

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Biyokimya Anabilim Dalı

138003

**TOPOTECAN'IN ÖSTROJEN BAĞIMLI  
MEME HÜCRE DİZİSİ MCF-7  
HÜCRELERİNDE ANTIOKSİDAN MEKANİZMA  
VE ENZİMLER ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

138003

**Müjgan TUNALI**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
BOKÜ MANTASYON MERKEZİ**

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Tomris ÖZBEN**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.  
(Proje No. 21.01.0122.07)

“Tezimden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir”

Antalya, 2003

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,**

Bu çalışma, jürimiz tarafından Biyokimya Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 10/07/2003

**Tez Danışmanı:** Prof.Dr.T.Aslan AKSU  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı

**Üye:** Prof.Dr.Tomris ÖZBEN  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı

**Üye:** Prof.Dr.Gültekin YÜCEL  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı

**Üye:** Doç.Dr.Saadet GÜMÜŞLÜ  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı

**Üye:** Doç.Dr.Hakan Şat BOZÇUK  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
İç Hatalıklar Anabilim Dalı

**ONAY:**

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun 5.18/2003 tarih ve 15/92 sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ramazan DEMİR  
Enstitü Müdürü



## ÖZET

Meme kanseri dünyada kadınlarda en sık görülen ikinci kanserdir. Gelişmiş ülkelerde ise en sık izlenen kanser tipidir. Meme kanseri tedavisinde kullanılan umut verici ilaçlar arasında bir camptothecin türevidir olan topotecan (9- (dimetil amino) metil-10-hidroksi camptothecin) da yer almaktadır. Topotecan'ın sitotoksik etkisini topoizomeraaz 1 enzimi ve DNA arasındaki bağı stabilize ederek yaptığı bilinmektedir. Reaktif oksijen türleri hücrel metabolizmanın potansiyel olarak tehlikeli ürünleridir. Çoğu neoplastik ajan tümör hücrelerini apoptozis ile yok etmektedir. Birçok araştırmada sitotoksik ilaçlara maruz bırakılan hücrelerde oksidatif stres sonucunda hücrel değişimler bildirilmiştir. Bazı sitotoksik ajanlar yapısal olarak birbirlerine benzememelerine ve hücrede farklı hedefleri olmalarına rağmen reaktif oksijen türlerinin düzeylerini yükseltmektedirler. Ancak topotecan'ın henüz oksidatif strese yol açtığını gösteren bir çalışma yoktur.

Bu çalışmanın amacı antikanser bir ilaç olan topotecan'ın MCF-7 hücre dizisinde antioksidan enzimler ve oksidatif stres üzerine etkisini araştırmaktır. Bu değişikliklerin bilinmesi topotecan'ın etki mekanizması için alternatif bir yol sunabilir. Bu amaçla topotecan'a 24 saat maruz bırakılmış MCF-7 hücrelerinde ve hiç ilaç uygulanmamış kontrollerde: (1) Antioksidan enzimlerden, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) düzeyleri; (2) Lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA düzeyleri; (3) Oksidatif protein hasarının göstergesi olarak karbonil düzeyleri; (4) Redükte glutatyon (GSH) düzeyleri ve (5) Sülfidril düzeyleri incelenmiştir.

Topotecan'a maruz bırakılmış MCF-7 hücrelerinde kontrollere göre lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu ile gösterilen oksidatif durum anlamlı olarak artarken ( $p < 0.05$ ) enzimatik olmayan antioksidanlar (GSH ve sülfidril düzeyleri) anlamlı olarak ( $p < 0.05$ ) azalmıştır. Süperoksit dismutaz düzeylerinde anlamlı olmayan ( $p > 0.05$ ), glutatyon peroksidaz ve katalaz düzeylerinde ise anlamlı ( $p < 0.05$ ) bir artış vardır.

Bu sonuçlar, topotecan'a maruz kalan hücrelerde reaktif oksijen radikalleri oluştuğunu göstermektedir. Topotecan maruziyeti ile reaktif oksijen radikallerinin oluşumu topotecan'ın hücrelerdeki sitotoksik etki mekanizması için alternatif bir yol teşkil edebilir.

## ABSTRACT

Breast cancer is the second most common cancer among women in developed countries. Topotecan, a new camptothecin analogue [9-(dimethyl amino) methyl-10-hydroxy camptothecin], is giving hope in the treatment of breast cancer. The cytotoxic activity of topotecan in human tumor cells depends on the stabilization of topoisomerase 1 and DNA complex. Reactive oxygen species (ROS) are cytotoxic products of normal cellular metabolism. Many antineoplastic agents eliminate tumor cells by inducing programmed cell death or apoptosis, and numerous investigations have documented the cellular changes resulting from oxidative stress induced in cells following exposure to cytotoxic drugs. Although some of cytotoxic agents have different structures and targets, they increase the levels of ROS. However, it has not been studied yet that topotecan causes oxidative stress in tumor cells.

The aim of this study was to investigate the effect of topotecan on antioxidant enzymes and oxidative stress in the human breast cancer cell line (MCF-7). Determining the oxidant effect of topotecan can elucidate possible alternative mechanism of drug cytotoxicity. Therefore, MCF-7 cells were treated with topotecan for 24 hours and levels of antioxidant enzymes [superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px)], lipid peroxidation [MDA], oxidative protein damage [carbonyl content], reduced glutathione [GSH] and sulphdryl were determined.

The obtained data indicate a state of oxidation, as revealed by increased lipid peroxidation and protein oxidation ratios, in MCF-7 cells exposed to topotecan compared to the non-treated control group. Levels of non-enzymatic antioxidants (GSH, sulphdryl content) decreased significantly in MCF-7 cells treated with topotecan compared to controls. Compared to the control cell line, there was a slight increase in SOD and a significant increase in GSH-Px and catalase activity in MCF-7 cells treated with topotecan. These result support the probability of ROS formation in cells exposed to topotecan and suggest an alternative mechanism for topotecan cytotoxicity.

## TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması ve yürütülmesindeki değerli yardımlarından dolayı başta akademik danışmanım Sayın Prof. Dr. Tomris ÖZBEN olmak üzere tüm hocalarıma,

Bu araştırma süresince her zaman yanımda bana destek olan Dr. Halide AKBAŞ, Dr. Aysun ÖZKAN ve Merkezi Araştırma Laboratuvarı ekibine,

Sonsuz destekleri için aileme ve sonsuz sabrı için eőime teőekkürlerimi sunarım.

Müjgan TUNALI

## İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ŞİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1.    Meme Kanseri	3
2.1.1.    Meme Kanserinde Epidemiyoloji	3
2.1.2.    Etiyoloji	4
2.1.2.1.    Aile Hikayesi	4
2.1.2.2.    BRCA 1	5
2.1.2.3.    Hormonlar	5
2.1.2.4.    Sosyodemografik	5
2.1.2.5.    Diyet	5
2.1.2.6.    Yaşam Şekli	6
2.1.3.    Klinik Bulgular	6
2.1.4.    Tanı Yöntemleri	8
2.1.4.1.    Girişimsiz Tanı Yöntemleri	8
2.1.4.2.    Girişimli Tanı Yöntemleri	9
2.1.5.    Evreleme	10
2.1.6.    Erkeklerde Meme Kanseri	13
2.1.7.    Morfoloji	13
2.1.8.    Meme Kanserinde Tedavi	14
2.2.    Reaktif Oksijen Türleri	18
2.2.1.    Süperoksit Anyon Radikali ( $O_2^{\cdot-}$ )	18
2.2.2.    Hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ )	20
2.2.3.    Hidroperoksil radikali ( $HO_2^{\cdot}$ )	21
2.2.4.    Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )	21
2.2.5.    Singlet oksijen ( $^1O_2$ )	21
2.2.6.    Ozon ( $O_3$ )	22
2.2.7.    Hipokloröz Asit ( $HOCl$ )	22

2.2.8.	Nitrojen Oksitleri	22
2.3.	Reaktif Oksijen Türlerinin Hücrelere Etkisi	23
2.3.1.	Reaktif Oksijen Türlerinin Lipidlere Olan Etkileri	23
2.3.1.1.	Başlangıç Basamağı	24
2.3.1.2.	Çoğalma Basamağı	24
2.3.1.3.	Sonlanma Basamağı	24
2.3.2.	Reaktif Oksijen Türlerinin Proteinlere Olan Etkileri	26
2.3.3.	Reaktif Oksijen Türlerinin Karbohidratlara Etkileri	27
2.3.4.	Reaktif Oksijen Türlerinin Nükleik Asitlere Olan Etkileri	27
2.4.	Antioksidanlar	27
2.4.1.	Süperoksit Dismutaz (SOD)	28
2.4.1.1.	Cu ve Zn İçeren SOD (Cu,Zn-SOD)	29
2.4.1.2.	Mn İçeren SOD (Mn-SOD)	29
2.4.2.	Katalaz (KAT)	30
2.4.3.	Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	30
2.4.5.	Tiyoller	31
2.4.6.	Glutasyon (GSH)	32
2.5.	Camptothecin	32
2.6.	Topoizomerazlar	33
2.7.	Topotecan	34
2.8.	Kanser ve Serbest Radikaller	36
<b>MATERYAL ve METOD</b>		<b>39</b>
3.1.	Hücre kültürü	39
3.1.1.	Hücre Dizileri ve ilaçlar	39
3.1.2.	Hücre kültürü ve hücrelerin deneylere hazırlanması için gerekli çözeltiler	39
3.1.3.	Hücrelerin çoğaltılması ve dondurulması	40
3.2.	Hücrelerin deney için hazırlanması	40
3.3.	Sitotoksosite Ölçümleri	41
3.4.	Yöntemler	42
3.4.1.	Protein Tayini	42
3.4.2.	Bakır,Çinko-Bağımlı Süperoksit Dismutaz (Cu,Zn-SOD) Aktivitesinin Tayini	44
3.4.3.	Katalaz (KAT) Aktivitesinin Tayini	45
3.4.4.	Selenyum-Bağımlı Glutasyon Peroksidaz (Se-GSH-Px) Tayini	46
3.4.5.	MDA Tayini	47
3.4.6.	Protein Karbonil Grupları Tayini	49
3.4.7.	Redükte Glutasyon (GSH) Tayini	50
3.4.8.	Sülfidril Grupları (SH) Tayini	52
3.5.	İstatistiksel Analizler	52
3.6.	Gereçler ve Kimyasal Maddeler	52

3.6.1.	Gereçler	52
3.6.2.	Kimyasal Malzemeler	53
<b>BULGULAR</b>		<b>54</b>
4.1.	Topotecan'ın Süperoksit Dismutaza Etkisi	54
4.2.	Topotecan'ın Katalaza Etkisi	55
4.3.	Topotecan'ın Glutatyon Peroksidaza Etkisi	56
4.4.	Topotecan'ın Glutatyona Etkisi	57
4.5.	Topotecan'ın MDA'ya Etkisi	58
4.6.	Topotecan'ın Sülfidril Düzeylerine Etkisi	59
4.7.	Topotecan'ın Karbonil Düzeylerine Etkisi	60
<b>TARTIŞMA</b>		<b>61</b>
<b>SONUÇLAR</b>		<b>67</b>
<b>KAYNAKLAR</b>		<b>68</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>		<b>81</b>



## SİMGELER ve KISALTMALAR

$O_2^{\cdot-}$	Süperoksit Anyonu
$O_2^{2-}$	Peroksil Anyonu
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AJCC	American Joint Committee on Cancer
aq	Aköz
BSO	Buthionine sulfoximine
CEA	Karsino Embriyojenik Antijen
Cu,Zn-SOD	Bakır ve Çinko İçeren Süperoksit Dismutaz
Da	Dalton
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit
E.Coli	Echerichia Coli
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FCS	Fetal Calf Serum
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Redükte Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GSSG	Okside Glutasyonu
$H_2O_2$	Hidrojen Peroksit
$HO_2^{\cdot}$	Hidroperoksit
HOCl	Hipoklorik Asit
KAT	Katalaz
LH	Serbest Yağ Asidi
$L^{\cdot}$	Lipid Radikali
$LOO^{\cdot}$	Lipid Peroksil Radikali
MDA	Malondialdehit
Mn-SOD	Mangan İçeren Süperoksit Dismutaz
MRG	Manyetik Rezonans Grafi
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NO	Nitrik Oksit
$\cdot NO$	Nitrik Oksit Radikali
$NO_2^{\cdot}$	Nitrit
$NO_3^{\cdot}$	Nitrat
NT	Nitro Tirozin
$O_3$	Ozon
$^1O_2$	Singlet Oksijen

<b>OH<sup>·</sup></b>	Hidroksil Radikali
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroksinitrit
<b>PBS</b>	Fosfat Tamponlu Tuz
<b>ROO<sup>·</sup></b>	Peroksil Radikali
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>RS<sup>·</sup></b>	Tiyol Radikalleri
<b>-SH</b>	Tiyoller
<b>SD</b>	Standart Sapma
<b>SOD</b>	Süperoksit Dismutaz
<b>SPSS</b>	Statistical Package for Social Sciences
<b>TBA</b>	2-tiyobarbitürik asit
<b>TBARS</b>	Tiobarbitürik Asit Reaktif Maddeler
<b>t-BuOOH</b>	t-bütil hidroperoksit
<b>UICC</b>	Union International Centre Cancer
<b>WHO</b>	Dünya Sağlık Örgütü

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
<b>2.1</b> TNM sistemine göre evreleme	<b>11</b>
<b>2.2.</b> TNM sistemine göre evreleme	<b>12</b>
<b>2.3.</b> Patolojik evreleme	<b>12</b>
<b>2.4.</b> Memenin benign ve malign tümörlerinin histolojik sınıflandırılması	<b>14</b>
<b>2.5.</b> Etkinliklerine göre meme kanseri tedavisinde kullanılan ilaçların sınıflandırılması.	<b>17</b>
<b>2.6.</b> Bazı reaktif oksijen türevlerinin karakteristikleri	<b>19</b>
<b>2.7.</b> Canlı sistemlerdeki antioksidanlar	<b>28</b>
<b>2.8.</b> Camptothecin ve analogları	<b>33</b>
<b>4.1.</b> Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerin süperoksit dismutaz aktiviteleri	<b>54</b>
<b>4.2.</b> Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerin katalaz aktiviteleri	<b>55</b>
<b>4.3.</b> Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerin glutatyon peroksidaz aktiviteleri	<b>56</b>
<b>4.4.</b> Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde glutatyon düzeyleri	<b>57</b>
<b>4.5.</b> Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde MDA düzeyleri	<b>58</b>
<b>4.6.</b> Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde sülfidril düzeyleri	<b>59</b>
<b>4.7.</b> Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde karbonil düzeyleri	<b>60</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Lipid peroksidasyonu	26
2.2. Camptothecin ve analoglarının asidik pH'da lakton formundan hidroksi formuna dönüşmesi	35
2.3. Topoizomerez enzim inhibitörlerinin topoizomerez 1 ve topoizomerez 2 üzerine etki mekanizması	35
3.1. Farklı konsantrasyonlardaki topotecan'ın MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi	42
3.2. Protein standart grafiği	43
3.3. MDA standart grafiği	49
3.4. GSH standart grafiği	51
4.1. Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde süperoksit dismutaz düzeyleri	54
4.2. Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde katalaz düzeyleri	55
4.3. Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde glutatyon peroksidaz düzeyleri	56
4.4. Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde glutatyon düzeyleri	57
4.5. Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde MDA düzeyleri	58
4.6. Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde sülfidril düzeyleri	59
4.7. Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış gruplarda karbonil düzeyleri	60

## GİRİŞ

Meme kanseri dünyada kadınlarda en sık görülen ikinci kanserdir. Gelişmiş ülkelerde ise en sık izlenen kanser tipidir (1). Etiyolojisinde aile hikayesi, ileri yaş, uzun reproduktif evre, doğum yapmamış olmak, ilk çocuğa ileri yaşta sahip olma, obezite, radyasyona maruz kalma, belirli iyi huylu meme hastalıklarının hikayesi, endüstriyel kirlilik, erken menarj, geç menapoz, yüksek serum ve idrar östrojen seviyeleri gibi sebepler vardır (2,3).

Meme kanseri tedavisinde kullanılan umut verici ilaçlar arasında, bir camptothecin türevi olan topotecan (9- (dimetil amino) metil-10-hidroksi camptothecin) da yer almaktadır. Camptothecin, nyssaceae ailesinden olan camptotheca acuminata adlı bitkiden izole edilmiş olan bir bitki alkaloididir (4,5). Camptothecin 1960'lı yıllarda National Cancer Enstitüsü ilaç kontrol programında tümör hücrelerine karşı aktif olduğu saptanmıştır. Ancak ilacın beklenmedik toksisiteleri ve faz 2' deki sınırlı etkisi nedeniyle ileri araştırmalar yapılmış ve suda daha fazla eriyip daha az toksik olan topotecan, CPT-11 (irinotecan) gibi camptothecin analogları üretilmiştir (6). Camptothecin türevleri olan CPT-11 ve topotecan topoizomerez 1 inhibitörleridir.

Topotecan'ın sitotoksik etkisini topoizomerez 1 enzimi ve DNA arasındaki bağı stabilize ederek yaptığı bilinmektedir. Topoizomerez 1 enzimi DNA tek zincir üzerinde kırık oluşturup çift zincirli sarmal DNA'yı çözerek torsiyonal stresi azaltır. Bu gevşeme reaksiyonu esnasında topoizomerez 1 enziminin 106. tirozin aminoasidi ile kırılmış DNA zincirine ait 3 fosforil grubu arasında kovalent bir bağ oluşur ve protein-DNA çapraz bağı meydana gelir. Topotecan, DNA zincir reaksiyonunu önleyerek bu kompleksi stabilize eder. Stabilize olmuş üçlü kompleks ile replikasyon çatalı arasındaki etkileşimler sonucunda tek zincir kırığı çift zincir kırığına dönüşerek hücre ölümüne neden olur (7).

Reaktif oksijen türleri düşük konsantrasyonlarda, hücre büyümesini düzenleyen redüksiyon-oksidasyon durumundaki sinyal transdüksiyon yolları ve büyüme-farklılaşma ile ilişkili genlerin ekspresyonundaki değişimler için gereklidir. Ancak bu metabolitlerin aşırı üretimi hücre bütünlüğü ve hayatiyeti için gerekli yapıların okside olmasını ve hasara uğratılmasını içeren ölümcül zincir reaksiyonlarının başlamasına neden olur (8). Çoğu tümör hücresi normal hücrelere göre artmış metabolizma oranına sahiptirler ve bu doğal olarak reaktif oksijen türlerinin artışına yol açar (1,9,10).

Çoğu neoplastik ajan tümör hücrelerini apoptozis ile yok etmektedir. Birçok araştırmada sitotoksik ilaçlara maruz bırakılan hücrelerde oksidatif stres sonucunda hücreyel değişimler bildirilmiştir. Bazı sitotoksik ajanlar yapısal olarak birbirlerine benzememelerine ve hücrede farklı hedefleri olmalarına rağmen reaktif oksijen radikallerinin düzeylerini yükseltmektedirler (2). Doxorubicin, daunomycin, mitoxantrane, bleomycin ve cisplatin reaktif oksijen radikalleri üreterek oksidatif stresi tetiklemektedir. Kemoterapatik ilaçlar tarafından reaktif oksijen radikallerinin üretimi bu ilaçların hem antitümör etkilerini hem de bu ajanlarla ilişkili organa spesifik etkilerini güçlendirmektedir (11).

Bu tezin amacı antikanser ilaç olan topotecan'ın MCF-7 hücre dizisinde antioksidan enzimler ve oksidatif stres üzerine etkisini araştırmaktır. Bu değişikliklerin ve mekanizmaların bilinmesi topotecan'ın etki mekanizması için alternatif bir yol sunabilir. Daha önceki çalışmalarda camptothecin'in reaktif oksijen radikalleri ürettiği bildirilmiştir. Ancak literatürde topotecan ile ilgili yapılmış bir çalışma yoktur. Diğer antikanser ilaçlarla bu konuda yapılan çalışmalar da sınırlıdır. Topotecan'ın hücre içinde reaktif oksijen radikallerinin oluşumunu arttırdığını ve oksidatif strese yol açtığı hipotezini incelemek için aşağıda belirtilen parametreler araştırıldı: (1) Antioksidan enzim düzeyleri, (superoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz); (2) Lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA düzeyleri; (3) Oksidatif protein hasarının göstergesi olarak karbonil düzeyleri; (4) Glutatyon düzeyleri; (5) Sülfidril düzeyleri

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Meme Kanseri

#### 2.1.1. Meme Kanserinde Epidemiyoloji

Meme kanseri dünyada kadınlarda en sık görülen ikinci kanserdir. Gelişmiş ülkelerde ise en sık izlenen kanser tipidir (1).

Tüm ırklar için, 1980 ile 1987 yılları arasında meme kanseri insidansı her yıl %3.8 artış göstermiştir ve 1998 yılına kadar sabit bir insidans izlenmiştir. 20 yaşın altındaki kadınlarda lösemi, kanser ölümlerinin birinci sıradaki sebebidir. 20-59 yaş aralığında kadınlarda en fazla ölüme neden olan kanser meme kanseri iken, 60 yaş ve üzerinde akciğer kanserleri birinci sırayı almaktadır. Kadınlarda meme kanserine bağlı ölümler 1989'dan 1995'e kadar %1.6 oranında azalmıştır. 1995'den bu yana kadar ise %3.4 oranında azalma göstermiştir. Yaşa spesifik analizler meme kanseri mortalitesinin 75 yaş üzerindeki Afrikalı-Amerikalı kadınlar dışındaki kadınlarda, tüm yaş gruplarında, azalma gösterdiğini tespit etmiştir. Mortalitedeki bu azalma özellikle 50 yaş altındaki hem beyaz hem de Afrikalı-Amerikalı kadınlarda dikkati çekmiştir (9).

Populasyon istatistiklerine göre yaş bağımlı meme kanseri mortalite oranları birçok gelişmiş ülkede azalmaktadır. 1990'ların başlarında ilk ani düşmeler bildirilmiştir, 1990 ve 1996 yılları arasında Ukrayna, Hollanda, Kanada, Amerika Birleşik Devletleri (ABD), İsveç ve Fillandiya'da meme kanseri mortalite oranlarında %5-17'e kadar azalmalar rapor edilmiştir. 1990 yılından önce bu ülkelerde meme kanseri mortalite oranları ya artmıştır ya da sabit kalmıştır. Pek çok araştırmacı mevcut mortalite azalmasını mammografi ile yapılan taramalara bağlamıştır (10).

Amerika Birleşik Devletleri'nde total kadın populasyonunda meme kanseri insidansı 1990'lı yıllar boyunca yaklaşık olarak aynı seviyede kalmıştır. Ancak genç kadınlarda bu insidans azalma göstermiştir. 1990-1997 yılları arasında kadınlarda izlenen meme kanserine bağlı ölümlerde azalma oranları ortalama %2.2 olarak belirlenmiştir ve bu azalma özellikle beyaz ve daha genç kadınlarda tesbit edilmiştir. ABD'de meme kanseri 40-59 yaşlar arasındaki kadınlarda kanser ölüm sebeplerinin en başta gelen nedenlerinden birisidir. Ancak kanserden ölen kadınların sayısında bir azalma başlamıştır. ABD'de meme kanserine bağlı ölümler 43 844 ölümlerle en çok 1995 yılında izlenmiştir. Giderek azalan ölümler 1998'de 41 737'e inmiştir. Meme kanser insidansı 1979'dan 1992 yılına kadar her yıl %1 oranında artış göstermiştir. 1982'den 1987 yılına kadar ise her yıl %4

oranında artış göstermiştir. 1987 yılından 1996 yılına kadar ise meme kanser insidansı sabit kalmıştır (12).

Az ilerlemiş meme kanserine sahip hastalarda erken teşhis, gelişmiş cerrahi teknikler ve daha etkili sistemik terapiler yaşam kalitelerini ve hayatta kalma sürelerini arttırmıştır. Ancak metastatik tümörlü hastalar hala çok kötü prognoza sahiptirler ve hayatta kalma süreleri 2 yıldan azdır. Metastazı olan hastalarda kemoterapi ve hormonal terapi tümörün küçülmesinde etkilidir. Buna rağmen hayatta kalma süresi genellikle 6 aydan daha az uzatılabilmektedir (7).

40 yaşın altında olan genç kadınlarda meme kanseri görülme sıklığı %5'den daha az olmasına rağmen genç kadınlarda izlenen meme prognozunun 40 yaşın üstündeki kadınlarda gelişen meme kanserinin prognozundan çok daha kötü olduğu gösterilmiştir (8).

### **2.1.2. Etiyoloji**

Aile hikayesi, ileri yaş, uzun reproduktif evre, doğum yapmamış olmak, ilk çocuğa ileri yaşta sahip olma, obezite, radyasyona maruz kalma, belirli iyi huylu meme hastalıklarının hikayesi gibi durumlarda meme kanseri riski artmıştır. Ayrıca kolon, tiroid, endometriyum ve over karsinomunda kadınlarda meme kanseri insidansı artmıştır. Tek taraflı meme karsinomuna sahip hastalarda sağlam olan diğer memede karsinom gelişme riski çok daha yüksektir (2).

Endüstriyel kirlilik ve sigara dumanı gibi çevresel faktörler meme kanseri için risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Erken menarj, geç menapoz, yüksek serum ve idrar östrojen seviyeleri, düşük seks hormon bağlayıcı proteinler vücutta serbest östradiol seviyesini artırırlar. Bu şekilde endojen ve eksojen yollarla östrojenin artırılması meme kanseri için önemli bir risk faktörüdür (3).

#### **2.1.2.1. Aile Hikayesi**

Meme kanserli birinci dereceden akrabası olan bir kadında meme kanseri gelişme riski, ailesinde meme kanseri olmayan bir kadına göre 2-3 kat fazla iken; meme kanserli ikinci dereceden akrabası olan bir kadında bu risk iki kattan biraz azdır. Meme kanseri olan birinci derece akraba sayısı arttıkça meme kanseri gelişme riski de daha fazla artmaktadır. Bu ilişki aile fertleri arasındaki genetik ve çevresel faktör benzerliklerine bağlanmaktadır (1,13,14,15).



### 2.1.2.2. BRCA 1

Meme kanseriyle yakından ilişkili olan bu gen klonlanıp sekanslanmıştır. Her 300 kadından birinde BRCA 1 geni mevcuttur. Bu gene sahip kadınların 80'li yaşlarda meme kanseri olma ihtimalleri %85 olup bu kadınların yarısından fazlasının 50 yaş öncesi meme kanseri olma ihtimalleri de çok yüksektir (1,14).

### 2.1.2.3. Hormonlar

- Endojen: Endojen olarak östrojen üretiminin artmış olduğu durumlarda meme kanseri riski artar. 11 yaş veya altında erken menarj ve 55 yaş ya da üstünde geç menapoz, ileri yaşlarda ilk hamileliğin olması (30 yaş üstü), nulliparite (hiç doğum yapmamış olmak), obez kadınlarda adrenal kortekste üretilen androstendiolün yağ hücrelerince östrojene çevrilmesi ile östrojen düzeyinde artışlar olması gibi durumlarda meme kanseri riski artar (1,3,13).
- Eksojen: Dünya Sağlık Örgütü'nün bir çok ülkede yapmış olduğu çalışmalar sonucunda oral kontraseptif gibi eksojen kaynaklı östrojenlerin (dünya çapında 61 milyon kadın kullanmaktadır) meme kanser riskini 3-5 kat arttırdığı tesbit edilmiştir ve östrojen preparatlarına progesteronların eklenmesi bu riski azaltmamaktadır (1,3,13).

### 2.1.2.4. Sosyodemografik

Diğer birçok kanserin tersine meme kanserleri düşük sosyal sınıflardan çok, yüksek sosyal sınıftaki kadınlarda daha sık izlenmektedir. Yahudilerde, Afrikalı-Amerikalı kadınlarda sık izlenirken, Asyalı kadınlarda daha az izlenmektedir (1,8,16,17).

### 2.1.2.5. Diyet

- Yağ: Yüksek yağlı diyetlerin meme kanseri riskini arttırdığı yapılan fare deneylerinde tesbit edilmiştir. Omega 6 poliansature yağ asitleri, linoleik asit meme kanser riskini artırırken omega 3 yağ asitleri meme kanseri riskini azaltmaktadır (1,15,18).
- A vitamini ve Karotenoidler: Retinoller hücre differansiyasyonunu düzenlerler, karotenoidler ise güçlü antioksidanlardır. Bunların her ikisi de meme kanseri riskini azaltmaktadır (1).
- Diğer gıdasal komponentler: Bazı gıdalarda bulunan heterosiklik aminlerin karsinojenik etkileri varken, soya ürünlerinde bol miktarda bulunan tofu gibi bitkisel östrojenlerinin anti-karsinojenik etkileri tesbit edilmiştir ve Asyalılarda meme kanseri insidansının düşük olması bu gıdanın fazla tüketilmesine bağlanmaktadır (1,13).

### 2.1.2.6. Yaşam Şekli

- Egzersiz: Genç yaşta yapılan egzersizin kadınlarda premenapozal ve post menapozal meme kanseri riskini azalttığı bildirilmiştir. Bu etkinin hormonal mekanizmalarla olduğu düşünülmektedir. Çünkü egzersiz menarj süresini uzatıp ovulatuvar menstürel siklus sayısını azaltabilmektedir (1,13).
- Alkol: Günde 15 gr ve üstünde alkol tüketen kadınlarda, alkol kullanmayan kadınlara göre meme kanser riski %50 kadar daha fazladır. Bu artışın alkolün neden olduğu plazma östrojen ve östriol seviyelerindeki yükselmeye bağlı olduğu düşünülmektedir (1,13).
- Sigara: Sigara kullanımının meme kanseri riskini hem arttırıcı hem de azaltıcı özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir. Meme kanseri riskini azaltıcı özelliğinin sigara içenlerde izlenen düşük plazma ve üriner östrojen seviyesine , kanser riskini arttırıcı özelliğinin ise sigara dumanındaki oksidan ve karsinojen maddelere bağlı olduğu düşünülmektedir (1).
- Çevresel faktörler: Pestisitlerin meme kanserini arttırdığı ve meme kanserli hastaların serum ve yağ dokusunda bu kimyasalların yüksek olarak bulunduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (1).
- Elektromanyetik alanlar: Ekolojik ve epidemiyolojik çalışmalarda elektromanyetik alanların etkileri araştırılmaktadır. Bazı çalışmalarda elektromanyetizmanın kanser riskini arttırdığı yönünde sonuçlar alınmıştır ancak hala bu ilişki kesin olarak kanıtlanamamıştır (1).
- İyonize radyasyon: Göğüs bölgesine alınan yüksek dozdaki iyonize radyasyonun meme kanser riskini arttırdığı bilinmektedir. Özellikle sık sık radyografi çekirmek zorunda olan akciğer hastalıklı, tüberkülozlu hastalarda ya da radyoterapi alan kadınlarda meme kanseri gelişme riski yükselmiştir (1,13).

### 2.1.3. Klinik Bulgular

Meme kanserli kadınların %70'inde ilk bulgu memede bir kitlenin varlığıdır. Çoğu kez kitle ağrısızdır ve kadın tarafından rastlantı sonucu bulunur. Hastaların %8-10'unda ise kitle ağrılıdır ve kadın memesini ağrı nedeniyle yokladığında ortaya çıkar (19,20).

Genelde kitle serttir, hareketsizdir; ancak etrafındaki meme dokusu ile birlikte hareket eder. Fibroadenom gibi hareket edebilen kanserlerin olduğu da akıldan çıkarılmamalıdır. Kitlenin sınırları, çoğu kez, iyi tayin edilemez. Bazen tümör memede asimetri yaratabilir ya da gözle farkedilebilecek boyuta ulaşabilir (19).

Hastaların %2 kadarında ise kanser kendini tek taraflı meme başı ve areolada ekzamatiform lezyon, erozyon ya da ülserasyon görünümü ile ortaya koyar. Meme başları tahrişe açık bölgelerdir. O nedenle, meme başlarında bu tip lezyonlara rastlamak olağandır. Tahrişin neden olduğu bu tip lezyonlar meme başlarını korumak ve inert bir pomad kullanmakla kısa sürede iyileşir. Tedaviye rağmen iki haftada iyileşmeyen bu tip lezyonda Paget hastalığı düşünülmelidir. Hastaların %4'ünde ise kanser enflamasyon bulguları ile ortaya çıkar. Meme bütünü ile büyümüştür, derisi kızarmıştır ve ödemlidir. Deri portakal kabuğu (peau d'orange) görünümü almıştır; deri iki parmak arasında hafifçe sıkılırsa portakal kabuğu görünümü çok daha belirginleşir. Ağrı olabilir ya da olmayabilir. Palpasyonda belirgin bir kitle alınamaz ancak meme bütünü ile yoğundur (8,14,20).

Memenin santral kadranında yer alan tümörlerde meme başı içeri çekilebilir (meme başı retraksiyonu), memenin üst-dış kadranında yer alan tümörlerde bazen meme başı yukarı ve dışa doğru çekilir. Bu durum memelerde ve meme başlarında asimetrik bir görünüme yol açar. Meme kanserli hastaların ortalama %10'unda ilk belirti meme başı akıntısıdır. Kanserinin neden olduğu meme başı akıntısı spontan, tek taraflı ve porustan olup genellikle kanlı, kanlı-seröz ya da seröz niteliktedir. Bu akıntıya palpabil bir kitle eşlik edebilir ya da etmeyebilir (19,20,21).

Cooper bağlarını infiltre eden tümörlerde bu bağların kısılması ile tümör üzerindeki deri tümöre doğru çekilerek göbekteleşme (deri retraksiyonu) oluşur. Deri retraksiyonu başlangıçta hasta normal durumda iken görülmeyebilir; ancak kollar yukarıya kaldırıldığında ya da öne doğru eğildiğinde ortaya çıkabilir. Mevcut, fakat normal pozisyonda ya da kolları yukarı doğru kaldırarak veya öne eğilerek belirmeyen deri retraksiyonu kitle üzerindeki deriyi baş ve işaret parmağı arasında sıkıştırarak ortaya çıkar. Memedeki her kitlede deri retraksiyonunun olup olmadığı mutlaka araştırılmalıdır. Deri retraksiyonunun varlığı memedeki kitlenin, çok büyük olasılıkla kanser olacağına işaret eder (14,20,21).

Memenin lenf damarlarına giren tümör hücreleri zamanla meme derisinin lenf damarlarına taşınırlar. Bu tümör hücreleri meme derisinin lenf damarlarında tıkanmaya neden olarak lenf akımının yavaşlamasına yol açar. Lenf akımındaki yavaşlama ise deri ve derialtı dokusunun aşırı beslenmesine neden olur; deri kalınlaşır, kıl folikülleri içeri doğru çekilmiş gibi kalır ve bu durum deriye portakal kabuğu görünümü (peau d'orange) kazandırır. Tümör hücrelerinin deri lenfatiklerini daha fazla tıkaması sonucu derinin beslenmesi bozulur; deri kızarır eritem oluşur, beslenmesi gittikçe bozulan deride ülserasyon gelişir. Bazen meme derisi lenfatikleri içindeki tümör hücreleri yandaş (satellit) nodüller oluşturabilir (14,20).

Meme kanseri seyrek de olsa kendini koltukaltında lenf bezi büyümesi ya da metastaz yaptığı organın kendine özel belirtileriyle ortaya koyabilir. Böyle

bir durumda meme muayene edildiğinde bir kitle palpe edilebilir; memede kitle palpe edilmeyen durumlarda tümör mammografi ile ortaya konabilir. Memede herhangi bir patolojinin söz konusu olmadığı durum da vardır (22,23,24).

#### **2.1.4. Tanı Yöntemleri**

Genellikle hastanın kendisinin farketdiği bir kitle veya ağrı gibi şikayetlerle sağlık merkezlerine başvuran hastalar veya şikayeti olmadan yapılan taramalar esnasında şüpheli bulgular tesbit edilen hastalarda kullanılabilecek tanı yöntemleri şunlardır:

##### **2.1.4.1. Girişimsiz Tanı Yöntemleri**

A) Fizik muayene: Meme tüm kadranlarıyla ayrıntılı olarak muayene edilir, meme derisinde çekilmeler, ödem, deformite, enflamasyon gibi şüpheli bulgular taranır. Memede ele gelen bir kitlenin ya da hassasiyetin olup olmadığına bakılır. Aksiller ve supraklaviküler lenf bezlerinin durumu mutlaka değerlendirilir. Hastanın düzenli aralıklarla meme muayenesi yaptırması ya da kendi yapması meme kanserinin erken teşhis edilmesini ve dolayısıyla erken müdahale edilmesini sağlar (13,25).

B) Mammografi: Hem taramalarda hem de yakınması olan her hastada kullanılabilen çok değerli bir tetkiktir. X ışınları ile saptanan düzensiz kitleler ya da mikrokalsifikasyonlar kanser lehine olabilmektedir. Ancak unutulmamalıdır ki kalsifikasyonlar benign meme hastalıklarında izlenebilmektedir. Hayat kurtarıcı olan bu tetkikle bir çok şüpheli bulgu yakalanabilmekte ve meme kanserine erken evrede müdahale edilebilmektedir (13,26,27,28,29). Kadınlarda mammografinin tarama amacıyla kullanım prensipleri şunlardır:

- Meme yakınması olan her kadına yaşına bakılmaksızın ve sıklığı göz önüne alınmaksızın, gerektiği her an mammografi yapılmalıdır.
- 35-40 yaş mammografi için, tarama çalışmalarında alt sınırdır.
- 40 yaş ve üzerindeki her kadın, 1-2 yılda bir fizik muayene ve mammografi ile kontrol edilmelidir.
- 50 yaş ve üzerindeki her kadın, her sene muayene ve mammografi ile kontrol edilmelidir (13,23,25).

C) Kseromammografi: Mammografi özellikle fibroglanduler yoğunluğun yüksek olduğu %10 oranında izlenebilen meme kanseri olgularında kanserin tesbitinde başarısız olabilmektedir. Bu durumu düzeltmek amacıyla geliştirilen kseromammografi daha detaylı görüntüyü daha az radyasyon dozuyla ortaya koyabilmektedir (13,25,26).

D) Termografi: İyonize radyasyon kullanılmadıkça meme dokusundaki ısı düzeylerinin grafi üzerine aktarımı termografi olarak bilinmektedir. Isı sensörlerinin memede algıladıkları ısı artış alanları o bölgedeki damarlanma ve kan akımı artışını yansıtmaktadır. Bu durum da hekime kanser ihtimalini düşündürmelidir. Ancak çok kullanışlı olmayan, hassasiyeti ve spesifikliği çok düşük olan bu tetkikin faydası sınırlıdır (25,26).

E) Ultrasonografi: Yüksek frekanslı ses dalgaları ve onların yansımalarının görüntüye dönüştürülmesine dayalı bu tetkik mammografi ile tesbit edilen kitlenin kist mi yoksa solid bir tümör mü olduğunu anlamada kullanılır. Kistlerin boşaltılmasında da yardımcı bir tetkik olarak kullanılır (13,25,26).

F) Transilluminasyon (Diafanografi): Eski ve geçerliliğini kaybetmiş olan bu tetkikin temelinde memenin güçlü bir ışık kaynağıyla transilluminasyonu (aydınlatılması) vardır (13,25,26)

G) Bilgisayarlı Tomografi: Lezyonun lokalizasyonu, boyutu hakkında değerli bilgiler sağlayan bu tetkik meme kanseri saptanmasında oldukça etkilidir. Ancak pahalı olması nedeniyle taramalarda kullanımı sınırlıdır (13,25,26).

H) Manyetik rezonans grafi (MRG): Çok değerli bilgilerin elde edilebildiği bu tetkik ile küçük boyutlardaki tümörler ve lenf bezleri tutulumları saptanabilir (13,25,26).

#### **2.1.4.2. Girişimli Tanı Yöntemleri**

A) Kan tetkikleri: Meme kanserli olgularda Ca 15-3, CEA (Karsino Embriyojenik Antijen) gibi belirleyicilerin kan düzeyleri artabilir. Spesifiteleri düşüktür, CEA vücuttaki tüm adenokarsinomlarda yükselebilir (23,30).

B) Biyopsi: Mammografi ya da farklı tetkikler ile tesbit edilen kitlenin histopatolojik incelemesinin yapılması için kitleden örnek alınması işlemine biyopsi denir. 3 farklı biyopsi tekniği vardır (1,13).

- İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi: Hızlı, ağrısız, ucuz olan ve kesi yapılmadan uygulanan bu tekniğin %87 oranında hassasiyeti, %4-9,6 oranında yanlış negatif sonuç verme özelliği vardır. Yaygın olarak kullanılan bu teknik histopatolojik incelemelerinde gerekli örneği elde etmek için oldukça iyi bir yöntemdir (14).
- Core biyopsisi: İnce iğne aspirasyon biyopsisi gibi hızlı, ağrısız, ucuz olan ve kesi yapılmadan uygulanan bu tekniğin yanlış negatiflik sonuç verme oranı çok daha azdır (14).

- Eksisional Biyopsi: Lokal anestezi altında yapılan bu teknikde histopatolojik inceleme için tümör dokusu etrafındaki normal doku ile birlikte çıkarılır. Diğer iki teknikten farklı olarak yanlış negatiflik ya da inceleme için yetersiz örnek eldesi bu teknikte izlenmez. Ancak daha ağırlı ve pahalı olup kozmetik görüntüyü bozan kesi izlerine neden olmaktadır (14).

C) Sintigrafik yöntemler: Lenf nodu tutulumlarını tesbit etmek amacıyla "Tc" işaretli lipozomlar kullanılarak lenfo-sintigrafi uygulanabilmektedir (16).

### 2.1.5. Evreleme

Meme kanserli hastalar hekime başvurdıklarında hastalıklarının yayılmaları bakımından farklılıklar gösterirler. Evreleme, hastaları hastalıklarının yayılma derecesine göre gruplara ayırma işlemidir. Böylece gerek tedavi planının yapılmasında gerek prognoz tayininde en etkili yoldur. Evreleme ya radyolojinin de eşlik edebileceği klinik bulgulara göre (klinik evreleme) ya da ameliyatla çıkarılan dokuların histolojik-histopatolojik durumlarına göre (patolojik evreleme) yapılır (1,20,31).

Klinik evreleme için kullanılan sistemlerden en eskisi Manchester sistemidir. 1940 yılında ortaya konmuştur. Columbia sistemi 1943'de kullanılmaya başlanmış, 1969 yılında yeniden düzenlenmiştir. Gerek Manchester gerek Columbia sisteminin uygulanması birkaç merkezle sınırlı kalmıştır. Günümüzde hemen her yerde UICC (Union International Centre Cancer) ve AJCC (American Joint Committee On Cancer)'nin biçimlendirdiği TNM sistemi kullanılmaktadır. Buna göre primer tümörü T, koltukaltı lenf bezlerini N, uzak metastazları ise M temsil etmektedir. Bu verilere göre evre grupları Tablo 2.1. ve 2.2' de belirtilmiştir (23, 31).

**Tablo 2.1.** TNM sistemine göre evreleme (23).

**Primer Tümör T**

- $T_x$  : Primer tümör değerlendirilmeyebilir.  
 $T_0$  : Primer tümör bulgusu yoktur.  
 $T_{is}$  : Tümör bulgusu olmayan paget hastalığı vardır. İn situ tümör.  
 $T_1$  : Tümör 2 cm veya daha küçüktür.  
 $T_{1a}$  : Tümör 0,5 cm veya küçüktür.  
 $T_{1b}$  : Tümör 0,5'den büyük fakat 1 cm'yi aşmamıştır.  
 $T_{1c}$  : Tümör 1 cm'den büyük, fakat 2cm'yi aşmamıştır.  
 $T_2$  : Tümör 2 cm'den büyük fakat 5 cm'yi aşmamıştır.  
 $T_3$  : Tümör 5'cm'yi aşmıştır.  
 $T_4$  : Tümörün boyutu ne olursa olsun deri ya da toraks duvarına doğrudan ulaşmıştır.  
 $T_{4a}$  : Toraks duvarına ulaşmıştır.  
 $T_{4b}$  : Meme derisinde ödem (Peau d'orange dahil), ülserasyon tümörlü memede yandaş deri lezyonları vardır.  
 $T_{4c}$  :  $T_{4a} + T_{4b}$   
 $T_{4d}$  : Enflamatuvar kanser vardır.  
Paget hastalığında kitle varsa T'yi kitlenin büyüklüğü tayin eder. T ölçümünde tümörün en büyük boyutu göz önüne alınır.

**Bölgesel Lenf Bezleri N**

- $N_x$  : Bölgesel lenf bezleri değerlendirilmeyebilir.  
 $N_0$  : Bölgesel lenf metastazı yoktur.  
 $N_1$  : Aynı taraftaki koltukaltında bir yada fazla mobil lenf metastaz vardır.  
 $N_2$  : Aynı taraftaki koltukaltında bir ya da fazla lenf bezinde metastaz; fakat bu lenf bezleri birbirine ya da etraf dokularına yapışıktır.  
 $N_3$  : Tümörün bulunduğu taraftaki mamma interna lenf bezi grubuna metastaz vardır.

**Uzak metastazlar M**

- $M_x$  : Uzak metastazların varlığı değerlendirilmeyebilir.  
 $M_0$  :  $M_0$  : Uzak metastaz yoktur.  
 $M_1$  :  $M_1$  : Uzak metastazlar mevcuttur.  
Supraklaviküler lenf bezlerindeki metastazlar uzak metastaz olarak nitelenir.

Günümüzde, meme kanserinde prognozu belirleyen en önemli kriter koltukaltı lenf bezlerinin durumudur. Klinik muayene ile lenf bezleri hakkında karar vermek hem yanlış pozitiflik hem de yanlış negatiflik bakımından %30 yanlışlıkla gider. Daha önemlisi, tümörle tutulan lenf bezlerinin sayısı, tümörün lenf bezi içindeki boyutu, tümör hücrelerinin lenf bezinin kapsülünü aşip aşmaması gibi ayrıntılar da hem prognoz yönünden, hem de cerrahi girişim sonrası seçilecek adjuvan tedavi yöntemini belirleme açısından göz önüne alınır (13,14).

**Tablo 2.2.** TNM'ye göre evreleme (23).

Evre 0	T <sub>is</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Evre I	T <sub>1</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Evre IIA	T <sub>0</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>1</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>2</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Evre IIB	T <sub>2</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>3</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Evre IIIA	T <sub>0</sub>	N <sub>2</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>3</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>3</sub>	N <sub>2</sub>	M <sub>0</sub>
Evre IIIB	T <sub>4</sub>	Herhangi N	M <sub>0</sub>
	Herhangi T	N <sub>3</sub>	M <sub>0</sub>
Evre IV	T ve N ne olursa olsun M <sub>1</sub> içeren tüm hastalar		

Patolojik evrelemede T ve M klinik evrelemeden farklılık göstermez. Lenf bezlerinin durumu Tablo 2.3.'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.3.** Patolojik evreleme (23).

pN <sub>x</sub>	: Bölgesel lenf bezi metastazı değerlendirilmeyebilir.
PN <sub>0</sub>	: Bölgesel lenf bezi metastazı yoktur.
PN <sub>1</sub>	: Aynı tarafta bir ya da daha fazla mobil lenf bezi metastazı vardır.
pN <sub>1a</sub>	: Metastazlar mikrometastazdır. (Hiçbiri 0,2 cm'den fazla değildir.)
pN <sub>1b</sub>	: Bir ya da daha fazla lenf bezinde metastaz vardır; bunlardan herhangi biri 0,2 cm'den büyüktür.
pN <sub>1bi</sub>	: 1-3 lenf bezinde metastaz mevcuttur; herhangi bir metastazın boyu 0,2 cm'den büyüktür.
pN <sub>1bii</sub>	: 4 ya da daha fazla ganglionda metastaz vardır; bunlardan biri 0,2 cm'den büyük, fakat hepsi 2 cm'den küçüktür.
pN <sub>1biii</sub>	: Lenf bezi metastazı bezin kapsülünün dışına çıkmıştır; fakat boyu 2 cm'den küçüktür.
pN <sub>1biv</sub>	: Lenf bezindeki metastazın boyutu 2 cm veya daha büyüktür.
pN <sub>2</sub>	: Aynı taraftaki metastazlı lenf bezleri birbirlerine ya da etraf dokulara yapışıktır.
pN <sub>3</sub>	: Aynı taraftaki bir ya da daha çok mammaria interna lenf bezlerine metastaz vardır.
Ölçü	en büyük boyuta göre verilir.



### **2.1.6. Erkeklerde Meme Kanseri**

Her 100 meme karsinomlarından biri erkeklerde oluşmaktadır. Erkeklerde en sık invaziv duktal karsinom izlenmektedir. Ve bu tip karsinomda sıklıkla 2. ve 3. evrelerde karşımıza çıkmaktadır. Papiller karsinomlarda erkeklerde sıklıkla izlenmektedir ancak erkek meme dokusu yapısında lobüler yapı yani asiniller olmadığından lobüler karsinomlar erkeklerde izlenmemektedir. Genel olarak erkeklerde gelişen meme karsinomlarının prognozu kadınlara göre çok daha kötüdür (23).

### **2.1.7. Morfoloji**

Meme kanseri sol memede sağ memeye göre biraz daha sık görülür. Hastaların %4-10'unda iki taraflı primer tümörler vardır ya da sonradan ikinci bir primer tümör gelişir (21).

Tümörler duktus epitelinden (%90) ya da lobül epitelinden (%10) köken alırlar. Başka bir özellik belirtilmezse "meme kanseri" teriminde duktal kökenli bir karsinom anlaşılır. Duktal ve lobüler kanserlerin her ikisi de ayrıca sınırlayıcı basal membranı penetre etmeyenler (infiltrate olmayan) ve penetre edenler (infiltrate olan) olmak üzere ikiye ayrılırlar (21).

Meme karsinomlarının büyük çoğunluğu adenokarsinomlardır ve çoğu morfolojik olarak duktal ya da lobuler olarak sınıflandırılırlar. İnvaziv meme kanserlerinin %75'ini invaziv duktal karsinom oluşturarak en sık görülen malign meme kanseri olarak karşımıza çıkmaktadır. İnvaziv meme kanserleri içinde lobuler karsinom %10, meduller karsinom %5 oranında görülür. Diğerlerine göre daha iyi prognozu olan tubuler (ya da cribriform) tümör müsinöz (ya da kolloid ) tümör ve papiller karsinomların tümü invaziv meme karsinomlarının %5'ini oluştururlar. Kalan diğer tümörler ise %5'lik bir kısmını oluştururlar (21). Memenin benign ve malign tümörleri Tablo 2.4'de verilmiştir.

**Tablo 2.4.** Memenin benign ve malign tümörlerinin histolojik sınıflandırılması (Dünya Sağlık Örgütü (WHO)) (21)

---

## **I) MEMENİN BENİGN TÜMÖRLERİ**

**Fibroadenom**

**Filloides tümör**

**İntraduktal papillomdan oluşur (23).**

## **II) MALİGN EPİTELYAL MEME TÜMÖRLERİNİN HİSTOLOJİK SINIFLAMASI**

### **A. İnvaziv olmayan**

İntraduktal karsinom (komedokarsinom)

Lobüler karsinoma in situ

### **B. İnfiltre olan (İnvaziv) duktal karsinom**

İnvaziv duktal karsinom

Predominant invaziv komponentli invaziv duktal karsinom

İnvaziv lobüler karsinom

Medüller karsinom

Kolloid (müsinöz) karsinom

Papiller karsinom

Adenoid sistik karsinom

Sekratuar (juvenil) karsinom

Apokrin karsinom

Metaplastik karsinom

Diğerleri

### **C. Paget hastalığı**

---

## **2.1.8. Meme Kanserinde Tedavi**

### **A) Cerrahi girişim:**

- **Halsted Radikal Mastektomi:** Uzun yıllar boyunca meme kanserinin tedavisinde bu yöntemin en etkili yöntem olduğu düşünülmüştür. Halsted radikal mastektomi erken evrelerde tüm meme dokusu altındaki major ve minor pektoral kasları ve rejyonel lenf nodlarının cerrahi yöntemlerle alınması şeklinde uygulanmıştır. Oldukça etkili olan bu yöntem kozmetik ve fonksiyonel bozukluklara neden olması nedeniyle pektoral kasları infiltre etmiş meme tümörlerindeki kullanımı dışında günümüzde artık kullanılmamaktadır (23,32,33,34).

- **Modifiye Radikal Mastektomi:** Evre 1 ve 2'deki erken evreli meme kanseri olgularında hem kozmetik hem de fonksiyonel bozulmanın Halsted radikal mastektomiye göre daha az olduğu bu yöntemde bu olguların hayatta kalma süreleri de oldukça uzundur. Halsted yönteminden farklı olarak pektoral kaslar korunur ve sadece meme dokusundan tümör dokusu ve çevre normal doku çıkarılır. Beraberinde rekürenslerin önlenmesi amacıyla radyoterapi mutlaka uygulanır. Pektoral kasların korunması ilerde yapılan memenin rekonstrüktif operasyonlarında büyük avantajlar sağlamaktadır (13,19,33,35,36,37).
- **Overektomi:** Hormonal etkenlere bağlı olarak gelişen meme kanserlerinde overlerin alınarak östrojen düzeyini azaltmayı amaçlayan bu yöntem de artık yerini, gonotropin releasing hormon analogları ile oversupresyon tedavilerine bırakmıştır (23).
- **Lenf nodu disseksiyonu:** Mastektomi ameliyatları ile birlikte aksiller lenf nodlarının disseksiyonu sıklıkla yapılan bir işlemdir. Lenf nodu disseksiyonu terapatik amaçtan çok diagnostik amaçlı yapılmaktadır. Çıkarılan lenf nodlarının histopatolojik incelemeleri ile kanserin evresi belirlenmeye çalışılır. Lenf nodu disseksiyonu uygulanmadığı takdirde özellikle aksiler lenf nodları başta olmak üzere reyonel lenf nodlarında radyoterapi uygulamak gerekir (21,23,32).

**B) Radyoterapi:** Tekrarlama ihtimali olan tüm meme kanseri tedavilerinde ya da sonrasında kullanılır. Tedavi sonrası radyoterapi uygulanmamış meme kanserli hastalarda 5-10 yıl içinde tekrarlama oranı %35 iken radyoterapi uygulanmış hastalarda bu oran %15'dir. Mastektomi sonrası tüm göğüs kafesine uygulanan radyoterapinin lokal ve reyonel rekürensleri azalttığı bilinmektedir (14,19,20,23).

**C) Adjuvan terapi:** Kemoterapi ya da endokrin terapinin lokal terapi sonrasında ya da adjuvan olarak uygulanması tüm hasta gruplarında yaşam sürelerini uzatıp kanserin yeniden tekrarlanması geciktirecektir (13,21,30,38,39).

- **Kemoterapi:**Tümör üzerinde östrojen reseptörlerinin negatif olduğu meme kanserlerinde tercih edilirler. Kemoterapinin farklı uygulanım şekilleri vardır. Meme kanserinde kullanılan ilaçlar etkinlikleriyle birlikte Tablo 2.5.'de belirtilmiştir.

a) **Preoperatif kemoterapi:** Lokal operatif terapi öncesinde tümörün boyutunu küçültmek ve kanlanması azaltmak amacıyla kemoterapi uygulanabilmektedir. 5-fluro-urasil, Epirubicin ve Cisplatin gibi ilaçların operasyon öncesi tümörde regresyon yapabilecekleri gösterilmiştir.

b) Perioperatif Kemoterapi: Ameliyatla birlikte 0-72 saat içinde poli-kemoterapi uygulanan ameliyattan 24-35 gün sonra başlatılmış kemoterapi olguları ile karşılaştırıldığında perioperatif kemoterapi uygulamanın önemli faydaları olabileceği gösterilmiştir.

c) Postoperatif kemoterapi: Lokal terapi sonrası uygulanan kemoterapi yöntemi eski bir yöntem olup hastalığın kontrolünde ve hastanın yaşam süresini arttırmada büyük başarılar sağlamıştır. Bu tedavi yönteminde en çok kullanılan ilaç kombinasyonu Siklofosfamid metotreksat ve 5-fluro-urasil (CMF) ve Siklofosfaamid, Doxorubicin ve 5-fluro-urasil'dir (CAF) (13,21,30,38,39).

Çok çeşitli kemoterapatik ilaç vardır ve bu ilaçların etkinlikleri ve sitotoksiteleri birbirinden çok farklıdır. Meme kanseri tedavisinde kullanılan ilaçlardan bazılarının etkinliklerine göre bazıları Tablo 2.5.'de belirtilmiştir.

- Endokrin terapi (Hormonal terapi): Endokrin terapinin verildiği hastalık özellikleri şunlardır:
  - Östrojen ya da progesteronların reseptörüne sahip tümörler,
  - En az iki yıl devam eden serbest intervalli kanserler,
  - Kemiğe ve yumuşak dokuya sınırlı metastaz olması,
  - Geç premenopozal ya da postmenopozal olgular,
  - Daha önceden endokrin terapiye olumlu yanıt vermiş olan olgular.

Endokrin terapide kullanılan yeni ilaçlar arasında LHRH agonistleri, anti östrojenler, anti progestinler ve aromataz inhibitörleri vardır (21,23,30,38).

- Kemoendokrin terapi: Kemoterapi ve endokrin terapinin kombinasyonu ile daha başarılı sonuçlar elde edilebileceğine yönelik bir çok çalışma ve yayın vardır. En etkili kombinasyon ise kemoterapotiklerden bir ilaç ile tamoksifendir (23).

**Tablo 2.5.** Etkinliklerine göre meme kanseri tedavisinde kullanılan ilaçların sınıflandırılması (14).

Çok aktif olanlar (>%50 cevap oranı)	Orta derecede aktif olanlar (%20 den %50'ye varan cevap oranı)	Zayıf aktif olanlar (%20 cevap oranı)
Docetaxel	Cisplatin	Actinomycin
Doxorubicin	Cyclophosphamide	Amonifide
Epirubicin	Esorubicin	Amsacrine
Paclitaxel	Estramustine	Bisantrene
Vinorelbine	5-Fluorouracil	Carboplatin
	Ifosfamide	Carmustine (BCNU)
	Losoxantrone	Chlorambucil
	Methotrexate	CPT-11
	Mitomycin-C	Cytarabine
	Mitoxantrone	Dacarbazine
	Pirarubicin	Elliptinium
	Prednimustine	Etoposide
	Thiotepa Vinblastine	Fenretinine
	Vincristine	Floxuridine
		Gemcitabine
		Hexamethylmelamine
		Hydroxyurea
		Idarubicin
		Lomustine (CCNU)
		Lonidamine
		Melphalan
		Menogaril
		6-Mercaptopurine
		Miltefosine
		Mithramycin
		Mitolactol
		Nitrogen mustard
		Vindestine

Yeni ve umut verici ilaçlar arasında ise

Taksol

Taksoter

Navebine

Topotecan

Amonafide

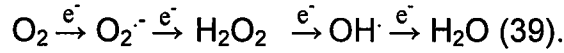
Suramin

Lipozomal Doxorubicin yer almaktadır (13,14,19,21,30).

## 2.2. Reaktif Oksijen Türleri

Moleküler oksijen ( $O_2$ ) temel olarak solunum için gerekli bir elementtir. Moleküler oksijen, bir yandan hücrelerin ihtiyacı olan enerjiyi sağlarken diğer yandan da hücrel bileşiklere ciddi hasarlar verir (40).

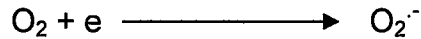
Moleküler oksijen, serbest radikal oluşturan reaksiyonlarla, süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), hidroksil radikali ( $OH^\cdot$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), singlet oksijen ( $^1O_2$ ) gibi oldukça reaktif oksijen türlerine dönüşür. Metabolik ara ürün olarak yüksek reaktif oksijen türlerinin oluşması aerobik yaşamın evrimsel bir sonucu olarak değerlendirilebilir. Çünkü oksijen yapısal döngüsü, tek değerlikli yollar içermektedir (41).



Reaktif oksijen türleri üretimi birçok hücrel fonksiyon için elzemdir. Örneğin fagositlerce bakterilerin öldürülmesi esnasında  $O_2$  radikallerinden faydalanılır. Ancak reaktif oksijen türlerinin bir yandan bizim aerobik sistemlerimiz için elzem olması, diğer yandan da yaşlanıp yavaş yavaş ölüme gidişimize katkıda bulunması paradoksal bir durumdur. Süperoksit anyonları gibi toksik oksijen türlerinin DNA'ya zarar verdikleri, enzimleri inaktive ettikleri, hormonları okside ettikleri, membranları parçaladıkları ve çeşitli tipte hücreleri öldürdükleri gösterilmiştir. Aslında birçok kanıt serbest radikal reaksiyonlarının hücrel yıkılma ve yaşlanma ile sonuçlanan dejeneratif süreçlerin başlıca nedenleri ve destekleyicileri olduklarını göstermektedir (41). Bazı reaktif oksijen türlerinin karakteristikleri Tablo 2.6.'de gösterilmiştir (42).

### 2.2.1. Süperoksit Anyon Radikali ( $O_2^-$ )

Süperoksit anyon radikali reaktif oksijen türleri içinde en iyi bilinen radikaldir (42).  $O_2$ , dış orbitalinde eşleşmemiş iki elektron içeren ve bu şekli ile zararlı etkisi olmayan bir moleküldür (43,44,45). Bu moleküldeki  $\pi^* 2p$  orbitallerden birinin herhangi bir şekilde elektron alması ile süperoksit radikali ( $O_2^-$ ) oluşur (46).



Her iki orbitali de elektron alırsa yine bir serbest radikal olan peroksil anyonu ( $O_2^{2-}$ ) oluşur (43,44,45). Fizyolojik koşullarda oksijenin yaklaşık %2'si mitokondrilerde tam redüksiyona uğramaz ve son reaksiyon ürünü olarak serbest radikallerin oluşumu ile sonuçlanır (40).

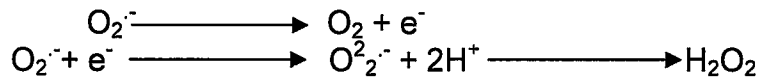
Süperoksit anyon radikalinin kimyasal özellikleri kendisinin çözündüğü ortama bağlı olarak çok değişir. Aköz bir solusyonda  $O_2^-$ , askorbik asid ve tiyol gibi molekülleri okside edebilen zayıf bir oksitleyici ajandır. Oysa  $O_2^-$ ,

çok daha kuvvetli bir oksitleyici ajandır ve sitokrom c ve ferrik EDTA gibi çeşitli demir komplekslerini indirgeyebilir. Süperoksit anyonu aköz solusyonlarda, içinde  $H_2O_2$  ve oksijenin de olduğu dismutasyon reaksiyonlarıyla hızla kaybolur (46).

**Tablo 2.6.** Bazı reaktif oksijen türevlerinin karakteristikleri (42).

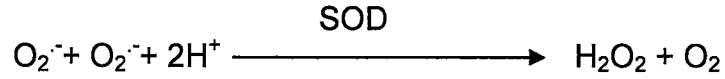
Radikal	Kimyasal sembolü	Yarı ömrü	Özellikleri
Süperoksit anyonu	$O_2^{\cdot-}$	$10^{-6}$	İyi bir redüktan, zayıf bir oksidandır.
Hidroksil radikali	$OH^{\cdot}$	$10^{-9}$	Elektron alıp verme ve transfer reaksiyonlarında çok aktif, difüzyon mesafesi kısadır.
Hidroperoksil radikali	$HO_2^{\cdot}$	$10^{-8}$	Süperoksit anyon radikaline göre daha hidrofobik ve daha güçlü bir oksitleyicidir, membran lipidlerinde lipid peroksidasyonuna neden olabilir.
Peroksil radikali	$ROO^{\cdot}$	$10^{-2}$	Hidroksil radikaline göre düşük okside edebilme yeteneği vardır, fakat çok daha yüksek difüzyon oranına sahiptir.
Alkoksi radikali	$RO^{\cdot}$	$10^{-6}$	$ROO^{\cdot}$ ve $OH^{\cdot}$ arasında aracı olarak lipidlerle etkileşebilme gücüne sahiptir.
Hidrojen peroksit	$H_2O_2$	10-100	Organik substrat ile düşük oranda etkileşme ile oksidan etki gösterir ve hücre membranlarına yüksek penetrasyon kabiliyeti vardır.
Singlet oksijen	$^1O_2$	$10^{-6}$	Güçlü oksidandır.
Moleküler oksijen	$O_2$	$>10^2$	Zayıf oksidandır.

Süperoksit anyonu elektron fazlasını bir başka elektron alıcısına vererek tekrar moleküler oksijene oksitlenebilir. Ya da önceden bahsedildiği gibi bir elektron daha alarak peroksil anyonunu ( $O_2^{2\cdot-}$ ) oluşturur, bu da ortamdan iki proton alarak ( $H^+$ ) hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) oluşumuna neden olur (43,44,45).



Oksijenin metabolizması esnasında ilk oluşan serbest radikal olan süperoksit anyonundan ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroperoksitler ( $HO_2$ ) gibi diğer zararlı oksijen metabolizması ürünleri oluşur. Süperoksit anyonu hücre membranlarından, muhtemelen iyon kanallarını kullanarak çok az çıkıyor olsa da, membranları kolayca geçemediği için zararlı etkisi oldukça düşük düzeyde bir radikaldir. Çoğunlukla redüktiftir ve  $H_2O_2$  kaynağı olarak görev yapar (43).

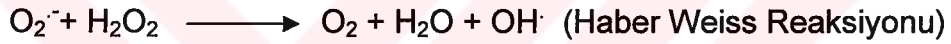
Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi bir  $O_2^{\cdot-}$ 'nin oksijene oksidasyonunu, başka bir  $O_2^{\cdot-}$ 'nin de  $H_2O_2$ 'ye oksidasyonunu katalizleyerek  $O_2^{\cdot-}$ 'ni uzaklaştırır. Bu olaya dismutasyon adı verilir (45).



Süperoksit dismutaz enziminin yokluğunda reaksiyon nonenzimatik olarak meydana gelir fakat yaklaşık olarak  $10^4$  kat daha yavaştır (45).



Süperoksit radikalinin her iki şekilde de  $H_2O_2$ 'ye dönmesinin dışında, ayrıca süperoksit radikali ile  $H_2O_2$ , Haber-Weiss reaksiyonu adı verilen bir reaksiyon ile daha potent bir radikal olan  $OH^{\cdot}$  radikalini oluşturur (42,43).

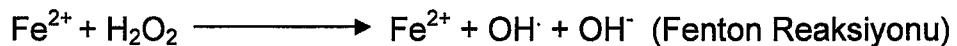


### 2.2.2. Hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ )

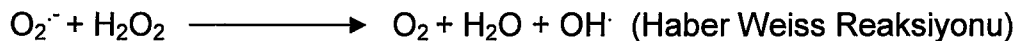
Hidroksil radikali son derece kısa olan yarı ömrü nedeniyle biyolojik sistemdeki en güçlü oksidandır. Organizmadaki tüm maddelerle reaksiyona giren en reaktif oksijen türlerinden biridir Hidroksil radikali DNA zincirinin kırılmasından, lipid peroksidasyonunun başlamasından, protein modifikasyonundan sorumludur (40,45). Bu radikal ilk olarak 1934 yılında Haber ve Weiss adlı araştırmacıların gösterdikleri, kendi adları ile anılan, reaksiyon ile ortaya konmuştur (47).

Hidroksil radikali hücrede çeşitli yollarla oluşuyor ise de, yaygın olarak iki önemli biyolojik kaynağı vardır.

$H_2O_2$ 'nin, ortamdaki iki değerlikli demir ( $Fe^{2+}$ ) katalizörlüğünde Fenton reaksiyonu ile ayrışmasından oluşur (45).

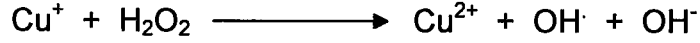


Haber-Weiss tepkimeleri önemli bir hidroksil radikali oluşum tepkimesidir.

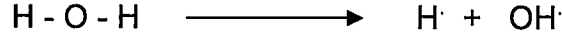


Hidroksil radikali, bakır gibi geçiş metal iyonlarının redükte formlarının  $H_2O_2$  ile teması sonucunda da oluşabilmektedir (45).





Radyasyon sudaki oksijen hidrojen bağlarından birinin kırılması için hidrojenden ve oksijenden birer elektron ayrılır. Böylece iki radikal ortaya çıkar (42).



### 2.2.3. Hidroperoksil radikali ( $\text{HO}_2\cdot$ )

$\text{O}_2\cdot^-$ 'nin protonlanmış formudur.  $\text{O}_2\cdot^-$ 'den hem daha güçlü bir oksidan, hem de daha güçlü bir redüktan maddedir, fakat bu radikalin pKa değeri 4.7-4.8 civarında olduğu için, pH 7.4'te çok az bulunur (46).

### 2.2.4. Hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

Hidrojen peroksitin ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) eşleşmemiş elektronu yoktur ve bir serbest radikal olarak nitelendirilmez (45). Süperoksit üreten her sistem dismutasyon reaksiyonunun bir sonucu olarak aynı zamanda  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'de üretir. Hidrojen peroksit urat oksidaz, glukoz oksidaz ve D amino asit oksidaz gibi bir çok enzimin katalizlediği reaksiyonlar sonucunda oksijene iki elektron transfer edilmesi ile de oluşur (46).

Hidrojen peroksit oksijen metabolizması esnasında oluşan bir ara üründür. Genellikle tek başına organik molekülleri okside etmek için yeteri kadar bir reaktivitesi olmasa da, biyolojik olarak önemli bir oksidandır. Süperoksit anyonuna nazaran, biyolojik membranlardan, düşük elektriksel yükü ve non iyonize özelliklerinden dolayı daha kolay geçebilmesi (mitokondriyal  $\text{H}_2\text{O}_2$  sızmasında olduğu gibi) ve direkt kendisinin sitotoksitesinden ziyade  $\text{OH}\cdot$  radikalleri gibi daha reaktif radikallerin üretimine katkıda bulunmasından dolayı önemli bir oksijen metabolizması ara ürünüdür (43,48).

Hidrojen peroksitin redoks özellikleri ve geçiş metal iyonları varlığında yüksek reaktif oksijen türleri oluşturma kabiliyeti, kendisine karşı vücut savunma mekanizmalarının geliştirilmesine yol açmıştır. İstenmeyen  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in uzaklaştırılması katalaz, selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve diğer bazı enzimlerin aktiviteleri ile sağlanır (49,50).

### 2.2.5. Singlet oksijen ( $^1\text{O}_2$ )

Bir başka reaktif oksijen türü olan fakat radikal olarak kabul edilmeyen singlet oksijen, normal oksijene göre biyolojik moleküllerle daha hızlı reaksiyona girmesini sağlayan elektronik düzenlemeye maruz kalmış bir

oksijen formudur. Örneğin singlet oksijen lipid peroksitlerini oluşturmak üzere membran lipidlerinin yağ asit zincirleriyle doğrudan reaksiyona girebilmektedir. Singlet oksijen, bazı pigmentlerin ışığa maruz kalması ile oluşabilmektedir. Işık, pigment tarafından absorbe edilir ve pigment daha yüksek bir elektronik uyarım düzeyine ulaşır. Bu yüksek enerji oksijene aktarılır ve sonuçta singlet oksijen oluşur. Bitkilere bulunan bazı bileşikler, bazı kozmetik ürünleri, bazı ilaçlar (tetrasiklinler vb) ışık varlığında singlet oksijen oluşumuna neden olabilmektedirler (51).

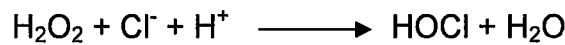
### 2.2.6. Ozon (O<sub>3</sub>)

Ozon havayı kirleten ve insanlarda akut ve kronik maruziyeti sonrası insan sağlığına çeşitli etkileri olan bir maddedir. Ozon biyolojik etkisini hedef moleküllerle doğrudan reaksiyona girerek ya da poliansatüre serbest yağ asitlerinin peroksidasyonu ve protein, amin ve tiyollerin oksidasyonu ile oluşan serbest radikaller aracılığı ile gerçekleştiren güçlü bir oksidandır. Ozon indirgenmesi boyunca oluşan hidroksil radikalleri baz hasarları ve zincir kırıklarına neden olarak DNA'ya ciddi zararlar verebilirler (52).

Jorge ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada ozon tarafından oluşturulan DNA hasarının yüksek oranda mutajenik olup DNA üzerinde G:C baz çiftlerinde baz değişimlerine neden olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca Kanofsky ve Sima, ozonun bazı biyolojik moleküllerle reaksiyona girmesi sonunda singlet oksijenin oluşabildiğini bulmuşlardır (53).

### 2.2.7. Hipokloröz Asit (HOCl)

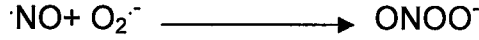
Nötrofillerin konak savunmasında çok önemli rolleri vardır. Nötrofiller mikroorganizmaları 2 mekanizma ile öldürürler. Bu mekanizmalardan birisi oksijen bağımlı iken diğeri oksijenden bağımsızdır. Oksijen bağımlı mekanizmada nötrofillerin bakteriosidal ürünleri arasında süperoksit anyon ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türleri olduğu kadar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi radikal olmayan moleküllerde yer alır. Bu ürünler solunumsal patlama olarak bilinen bir seri karmaşık reaksiyonlar sonucu üretilirler. Süperoksit anyonu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e ya kendiliğinden ya da süperoksit dismutaz enzimi aracılığıyla dönüşür. Süperoksit anyonunun H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile reaksiyona girmesi sonucu güçlü bir bakterisidal olan hidroksil radikali oluşur. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin klor (Cl) ile miyeloperoksidaz tarafından katalizlenen bir tepkimeye girmesi sonucunda ise oldukça toksik olan HOCl oluşur (54).



### 2.2.8. Nitrojen Oksitleri

Nitrik oksit (:NO) çeşitli hücrelerce salınan biyolojik bir mediatördür (55). Nitrik oksit yarı ömrü çok kısa olan (3-5 sn) fakat çok fazla biyolojik fonksiyonları olan bir moleküldür. Nitrik oksit ve nitrojen dioksit (:NO<sub>2</sub>) tek

sayıda elektron içerirler, bu nedenle serbest radikaldirler. Zehirli bir gaz olan  $\cdot\text{NO}$ , güçlü bir okside edici ajandır. In vivo ortamda salınan  $\cdot\text{NO}$ , nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) veya nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ) otookside olabilir. Nitrojen dioksit ise zayıf redükte edicidir. Nitrik oksit endotel kökenli vazodilatör faktörle aynı maddedir (48). Nitrik oksitin süperoksit iyonları ile reaksiyonu protein moleküllerine saldırabilen güçlü oksidan bir ajan olan peroksinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) oluşumu ile sonuçlanır (55).



Pekçok biyolojik molekülü zedeleyebilir ve asit pH'da, küçük miktarlarda hidroksil radikali salıvererek dekompoze olabilir (48).



$\text{ONOO}^-$ 'in proteinler üzerine olan etkisinin major ürünü tirozin rezidülerinin orto pozisyonlarına nitro grubu eklenerek oluşmuş olan Nitrotirozin (NT)'dir.  $\text{ONOO}^-$  proteinler üzerine tiyol rezidü oksidasyonlarını da içeren farklı kimyasal modifikasyonlara da neden olabilir (55).

### 2.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Hücrelere Etkisi

Serbest radikallerin hücre yapı ve fonksiyonlarına zararlı etkileri olduğu bilinen bir gerçektir. Lipidler, proteinler, karbohidratlar, nükleik asitler serbest radikaller için hedef teşkil eden yapılardır (55).

#### 2.3.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Lipidlere Olan Etkileri

Lipid peroksidasyonu artmış membran rijiditesi, aterosklerozis, karsinogenezis ve miyokard enfarktüsü gibi patolojik olaylarla ilişkili karmaşık bir süreçtir (56). Poliansature yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olan lipid peroksidasyonu yağ asid-hidroperoksitleri ve sekonder ürünlerden olan aldehit bileşimlerinin oluşumu ile sonuçlanan otokatalitik kontrolsüz bir reaksiyondur. Hayvan hücre membranları ve lipoproteinler lipid peroksidasyonuna duyarlıdır. Çünkü yapılarında linoleik asit (18:2), araşidonik asit (20:4) ve docosa hekzanoik asit (22:6) vardır ve bu yapıların lipid peroksidasyonuna hassasiyetleri yapılarındaki çift bağ sayısı arttıkça yükselir (57).

Serbest radikaller çeşitli substratlar ile kimyasal reaksiyonlara girerler. Bu reaksiyon başlama, çoğalma ve sonlanma şeklinde üç basamakta gerçekleşir (58).

### 2.3.1.1. Başlangıç basamağı

Lipid peroksidasyonu serbest yağ asidinden (LH) lipid radikali oluşturmak üzere (L<sup>·</sup>), (H) atomunun koparılmasıyla başlamaktadır (Şekil 2.1). Bu reaksiyona başlangıç reaksiyonu denir. Hidroksil radikali, peroksil radikallerinin çoğu (ROO<sup>·</sup>) ve alkoksil radikallerinin çoğu poliansature serbest yağ asitlerini okside edebilme yeteğine sahipken süperoksit radikalleri bu yeteneğe sahip değildir.

Mevcut peroksidasyon reaksiyonunun in vivo ortamda hangi ajan tarafından gerçekleştirilmiş olabileceğini kesin olarak bilmek imkansızdır. Bu başlangıç reaksiyonunun ürünü, hızla konjuge dien yapısı oluşturabilen yağ asit radikalidir. Yağ asit radikaline oksijenin çok hızlı eklenmesi sonucunda lipid peroksil radikali (LOO<sup>·</sup>) oluşur (57,59,60).

### 2.3.1.2. Çoğalma basamağı

Oluşmuş olan bu lipid peroksil radikali komşu yağ asitleri ile etkileşime girerek yeni bir oksidasyon zincirine neden olabilmektedir. Bu reaksiyon sonucunda lipid peroksil radikali (LOO<sup>·</sup>) lipid hidroperoksite dönüşürken hidrojen atomunu kaybetmiş poliansature yağ asidi ise yeni bir yağ asit radikaline dönüşür (57,59,60).

Oluşan peroksil radikali, diğer bir peroksil radikali ile birleşebilir ya da membran proteinleri ile etkileşebilir. Fakat en önemlisi peroksil radikallerinin membrandaki komşu yan zincirlerden hidrojen atomlarını çıkarabilmeleri ve peroksidatif zincir reaksiyonunu yaymalarıdır. Peroksidasyon bir kere başladıktan sonra otokatalitik olarak yayılabilmekte ve yüzlerce yağ asidi zinciri lipid hidroperoksitlerine çevrilebilmektedir (61,62).

Lipid hidroperoksitler iki sebepten dolayı önemlidir :

-Bu reaksiyon sonucunda lipid peroksidasyonunu tetikleyen radikaller (LO<sup>·</sup>, LOO<sup>·</sup> gibi) oluşur.

-Bu reaksiyon sonucunda çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler (örn. Malonildialdehit=MDA gibi) gibi radikal olmayan ürünler oluşur (57). Örneğin MDA, membran komponentlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına neden olmakta ve deformabilite, iyon transportu, enzim aktivitesi gibi iç membranın bazı özelliklerini değiştirmektedir. Ayrıca diffüze olabildiğinden, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girerek, mutajenik ve karsinojenik etki gösterebilmektedir (61,62,63,64).

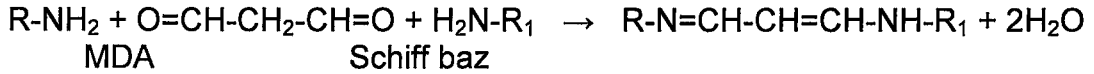
### 2.3.1.3. Sonlanma

Lipid hidroperoksitleri demir ve bakır iyonları gibi geçiş metalleri varlığında unstabildirler ve bu metallerle girdikleri reaksiyon sonucunda lipid alkoksil radikallerine ve lipid peroksil radikallerine dönüşürler. Bu iyonların fosfat esterleri ile oluşturduğu basit şelatları (Fe<sup>2+</sup>-ADP), hem, hemoglobin ve myoglobini de içeren bazı demir proteinleri, lipid peroksitlerini bozarak

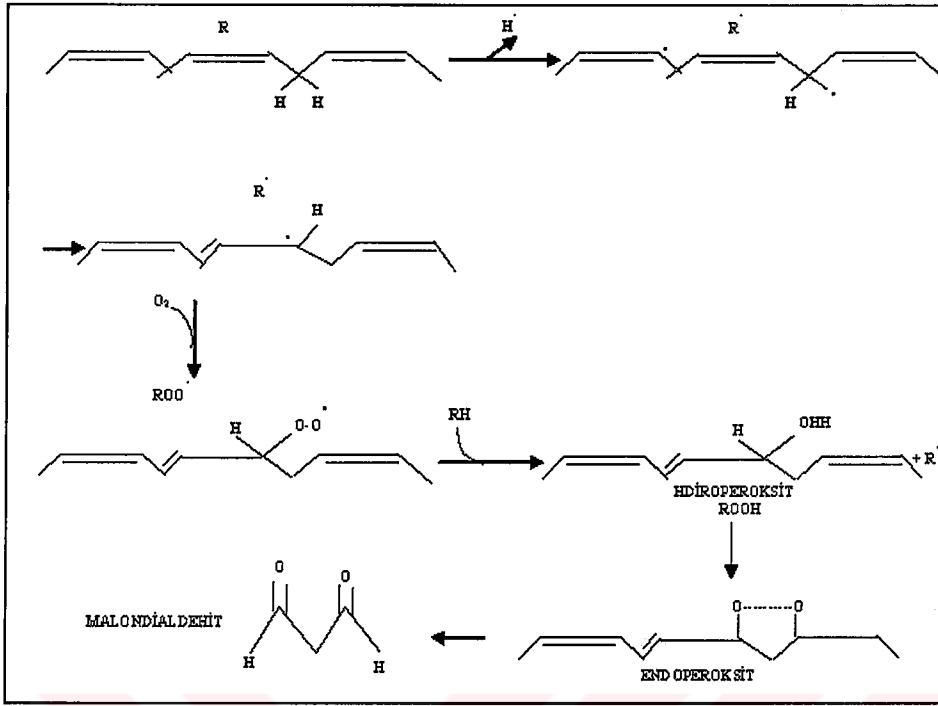
peroksidasyonu sonlandırmaktadır. Bu kompleks bozulma reaksiyonlarının ürünleri pentan, etan gibi hidrokarbon gazları, ROOH, RCOOH, ROH ve RCHO grupları içeren kısa zincirli yağ asitleridir (57,61,63).

- Lipid Peroksidasyonunun Ürünü Olarak Malondialdehid (MDA)

Peroksidasyon sonucu oluşan kısa zincirli ürünler de peroksidasyona uğramış membran ya da hücrenin herhangi bir alanında bir takım etkilerde bulunabilirler. MDA iki amin grubuyla schiff baz oluşturmak için etkinlik gösterebilen bifonksiyonel aldehittir.



Bu şekilde proteinlerin çapraz bağlanmaları sonucunda enzimler inaktive olur ve seroid, lipofusin gibi yaşlılık pigmenti olarak bilinen yüksek molekül ağırlıklı agregatlar oluşur (65). MDA ayrıca fosfatidil etanol aminin amino grubu ile bir başka fosfatidil etanol amin grubunu, fosfatidil serini ya da proteini bağlayabilir ve bu şekilde membran yapısını tahrip edebilir (65). Ek olarak MDA, DNA ile reaksiyona girerek floresan ürünler oluşumuna neden olabilir. MDA'nın biyolojik moleküllerle çapraz bağlar kurarak oluşturduğu schiff baz floresan ürünler lipid peroksidasyonunun belirlenmesi ve değerlendirilmesi için bir ölçüt olarak sıklıkla kullanılmıştır. Farklı floresan bileşimlerde lipid peroksidasyonu esnasında gelişebilir ya da DNA, MDA dışında farklı peroksidasyon ürünleriyle de floresan agregatlar oluşturabilirler. MDA primer aminlerle de 1,4-dihidropiridin-3,5-dikarbaldehit oluşturmak üzere reaksiyona girebilir (65).



Şekil 2.1. Lipid peroksidasyonu (50).

### 2.3.2. Proteinlere Olan Etkileri

Reaktif oksijen türleri direkt ya da indirekt olarak proteinlerde hasar oluşturabilirler (66). Serbest radikallerin DNA, protein, lipid gibi birçok hücrenel bileşeni tahrip edebilme kapasitesine sahip oldukları bilinmektedir. *In vivo* ortamda oksidatif stres durumlarında DNA ve protein hasarları lipid hasarlarından çok daha önemlidir (55).

Proteinlerin *in vivo* oksidatif modifikasyonları hücrenel birçok fonksiyonları etkileyebilir. Bu modifikasyonlar reseptörlerin işleyişine, sinyal transdüksiyon mekanizmasına, transport sistemlerine ve enzimlere zarar verebilir (55).

Bunların dışından sekonder olarak diğer biyomoleküller de zarar görebilir. Örneğin DNA tamir enzimlerinin inaktivasyonu, DNA replikasyonunda DNA polimeraz enzim fonksiyon bozuklukları, otoimmün reaksiyonlara neden olan yeni antijenlerin oluşumu gibi (55,67,68).

Oksijen ve nitrojen radikallerin (ROS/RNS) proteinler üzerindeki etkisine bağlı gelişen kimyasal reaksiyonlar kompleks olup, daha henüz tamamlanmamış birçok ürünün oluşmasına neden olurlar. Proteinler üzerindeki oksidatif hasarı protein karbonillerindeki (PCO) artış ile protein tiyollerindeki (PSH) azalış en iyi yansıtmaktadır. Proteinler üzerine olan ROS atakları sonucu histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi birçok aminoasit zarar

görebilir. Bu aminoasitlerden birkaçına ya da proteinlerin peptid yapılarında oluşan hasar sonucu PCO ürünleri oluşabilir (69).

Reaktif oksijen türlerinin oluşum mekanizmalarından biri metallerle katalizlenen oksidasyon reaksiyonlarıdır. Uygun bir elektron vericisi varlığında (NADH, NADPH, askorbat) metallerle olan bu reaksiyonlar  $H_2O_2$  oluşturma ve hem süperoksit bağımlı hem de bağımsız mekanizmalar yoluyla  $Fe^{3+}$  ve  $Cu^{2+}$ 'yi indirgeyebilme yeteneğindedirler. Bu reaksiyonlarla oluşan  $Fe^{2+}$  ve  $Cu^{+}$ 'in proteinler üzerindeki metal bağlayıcı kısımlara bağlanması, OH $\cdot$  oluşumuna yol açar. Bu hidroksil radikalleri metal bağlayıcı amino asitlere özellikle saldırır. Oksidatif olarak modifiye olmuş proteinler proteolitik yıkım için hedeftirler; ancak, bazı okside protein formları sadece proteolize dirençli olmayıp aynı zamanda diğer proteinlerin okside formlarının yıkımını sağlayacak proteazları da inhibe edebilme yeteneğindedir (66).

### 2.3.3. Karbohidratlara Etkileri

Çalışmalar, alfa-hidroksialdehit yapıya sahip karbohidratların metal iyonlarının varlığında radikallerin etkisi ile ketoaldehitlere dönüştüğünü göstermiştir. Ayrıca bir hidroksil radikal temizleyicisi glukozun da dahil olduğu bir çok monosakkaridin hızlı bir şekilde otooksidasyona uğradığını göstermiştir (70).

### 2.3.4. Nükleik Asitlere Olan Etkileri

Memeli hücrelerinde oksidatif stres ile sıklıkla DNA zincir kırılmaları olur. Bu durum  $NAD^+$ 'yi parçalayarak ADP riboz üreten poly (ADP-riboz) sentetaz enziminin aktivasyonuna neden olur. Poly (ADP-riboz) sentetaz enziminin aşırı aktivasyonu hücresele  $NAD^+$  konsantrasyonlarında büyük düşmelere ve ATP sentez inhibisyonlarına neden olur (51).

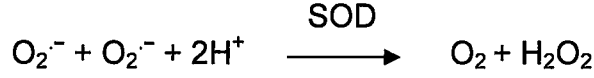
Oksidatif stres endoplazmik retikulum ve mitokondrideki serbest kalsiyum ( $Ca^{2+}$ )'u bağlayan enzimleri inaktive ederek ve plazma membranında  $Ca^{2+}$ 'u hücreden dışarı atan transport sistemlerine zarar vererek hücre içi serbest  $Ca^{2+}$  düzeyinde artışlara neden olabilmektedir. Eğer hücre içi serbest kalsiyum düzeyi fazla artarsa, hücre iskeletini parçalayabilen proteazlar aktive olabilir.  $Ca^{2+}$  ayrıca DNA zincir kırıklarına neden olan endonükleaz aktivasyonlarına da neden olabilir (51).

## 2.4. Antioksidanlar

Antioksidan, ortamda çok düşük konsantrasyonda bulunduğu halde okside edebilen bir substratla karşılaştığında, substratın okside olmasını belirgin bir şekilde geciktiren ve önleyen madde anlamına gelmektedir. Canlı sistemlerindeki antioksidanlar Tablo 2.7.'de gösterilmiştir (42).

### 2.4.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz, süperoksit radikalinin eliminasyonundan sorumlu kritik bir enzim ve aerobik hücrelerde anahtar bir antioksidandır (71). Süperoksit dismutaz,  $O_2^{\cdot -}$  nin  $O_2$  ve  $H_2O_2$  'e dismutasyonunu katalizleyerek oksidatif strese karşı koruma sağlar (72).



Ökaryotlarda 2 tip süperoksit dismutaz vardır; biri sitoplazma ve mitokondriada bulunan Cu,Zn-SOD diğeri ise mitokondriada bulunan Mn-SOD'dur. Primatlarda Mn-SOD aynı zamanda sitoplazmada da bulunur (73).

**Tablo 2.7.** Canlı sistemlerdeki antioksidanlar (42)

Antioksidanlar	Lokasyon	Fonksiyon
Cu,Zn-SOD	Eritrositler, sitoplazma	$O_2^{\cdot -}$ 'yi etkisiz hale getirir.
Mn-SOD	Mitokondriya	$O_2^{\cdot -}$ 'yi etkisiz hale getirir.
Ekstraselüler SOD	Kan plazması, vasküler sistem	$O_2^{\cdot -}$ 'yi etkisiz hale getirir.
Katalaz	Peroksizomlar	$H_2O_2$ 'yi etkisiz hale getirir.
Glutasyon peroksidaz	Sitoplazma, mitokondriya	$H_2O_2$ ve lipoperoksitleri degrade eder.
Glutasyon transferaz	Sitoplazma, dış mitokondriyal membran, endoplazmik retikulum	
Ferritin	Sitoplazma	Fe iyonlarına şelasyon yapar.
Transferrin	Ekstraselüler ortam	Fe iyonlarına şelasyon yapar.
Laktoferrin	Ekstraselüler ortam	Fe iyonlarına şelasyon yapar.
Seruloplazmin	Ekstraselüler ortam	Cu iyonlarına şelasyon, Fe iyonlarına oksidasyonu ve $O_2^{\cdot -}$ 'i ise etkisiz hale getirir.
Albumin	Ekstraselüler ortam	Cu iyonlarına şelasyon yapar. OH $\cdot$ , LOO $\cdot$ , HOCl'i etkisiz hale getirir
<b>Düşük Moleküler Ağırlıklı Bileşikler</b>		
Vitamin E	Hücre membranları	OH $\cdot$ , LOO $\cdot$ , HOCl vs'yi etkisiz hale getirir.
Ubiquinol	Mitokondriyal membranlar	OH $\cdot$ , LOO $\cdot$ , HOCl vs'yi etkisiz hale getirir.
Karotenoidler	Hücre membranları	OH $\cdot$ , LOO $\cdot$ , HOCl, $^1O_2$ vs'yi etkisiz hale getirir.
Vitamin C	Sitoplazma	OH $\cdot$ , $O_2^{\cdot -}$ vs'yi etkisiz hale getirir.
Karnozin	Sitoplazma	Çeşitli ROS'ları etkisiz hale getirir.
N-asetil sistein	Sitoplazma	OH $\cdot$ , LOO $\cdot$ , HOCl, $^1O_2$ vs'yi etkisiz hale getirir.
Taurin	Sitoplazma	Hipoklorit nötralizasyonu yapar.
Glutasyon	Sitoplazma, mitokondriya	OH $\cdot$ , $O_2^{\cdot -}$ 'yi etkisiz hale getirir.
Urik asit	Kan	Lipid peroks. önler.
Bilirubin	Kan	Lipid peroks. önler.



#### 2.4.1.1. Cu ve Zn İçeren SOD (Cu,Zn-SOD)

Bu enzimlerin aktif bölgelerinde bakır ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ve çinko ( $\text{Zn}^{2+}$ ) vardır. Katalitik siklus esnasında bakırın değerliğinde değişiklikler gelişirken çinkonun daha çok yapısal bir rol oynadığı düşünülmektedir (74). 32000 Dalton (Da) molekül ağırlığında bir enzimdir. Disülfid köprüsü ile bağlanmış, birbirinin aynı olan iki alt üniteden oluşmuştur. Her bir alt ünite birer adet  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Zn}^{2+}$  içermektedir (75). Enzim aktivitesi için  $\text{Cu}^{2+}$  mutlaka gereklidir.  $\text{Zn}^{2+}$ 'nin ise olasılıkla enzimin stabilitesini sağladığı, yerine kobalt ( $\text{Co}^{2+}$ ), Civa ( $\text{Hg}^{2+}$ ), ve kadmiyum ( $\text{Cd}^{2+}$ ) geçmesi durumunda da enzimin aktivitesini kaybetmediği gösterilmiştir. Süperoksit anyon dismutasyonu  $\text{Cu}^{2+}$  ile sağlanır (76,77).

Cu,Zn-SOD ökaryotik hücrelerin sitozollerinde, gram negatif bakterilerin periplazmasında bitkilerin plastidlerinde ve memelilerin ekstraselüler aralıklarında bulunur. Bunun yanısıra mitokondride de yer almaktadır (74). Bakır iyonunun  $\text{O}_2^-$  ile redüksiyonu sonucunda bakır imidazol bağı kırılır ve imidazol protonlanır. Ardından bakırın yeni bir  $\text{O}_2^-$  ile reoksidasyonu esnasında imidazoldaki protonun  $\text{O}_2^-$ 'yi  $\text{HO}_2^-$ 'ye çevirmesi ile Cu-imidazol bağı yeniden kurulur. Oluşan  $\text{HO}_2^-$  aktif bölgeyi terkedip yeni bir proton ile birleşerek  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'yi oluşturur (74).

Cu,Zn-SOD oldukça kararlı bir enzimdir. Saflaştırılması esnasında kullanılan organik çözücüler (üre ve sodyum dodesil sülfat gibi) ile aktivitelerini kaybetmediği gösterilmiştir. Cu,Zn-SOD siyanid (KCN) (5 mM) tarafından tersinir olarak inhibe edilir. Siyanidin C atomu, enzimin  $\text{Cu}^{2+}$  atomuna bağlanarak enzimi inhibe etmektedir.  $\text{H}_2\text{O}_2$  ise enzimde  $\text{Cu}^{2+}$ 'yi redükleyebilir. Ancak 10  $\mu\text{M}$ 'ün üzerindeki  $\text{H}_2\text{O}_2$  konsantrasyonlarında enzim irreversible olarak inhibe olmaktadır. In vivo koşullarda süperoksit radikalinin kendisi  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile yarışa girerek bu inhibisyonu önlemektedir (78,79).

#### 2.4.1.2. Mn İçeren SOD (Mn-SOD)

Ökaryotik hücrelerin mitokondri matrikslerinde ve çeşitli bakterilerde bulunan bir enzimdir. Bakteriyel enzim eşit büyüklükte iki alt birimden oluşur ve her alt birim bir  $\text{Mn}^{2+}$  içermektedir. Molekül ağırlığı 40000 Da civarındadır (80). E coli'de bulunan Mn-SOD bakterinin anaerobik gelişimi esnasında çok nadir olarak üretilir. Fakat bakterinin oksijenle teması sonucu bu enzim uyarılır. Ayrıca intraselüler  $\text{O}_2^-$  üretimini arttıran maddeler de bu enzimin aktivasyonunu arttırmaları (74).

Mitokondriyal enzim ise dört alt birim içeren ve molekül ağırlığı 80000 Da olan bir tetramerdir (80). Enzim kloform, etanol ve %2'lik sodyum dodesil sülfat tarafından inhibe olur. Siyanür ise bu tür bir etki göstermez (81).

### 2.4.2. Katalaz (KAT)

Katalaz dört subünitten oluşan bir hemoproteindir. Mol başına 4 atom gram  $Fe^{3+}$  içerir. Protohem aktif bölgenin temel komponentidir.  $Fe^{3+}$  içeren her alt birimde bir protoporfirin IX bulunmaktadır. Bu enzim peroksidaz aktivitesi dışında bir molekül hidrojen peroksiti elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir. İn vivo koşullarda baskın olan peroksidaz aktivitesidir (70,82).

Subünit ağırlığı yaklaşık olarak 60 kDa'dır. Bu enzimlerin  $H_2O_2$ 'ye karşı  $K_m$ 'leri milimolar düzeyinde olduğundan özellikle yüksek konsantrasyonlardaki  $H_2O_2$ 'lere karşı mücadelelerde çok etkilidirler (74).

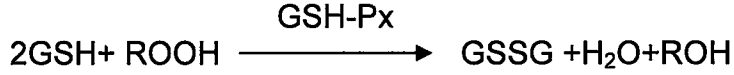
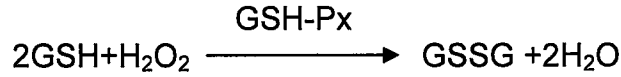


Bu fonksiyonu glutatyon peroksidazinkine benzer ancak bu enzimlerin farklı substrat afiniteleri vardır. Düşük  $H_2O_2$  düzeylerinde aktif olan enzim GSH-Px iken yüksek  $H_2O_2$  düzeylerinde ise katalaz aktiftir. Katalazın dokudaki dağılımı süperoksit dismutaz gibi geniştir. Enzim aktivite düzeyleri dokular arasında değişiklik gösterdiği gibi hücrenin kendi içinde dahi farklılıklar söz konusudur. Karaciğer, böbrek ve kırmızı kan hücrelerinde yüksek düzeyde katalaz bulunmaktadır. Hepatositler içinde mikrozom ve sitozolde az da olsa katalaz aktivitesi bulunmasına rağmen katalazın asıl olarak bulunduğu yer peroksizom organelidir (45). Memeli katalazı metanol, etanol, nitrit formik asit gibi ufak moleküllere karşı peroksidaz aktivitesi de gösterebilmektedir. Katalaz sıkıca bağlanmış ve yapısındaki inaktif  $Fe^{4+}$  birikimini önleyici görevi olan NADPH içerir (74).

Enzimin inhibitörleri; asetat, askorbat, azid, siyanid, siyanojenbromid, 2,4-diklorofenol, etanol, florid, formik asit, hidroksilamin, metanol, monokloramin, ve nitrittir (50).

### 2.4.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

Bir çok canlı intraselüler sitozol ve mitokondrial matriksde glutatyon peroksidaz (GSH-Px) içerirler. Bu enzim  $H_2O_2$  ve organik hidroperoksitleri aşağıdaki gibi redükte eder (45). Memeli hücrelerinde lipid peroksidasyonuna karşı en etkili savunma redükte glutatyon (GSH) varlığına bağlıdır ve GSH-Px hücrenin oksidatif hasara karşı korunmasını sağlar (65).



Selenyum (Se) bağımlı GSH-Px, aktivitesi için Se'ye ihtiyaç duyar. 23 kDa'lık tetramerik bir proteindir. Mol başına 4 atom Se içermekte ve aktif bölgesinde de selenosistein bulunmaktadır. Enzimin selenolat formu aktiftir. Peroksitleri alkole redüklerken, kendisi selenenik aside oksitlenir. Redükte glutatyonun reaksiyona girmesi ile enzim, selenosülfite dönüşür. İkinci bir glutatyonun selenosülfite eklenmesi ile glutatyon okside formuna geçer ve enzim aktif durumuna geri döner. Uzun süreli Se eksikliği tüm dokularda GSH-Px aktivitesinin düşmesine yol açar (50,83). Fosfolipid hidroperoksit GPx (PHG-Px) bir diğer selenoproteindir. Molekül ağırlığı 20000 Da'un üzerinde olan monomerik bir enzimdir. Aktif bölgesinde bir Se atomu taşımaktadır. Membran bileşiklerinin hidroperoksitlerinin redüksiyonunda primer görev yapan sitozolik bir enzimdir. Fosfolipidlerin hidroperoksit derivelerini alkol derivelerine redükte eder (84).

Plazmada bulunan GPx'in hücre içinde bulunan GPx'ten farklıdır. Bu enzim de Se içermektedir ancak glutatyonla olan afinitesi on kat daha azdır.  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  ve  $\text{Zn}^{2+}$  bu enzimi tamamen inhibe eder. Bu enzimin görevi ekstraselüler  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'ye karşı koruma ve glutatyon transportunu sağlamaktır (85).

Bunların dışında karaciğer, iskelet kası ve renal kortekste yoğun olarak Se bağımsız GPx bulunmaktadır. Daha küçük molekül ağırlıklı olan bu enzim bir selenoprotein değildir ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  dışında diğer organik hidroperoksitleri substrat olarak kullanabilir. GPx enzimi inhibitörleri; adenzin, adenzin 5'-tetrafosfat, ADP, AMP, ATP,  $\text{Ca}^{2+}$ , Co, CTP,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{NADPH}$ , Ni, D-penisillamin, ve  $\text{Zn}^{2+}$ 'dir (86).

#### 2.4.5. Tiyoller

Tiyol veya sülfidril terimi, SH gruplarını kastetmektedir. Biyolojik tiyoller, sülfür metabolizması ürünleridir. S-H bağının fiziksel özellikleri, reaktivitesine ve kimyasal özelliklerine yön verir. Biyolojik açıdan; pK, redoks potansiyeli ve serbest radikal oluşturma kapasitesi, tiyol biyokimyasının anahtar noktalarıdır (87).

Hücrede birçok biyolojik ve farmakolojik-toksikolojik olaylar, sinyal iletimi ile ilişkili olan tiyol-redoks değişiklikleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. N-asetil sistein, penisilamin, merkaptopropionit glisin, dihidrolipoat ve kaptopril gibi farmakolojik olarak reaktif ajanların geliştirilmesi ile, bu ajanların bazı

spesifik özellikleri gözlenmiştir. Bazı sülfür içeren ajanlar, antioksidan özelliklerinden dolayı tedavide kullanılmaktadır. Tiyoller, doku hasarını önlemek için proteinaz inhibitörlerinin oksidasyonunun baskılanmasında kullanılmaktadırlar. Okside olduklarında sülfidril grupları kalsiyum salınımına neden olmaktadır (87).

#### 2.4.6. Glutasyon (GSH)

1988 yılında ilk kez tanımlanan glutasyon (GSH) memeli hücrelerinin tümünde ve bol bulunan protein olmayan tiyoldür (88). Glutasyon, memeli hücrelerinde bulunan bir tripeptiddir (42). Glutasyon inflamasyonun düzenlenmesinde, immun cevapta ve hücre canlılığında redoks durumunun korunmasında bir antioksidan olarak hayati rolleri vardır (42).

İnsanlarda GSH'nin normal düzeyi plazmada 10-30  $\mu$ M, idrarda 1-3  $\mu$ M, böbrek proksimal tübülde 3mM ve çeşitli organlardaki tümörlerde 1-10 mM'dir (88). Glutasyon'un hemostazisin korunması hem de nova sentezi hem de kurtarma sentezi ile olur ve bu birbiriyle ilişkili yolları gerektirir (88).

Glutasyon'un hücrelerin oksidatif stresten korunmasında çok önemli rolleri vardır. Glutasyon, H ve lipid peroksidazları redükleyici bir ajandır ve aynı zamanda konjugatlardan GST katalizli ya da spontan oluşan elektrofilik bileşikler inaktive eder. Redükte glutasyonun okside formu olan glutasyon disülfid (GSSG)'e oranı hücrel redoks durumunun bir yansımasıdır. Oksidatif stres esnasında GSH redüktazlarıyla GSH'nin oksidasyonu GSSG redüksiyonundan daha hızlıdır. Düşük hücrel GSSG konsantrasyonlarının korunması ve yüksek GSH düzeyleri homeostaz için önemlidir (89). Normal şartlarda glutasyonun çoğu serbest GSH olarak bulunur. Glutasyon disülfidin sitozoldeki miktarı çok düşüktür. Genellikle GSH içeriğinin %1-3 kadarı GSSG'dir (42).

#### 2.5. Camptothecin

Camptothecin, nyssaceae ailesinden olan camptotheca acuminata adlı bitki den izole edilmiş olan bir bitki alkaloididir (4,5). camptothecin 1960'lı yıllarda National Cancer Enstitüsü ilaç kontrol programında tümör hücrelerine karşı aktif olduğu saptanmıştır. Bu ilacın etki mekanizması 1980'li yılların sonuna kadar aydınlatılmamış olmasına rağmen 1970'li yıllarda klinikte kullanılmak üzere sunulmuştur. Ancak ilacın beklenmedik toksisiteleri ve faz 2' deki sınırlı etkisi nedeniyle ileri araştırmalar yapılmış ve suda daha fazla eriyip daha az toksik olan camptothecin analogları üretilmiştir. Bu analoglar arasında topotecan da yer almaktadır (6). Camptothecin analogları Tablo 2.8'de gösterilmiştir.


Camptothecin türevleri olan CPT-11 (irinotecan) ve topotecan topoizomerez 1 inhibitörleridir. Kültüre edilmiş memeli hücrelerinde yapılmış daha önceki çalışmalar camptothecin'in hem DNA hem de RNA sentezini

inhibe ettiğini ve kromozomal DNA üzerinde geri dönüşümlü kırıklar oluştuğunu göstermiştir (4).

DNA polimeraz inhibitörü olan apihidicolin ile hücrelerin önceden muamele edilmesi ve camptotecin bu hücreler üzerindeki sitotoksitesinin azalması, camptotecin'in S faz aktivitesi ile uyumlu olduğu gösterir (90). Ancak replikasyon inhibitörlerinin kullanımı sonucunda DNA polimeraz bağımlı DNA tamir işlemleri de inhibe olabilir ve siklus işleyişini bozabilir (90).

Camptotecin türevleri ile yapılan kısa süreli tedavi deneyleri sonucunda hücrelerin %80'den fazlasının öldüğü tespit edilmiştir ve bu sonuç da camptotecin'in aslında S faza spesifik olmadığını ortaya koymuştur. Camptotecin'e bağlı DNA hasarı S fazı dışında transkripsiyon esnasında da olabilmektedir (90).

**Tablo 2.8.** Camptotecin ve analogları (91)

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Camptotecin	H	H	H
Topotecan	OH	CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H
9-Aminocamptotecin	H	NH <sub>2</sub>	H
Irinotecan		H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
SN-38	OH	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

## 2.6. Topoizomerazlar

Memelilerde tespit edilen Topoizomeraz 1 enzimi monomerik bir protein olup kromozom 20 üzerinde bulunan tekli bir gen tarafından kodlanır. Aktivitesi ATP'den bağımsızdır (6,92).

DNA topoizomerazın fonksiyonel önemi bakteri, bitkiler, bazı virüsler, tüm malign ve normal ökaryotik hücrelerde olduğu gibi her yerde bulunan varlığı ile gösterilmiştir. Topoizomerazlar; DNA replikasyonu, transkripsiyonu, rekombinasyonu ve tamiri gibi DNA zincir ayrılmalarıyla ilgili çoğu hücre metabolik yollara katılmaktadır (93).

Topoizomerazlar DNA'yı ayırma şekillerine göre iki sınıfa ayrılırlar; Topoizomeraz 1 tek zincir üzerinde geçici bir çentik yapıp diğer zincirin çentikten geçmesine izin vererek DNA çift sarmal yapısının açılmasını sağlar (93). Bu enzim çift zincirli DNA'da enzim-DNA kovalent bağı oluşturarak enzimin tirozin aminoasidi ile DNA'nın 3' fosfatı arasına bağlanır (92). Topoizomeraz 2 ise DNA'nın her iki zincirinde de çentik oluşturarak

başka bir çift zincir DNA segmentinin bu çentikten geçmesini sağlamaktadır. Topoizomeraz 2 replikasyon sonunda oluşmuş kardeş moleküllerin ayrılmasını sağlamaktadır (91,93,94).

Topoizomeraz 1 enziminin transkripsiyonel, translasyonel ve post translasyonel evrelerde düzenlendiği gösterilmiştir. İn vitro koşullarda topoizomeraz 1, enzim regulasyonu, fosforilasyonu, defosforilasyonu, adenozin-difosforibozilasyonu gibi mekanizmalarda önemlidir (92).

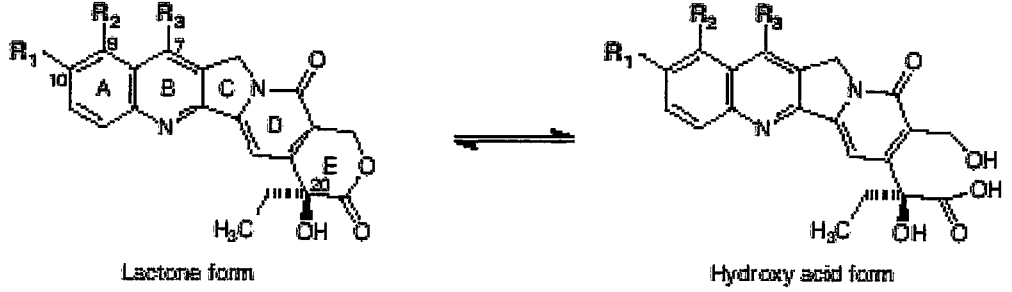
## 2.7. Topotecan

Topotecan, 9- (dimetil amino) metil-10-hidroksi camptothecin'dir. Topotecan yapısında 9-alt grubunun camptothecin aktivitesinde yapmış olduğu azalma 10-alt grubunun etkisi ile kompanse edilmiştir (93). Topoizomeraz 1 enzimi DNA tek zincir üzerinde kırık oluşturup çift zincirli sarmal DNA'yı çözerak torsiyonel stresi azaltır. Bu gevşeme reaksiyonu esnasında 106 tirozin grubu ile kırılmış DNA zincirine ait 3 fosforil grubun arasında kovalent bir bağ oluşur ve protein-DNA çapraz bağ meydana gelir. Topotecan, DNA zincir reaksiyonunu önleyerek bu kompleksi stabilize eder (Şekil 2.3). Stabilize olmuş üçlü kompleks ile replikasyon çatalı arasındaki etkileşimler sonucunda tek zincir kırığı çift zincir kırığına dönüşerek hücre ölümüne neden olur (95).

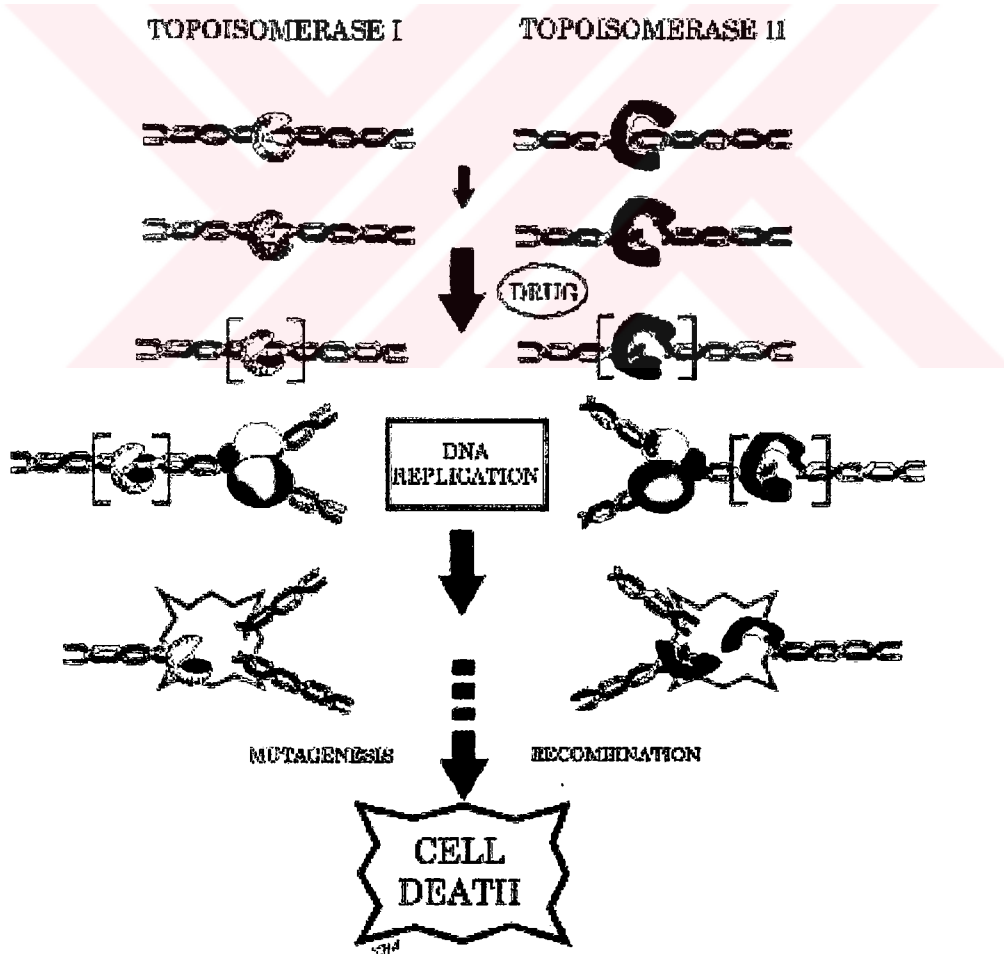
Topotecan in vitro koşullarda bir çok hücre tipine karşı sitotoksik etki göstermiştir. Topotecan'ın spesifik etki gösterdiği hücre tipleri kolorektal, meme, küçük hücreli akciğer karsinomu, over ve böbrek kanseri, akut lenfositik lösemi hücreleridir. Farelere inoküle edilmiş insan kaynaklı tümör ksenogreftlerinden rabdomiyosarkom ve santral sinir sistemi tümörlerine karşı da Topotecan başarılı aktivite göstermiştir (96).

Topotecan klinik uygulamada birçok kanser tedavisinde başarı göstermiştir. Topotecan için yapılan faz 2 çalışmalarında, meme kanseri, küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde, kolorektal kanseri, over kanseri ve servikal kanserlerde tedaviye olumlu yanıtlar alınabilmiştir. Irinotecan, SN-38 ve Topotecan'a ait E-halka lakton yapısının pH bağımlı hidrolizi ile açık halkalı hidroksi asit oluşur (Şekil 2.2). Ancak sadece asit ortamda değişmeden kalabilen kapalı lakton halka formu anti tümör aktivitesi gösterebilmektedir. Bu ajanlar için tercih edilen dilüsyon solüsyonu salinden daha asidik pH'a sahip olan %5 dekstrozdur. %5 dekstroz ajanların lakton halkalarının hidrolizini yavaşlatır. Fakat %5 dekstroz içinde verilse de sistemik olarak uygulanan ilaç organizmada hızla hidrolize olur ve ilacın yaklaşık olarak sadece %50'si kapalı lakton formunda korunabilir (97). Analiz öncesi ilaca ait lakton halkasını stabilize etmek çok zor olduğundan çoğu araştırmacı lakton ve hidroksi asit miktarlarının toplamına eşit olan total ölçümleri yapmaktadır (92). Irinotecan ve SN-38'in temel metabolizasyon yolu bilier ekspresyondur yani Irinotecan ve SN-38 vücuttan safra yolu ile atılırlar. Topotecan ise böbrekler tarafından metabolize

edilir ve idrar yolu ile uzaklaştırılır. Topotecan'ın %45'i ilk 24 saat içinde idrar yolu ile atılır (97).



**Şekil 2.2.** Camptothecin ve analoglarının asidik pH'da lakton formundan hidroksi formuna dönüşmesi (98).



**Şekil 2.3.** Topoizomeraz enzim inhibitörlerinin topoizomeraz 1 ve topoizomeraz 2 üzerine etki mekanizması (99)

İrinotecan ve Topotecan'ın doz bağımlı toksisitesi miyelosupresyondur. Bu supresyondan en çok etkilenen hücre grubu nötrofillerdir ve sonuçta nötropeni gelişmektedir (100). Nötropeniye sıklıkla hafif bir trombositopeni de eşlik edebilmektedir. Topotecan kullanımı esnasında bazen hafif diyare de gelişebilmektedir (97).

Bazı olgularda hayatı tehdit eden karaciğer fonksiyon bozuklukları da bildirilmiştir. Daha hafif toksik etkileri arasında ateş, bulantı, kusma, mukozit, diyare, rahatsızlık, sıkıntı, yorgunluk, baş ağrısı yer almaktadır. Günümüzde Topotecan'ın faz 2 çalışmalarında değerlendirilmesi sonucu uygun görülen kullanım dozu 5 gün boyunca günlük 1,5 mg/m<sup>2</sup>'dir ve her 3 haftada bir bu doz tekrarlanır (30,100).

## 2.8. Kanser ve Serbest Radikaller

Reaktif oksijen türleri hücrel metabolizmanın potansiyel olarak tehlikeli ürünleridir. Bunların hücre gelişimi, büyümesi, yaşamı, yaşlanma, ve kanser gelişimi üzerine direkt etkileri vardır. Reaktif oksijen türleri tüm aerobik organizmalarda üretilir fakat bunların üretimi iki tarafı keskin kılıç gibidir. Reaktif oksijen türleri düşük konsantrasyonlarda, hücre büyümesini düzenleyen redüksiyon-oksidasyon durumundaki sinyal transdüksiyon yolları ayrıca büyüme-farklılaşma ile ilişkili genlerin ekspresyonundaki değişimler için gereklidir. Fakat bu metabolitlerin aşırı üretimi hücre bütünlüğü ve hayatı için gerekli yapıların okside olmasını ve hasara uğratılmasını içeren ölümcül zincir reaksiyonlarının başlamasına neden olur. Çoğu tümör hücresi normal hücrelere göre artmış metabolizma oranına sahiptirler ve bu doğal olarak reaktif oksijen türlerinin artışına yol açar (101,102).

Radyasyon ve kimyasal karsinojen nedenli neoplastik hastalıkların gelişiminde serbest radikallerin çok büyük önemi vardır. Serbest radikal içeren birçok bileşim genomik hasarlara neden olarak neoplastik hastalıkların gelişimine neden olabilirler. Swartz karsinojenlerin serbest radikal mekanizmaları üzerinden etkinlik gösterdiklerini ileri sürmüştür. Bu düşüncenin temelinde ise iyonize radyasyonun büyük miktarlarda serbest radikal üretmesi vardır. Neoplastik sürecin indüklenmesi; başlangıç, ilerleme ve gelişme gibi çok aşamalı bir süreçtir. Hem oksijen hem de organik serbest radikallerinin tümör gelişiminde etkili olduğu düşünülmektedir (45).

Reaktif oksijen türleri DNA zincir kırılmalarına, guanin ve timin hasarlarına ve kardeş kromatid değişimlerine neden olur. Bundan dolayı ROS'un üretimi hücrelerin genetik instabilitelerine neden olabilir. Genetik instabilite malign potansiyelin artışıyla doğru orantı göstermektedir. Tümör oluşumunun tetiklenmesinde serbest radikallerin rolü çoğu kez bildirilmiştir. Çoğu tümör tetikleyicileri oksidan bir mekanizmayla iş görürler. Onlar direkt kimyasal bir aktivasyonla, hücrel metabolik prosessin değişimi ile ya da indirekt kimyasal bir reaksiyonla serbest radikal üretirler (103).



Tümör hücrelerinde antioksidan süpürücü enzimler ile ilgili yapılan çalışmalarda serbest radikallere karşı savunma sistemlerinde zayıflamaya yönelik bulgular tesbit edilmektedir. Tümör hücreleri çoğunlukla azalmış Mn-SOD, Cu,Zn-SOD ve KAT aktiviteleri sergilerler. Ancak tümör ile serbest radikaller ve savunma sistemleri arasında bir ilişki bulunmasına rağmen bu ilişki tam olarak kanıtlanmamıştır ve bu ilişkinin kesin mekanizması da tam olarak tesbit edilememiştir (45,103).

Bu enzimler aynı zamanda hücre proliferasyonunda, tümör invazyonunda, malign hücrelerin ilaç direncinde, tümör hücrelerinin ölümsüzlüğünde ve differansiasyon derecesinde önemli bir rol oynar (104).

İncelenen pek çok malignanside katalazın düşük düzeyde ekspresyonu gösterilmiştir ve bunun malign hücrelerdeki peroksizomal biyogenezin bozulması sonucu olabileceği belirtilmiştir (105). Mavier ve arkadaşları üç hepatokarsinoma hücresinde katalaz aktivitelerinin kontrole göre düştüğünü bulmuşlardır (103). Ho ve arkadaşları katalaz aktivitesinin akciğer kanserinde azaldığını bulmuşlardır. Bu azalmayı da tümör hücrelerinde katalaz proteinindeki ve katalaz mRNA'sındaki azalmaya bağlamışlardır (106).

Mn-SOD geni tümör supressör geni olarak tanımlanmıştır ve pek çok çalışmada Mn-SOD düzeylerinin düşük olduğu gösterilmiştir (107). Bize ve arkadaşları total SOD ve Mn-SOD düzeylerinin spesifik aktivitelerinin tüm tümör homojenatlarında, normal rat karaciğeri ile karşılaştırıldığında azaldığını gözlemişlerdir (108).

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda ise kolon karsinom, tiroid karsinom ve nöral orijinli tümörlerde Mn-SOD'un yüksek düzeyleri belgelenmiştir (107). Kahlos ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada malin mezotelioma hücrelerinin, sağlıklı plevral mezoteliomundan daha yüksek Mn-SOD ve katalaz düzeylerine sahip olduğunu göstermiştir (105). Oksidanlar hücre proliferasyonunu arttırabilir ve bu durumda antioksidan enzimlerdeki artış tümörün büyümesini ve ilerlemesini azaltabilir (105).

Mn-SOD aktivitesinin kaybının hücre dizilerinin ölümsüzlüğü ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (104). Mn-SOD düzeyinin in vitro olarak malign hücrelerin mitotik oranı ile ters ilişkili olduğu gösterilmiştir (107).

Hem normal hem de tümör hücrelerinde SOD aktiviteleri özellikle de Mn-SOD aktiviteleri differansiasyonun derecesi ile ilişkilidir. Tümör ne kadar differansiye ise o kadar yüksek SOD aktivitesine sahiptir. Hem Cu,Zn hem de Mn-SOD aktiviteleri Morris hepatomalarında normal rat karaciğeri ile karşılaştırıldığında düşük bulunmuştur. In vitro olarak insan monositlerinde differansiasyon esnasında SOD aktivitesinde artış gözlenirken, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinde azalma gözlenmiştir (104).

Hücresel antioksidan savunma sistemleri birbiriyle ilişkili düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı birçok komponentden oluşmaktadır. Çeşitli antioksidanlar arasında var olan dengenin organizmanın koruyucu kapasitesi üzerindeki etkisinin tek bir enzimin etkisinden daha önemli ve güçlü olduğu bildirilmiştir (101). Akciğer hücreleri üzerine yapılan önceki pek çok çalışmada ayrı ayrı uygulanmalarından ziyade kombine olarak kullanıldıklarında SOD ve KAT'ın daha iyi bir oksidan savunma gösterdikleri bulunmuştur (105).

Genel olarak lipid peroksit konsantrasyonları ile hücre proliferasyon oranları arasında ters bir orantının olduğuna inanılmaktadır. Lipid peroksidasyon oranı ne kadar yüksekse hücre bölünme oranı da o kadar düşüktür. Bu düşünce tümör hücrelerinin normal hücrelere göre peroksidasyona daha dirençli olmalarıyla desteklenebilir. Ayrıca Hepatomalarda tümör büyüme oranı ne kadar yüksekse hücrelerin mikrozomal fosfolipid içerikleri ve ansatüre serbest yağ asidi düzeylerinin o kadar düşük olduğu gösterilmiştir (109).

Morris hepatomalarına ait mitokondri ve mikrozomlardan elde edilmiş fosfolipidlerin serbest yağ asit bileşimlerinin incelenmesinde tümör hücrelerinin büyüme oranı ne kadar yüksekse 16:1., 18:1, 18:2 serbest yağ asitleri o kadar fazla ve 4 ve daha fazla çift bağ içeren poliansature yağ asidi miktarı ise o kadar düşüktür. Cheeseman ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada Novikoff hepatoma hücrelerinde lipid peroksidasyon oranlarının düşük olmasının aşağıda belirtilen faktörlerin kombinasyonuna bağlı olduğunu göstermişlerdir (109).

- a) Poliansatüre serbest yağ asidi ve cyt P450 oranlarındaki düşüklük
- b) Yağda eriyebilen antioksidan ve  $\alpha$ - tokoferol düzeyindeki artış

Tümör hücrelerinde superoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimleri çok az ya da hemen hemen yoktur. Buna rağmen bu hücrelerdeki lipid peroksidasyonunun az olmasının nedeni bu hücrelerdeki yüksek  $\alpha$ - tokoferol düzeyi olduğu bildirilmiştir (109).

Kaspazların -SH grupları onların katalitik aktiviteleri için gereklidir. –SH grupları serbest radikallere maruz kalırlarsa inaktive olurlar. Melonoma M14 hücre dizisinde  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  kaspaz inaktivasyonundan dolayı tumor hücresinin yaşamını uzatırlar (109). Rovere ve arkadaşları kanser hastalarının plazma ve eritrositlerinde glutatyon ve –SH gruplarını ölçmüşler ve hem glutatyon hem de –SH düzeylerinde plazma ve eritrositlerde sağlıklı kontrole göre anlamlı düşüş bulmuşlardır. Bu farklılığı ise hematik dokunun serbest radikal aktivitesine karşı savunmasıyla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (110).

## MATERYAL ve METOD

### 3.1 Hücre kültürü

#### 3.1.1. Hücre Dizileri ve ilaçlar

MCF-7 meme kanseri hücre dizisi Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndan temin edildi. Topotecan Hidroklorür (Hycamtin, SmithKline Beecham); 1 mg/ml olacak şekilde steril distile su içinde çözülerek kısımlara ayrıldı ve  $-80^{\circ}\text{C}$  de saklandı.

#### 3.1.2. Hücre kültürü ve hücrelerin deneylere hazırlanması için gerekli çözeltiler

**A) RPMI (Roswell Park Memorial Institute):** 5.16 gr RPMI hassas terazide tartıldı ve 500 ml distile suda manyetik karıştırıcı kullanılarak çözüldü. 500 ml'lik otoklava dayanıklı şişede  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dk otoklavlanarak steril edildi. Laminer flow kabinde 5.125 ml steril 200 mM'lık L-Glutamin ve %7.5'luk  $\text{NaHCO}_3$  çözeltisi eklendi. Kullanılacağı zaman 50 ml steril, inaktive edilmiş FCS (Fetal Buzağı Serumu) ve 5 ml steril antibiyotik antimikotik çözeltisi eklendi. pH 6.9-7.2 arasında olacak şekilde ayarlandı. RPMI  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

**B) 200 mM L-Glutamin çözeltisi:** 2.92 gr L-Glutamin hassas terazide tartılarak, 100 ml bidistile suda çözüldü. 0.22 mikron por çaplı filtrelerden geçirilerek steril olması sağlandı ve  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

**C) FCS (Fetal Buzağı Serumu):** 500 ml Sigma'dan temin edildi. Kullanmadan önce  $56^{\circ}\text{C}$ 'lik benmaride 30 dk bekletildi ve kompleman sistem elemanlarının inaktive edilmesi sağlandı. 50'şer ml'lik şişelere bölünerek  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

**D) Antibiyotik antimikotik çözeltisi:** Biological Industries'den 100 ml alındı. İçinde 10.000 ünite/ml penisilin G, 10 mg/ml streptomisin içermekteydi. Kullanılmadığı sürece  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

**E) DMSO (Dimetil Sülfoksit):** 100 ml Sigma'dan temin edildi. Oda ısısında saklandı.

**F) Hücre dondurma çözeltisi:** 8 ml %10 FCS içeren steril RPMI besiyeri, 1 ml DMSO ve 1 ml Steril FCS steril bir tüpte karıştırıldı. Bu solusyon hücreler dondurulacağı zaman taze olarak hazırlandı.

**G) Tripin Blue çözeltisi (%0.5'lik):** Biological Industries'den hazır olarak alındı. Oda ısısında saklandı.

**H) Tripsin:** Biological Industries'den hazır olarak alındı. +4°C'de saklandı.

**I) Proteaz inhibitör kokteyl:** Sigma'dan hazır olarak alındı. -20°C'de saklandı.

**J) PBS (Fosfat tamponlu tuz) çözeltisi:** 8 gr NaCl + 1.15 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0.2 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 lt suda distile suda manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak çözüldü. +4°C'de saklandı.

**K) Ekstraksiyon tamponu:** 100 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltilerinden pH 7 olan bir tampon hazırlandı. 300 µl tampon, 1180 µl distile su ve 20 µl proteaz inhibitor kokteyl karıştırılarak ekstraksiyon tamponu hazırlandı.

### 3.1.3 Hücrelerin çoğaltılması ve dondurulması

Hücreler 200 mM L-Glutamin, %7.5 NaHCO<sub>3</sub>, %10 FCS ve %1 Antibiyotik antimikotik çözeltisi içeren steril RPMI besiyerinde 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe kültür edilerek çoğaltıldı. Hücreler hücre yoğunluğuna göre 2-3 günde bir beslendi ve çok yoğunlaştıkları zaman tripsinle yapıştıkları flasktan kaldırıldı. Elde edilen hücre süspansiyonu steril bir tüpe alınarak 500-600 g'de 8 dk çevrildi. Süpernatant kısmı steril bir şekilde uzaklaştırıldı ve elde edilen pellet steril RPMI ile suspanse edildikten sonra flaslara bölündü ve çoğaltılmaya devam edildi ya da daha sonra kullanılmak üzere 1.5 ml hücre dondurma çözeltisi içinde çözümlenerek cryo tüpe alındı ve -80°C'de saklandı.

### 3.2. Hücrelerin deney için hazırlanması

Yeterli flask sayısı elde edildikten sonra hücreler tripsinize edilerek flasktan ayrıldı ve santrifüj edildi. Elde edilen pelletlerin tümü birleştirildi ve tüm flaslara eşit oranda dağıtıldı. Bu flaslardaki hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıncaya bir kısmı kontrol olarak ayrıldı, bir kısmına ise 100 ng/ml dozunda Topotecan uygulanarak 24 saat 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>, %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi.

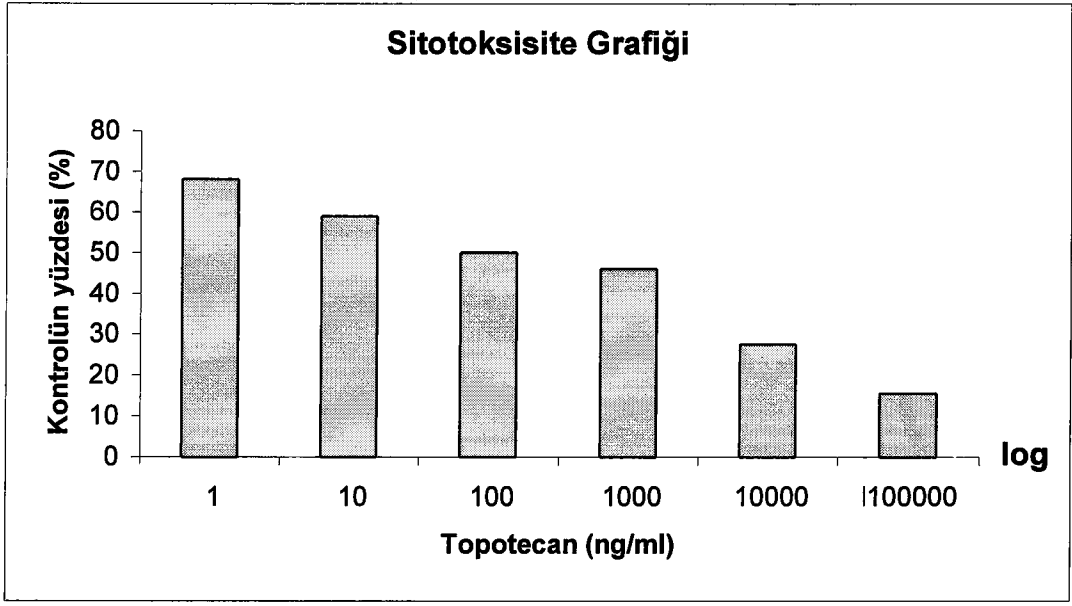
İlaç uygulanması yapıldıktan 24 saat sonra ilaç uygulanan ve kontrol flasklarındaki hücreler tripsinlenerek alındı. 500-600 g'de çevrilerek elde edilen pellet PBS (fosfat tamponlu tuz) çözeltisi ile 2-3 kez yıkandı. En son

yıkamadan sonra kalan pelletlere 1 ml PBS eklendi ve pipetaj yapılarak ependorfa alındı. Ependorf santrifüj edilerek kalan pellet deneylerde kullanılıncaya kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Deney yapılacağı zaman pellet ekstraksiyon tamponuyla pellet yoğunluğuna göre dilüe edildi. Hücreler Branson Sonifier 250 marka ultrasonik parçalayıcıda 4x15'er saniye buz içinde homojenize edildikten sonra ekstrakte edilerek 150 000 g'de 45 dk  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi ve süpernatandan deneyler yapıldı.

### 3.3. Sitotoksosite Ölçümleri (111)

Hücreler tripsinize edilerek yapışmış olduğu flaskın yüzeyinden kaldırıldı. Hücre sayımları için %0.5 lik konsantrasyonda Tripin Blue, PBS içinde çözüldü. Tripsinize edilmiş hücre süspansiyonundan 0.2 ml alınarak bir tüpe kondu, üzerine 0.3 ml RPMI eklendi, üzerine %0.5 lik Tripin Blue 'dan 0.5 ml eklenerek karıştırıldı. 5 dakika bekletildikten sonra, hemasiyometrede hücreler sayılarak ml deki hücre sayısı hesaplandı. 96 kuyulu mikropalak'lara, her kuyuda  $1 \times 10^5$  hücre olacak şekilde 100  $\mu\text{L}$  hücre süspansiyonu dağıtıldı. 24 saat  $37^{\circ}\text{C}$  de inkübasyon sonrası mikropalak'da kullanılan medyumlar atılarak yenilendi. Topotecan'ın 1 mg/ml konsantrasyonda çözülmesiyle hazırlanan stok solüsyondan 100 000 ng/ml den 0.5 ng/ml ye kadar giden seri dilüsyonlar yapıldı. Topotecan her doz üç tekrarlı olacak şekilde kuyucuklara 10'ar  $\mu\text{L}$  konuldu. Herbir ilaç için hücre içermeyen ancak RPMI ve ilaç içeren kontroller de aynı plak'a uygulandı. Hücreler  $37^{\circ}\text{C}$  inkübatörde 1 gün inkübe edildiler. Inkübasyon sonrasında hücrelerin canlılığı MTT ( 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide ) kullanılarak kolorimetrik olarak ölçüldü. Bu metodun prensibi; canlı hücrelerin mitokondrial dehidrogenazları aracılığı ile MTT'nin mavi bir formazan ürüne hücrenel olarak indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Oluşan mavi rengin yoğunluğu hücre canlılığının bir ölçütüdür. Ölçüm için steril PBS içinde 5 mg/ml çözülmüş ve filtre edilmiş steril MTT 'den her kuyuya 10'ar  $\mu\text{L}$  eklendi. 4 saat  $37^{\circ}\text{C}$  de bekletildi. Sonra her kuyuya 180  $\mu\text{L}$  DMSO eklenerek karıştırıldı ve plak 1 gece karanlıkta bekletildi. 630 nm dalga boyunda mikropalak okuyucuda absorbanslar okundu. Hücre ve ilaç kuyularının ortalama absorbans değerlerinden ilaç ve RPMI içeren kuyuların ortalama absorbans değerleri çıkartıldı. Yaşayan hücre yüzdesi; sadece hücre içeren kontrol grubunun ortalama absorbans değerlerinin ilaçlarla inkübe edilen hücrelerin ortalama absorbans değerleri ile karşılaştırılmasıyla hesaplandı. Sonuçlar % kontrol olarak ifade edildi. Deney üç kere tekrarlandı ve  $\text{IC}_{50\text{S}}$  ( hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden konsantrasyon ) düzeyi; 100 ng/ml olarak bulundu. Topotecan deneylerde bu konsantrasyonda hazırlanarak kullanıldı.



**Şekil 3.1.** Farklı konsantrasyonlardaki Topotecan'ın MCF-7 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

### 3.4. Yöntemler

#### 3.4.1. Protein Tayini (112)

##### Prensip

Proteinler alkali ortamda  $Cu^{+2}$  ile reaksiyona girerek kompleks oluştururlar. Bakır-protein kompleksi bir elektron vericisi olarak hareket edebilir ve ortama eklenen Folin Ciocalteu reaktifini (polifosfomolibdik ve polifosfotungustik asit), yoğun renkli molibdenyum ve tungsten mavisine indirger. Oluşan rengin absorbanısı 750 nm'de ölçülür.

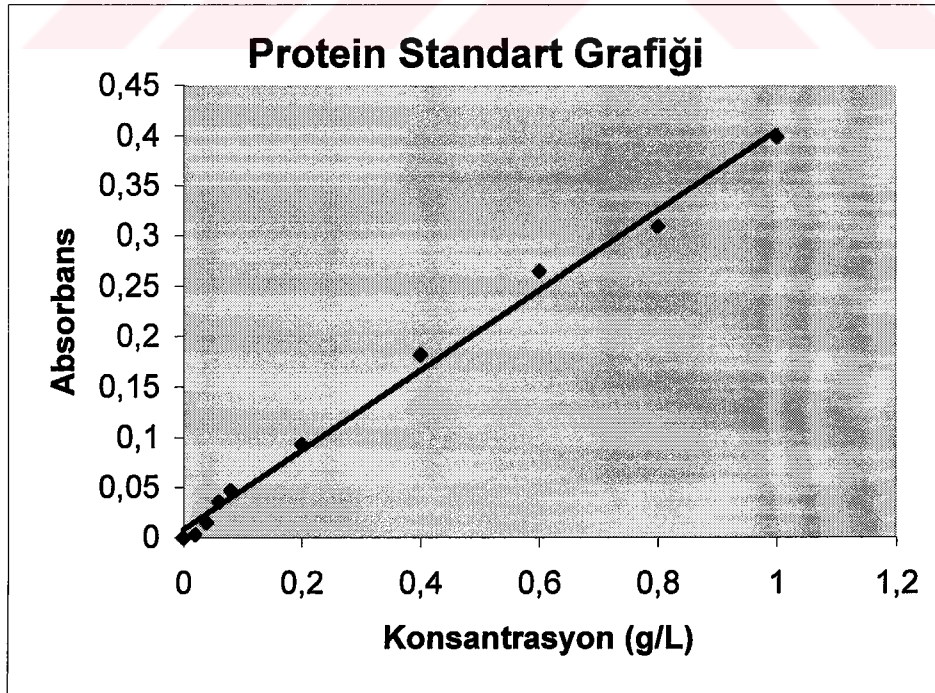
##### Reaktifler

- 1) 1 N NaOH
- 2) D Reaktifi: a) %2'lik  $Na_2CO_3$  anhidrit (10 ml)  
b) %1'lik  $CuSO_4$  (0.1 ml)  
c) %2'lik Na-K tartarat (0.1 ml)
- 3) Folin-Ciocalteu-Fenol (FCF) Reaktifi : Sigma'dan hazır olarak temin edildi. 1 kısım distile su/1 kısım FCF reaktifi olacak şekilde dilüe edilerek kullanıldı.
- 4) Protein Standartı için 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1 g/L dilüsyonlarda Bovine Serum Albumin (BSA) çözeltisi kullanıldı

## Prosedür

	Kör	Standart	Numune
Distile Su (ml)	0.1	—	—
Standart (ml)	—	0.1	—
Hücre (ml)	—	—	0.1
NaOH (ml)	0.1	0.1	0.1
D Reaktifi (ml)	1	1	1
20 dakika oda ısısında karanlıkta inkübasyondan sonra			
Dilüe FCF Reaktifi (ml)	0.1	0.1	0.1
30 dakika oda ısısında karanlıkta inkübasyondan sonra			
Distile Su (ml)	2	2	2

Numunelerin ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standartların absorpsanları 750 nm'de köre karşı ölçüldü.



Şekil 3.2. Protein standart grafiği

### 3.4.2. Bakır , Çinko - Bağımlı Süperoksid Dismutaz (Cu,Zn-SOD) Aktivitesinin Tayini (113)

#### Prensip

Cu,Zn-SOD aktivitesi, Misra ve Fridovich'in yöntemine göre ölçüldü. Epinefrinin otooksidasyonu sonucu adrenokrom oluşur. Bu otooksidasyonun, Cu,Zn-SOD ile inhibisyonunun yüzdesine göre, enzim aktivitesi hesaplandı. Adrenokromun maksimum absorbans verdiği 480 nm'deki absorbans değişikliği Cu,Zn-SOD inhibisyonuyla ilişkilidir.

#### Çözeltiler

- 1) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / NaHCO<sub>3</sub> tamponu (0.05 M, pH 10.2)
- 2) EDTA (0.075 mM)
- 3) Epinefrin (1.8 mM, pH 2)

#### Prosedür

	Kontrol	Numune
Tampon (µl)	550	550
EDTA (µl)	400	400
Hücre (µl)	-	50
Distile su (µl)	50	-
Epinefrin (µl)	500	500

Ortama en son 0.5 ml epinefrin eklenerek hemen karıştırıldı ve 480 nm'de +30°C'de tampon körüne karşı, numune ve kontrol tüplerindeki absorbans değişimi 3 dakika boyunca izlendi.

#### Standart hazırlanması

20 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.4) içinde 0.0625, 0.125, 0.25 ve 0.5 µg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan Cu,Zn-SOD (Bovine eritrosit SOD, Sigma) standartları numune gibi çalışıldı. Tüm standartlar çift çalışılarak ortalamaları alındı. Konsantrasyon absorbans (% inhibisyon) değerleri arasında yapılan regresyon analizinde:

Konsantrasyon (µg/ml)= [ (% inhibisyon × 0.0202) - 30.18 ] / 35.11  
şeklinde bir ilişki saptandı. Korelasyon r = 0.98 olarak bulundu.

#### Aktivitenin Hesaplanması

Kontrol tüpünde enzim olmadığı için, epinefrin kolayca nonenzimatik olarak adrenokroma oksitlenir. Bu nedenle kontrol tüpündeki inhibisyon



yüzdesi sıfırdır. Standart ve numune tüplerindeki inhibisyon yüzdesi, Cu,Zn-SOD konsantrasyonuna bağlı olarak değişir.

$\Delta OD/dk$  (kontrol) 100 aktif birim  
 $\Delta OD/dk$  (standart) X

$$X = [ (\Delta OD/dk \text{ (standart)}) / (\Delta OD/dk \text{ (kontrol)}) ] \times 100$$

Standardın % inhibisyon değeri = 100 - X

$\Delta OD/dk$  (kontrol) 100 aktif birim  
 $\Delta OD/dk$  (numune) Y

$$Y = [ (\Delta OD/dk \text{ (numune)}) / (\Delta OD/dk \text{ (kontrol)}) ] \times 100$$

Numunenin % inhibisyon değeri = 100 - Y

Numunenin % inhibisyon değeri bulunduktan sonra, bu değerler standart çalışması ile elde edilen formülde yerine konuldu. Sonuçlar %g prot cinsinden verileceği için, numunenin son hacimdeki proteini hesaplandı ve orantı kurularak %g prot için enzim aktivitesi bulundu.

### 3.4.3. Katalaz (KAT) Aktivitesinin Tayini (85)

#### Prensip

KAT aktivitesi, Aebi'nin metoduna göre ölçüldü. Bu metod,  $H_2O_2$ 'in KAT tarafından  $O_2$  ve  $H_2O$ 'ya parçalanması sırasında,  $H_2O_2$ 'nin absorbanasının azalmasının 240 nm'de ölçümü esasına dayanır.

( $\epsilon_{240}$ :  $0.00394 \pm 0.0002 \text{ mmol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$ ).

#### Çözeltiler

- 1) Fosfat tamponu (50 mmol/l, pH 7.0 )  
 $KH_2PO_4$  ve  $Na_2HPO_4$  kullanılarak hazırlandı.  
Fosfat tamponu +2°C'de stabildir.
- 2)  $H_2O_2$  (30 mM): Fosfat tamponu içinde taze hazırlandı.

#### Prosedür

	Kör	Numune
Fosfat tamponu ( $\mu$ l)	2100	-
Hücre ( $\mu$ l)	-	1400
$H_2O_2$ ( $\mu$ l)	-	700

Reaksiyon, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenmesiyle başlatıldı. Başlangıç absorbanasının (A), 0.500 civarında olmasına dikkat edildi. 15 sn boyunca absorbanlar kaydedildi.

Aktivitenin hesaplanması

$$k = 2.3 / \Delta t \times \log (A_0 / A_{15}) \text{ s}^{-1}$$

$$k = 2.3 / 15 \times \log (A_0 / A_{15}) = 0.153 \times \log (A_0 / A_{15}) \text{ s}^{-1} \text{ (ml)}$$

Litredeki k değeri hesaplanacağı için çıkan sonuç 1000 ile çarpıldı.

$$k = 153 \times \log (A_0 / A_{15}) \text{ s}^{-1} \text{ L}^{-1}$$

k : Birinci dereceden reaksiyonun hız sabiti

A<sub>0</sub>: 0. sn'deki absorban değeri

A<sub>15</sub> : 15. sn'deki absorban değeri

Bulunan değer dilüsyon faktörü ile çarpıldı. KAT'ın aktivitesi k/g prot olarak belirlendi.

$$\text{KAT aktivitesi (k/g prot)} = [ \log (A_0 / A_{15}) ] / 50 \times 382500$$

Anormal kinetiği nedeniyle KAT ünitesi için "birinci derece reaksiyon sabiti (k) kullanıldı ve hücre KAT'ının spesifik aktivitesi k/g prot olarak verildi.

#### 3.4.4. Selenyum-Bağımlı Glutasyon Peroksidaz (Se-GSH-Px) Tayini (114)

##### Prensip

Se-GSH-Px aktivitesi, Paglia ve Valentina'nın enzimatik yöntemi modifiye edilerek tayin edildi. Birinci aşamada GSH, Se-GSH-Px tarafından katalizlenen bir reaksiyonla, t-bütil hidroperoksit (t-BuOOH) kullanılarak okside edilir. İkinci aşamada, ortama eksojen olarak eklenen glutasyon redüktaz (GR), yine ortama eksojen olarak eklenen NADPH'ı kullanarak okside glutasyonu (GSSG) yeniden redükler. Sonuçta 340 nm'deki NADPH absorbanındaki azalma ölçülür.

##### Çözeltiler

1. Fosfat tamponu (50 mM, pH 7.2): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> kullanılarak hazırlandı. Tampon kahverengi şişede, +4 °C'de 1 yıl stabildir.

2. Reaksiyon karışımı
  - EDTA (0.3 mM)
  - NADPH (0.1 mM)
  - GR (0.5 U)
  - NaN<sub>3</sub> (0.5 mM)

2.21 mg EDTA, 1.666 mg NADPH, 14 mg GR, 0.65 mg NaN<sub>3</sub> tartılıp 15 ml fosfat tamponunda çözüldü.

3. Redükte glutatyon (GSH): 0.0015 g GSH 2 ml tamponda içinde çözüldü.
4. t-BuOOH: 54.78 µl / 100 ml olacak şekilde distile suyla hazırlandı.

### Prosedür

Her hücre solüsyonundan GSH içeren GSH (+) ve GSH içermeyen GSH (-) olmak üzere ikişer deney tüpü hazırlandı.

	GSH (+)	GSH (-)
Reaksiyon karışımı (µl)	750	750
Hücre (µl)	50	50
GSH (µl)	100	-
Distile su (µl)	-	100
t-BuOOH (µl)	100	100

t-BuOOH eklenmesiyle her numunede 340 nm'de 37°C'de GSH (+) ve GSH (-) deneylerinin 3'er dakikalık ölçümleri yapıldı.

### Aktivitenin hesaplanması

GSH (+) ve GSH (-) tüplerine ait absorbans farkları ( $\Delta OD$ ) bulundu. Optik dansite artışının ortalaması ( $\Delta OD/dak$ ) hesaplandı. Daha sonra bu değer aşağıdaki formüle yerleştirilerek g prot başına düşen enzim aktivitesi hesaplandı.

Se-GSH-Px Aktivitesi (U/g prot)=

$$[(GSH (+) \Delta OD - GSH (-) \Delta OD)] / [\epsilon_{NADPH} \times \%g \text{ Prot} \times v/V]$$

$$[(GSH (+) \Delta OD - GSH (-) \Delta OD)] \times 10^5 / 6.22 \times \text{prot}^a \times \text{hücre solüsyonu hacmi}^b$$

a: % g      b: µl hücre solüsyonu / ml reaksiyon karışımı

$$U/g \text{ prot} = [(\Delta OD/dk) \times 10^5] / 311 \times \%g \text{ prot}$$

### 3.4.5. MDA Tayini (115)

#### Prensip

MDA tayini Wasowicz, Neve ve Peretz'in metoduna göre yapıldı. Metodun temel prensibi, lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA'nın, 2-tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi ve oluşan bileşiğin bütanol fazına ekstrakte edilerek 525 nm eksitasyon ve 547 nm emisyon'da spektrofotometrik olarak okunması esasına dayanır.

## Çözeltiler

- 1) 2-Tiyobarbitürik asit (TBA) (29 mM): 8.75 M Asetik asit içerisinde hazırlandı.
- 2) Hidroklorik asit (HCl) (5 M)
- 3) n-Bütanol
- 4) 1,1,3,3-tetrametoksipropan (Malonaldehid bis [dimetil asetal]) standart solusyonu, 0, 2, 4, 6, 8, 10 nmol/ml konsantrasyonlarında hazırlandı.

## Prosedür

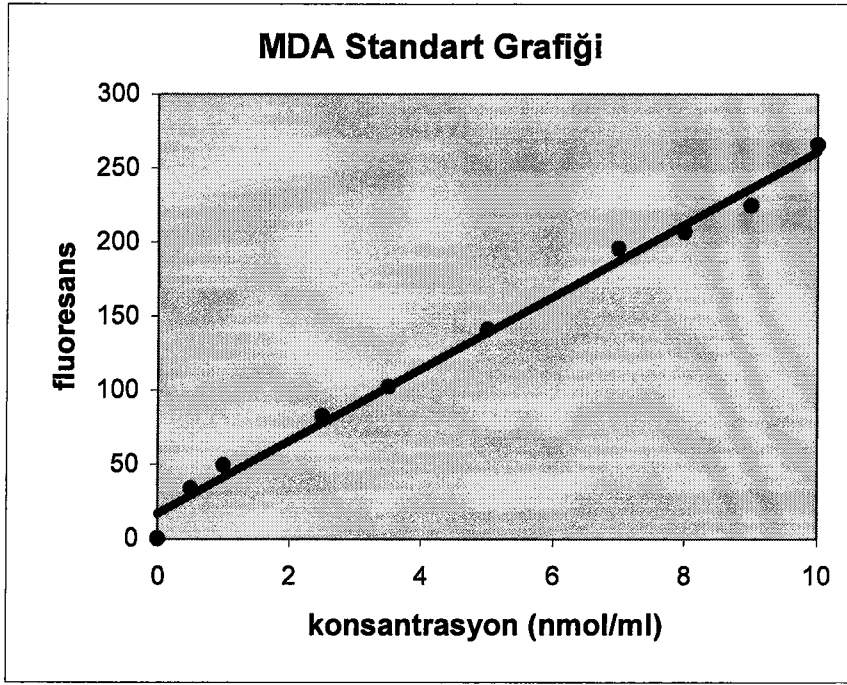
	Deney
Hücre (ml)	0.05
Distile su (ml)	1
TBA (ml)	1

Tüm tüpler 1 saat boyunca +100°C'de kaynatıldı. 1 saat sonunda tüpler musluk suyu altında soğutuldu.

HCl (ml)	0.025
n-bütanol (ml)	3

Tüm tüpler, 3-4 dakika boyunca kuvvetle karıştırıldıktan sonra, 10 dakika 3000 g'de santrifüj edilerek üst faz ayrıldı ve fluorometrede yukarıda belirtilen dalga boylarında okundu.

Numunelerin MDA içerikleri standart grafiğinden hesaplandı.



**Şekil 3.3.** MDA standart grafiği

Numunelerin değerlendirilmesi standart grafiğine göre yapıldı. Aynı numunelerden Lowry metodu ile protein lm yapılarak MDA seviyesi nmol/mg prot olarak verildi.

#### **3.4.6. Protein Karbonil Grupları Tayini (116)**

##### **Prensip**

Protein karbonil grupları, Levine ve arkadaşlarının spektrofotometrik metoduna göre belirlendi. Proteinler ile kullanılan klasik bir karbonil reaktifi olan 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH), karbonil grupları ile birleştiğinde renkli bir hidrazon oluşturur ve oluşan bu hidrazonun absorbansı 360 nm'de okunur.



##### **Çözeltiler**

- 1) 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) (10 mM)
- 2) HCl (2 N)
- 3) Triklorasetik asid (TCA, %10)
- 4) Triklorasetik asid (TCA, %20)
- 5) NaOH (1 M)

## Prosedür

500 µl hücre solüsyonu 500 ml %20 TCA ile karıştırıldı. 14000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildikten sonra süpernatant döküldü. Pelet 500 µl 10 mM DNPH (2 N HCl içinde +50 °C'de çözülerek hazırlandı.) ile karıştırıldıktan sonra karanlıkta oda ısısında 1 saat bekletildi. Her 10 dakikada bir vortekslenerek peletin DNPH ile reaksiyonu sağlandı. 1 saat sonunda 500 µl %20 TCA ile karıştırıldıktan sonra 2-3 dakika oda ısısında bekletildi. 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant döküldü ve aynı işlem %10 TCA ile 3 defa tekrarlandı. Presipitat 2 ml NaOH içinde 37°C'de 30 dakika bekletilerek çözüldü. Numunenin absorbansı NaOH körüne karşı 360 nm'de okundu.

$\epsilon_{\max}=22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kullanılarak sonuçlar µmol /L olarak hesaplandı.

Numunelerden Lowry metodu ile protein ölçümü yapılarak sülfidril seviyesi µmol/g prot olarak verildi.

### 3.4.7. Redükte Glutasyon (GSH) Tayini (117)

#### Prensip

GSH düzeyleri Fairbanks ve Klee'nin metoduna göre ölçüldü. 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB), bir disülfid kromojendir ve sülfidril bileşikler ile indirgenerek koyu sarı bir renk verir. Redükte kromojenin absorbansı 412 nm'de ölçülür.

#### Çözeltiler

1. Presipite edici solüsyon: 1.67 g glasiyal metafosforik asit, 0.20 g disodyum EDTA ve 30.0 g NaCl tartıldı, bir miktar distile suda çözüldükten sonra hacim 100 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyon +4°C'de 3 hafta dayanıklıdır.
2. Fosfat solüsyonu ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (0.3 M): Solüsyon, +4 °C'de uzun süre stabildir.
3. DTNB solüsyonu: 40 mg 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB), 1g /dl'lik sodyum sitrat solüsyonu ile çözüldükten sonra hacim 100 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyon +4°C'de uzun süre dayanıklıdır.
4. GSH standartları: 10 mg GSH tartıldı ve distile suyla 10 ml'ye tamamlandı (100 mg/dl). Bu standarttan 2, 4, 6, 8 ve 10 mg/dl olacak şekilde dilüsyonlar yapıldı. Bu solüsyonlar günlük hazırlandı.

#### Prosedür

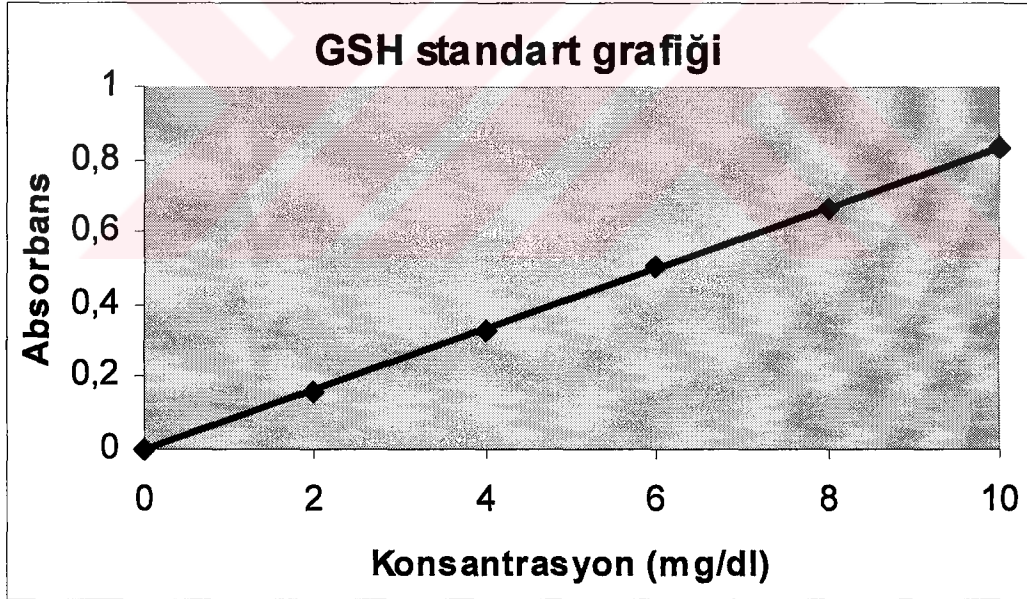
200 µl hücre üzerine 1800 µl distile su eklenerek hücre dilüe edildi. Bunun üzerine 3 ml presipite edici solüsyon eklenerek karıştırıldı. 5 dakika oda ısısında bekletilerek, filtre kağıdından süzüldü. Elde edilen filtrata aşağıdaki yöntem uygulandı.

	Kör	Numune	Standart
Filtrat (µl)	-	500	-
Presipite edici (µl)	300	-	-
Distile su (µl)	200	-	-
Fosfat tamponu (µl)	2000	2000	2000
DTNB (µl)	250	250	250
Standart (µl)	-	-	500

Kör ve numune tüpleri karıştırılır ve 4 dakika içinde 412 nm'de absorbanslar okundu. Numunelerin protein değeri ölçüldü.

#### Standart Çalışması

Daha önce tanımlandığı şekilde hazırlanan standart solüsyonları ile yapılan ölçümler sonunda elde edilen absorbans değerleri ile konsantrasyon değerleri arasında yapılan regresyon analizi sonucunda;



Şekil 3.4. GSH standart grafiği

Konsantrasyon= [ (OD/ 0.0706) + 0.29 ] şeklinde bir ilişki ortaya konuldu. (korelasyon: r=0.99 )

Ortamdaki prot değeri hesaplanarak sonuçlar prot başına olacak şekilde ayarlandı ve GSH mg/g prot şeklinde belirlendi.

### 3.4.8. Sülfidril Grupları (SH) Tayini (118)

#### Prensip

Koster, Biemond ve Swaak'ın metoduna göre yapıldı. Proteinlerin sülfidril grupları, bir disülfid olan 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB)'i indirgeyerek, koyu sarı renkte kromofor oluşturur. Oluşan kromoforun absorbanansı 412 nm'de okunur.

#### Çözeltiler

1. 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) (2 mM)
2. Potasyum fosfat tamponu (0.1 M, pH 7.4)
3. Sodyum sitrat (%1)

#### Prosedür

100 µl numune, 1500 µl fosfat tamponu ile karıştırıldı. 400 µl DTNB (sodyum sitrat içinde çözülür) ilave edildikten sonra 5 dakika 37°C'de bekletildi. Numunelerin absorbanansı 412 nm'de reaktif körüne karşı okundu. Sonuçlar  $\epsilon_{\max} : 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kullanılarak µmol / L olarak hesaplandı.

Numunelerde Lowry metodu ile protein ölçümü yapılarak sülfidril seviyesi µmol/g prot olarak verildi.

### 3.5. İstatistiksel Analizler

Tüm sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) şeklinde verildi. İstatistiksel değerlendirme Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 10.0 paket programı kullanılarak Mann-Whitney U testine göre yapıldı.

### 3.6. Gereçler ve Kimyasal Maddeler

#### 3.6.1. Gereçler

Ultrasantrifüj	: Beckman
Laminer flow	: Heraeus
CO <sub>2</sub> inkübatörü	: Heraeus
İnverted mikroskop	: Olympos
Otomatik pipetör	: Drummond
Etüv	: Heraeus
Otoklov	: Harvey
Sonikatör	: Branson
pH metre	: Jencons
Hassas terazi	: Gec Avey
Magnetik karıştırıcı	: İkamag RH
Derin dondurucu	: Sanyo
Dondurma tüpü	: 2 ml'lik cryo tüp
Spektrofotometre	: Shimadzu UV 1601



Spektrofluorometre : Shimadzu RF-5000  
Su banyosu : Precitherm PFV Boehringer-Mannheimö Nüve  
Hassas terazi : Sartorius 2472  
Buzdolabı : Ariston No-frost  
Otomatik pipet : 5-50, 20-200, 100-1000 µl'lik  
Cam pipet : 1, 2, 5 ve 10 ml'lik  
25, 75 cm<sup>2</sup>lik steril hücre doku kültürü flaskları  
Cam balon jojeler, beherler, erlen mayerler, huniler, mezürler  
Santrifüj tüpleri, deney tüpleri, süzgeç kağıtları ve ependorf tüpler

### 3.6.2. Kimyasal Malzemeler

Tüm kimyasal maddeler "Sigma" ve "Biological Industries" den temin edildi.



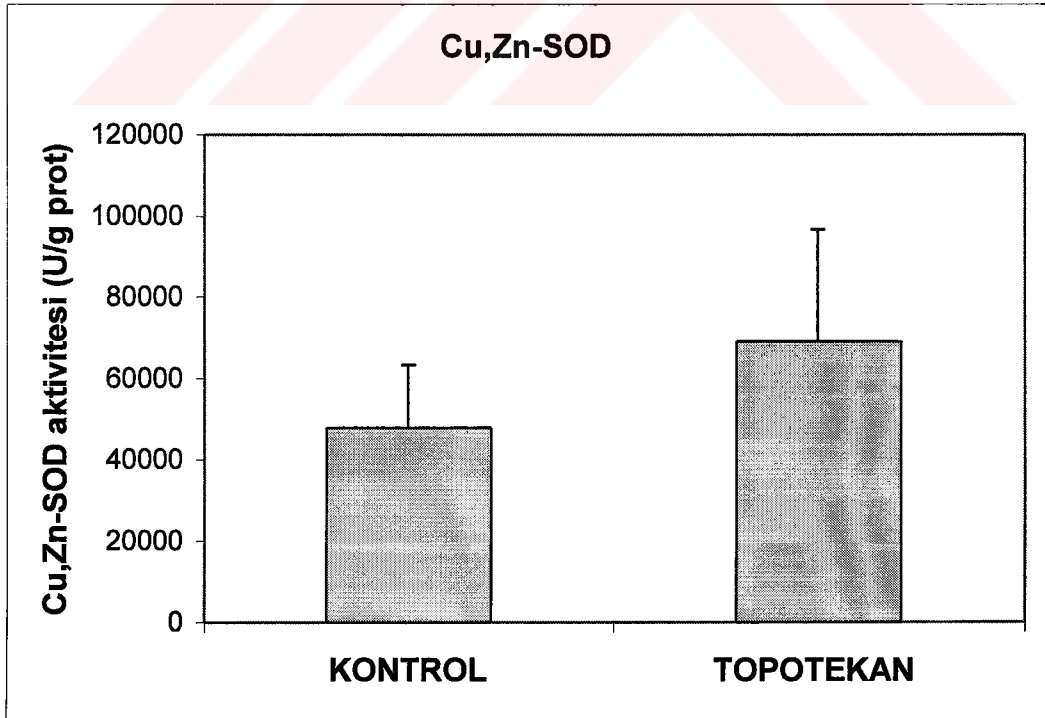
## BULGULAR

### 4.1. Topotecan'ın Cu,Zn-SOD'a Etkisi

Topotecan ile 24 saat muamele edilmiş gruplarda süperoksit dismutaz düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişme göstermedi ( $p>0.05$ ). Kontrol ve topotecan uygulanmış gruptaki değerler Tablo 4.1. ve Şekil 4.1.de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1.** Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerin Cu,Zn-SOD aktiviteleri (U/gprot).

Grup	n	Ortalama $\pm$ SD (en düşük-en yüksek)
Kontrol	6	47 765.5 $\pm$ 15 637.3 (29 248.7-67 591.1)
Topotecan	6	69 105.7 $\pm$ 27 496.9 (37 406.8-116 782)



**Şekil 4.1.** Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde süperoksit dismutaz aktiviteleri.

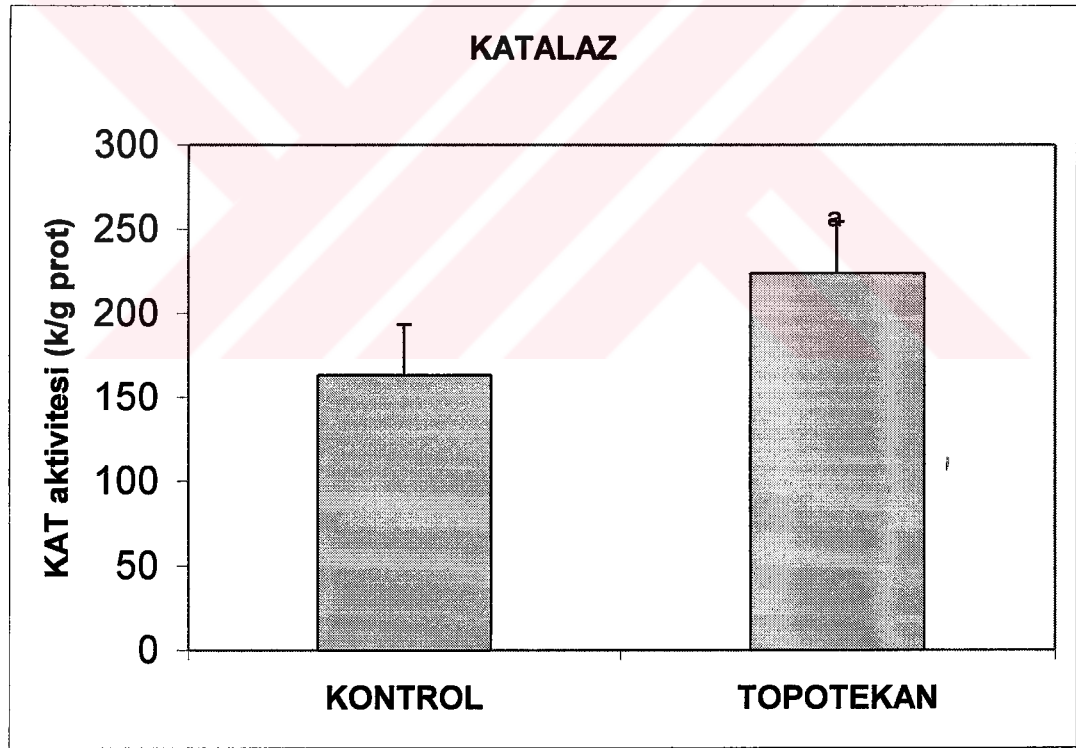
#### 4.2. Topotecan'ın Katalaz Üzerine Etkisi

Topotecan ile 24 saat muamele edilmiş gruplarda katalaz düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ( $p < 0.05$ ). Kontrol ve Topotecan uygulanmış gruptaki değerler Tablo 4.2. ve Şekil 4.2.de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerin katalaz aktiviteleri (k / g prot).

Grup	n	Ortalama $\pm$ SD (en düşük-en yüksek)
Kontrol	6	162.94 $\pm$ 30.48 (135.64-207.82)
Topotecan	6	223.86 $\pm$ 30.73 <sup>a</sup> 176.98-255.33

<sup>a</sup> $p < 0.05$  Topotecan ile muamele edilmemiş kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında



Şekil 4.2. Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde katalaz aktiviteleri.

<sup>a</sup> $p < 0.05$  Topotecan ile muamele edilmemiş kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında

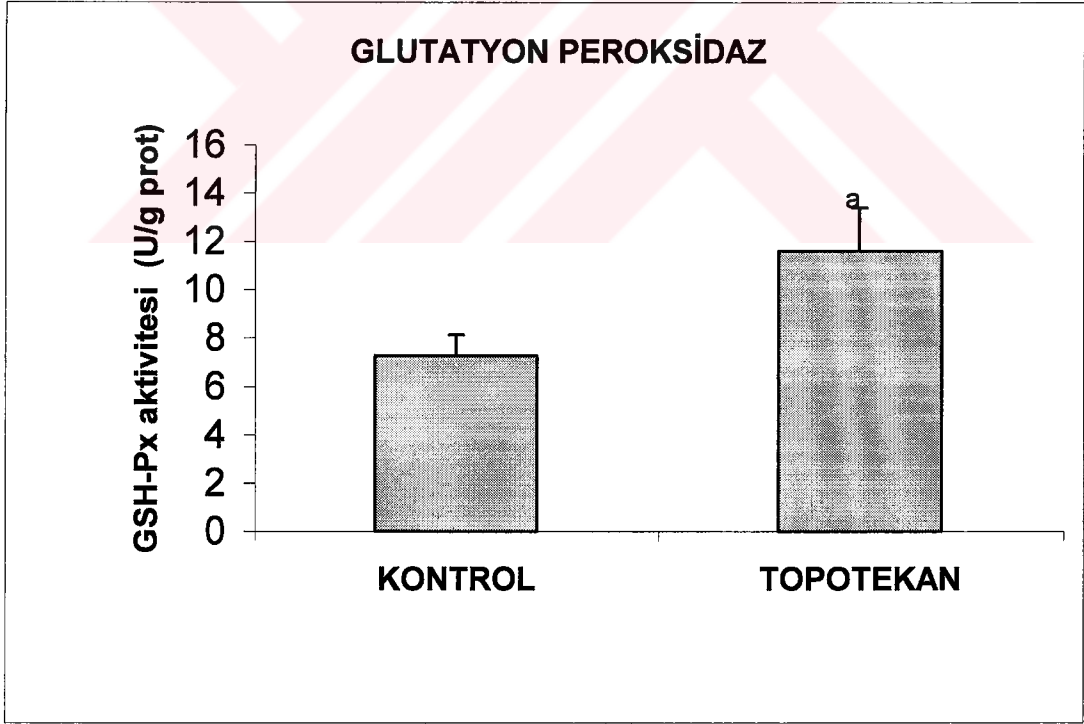
### 4.3. Topotecan'ın Glutatyon Peroksidaz Üzerine Etkisi

Topotecan ile 24 saat muamele edilmiş grupta glutatyon peroksidaz düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ( $p<0.05$ ). Kontrol ve topotecan uygulanmış gruptaki değerler Tablo 4.3. ve Şekil 4.3.de gösterilmiştir.

**Tablo 4.3.** Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerin glutatyon peroksidaz aktiviteleri (U/g prot).

Grup	n	Ortalama $\pm$ SD (en düşük-en yüksek)
Kontrol	6	7.26 $\pm$ 0.87 (6.19-8.69)
Topotecan	6	11.59 $\pm$ 1.80 <sup>a</sup> (9.13-13.44)

<sup>a</sup> $p<0.05$  Topotecan ile muamele edilmemiş kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında



**Şekil 4.3.** Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde glutatyon peroksidaz aktiviteleri.

<sup>a</sup> $p<0.05$  Topotecan ile muamele edilmemiş kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında

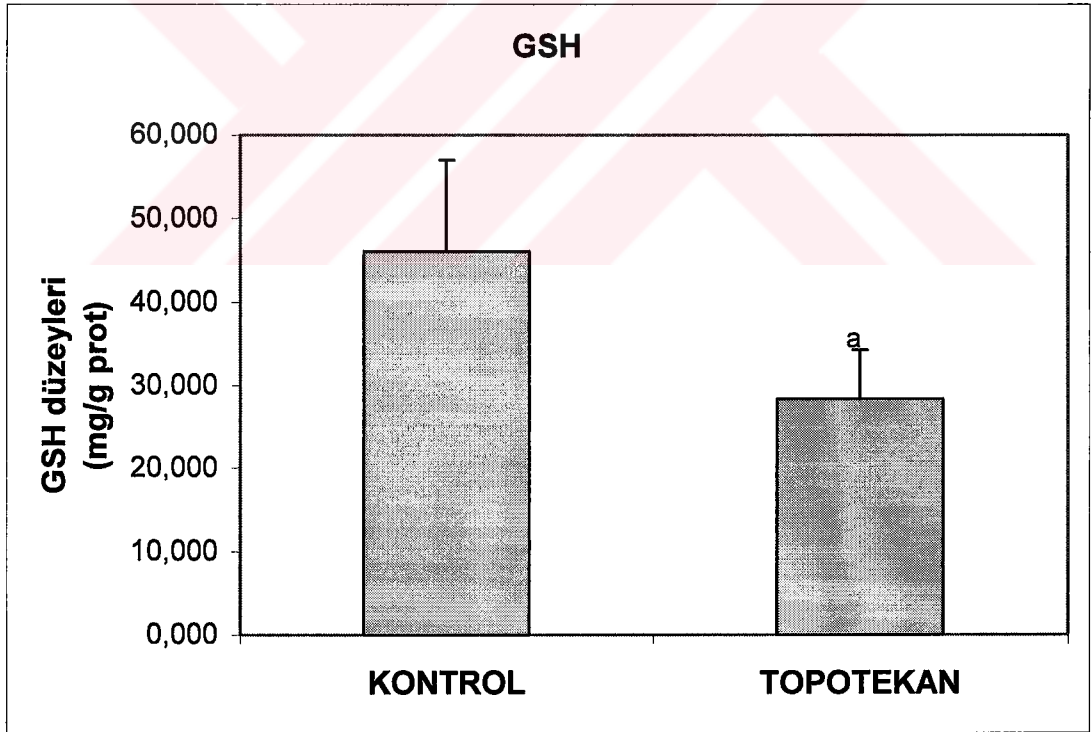
#### 4.4. Topotecan'ın Glutatyon Üzerine Etkisi

Topotecan ile 24 saat muamele edilmiş gruplarda glutatyon düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi ( $p < 0.05$ ). Kontrol ve topotecan uygulanmış gruptaki değerler Tablo 4.4. ve Şekil 4.4.de gösterilmiştir.

**Tablo 4.4.** Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde glutatyon düzeyleri (mg/g prot).

Grup	n	Ortalama $\pm$ SD
Kontrol	6	46.00 $\pm$ 10.99 (35.51-61.40)
Topotecan	6	28.30 $\pm$ 5.95 <sup>a</sup> (20.87-34.50)

<sup>a</sup> $p < 0.05$  Topotecan ile muamele edilmemiş kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında



**Şekil 4.4.** Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde glutatyon düzeyleri.

<sup>a</sup> $p < 0.05$  Topotecan ile muamele edilmemiş kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında

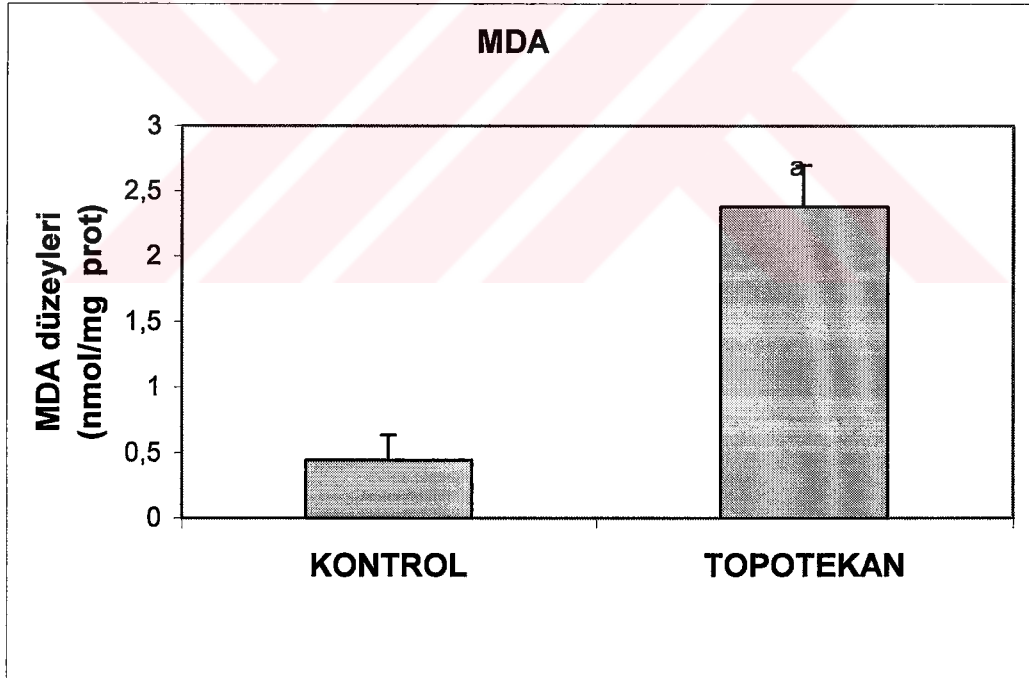
#### 4.5. Topotecan'ın MDA Üzerine Etkisi

Topotecan ile 24 saat muamele edilmiş gruplarda MDA düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ( $p < 0.05$ ). Kontrol ve topotecan uygulanmış grupların MDA değerleri Tablo 4.5. ve Şekil 4.5.de gösterilmiştir.

**Tablo 4.5.** Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde MDA düzeyleri (nmol/mg prot).

Grup	n	Ortalama $\pm$ SD (en düşük-en yüksek)
Kontrol	6	0.44 $\pm$ 0.19 (0.17-0.64)
Topotecan	6	2.37 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup> (1.97-2.93)

<sup>a</sup> $p < 0.05$  Topotecan ile muamele edilmemiş kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında



**Şekil 4.5.** Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde MDA düzeyleri.

<sup>a</sup> $p < 0.05$  Topotecan ile muamele edilmemiş kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında

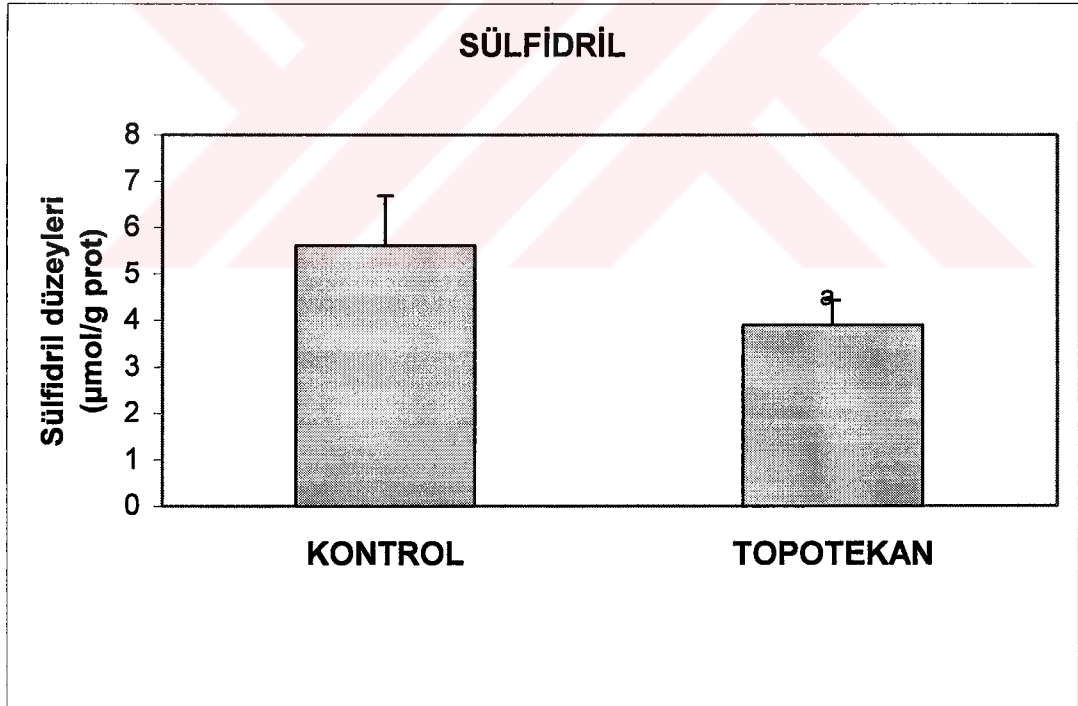
#### 4.6. Topotecan'ın Sülfidril Düzeyleri Üzerine Etkisi

Topotecan ile 24 saat muamele edilmiş gruplarda sülfidril düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi ( $p < 0.05$ ). Kontrol ve topotecan uygulanmış grupların sülfidril değerleri Tablo 4.6. ve Şekil 4.6.de gösterilmiştir.

**Tablo 4.6.** Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde sülfidril düzeyleri ( $\mu\text{mol/g}$  prot).

Grup	n	Ortalama $\pm$ SD (en düşük-en yüksek)
Kontrol	6	5.60 $\pm$ 1.07 (4.34-6.94)
Topotecan	6	3.08 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup> (3.17-4.56)

<sup>a</sup> $p < 0.05$  Topotecan ile muamele edilmemiş kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında



**Şekil 4.6.** Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde sülfidril düzeyleri.

<sup>a</sup> $p < 0.05$  Topotecan ile muamele edilmemiş kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında

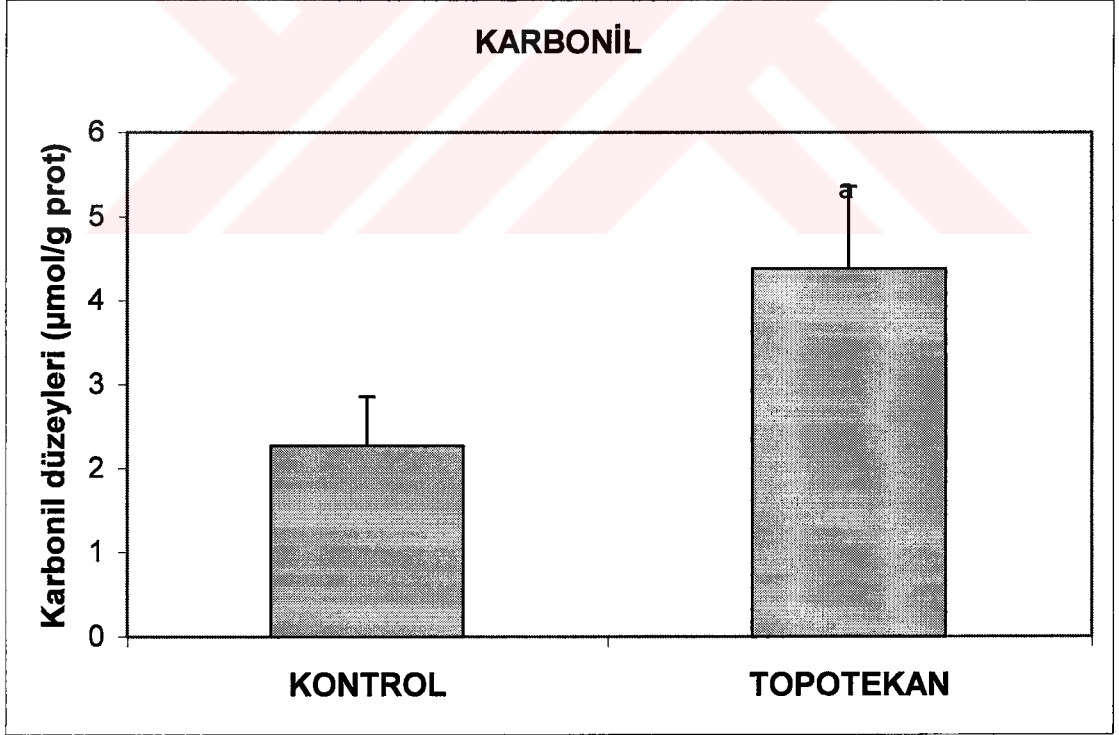
#### 4.7. Topotecan'ın Karbonil Düzeyleri Üzerine Etkisi

Topotecan ile 24 saat muamele edilmiş gruplarda karbonil düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ( $p < 0.05$ ). Kontrol ve Topotecan uygulanmış grupların karbonil düzeyleri Tablo 4.7. ve Şekil 4.7.de gösterilmiştir.

**Tablo 4.7.** Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde karbonil düzeyleri ( $\mu\text{mol/g}$  prot).

Grup	n	Ortalama $\pm$ SD (en düşük-en yüksek)
Kontrol	6	2.26 $\pm$ 0.59 (1.14-2.85)
Topotecan	6	4.37 $\pm$ 0.98 <sup>a</sup> (2.96-5.24)

<sup>a</sup> $p < 0.05$  Topotecan ile muamele edilmemiş kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında



**Şekil 4.7.** Topotecan uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde karbonil düzeyleri.  
<sup>a</sup> $p < 0.05$  Topotecan ile muamele edilmemiş kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında



## TARTIŞMA

Meme kanseri dünyada kadınlarda en sık görülen ikinci kanserdir. Gelişmiş ülkelerde ise en sık izlenen kanser tipidir (1). 20-59 yaş aralığındaki kadınlarda ölüme en fazla neden olan kanser meme kanseri iken, 60 yaş ve üzerindeki kadınlarda akciğer kanseri birinci sırayı almaktadır (9). Kemoterapi ya da endokrin terapinin lokal terapi sonrasında ya da adjuvan olarak uygulanması tüm hasta gruplarında yaşam sürelerini uzatıp kanserin yeniden tekrarlanmasını geciktirecektir (13,21,30,38,39).

Topotecan meme kanserinde yeni ve umut verici ilaçlar arasında yer almaktadır (30). Preklinik ve faz 1 çalışmaları sonuçlarına göre topotecan'ın metastatik meme kanserine karşı etkili olduğu gözlenmiştir. Faz 2 çalışmalarında ise topotecan'ın hastalığı stabilize edip, relaps süresini uzattığı bildirilmiştir (119). Topotecan'ın meme kanseri dışında faz 2 çalışmalarında özellikle over kanserleri başta olmak üzere küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer, kolorektal, ve serviks kanserlerinde de etkili olduğu gösterilmiştir (6). Östrojen bağımlı bir hücre dizisi olan MCF-7 meme kanseri hücre dizisi direkt meme tümöründen alınarak elde edilmiş epitel kökenli bir hücre dizisidir. Apoptozise kaspaz 3 ve p73 eksikliği nedeniyle dirençlidir (90). MCF-7, pek çok çalışmada sıkça kullanılan ve meme dokusuna ait bir çok biyokimyasal ve endokrin karakteristiklere sahip, iyi tanımlanmış bir hücre dizisidir (120). Tüm bu nedenlerden dolayı biz de bu çalışmada MCF-7 hücre dizisini tercih ettik.

Bir camptothecin türevi olan topotecan bir topoizomerez 1 inhibitörüdür ve camptothecin'e göre daha az toksik olup, suda daha iyi çözünebilmektedir. Topotecan'ın topoizomerez 1 ve DNA kompleksine bağlanarak bu kompleksi stabilize ettiği ve replikasyonu durdurduğu pek çok çalışmada bildirilmiştir (4,6). Topoizomerez 2 inhibitörü olan Epirubicin, Adriamicin gibi antikanser ilaçların sitotoksitesisi için ikinci bir mekanizma olarak ROS oluşumu gösterilmiştir (121,122). Bunun yanısıra topotecan'ın analogu olduğu camptothecin ROS ürettiğinin ve eksojen katalaz eklenmesiyle sitotoksitesinin azaldığının gösterilmiş olması bizi bu çalışma için yönlendirmiştir. Bugüne kadar topotecan hakkında bu konuda herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Biz bu çalışmanın bu açığı kapatacağına inanıyoruz.

Yapmış olduğumuz sitotoksitesite deneyi sonucunda topotecan'ın MCF-7 meme hücre dizisinde sitotoksik dozunu 100 ng/ml bulduk. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda IC50 dozu bizim bulmuş olduğumuz dozdan daha düşük bulunmuştur. Çünkü hücreleri ilaca maruz bıraktıkları süre daha uzundur (123).

Çalışmamızda topotecan'a 24 saat maruz bırakılan hücrelerde ve kontrollerde antioksidan düzeylerini ölçtük. Süperoksit dismutaz enziminde anlamsız bir artış gözlenirken, katalaz ve glutatyon peroksidaz düzeylerinde anlamlı artışlar bulduk. Süperoksit dismutaz enzim düzeylerindeki artışın oldukça fazla olmasına karşın bu artışın anlamsız olması örnek sayımızın az olmasından kaynaklanmaktadır. Hücre içi antioksidan kapasitesindeki artış topotecan'ın hücrede ürettiği ROS'a karşı bir cevap olarak yorumlanabilir. topotecan ile bu konuda yapılmış bir araştırmanın bulunmaması nedeniyle bulgularımızı karşılaştırma olanağı bulamadık.

Diğer antikanser ilaçlarıyla yapılmış birkaç çalışmada Mn-SOD'un sitotoksik ilaçlarla indüklenmesi araştırılmıştır. Sanchez-Alcazar ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada Teniposid'in mitokondride Mn-SOD'u upregüle ettiğini göstermişlerdir (124). Akashi ve arkadaşları antikanser bir ilaç olan OK432'nin insan granülositlerinde Mn-SOD'un artışına yol açtığını göstermişlerdir (125). Das ve arkadaşları aynı zamanda Mn-SOD mRNA'sının protein kinaz bağımlı bir mekanizma ile sitotoksik ilaçlarla upregüle edildiğini bildirmişlerdir (126). Epirubicin-HCl'ün uygulandığı HepG2 hücrelerinde de Mn-SOD'un arttığı gözlenmiştir (127).

Spesifik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> süpürücüsü olan katalaz, U-937 insan promonositik hücrelerinde etoposid (VP-16), camptothecin, doxorubicin (adriamycin) ve cisplatin gibi antitümör ilaçlarla oluşan apoptozisi azaltmaktadır (128). Bai ve arkadaşları HepG2 hücrelerinin mitomicin C ve VP16 gibi DNA'ya hasar verici ajanlar ile inkübasyonlarından sonra kontrol hücrelerinde apoptozis gözlerken, katalaz cDNA'sı içeren adenovirüs verilmiş hücrelerde apoptozisin katalaz overekspresyonu ile inhibe edildiğini gözlemişlerdir. Ayrıca katalaz overekspresyonu olan hücrelerde p53'ün degradasyonunun arttığını gözlemişlerdir. Bu sonuçlar katalaz düzeylerinin p53 upregülasyonu yapan antikanser ilaçların etkilerine karşı hücresel dirençte kritik bir rol oynadığını göstermiştir (129).

Sarvazyan ve arkadaşları elde ettikleri sonuçlarla erişkin rat myositlerinin artmış hücre içi oksidatif stresden korunmasında Cu,Zn-SOD'un rolünü desteklemişlerdir. İzole kardiyak miyositlerindeki Doxorubicin sitotoksitesini süperoksit anyonunun oluşumuyla açıklamışlardır ve hücre içi SOD aktivitesi düzeyinin hücre korunması için önemli bir faktör olduğunu ileri sürmüşlerdir (130). Doxorubicin analogu olan Epirubicin-HCl'in de HepG2 hücrelerinde süperoksit ürettiği, Cu,Zn-SOD'u arttırdığı ve apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (127). Bu sonuçlar bizim sonuçlarımızla uyumludur.

Sadzuka ve arkadaşları fare ve rat dokularında bir camptothecin türevi olan CPT-11'in glutatyon peroksidaz ve lipid peroksidasyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarında lipid peroksidasyonunda kontrollere göre fare kalbinde 1.5 kat rat kalbinde ise 1.3 kat artış gözlemişlerdir. Glutatyon peroksidaz aktivitesi kontrollerin %64'ünde azalmıştır. Akciğerde ise lipid

peroksidasyonu 2.5 kat artmış ve glutatyon peroksidaz düzeyleri %74 azalmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda CPT-11'in kardiyotoksik ve pulmonotoksik olabileceğini önermişlerdir (131). Bustamante ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmalarda MCF-7 meme kanseri hücre dizisinde Adriamycin'e maruz bırakılmış hücrelerde Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, KAT, GSH-Px enzim aktivitelerinde bir artış gözlemlenmemişlerdir (132).

Roller ve arkadaşları çalıştıkları tüm hücre dizilerinde cisplatin ile indüklenen hücre ölümü ve Cisplatin'in akut sitotoksitesinin N-acetylcysteine, superoksit dismutaz veya phenyl-N-tert-butyl-alpha-phenylnitron antioksidanlarıyla inhibe edildiğini gözlemlemişlerdir. İlaç inkübasyonu sonrasında ROS oluşumunu incelemişler ve Cisplatin sitotoksitesinin ROS oluşumu ile indüklenmediğini ayrıca buthionine sulfoximine (BSO) ile indüklenen GSH tüketimiyle sitotoksitesinin güçlenmediğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada uygulanan antioksidanların, antikanser ilaçlar olan BCNU, Doxorubicin, VM26, Vincristine, Cytarabine veya camptothecin sitotoksiteleri üzerine zayıf bir etkilerinin olduğu gösterilmiştir (133).

Biz yapmış olduğumuz çalışmada topotecan ile 24 saat muamele sonunda glutatyon ve sülfidril düzeylerini inceledik. Glutatyon ve sülfidril düzeylerini 24 saat topotecan uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulduk. GSH ve sülfidril düzeyindeki bu düşüş hücre içi oksidatif stres artışını desteklemektedir.

Gomscik ve arkadaşları tarafından MCF-7 ve MDA-MB 231 hücrelerinde bir glutatyon sentez inhibitörü olan buthionine sulfoximine ile glutatyonun tüketiminin, camptothecin ve bunun türevleri olan SN-38, topotecan ve CMMDC nin aktivitesini güçlendirdiği bildirilmiştir. Bunun nedeni BSO aracılı GSH tüketimi ile oksidatif stres düzeyinin artması ve relatif ROS artışı olabilir. Bu durum camptothecin'in sitotoksik aktivitesini ROS aracılığı ile gösterdiğini desteklemektedir. Ancak buthionine sulfoximine ile muamele edilmiş hücrelerde DNA protein çapraz bağlanmasındaki artışlar GSH'ın ayrıca camptothecin'in hücre hedefi olan topoizomera 1 üzerine etki ettiğini de düşündürmektedir. Oksidatif stresin ve relatif ROS artışının hücrelerde DNA, protein ve lipid yapılarında oksidatif hasara yol açtığı bilinmektedir (134).

Başka bir antikanser ilaç olan docetaxel ile yapılmış çalışmada Geng ve arkadaşları SMMC-7721 insan hepatoma hücre dizisinde docetaxel'in 24 saat uygulanmasından sonra ROS düzeylerinde anlamlı artışlar elde ederken glutatyon düzeylerinin önemli ölçüde azaldığını bulmuşlardır (135).

Hug ve arkadaşları HEPG2 hepatoma hücrelerinin bleomisin ile muamelesinin GSH tüketimini indüklediğini ve bunun yanı sıra ROS ürettiğini bulmuşlardır. Bu sonuçlar bizim yapmış olduğumuz çalışmanın sonuçlarıyla uyumludur (136).

Sawyer ve arkadaşları hamster akciğer fibroblast hücreleri olan V79 hücrelerinde buthionine sulfoximine indüklü glutasyon tüketiminin artmış CPT-11 hassasiyeti ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. V79 hücrelerinin CPT-11'in sitotoksik etkisine buthionine sulfoximine indüklü hassasiyetinin DNA-topoizomeraz 1 kompleksinin stabilizasyonundan bağımsız bir mekanizma ile meydana geldiğini bildirmişlerdir (137).

Cisplatin'e dirençli küçük hücreli akciğer kanseri hücre dizisi olan NYH/CIS 'de camptothecin ve topotecan'a karşı çapraz direnç geliştirmiş olmasının, artmış glutasyon seviyelerine bağlanabileceğini fakat topoizomeraz seviyelerindeki değişimler gibi diğer açıklamaların daha olası olduğunu bildirmişlerdir (138). Cisplatin hücrelerde ROS oluşturur ve glutasyonun artışı bu ROS oluşumunu inhibe ederek ilaca karşı bir direnç mekanizması geliştirebilir. Cisplatin'e karşı artmış glutasyon seviyeleri ile direnç kazanmış bir hücre Topotecan'a karşı da direnç gösterebilir. Bu durum topotecan'ın sitotoksik etkisinde ROS aracılı bir mekanizmanın olabileceğini desteklemektedir.

Mans ve arkadaşları hücreSEL GSH düzeyinin etoposide toksisitesinde belirleyici bir faktör olabileceğini göstermişlerdir. GSH tüketimi olan hücrelerde etoposide hassasiyetinin arttığını bildirmişlerdir (139).

Çalışmamızda 24 saat topotecan uygulanan grupta lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'nın ve protein oksidasyon ürünü olan karbonil düzeyinin artmış olduğunu gördük. Bu sonuçlar topotecan'ın oksidatif stres oluşturduğunu desteklemektedir.

Poot ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada camptothecin indüklü apoptozisin başlangıç fazında mitokondrial aktivitenin arttığını ve mitokondrial membranların yapısal bütünlüklerinde küçük oranlarda kayıpların olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca Frankly apoptotik hücrelerinde camptothecin'in mitokondrilerde parçalanma ve lipid peroksidasyonuna neden olduğunu bildirmiştir (140).

Bustamante ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmalarda MCF-7 meme kanseri hücre dizisinde adriamycin'e maruz bırakılmış hücrelerde lipid peroksidasyonunun arttığını gözlemlemişlerdir (133). Bu sonuçlar bizim bulgularımızla uyumludur.

Mimnaugh ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada adriamycin kaynaklı serbest radikal saldırısı için nükleer membran zarflarının yapısındaki polyenoic fosfolipidlerin önemli hedefler olduğunu göstermeyi amaçlamışlardır. Bu çalışmanın sonucunda nükleer membran lipidlerinin peroksidatif hasarının, hücre çekirdeğindeki biyokimyasal ve morfolojik

değişimlere katkıda bulunduğunu ve bu değişimlerin adriamycin sitotoksitesinde önemli bir rol oynadığını göstermişlerdir (141).

Germain ve arkadaşları doxorubicin sitotoksitesinde lipid peroksidasyonunun major bir role sahip olup olmadığını anlamak için insan meme kanseri hücre dizisi olan MDA-MD 231 hücre dizisini doxorubicin ile birlikte çeşitli poliansatüre serbest yağ asitleri ile inkübe etmişlerdir ve serbest yağ asitlerinin doxorubicin'in sitotoksitesini arttırdıklarını gözlemlemişlerdir (142).

Ikushima ve arkadaşları iki çeşit insan nöroblastoma hücre dizisinde bir poliansatüre yağ asidi olan gama linolenik asit (GLA) kullanılarak vinca alkaloidleri grubundan vincristine ve vinblastine'in lipid peroksidasyon potansiyellerini göstermek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışma sonucunda vinca alkaloidlerinin sitotoksik etkinliklerinin GLA eklenmesiyle 2 kat arttığı tesbit edilmiştir (143).

Hardman ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmalarda atimik farelere MCF-7 insan meme kanser hücreleri inoküle edilmiştir. CPT-11 ile yapılan tedavi çalışmalarında besinlerine balık yağı eklenmiş olan fare gruplarında CPT-11'in etkinliğinin atmış olduğu gözlenmiştir (144).

Biz yapmış olduğumuz çalışmada karbonil düzeylerini anlamlı olarak artmış, sülfidril düzeylerini anlamlı olarak azalmış bulduk. Bu sonuçlar hücrede reaktif oksijen radikallerinin artışını desteklemektedir. Bu konuda topotecan ya da diğer antikanser ilaçlarla yapılmış bir çalışmaya rastlayamadık. Reaktif oksijen radikallerinin proteinler üzerindeki etkisine bağlı gelişen kimyasal reaksiyonlar kompleks olup, daha henüz tamamlanmamış birçok ürünün oluşmasına neden olurlar. Proteinler üzerindeki oksidatif hasarı en iyi protein karbonillerindeki (PCO) artış ile protein tiyollerindeki (P-SH) azalış yansıtmaktadır. Proteinler üzerine olan ROS atakları sonucu histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi birçok aminoasit zarar görebilir. Bu aminoasitlerden birkaçına ya da proteinlerin peptid yapılarında oluşan hasar sonucu PCO ürünleri oluşur (69).

Çalışmamızın öncüsü olan başka bir projemizde topotecan'ın ROS ürettiği gösterilmiştir (145). Bu bağlamda antioksidan-enzimlerin yükselmesini topotecan'ın ROS üretmesine bağlayabiliriz. Daha önce Gorman ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada camptothecin ve bunun türevi olan SN 38'in promyelocytic leukemia HL-60 hücre dizisinde ROS ürettiği bildirilmiştir (146). Simizu ve arkadaşları vinblastin ve camptothecin gibi antikanser ilaçların ROS üretimiyle hücrelerde apoptozisi indüklediğini bildirmişlerdir (147).

Kanser tedavisinde kullanılan antrasiklinlerin sitotoksik etkilerini gösterebilmeleri için önerilen iki mekanizma vardır. Birinci mekanizma DNA-topoizomeraz 2 kompleksini sabit hale getirerek topoizomerazın hücre içindeki görevini yapmasına engel olurlar. İkinci mekanizma ise NADPH-cyt p450 redüktaz veya diğer flavin içeren enzimlerin metabolik aktivasyonu boyunca bir elektron redüksiyonuna girebilirler. Bu redüksiyon semiquinon serbest radikalini oluşturabilir. Semiquinon ise  $O_2^-$ ,  $OH^{\cdot}$  ve  $H_2O_2$  gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna sebep olabilir (127). Çoğu kanserin tedavisinde kullanılan adriamisin ve daunomisin gibi antrasiklinlerle yapılmış çalışmalarda da ROS oluşumu gösterilmiştir. Doroshov ve Sinha ilaçlardan oksijen radikalleri oluşumunun bu ilaçların MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileriyle direkt ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir. Hem Doroshov hem de Sinha radikal süpürücülerin MCF-7 hücrelerinde bu ilaçların sitotoksitesini azalttığını bulmuşlardır. Bu gözlemler antrasiklinlerin antitümör aktivasyonunda serbest radikal oluşumunun önemli rol oynadığını desteklemektedir (121).

Ayrıca mitomisin C ve mitaxantrone antikanser ilaçları da ROS oluşumunu indükleme yeteneğindedir (148).

Bu bilgilerin ve yapmış olduğumuz çalışmanın ışığında topotecan'ın ROS üretmesini bu ilacın toksisitesi için alternatif bir mekanizma olarak önerebiliriz. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda antikanser ilaçlara karşı gelişen dirençten ilaçların ürettiği ROS'a karşı yükselen antioksidan enzim düzeyleri ve GSH seviyelerinin artışı sorumlu tutulmaktadır. Topotecan gibi ilaçların mekanizmasının daha iyi anlaşılmasının tedaviye yeni stratejiler getireceğine inanıyoruz.

## SONUÇLAR

Bu çalışma östrojen bağımlı meme hücre dizisi olan MCF-7 hücrelerinde yapıldı. Çalışmada topotecan uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) grup olmak üzere iki grup kullanıldı.

1. MCF-7 hücrelerinde topotecan'ın sitotoksik dozu 100 ng/ml olarak belirlendi.
2. Topotecan uygulanmış hücrelerde süperoksit dismutaz aktivitesi kontrollere göre anlamlı ( $p>0.05$ ) olmayan bir artış gösterdi.
3. Topotecan uygulanmış hücrelerde glutatyon peroksidaz aktivitesi kontrollere göre anlamlı ( $p<0.05$ ) olarak arttı.
4. Topotecan uygulanmış hücrelerde katalaz aktivitesi kontrollere göre anlamlı ( $p<0.05$ ) olarak arttı.
5. Topotecan uygulanmış hücrelerde glutatyon düzeyleri kontrollere göre anlamlı ( $p<0.05$ ) olarak azaldı.
6. Topotecan uygulanmış hücrelerde sülfidril düzeyleri kontrollere göre anlamlı ( $p<0.05$ ) olarak azaldı.
7. Topotecan uygulanmış hücrelerde karbonil düzeyleri kontrollere göre anlamlı ( $p<0.05$ ) olarak arttı.
8. Topotecan uygulanmış hücrelerde MDA düzeyleri kontrollere göre anlamlı ( $p<0.05$ ) olarak arttı.

## KAYNAKLAR

1. Hulka B.S., Stark A.T. Breast cancer: cause and prevention. *Lancet*. 1995; 30;346(8979):883-887.
2. Mitra N., Schnabel F.R., Neugut A.I., Heitjan D.F. Estimating the effect of an intensive surveillance program on stage of breast carcinoma at diagnosis: a propensity score analysis. *Cancer*. 2001; 91(9):1709-1715.
3. Kristensen V.N., Borresen-Dale A.L. Molecular epidemiology of breast cancer: genetic variation in steroid hormone metabolism. *Mutation Res*. 2000; 462:323-333.
4. Hsiang Y.H., Lihou M.G., Liu L.F. Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res*. 1989; 49(18):5077-5082.
5. Hsiang Y.H., Liu L.F. Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin. *Cancer Res*. 1988; 48(7):1722-1726.
6. Jonsson E., Fridborg H., Csoka K., Dhar S., Sundstrom C., Nygren P., Larsson R. Cytotoxic activity of topotecan in human tumour cell lines and primary cultures of human tumour cells from patients. *Br J Cancer*. 1997; 76(2):211-219.
7. Ng B., Kramer E., Liebes L., Wasserheit C., Hochster H., Blank E., Ceriani R., Furmanski P. Radiosensitization of tumor-targeted radioimmunotherapy with prolonged topotecan infusion in human breast cancer xenografts. *Cancer Res*. 2001; 61(7):2996-3001.
8. Furberg H., Millikan R., Dressler L., Newman B., Geradts J. Tumor characteristics in African American and white women. *Breast Cancer Res Treat*. 2001; 68(1):33-43.
9. Jemal A., Thomas A., Murray T., Thun M. Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2002; 52(3):181-182.
10. Jatoi I., Miller A.B. Why is breast-cancer mortality declining? *Lancet Oncol*. 2003; 4(4):251-254.
11. Davis W., Ronai Z., Tew K.D. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 296(1):1-6.



12. Greenlee R.T., Hill-Harmon M.B., Murray T., Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin.* 2001; 51(1):15-36.
13. Henderson C. Breast cancer. In: *Principles of Internal Medicine.* Wilson J.D., Braunwald E., Isselbacher K.J., Petersdorf R.G., Martin J.B., Fauci A.S., Root R.K. Mc Graw-Hill Inc., New York, 1991, twelfth edition, volume 2, pp: 1612-1621.
14. Harris H., Morrow M., Norton L. Cancer of the breast. In: *Cancer Principles Practice of Oncology,* De Vita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia-New York, 1997, 5th edition, Volume 2, pp: 1557-1616.
15. Gump F.E. Premalignant diseases of the breast. *Surg Clin of North Am.* 1984; 64(6):1051-1059.
16. Bradley C.L., Given C.W., Roberts C. Race, socioeconomic status, and breast cancer treatment and survival. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94(7):490-496.
17. Newman L.A., Carolin K., Simon M., Kosir M., Hyrniuk W., Demers R., Grossbart Schwartz A., Visscher D., Peters W., Bouwman D. Impact of breast carcinoma on African-American women: the Detroit experience. *Cancer.* 2001; 91(9):1834-1843.
18. Boyd N.F., Martin L.J., Noffel M., Lockwood G.A., Trichler D.L. A meta-analysis of studies of dietary fat and breast cancer risk. *Br J Cancer.* 1993; 68(3):627-636.
19. Canellos G.P. Endocrine and reproductive diseases. In: *Cecil Textbook of Medicine.* Wyngaarden J.B., Smith L.H. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1982, 16th edition, pp: 1283-1285.
20. Ribeiro G.G. Breast. In: *The Radiotherapy of Malignant Disease.* Easson E.C., Pointon R.C.S. William Clowes Limited, Berlin, 1995, second edition, pp: 259-280.
21. Yarnol J. Breast cancer. In: *Treatment of Cancer.* Price P., Sikora K., Halnan K.E. Chapman & Hall Medical, London, 1995, third edition, pp: 413-438.
22. Kulka J., Davies J.D. The pathology of breast cancer. In: *Oxford Textbook of Oncology.* Souhami R.L., Tannock I., Hohenberger P., Horiot J.C. Oxford University Press, New York, 2002, second edition, volume 2, pp: 1697-1786.

23. Santora L.M., Mahoney M.C., Lawvere S., Englert J.J., Symons A.B., Mirand A.L. Breast cancer screening beliefs by practice location. *BMC Public Health*. 2003; 3(1):1-9.
24. Prorok J.J., Trostle D.R., Scarlato M., Rachman R. Excisional breast biopsy and roentgenographic examination for mammographically detected microcalcification. *Am J Surg*. 1983; 145(5):684-686.
25. Kvasoğlu T. Meme hastalıklarında cerrahi yaklaşım. Uzmanlık tezi, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi A.D, Antalya, 1985.
26. Strax P. Imaging of the breast. A perspective. *Surg Clin North Am*. 1984; 64(6):1061-1072.
27. Michaelson J., Satija S., Moore R., Weber G., Halpern E., Garland A., Puri D., Kopans D.B. The pattern of breast cancer screening utilization and its consequences. *Cancer*. 2002; 94(1):37-43.
28. Grady K.E., Lemkau J.P., Lee N.R., Caddell C. Enhancing mammography referral in primary care. *Preventive Medicine* 1997; 26: 791-800.
29. Cady B., Michaelson J.S. The life-sparing potential of mammographic screening. *Cancer*. 2001; 91(9):1699-1703.
30. Wong K., Henderson I.C. Management of metastatic breast cancer. *World J Surg*. 1994; 18(1):98-111.
31. Benson J.R., Weaver D.L., Mittra I., Hayashi M. The TNM staging system and breast cancer. *Lancet Oncol*. 2003; 4(1):56-60.
32. Ashikari R.H. Modified radical mastectomy. *Surg Clin of North Am*. 1984; 64(6):1095-1102.
33. Maddox W.A., Carpenter J.T.Jr., Laws H.L., Soong S.J., Cloud G., Urist M.M., Balch C.M. A randomized prospective trial of radical (Halsted) mastectomy versus modified radical mastectomy in 311 breast cancer patients. *Ann Surg*. 1983; 198(2):207-212.
34. Haagensen C.D., Bodian C. A personal experience with Halsted's radical mastectomy. *Ann Surg*. 1984; 199(2):143-150.
35. Bland K.I., Menck H.R., Scott-Conner C.E.H., Morrow M., Winchester D.J., Winchester D.P. The National Cancer Data Base 10-year survey of breast carcinoma treatment at hospitals in the United States. *Cancer*. 1998; 83(6):1262-1273.

36. Hermann R.E., Esselstyn C.B. Jr., Cooperman A.M., Crile G. Jr. Partial mastectomy without radiation therapy. *Surg Clin North Am.* 1984; 64(6):1103-1113.
37. Cody H.S., Egeli R.A., Urban J.A. Rotter's node metastases. Therapeutic and prognostic considerations in early breast carcinoma. *Ann Surg.* 1984; 199(3):266-270.
38. Murphy M.J. Jr. Molecular Action and Clinical Relevance of Aromatase Inhibitors. *Oncologist.* 1998; 3(2):129-130.
39. Kitagawa K., Yamakado K., Nakatsuka A., Tanaka N., Matsumura K., Takeda K., Kawarada Y. Preoperative transcatheter arterial infusion chemotherapy for locally advanced breast cancer (stage IIIb) for down-staging and increase of resectability. *Eur J Radiol.* 2002; 43(1):31-36.
40. Drewa G., Krzyzyska-Malinowska E., Wozniak A., Protas-Drozd F., Mila-Kierzenkowska C., Rozwodowska M., Kowaliszyn B., Czajkowski R. Activity of superoxide dismutase and catalase and the level of lipid peroxidation products reactive with TBA in patients with psoriasis. *Med Sci Monit.* 2002; 8(8):BR338-BR343.
41. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med.* 1991; 91(3C):14S-22S.
42. Boldyrev A.A., Significance of reactive oxygen species for neuronal function. In: *Free Radicals, Nitric Oxide and Inflammation: Molecular, Biochemical, and Clinical Aspects.* Tomasi A., Özben T., Skulachev V.P. IOS Press, Amsterdam, 2003, Series 1: Life and Behavioral Sciences, vol.344, pp: 153-162.
43. Pal Yu B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 1994; 74(1):139-162.
44. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., Cross C.E. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J. Lab. Clin. Med.*, 1992; 19 (6): 598-620.
45. Esterbauer H., Cheeseman K. Determination of aldehydic lipid-peroxidation products malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods. Enzymol.* 1990; 186: 407-421.
46. Gutteridge J.M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995; 41(12 Pt 2):1819-1828.

47. Sadrzadeh S.M., Graf E., Panter S.S, Hallaway P.E., Eaton J.W. Hemoglobin and biologic fenton reagent. *J. Biol. Chem.* 259(23):14354-14356.
48. Auroma O.L., Halliwell B., Gajewski E., Dizdaroğlu M. Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 1994; 273 (Pt 3):601-604.
49. Galle J., Wanner C. Oxidative stress and vascular injury-relevant for atherogenesis in uremic patients? *Nephrol Dial Transpl.* 1997; 12:2480-2483.
50. Dursun E. Kronik hemodiyaliz programında olan tip 2 diyabetik olgularda oksidatif stres ve antioksidan sistem dengesi değişiklikleri. Akdeniz Üniversitesi Biyokimya A.D. Antalya, 2003.
51. Halliwell B. Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? *Drugs.* 1991; 42(4):569-605.
52. Jorge S.A., Menck C.F., Sies H., Osborne M.R., Phillips D.H., Sarasin A., Stary A. Mutagenic fingerprint of ozone in human cells. *DNA Repair (Amst).* 2002; 1(5):369-378.
53. Halliwell B., Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 1993; 57(5 Suppl):715S-724S.
54. Klink M., Cedzynski M., St Swierzko A., Tchorzewski H., Sulowska Z. Involvement of nitric oxide donor compounds in the bactericidal activity of human neutrophils in vitro. *J Med Microbiol.* 2003; 52(Pt 4):303-308.
55. Cakatay U., Telci A., Kayali R., Tekeli F., Akcay T., Sivas A. Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle. *Clin Biochem.* 2003; 36(1):51-55.
56. Kumar J.S., Menon V.P. Effect of diabetes on levels of lipid peroxides and glycolipids in rat brain. *Metabolism.* 1993; 42(11):1435-1439.
57. Cheeseman K.H. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Mol Aspects Med.* 1993; 14(3):191-197.
58. Chiu D., Kuypers F., Lubin B. Lipid peroxidation in human red cells. *Sem. Hematol.* 1989; 26:257-276.
59. Gutteridge J.M., Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci.* 1990; 15(4):129-135.

60. Clemens M.R., Waller H.D. Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem Phys Lipids*. 1987; 45(2-4):251-268.
61. Freeman B.A., Crapo J.D. Biology of disease- Free radicals and tissue injury. *Lab Invest*. 1982;47: 412-426.
62. Garner M.H., Spector A. Selective oxidation of cysteine and methionine in normal and senile cataractous lenses. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1980; 77(3): 1274-1277.
63. Frank L., Massaro D. Oxygen Toxicity. *Am J Med*. 1980; 69:117-126.
64. Winyard P., Lunec J., Brailsford S., Blake D. Action of free radical generating systems upon the biological and immunological properties of caeruloplasmin. *Int J Biochem*. 1984; 16(12):1273-1278.
65. Horton A.A., Fairhurst S. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *Crit Rev Toxicol*. 1987; 18(1):27-79.
66. Stadtman E.R., Berlett B.S. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metabol Rev*. 1998; 30(2):225-243.
67. Witko-Sarsat V., Friedlander M., Nguyen Khoa T., Capeillere-Blandin C., Nguyen A.T., Canteloup S., Dayer J.M., Jungers P., Druke T., Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol*. 1998; 161(5):2524-2532.
68. Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chim Acta*. 2003; 329 (1-2); 23-38.
69. Cakatay U., Telci A., Kayali R., Tekeli F., Akcay T., Sivas A. Relation of oxidative protein damage and nitrotyrosine levels in the aging rat brain. *Exp Gerontol*. 2001; 36(2):221-229.
70. Kamijo M., Cherian P.V., Sima A.A.F. The preventive effect of aldose reductase inhibition on diabetic optic neuropathy in the BB/W-rat. *Diabetologia*. 1993, 36: 893-898.
71. Hileman E.A., Achanta G., Huang P. Superoxide dismutase: an emerging target for cancer therapeutics. *Expert Opin Ther Targets*. 2001; 5(6):697-710.
72. Liochev S.I., Fridovich I. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase can act as a superoxide reductase and a superoxide oxidase. *J Biol Chem*. 2000; 275(49):38482-38485.

73. Westman N.G., Marklund S.L. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase and manganese-containing superoxide dismutase in human tissues and human malignant tumors. *Cancer Res.* 1981; 41(7):2962-2966.
74. Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol.* 1998; 201 (Pt 8):1203-1209.
75. Hartz J.W., Deutsch H.F. Subunit structure of human erythrocyte superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 1972; 247: 7043-7050.
76. Rotilio G., Calabrese L., Bossa F., Barra D. Properties of the apoprotein and role of copper and zinc in protein conformation and enzym activity of bovine superoxide dismutas. *Biochem.* 1972; 11:2182-2187.
77. Weser U., Barth G., Djerassi C., Hartmann H.J., Krauss P., Voelcker G., Voelter W., Voetsch W. A study on purified apoerythrocyprein. *Biochim Biophys Acta.* 1972; 278(1): 28-44.
78. Bray R.C., Cockle S.A., Fielden E.W., Roberts P.B., Rotilio G. Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochem J.* 1974; 139:43-48.
79. Salin M.L., Mc Cord J.W. Superoxide dismutase in polymorphonucleer leucocytes. *J Clin Invest.* 1974,54(4): 1005-1009.
80. Vance P.G., Keek B.B. Superoxide dismutase from streptococcus mutants. *J. Biol. Chem.* 1972; 247: 4782-4786.
81. Saik L.A., Hsieh H.L, Baricos W.H., Shapira E. Enzymatic and immunologic quantitation of erythrocyte superoxide dismutase in adults and in neonates of different gestasyonel ages. *Pediatr. Res.* 1982; 16: 933-937.
82. Aebi H.E. Catalase. *Methods of Enzymatic Analysis. Volume III. Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases.* Ed. Bergmeyer, H.U., V.C.H. Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987:273-285.
83. Takahashi K., Cohen H.J. Selenium dependent glutathione peroxidase protein and activity: Immunological investigations on cellular and plasma enzymes. *Blood.* 1986; 68: 640-645.
84. Maiorino M., Grogogolin C., Ursini F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Met Enzymol.* 1990; 186: 448-457.
85. Avissar N., Whitin J.C., Allen P.Z. Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *J Biol Chem.* 1989; 264:15850-15855.

86. Carmagnoe F., Sinet M.P., Jerome H. Selenium-dependent and non-selenium dependent glutathione peroxidase in human tissue extracts. *Biochim Biophys Acta*. 1988; 759:49-57.
87. Serteser M. Deneysel global serebral iskemi - reperfüzyon hasarında nitrik oksit oluşumu, lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu: Glutamat salınım inhibisyonunun nöroprotektif etkisi. Uzmanlık tezi, Akdeniz Üniversitesi Biyokimya A.D, Antalya, 1999.
88. Tew K.D. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res*. 1994; 54(16):4313-4320.
89. Leslie E.M., Deeley R.G., Cole S.P. Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology*. 2001; 167(1):3-23.
90. Feeney G.P., Errington R.J., Wiltshire M., Marquez N., Chappell S.C., Smith P.J. Tracking the cell cycle origins for escape from topotecan action by breast cancer cells. *Br J Cancer*. 2003; 88(8):1310-1317.
91. Bomgaars L., Berg S.L., Blaney S.M. The development of camptothecin analogs in childhood cancers. *Oncologist*. 2001; 6(6):506-516
92. Stewart C.F., Ratain M.J. Pharmacology of cancer chemotherapy. In: *Cancer Principles Practice of Oncology*. De Vita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A. Lippincott-Raven Publishers, 5th edition, Volume 1, 452-467, Philadelphia-New York, 1997.
93. Pommier Y., Fujimori A., Hoki Y., Gupta M., Gariboldi M. DNA topoisomerase 1 inhibitors and multidrug resistance. In: *Multidrug Resistance in Cancer Cells*. Gupta S., Tsuruo T. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 1996, pp: 119-135.
94. Hsiang Y.H., Hertzberg R., Hecht S., Liu L.F. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*. 1985; 260(27):14873-14878.
95. Ulukan H., Swaan P.W. Camptothecins: a review of their chemotherapeutic potential. *Drugs*. 2002; 62(14):2039-2057.
96. Coleman R.L. Emerging role of topotecan in front-line treatment of carcinoma of the ovary. *The Oncologist*. 2002; 7(suppl 5):46-55.
97. Balmer C., Valley A.W. Basic principles of cancer treatment and cancer chemotherapy. In: *Pharmacotherapy-A Pathophysiologic Approach*. DiPiro J.T., Talbert R.L., Yee G.C., Matzke G.R., Wells B.G., Posey L.M. Appleton&Lange, Stamford, 1997, third edition, 2432-2433.

98. Staker B.L., Hjerrild K., Feese M.D., Behnke C.A., Burgin A.B., Stewart L. The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(24):15387–15392.
99. <http://cmgm.stanford.edu/biochem/biochem201/Slides/DNA%20Topoisomerase>
100. Wall J.G., Burris H.A. 3rd, Von Hoff D.D., Rodriguez G., Kneuper-Hall R., Shaffer D., O'Rourke T., Brown T., Weiss G., Clark G. A phase I clinical and pharmacokinetic study of the topoisomerase I inhibitor topotecan (SK&F 104864) given as an intravenous bolus every 21 days. *Anticancer Drugs*. 1992; (4):337-345.
101. Cerutti P.A. Oxy-radicals and cancer. *Lancet*. 1994; 24;344(8926):862-863.
102. Cleveland J.L., Kastan M.B. A radical approach to treatment. *Nature*. 2000; 407:309-311.
103. Sun Y. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radic Biol Med*. 1990; 8(6):583-599.
104. Oberley L.W., Oberley T.D. Role of antioxidant enzymes in cell immortalization and transformation. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1988; 84:147-153.
105. Kahlos K., Soini Y., Sormunen R., Kaarteenaho-Wiik R., Paakko P., Linnainmaa K., Kinnula V.L. Expression and prognostic significance of catalase in malignant mesothelioma. *Cancer*. 2001; 91(7):1349-1357.
106. Chung-man Ho J., Zheng S., Comhair S.A., Farver C., Erzurum S.C. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res*. 2001; 61(23):8578-8585.
107. Soini Y., Vakkala M., Kahlos K., Paakko P., Kinnula V. Mn-SOD expression is less frequent in tumour cells of invasive breast carcinomas than in in situ carcinomas or non-neoplastic breast epithelial cells. *J Pathol*. 2001; 195(2):156-162.
108. Bize I.B., Oberley L.W., Morris H.P. Superoxide dismutase and superoxide radical in Morris hepatomas. *Cancer Res*. 1980; 40(10):3686-3693.
109. Das U.N. A radical approach to cancer. *Med Sci Monit*. 2002; 8(4):RA79-92.



110. Rovere F.D., Granata A., Saija A., Broccio M., Tomaino A., Zirilli A., Caridi G, Broccio G. -SH groups and glutathione in cancer patient's blood. *Anticancer Res.* 2000; 20:1595-1598
111. Cole S.P. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1986; 17(3):259-263.
112. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randell R.J. Protein measurement with folin-phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-275
113. Misra H.P., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972, 247: 3170-3175.
114. Paglia D.E., Valentine W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70: 158-169.
115. Wasowicz W., Neve J., Peretz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem.* 1993; 39 (12): 2522-2526.
116. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S., Stadtman E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186:464-478.
117. Fairbanks V.F., Klee G.G. Biochemical Aspects of Hematology, In *Textbook of Clinical Chemistry.* Ed. By Tietz NW, WB, Saunders Company, Philadelphia. 1498-535.1986
118. Koster J.F., Biemond P., Swaak J.G. Intracellular and extracellular sulphhydryl levels in rheumatoid arthritis. *Ann Rheumatic Diseases.* 1986; 45:44-46.
119. Chang A.Y. The potential role of topotecan in the treatment of advanced breast cancer. *Semin Oncol.* 1997; 24(6 Suppl 20):S20-49-S20-54.
120. Sinha B.K., Katki A.G., Batist.G., Cowan K.H., Myers C.E. Differential formation of hydroxyl radicals by adriamycin in sensitive and resistant MCF-7 human breast tumor cells: implications for the mechanism of action. *Biochemistry.* 1987; 26(13):3776-3781.
121. Yeh G.C., Occhipinti S.J., Cowan K.H., Chabner B.A., Myers C.E. Adriamycin resistance in human tumor cells associated with marked

- alteration in the regulation of the hexose monophosphate shunt and its response to oxidant stress. *Cancer Res.* 1987; 47(22):5994-5999.
122. Kinnula K., Linnainmaa K., Raivio K.O., Kinnula V.L. Endogenous antioxidant enzymes and glutathione S-transferase in protection of mesothelioma cells against hydrogen peroxide and epirubicin toxicity. *Br J Cancer.* 1998; 77(7):1097-1102.
  123. Robey R.W., Medina-Perez W.Y., Nishiyama K., Lahusen T., Miyake K., Litman T., Senderowicz A.M., Ross D.D., Bates S.E. Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2(MXR/BCRP/ABCP1), in Flavopiridol-resistant human breast cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2001; 7:145-152.
  124. Sanchez-Alcazar J.A., Khodjakov A., Schneider E. Anticancer drugs induce increased mitochondrial cytochrome c expression that precedes cell death. *Cancer Res.* 2001; 61(3):1038-1044.
  125. Akashi M., Takagi S., Hachiya M.. Anti-cancer agent OK432 induces manganese superoxide dismutase in human granulocytes. *Int J Cancer.* 1996; 68(3):384-390.
  126. Jarvinen K., Pietarinen-Runtti P., Linnainmaa K, Raivio K.O., Krejsa C.M., Kavanagh T, Kinnula V.L. Antioxidant defense mechanisms of human mesothelioma and lung adenocarcinoma cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 278(4):L696-L702.
  127. Özkan A. Epirubicin-HCL ve LAK'ın hepatoma G2 hücrelerinde antioksidan mekanizması ve radikal süpürücü enzimler üzerine etkilerinin araştırılması. Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 2003.
  128. Sancho P., Troyano A., Fernandez C., De Blas E., Aller P. Differential effects of catalase on apoptosis induction in human promonocytic cells. Relationships with heat-shock protein expression. *Mol Pharmacol.* 2003; 63(3):581-589.
  129. Bai J., Cederbaum A.I. Catalase protects HepG2 cells from apoptosis induced by DNA-damaging agents by accelerating the degradation of p53. *J Biol Chem.* 2003; 278(7):4660-4667.
  130. Sarvazyan N.A., Askari A., Huang W-H. Effects of Doxorubicin cardiomyocytes with reduced level of superoxide dismutase. *Life Sci.* 1995, 57(10):1003-1010.
  131. Sadzuka Y., Hirota S. Effect of CPT-11 on lipid peroxide level in mouse tissues. *Jpn J Cancer Res.* 1997; 88(5):512-516.

132. Bustamante J., Galleano M., Medrano E.E., Boveris A. Adriamycin effects on hydroperoxide metabolism and growth of human breast tumor cells. *Breast Cancer Res Treat.* 1990; 17(2):145-153.
133. Roller A., Weller M. Antioxidants specifically inhibit cisplatin cytotoxicity of human malignant glioma cells. *Anticancer Res.* 1998; 18(6A):4493-4497.
134. Gamcsik M.P., Kasibhatla M.S., Adams D.J., Flowers J.L. Colvin O.M., Manikumar G., Wani M., Wall M.E., Kohlhagen G., Pommier Y. Dual role of glutathione in modulating camptothecin activity: depletion potentiates activity, but conjugation enhances the stability of the topoisomerase I-DNA cleavage complex. *Mol Cancer Ther.* 2001; 1(1):11-20.
135. Geng C.X., Zeng Z.C., Wang J.Y. Docetaxel inhibits SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis. *World J Gastroenterol.* 2003; 9(4):696-700.
136. Hug H., Strand S., Grambihler A., Galle J., Hack V., Stremmel W., Krammer P.H., Galle PR. Reactive oxygen intermediates are involved in the induction of CD95 ligand mRNA expression by cytostatic drugs in hepatoma cells. *J Biol Chem.* 1997; 272(45):28191-28193.
137. Sawyer T.E., Bonner J.A. The interaction of buthionine sulphoximide (BSO) and the topoisomerase I inhibitor CPT-11. *Br J Cancer Suppl.* 1996; 27:S109-S113.
138. Jensen P.B, Holm B., Sorensen M., Christensen I.J., Sehested M. In vitro cross-resistance and collateral sensitivity in seven resistant small-cell lung cancer cell lines: preclinical identification of suitable drug partners to taxotere, taxol, topotecan and gemcitabin. *Br J Cancer.* 1997; 75(6):869-877.
139. Mans D.R.A., Lafleur M.V.M., Westmijze E.J., Horn I.R., Bets D., Schuurhuis G.J., Lankelma J., Retel J. Reactions of glutathione with the catechol, the ortho-quinone and the semi-quinone free radical of Etoposide. *Biochem Phar.* 1992; 43(8):1761-1768.
140. Poot M., Pierce R.H. Detection of changes in mitochondrial function during apoptosis by simultaneous staining with multiple fluorescent dyes and correlated multiparameter flow cytometry. *Cytometry.* 1999; 35(4):311-317.
141. Mimnaugh E.G., Kennedy K.A., Trush M.A., Sinha B.K. Adriamycin-enhanced membrane lipid peroxidation in isolated rat nuclei. *Cancer Res.* 1985; 45(7):3296-3304.

142. Germain E., Chajes V., Cognault S., Lhuillery C., Bougnoux P. Enhancement of doxorubicin cytotoxicity by polyunsaturated fatty acids in the human breast tumor cell line MDA-MB-231: relationship to lipid peroxidation. *Int J Cancer*. 1998; 75(4):578-583.
143. Ikushima S., Fujiwara F., Todo S., Imashuku S. Gamma linolenic acid alters the cytotoxic activity of anticancer drugs on cultured human neuroblastoma cells. *Anticancer Res*. 1990; 10(4):1055-1059.
144. Hardman W.E., Moyer M.P., Cameron IL. Fish oil supplementation enhanced CPT-11 (irinotecan) efficacy against MCF7 breast carcinoma xenografts and ameliorated intestinal side-effects. *Br J Cancer*. 1999; 81(3):440-448.
145. Akbaş S.H., Özben T., Yenisoy S., Savaş B., Ündar L. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre dizilerinde Topotecan'a karşı gözlenen MRP ve P-GP ilişkili direncin oksidatif stres ve antioksidan mekanizmalarla olan etkileşiminin araştırılması. Araştırma projesi (yayınlanmamış data), Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 2002.
146. Gorman A., McGowan A., Cotter T.G. Role of peroxide and superoxide anion during tumour cell apoptosis. *FEBS Lett*. 1997; 404(1):27-33.
147. Simizu S., Takada M., Umezawa K., Imoto M. Requirement of caspase-3(-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs. *J Biol Chem*. 1998; 273(41):26900-26907.
148. Powis G. Free radical formation by antitumor quinones. *Free Radic Biol Med*. 1989; 6(1):63-101

## ÖZGEÇMİŞ

Müjgan TUNALI, 01.09.1977 yılında Denizli'de doğdu. İlkokul öğrenimini 1988 yılında Ankara Abdullah Tokur İlköğretim Okulu'nda, orta öğrenimini 1991 yılında Erzurum Oltu Ortaokulu'nda, lise öğrenimini , 1994 yılında Antalya Çağlayan Lisesinde, tamamladı. Yüksek öğrenimini 1999 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde tamamladı. 2000 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğretimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizcedir.

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
BİLGİ YÖNETİMİ MERKEZİ**