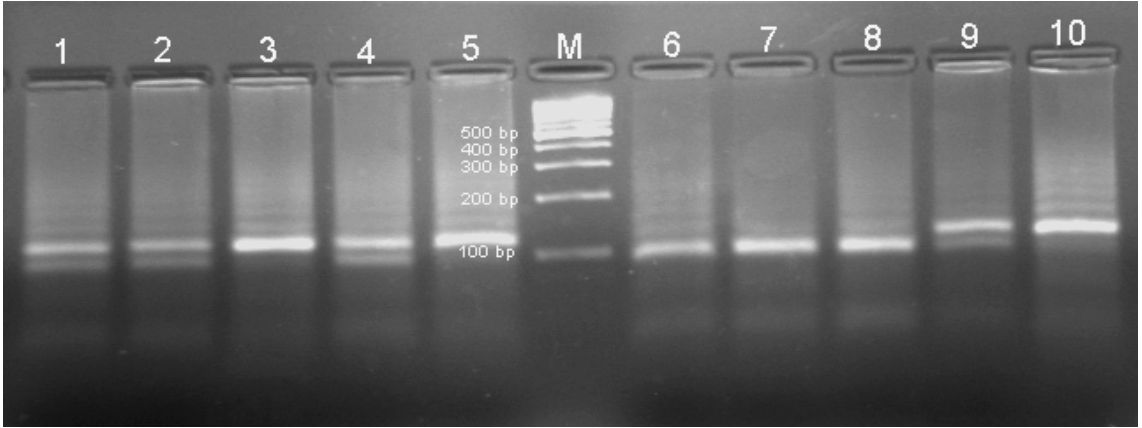
## 4. BULGULAR

MnSOD geninin ekson 2'de (Ala-9Val) polimorfizmiyle meme kanseri arasındaki ilişkinin araştırıldığı bu çalışmada, araştırma popülasyonumuza ait kontrol grubu; geçmişte meme kanseri öyküsü olmayan yaşları 32-75 arasında değişen ( $\bar{x}$  =49.01±9.26) 104 gönüllü bireyden oluşmuştur. Deney grubu ise Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahiliye Anabilim Dalı Onkoloji Kliniği ve Genel Cerrahi Anabilim Dalında 2004-2005 yıllarında meme kanseri tanısı konmuş yaşları 26-78 arasında değişen ( $\bar{x}$  =51.97±11.48) 83 bireyden oluşmuştur. Kontrol ve deney grubundaki tüm bireyler için ayrı ayrı PCR ve RFLP yöntemleri ile MnSOD genine ait Ala-9Val polimorfizmi allel ve genotip oranları belirlenerek incelenmeye alındı. Deney ve kontrol grubuna ait bulgularımız; Meme kanserinin yaş gruplarına göre dağılımı, allel ve genotip oranları ile meme kanserine yakalanma riskinin incelenmesi ve çevresel faktörlerle meme kanseri ilişkisi olmak üzere üç ana başlık altında toplanmıştır.

MnSOD geninin Ala-9Val polimorfizmi için genotiplendirme yapılırken 104 kontrol grubu ve 83 meme kanserli olmak üzere toplam 187 bireyden oluşan örnek hacmi kullanıldı. Bireylere ait elektroforez sonuçları görüntüleme sisteminde değerlendirildi. 260 nm dalga boyundaki UV altında görünür hale gelen bantların uzunlukları marker ile karşılaştırıldığında 107 bp hizasında olan örnekler T alleli; 89 bp hizasındaki örnekler C alleli olarak değerlendirildi. Buna göre de 107 bp hizasındaki tek banta sahip olan bireyler TT; 89 bp hizasında tek banta sahip olan bireyler CC; 107 ve 89 bp hizalarında iki banta sahip olan örnekler ise hem T hem de C alleleline sahip oldukları için TC olarak değerlendirildi. Meme kanserlilerde MnSOD geninin Ala-9Val polimorfizminin RFLP öncesi görüntüsü şekil 4.1'de ve RFLP sonrası görüntüsü şekil 4.2'de verilmiştir.



**Şekil 4.1.** MnSOD Ala-9Val polimorfizmine ait DNA fragmentlerinin RFLP öncesi görüntüsü. M: 100 bp'lik markeri, 1-10: 107 bp'lik PCR bantlarını göstermektedir.



**Şekil 4.2.** MnSOD Ala-9Val polimorfizmine ait genotiplerin RFLP sonrası görüntüsü. M: 100 bp'lik markeri, 1, 2, 4, 9: TC genotipi, 3, 5, 10:TT genotipi, 6, 7, 8: CC genotipini göstermektedir.

#### **4.1. MEME KANSERİNİN YAŞ GRUPLARINA GÖRE DAĞILIMI**

Örnek hacmimizde yer alan bireyler; <40, 40-49, 50-59 ve >60 olmak üzere 4 alt yaş grubuna ayrılarak ayrıntılı değerlendirildi. Kontrol grubumuzdaki 104 kişi yaş gruplarına göre miktar ve oransal dağılımı incelendiğinde; <40 yaş:17 kişi (%16.35), 40-49 yaş: 38 kişi (%36.53), 50-59 yaş: 35 kişi (%33.65) ve >60: 14 kişi (%13.46) şeklindedir. Deney grubumuzu oluşturan meme kanserli 83 bireyin yaş gruplarına göre miktar ve oransal dağılımı ise; <40 yaş:13 kişi (%15.67), 40-49 yaş: 22 kişi (%26.51), 50-59 yaş: 30 kişi (%36.14) ve >60: 18 kişi (%21.68) şeklindedir.

Meme kanseri ile yaş ilişkisini belirlemek üzere yapmış olduğumuz değerlendirildiğinde: Yukarıdaki oransal değerlerden de görüleceği gibi Meme kanserinin 40 yaş civarında ortaya çıktığı, 50 yaş civarında artan bir oranla en yüksek seviyeye ulaştığı, bu artışın 60 yaş üzerinde daha düşük bir düzeyde (%21.68) devam ettiği görülmektedir. Yaş ile meme kanserinin görülme sıklığı arasındaki ilişkiyi belirlemek üzere yapılan istatistiksel değerlendirmede 40 yaşından sonra yaş artışına paralel olarak meme kanseri görülme riskinin arttığı saptanmıştır ( $p<0.05$ ).

#### **4.2. MnSOD GENİ ALA-9VAL POLİMORFİZMİNE AİT ALLEL ve GENOTİP ORANLARIYLA MEME KANSERİ İLİŞKİSİ**

##### **4.2.1. MnSOD Geni Ala-9Val Polimorfizmine Ait Allellerin Kontrol Grubu ve Meme Kanserlilere Göre Dağılımı**

Ala-9Val Polimorfizmi allellere ait bulgular incelendiğinde; Kontrol grubunda toplam 208 allelin: 139'u T alleli ve 69'ı C alleli, meme kanserlilerde ise toplam 166 allelin: 127'si T alleli ve 39'ı C alleli olarak belirlendi. Kontrol grubu ve meme kanserlilerdeki allel oranları karşılaştırıldığında; kontrol grubunda T alleli %66.8 iken meme kanserlilerde %76.5, C alleli kontrol grubunda %33.2 iken meme kanserlilerde %23.5 olarak bulunmuştur ( $p>0.05$ ) (Çizelge 4.3.). Allel frekanslarına dair bulgulardan anlaşılacağı üzere allel frekansları ile meme kanseri riski arasında doğrudan bir ilişki görülmemektedir.



**Çizelge 4.1.** MnSOD geni Ala-9Val polimorfizminin allel frekansları

MnSOD Ala-9Val Allelleri	GRUP			
	KONTROL		MEME KANSERLİ	
	Allel sayısı (n)	Oran (%)	Allel sayısı (n)	Oran (%)
<b>T Allel Frekansı</b>	139	66.8	127	76.5
<b>C Allel Frekansı</b>	69	33.2	39	23.5

#### 4.2.2. MnSOD Geni Ala-9Val Polimorfizmine Ait Genotiplerin Kontrol Grubu ve Meme Kanserlilere Göre Dağılımı

Ala-9Val Polimorfizminin genotip bulguları incelendiğinde; kontrol grubunda toplam 104 bireyden, 46 bireyin TT, 47 bireyin TC ve 11 bireyin ise CC genotipine sahip olduğu belirlendi. Meme kanserli 83 bireyden, 50 bireyin TT, 27 bireyin TC ve 6 bireyin CC genotipinde olduğu saptandı. Kontrol grubu ve meme kanserlilerdeki genotip oranları karşılaştırıldığında; kontrol grubunda TT %44.2 iken meme kanserlilerde %60.2'ye yükselmiştir ( $p<0.05$ ), TC kontrol grubunda %45.2 iken meme kanserlilerde %32.6'ya düşmüştür ( $p<0.05$ ), CC genotipi ise kontrol grubunda %10.6 iken meme kanserlilerde %7.2 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4.). Genotip oranları ile meme kanserine yakalanma riski ilişkisine dair değerlendirmelerde; TT genotipi ile meme kanser birlikteliği artarken, TC genotipinde azalmaktadır.

**Çizelge 4. 2..** MnSOD geni Ala-9Val polimorfizminin genotip frekansları

MnSOD Ala-9Val Genotipleri	GRUP			
	KONTROL		MEME KANSERLİ	
	Birey Sayısı N	Oran (%)	Birey Sayısı N	Oran (%)
<b>TT</b>	46	44.2	50	60.2
<b>TC</b>	47	45.2	27	32.6
<b>CC</b>	11	10.6	6	7.2

Örnek hacmimizdeki allel ve genotip oranları ile meme kanserine yakalanma riski arasındaki ilişkiyi meme kanserli bireylerin menopoz durumlarına göre (premenopoz ve postmenopozal) ayrıntılı olarak değerlendirdiğimizdeyse allel frekansları; premenopozal kontrol grubunda Timin %65.1 iken meme kanserlilerde %73.5, Sitozin alleli ise kontrol grubunda %34.9 iken meme kanserlilerde %26.5'dir. Post menopozal kontrol grubunda Timin %68.6 iken meme kanserlilerde %78.6, C alleli ise kontrol grubunda %31.4 iken meme kanserlilerde %21.4'dir. Allel frekansı bulguları üzerinde yapılan istatistiksel değerlendirmelerde; Timin veya Sitozin allel frekansları her iki alt grup için fark göstermemiştir. Genotip oranları; premenopozal kontrol grubunda TT %43.4, TC %43.4 ve CC %13.2 iken, meme kanserlilerde TT %58.9, TC %29.5 ve CC %11.6'dır. Postmenopozal kontrol grubunda TT %45.1, TC %47.1 ve CC %7.8 iken Meme kanserlilerde TT %61.2, TC %34.7 ve CC %4.1'dir. Genotip oranlarına dair bulgular üzerinde yapılan istatistiksel değerlendirmelerde; premenopozal kontrol grubunda TT genotipi %43.4 iken meme kanserlilerde %58.9'a yükselmiş, TC %43.4 iken meme kanserlilerde %29.5'e düşmüştür ( $p<0.05$ ). Postmenopozal kontrol grubunda TT genotipi kontrol grubunda %45.1 iken meme kanserlilerde %61.2'ye yükselirken, TC %47.1'den meme kanserlilerde %34.7'ye düşmüştür ( $p<0.05$ ). Bu değerlendirmeden görüleceği üzere; Meme kanseri ile birliktelik yabancı genotip olan TT uyumlu iken, TC heterozigot genotipte azalma göstermektedir.

**Çizelge 4.3.** Premenopozal ve Postmenopozal kadınlarda MnSOD geni Ala-9Val polimorfizminin allel ve genotip oranlarının Kontrol Grubu ve Meme Kanserlilerde dağılımı

			Premenopozal Grup		Postmenopozal Grup	
Allel Sıklığı		n (%)	Kontrol Grubu	Meme Kanserli	Kontrol Grubu	Meme Kanserli
			T	69 (65.1)	50 (73.5)	70 (68.6)
C	37 (34.9)	18 (26.5)	32 (31.4)	21 (21.4)		
Genotip Sıklığı	TT	23 (43.4)	20 (58.9)	23 (45.1)	30 (61.2)	
	TC	23 (43.4)	10 (29.5)	24 (47.1)	17 (34.7)	
	CC	7 (13.2)	4 (11.6)	4 (7.8)	2 (4.1)	

### 4.3. MEME KANSERİ OLUŞUMUNDA ETKİLİ OLAN RİSK FAKTÖRLERİ

Meme kanseri oluşumunda etkili olan risk faktörleri başlığı altında sigara kullanımı, menarş yaşı, ilk hamilelik yaşı, BMI, eğitim ve menopoz yaşı değerlendirmeye alınmıştır. Bu risk faktörlerinden sadece ailede meme kanseri öyküsü bulunması ile meme kanserine yakalanma riskinin arttığı saptanmıştır (p=0.009). Meme kanseri oluşumuna etki eden risk faktörlerine ait bulgular çizelge 4.6'da verilmiştir.

Sigara kullanımının meme kanserine yakalanma riski açısından rolünün olup olmadığı araştırıldığında; Kontrol grubunda yer alan 104 kişiden 29 kişi sigara kullanırken, 75 kişi kullanmamaktadır. Meme kanserlilerde ise toplam 83 kişiden 21 kişi kullanırken 62 kişi kullanmamaktadır. Yapılan istatistiksel değerlendirmelerde sigara kullanımı ile meme kanseri arasında ilişki olmadığı belirlenmiştir (p=0.89).

Menarş yaşı ile meme kanserine yakalanma riski arasındaki olası ilişkiyi belirlemek için yaptığımız çalışmada 10-13 yaş aralığında: Kontrol grubunda yer alan 104 kişiden 63 kişi (%55.26) yer alırken, meme kanserlilerde 83 kişiden 42 kişi (%50.63) yer almaktadır. 14-18 yaş aralığında kontrol grubunda 41 kişi (%35.96) yer alırken meme kanserlilerde 41 kişi (%49.3) yer almaktadır. Meme kanserine yakalanma riski ile menarş yaşı arasında bir ilişki saptanmamıştır (p=0.26).

Meme kanserine yakalanma riski ile ilk hamilelik yaşı ilişkisini belirlemeye yönelik yaptığımız değerlendirmede: Kontrol grubunda yer alan çocuk sahibi 98 kişiden 45 kişi (%45.91) 20 yaş altında, 53 kişi (%54.09) ise 20 yaş üstündedir. Meme kanserlilerde çocuk sahibi 77 bayandan; ilk hamilelik yaşı 20 yaş altında 29 kişi (%37.66), 20 yaş üzerinde ise 48 kişi (%62.34) yer almaktadır. Anne olma yaşı ile meme kanserine yakalanma riski arasında ilişki belirlenmemiştir (p=0.23).

Meme kanserine yakalanma riski açısından beden kitle indeksi değerlendirildiğinde: Kontrol grubunda 36 (%34.61) kişinin beden kitle indeksi 25'in altında, 68 (%65.38) kişinin ise 25'in üstünde bulunmuştur. Meme kanserlilerde ise <25 için 18 (%21.68) kişi ve >25 için 65 (%78.32) kişi değerleri belirlenmiş olup meme kanseri ile ilişki olmadığı bulunmuştur (p=0.51).

Ailede meme kanseri öyküsüne sahip (birinci dereceden akrabalarda) en az bir meme kanserli kişi bulunma ile meme kanserine yakalanma arasındaki ilişkiyi değerlendirdiğimizde: Kontrol grubunda 6 (%5.76) kişide, Meme kanserlilerde 18

(%21.68) kişide en az bir yakınında meme kanseri öyküsü mevcuttur. Buna göre, aile öyküsünde meme kanserli yakını olma meme kanserine yakalanma riskini arttırmaktadır (p=0.009).

Eğitim durumu ile meme kanserine yakalanma riski arasındaki ilişkiyi belirlemek için kontrol grubu ve meme kanserliler eğitim durumu yüksek okul mezunu olanlar ve olmayanlar olarak iki gruba ayrıldı. Yüksek öğrenimliler kontrol grubunda 16 (%15.38) iken meme kanserlilerde 11 (%13.25) kişiden oluşmuştur. Öğrenim durumu yüksek öğrenimin altında yer alanlar kontrol grubunda 88 (%84.61) kişi, meme kanserlilerde ise 72 (%86.74) kişiden oluşmaktadır. Yüksek öğrenim yapma ile meme kanseri arasındaki ilişki saptanmamıştır (p=0.52).

**Çizelge 4.4.** Meme kanserinde rol oynadığı düşünülen risk faktörlerinin Kontrol ve Meme Kanserli Gruplarına göre değerlendirilmesi

	<u>Kontrol/Meme Kanserli</u>	<u>Odds Oranı</u>	<u>p</u>
<b>Sigara Kullanımı</b>			
Yok	75/62	Referans	–
Var	29/21	0.95 (0.45-2.01)	0.89
<b>Menarş Yaşı</b>			
10-13 Yaş	63/42	0.68 (0.35-1.32)	0.26
14-18 Yaş	41/41	Referans	–
<b>İlk Hamilelik Yaşı</b>			
<20 Yaş	45/29	Referans	–
>20 Yaş	53/48	0.67 (0.34-1.29)	0.23
<b>Menopoz</b>			
Premenopozal	53/34	0.99 (0.39-2.52)	0.99
Postmenopozal	51/49	Referans	–
<b>Beden Kitle İndeksi</b>			
<25	36/18	Referans	–
>25	68/65	1.27 (0.61-2.63)	0.51
<b>Aile Meme Kanseri Öyküsü</b>			
Yok	96/65	Referans	–
Var	6/18	0.28 (0.11-0.72)	0.009
<b>Eğitim</b>			
Yüksek okul mezunu	16/11	Referans	–
Yüksek okul mezunu değil	88/72	0.74 (0.29-1.85)	0.52

Örnek hacmimiz; Menopoz durumuna göre, meme kanserinde etkili olduğu düşünülen risk faktörleri ile meme kanserine yakalanma riski arasındaki ilişki açısından

ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar çizelge 4.7’de verilmiştir. Kontrol grubu 53 (%50.96) premenopozal kişiden ve 51 (%49.04) postmenopozal kişiden oluşmaktadır. Meme kanserliler ise 34 (%40.96) premenopozal ve 49 (%59.03) postmenopozal kişiden oluşmaktadır. Menopoz durumu ile meme kanserine yakalanma arasında bir ilişki belirlenmemiştir (p=0.99).

**Premenopozal grupta:** Kontrol grubunun %15.09’u yüksek okul mezunu iken meme kanserli grupta %17.64 kişi yüksek okul mezunudur. Kontrol grubunda menarş yaş ortalaması 13.37±1.09 iken meme kanserli grupta ise 13.55±1.43’dir. İlk hamilelik yaş ortalaması kontrol grubunda 21.95±4.27, meme kanserli bireylerde 21.87±2.68’dir. Beden kitle indeksi ortalaması kontrol grubunda 26.30±4.62, meme kanserli bireylerde 27.82±3.29’dir. Kontrol grubunun %3.77’sinde aile öyküsü mevcutken meme kanserlilerin %26.7’sinde mevcuttur. Sigara kullanımı kontrol grubunun %37.73, meme kanserli grubun %29.41’inde mevcuttur. Premenopozal grupta meme kanserine yakalanma riski artışı, sadece aile öyküsünde meme kanserli yakını bulunma faktöründe ön plana çıkmıştır (p=0.01).

**Postmenopozal grupta:** Yüksek öğrenimliler kontrol grubunda %15.68 iken meme kanserli grupta %10.20 dir. Kontrol grubunda menarş yaş ortalaması 13.52±1.54 iken meme kanserli grupta ise 13.46±0.98’dir. İlk hamilelik yaş ortalaması kontrol grubunda 22.20±5.53, meme kanserli bireylerde 21.75±4.35’dir. Beden kitle indeksi ortalaması kontrol grubunda 28.87±5.45, meme kanserli bireylerde ise 27.81±3.54’dir. Ailede meme kanseri öyküsü kontrol grubunda %11.76 iken meme kanserlilerde %18.36’dir. Kontrol grubunda sigara kullanımı %17.64 iken meme kanserli grupta %22.44’dir. Postmenopozal grupta göğüs kanserinde etkili olduğu düşünülen risk faktörlerinden meme kanserine yakalanma riskini etkileyen bulunmamıştır (p>0.05).

**Çizelge 4.5.** Meme kanserinde rol oynadığı düşünülen risk faktörlerinin Kontrol Grubu ve Meme Kanserlilerde Menopoz durumuna göre dağılımı

	<b>Kontrol</b>	<b>Meme Kanserli</b>
<b>Premenopozal</b>		
Eğitim (%)	15.09	17.64
Menarş Yaşı (± )	13.37±1.09	13.55±1.43
İlk Hamilelik Yaşı (±)	21.95±4.27	21.87±2.68
Beden Kitle İndeksi (±)	26.30±4.62	27.82±3.29
Aile Meme Kanseri Öyküsü (%)	3.77	26.47
Sigara (%)	37.73	29.41
<b>Postmenopozal</b>		
Eğitim (%)	15.68	10.20
Menarş Yaşı (mean)	13.52±1.54	13.46±0.98
İlk Hamilelik Yaşı (mean)	22.20±5.53	21.75±4.35
Beden Kitle İndeksi (mean)	28.87±5.45	27.81±3.54
Aile Meme Kanseri Öyküsü (%)	11.76	18.36
Sigara (%)	17.64	22.44

## 5. TARTIŞMA

Manganez Süperoksid Dismutaz geninin Ala-9Val polimorfizmi ile meme kanseri riski arasındaki ilişkinin araştırıldığı bu çalışmada elde edilen bulgular aynı zamanda Mersin ili bazında Türk popülasyonuna ait değerleri oluşturmuştur. Bu amaçla, kontrol grubu ve meme kanserlilerden oluşan hasta gruplarına ait bireylerden izole edilen DNA örnekleri PCR-RFLP yöntemleri ile analiz edilerek genotiplendirme yapılmıştır. Bulgular meme kanseriyle yaş ilişkisi, allel ve genotip frekansları ile meme kanserine yakalanma riskinin incelenmesi ve göğüs kanserinde etkili olduğu düşünülen risk faktörlerinin meme kanseri ile ilişkisi başlıkları altında toplanmıştır.

Meme kanserinin yaş gruplarına göre dağılımını belirlemek üzere meme kanserli bireylerin yaş gruplarına göre oransal dağılımı incelendiğinde 40 yaşın altındakiler %15.67, 40-49 yaş aralığındakiler %26.51, 50-59 yaş aralığındakiler %36.14 ve 60 yaşın üzerindeki ise %21.68 şeklinde sıralanmaktadır. Değerlerden de görüleceği üzere meme kanseri 40 yaş civarında ortaya çıktığı, 50 yaş üzerine kadar artan bir ivme ile artış gösterdiği, 60 yaş üzerinde ise artış eğrisinin düştüğü belirlenmiştir ( $p<0.05$ ). Meme kanserine yakalanma yaşı ile ilgili bulgularımızı genel bilgiler bölümünde verilen: Mettlin ve ark. (15) tarafından verilen oranlarla uygunluk göstermektedir.

MnSOD ekson 2 (Ala-9Val) polimorfizminin allel oranları meme kanseri ile ilişkisi incelendiğinde; kontrol grubunda T allel frekansı 66.8 iken meme kanserlilerde 76.5'dir ( $p>0.05$ ). Kontrol grubunda C allel frekansı 33.2 iken meme kanserlilerde 23.5'dir ( $p>0.05$ ). Allel frekanslarıyla meme kanseri riski artışı arasında bir ilişki belirlenmemiştir.

Genotiplendirme sonucunda hasta ve kontrol grubundaki bireyler MnSOD ekson 2 (Ala-9Val) polimorfizmi bakımından değerlendirildiğinde; TT, TC ve CC genotiplerinin kontrol grubu bireylerdeki dağılımı sırasıyla %44.2, %45.2 ve %10.6 iken meme kanserlilerde ise %60.2, %32.6, %7.2 'dir. Yapılan değerlendirmelerde TT genotipinin artışı, TC genotip oranının düşmesi meme kanserine yakalanma riskini arttırmaktadır.

Allel ve Genotip oranlarıyla meme kanserine yakalanma riskinin menopoza durumuna göre değerlendirilmesinde; Timin veya Sitozin allel frekansları hem premenopoz hem de postmenopozal grupta meme kanserine yakalanma riskini

etkilemediği saptanmıştır. Premenopozal ve postmenopozal grupta genotip oranları ile meme kanserine yakalanma riski arasındaki ilişkiyi değerlendirdiğimizde; hem premenopozal alt grupta hem de postmenopozal alt grupta TT genotip oranının artması, TC genotip oranının ise azalması meme kanserine yakalanma riskini arttırmada ilişkili bulunmuştur.

Ambrosina ve ark.(11) Batı Newyork'da, 295 kontrol ve 266 meme kanserli ile yaptıkları çalışmada premenopozal kadınlarda TT, TC ve CC genotipleri kontrol grubunda 25(%23), 62(%56) ve 23(%21) iken meme kanserlilerde 16(%14), 53(%46), ve 45(%40) olarak belirlemişlerdir. Post menopozal kadınlarda ise TT, TC ve CC sırasıyla kontrol grubunda 38(%20), 107(%58) ve 40(%22) iken meme kanserlilerde aynı oranları 23(%15), 84(%55) ve 45(%30) şeklinde belirlemişlerdir. CC genotipine sahip premenopozal bireylerin göğüs kanserine yakalanma riskinin dört kat yüksek olduğunu (Odds Oranı: 4.3) saptamışlardır.

Kocabaş ve ark.(68) çalışmaları 103 kontrol ve 84 meme kanserli birey üzerinde yaptıkları çalışmada TT, TC, CC genotiplerinin frekanslarını; kontrol gruplarında 0.27, 0.39, 0.37 ve meme kanserlilerde 0.33, 0.45, 0.22 olarak saptamışlardır. MnSOD Sitozin allelinin sıklığında vaka ve meme kanserliler arasında fark olmadığını tespit etmişlerdir (Odds Oranı:0.86, p=0.67). CC genotipini taşıyan premenopozal kadınları TT genotipini taşıyan kadınlar ile karşılaştırmışlar ve CC genotipini taşıyan premenopozal kadınlarda pozitif ilişki bulamamışlardır (OR: 0.43). Meme kanseri riskini özellikle BMI >24 olan Sitozin genotipli kadınlarda Timin genotipli kadınlardan 1.5 kat daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir (OR: 1.42).

Mitrunen ve ark. (79) Finlandiya'da yaşayan Kafkas kökenli 482 kontrol ve 483 meme kanserli birey ile yaptıkları çalışmada: Kontrol grubunda TT, TC, CC genotip oranlarının %31.7, %47.9 ve %20.3, meme kanserlilerde ise %25.9, %53.2 ve %20.9 olduğunu saptamışlardır. Kontrol grubundaki premenopozallarda aynı oranlar %30.4, %52.0 ve %17.6 şeklinde iken meme kanserlilerde %28.0, %50.2 ve %22.0 olarak bulmuşlardır. Postmenopozal kontrol grubunda %32.7, %45.0 ve %22.3, meme kanserlilerde ise %24.8, %54.9 ve %20.3 genotipine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. C alleleline sahip bireylerde meme kanserine yakalanma riskinin birbuçuk kat arttığını saptamışlardır. Ağır sigara kullanan ve CC genotipli postmenopozal kadınlarda artan risk (Odds Oranı:3.7) bulmuşlardır.



Cai ve ark. (80) Shanghai'de 1197 kontrol ve 1125 meme kanserli bireyden oluşan çalışmalarındaki kontrol ve deney grubundaki genotip oranlarını: TT %73.9-%73.9, TC %24.2-%23.6 ve CC %1.9-%2.5 olarak tespit etmişlerdir. Kontrol grubunda premenopozal kadınlarda TT +TC %98.4, CC %1.6 meme kanserlilerde TT+TC %97.2, CC %2.8 (Odds Oranı:1.8) iken, aynı değerleri kontrol grubu postmenopozal kadınlarda %97.4, %2.6, meme kanserlilerde %98.1, %51.9 olarak bulmuşlardır (Odds Oranı:0.8). Yüksek beden kitle indeksine sahip premenopozal bireylerde CC genotipi ile meme kanseri arasında ilişki bulmuşlardır (Odds Oranı:2.5). Erken menarş ve CC genotipi birlikteliği olan premenopozal kişilerle de meme kanserini ilişkilendirmişlerdir (Odds Oranı:2.6). Ancak sitozin allelinin sıklığını araştırmayı yaptıkları toplumda, Japonya (%14.1) ve Çin (%11.5)'de olduğu gibi düşük oranda (%14) buldukları için verdikleri odds oranının istatistiksel değerinin önemli olmadığı vurgulamışlardır.

Egan ve ark (70) Amerika'da 502 kontrol ve 476 meme kanserliden oluşan 978 kişide meme kanseri ve risk faktörleri arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada 978 kişinin kontrol grubundaki dağılımı; TT %26, TC %49, CC %26 ve meme kanserlilerde dağılımı ise %21, %53, %25 olarak bulmuşlardır. Premenopozal kontrol grubunda %30, %44, %26 ve meme kanserlilerde dağılımı ise %21, %57, %21 iken postmenopozal kontrol grubunda %24, %50, %25 ve meme kanserlilerde dağılımı ise %22, %51, %27 olarak tespit etmişlerdir. CC veya TC genotiplilerle (Odds Oranı: 1.27) TT genotipli kadınları (Odds Oranı:1.18) karşılaştırdıklarında relatif riski önemsiz olarak değerlendirmişlerdir. Timin genotipli kadınlarla Sitozin genotipli kadınları karşılaştırdıklarında BMI  $\geq$ 25 olanlarda (p=0.12), sigara kullananlarda (p=0.63) meme kanseri riskinde artış bulmamışlar ve meme kanserinin gelişimi ile Ala-9Val MnSOD polimorfizminin ilişkisini desteklememişlerdir.

Millikan ve ark. (81) 1812 kontrol grubu (677 zenci ve 1135 beyaz) ve 2025 meme kanserli (760 zenci- 1265 beyaz) ile Kuzey Karolina yaptıkları çalışmada TT, TC, CC genotiplerini; zencilerde, kontrol grubunda %29, %53, %18, meme kanserlilerde ise %34, %49, %17 olarak beyazlarda ise kontrol grubunda %23, %52, %25 meme kanserlilerde %21, %54, %25 olarak bulmuşlardır. Çalışmalarında premenopozal grupta kontrol grubu dağılımı TT %23.9, TC %53.2, CC %22.9, meme kanserlilerde TT %24.7, TC %53.0, CC %22.3 iken postmenopozal grupta kontrol grubunda TT %26.7, TC %51.1, CC %22.2, meme kanserlilerde TT %27.5, TC %51.2 ,

CC %21.3'dir. Sigara kullanımı ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi 20 yıldan uzun süre içenlerde belirlemişlerdir. Zencilerde veya beyazlarda meme kanserinin gelişimi ile Ala-9Val MnSOD polimorfizminin, uzun süre(>20 yıl) sigara içenlerle iyonize radyasyona maruz kalanlar dışındaki faktörlerle ilişkisini bulamamışlardır.

Akyol ve ark. (9) 94 sağlıklı birey ile yaptıkları çalışmada kadınlarda TT, TC, CC genotip % oranlarını; 24.5, 70.2, 5.3 olarak bulurken Gren H ve ark. (82) kontrol grubunda TT, TC, CC genotip % oranlarını; 22.2, 61.1, 16.7, meme kanserlilerde 33.3, 43.6, 23.1 tespit etmişlerdir.

Van Landeghem ve ark. (83). MnSOD Ala-9Val polimorfizminin etnik dağılımını incelediği çalışmasında Finlilerde TT, TC, CC genotip dağılımını %28, %49, %23, İsveçlilerde %34, %50, %16, Litvanyalılarda %14, %60, %26 ve Çinlilerde %42, %55, %3 olarak belirlemişlerdir.

Sonuç olarak, yabanıl T alleli ile polimorfik C alleli oranlarının kontrol ve deney gruplarında farklılık göstermediği şeklindeki bulgumuzu literatür bulgularıyla kıyasladığımızda; Kocabaş ve ark.(68), Cai ve ark.(80), Egan ve ark.(70) ve Millikan ve ark.(81)'i çalışmalarındaki bulgularla birbirini desteklemektedir. Allel frekansları (Kontrol için T: %66.8, C: %33.2, Meme kanserliler için T: %76.5, C: %23.5) ve genotip oranlarını (Kontrol için TT: %44,2, TC: %45,2 ve CC: %20.6, Meme kanserliler için TT: %60,2, TC: %32,6 ve CC: %7.2) oransal olarak kıyasladığımızda ise; Türk popülasyonunun Mersin ili örnekleme dair allel frekansı bulgularımız; Türk popülasyonunun Elazığ ili örneklemini yansıtan Akyol ve ark.(9) Kontrol grubundaki allel frekansı ile kısmen benzerlik gösterirken, Kocabaş ve ark.(68) Ankara örneklemini yansıtan kontrol grubu bulgular ise bizim bulgularımızın tersine T frekansı düşük, C frekansı ise daha yüksektir. Meme kanserlilere ait T ve C frekansları ise Timinin Sitozine göre yüksek olması açısından benzerlik gösterirken oransal olarak ciddi şekilde T frekansları daha düşük, C frekansları ise daha yüksektir. Cai ve ark.(80) Şangay popülasyonuna ait kontrol ve meme kanserlilerdeki T ve C allel frekansı değerleri, Millikan ve ark.(81) Amerikan zenci popülasyonuna ait kontrol ve meme kanserlilerdeki T ve C allel frekansı değerleri, Green ve ark.(82) İngiliz popülasyonuna ait kontrol ve meme kanserlilerdeki T ve C allel frekansı değerleri, Van Landeghem ve ark. (83) Fin, İsveç ve Çin popülasyonuna ait kontrol grubundaki T ve C allel frekansı değerleri T oranının yüksek, C oranının düşük olması açısından bulgularımızla

benzerlik gösterirken oransal açıdan farklılıklar içermektedir. Bizim bulgularımıza en yakın oranlar; Van Landeghem'in Çin populasyonuna ait değerleridir. Bizdeki kontrol ve meme kanserli grup için T oranının yüksek C frekansının düşük olduğu şeklindeki bulgumuzun tersine T oranı düşük, C oranı yüksek olan çalışmalar ise; Ambrosana ve ark.(11) Batı Newyork örnekleme meme kanserlilerde, Egan ve ark (70) Amerika populasyonu meme kanserlilerde, Millikan ve ark.(81)'nin Amerikan beyaz populasyonuna meme kanserlilerde, Van Landeghem ve ark.(83)'nin Litvanya populasyonuna kontrol grubuna ait değerlerle farklılık göstermektedir.

Genotip oranlarını kontrol grubu için TT: %44.2, TC: %45.2 ve CC: %10.6, meme kanserliler için TT: %60.2, TC: %32.6 ve CC: %7.2 değerlerini oransal olarak kıyasladığımızda; Mersin ili örnekleme dair genotip oranları bulgularımızı; Türk populasyonunun Elazığ örnekleme yansıtan Akyol ve ark.(9) kontrol grubundaki TT oranı bizim değerimizden düşük TC ve CC oranı ise bizim değerimizden oldukça yüksektir. Kocabaş ve ark.(68)'nin Ankara örnekleme yansıtan kontrol grubu genotip oranları CC bizde daha düşük, meme kanserlilerde TT bizde daha yüksek iken CC daha düşüktür. Bizim hem kontrol hemde meme kanserlilerde TT genotip oranının daha yüksek, CC genotip oranının daha düşük olduğu şeklindeki bulgumuz; Cai ve ark.(80) Şangay populasyonuna ait kontrol ve meme kanserlilerdeki, Millikan ve ark.(81) Amerikan zenci populasyonuna ait kontrol ve meme kanserlilerdeki, Green ve ark.(82) İngiliz populasyonuna ait kontrol ve meme kanserlilerdeki, Van Landeghem ve ark.(83)'nin Fin ve İsveç ve Çin populasyonuna ait kontrol grubundaki bulgularla birbirini desteklemektedir. Bizdeki kontrol ve meme kanserli grup için TT oranının yüksek CC frekansının düşük olduğu şeklindeki bulgumuzun tersine TT oranı düşük, CC oranı yüksek olan çalışmalar ise; Ambrosana ve ark.(11) Batı Newyork örnekleme meme kanserlilerde, Egan ve ark (70)'ı Amerika populasyonu meme kanserlilerde, Millikan ve ark. (81) Amerikan beyaz populasyonuna meme kanserlilerde, Van Landeghem ve ark.(83)'nin Litvanya populasyonuna kontrol grubuna ait değerlerle farklılık göstermektedir.

Premenopoz ve postmenopozal gruplardaki kontrol grubu ve meme kanserlilerdeki allel frekanslarını incelediğimizde Timin veya Sitozin allel frekansları her iki alt grup için fark göstermemiştir. Bulgularımızı literatür bulgularıyla kıyasladığımızda; Ambrosana ve ark.(11), Cai ve ark.(80), Egan ve ark.(70) ve Millikan ve ark.(81 )

bulguları oransal bazda farklılıklar içermekle beraber premenopozal ve postmenopozal alt grupların kontrol ve meme kanserli gruplarındaki Timin ve Sitozin allellerinin fark göstermediği şeklindeki bulgumuz birbirlerini desteklemektedir.

Premenopozal kontrol grubunda TT genotipi %43.4 iken meme kanserlilerde %58.9'a yükselmiş, TC %43,4 iken meme kanserlilerde %29.5'e düşmüştür ( $p<0.05$ ). Postmenopozal kontrol grubunda TT genotipi kontrol grubunda %45,1 iken meme kanserlilerde %61.2'ye yükselirken, TC %47.1'den meme kanserlilerde %34.7'ye düşmüştür ( $p<0.05$ ). Ambrosana ve ark.(11)'ı çalışmalarında premenopozal alt grup kontrol grubunda CC %23 iken meme kanserlilerde %45'e yükseldiğini, postmenopozal alt grup kontrol grubunda CC %22 iken meme kanserlilerde %30'a yükseldiğini belirlemişlerdir. Cai ve ark.(80) premenopozal ve postmenopozal alt grupların kontrol grubu ve meme kanserlilerdeki genotip oranları arasında fark olmadığını saptamışlardır. Egan ve ark.(70) premenopozal kontrol grubunda TC genotip oranını %44 iken meme kanserlilerde %57'ye yükseldiğini belirlemişlerdir. Millikan ve ark.(81) premenopozal ve postmenopozal alt grupların kontrol grubu ve meme kanserlilerdeki genotip oranları arasında fark olmadığını saptamışlardır. Premenopozal ve postmenopozal alt gruplarda kontrol grubundaki TT genotip oranının meme kanserlilerde yükseldiği ve TC oranının ise düştüğü şeklindeki bulgumuz çalışmamıza özgü bir bulgu olarak ortaya çıkmaktadır. Ambrosana ve ark.(11)'nin premenopoz ve postmenopozlarda CC'in kontrol grubuna göre meme kanserlilerde daha yüksek olduğu, Egan ve ark.(70)'nin premenopozlarda TC oranının meme kanserlilerde yüksek olduğu bulguları dışında tüm diğer genotipik oran bulgularımız birbirini desteklemektedir.

Çalışmamızdaki bireyler meme kanserinde etkili olduğu düşünülen risk faktörleri; sigara kullanımı, menarş yaşı, ilk hamilelik yaşı, beden kitle indeksi, eğitim durumu, menopoz yaşı ve aile öyküsünde meme kanserli bir yakınının olması durumlarına göre ayrıntılı olarak değerlendirmeye alınmıştır. Bu faktörlerden sadece aile öyküsünde meme kanserli yakını bulunanlarda meme kanserine yakalanma riskinin arttığı saptanmıştır ( $p=0.009$ ). Meme kanserinde etkili olduğu düşünülen risk faktörlerinden hiç birinin meme kanserine yakalanma riskini etkilediğine dair bir bulgu belirlenmemiştir.

Mitrunen ve ark.(79) ağır sigara kullanan ve CC genotipli postmenopozal kadınlarda artan risk bulmuşlardır. Egan ve ark (70) BMI  $\geq 25$ , sigara kullananlarla

meme kanseri riskinde artış bulmamışlar ve meme kanserinin gelişimi ile Ala-9Val MnSOD polimorfizminin ilişkisini desteklememişlerdir. Millikan ve ark. (81) sigara kullanımı ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi sadece >20 yıl kullananlarda belirlemişlerdir. Kocabaş ve ark.(68) sigara kullanımının meme kanseri için risk olmadığını ve BMI >24 olan Sitozin genotipli kadınlarda riskin Timin genotipli kadınlardan 1.5 kat daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir (OR:1.42). Cai ve ark.(80) BMI >24 olan premenopozal bireyler ve erken menarş olan premenopozal kişilerle meme kanserini ilişkilendirmişlerdir. Ambrosona ve ark. (11), premenopozal grupta aile öyküsünde meme kanserli yakını olan kişilerde meme kanserine yakalanma riskinin yüksek olduğunu, postmenopozal grupta ise fark olmadığını belirlemişlerdir.

Aile öyküsünde meme kanserli yakını olan premenopozal ve postmenopozal grup için Ambrosona ve arkadaşlarının bulgularıyla bizim bulgularımız bire bir uyuşmaktadır. Sigara kullanımının meme kanseri riskini etkilemediği şeklindeki bulgumuz; (79, 70, 81, 68)'in bulgularıyla örtüşürken sadece Mitrunen ve ark.(79) ve Millikan ve ark.(81) ağır sigara kullanan grubu için meme kanserin risk faktörü olduğunu saptamıştır. Yukarıdaki literatür bulgularında görüleceği gibi Meme kanserinde etkili olduğu düşünülen risk faktörlerinin çoğu bizim bulgularımızda olduğu gibi meme kanserine yakalanma açısından risk oluşturmamaktadır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

MnSOD ekson 2 Ala-9Val polimorfizminin meme kanserine yakalanma riski açısından ırksal farklılıklar gösterdiği bilgisinden hareketle; Çalışmamız Mersin ili örneklemindeki bu polimorfizmin meme kanserine yakalanma riskine olası etkisinin belirlenmesi temel hipotezimizi oluşturmuştur. Ayrıca meme kanserinin yaş gruplarına göre dağılımı ve meme kanserinde etkili olduğu düşünülen risk faktörlerinin meme kanseriyle ilişkisi araştırılmıştır.

Meme kanserinin 40 yaş civarında ortaya çıktığını ve 50 yaş civarında maksimum hızla artış gösterdiği 60 yaş üzerinde artış hızının azalarak devam ettiği belirlendi. T ve C allel frekansları genel olarak kontrol grubu ve meme kanserli grupta fark göstermediği gibi, ayrıca premenopoz ve postmenopozal alt grupta da meme kanserine yakalanma riskini etkilemediği saptanmıştır. Genotip oranlarıyla meme kanserine yakalanma riski açısından TT genotipinin artışı, TC genotip oranının ise düşmesi meme kanseriyle daha fazla birliktelik göstermektedir. Bu durum hem premenopozal hem de postmenopozal grup için geçerlidir. Genotip oranlarına ait bu bulgumuz çalışmamızı diğer çalışmalardan farklı kılan ve örnekleminimize karakteristik olan en özgün bulgumuzu oluşturmaktadır. Polimorfik CC genotipi meme kanserlilerde daha düşük miktarda görülmekle beraber bu farkın meme kanseri için risk faktörü olarak değerlendirilebilecek düzeye ulaşmadığı saptanmıştır. Meme kanseriyle olası ilişkisi açısından değerlendirmeye aldığımız sigara kullanımı, menarş yaşı, ilk hamilelik yaşı, beden kitle indeksi, eğitim durumu, menopoz yaşı ve aile öyküsünde meme kanserli bir yakınının olması faktörlerinden sadece aile öyküsünde meme kanserli yakını olmanın etkisi belirlenmiştir. Bu durum çalışmadaki bir diğer özgün bulgumuz olarak ortaya çıkmıştır. MnSOD ekson 2 Ala-9Val polimorfizminin Türk popülasyonundaki allel ve genotip oranlarını belirlemede, Elazığ örnekleminde Akyol ve arkadaşları, Ankara örnekleminde Kocabaş ve arkadaşlarından sonra bizim çalışmamız Mersin örneklemini oluşturmuştur. Bu nedenle Türk popülasyonda söz konusu gen polimorfizmi oranlarının belirlenmesine yönelik önemli bir katkı oluşturmuştur.

MnSOD ekson 2 Ala-9Val polimorfizminin yabancı genotipi olan TT (Valin) artışının, Hiroi ve ark.(84) kardiyomyopati, Wang ve ark.(85) akciğer kanseri, Matthey

ve ark.(86) romatoid artrit, Hori ve ark.(87) ise tardiv diskinezili şizofreni ile birliktelik gösterdiğini saptamışlardır. Çalışmamızda TT (Valin) genotip oran bulguları söz konusu hastalıkların kentimizdeki dağılımının belirlenmesine ve tanısına indirekt katkı sunabilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Topuz E, Aydın A, Dinçer M.** *Meme Kanseri*. 2. Baskı, Nobel Matbaacılık: Nobel tıp kitabevi, **2003**.
2. **Sherman CD, Calman KC, Eckhardt S, Elsebai I, Fırat D, Hossfeld DK, Salvadori PB.** Meme kanseri. *Klinik Onkoloji*. 5. Baskı, Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu, **1992**:236.
3. **Kumar V, Cotran RS, Robbins SL.** *Temel Patoloji*. 6. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. **2000**.
4. **Emerit I.** Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.*, **1994**; 16:99-109.
5. **Fridovich I.** Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, **1995**; 64:97-112.
6. **Hong YC, Lee KH, Yi CH, Ha EH, Christiani DC.** Genetic susceptibility of term pregnant women to oxidative damage. *Toxicology Letters*, **2002**; 129:255-262.
7. **Mitrunen K, Hirvonen A.** Molecular epidemiology of sporadic breast cancer the role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutation Research*, **2003**; 544:9-41.
8. **Mercan U.** Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *YYU Vet Fak Derg.*, **2004**; 15(1-2):91-96.
9. **Akyol O, Canatan H, Yılmaz RH, Yuce H, Ozyurt H, Sogut S, Gulec M, Elyas H.** PCR/RFLP- based cost-effective identification of SOD2 signal (leader) sequence polymorphism (Ala-9Val) using *NgoM IV: a detailed methodological approach*. *Clinica Chimica Acta*, **2004**; 345:151-159.
10. **Borgstahl GE, Parge HE, Hickey MJ, Johnson MJ, Boissinot M, Hallewell RA, Lepock JR, Cabelli DE, Tainer JA.** Human mitochondrial manganese süperoksidi Dismutase polymorphic variant Ile58Thr reduces activity by destabilizing the tetrameric interface. *Biochemistry*, **1996**; 35:4287-4297.
11. **Ambrosone CB, Freudenheim JL, Thompson PA, Bowman E, Vena JE, Marshall JR, Graham S, Laughlin R, Nemoto T, Shields PG.** Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) Genetic Polymorphisms, Dietary Antioxidants, and Risk of Breast Cancer. *Cancer Research*, **1999**; 59:602-606.
12. **McPherson K, Steel CM, Dixon JM.** ABC of breast diseases, breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*, **2000**; 321:624-628.
13. **Parkin DM.** Epidemiology of cancer: global patterns and trends. *Toxicol. Lett.*, **1998**; 102-103:227-234.
14. **Aydın A.** Menapoz ve Meme Kanseri. *Menapoz Tedavisi ve Kanser*. 2. Baskı, Universal Yayıncılık: Nobel Yayınevi, **2001**: 633-694.
15. **Mettlin C.** Global breast cancer mortality statistics. *CA Cancer J Clin*, **1999**; 49:138-144.
16. **Greenlee RT, Murray T, Bolden S.** Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*, **2000**; 50:7-33.



17. Erişim: [www.gata.edu.tr/dahili\\_bilimler/onkoloji/kanser-epidemiyojisi.htm](http://www.gata.edu.tr/dahili_bilimler/onkoloji/kanser-epidemiyojisi.htm). Erişim Tarihi: 27.10.2006.
18. **Dunning AM, Healey CS, Pharoah PD, Teare MD, Ponder BA, Easton DF.** Asystematic review of genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **1999**; 8:843-854.
19. **Henderson BE, Feigelson HS.** Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **2000**; 21:427-433.
20. **Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K.** Environmental and heritable factors in the causation of cancer-analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland, N. Engl. *J. Med*, **2000**; 343:78-85.
21. **Rebbeck TR.** Inherited genetic predisposition in breast cancer .*A population-based perspective, Cancer*, **1999**; 86:2493-2501.
22. **Jefcoate CR, Liehr JG, Santen RJ, Sutter TR, Yager JD, Yue W, Santner SJ, Tekmal R, Demers L, Pauley R, Naftolin F, Mor G, Berstein L.** Tissue-specific synthesis and oxidative metabolism of estrogens. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, **2000**; 27:95-112.
23. **Özçelik T.** Kalıtsal Meme Kanseri ve BRCA-1-BRCA-2 Genleri. *7. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi*. **2001**:53-1.
24. **Baykal Y, Özet A, Güran Ş, Özet G.** P53 ve Onkogenezdaki Rolü. *Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi*, **1996**; 6(2):111-115.
25. **Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF.** Genetik ve Kanser. *Thompson & Thompson Tıbbi Genetik*.6. Baskı, İstanbul: Öncü Basımevi, **2005**: 34.
26. **Li Z, Khaletskiy A, Wang J, Wong JYC, Oberley LW, Li JJ.** Genes regulated in human breast cancer cells overexpressing manganese-containing Superoxide Dismutase. *Free Radical Biology & Medicine*, **2001**; 3:260-267.
27. **Johnson-Thompson MC.** Guthrie, Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. *Cancer*, **2000**; 88:1224-1229.
28. **Rutter J, Chatterjee N, Wacholder S, Struwing J.** The HER2 I655V polymorphism and breast cancer risk in Ashenazim. *Epidemiology*, **2003**; 14:694-700.
29. **Dalay N.** Meme Kanserinde Moleküler Mekanizmalar. *Moleküler Kanser Sempozyumu*. İzmir, **2004**:62-63.
30. **Kabuto M, Akiba S, Stevens RG, Neriishi K, Land CE.** A prospective study of estradiol and breast cancer in Japanese women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* ,**2000**; 9:575-579.
31. **Russo J, Hu YF, Yang X, Russo IH.** Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer (in process citation). *J.Natl. Cancer Inst. Monogr.*, **2000**; 27:17-37.
32. **Lipworth, Bailey LR, Trichopoulos D.** History of breast-feeding in relation to breast cancer risk: a review of the epidemiologic literature, *J. Natl. Cancer Inst.*, **2000**; 92:302-312.
33. **Huang WY, Newman B, Millikan RC, Schell MJ, Hulka BS, Moorman PG.** Hormone-related factors and risk of breast cancer in relation to estrogen receptor and progesterone receptor status. *Am. J. Epidemiol*, **2000**; 151:703-714.

34. **Enger SM, Ross RK, Paganini-Hill A, Carpenter CL, Bernstein L.** Body size, physical activity, and breast cancer hormone receptor status: results from two case-control studies (in process citation). *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, **2000**; 9:681-687.
35. **Schairer C, Lubin J, Troisi R, Sturgeon S, Brinton L, Hoover R.** Estrogen-progestin replacement and risk of breast cancer. *JAMA*, **2000**; 284:691-694.
36. **Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J.** Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA*, **2002**; 288:321-333.
37. **Garner CE, Burka LT, Etheridge AE, Matthews HB.** Catechol metabolites of polychlorinated biphenyls inhibit the catechol-O-methyltransferase-mediated metabolism of catechol estrogens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2000**; 162:115-123.
38. **Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov K.** Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, **2000**; 9:3-28.
39. **Hein DW, Doll MA, Freatland AJ, Leff MA, Webb SJ, Xiao GH, Devanaboyina US, Nangju NA, Feng Y.** Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **2000**; 9:29-42.
40. **Gilks CB, Price K, Wright JL, Churg A.** Antioxidant gene expression in rat lung after exposure to cigarette smoke. *Am. J. Pathol.* **1998**; 152:269-278.
41. **Pryor WA.** Cigarette smoke radicals and the role of free radicals in chemical carcinogenicity. *Environ. Health Perspect.*, **1997**; 105:875-882.
42. **Marnett LJ.** Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. **2000**; 21:361-370.
43. **Sugimura T.** Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis*, **2000**; 21:387-395.
44. **Sevin G, Yasa M, Akçay YD, Özer A.** Contribution of Antioxidant Property of Fluvastatin in Prevention of Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Rabbits. *KocatepeTip Dergisi*, **2004**; 5:43-49.
45. **Hunter DJ, Willet WC.** Diet, body size, and breast cancer. *Epidemiol. Rev*, **1993**; 15:110-132.
46. **Freudenheim JL, Marshall JR, Vena JE, Laughlin R, Brasure JR, Swanson M, Nemoto T, Graham S.** Premenopausal breast cancer risk and intake of vegetables, fruits, and related nutrients. *J. Natl. Cancer Inst.*, **1996**; 88:340-348.
47. **Steinmetz KA, and Potter JD.** Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review: *J. Am. Diet. Assoc.*, **1997**; 96:1027-1039.
48. **Oberley TD, and Oberley LW.** Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol. Histopathol.*, **1997**; 12:525-535.
49. **Perumal SS, Shanthi P, Sachdanandam P.** Augmented efficacy of tamoxifen in rat breast tumorigenesis when gavaged along with riboflavin, niacin, and CoQ<sub>10</sub>: Effects on lipid peroxidation and antioxidants in mitochondria. *Chemico-Biological Interactions*, **2005**; 152: 49-58.
50. **Gale EAM.** Molecular mechanisms of beta-cell destruction in IDDM: the role of nicotinamide. *Horm. Res.*, **1996**; 45:40-43.

51. **Ellis PA, Sacconi-Jotti G, Clarke R, Johnston SR, Anderson E, Howell A, A'Hern R, Salter J, Detre S, Nicholson R, Robertson J, Smith IE, Dowsett M.** Induction of apoptosis by tamoxifen and ICI 182780 in primary breast cancer. *Int. J. Cancer*, **1997**; 72:608-613.
52. **Kuper H, Ye W, Weiderpass E, Ekblom A, Trichopoulos D, Nyren O, Adami HO.** Alcohol and breast cancer risk: the alcoholism paradox. *Br. J. Cancer*, **2000**; 83:949-951.
53. **Colditz GA, Frazier AL.** Models of breast cancer show that risk is set by events of early life: prevention efforts must shift focus. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*, **1995**; 4:567-571.
54. **Blettner M, Zeeb H, Langner I, Hammer GP, Schafft T.** Mortality from cancer and other causes among airline cabin attendants in Germany. *Am. J. Epidemiol*, **2002**; 156:556-565.
55. **Kheifets LI, Matkin CC.** Industrialization, electromagnetic fields, and breast cancer risk. *Environ. Health Perspect.*, **1999**; 107:145-154.
56. **Zhang ZJ, Zhang XB, Hou Gang, Sha WW, Reynolds GP.** The increased activity of plasma manganese superoxide dismutase in tardive dyskinesia is unrelated to the Ala-9Val polymorphism. *Journal of Psychiatric Research*, **2002**; 36:317-324.
57. **Jarvinen K.** Antioxidant enzymes and related mechanisms in malignant pleural mesothelioma. *Finnish Institute of Occupational Health Department of Industrial Hygiene and Toxicology*. **2001**:21-23.
58. Erişim: <http://diss.kib.ki.se/2005/91-7140-475-9/thesis.pdf>. Erişim tarihi: 16.07.2006.
59. Erişim: <http://www.medicine.uiowa.edu/frfb/VirtualSchool/StClair-MnSOD.ppt>. Erişim tarihi: 14.11.2005.
60. **Hirvonen A, Tuimala J, Ollikainen T, Linnainmaa K, Kinnula V.** Manganese superoxide dismutase genotypes and asbestos-associated pulmonary disorders. *Cancer Letters*, **2002**; 178:71-74.
61. **Wong GHW, and Goddal DV.** Induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor: Possible protective mechanism. *Science*, **1988**; 242:941-944.
62. **Porntadavity S, Xu Y, Kiningham KK, Rangnekar MV, Prachayasitikul V, and St. Clair DK.** TPA-activated transcription of the human MnSOD gene: Role of transcription factors SP-1 and Egr-1. *DNA & Cell Biol*, **2001**; 20:473-481.
63. **Thongphasuk J, Oberley LW, Oberley TD.** Induction of Superoxide Dismutase and Cytotoxicity by Manganese In Human Breast Cancer Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1999**; 365:317-327.
64. **Borgstahl GEO, Parge HE, Hickey MJ, Beyer WF, Hallewell RA, Tainer JA.** The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4- helix bundles. *Cell*, **1992**; 71:107-118.
65. **Zhang HJ, Yan T, Oberley TD, Oberley LW.** Comparison of Effect of Two Polymorphic Variants of Manganese Superoxide Dismutase on Human Breast MCF-7 Cancer Cell Phenotype. *Cancer Research*, **1999**; 59:6276-6283.
66. **Buettner GR, Oberley LW, Schafer FQ, Spitz DR, Domann FE.** Manganese Süperoksidge Dismutase. *Free Radicals in Biology and Medicine*, **2001**; 77(222):1-11.
67. **Davis CD, Greger JL.** Longitudinal changes of manganese-dependent superoxide dismutase and other indexes of manganese and iron status in women. *Am. J. Clin. Nutr*, **1992**; 55:747-752.

68. **Kocabaş NA, Şardaş S, Cholerton S, Daly AK, Elhan AH and Karakaya AE.** Genetic polymorphism of manganese superoxide dismutase (MnSOD) and breast cancer susceptibility. *Cell Biochem Funct.*, **2005**; 23:73-76.
69. **Cavalli LR, Varela-Garcia M, and Liang BC.** Diminished tumorigenic phenotype after depletion of mitochondrial DNA. *Cell Growth Differ.*, **1997**; 8:1189-1198.
70. **Egan KM, Thompson PA, Titus-Ernstoff L, Moore JH, Ambrosone CB.** MnSOD polymorphism and breast cancer in population-based case-control study. *Cancer Letter*, **2003**; 199:27-33.
71. **Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, and Mizuno Y.** Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1996**; 226:561-565.
72. Erişim: <http://www.mbi.ufl.edu/~hnick/Manganese%20Superoxide%20Dismutase>. Erişim tarihi: 11.09.2005.
73. **Mates JM.** Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, **2000**; 153:83-104.
74. **Solak M, Bağcı H, Şengil AZ, Öztaş S.** Moleküler Genetik ve Rekombinant DNA Teknolojisi. 1. Baskı, Ankara: Uyum Ajans, **2000**.
75. **Başaran N.** *Tıbbi Genetik* 8. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., **2003**: 300.
76. **Temizkan G, Arda N.** *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., **2004**.
77. **Akar N.** *Klinik Moleküler Patoloji'ye Giriş*. 2. Baskı, Antip A.Ş. Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınları, **1999**: 167-230.
78. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, **1988**; 16: 1215.
79. **Mitrunen K, Sillanpaa P, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, Benhamou S, Uusitupa M, Hirvonen A.** Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and breast cancer risk. *Carcinogenesis*, **2001**; 22(5): 827-829.
80. **Cai Q, Shu XO, Wen W, Cheng JR, Dai Q, Gao YT and Zheng W.** Genetic polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene, antioksidant intake, and breast cancer risk: result from the Shanghai Breast Cancer Study. *Breast Cancer Res*, **2004**; 6:647-655.
81. **Millikan RC, Player J, Cotret AR, Moorman P, Pittman G, Vannappagari V, Tse JCK, Keku T.** Manganese superoxide dismutase Ala-9Val polymorphism and risk of breast cancer in a population-based case-control study of African Americans and whites. *Breast Cancer Research*, **2004**; 6:264-274.
82. **Green H, Ross G, Peacock J, Owen R, Yarnold J, Houlston R.** Variation in the manganese superoxide dismutase gene (SOD<sub>2</sub>) is not a major cause of radiotherapy complications in breast cancer patients. *Radiotherapy and Oncology*, **2002**; 63:213-216.
83. **Van Landeghem GF, Tabatabaie P, Kucinskis V, Saha N, Beckman G.** Ethnic variation in the mitochondrial targetting sequence polymorphism of MnSOD. *Hum Hered.* **1999**; 49: 190-3.
84. **Hiroi S, Harada H, Nishi H, Satoh M, Nagai R, Kimura A.** Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1999**; 261:332-339.

85. **Wang LI, Miller DP, Sai Y, Liu G, Su L, Wain JC, Lynch TJ, Christiani DC.** Manganese superoxide dismutase alanine-to-valine polymorphism at codon 16 and lung cancer risk. *J Natl CancerInst.*, **2001**; 93:1818-1821.
86. **Mattey DL, Hassell AB, Dawes PT, Jones PW, Yengi L, Aldersea JE, Strange RC, Fryer AA.** Influence of polymorphism in the manganese superoxide Dismutase locus on disease outcome in rheumatoid arthritis: evidence for the interaction with glutathione S-transferase genes. *Arthritis Rheum.*, **2000**; 43:859-864.
87. **Hori H, Ohmori O, Shinkai T, Kojima H, Okano C, Suzuki T, Nakamura J.** Manganese Superoxide Dismutase gene polymorphism and schizophrenia: Relation to tardive dyskinesia. *Neuropsychopharmacology*, **2000**; 23:170-177.

## ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında Malatya'da doğdum. İlkokul ve ortaokulu Malatya'da, liseyi Mersin'de okudum. 1987 yılında girdiğim Dicle Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümünde iki yıl okudum. 1989 yılında kazandığım Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesinden 1995 yılında mezun oldum. 1996-1999 yılları arasında Erzurum Narman Sağlık Ocağı, Malatya Erkenek Sağlık Ocağı, Mersin Karaduvar Sağlık Ocağında doktor olarak görev yaptım. 2000 tarihinden itibaren Acil Yardım ve Kurtarma Komuta Merkezinde çalışmaktayım.

2003 yılı Eylül ayında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladım. Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine devam etmekteyim.