

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Meme Kanserinde Mangan-Superoksit Dismutaz (*Mn-SOD*) Gen Polimorfizminin
Araştırılması**

Emel ERGÜL

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Biyoloji Programı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır

**KOCAELİ
2006**

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Meme Kanserinde Mangan-Superoksit Dismutaz (*Mn*-SOD) Gen Polimorfizminin
Araştırılması**

Emel ERGÜL

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Biyoloji Programı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Ali SAZCI

KOÜ Bilimsel Araştırmalar Birimi
tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 2005/33

KOCAELİ
2006

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

İşbu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof.Dr. M. Doğan GÜLKAÇ İMZA

Üye Prof.Dr. Ali SAZCI (Danışman) İMZA

Üye Prof.Dr. N. Zafer UTKAN İMZA

Üye Doç.Dr. Şükrü ÖZTÜRK İMZA

Üye Yrd.Doç.Dr. Kıvanç ERGEN İMZA

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../200..

Prof.Dr. Emin Sami ARISOY

Enstitü Müdürü

ÖZET

Meme Kanserinde Mangan-Superoksit Dismutaz (*Mn*-SOD) Gen Polimorfizminin Araştırılması

Değişik endojen ve eksojen etmenler sonucu oluşan reaktif oksijen türlerinin yarattığı hasarın meme kanseri oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir. Superoksit dismutaz (SOD) reaktif oksijen türlerine (ROT)'ne karşı antioksidant etkiye sahip en önemli enzimlerden biridir. SOD2 veya mangenez içeren SOD (*Mn*-SOD) mitokondride superoksidleri yok eden tek enzim olduğundan enzimin antioksidant etkisi oldukça önemlidir. *Mn*-SOD geninde meydana gelen bir transisyon (T-C) mutasyon enziminin mitokondri taşıma dizisinin 9. kodonunda Alanin yerine Valin amino asidinin geçmesine neden olmaktadır.

Tezin amacı *Mn*-SOD Ala-9Val polimorfizminin meme kanseri ile ilişkisini araştırmaktır. Bu amaçla histolojik olarak onaylanmış meme kanseri vakalarından ve gönüllü olarak çalışmamıza katılan sağlıklı kontrollerden kan toplandı.

PCR-RFLP metodu kullanılarak 156 meme kanseri hastasının ve 228 kontrolün genotiplemesi yapıldı. İstatistiksel analize göre hastalarla kontroller arasında allelik ilişki bulunamadı ($\chi^2 = 3.447$, $df=2$, $P= 0.178$). Fakat AV genotipinin odds ratio (OR)'su 1.476 olarak bulundu (95% CI=0.978-2.229, $df=1$, $P=0.063$). Buna göre hastalarda ve kontrollerde genotip dağılımı sırasıyla %24.4 VV, %56,6 AV, %16 AA; %30.3 VV, %50 AV, %19.7 AA olarak bulundu. Allelik frekansları da V alleli için, hastalarda %54.16 kontrollerde %55.26, A alleli için de hastalarda %45.83 kontrollerde %44.73, olarak hesaplandı.

Sonuç olarak *Mn*-SOD Ala-9Val polimorfizminin meme kanserine yatkınlık sağlayan bağımsız bir risk faktörü olmadığı bulundu.

Anahtar kelimeler : Meme kanseri, *Mn*-SOD geni, Polimorfizm, Bağlantı

ABSTRACT

The Investigation of Manganese Superoxide Dismutase (*Mn*-SOD) Gene Polymorphism in Breast Cancer

Oxidative damage induced by the generation of reactive oxygen species (ROS) by exogenous and endogenous exposures is believed to be implicated in breast cancer. *Mn*-SOD is the primary antioxidant enzyme in the mitochondria with a function of the detoxification of superoxide free radicals and thus protecting cells from oxidative stress. An alanin to valin substitution at amino acid 16, occuring in the mitochondrial targeting sequence of the *Mn*-SOD gene has been reported to increase breast cancer risk.

The aim of the thesis was to investigate the relationship of the *Mn*-SOD Ala-9Val polymorphism to breast cancer risk in a population-based case-control study. We collected blood from women with primary, incident, histologically confirmed breast cancer who had not received radiotherapy and/or chemotherapy and age-matched voluntary healthy controls.

By using PCR-RFLP method we genotyped 156 breast cancer patients and 228 healthy controls. Statistical analysis of the data suggested that there was no allelic association between the cases and healthy controls ($\chi^2=3.447$, $df=2$, $P=0.178$). Whereas the AV genotype gave an odds ratio of 1.476 (95% CI=0.978–2.229, $df=1$, $P=0.063$). However it was statistically insignificant. The distribution of the VV, AV, AA genotypes was %24.4, %56,6, %16 in breast cancer patients and %30.3, %50, %19.7 in controls. The frequency of the V allele was %54.17 in cases and %55.26 in controls. The frequency of the A allele was %45.83 in cases and %44.74 in controls.

In conclusion, there is no association between *Mn*-SOD polymorphism and breast cancer.

Key words : Breast cancer, *Mn*-SOD gene, Polymorphism, Association

TEŐEKKÖR

Tez alıőmam sűresince kıymetli bilgileri, ilgisi ve desteği ile yanımda olan çok değerli hocam ve danıőmanım Prof. Dr. Ali SAZCI'ya,

Manevi desteği ve yardımlarından dolayı çalıőma arkadaőım Arő. GÖr. Gűrler AKPINAR'a

Katkı ve yardımlarından dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. N. Zafer UTKAN'a ve Prof. Dr. N. Zafer CANTÖRK'e

Tez çalıőmam boyunca gÖsterdikleri sevgi ve hoőgÖrűden dolayı canım aileme teőekkÖr ederim.

Bu alıőma KOÖ Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2005/33)

İÇİNDEKİLER

ÖZET	IV
ABSTRACT	V
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
ÇİZELGELER DİZİNİ	XI
1. GENEL BİLGİ VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	1
1.1. Meme Biyolojisi	1
1.1.1. Meme Kanseri	5
1.1.1.1. Meme Kanserlerinin Klinik Özellikleri	6
1.1.1.2. Meme Kanseri Açısından ER, PR ve ERBB Proteinlerinin Önemi	7
1.1.1.3. Meme Kanserinin Etiyolojisi	8
1.1.1.3.1. Meme Kanserinde Genetik Faktörler	12
1.2. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ VE REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ	18
1.2.1 Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı	20
1.2.1.1 Reaktif Oksijen Türlerinin Kansereleşme Mekanizmaları	22
1.2.2. Biyolojik Sistemde ROT'ne Karşı Koruma Sağlayan Antioksidant Sistemler	23
1.2.2.1. <i>Mn</i> -SOD Genin Yapısı ve Fonksiyonu	25
1.2.2.1.1. <i>Mn</i> -SOD Proteinini	27
1.2.2.2. <i>Mn</i> -SOD Enziminin ve <i>Mn</i> -SOD Genin Ala-9Val Polimorfizminin Hastalıklarla İlişkisi	28
1.2.2.2.1 Ala-9Val Polimorfizminin Kansere İlişkisi	32
1.2.2.3. SOD Evrimi	37
1.3 DNA POLİMORFİZMİ	38
1.3.1 DNA Polimorfizm Tipleri	39

1.3.1.1. Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP)	39
1.3.1.2.VNTR	40
2. AMAÇ VE KAPSAM	41
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	42
3.1. Gereçler	42
3.1.1.Enzimler	42
3.1.2.Primerler	42
3.1.3.Kimyasallar	42
3.1.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	43
3.1.4.1. DNA İzolasyon Çözeltileri	43
3.1.4.2. Elektroforez Solüsyonları	44
3.1.4.3. Gümüş Boyama Solisyonları	45
3.1.5. Kullanılan Cihazlar	45
3.1.6. Hasta Grubu	46
3.1.7. Kontrol Grubu	46
3.2. Yöntemler	46
3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	46
3.2.2. DNA Konsantrasyonu ve Saflığının Ölçümü	47
3.2.3. Genotipleme	47
3.2.3.1. PCR	47
3.2.3.1.1. PCR Ürünlerinin Agoroz Gel Elektroforezi	48
3.2.3.2. RFLP	48
3.2.3.2.1. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Gel Elektroforezi	48
3.2.3.2.2. Gümüş Boyama	49
3.2.4. İstatiksel Analiz	50
4.BULGULAR	51
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	71

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALS:	Amiyotrofik Lateral Sklerozis
AT:	Ataksia Telangiektasia
ATM:	Ataxia Telangiectasia Mutated (Ataksia Telangiektasia'da Mutant)
CI:	Confidence Intervale (Güven Aralığı)
COMT:	Catechol-O-Metyltransferase (Katekol-O-Metiltransferaz)
EGF:	Epidermal Growth Factor (Epidermal Büyüme Faktörü)
ER:	Estrogene Reseptor (Östrojen Reseptörü)
ERE:	Estrogene Response Element (Östrojen Cevap Elementi)
IARC:	International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu)
IR:	İyonizan Radyasyon
MAPK:	Mitogen Activated Protein Kinase (Mitojen Etkisiyle Aktive Olan Protein Kinaz)
MND:	Motor Neuron Disease (Motor Nöron Hastalığı)
MTHFR:	5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (5,10-Metilentetrahidrofolat reduktaz)
OR:	Odds Ratio
PCR:	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PIP3:	Phosphatidilinositole-3,4,5-triphosphate (Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat)
PRE:	Progesterone Response Element (Progesteron Cevap Elementi)
PR:	Progesteron Reseptörü
RFLP:	Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi)
ROT:	Reaktif Oksijen Türleri
SNP:	Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)
SOD:	Superoksid Dismutaz
TNF:	Tümör Nekroz Faktör
UV:	Ultraviyole Işık

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1: Memenin büyüme fazları	1
Şekil 1.2: Östrojenin meme kanserine neden olduğu iki farklı yolun şematik olarak gösterilmesi	9
Şekil 1.3: Östrojen biyosentezinde ve metabolizmasında rol oynayan genlerin şematik olarak gösterilmesi	10
Şekil 1.4: Hücrenin değişik komponentlerinde serbest radikal oluşumu	20
Şekil 1.5: Süperoksit dismutaz enzimleri ve hücresel lokalizasyonları	24
Şekil 1.6: <i>Mn</i> -SOD geninin yapısının şematik olarak gösterilmesi	26
Şekil 1.7: İnsan <i>Mn</i> -SOD proteininin aktif bölgesini içeren monomerik kristal yapı	27
Şekil 4.1: PCR ile çoğaltılan <i>Mn</i> -SOD Ala-9Val polimorfizmini içeren gen bölgesinin agaroz jel görüntüsü	52
Şekil 4.2: <i>Bswa</i> I enzimi ile kesilen <i>Mn</i> -SOD Ala-9Val polimorfizmini içeren gen bölgesinin poliakrilamid jel görüntüsü (1: pUC mix 8 M, 2: kesilmemiş PCR ürünü, 3: AA, 4: VV, 5: AV)	52
Şekil 4.3: <i>Bswa</i> I enzimi ile kesilen <i>Mn</i> -SOD Ala-9Val polimorfizmini içeren gen bölgesinin poliakrilamid jel görüntüsü (Total jel görüntüsü)	52

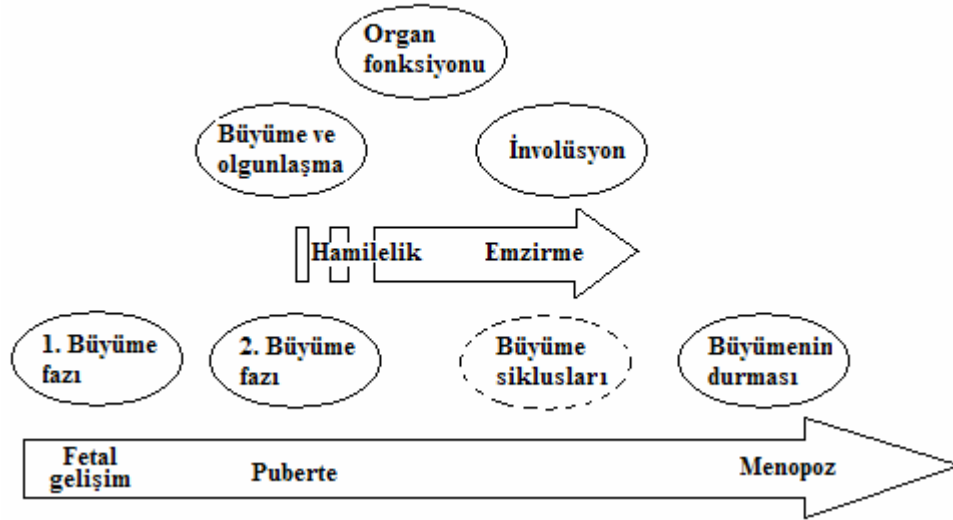
ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1: İnsanda ERBB ailesi	4
Çizelge 1.2: Türkiyede kadınlarda en çok görülen on kanser türü	5
Çizelge1.3: SOD enzimlerinin protein yapıları, kullandıkları metaller, molekül ağırlıkları ve genlerinin kromozomal lokalizasyonları	27
Çizelge 1.4: Değişik populasyonların kontrol gruplarında Ala-9Val polimorfizminin genotip ve allel frekanslarının dağılımı	35
Çizelge 1.5: Değişik populasyonların hasta gruplarında Ala-9Val polimorfizminin genotip ve allel frekanslarının dağılımı	36
Çizelge 3.4: <i>Mn</i> -SOD Ala-9Val polimorfizmi için poliakrilamid jel koşulları	49
Çizelge 4.1: PCR ile çoğaltılan <i>Mn</i> -SOD Ala-9Val polimorfizmini içeren gen dizisi	52
Çizelge 4.2: Enzim kesimi sonrası oluşan bant dizileri ve uzunlukları	53
Çizelge 4.3: <i>Mn</i> -SOD gen polimorfizminin hasta ve kontrol gruplarına göre genotip dağılımları	53
Çizelge 4.4: Hasta ve kontrol gruplarına göre allelik dağılım	54
Çizelge 4.5: Hasta ve kontrol gruplarının yaş ortalamaları	54
Çizelge 4.6: Hasta grubunda patolojik tanıların dağılımı	54

1. GENEL BİLGİ VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

1.1 MEME BİYOLOJİSİ

Memeler ergenlik öncesi dönemde gelişmemiştir, ergenlikten sonra yumurtalıklarda östrojen hormonu üretiminin başlaması ile hızlı bir şekilde gelişim gösterirler (Şekil 1.1). Bu dönemde o zamana kadar olgunlaşmamış duktalar uzamaya başlar ve bunları çevreleyen doku içerisine 15–20 arasında lob oluşur. Her lob kendi içinde 20–40 adet daha ufak alt birime ayrılır. Bu alt birimler de kendi içerisinde çok sayıda bölüme ayrılırlar. Hamilelikte duktuslar bağ dokusunun içine doğru iyice uzayarak alveolleri oluşturur. Böylece salgı hücreleri farklılaşır ve duktuslar olgunlaşır. Emzirme salgı bezlerinin büyümesine neden olmaktadır ve daha sonra da özellikle alveollerde bulunan luminal salgı hücreleri apoptozis geçirmektedir. Bu şekilde doku tekrar bir düzenlemeye gitmektedir (<http://www.gebelik-rehberi.com/meme/doku.asp>).



Şekil.1.1. Memenin büyüme fazları

Tüm bu sikluslar lokal olarak oluşturulan büyüme faktörleri ve hormonların birlikte çalışması ile kontrol edilmektedir. Diğer dokularda olduğu gibi memede de

bölünme stroma tarafından gerçekleştirilir. Stromal ve epiteliyal hücreler steroid hormonlarına cevaben parakrin büyüme faktörleri üretirler. Östradiol ve progesteron steroid hormon reseptörleri ailesine ait olan özel reseptörlere bağlanarak hareket ederler. Bu aile birçok ligand vasıtası ile DNA'ya bağlanan proteinleri kapsamaktadır. Bu grubun üyeleri ligand bağımlı olarak çalışan transkripsiyon faktörleri olup homodimer olarak spesifik DNA bölgelerine bağlanırlar. Bu bölgeler de östrojen respons elementi (ERE), progesteron respons elementi (PRE) v.s gibi isimlendirilmektedirler. Östrojen reseptör α (ER α) bu reseptörlere tipik bir örnektir. Bu reseptörün, iki adet çinko parmak taşıyan DNA'ya bağlanma bölgesi primer aminoasid dizisinin ortasında bulunur. Bu bölgenin yanında ve proteinin N-terminal bölgesinde AF-1 olarak adlandırılan transaktivasyon bölgesi bulunur. C-terminal bölgesinde bulunan "hinge" bölgesi ise AF-2 olarak adlandırılan ikinci transaktivasyon bölgesine bağlanır. AF-2 sıkı bir şekilde liganda bağlanır ve aktif hale geçmesi buraya bağlanması ile olur (Schulz, 2005).

İnaktif reseptörler sitosolde durmaktadır, ancak liganda bağlanıp gereken konformasyon değişiklikleri geçirdikten sonra çekirdeğe girerler. Reseptör dimerleri DNA'da kendine spesifik bölgelere bağlandıktan sonra AF bölgeleri vasıtasıyla değişik ko-aktivatör proteinleri çağırırlar. ER α 'daki AF-2 bölgesi en az 5 farklı ko-aktivatör proteini bağlayabilmektedir. Bunlardan en iyi tanımlanmış olan SRC-1(steroid reseptör ko-aktivatörü) proteindir. Ko-aktivatörler aracılığıyla steroid hormon reseptörleri ve transkripsiyon aparatı arasındaki etkileşimler gerçekleşir, bunun sonucunda da reseptörün DNA bağlanma bölgesinde kromatin değişimi olmaktadır. Ko-aktivatörlerin bağlanması histon asetilasyonunu stimule ederek transkripsiyonun başlamasına neden olmaktadır. Ayrıca reseptörler aynı genin regülatör kısmına bağlanan birden fazla transkripsiyon faktöründen ve sinyal transduksiyon "yolak"larından gelen sinyalleri entegre ederler. Örneğin, ER'ü ve androjen reseptörü (AR) ile etkileşime giren ko-aktivatörler EGF ailesine ait büyüme faktörleri ile fosforile olan mitojen activated protein kinase (MAPK) ile regule edilirler. Reseptörün kendisi de fosforile olur. Ko-aktivatörlerle etkileşimler genleri aktif hale getirirken ko-represörlerle etkileşimler genin baskılanmasına neden olur (McDonnell and Norris, 2002).

ER α 'yı aktive eden ikinci bir mekanizma ise reseptörün DNA'ya bağlanmasına gerek duymamaktadır. Steroid hormon reseptörü DNA'ya bağlı olan diğer transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girerek onların aktivitelerini düzenlemektedirler. Bu mekanizma reseptör bağlama bölgesi içermeyen genlerin regülasyonunda yer almaktadır. ER α AP1 transkripsiyon faktörünün aktivitesini düzenleyebilmektedir. Böylece östrojen tek başına veya büyüme faktörleri ile birlikte MAPK yollarını taklit ederek hücre çoğalmasını stimüle eder. Ayrıca östrojen meme dokusunda EGF'ne benzer büyüme faktörlerinin üretimini de stimüle eder (Schulz, 2005).

Aslında östrojen ile meme dokusu büyümesi ve fonksiyonunun düzenlenmesi oldukça karmaşık bir olaydır. Östrojen reseptörleri SP1 ve NF κ B ile doğrudan veya doğrudan olmayan etkileşimler yaparak da gen aktivitesini etkileyebilmektedirler. Bunun dışında ER α aktivitesi siklin D1 ve BRCA1 ile olan protein-protein etkileşimleri ile değişmektedir. Östrojenler hücre membranında da direkt olarak iyon kanallarını etkileyerek membranda değişikliğe yol açmaktadırlar. En önemlisi de östrojenlerin meme dokusunda yer alan epiteliyal ve stromal orjinli birçok hücre tipini etkileyebilmeleridir.

İnsanda östrojen reseptörü α ve östrojen reseptörü β olmak üzere iki tane farklı östrojen reseptörü bulunmaktadır. ER α 'yı ESR1 geni, ER β 'yı ise ESR2 geni kodlamaktadır. Bu iki reseptörün yapıları sadece %30'luk homoloji göstermesine rağmen DNA'ya bağlanma bölgeleri birbirinin aynıdır ve her ikisi de AGGTCA NNN TGACCT östrojen respons elementi (ERE) dizisini tanırlar. ER α dişi üreme dokularındaki hücre bölünmelerinden sorumludur. Oysa ER β inhibitör görevi yapmaktadır. İki östrojen reseptörü vücut içerisinde farklı ekspresyon paternlerine sahiptirler (Schulz, 2005).

Progesteron reseptörü (PR)'nün subüniteleri (PRA ve PRB) ise farklı şekilde çevrilen fakat aynı gen ürünü olan mRNA'dan sentezlenirler. Homodimer veya tetradimer olarak birbirleriyle bağlanabilmektedirler. Progesteron reseptörünün ekspresyonu ER α tarafından indüklenir. PRA (veya PR α) kısmen ER α 'nın feedback inhibitörü olarak görev yapar. Fakat PR aktivitesi gestagenlere bağlı olarak değişir, yani

PR'unun aktif olabilmesi için gestagenlerin belli seviyede olması gerekmektedir (Jordan, 2004).

Östrojen ve östrojen reseptörleri birçok diğer hormon ile etkileşerek normal meme gelişimden sorumlu olan en önemli faktörlerdir. Ayrıca östrojen, EGF ailesine ait büyüme faktörleri ile birleşerek ERBB ailesine ait olan reseptör tirozin kinazları aktive eder. Bu şekilde de duktal ve alveolar epitelyumun proliferasyonunu ve farklılaşmasını sağlamaktadır. Aktif ERBB reseptörleri MAPK kaskadını indüklemektedir bu da ER α 'nın proliferasyonunu ve AP1 transkripsiyon faktörünün sentezlenip fosforile olmasına neden olmaktadır.

İnsanda ERBB ailesi ismini ilk olarak karakterize edilen retroviral v-erbB onkogeninden almaktadır. Bu ailede yapısal olarak birbirleri ile ilişkili dört membran reseptörü yer almaktadır: ERBB1-ERBB4 (HER1-HER4 olarak da adlandırılmaktadır) (Çizelge 1.1) (Holbro et al, 2003).

Çizelge 1.1 İnsanda ERBB gen ailesi

Gen	Diğer adı	Kromozomal lokasyonu	Ligandları*	Özellik
EGFR	ERBB1/ HER1	7p12	EGF, TGF α , Amphiregulin, HB-EGF, betaselülin	
ERBB2	HER2/ NEU/ p185 ^{HER}	17q11.2-q12	yok	Diğer aile üyelerini heterodimerizasyon ortağı
ERBB3	HER3	12q13	NRG1, NRG2	Tirozin kinaz aktivitesi yok
ERBB4	HER4	2q33.3-q34	NRG1, NRG2 NRG3, NRG4 Betaselülin HB-EGF	

*EGF: epidermal büyüme faktörü, TGF: transformasyon büyüme faktörü, NRG: nörogulin.

Her reseptörde yaklaşık 600 aminoasitlik ekstraselüler ligand bağlama bölgesi, 24 aminoasitlik tek geçişli helikal transmembran bölgesi ve otofosforilasyon ve otoinhibitör lupları olan >500 aminoasitlik tirozin kinaz bölgesi bulunmaktadır (Schulz, 2005).

1.1.1 Meme Kanseri

Meme kanseri dünyada kadınlarda en sık görülen habis tümörlerdendir. Ülkemiz Sağlık Bakanlığının 1999 yılı verilerine göre kadınlarda meme kanseri en çok görülen on kanser türü arasında %24,1 ile birinci sırayı almaktadır (www.saglik.gov.tr).

Çizelge.1.2 Türkiye’de kadınlarda en çok görülen on kanser türü, 1999

ORGANLAR	VAK'A	%	İNSİDANS(Yüzbinde)
Meme	2.390	24,1	7.32
Mide	693	6,99	2.12
Yumurtalık	556	5,61	1.70
Deri	684	6,9	2.10
Kolon	419	4,22	1.28
Akciğer	404	4,07	1.24
Serviks	310	3,13	0,95
Beyin	349	3,52	1.07
Kemik iliği	391	3,94	1.20
Rektum	381	3,84	1.17
Diğerleri	3342	33,69	10.24
TOPLAM	9.919	100	30.38

Ayrıca Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında yatırılarak tedavi görmüş 100 kanserli kadın hastanın 27’si meme kanseri olarak tespit edilmiştir (Cerrahi Onkoloji, 1995).

1.1.1.1 Meme Kanserinin Klinik Özellikleri

Klinik olarak meme kanserlerinin ilk belirtisi bir sertlik veya kitlenin ortaya çıkmasıdır. Çok nadir olarak memede palpabl bir kitle yokken hastalık memebaşı akıntısı ya da bölgesel lenf düğümlerinde kendini gösterebilir. Okült meme kanserleri adı verilen bu kanserler çok ender görüldüğü için meme kanserinin ilk belirtisi pratik olarak memede bir kitleden ibarettir. Bu kitlenin kıvamı, içerdiği epitelyal ve fibröz elemanların birbirine oranına göre değişir.

Meme karsinomları daha çok meme üst dış kadranında gelişir. İkinci derecede santral bölge, daha sonra üst iç kadran, onu da takiben alt kadranlar gelir. Meme kanserlerinde klasik olarak kitle sert, zor hareket ettirilebilen, elastik olmayan kolayca kesilebilen bir nodüldür. Kesit yüzünde opak, kuru bir yüzey mevcut olup bağ dokunun translusan çizgilerin yanında ufak sarımsı veya opak gri çizgiler bulunur. Kitleye iştirak eden epitelyal ve bağ doku miktarına göre tümörün kıvamı değişir. Tümör bağ dokudan zenginse skirö karsinomdan söz edilir. Diğer makroskopik görünümeler arasında hemoraji ve nekrozla birlikte olan opak beyaz veya pembemsi görünümde, yumuşak kıvamda medüller tümörler, mukoid veya jelatinöz papiller sınırlı intrakistik ve komedo tipleri vardır. Malign meme tümörlerinin %90'ından fazlası ya geniş veya küçük çaplı duktal sistem epitelinden gelişir. Geri kalan kısımda ise lobüler karsinomlar ve sarkomlar yer alır.

Histolojik olarak herhangi bir meme karsinomunda esas olarak adenokarsinom yapısı bulunabilir, ama bir tümörde birkaç değişik histolojik yapı da bulunabilir. Meme tümörleri makroskopik özelliklerine göre (skirö, kolloid, medüller), histolojik karakterlerine göre (adenokarsinom, papiller, sarkom), histogenezine göre (duktal, lobüler, asiner) veya aktivitesine göre (infiltratif ve noninfiltratif) olarak ayrılır (Göksel, 1991).

Meme kanserinin tanısı klinik muayene ile başlar ve biopsi ile sonuçlanır. Meme tanı metodları arasına girmiş olan mammografi, ksenografi, termografi ve ultrasonografi memede patolojik bir olay olup olmadığını gösterme bakımından yardımcı olabilirler. Bu metodlarla her ne kadar mevcut hastalığın malign mi, benign mi olduğu konusunda

ön kanılara varılabilirse de bu tanımlar hiçbir zaman kesin değildir ve meme hastalıklarında biyopsi olmaksızın kesin tanı konulamamaktadır (Göksel, 1991).

1.1.1.2 Meme Kanserinde ER, PR ve ERBB Reseptörlerinin Önemi

Meme kanserlerinin %70'i ER α bakımından pozitifdir. Bu kanserlerin yaklaşık yarısı da PR'ünü eksprese etmektedirler. PR'ü ER'ü tarafından indüklendiği için PR'ünün varlığı hem ER'ünün varlığını kanıtlar hem de onun aktif olarak çalıştığını gösterir. Meme kanserinin %5'lik bir kısmında sadece PR'ü eksprese edilir. ER β ise meme kanserinde genellikle eksprese edilmemektedir ve sıklıkla ESR2 genin promotörü hipermetiledir. Bu da ER β 'nın büyüme açısından negatif bir faktör olduğunu göstermektedir.

ER (+) meme kanserleri iyi diferensiyel olup daha yavaş büyümektedir ve ER (-) meme kanserlerine göre daha iyi prognoz göstermektedir. Bu kanserler östrojene bağılı olarak çoğaldıkları için östrojen antagonistleri kullanılarak daha başarılı tedavi yapılabilmektedir (McDonnell and Norris, 2002).

ER'ü eksprese etmeyen tümörlerde, hatta bazı ER(+) tümörlerde bile büyüme ERBB tirozin kinaz reseptörleri üzerinden gerçekleşmektedir. Bu grup kanserlerde ERBB1 ve ERBB3 ile heterodimer oluşturan ERBB2 proteinini kodlayan gen amplifiye olmuştur ve fazla eksprese olmaktadır. Bu yüzden ER (+) veya ER (-) klasifikasyonunda olduğu gibi tümörün ERBB2 (+) mi yoksa ERBB (-) olduğu da tümörün tedavisi açısından önemlidir. ERBB (+) kanserler kötü prognoza sahiptir. Diğer tirozin kinazlara karşı olduğu gibi ERBB2'ye karşı düşük moleküler ağırlıklı inhibitörler kullanılarak tedavi yapılmaktadır. Trastuzumab adı verilen monoklonal antikor özellikle ERBB2 için geliştirilmiştir ve son zamanda tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Holbro et al, 2003).

1.1.1.3. Meme Kanserinin Etiyolojisi

Meme kanserleri bayanlarda özellikle menopoz sonrası ortaya çıkmaktadır fakat son zamanlarda menopoz öncesi vakalarda da artış görülmektedir. Ortalama menopoz yaşı yaklaşık 50 dir ve menopoz hemen hemen tüm kadınlarda 45–55 yaşları arasında görülmektedir. Meme kanseri de özellikle 40–60 yaşları arasında kadınlarda en sık görülen hastalıktır (Colditz, 1998).

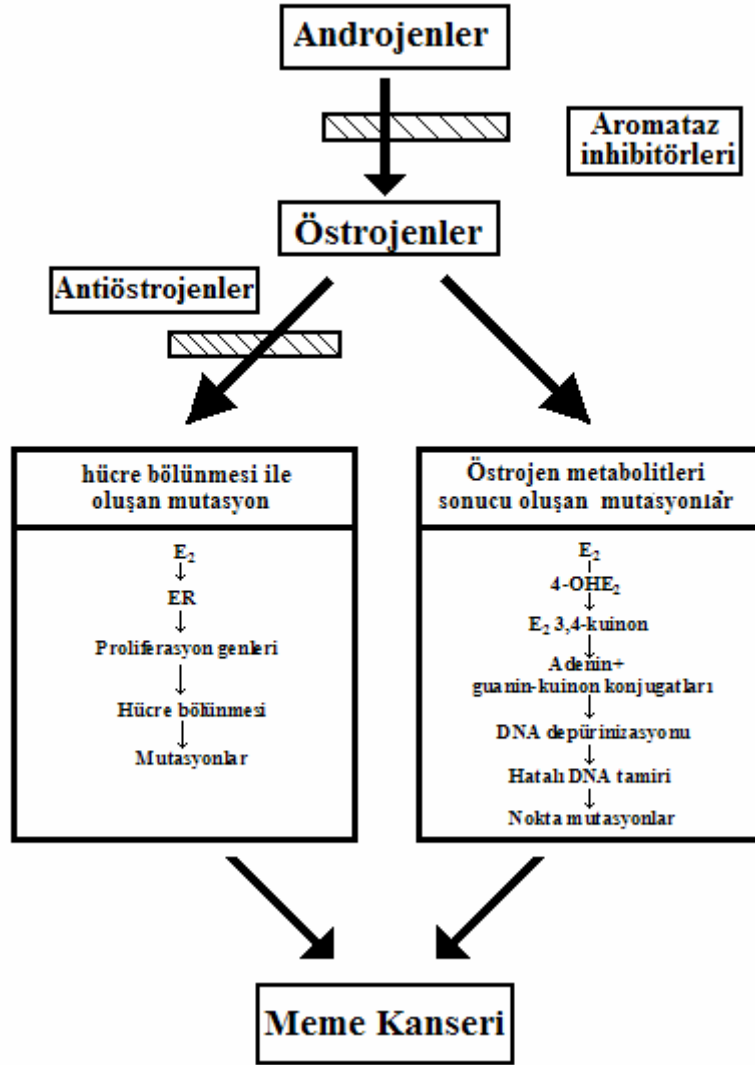
Meme kanserine neden olan faktörler arasında östrojene maruz kalma süresi, iyonizan radyasyona maruz kalma, hareketsiz yaşam tarzı, yüksek miktarda yağ içeren besinlerle beslenme, alkol, sigara ve genetik yatkınlık (BRCA1, BRCA2 ve diğer genlere bağlı olan yatkınlık) sayılabilir (Bingham et al, 2003).

Reprodaktif faktörler: Son zamanda yapılan çalışmalar endojen hormon seviyeleri ile meme kanseri arasında bağlantı olduğunu ortaya koymuştur. Östrojene uzun süre maruz kalma meme kanseri riskini artırmaktadır. Erken adet görme, geç menopoza girme, geç yaşta doğum yapma ve az sayıda doğum yapma gibi faktörler östrojene maruz kalma süresini artırmaktadır ve böylece meme kanser riskini artırmaktadır. Bu mekanizmanın altında yatan nedenler tam olarak belli değilse de buna dair bazı tahminler mevcuttur. Buna göre meme dokusunun uzun süre östrojene maruz kalması hücrelerde meydana gelebilecek mutasyonların birikmesine neden olabilir. Fakat hamilelik boyunca gelen güçlü sinyaller meme dokusunu değişime uğratmaktadır ve özellikle emzirme kesildikten sonra hücrelere apoptozisi hızlandıran sinyaller gelmektedir ve bu bir ölçüde meme dokusunun temizlenmesini sağlamaktadır (Colditz,1998).

Vücutta bulunan tüm östrojenler aromatik A halkası, C–3 pozisyonunda fenolik hidroksil grubu ve C–13 pozisyonunda metil grubu içermektedirler. Kanda iki tür östrojen mevcuttur, C–17 pozisyonunda hidroksil grubu bulunan östradiol (E2) ve bu pozisyonda keto grubu içeren östron (E1). Meme dokusunda biyolojik olarak daha aktif olan östradioldür. Östrojen ve progesteron hücrel aktivilerini reseptörlere bağlanarak gösterirler. Östradiolün östrojen reseptörüne (ER) bağlanma afinitesi daha

yüksektir. Kanserleşmiş dokularada normal dokulara göre daha fazla ER'ü bulunmaktadır (Mitrunen et al, 2003).

Östradiolün aneuploidiye ve yapısal kromozomal değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Hayvanlarda yapılan çalışmalar östradiolün karsinojen olduğunu açıkça ortaya koymuştur ve ayrıca Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşuna (IARC) göre insanlarda da karsinojen olduğuna dair yeterli kanıt mevcuttur.

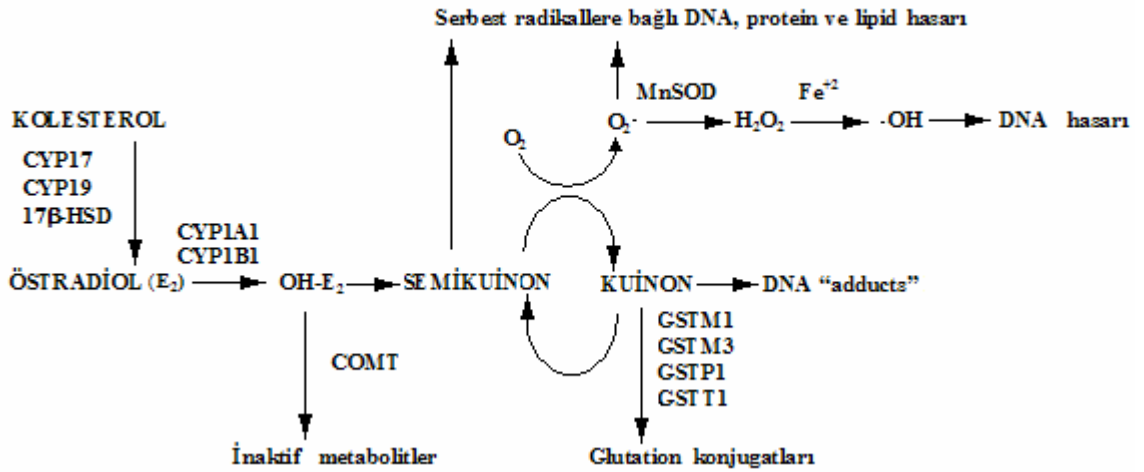


Şekil 1.2 Östrojenin meme kanserine neden olduğu iki farklı yolun şematik olarak gösterilmesi

Meme dokusunda hücre çoğalmasına neden olması da östrojenin karsinleşmedeki rolünü ortaya koymaktadır. Hücreler ne kadar fazla ve hızlı çoğalırlarsa genetik hata şansının o kadar yüksek olduğu düşünülmektedir. Normalde hücrede çift sarmal olarak bulunan DNA'nın bölünme sırasında tek zincir halinde olması DNA'da hasar meydana gelme olasılığını arttırmaktadır. Bu şekilde bir mutasyon taşıyan hücrenin de östrojen etkisiyle çoğalarak klonlar oluşturması mümkün hale gelmektedir (Şekil 1.2).

Mutasyona bağlı olmayan diğer bir mekanizma da östrojenin meydana getirdiği metabolitlerin meme dokusunda yaptığı toksik etkidir. Östrojen ve östrojen metabolitleri fenolik bileşiklerdir ve özellikle difenolik östrojen metabolitleri okside olarak semiküinoninlere dönüşmektedir, bunlar da makromoleküllerle etkileşime girmektedirler (Şekil 1.2).

Ayrıca semiküinoninler küinon redoks "cycling" denilen bir işleme neden olmaktadır ve bunun sonucunda da ortama yüksek derecede reaktif oksijen türlerinin meydana gelmesini sağlamaktadır (Şekil 1.3).



Şekil 1.3 Östrojen biyosentezinde ve metabolizmasında rol oynayan polimorfik genlerin şematik gösterilmesi

Böylece östrojen kimyasal karsinojen etkisi yapmaktadır. Yüksek konsantrasyonda östrojen içeren dokuların kanserleşme riski kişinin östrojen metabolitlerini elimine etme kapasitesi ile doğrudan bağlantılıdır (Mitrunen et al. 2003).

Eksojen östrojen: Son zamanlarda yapılan çalışmalar oral kontraseptif kullanımı ve hormon replasman tedavisinin meme kanser riskini artırdığını ortaya koymuştur. Her ikisinin kullanımı ile ilgili çelişkili bilgiler bulunmasına rağmen oral kontraseptif kullanımının %24, hormon replasman tedavisinin de %36 oranında meme kanser riski artırdığı bilinmektedir (Ross et al.,2000).

Kilo: Menopoz sonrası bayanların kanındaki östrojen yağ dokusunda bulunan androjenin östrojene dönüşmesi sonucu oluşmaktadır. Böylece menopoz sonrası kilo alan kadınlarda östrojen seviyeleri yükselmektedir, bu da meme kanser riskinin artırmaktadır. Son zamanda bel/kaça oranı ile meme kanseri arasında doğru orantı olduğu saptanmıştır (Carpenter et al, 2003).

İyonizan radyasyona maruz kalma: İyonizan radyasyona maruz kalmanın da meme kanser riskini artırdığı bulunmuştur (Dumitrescu and Cotarla, 2005).

Beslenme faktörleri: Yediğimiz besinlerde bol miktarda karsinojen ve anti-karsinojen maddeler bulunmaktadır. Bazı bileşiklerin oksijen radikallerini üreterek DNA'da hasar meydana getirebilirler. Özellikle doymamış yağ asitleri içeren besinlerle beslenmenin meme kanser riskini artırdığı ortaya konmuştur. Bol miktarda doğal antioksidantları içeren meyve ve sebzeleri bol şekilde tüketmek ise meme kanser riskini azalttığı bulunmuştur (Hanf and Gonder, 2005).

Sigara: Sigara ve meme kanseri arasındaki ilişki hakkında çelişkili bilgiler mevcuttur. Özellikle erken yaşta sigaraya başlamış ve çok sigara içenlerde meme kanseri geliştiğine dair bazı yayınlar bulunmaktadır. Diğer yandan da sigarada bulunan bazı kimyasalların anti-östrojenik etkisi olduğu düşünülmektedir. Örneğin nikotinin CYP19'u inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca sigara içicilerin daha erken menopoza girdiği bilinmektedir. Sigaranın bol miktarda oksijen radikali üretilmesine neden olarak *Mn-SOD*'i enzimini indüklediği gösterilmiştir (Schulz, 2005).

Alkol: Alkol alımının meme kanseri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Özellikle içki miktarı ve meme kanseri arasında linear bir ilişki bulunduğu saptanmıştır. Bunun nedenin östrojen seviyelerinin artması ile olabileceği veya diğer bir mekanizma da alkole bağlı olarak ROT'lerinin üretilmesi olabileceği düşünülmektedir (Hanf ve Gonder 2005).

1.1.1.3.1. Meme Kanserinde Genetik Faktörler:

Meme kanserlerinde rol oynayan genler iki sınıfta toplanabilir: 1) Yüksek meme kanser riski oluşturan yüksek geçişli (high-penetrance) genler; 2) Meme kanserinin oluşmasına neden olan düşük geçişli (low-penetrance) genler. Genel popülasyonda yüksek geçişli genlerde mutasyonların nadir görüldüğü ve bu mutasyonların özellikle ailesel meme kanserlerine neden olduğu bilinmektedir. Oysa düşük geçişli genlerdeki mutasyonların, meme kanserlerinin büyük çoğunluğunu oluşturan sporadik meme kanserlerinin oluşumunda rol aldığı düşünülmektedir (Mitrunen et al, 2003).

Ailelerde birden fazla meme kanseri vakası görüldüğünde bu ailesel meme kanseri olarak değerlendirilmektedir. BRCA1, BRCA2, ATM ve p53 genleri ailesel meme kanserlerine neden olan yüksek geçişli genlerdir. Bu genler tümör supresör genler olup erken yaşta görülen ailesel meme kanserlerinin %50'sinden ve total olarak değerlendirildiğinde meme kanserlerinin yaklaşık %5-10'dan sorumludurlar. Ayrıca bu genlerdeki mutasyonların multifokal meme kanserlerine neden olduğu bulunmuştur (Oesterreich and Fuqua, 1999).

BRCA1 ve BRCA2 proteinleri genomik stabilitenin sağlanmasında, DNA'da meydana gelen hasara karşı hücrenin verdiği cevaba, transkripsiyonel regülasyonda ve hücre çoğalmasında görev yapmaktadırlar. BRCA1 geni 17. kromozomda bulunmakta olup otozomal dominant kalıtım özelliği göstermektedir ve ailesel meme kanserlerinin %42'sinden sorumludur. BRCA2 geni ise 13. kromozomun üzerinde yer almaktadır ve kadınlarda görülen ailesel meme kanserlerinin %32'nden ve hemen hemen erkeklerde görülen tüm meme kanserinden sorumludur. BRCA1 veya BRCA2 genlerinde mutasyon taşıyan bayanlarda meme kanser riskinin %80 olduğu belirlenmiştir. Fakat

bazı toplumlarda, örneğin Finlandiya popülasyonunda, BRCA1 ve BRCA2 genlerinin sadece ailesel meme kanserlerinin %10–11 sorumlu olduğu bulunmuştur. Bu yüzden bu popülasyonda BRCA genlerinin meme kanseri ile çok fazla ilişkisi olmadığı düşünülmektedir (Rebbeck, 1999).

Epidemiyolojik çalışmalara dayanarak mutant BRCA1 taşıyıcılarında belirlenen meme ve over kanser riski, sırasıyla %85 ve %50'dir (Fearon and Cho, 1997). BRCA1 mutasyonları 35 yaş öncesi meme kanseri gelişen kadınların %10-15'nde gözlenmiştir. 40 yaş öncesi meme kanserine yakalanan Yahudi kadınlarının %20'nde BRCA1 mutasyonları gözlenmiştir (Fitzgerald et al, 1996). BRCA1 veya BRCA2'de mutasyon taşıyan bayanlardaki meme kanser riski hemen hemen aynıdır. Fakat over kanser riskinin BRCA2 taşıyıcılarında BRCA1 taşıyanlara nazaran daha azdır. BRCA2 mutasyonu taşıyan erkekler de ise meme kanser riski daha yüksektir. Aynı zamanda larinks ve prostat kanser riski de BRCA2 mutasyonlarına bağlı olarak artmaktadır (Ford et al, 1994). BRCA2 lokusunu kapsayan bölgede heterozigosite kaybının sporadik meme, pankreas, baş-boyun ve diğer bazı kanserlerde arttığı gözlenmiştir. Bu da BRCA2'ye yakın bölgede somatik olarak mutasyona uğrayan başka bir tümör süpresör genin olduğunu düşündürmektedir.

p53 mutasyonları birçok kanserde yaygın olarak görülmektedir. p53 geni 17. kromozomun p13.1 bölgesinde bulunmaktadır. Bu gen bir tümör süpresör gen olup 393 kodon içermektedir ve 53 000 Dalton büyüklüğünde bir protein kodlamaktadır. p53 mutasyonları en sık genin 175, 248 ve 273 kodonlarında meydana gelmektedir (tüm kanserlerin %12-13'nde). Mutasyonların detaylı karakterizasyonu değişik tiplerdeki kanserlerde p53 mutasyonlarının değişik yapıda olduklarını göstermektedir (Greenblatt et al, 1994).

Primer meme kanserlerinde p53 mutasyonları oldukça yaygındır ve genin büyümeyi baskılayan özelliklerini kaybettirmektedir (Shishikura et al, 1998). Meme kanserlerinin yaklaşık %20-40'nda p53 genleri mutasyona uğramıştır (Hollstein et al, 1997). Germline p53 mutasyonları taşıyan bireylerde (Li-Fraumani sendromlu bireylerde) meme kanser riski oldukça yüksektir (Malkin et al, 1990). Germline p53 mutasyonu taşıyan bireylerde 30 yaşın altındakiler için risk %50'dir, 70 yaşın üzerinde

olanlar için de %90 dır (Li et al, 1990). Germline p53 mutasyonu taşıyan 231 hasta ile yapılan bir çalışmada bu hastalarda en yaygın olarak meme kanserinin olduğu tespit edilmiştir (Velculescu and El-Deiry, 1996). BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarına bağlı olarak gelişen meme tümörlerinde p53'ün de mutasyon sıklığının oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir (Smith et al, 1999). BRCA1 mutasyonu taşıyan meme tümörlerinde p53'ün ekspresyon seviyelerinin BRCA2 mutasyonu taşıyıcıları ve BRCA mutasyonu taşımayanlara göre oldukça yüksek olduğu bulunmuştur (Armes et al, 1999). Erken yaşta ortaya çıkan meme kanserlerinin %18'de p53 mutasyonları görülmektedir ve BRCA1 mutasyonu taşıyıcılarında diğer kanserlerde sık rastlanmayan insersiyon ve delesyonlar saptanmıştır. Bunun dışında bazı çalışmalarda da 17. kromozomun kısa kolunun sporadik meme kanserlerinde en çok değişikliğe uğrayan bölge olduğu tespit edilmiştir (%45–60). Bu da p53'e bitişik olan bölgede başka bir tümör süpresörün olduğunu düşündürmektedir (Armes et al, 1999).

Son zamanda yapılan çalışmalara göre, meme tümörlerinde p53 mutasyonlarının varlığı hastaların prognozu hakkında fikir verebileceği düşünülmektedir (Stal et al, 1995; Kovach et al, 1996). Overgaard ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da hem nod pozitif hem de nod negatif hastalarda p53 mutasyonlarının oldukça yüksek oranda bulunduğu ve bunlarda hastalığın kötü seyrettiği tespit edilmiştir. Ayrıca p53 mutasyonlarının, anaplazi derecesi yüksek, ER(-) duktal karsinomlarda çok sık olarak meydana geldiği gözlenmiştir (Overgaard et al, 2000). p53 mutasyonlarının görülme sıklığı populyasyona ve tümörün evresine göre de değişiklik göstermektedir. Tümörü büyük ve hastalığı ilerlemiş olanlarda ve genç hastalarda görülme sıklığı yüksekken küçük tümöre sahip olan ve ilerlemiş yaştaki hastalarda ise mutasyon görülme sıklığı düşüktür (Sunpaweravong and Sunpaweravong, 2005). Fakat bu bilgilerin kesinleşmesi için ilave çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Ataksiya Telangiektaziya (AT) ile ilgili olan ATM genin meme kanseri oluşumunda rol oynayabileceği düşünülmektedir. ATM geni 11. kromozomun q22–23 bandında bulunmaktadır (Rodriguez et al, 1997). ATM c-Abl, DNA-PK ve p53 ile etkileşime girerek DNA tamirinde ve hücre siklusu kontrolünde rol oynamaktadır. DNA hasarı sonucu p53'ün ATM tarafından fosforile ve stabilize edildiği bulunmuştur (Banin

et al, 1998). Moleküler genotipleme uygulanan bir çalışmada ATM heterozigositesi ile meme kanseri arasında bir ilişki olduğu ortaya konmuştur ve bu çalışmaya göre meme kanser popülasyonunda ATM heterozigositesinin %6,6 olduğu tespit edilmiştir (Athma et al, 1996). Ayrıca ATM’de görülen nadir polimorfizmlerin, bazı spesifik missense mutasyonların ve protein truncating varyantların da meme kanseri riski ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Khanna and Chenevix-Trench, 2004).

Meme kanserinde rolü olabileceği düşünülen diğer bir tümör süpresör de PTEN genidir. Gen 10. Kromozomun q23 bölgesinde bulunmakta olup birçok sporadik kanserde ve kalıtsal bazı sendromlarda rolü olduğu bulunmuştur (Agrawal and Eng, 2006). Tümör süpresör etkisini apoptozise neden olarak ve hücre siklusunun G1 fazını durdurarak göstermektedir. Bu gen ürünü çift fosfataz etkisi göstererek hem lipid hem de protein substratlarını defosforile edebilmektedir. PTEN fosfatidil inositol-3-kinaz ürünü olan fosfatidilinositol-3.4.5-trifosfat (PIP3)’ı defosforile etmektedir (Agrawal and Eng, 2006). Cowden sendromlu hastaların %85’nde PTEN geni germline olarak mutasyona uğramıştır. Bu sendrom multiple hamartomalarla karakterize edilir ve bu sendromu taşıyan hastaların meme ve tiroid kanseri geliştirme riskleri oldukça yüksektir. PTEN’nin sporadik meme kanseri ile ilişkisini gösteren birçok çalışma mevcuttur fakat sonuçlar çelişkilidir. Agrawal ve Eng’in yaptıkları çalışma PTEN’deki splice variantlarının meme kanseri patolojisinde rolü olabileceğini göstermektedir. Ueda ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre ise PTEN genindeki mutasyonların sporadik meme kanseri açısından önemli bir etken olmadıkları düşünülmektedir (Ueda et al. 1998).

Ailesel vakalara karşın sporadik meme kanserlerinin daha çok düşük geçişli genlerdeki mutasyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu tümörlerin daha çok bazı genetik faktörlerin çevresel koşullarla interaksiyona girmeleri ile oluştuğuna dair birçok yayın mevcuttur.

Genelde düşük geçişli genlerin yaptığı yatkınlığın daha çok meme karsinogenezisindeki biyokimyasal veya fizyolojik mekanizmaların aydınlatılması ile ortaya çıkarılabileceği düşünülmektedir. Aday polimorfik genler östrojen ve karsinojen metabolizmasında rol oynayan enzimleri kodlayan genleri, ROT’lerini etkisiz hale

getiren enzimleri kodlayan genleri, alkol ve tek karbon metabolizmasında rol oynayan genleri ve DNA tamirinde ve hücre sinyal sisteminde görev yapan genleri içermektedir. Süstrata bağlı olarak bu enzimler bu mekanizmalarda inaktive edici veya aktive edici özellikte olabilirler. Bunların arasında en çok çalışılmış gen polimorfizimler CYP, GST, NAT, COMT, Mn-SOD, ER, PR, VDR, ADH, MTHFR, XRCC1, TNF α , Hsp70 polimorfizimleri yer almaktadır (Dumitrescu and Cotarla, 2005).

Son zamanda hem epidemiyolojik çalışmalarla hem de hücre biyolojisi çalışmaları ile östrojenin meme uterus ve over kanserlerinde önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (Service, 1998). Steroidogenezis metabolizmasında ve biyosentezinde rol alan genlerin yapısı kişiden kişiye değişebilmektedir. Bu varyasyon da kişilerin üreme sistemine bağlı kanserlere yatkınlığının farklı olmasını açıklamaktadır. Özellikle östrojenin metabolizmasını ve östrojenin intrasellular transportunu kontrol eden genlerin rolü olabileceği düşünülmektedir. Etnik gruplar arasında da genetik yapıya bağlı olarak steroid metabolizması ve transportu farklıdır. Henderson ve Feilgeson (1997) tarafından geliştirilen poligenik modele göre steroid hormon biyosentezinde ve metabolizmasında yer alan enzimleri kodlayan genlerde fonksiyonel açıdan önemli olan polimorfizimler bulunmaktadır. Bunların da meme kanserinde bireysel yatkınlığa sebep olabilecekleri sanılmaktadır. Bu genler 17 β -hidroksi steroid dehidrogenaz 2 (EDH17 β 2) geni, sitokrom p450c17 α (CYR17) ve östrojen reseptör (ER) genleridir. ER genindeki polimorfizm östrojen bağlanmasını ve bunu takiben hedef genlerin transkripsiyonunu etkileyebilmektedir (Henderson and Feigelson, 1997). Ayrıca östrojen metabolizması sırasında meydana gelen metabolik yan ürünlerin de meme kanserinde rol oynadıkları bilinmektedir (Yue et al, 2003). Bu yolla ilgili çalışılan diğer bir polimorfik gen de katekol-O-metiltransferaz (COMT) genidir. Östrojen metabolizması sırasında oluşan katekolöstrojenler vücut için toksik olan kuinon veya semikuinonlara dönüşebilmektedir. COMT genin ürünü olan katekol-O-metiltransferaz enzimi de bu yolu engelleyerek katekolöstrojenleri metiller ve karsinojenik olmayan 2- ve 4-metoksiestradiollere dönüşmelerini sağlayarak östrojenin toksik etkisini yok etmektedir. COMT proteini iki formda bulunmaktadır: sitoplazmada çözünmüş olarak bulunan 25 kDa'luk S-COMT formu ve hücre memebraına bağlı olarak bulunan 30 kDa'luk MB-COMT formu. S-

COMT meme dokusunda eksprese olurken MB-COMT beyinde eksprese olmaktadır. Her iki form aynı gen tarafından kodlanmaktadır ve gen 22. kromozomun q11.2 bandında bulunmaktadır. Polimorfik olan bu gen kodlama bölgesinde S-COMT için 108. amino asid pozisyonunda valin yerine metionin amino asidi taşımaktadır, MB-COMT’da ise aynı amino asid değişimi 158. amino asitte bulunur. Metionin taşıyan ve düşük enzim aktivitesine neden olan form L formu olarak adlandırılmıştır, valin taşıyan ve yüksek enzim aktivitesine sahip formu ise H formu olarak adlandırılmıştır (Weinshilboum and Raymond, 1977; Lashman et al, 1996). L formunda enzim aktivitesinin 4 kat düştüğü tespit edilmiştir bundan dolayı da LL (Met108Met) genotipini taşıyan kadınların yüksek meme kanser riski taşıdığı bulunmuştur (Thompson et al, 1998; Huang et al, 1999; Yim et al, 2001, Sazci et al, 2004).

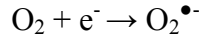
Tek karbon metabolizmasında rol oynayan genlerin de meme kanserindeki rolleri incelenmiştir. 5,10-metilenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) geni DNA sentezi ve DNA metilasyon paternlerinin korunması için önemli bir enzimi kodlamaktadır. Bu gende iki fonksiyonel polimorfizim bulunmuştur: C677T ve A1298C polimorfizimleri. Bunlardan özellikle C677T polimorfizmi düşük enzim aktivitesine neden olmaktadır ve mutant formu (TT genotipi) taşıyan bayanların meme kanserine yakalanma risklerinin yüksek olduğu bulunmuştur (Ergül et al, 2003; Deligezer et al, 2005; Kalemi et al, 2005).

Yapılan bu çalışmalar meme kanseri mekanizması ile ilgili bazı sorulara cevap verse de bununla ilgili fenotipik ve genotipik birçok özelliğin çalışılması gerektiği açıktır.

1.2. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ VE REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

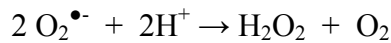
Serbest radikaller son orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan molekül veya molekül fragmanları olarak tanımlanabilir. Bir molekülde eşleşmemiş elektron bulunması o molekülü yüksek derecede reaktif hale getirmektedir (Akkuş, 1995).

Metabolik prosesler sonucu veya fiziksel olarak radyasyona maruz kalma sonucu oluşan oksijen aktifleşmesini takiben meydana gelen superoksid aniyonu primer ROT'ü olarak değerlendirilmektedir.



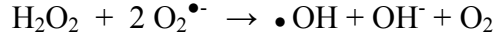
Daha sonra superoksid radikali diğer moleküllerle etkileşerek sekonder ROT'nin oluşumuna neden olmaktadır. Superoksid radikali polipeptidler, şeker veya nukleik asitlerle doğrudan etkileşime girmemekle beraber hidrojen peroksid kaynağı ve geçiş metalleri indirgeyicisi olması bakımından önemlidir. Superoksid, düşük pH değerlerinde daha reaktif olup hidroksil radikalini oluşturmaktadır. Hidroksil radikali organik bileşiklerle etkileşime giren oldukça güçlü bir oksidanttır. Fakat çok stabil bir radikal olmayıp çok küçük çapta etkisini gösterebilmektedir, sadece oluştuğu yerde hasar vermektedir. Oysa superoksid anyonu kolaylıkla difuse olabildiği için daha uzak mesafelere gidebilmektedir ve hidroksil radikaline göre daha fazla hasar verme olasılığı vardır (Fridovich, 1998).

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden 2 elektron alması sonucu peroksit oluşur. Ancak biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin üretimi superoksidin dismutasyonu ile olur. İki superoksid molekülü iki proton alarak hidrojen peroksid ve moleküler oksijeni oluştururlar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir.

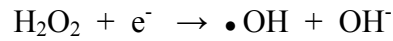
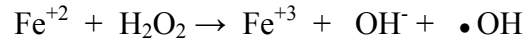


Bu dismutasyon ya spontandır ya da superoksid dismutaz tarafından katalizlenir. Hidrojen peroksid bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü superoksid ile reaksiyona

girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir.



Bu reaksiyon katalizörsüz oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyona Fenton reaksiyonu adı verilir.



Görüldüğü gibi superoksit, hem hidrojen peroksit kaynağı hem de geçiş metalleri indirgeyicisidir. İndirgenmiş geçiş metalleri (demir ve bakır gibi) okside şekillerine göre hidrojen peroksitle daha reaktiftirler.

Hidroksil radikali hidrojen peroksitin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesi ile (Fenton reaksiyonu ile) meydana gelir. Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur ve son derece reaktif bir oksidanttır (Akkuş, 1995).

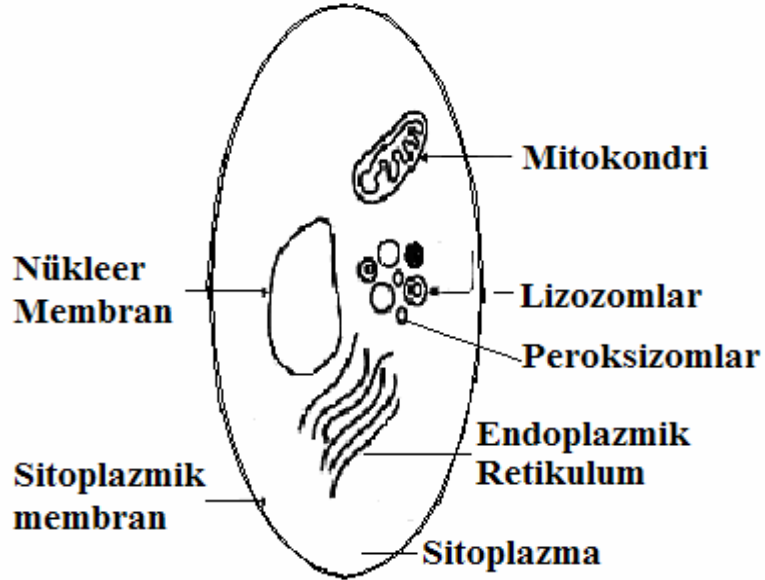
ROT'leri biyolojik sistemlerde aynı zamanda hem yararlı hem de zararlı olabilmektedirler. Optimal konsantrasyonlarda ROT'leri yararlı etki gösterirler ve oksidatif stresin azaltılması, patojen atağa, hücre sel sinyal sistemlerinde sinyal transdüksiyonu, gen ekspresyonu, mitojenik cevap aktivasyonunu gibi normal fizyolojik olaylarda önemli görevler almaktadırlar. Buna karşın yüksek konsantrasyonlarda nükleik asitler, lipidler, proteinler ve hücre membranları gibi önemli hücre komponentleri ile etkileşerek yaşayan organizmaya zarar verebilmektedirler. Biyolojik sistemler her ne kadar bu bileşiklerin zararlı etkilerine karşı koruma sistemleri geliştirmiş olsalar da radikallere bağlı biyolojik molekül hasarının kanser, arterosklerosis, artrit, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın meydana gelmesinde önemli rolü olduğu bilinmektedir. Tüm ROT'nin DNA bazları ve DNA'nın deoksiriboksil iskeleti ile etkileşime girdikleri gösterilmiştir. Oksijen radikalleri aynı zamanda lipid veya proteinleri de okside ederek DNA'ya zarar verecek metabolitler meydana getirebilmektedirler. Bazı oksidatif DNA lezyonlarının promotajenik olduğu

bulunmuştur ve bu lezyonların kanserleşmeye zemin hazırladığı bilinmektedir (Valko et al, 2004).

1.2.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı

ROT'lerinin kaynağı endojenik ve eksojenik olabilmektedir. Potansiyel endojenik kaynaklar mitokondri, sitokrom P450 metabolizması, peroksizomlar ve inflamatoar hücre aktivasyonu olabilmektedir (Şekil1.4).

Serbest radikaller: UV veya X ışınlarına maruz kalmanın sonucu olarak; metaller tarafından katalizlenen reaksiyon ürünleri olarak; atmosferde var olan toksik maddelerin; inflamasyon sırasında neutrofiller ve makrofajlardan ürünü olarak; mitokondride yapılan elektron transport reaksiyonları ürünü olarak ortaya çıkabilmektedirler (Valko et al, 2006).



Şekil 1.4 Hücrenin değişik komponentlerinde serbest radikal oluşumu

ROT'lerinin en fazla üretildiği yer mitokondridir. Mitokondri hücrenin hayatını sürdürebilmesi için gereken enerjiyi üreten en önemli organellerden biri olmakla beraber

serbest radikallerin de üretildiği, bu serbest radikallerin regülatör ve toksik etkilerinin düzenlendiği bir merkezdir. Ayrıca son zamanda yapılan çalışmalarda mitokondrinin özellikle hücre siklusunu, bölünmesini ve apoptosisi de düzenleyen bir organel olduğu ortaya konmuştur (Inoue et al, 2003).

Ubisemikuinon mitokondrial membranda en önemli oksijen redüktantıdır. Bu proteinin mitokondride dakikada yaklaşık 2–3 nmol superoksid üretmektedir ve proteinin yaygın olarak görülmesi de yaşayan organizmalarda superoksidin en önemli fizyolojik kaynaklarından biri olduğunu göstermektedir. En fazla serbest radikal üretimi mitokondride olduğu için mitokondrinin iç ve dış zarında GSH, SOD ve glutation peroksidaz gibi oksidatif stresi azaltan enzimlerden bol miktarda bulunmaktadır (Inoue et al, 2003).

Mitokondrinin dışında ksantin oksidaz enzimi de serbest radikallerin önemli kaynaklarından biridir. Bu enzim molibdenyum demir-sulfür flavin içeren hidroksilaz grubu enzimlerinin üyesi olup hipoksantini ksantine ksantini de ürik aside dönüştürmektedir. Bu reaksiyonun ilk adımında superoksid radikali ikinci aşamasında da hidrojen peroksid açığa çıkmaktadır (Valko et al, 2006).

Bunlara ilaveten nötrofiller, eozinofiller ve makrofajlar da hücre içi reaktif oksijen türlerinin kaynağıdır. Aktive olmuş makrofajlar oksijen alımını artırmaktadırlar ve bunun sonucunda superoksid anyonu, nitrik oksid ve hidrojen peroksid açığa çıkmaktadır. Sitokrom P450 katalitik siklus sırasında da özellikle superoksid anyonu ve hidrojen peroksid açığa çıkmaktadır (Klaunig and Kamendulis, 2004).

Diğer bir reaktif oksijen kaynağını da mikrozoimler ve peroksizomlar oluşturmaktadırlar. Mikrozoimler *in vivo* hiperoksi bölgelerinde H₂O₂ %80'ninden sorumludurlar. Peroksizomların fizyolojik şartlarda sadece H₂O₂ ürettiği bilinmektedir. Karaciğer, peroksizom kaynaklı H₂O₂ üretiminin primer organı olsa da peroksizom içeren diğer organlar da H₂O₂ maruz kalmaktadırlar (Fahl et al, 1984).

Eksojen reaktif oksijen türlerinin kaynağını çevresel ajanlar oluşturmaktadır. Bu çevresel ajanlar direkt olarak ROT'ni oluşturdukları gibi indirekt olarak da ROT'in oluşumuna neden olabilmektedirler. Birçok ksenobiotiğin kullanımı ile de ROT oluşumu tetiklenmektedir. Bunlar klorin bileşikleri, metal (redoks ve redoks olmayan) iyonları,

radiyasyonu ve barbituratları içermektedirler. Örneğin 2-butoksietanolün ROT'ni indirekt olarak ürettiği ve farelerde kanser meydana getirdiği bilinmektedir (Valko et al, 2006).

1.2.1.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Kanserleşme Mekanizmaları

Son 20 yıldır reaktif oksijen türleri olarak adlandırılan oksijen kökenli serbest radikallerin organizmaya etkisi yoğun bir şekilde incelenmektedir. Oksidatif stresin tam olarak nasıl bir mekanizmayla kanserleşmeye neden olduğu bilinmemekle beraber buna dair en azından iki mekanizma ortaya atılmıştır.

Birincisinde oksidatif hasarın gen ekspresyonunu değiştirerek kanserleşmeye neden olabileceği düşünülmektedir. Aktif oksijen türlerinin protein kinaz ve poly (ADP ribolizasyon) yolaklarını etkileyerek sinyal transdüksiyonunu etkileyebildikleri bilinmektedir. Bu da daha sonra hücre çoğalması ve tümör büyümesi için gereken önemli genlerin ekspresyonuna neden olabilmektedir (Cerutti and Trump, 1991). Son zamanda çıkan bir çalışmada serbest radikallerin ras sinyal transdüksiyon yolu ile etki ettikleri gösterilmiştir (Lander et al, 1995).

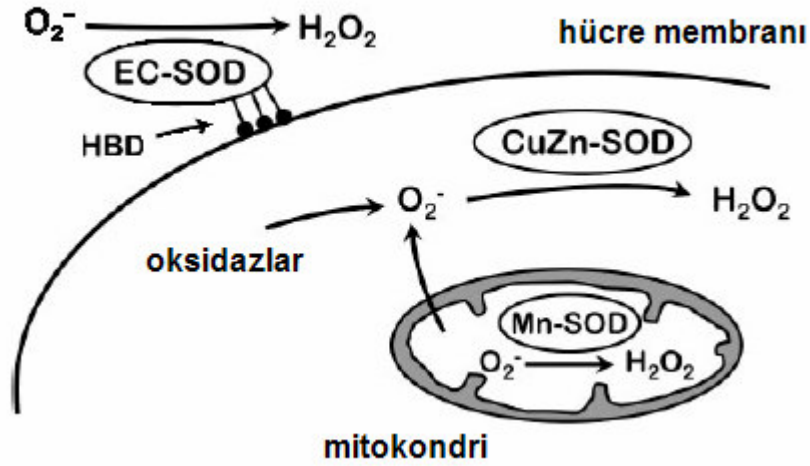
İkinci mekanizma ise serbest radikallerin bazı mutasyonlara veya kromozomal yeniden düzenlenmelere neden olarak kanserleşmeye neden olmalarıdır. Oksidatif DNA hasarı geniş ölçüde mutasyonlara neden olarak DNA replikasyonunu durdurabilir ve sitotoksite meydana getirebilir. Mutasyonlar, DNA'nın yanlış onarımı veya yanlış replikasyonundan kaynaklanırken geniş kromozomal düzenlemeler tek veya çift zincir kırıklarının yanlış tamirinden kaynaklanabilmektedir. Oksidantların kanserleşmeye neden olmalarının diğer bir sebebi de bazı onkogen veya tumor supresör genlerde baz değişimlerine sebep olarak bu genlerde mutasyon meydana getirmeleri olabilir. Hidroksil radikallerinin K-ras ve C-Raf-1 gibi bazı onkogenleri aktive etikleri gösterilmiştir. Aktivasyon özellikle genlerin CpG adacıklarında nokta mutasyonları oluşturarak veya genlerin N-terminal bölgelerinde delesyon meydana getirerek olmaktadır (Jackson, 1994). CpG dinükleotidlerindeki tek baz nokta mutasyonları p53 ve retinoblastoma gibi bazı tümör supressörleri de inaktif hale getirebilmektedir (Nigro

et al, 1989). Ayrıca hidroksil radikali ataklarından dolayı hücreler hücre siklusunu G1’de durduramadıkları için DNA’yı tamir etme kapasiteleri düşer. Bu replikasyon hatalarındaki artış da onkogen aktivasyonu veya tümör süpressör inaktivasyonuna neden olarak kanserleşmeye zemin hazırlamaktadır. Serbest radikallere bağlı sitotoksosite normal hücre popülasyonlarının oluşumunu engelleyerek daha dirençli klonal hücrelerin çoğalmasına da izin vererek maliniteye neden olabilmektedir (Jackson, 1994).

1.2.2. Biyolojik Sistemde ROT’ne Karşı Koruma Sağlayan Antioksidant Sistemler

Organizmaların ROT’ların hasar potansiyellerini azaltan antioksidant sistemleri mevcuttur. Bunlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidantlar olarak sınıflandırılabilirler. Enzimatik olmayan antioksidantlar C vitamini, E vitamini, karotenoidler gibi organik bileşiklerinin yanı sıra selenyum gibi mineralleri de içermektedirler. Besinlerle aldığımız bu antioksidantlar serbest radikallerin hücreye zarar vermesini engelleyerek kişilerin kansere, kalp hastalıklarına ve felce yakalanma risklerini azaltmaktadırlar. En önemli antioksidant enzimler superoksit dismutaz, glutation peroksidaz, katalaz ve tioredoksin reduktazdır. Bu enzimler hücrede üretilmektedirler ve besin yoluyla alınamazlar (Valko et al, 2004).

Superoksit dismutaz enzimleri hücrelerin ROT’lerine karşı koruma sağlayan en önemli enzimatik antioksidant sistemleri oluşturmaktadırlar. Bu enzimeler katalitik bölgelerinin merkezinde redoks metalleri içerirler ve superoksit radikalini hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürmektedirler. Üç farklı isoform karakterize edilmiştir: mitokondride bulunan ve manganez içeren SOD (Mn-SOD, SOD-2), sitozolde bulunan ve bakır/çinko içeren SOD (CuZnSOD, SOD-1) ve ekstrasellüler bölgede bulunan ve yine bakır/çinko içeren SOD (ecSOD, SOD-3) (Şekil1.5) (Faraci, 2003; Faraci and Didion, 2004).



Şekil 1.5 Süperoksit dismutaz enzimleri ve hücresel lokalizasyonları.

Glutation peroksidaz (GPX) selenyum içeren bir antioxidant enzim olup hidrojen peroksidi suya ve lipid peroksidleri de lipid alkollerine dönüştürmektedir. Daha sonra da glutasyonu glutation disulfide okside etmektedir. GPX etkin olarak görev yapmadığında veya glutation seviyeleri düşük olduğunda, hidrojen peroksid ve lipid peroksidleri detoksifiye edilememektedir ve Fe^{2+} gibi transisyon metallerin varlığında H_2O_2 hidroksil peroksidlerine, lipid peroksidleri de lipid peroksil radikallerine dönüşmektedir. GPX/glutation sistemlerinin düşük seviyeli oksidatif strese önemli rolleri olduğu düşünülmektedir (Wassmann et al, 2004).

Katalaz intrasellüler antioxidant enzimi olup genellikle hücresel peroksisomlarda bazen de sitozolde bulunmaktadır ve hidrojen peroksidi iki aşamalı bir reaksiyon ile suya ve moleküler hidrojene dönüştürmektedir. Katalaz hidrojen peroksidi etkisiz hale getirerek indirekt olarak SOD tarafından hidrojen perokside dönüştürülen superoksid radikalini detoksifiye etmektedir. Enzimin aynı zamanda peroksidaz aktivitesi de vardır. Katalaz yüksek seviyedeki oksidatif strese karşı etkili olup hücre içerisinde oluşan hidrojen perokside karşı etkilidir. Bu enzim özellikle hücrede glutation seviyeleri azsa

hidrojen peroksidin etkisiz hale getirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Wassmann et al, 2004).

Tioredoksin reduktaz da tirole bağlı hücresel reduksiyon prosesinde görev yapmaktadır. Enzim indirgenmiş tioredoksini rejenere edip direkt olarak lipid hidrojenperoksidlerini indirgemektedir. Ayrıca tioredoksinin MnSOD ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir. Tioredoksin sistemlerin aynı zamanda oksidatif stresin etkisiyle inaktif hale gelmiş proteinleri de etkili bir şekilde rejenere ettiği ortaya konmuştur (Wassmann et al, 2004).

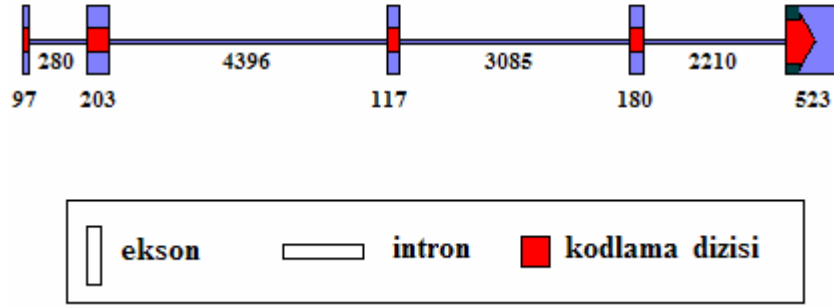
1.2.2.1. Mn-SOD Genin Yapısı ve Fonksiyonu

Gen fare-insan hibritleri kullanılarak 6. kromozom üzerinde localize edilmiştir. *In situ* hibridizasyon ve somatik hücre hibritlemeleri yardımıyla gen 6 kromozomun q25 bandında sublokalize edilmiştir. Gen 5 ekson ve 4 introndan oluşmaktadır (Şekil1.6). Genin upstream bölgesinde TATA ve CAAT kutusu bulunmamaktadır. Fakat bu gen ailesinin diğer üyelerinde de olduğu gibi CpG’ce zengin bölgeler mevcuttur. Bu “housekeeping” gen özellikleri ile uyum göstermektedir (Jones et al,1988). İnsan ve fare SOD genleri NF-κB transkripsiyonu regule edici elementleri içermektedirler. Bu element insan SOD genin 3’ bölgesinde bulunurken fare genlerinde ise genin 5’ bölgesinde bulunur (Wan et al, 1994).

Mn-SOD birçok hücre tipinde ve dokuda yüksek seviyede eksprese edilmesine rağmen transkripsiyonu bir çok intrasellüler ve çevresel etmenler tarafından kontrol edilmektedir. Translasyon başlama bölgesinin 74 bç ilerisinde transkripsiyon başlama bölgesi bulunmuştur. Bu bölgeye de CpG’ce zengin (%78) olan ve Sp-1 ve AP-2 konsensus dizileri içeren promotör bölge öncülük etmektedir. Gende SP1, AP2, and NF-κB konsensus dizilerin bulunması bu potansiyel regülator elementlerin Mn-SOD gen ekspresyonunda önemli rolleri olabileceğini ortaya koymaktadır (Wan et al, 1994). SP1 ve AP-2 proteinlerinin Mn-SOD geni ekspresyonunun üzerine zıt etkisi bulunmaktadır, Sp-1 transkripsiyonu pozitif etkilerken AP-2 ise Mn-SOD promotörünü aktif olarak baskılamaktadır (Zelko et al, 2002).

SOD2

Mn-SOD (insan)



Şekil 1.6 Mn-SOD gen yapısının şematik olarak gösterimi

Mn-SOD transkripsiyonu etkileyen bir çok bileşik bulunmaktadır. İnterleukin (IL)-1, IL-4, IL-6 gibi sitokinler, TNF- α , lipopolisakkarid (LPS) ve IFN- γ Mn-SOD'yi değişik dokularda aktive eden potansiyel aktivatörlerdir. Sitokinlere cevap veren SOD enhansırı 2. intronun 236.bç'nde bulunmaktadır. Ayrıca bu bölge NF- κ B, C/EBP ve NF-1 transkripsiyon faktörlerini de bağlayabilmektedir. TPA gibi protein kinaz C'yi aktifleştiren ajanlar SOD2 ekspresyonunu CREB-1/ATF-1 üzerinden etkilemektedirler. Mikrotubulleri aktive eden vinblastin, taxol ve vinkristin gibi antikanser ilaçların da SOD2 ekspresyonunu protein kinaz C üzerinden indükledikleri belirlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlardaki Manganez iyonların vücuda toksik etki yaptığı halde meme kanserinde SOD2 ekspresyonunu artırdığı bulunmuştur (Kim et al, 1999; Das et al,1998).

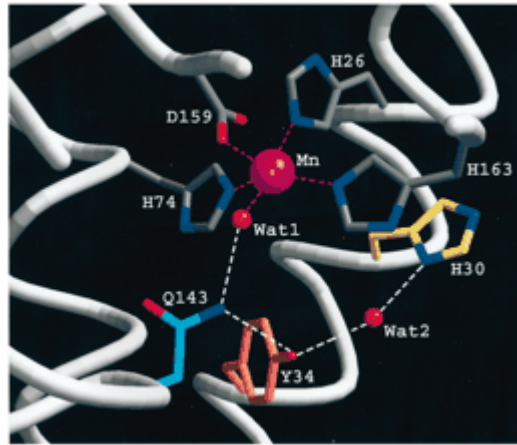
SOD2'nin bazı kanserlerde intronik bölgelerin metilasyonundan dolayı ekspresyonun düştüğü ve bu dokularda AP2 transkripsiyon faktörünün seviyelerinin yüksek olduğu gösterilmiştir (Zelko et al, 2002).

1.2.2.1.1. Mn-SOD Proteini

Superoksid dismutaz enzimi ilk olarak 1968 yılında McCord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır. SOD1 sitoplazmada, nuklear kompartmanlarda ve lenfositlerde bulunup moleküler ağırlığı 32 bin Dalton civarındadır. SOD3 enzimi ise yeni bulunmuş olup bu ailenin en az karakterize edilmiş üyesidir. Protein yapısı homotetradimer olup ağırlığı yaklaşık 135 bin Dalton'dur ve yüksek heparin afinitesi mevcuttur (Çizelge 1.3) (Zelko et al, 2002).

Çizelge 1.3 Superoksid dismutaz enzimlerinin protein yapıları, kullandıkları metaller, moleküler ağırlıkları ve genlerinin kromozomal lokalizasyonları

SOD	Protein yapısı	Metaller	M. Ağırlığı (kDa)	Kromozomal lokalizasyonu
CuZnSOD	Homodimer	Cu ve Zn	32	21q22
MnSOD	Homotetramer	Mn	86-88	6q25
ECSOD	Homotetramer	Cu ve Zn	135	4q21



Şekil 1.7 İnsan Mn-SOD proteinin aktif bölgesini içeren monomerik kristal yapı

SOD3'ün ekspresyonu sadece bazı hücre tipleri ile sınırlandırılmıştır. Özellikle plazmada, lenflerde veya serebrospinal sıvıda eksprese olmaktadır. Üçüncü SOD izoformu ise kofaktör olarak Mn (Mn-SOD) içermektedir ve mitokondride lokalize olmuştur. İnsan Mn-SOD enzimi homotetramer yapıda olup 22-kDalton'luk her monomeri aktif bölgesinde bir manganez atomu bulundurmaktadır. Metal üç histidin molekülü ve bir monodentat aspartat molekülü tarafından koordine edilir ve tek çözülmüş molekül sapsmış trigonal bipiramidal geometri göstermektedir. (Davis et al, 2004)

1.2.2.2. *Mn*-SOD Enziminin ve *Mn*-SOD Genin Ala-9Val Polimorfizminin Hastalıklarla İlişkisi

Mn-SOD hücre yaşamı için ne kadar önemli olduğunu bu gen bakımından homozigot mutant olan neonatal farelerin ölümü ile gösterilmiştir. Bu enzimi sadece %50 eksprese eden farelerin oksidatif strese aşırı duyarlı oldukları ve artan reaktif oksijen türleri sonucu mitokondriyal disfonksiyon gösterdikleri bulunmuştur (Lebovitz et al, 1996).

Sitokin uygulaması, ultraviyole ışık, radyasyon, bazı tumörler, amiyotrofik lateral sklerozis ve iskemi/reperfüzyon sonucu oluşan pro-oksidantlara karşı *Mn*-SOD'nin koruyucu rol oynadığı birçok çalışmada gösterilmiştir. *Mn*-SOD genin yüksek seviyedeki ekspresyonun pro-apoptotik stimulusa ve iskemi sonucu oluşan hasara karşı koruyucu olduğu saptanmıştır. Birçok çalışmada kanser, yaşlanma, progeria, astım ve transplant reddi gibi hatalıklarda *Mn*-SOD aktivitesinin düşük olduğu gösterilmiştir. Bu aktivite kaybının moleküler biyokimyasal düzeyde tam olarak nasıl olduğu henüz bilinmemektedir. Muhtemelen bu inaktivasyonda *Mn*-SOD gen ekspresyonu veya diğer bozukluklar rol oynamaktadır. Son zamanda yapılan çalışmalar *Mn*-SOD'nin post transkripsiyonel değişiminin bu aktivasyon kaybında rolü olabileceğini göstermiştir. Macmillan-Crow (2001) ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *Mn*-SOD'nin insan böbrek allograftlarının redidinde ve pankreatik duktal adenokarsinomlarında tirozin kısımlarından nitratlanarak inaktive edildiğini göstermişlerdir. Tirozinin nitratlanması ve

MnSOD inaktivasyonu superoksit seviyesinde artışlara yol açtığı gibi mitokondrideki ONOO- seviyelerini de yükselterek burdaki önemli proteinlerin nitratlanarak inaktif hale gelmelerine de neden olmaktadır. Bu durum da mitokondride fonksiyon bozukluğuna, bunu takiben de hücre ölümüne sebebiyet vermektedir (Macmillan-Crow et al, 2001).

Hutchinson-Gilford Progeria sendromu (progeria) insan hayatının ilk 10 yılında meydana gelen erken yaşlanma ile karakterize edilir. Progeria hastaları aşırı derecede yaşlanmış bir görünüme sahip olmanın yanında büyüme geriliği, aterosklerozis kardiovasküler hastalıklar gibi birçok hastalık belirtisi göstermektedirler. Yan ve arkadaşları (1999) normal kişilere ve progeria hastalarına ait hücrelerde *Mn-SOD* protein seviyelerini ölçmüşlerdir progeretik hücrelerde *Mn-SOD* protein seviyelerinin normallere göre düşük olduğunu bulmuşlardır (Yan et al,1999).

İnsan *Mn-SOD* geni için iki polimorfik yapı belirlenmiştir: 339. nukleotitte meydana gelen C'nin T'ye dönüşmesi sonucu oluşan Ile58Thr polimorfizmi ile 1183. nukleotitte meydana gelen yine C'nin T'ne dönüşmesi sonucu oluşan Ala-9Val polimorfizmi. Farklı alleller tarafından kodlanan proteinlerin aktivitelerinde de farklılık olduğu gösterilmiştir. Ile58Thr amino asit değişimi enzimin tetramerik stabilitesini etkileyerek enzimatik aktiviteyi düşürmektedir (Zhang et al, 1999). Oysa Ala/Val değişimi proteinin mitokondriyel hedef dizisinde meydana gelmektedir ve enzimin aktivitesinden çok enzimin mitokondriye transfer edilmesinde sorun yaratmaktadır (Grasbon-Frodl et al, 1999). Ayrıca SOD2 genin proksimal promotöründe üç tane heterozigot mutasyon bulunmuştur ve bu mutasyonların düşük transkripsiyon aktivitesi oluşturdukları gösterilmiştir (Xu et al, 1999).

Ala-9-Val polimorfizminin Parkinson hastalığı, ailesel olmayan idiopatik kardiyomyopati, romatoid artrit (RA), şizofreni, astım, motor nöron hastalıkları, Parkinson hastalığı, amiyotrofik lateral sklerozis (ALS) gibi nonkanser hastalıklarda ve meme kanseri, mide kanseri, kolon kanseri, akciğer kanseri gibi çeşitli kanserlerde hastalıklarla ilişkisi olup olmadığı incelenmiştir. Hemen hemen her hastalık grubunda yapılan çalışmaların sonuçları çelişkilidir. Bunun nedenlerinden biri Ala allelinin oldukça geniş etnik varyasyonunun olmasıdır. Örneğin Japonya populasyonunda ala allel dağılımı 0.14 iken Hispanik'lerde bu 0.62'dir (Çizelge1.4).

Motor Nöron Hastalığı (MND) beyinin motor korteksi, beyin kökü ve spinal kortta geriye dönüşümsüz olarak meydana gelen nöron kaybı ile karakterize edilen ölümcül bir hastalıktır. Semptomların başlangıç bölgesine ve hastalığın belirtilerine göre genelde klasik ‘Charkot-type’ amiyotrofik lateral sklerozis (ALS), progresif bulbar palsy (PBP) ve progresif spinal maskular atrofi (PMA) gibi alt tiplere ayrılmaktadır (van Landeghem et al, 1999). MND hastalığında SOD gen mutasyonlarının rolünü araştıran birçok çalışma yapılmıştır. Çalışmalar bu genlerdeki mutasyonların MND hastalığı ile ilişkili olduğunu göstermiştir ve bundan dolayı bu hastalığı taşıyan kişilerde, en azından bazılarında, serbest radikal homeostazisin bozuk olabileceğini ortaya koymuşlardır . Andersen et al (1997) bu hastalığın Cu/Zn-SOD genindeki mutasyonlarla ilişkili olduğu gösterilmişlerdir (Andersen et al, 1997). Van Landeghem ve arkadaşları ise MND hastaları ve kontroller arasındaki *Mn*-SOD genotiplerinin anlamlı derecede farklılık gösterdiklerini ortaya koymuşlardır (P = 0.025). Özellikle de erkek hastaların genotipleri ile dişi hastaların genotipleri arasında anlamlı farklılık bulmuşlardır (P = 0.009). Ala alleli bakımından homozigot olan bireylerin MND açısından yüksek risk taşıdıkları gözlenmiştir (OR= 2,9; 95% CI = 1,3–6,6). Özellikle sadece bayan hastalar analize alındığında bu riskin daha da yüksek olduğu gözlenmiştir (OR= 5.0; 95% CI =1.8–14.0). Klasik amyotrofik lateral sklerozis için ise OR 3,8 (95% CI=1.3–10.0) olarak bulunmuştur, sadece bayanlar için OR 5.5 (95% CI= 1.5–19.9) olarak hesaplanmıştır. (van Landeghem et al, 1999). Diğer bazı yayınlarda ise *Mn*-SOD Ala–9Val polimorfizminin ALS’de rolü olmadığını bulunmuştur (Parboosingh et al, 1995; Tomkins et al, 2001).

Parkinson hastaları substantia nigra (SN)’da kompleks I aktivitesinin düşük olması ile karakterize edilirler (Janetzky et al, 1994). Bu hastalarda ayrıca kaslarda fibroblastlarda ve plaketlerde enzim aktivitesinin düşük olduğu bulunmuştur (Haas et al, 1995). *Mn*-SOD Ala–9Val polimorfizminin bu hastalıkla olan ilgisini araştıran bazı çalışmalar mevcuttur. Shimoda-Matsubayashi ve arkadaşlarının (1996) yaptıkları çalışmada Japonyadaki Parkinson hastalarında val/val genotipinin daha sık görüldüğünü bulmuşlardır (Shimoda-Matsubayashi et al, 1996). Fakat Almanya’dan çıkan bir çalışmada *Mn*-SOD Ala–9-Val polimorfizminin bu hastalıkla ilişkili olmadığı ortaya konmuştur (Grasbon-Frodl

et al, 1999) Bu bulguyu destekleyen başka çalışmalar da mevcuttur (Farin et al, 2001; Parboosingh et al, 1995).

Şizofreni genç erişkin bireylerde gelişmektedir. Hastalık daha önce normal olan bu bireylerin daha sonra halüsünasyon, psikotik semptomlar, aşırı derecede emosiyonel cevap, karmaşık konsantrasyon ve düşünceler, sapkın davranışlar gibi semptomlar geliştirmeleri ile karakterize edilir (Andreasen, 1995). ROT'nin şizofrenide rol oynadıklarına dair bilgiler spekülatif olsa da nöropatolojik değişimlerin serbest radikallerin veya ROT'nin etkisi ile olabildiğini gösteren bulgular mevcuttur (Mahadic and Mukherjee, 1996). Ayrıca antioksidant enzimlerin şizofreni hastalarındaki aktiviteleri ile ilgili bilgiler de çelişkilidir. *Mn*-SOD enzim aktivitesini şizofrenin patofizyolojisi ile ilgili olduğunu gösteren yayınlar bulunmaktadır (Akyol et al, 2002). *Mn*-SOD Ala-9Val polimorfizminin şizofreni ile olan ilişkisi inceleyen yayınlar da mevcuttur. Akyol ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada şizofreni hastaları ile kontrollere ait genotip dağılımları arasında anlamlı farklılık saptanmıştır. Şizofreni hastalarında genotipik dağılım %9.2 AA, %69.3 AV ve %21.6 VV iken kontrollerde %23.5 AA, %42.3 AV ve %34.2 VV olarak bulunmuştur ($p < 0.0001$). Bu sonuçlara göre -9Ala allelinin şizofreni ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Akyol et al, 2005). Horry ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise şizofreni hastaları ve kontrol genotipleri arasında önemli farklılık bulunamamıştır fakat şizofreni tedavisinde kullanılan bir ilacın sonucu tardif diskenezi (TD) geliştiren ve geliştirmeyen şizofrenler olarak hastalar iki gruba ayrıldığında gruplar arasındaki genotipik dağılımın anlamlı olduğu ortaya konmuştur ($p = 0.03$). -9Ala allelinin TD'li hastalarda düşük oranda görülmesi bu genotipi taşıyan hastaların TD geliştirme riskine karşı korunabildiği düşünülmüştür (Hori et al, 2000).

Römatoid artrit (RA) eklemleri ve bazı internal organları etkileyen kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Hastalığın patogenezisine dair bilgiler kısıtlı olsa da etiyolojisi ile ilgili bazı genetik ve çevresel faktörler belirlenmiştir. cDNA mikroarray deneyleri ile hastalıkla ilgili birçok genin ekspresyonuna bakılmıştır (Heller et al, 1997). Bu sonuçlara göre bu hastalıkta *Mn*-SOD gen ekspresyonunun yüksek olduğu bulunmuştur. Fakat *Mn*-SOD Ala-9Val polimorfizminin hastalıkla ilişkisi olmadığı ortaya konmuştur (Yen et al, 2003).

Özellikle akciğerde O₂ karşı antioksidant savunmasının önemli olabileceği düşünülerek *Mn-SOD Ala-9Val* polimorfizmi astım hastalarında değerlendirilmiştir. Fakat bu konuda çıkan çalışmalar bu polimorfizmin astımda rol oynamadığını göstermiştir (Holla et al, 2006).

1.2.2.2.1 Ala-9Val Polimorfizminin Kanserle İlişkisi

Mn-SOD Ala-9Val polimorfizminin prostat kanseri, kolorektal kanser, akciğer kanseri, mesane kanseri, over kanseri ve meme kanseri ile ilişkisini araştıran yayınlar mevcuttur. Fakat kanser dışı çalışmalarda olduğu gibi kanser çalışmalarında da sonuçlar oldukça çelişkilidir.

Prostat kanseri ile ilgili şimdiye kadar iki yayın yapılmıştır. Woodson ve arkadaşlarının (2003) yaptığı çalışmada ala alleli bakımından homozigot olan erkeklerin prostat kanserine yakalanma riskinin val alleli bakımından homozigot erkeklere göre %70 daha fazla olduğu bulunmuştur (OR = 1.72, 95% CI = 0.96-3.08, p = 0.07). Ayrıca alanin bakımından homozigot olan erkeklerin tümör evrelerinin daha ileri safhada olduğu saptanmıştır (OR= 2.72, 95% CI=1.15-6.40, p = 0.02). Bu çalışmada ala allelinin prostat kanseri ile ilişkisi olduğu ortaya konmuştur ve daha ileri evre tümörlerinin ala/ala genotipini taşımasının, prognostik açıdan önemli olabileceği ileri sürülmüştür (Woodson et al, 2003). Prostat kanseri ile ilgili diğer çalışmaya göre ise *Mn-SOD* polimorfizmi ve prostat kanser riski arasında zayıf bir bağlantı vardır, fakat bu risk oranı prediagnostik plazma antioksidantların etkisiyle değişmektedir (P= 0.05). Total prostat kanseri hastaları arasında ala/ala genotipi taşıyan erkeklerde, yüksek selenyum seviyeleri 0.3'lük relative risk (RR) yaratmaktadır. (95% CI= 0.2-0.7) klinik agresif prostat kanserli kişiler için ise bu risk 0.2'dir (95% CI =0.1-0.5). Oysa val/val veya val/ala genotipi taşıyan hastalarda bu risk sırasıyla 0.6 (CI=0.4-1.0) ve 0.7 (CI=0.4-1.2) olarak hesaplanmıştır (Li et al, 2005).

Mn-SOD val/val genotipinin mesane kanser riski yarattığı (OR = 1.91, 95% CI = 1.20-3.04) ve bu riskin sigara (OR = 7.20, 95% CI = 3.23-16.1) ve polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) (OR = 3.02, 95% CI = 1.35-6.74) ile daha da arttığı bulunmuştur

(Hung et al, 2004). Terry ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise *Mn*-SOD ala/ala veya val/ala genotipi taşıyan hastalarda val/val genotipine göre küçük bir risk artışı olduğu gösterilmiştir. Val/ala genotipini taşıyan sigara içenlerde ise yüksek mesane kanser riski olduğu bulunmuştur (OR=1.7; 95% CI=1.0-2.9) (Terry et al, 2005).

Stoehlmacher ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kolorektal kanser ve *Mn*-SOD ala-9val polimorfizmi arasındaki ilişki incelenmiştir. Hispanik kökenli hastalarla hispanik olmayan beyazlarda yapılan çalışmada hasta ve kontrol grubuna ait genotip dağılımları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (P=0.90). Fakat hispanik kökenli genç hastalarda ala allelinin daha fazla görüldüğü saptanmıştır. Homozigot ala alleli taşıyan hastaların yaş ortalamasının 37.6 olduğu oysa heterozigot hastaların yaş ortalamasının 42.3 ve homozigot val genotipine sahip hastaların yaş ortalamasının 48.4 olduğu bulunmuştur (p=0.045) (Stoehlmacher et al, 2002). Levine ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise ala allelinin kolon kanseri bakımından çok zayıf şekilde koruyucu etki yarattığı tespit edilmiştir (Levine et al, 2002).

Akciğer kanseri ile ilgili çalışmalarda ala allelinin değil de val allelinin etkili olduğu bulunmuştur. Wang ve arkadaşlarının 1100 hasta ile yaptıkları çalışmada val/val ve val/ala'nin genotiplerinin ala/ala genotipine göre daha fazla risk (OR= 1.67 ve 1.4.) oluşturduğunu bulmuşlardır (Wang et al, 2001). Yapılan başka bir çalışmada da küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde *Mn*-SOD polimorfizmi XRCC1 ve p53 polimorfizmleri ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre *Mn*-SOD val/val genotipinin XRCC1 variant Gln ve p53 variant Pro genotipleri ile yüksek adenokarsinom riski oluşturmaktadır (OR= 1.84, 95% CI = 1.20–2.82; OR= 1.39, 95% CI= 0.98–2.21 ve OR= 2.54, 95% CI=1.38–4.68) (Liu et al, 2004). Fakat Lin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma bu sonuçları desteklememekle birlikte *Mn*-SOD ala-9val polimorfizminin akciğer kanseri bakımından risk oluşturmadığını göstermiştir (Lin et al, 2003).

Over kanseri ile *Mn*-SOD ala-9val polimorfizmi arasındaki ilişkiyi gösteren sadece bir çalışma mevcuttur. Buna göre ala/ala genotipi taşıyan kadınların yüksek over kanseri riski (OR= 2.1, 95% CI= 1.1–4.0) taşıdığı ortaya konmuştur (Olson et al, 2004).

Şu ana kadar meme kanserinin *Mn*-SOD polimorfizmini incelemiş olan toplam sekiz yayın bulunmaktadır. Bu çalışmalardan bazıları ala-9val polimorfizmi ile meme kanseri arasında bağlantı bulmuşlardır. Ambrosone ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ala/ala genotipi taşıyan kadınların bir veya iki valin alleli taşıyanlara göre 4 kat fazla meme kanseri riski (OR = 4.3, 95% CI= 1.7–10.8) taşıdıklarını bulmuşlardır. Risk az meyve tüketen bayanlar arasında daha belirgindir. Postmenopozal bayanlarda bağlantı zayıf olmakla beraber *Mn*-SOD ala/ala genotipi taşıyan bu bayanlarda risk iki kat olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (OR=1.8; 95% CI=0.9–3.6). Bu bayanların antioksidantça zengin bir diyetle beslenmeleri de bu riskin azalmasında önemli rol oynamamaktadır (Ambrosone et al, 1999).

Mitrunen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da ala/ala genotipini taşıyan kadınların val/val taşıyanlara göre meme kanserine yakalanma riski 1,5'tir (95% CI =1.1–2.0) (Mitrunen et al, 2001).

Cai ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da ala/ala genotipinin özellikle premenopozal bayanlarda meme kanser riskinin arttığını bulmuşlardır (OR=1.3, 95 % CI= 0.7–2.3). Özellikle riskin BM indeksi yüksek olan bayanlarda daha da fazla olduğu saptanmıştır (OR =2.5, 95% CI= 0.9-7.0) (Cai et al, 2004).

Bergman ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise genç meme kanseri vakaları ve val/val genotipi arasında bağlantı bulmuşlardır. Buna göre val/val genotipi taşıyan genç bayanlarda meme kanserine yakalanma riski yüksektir (OR= 2.7; 95% CI= 2.2-5.5, P=0.01) (Bergman et al, 2005).

Yapılan diğer çalışmalara göre de meme kanseri ile ala/ala genotipi arasında ilişki bulunamamıştır (Egan et al, 2003, Knight et al, 2004, Tamimi et al, 2004).

Sonuçların bu kadar çelişkili olmasının nedenlerinden birinin de çalışmalarda kullanılan populasyon büyüklüklerinin çok farklı olması, ayrıca hasta grupları ile kontrol gruplarında yer alan kişilerin etnik kökenlerin farklı olması olabileceği düşünülmektedir (Çizelge 1.4 ve 1.5).

Çizelge 1.4 Değişik populasyonların kontrol gruplarında ala-9val polimorfizminin genotip ve allel frekanslarının dağılımı

Ülke	n	Ala-9-Val Genotip Frekansı, (%)			Allel Frekansı, %		Referans
		AA	AV	VV	Ala	Val	
Amerika	1205	24.6	50.8	24.7	0.50	0.50	Tamimi, 2004
Amerika	295	21.3	57.2	21.3	0.50	0.50	Ambrosone, 1999
Amerika	495	21.8	42.2	25.3	0.48	0.52	Levine, 2002
Amerika	497	26	49	26	0.50	0.50	Egan, 2003
A	677	18	53	29	0.45	0.45	Millikan, 2004
B							
D	1135	25	52	23	0.51	0.49	Millikan, 2004
Çek Cumhuriyeti	327	24.8	51.4	23.8	0.51	0.50	Holla, 2005
Çin	1197	1.9	24.2	73.9	0.14	0.86	Cai, 2004
Doğu Litvanya	103	26.2	60	13.8	0.56	0.44	Landeghem, 1999
Finlandiya	482	20.3	47.9	31.7	0.44	0.56	Mitrunen, 2001
İngiltere	120	32	52	16	0.58	0.42	Tomkins, 2001
İsveç	174	25	50	25	0.50	0.50	Bergman, 2005
Kanada	372	23	52	25	0.49	0.50	Knight, 2004
Kuzey Finlandiya	100	23	49	28	0.61	0.39	Landeghem, 1999
Kuzey İsveç	135	16	50	34	0.40	0.60	Landeghem, 1999
Singapur	38	2.6	55.2	42.2	0.30	0.70	Landeghem, 1999
Türkiye	196	23.5	42.3	34.2	0.44	0.56	Akyol, 2005

Çizelge 1.5 Değişik populasyonların hasta gruplarında ala-9val polimorfizminin genotip ve allel frekanslarının dağılımı

Ülke	n	Hastalık grubu	Ala-9-Val Genotip Frekansı (%)			Allel Frekansı (%)		Ref.	
			AA	AV	VV	Ala	Val		
Amerika	968	Meme kanseri	25.3	48.4	26.3	0.49	0.51	Tamimi, 2004	
Amerika	456	Kolon kanseri	23.7	45.8 3	23.7	0.46	0.54	Levine, 2002	
Amerika	266	Meme kanseri	33.8	51.5	14.6	0.59	0.41	Ambrosone, 1999	
Amerika	470	Meme kanseri	25	53	21	0.51	0.49	Egan, 2003	
ABD	Afro-Amerikan	760	Meme kanseri	17	49	34	0.41	0.59	Millikan, 2004
	Beyazlar	126 5	Meme kanseri	25	54	21	0.52	0.48	Millikan, 2004
Çek Cumhuriyet	299	Astım	23.7	50.2	26.1	0.488	0.512	Holla, 2005	
Çin	112 5	Meme kanseri	2.5	23.6	73.9	0.14	0.86	Cai, 2004	
Finland	379	Meme kanseri	20.9	53.2	25.9	0.60	0.40	Mitrunen, 2001	
İsveç	118	Meme kanseri	10	62	28	0.41	0.59	Bergman, 2005	
İngiltere	77	ALS	28	42	30	0.49	0.51	Tomkins, 2001	
Kanada	399	Meme kanseri	26	47	27	0.49	0.51	Knight, 2004	
Türkiye	153	Şizofreni	9.2	69.3	21.6	0.46	0.54	Akyol, 2005	

1.2.2.3. Superoksid Dismutaz'ın Evrimi

Superoksid dismutazların oluşumu yaklaşık 2 milyar yıl önce fotosentetik organizmaların meydana gelip oksijen üretmesi ile birlikte başlamıştır. Oksijenin toksik etkilerini yok etmek için birçok antioksidant enzim evrimleşmiştir. O zamanda prokaryotlarda bakır/çinko içeren SOD'lar ve demir/manganez içeren SOD'lar olmak üzere iki ana tip superoksid dismutaz meydana gelmiştir. SOD'ların tüm formlarının, organizmaları bu yeni toksine karşı koruyan tek bir proteinden orijinlenmiş olababilirler mi sorusu akla gelmiştir. Enzimin iki tipi de aynı fonksiyona sahip olmasına rağmen kristal yapılarının bir birinden tamamen farklı olması, kullandıkları ko-faktörlerin aynı olmaması ve katalitik mekanizmalarının da farklı olması ortak bir atanın olabileceği ihtimalini ortadan kaldırmaktadır. Kristal yapıya dayanarak yapılan çoklu dizi analizleri sonucu ortaya çıkarılan *Cu/Zn-SOD*'a ait evrimsel ağacın, ekstrasellüler SOD'ın funginin, bitkilerin ve metazoa'nın henüz ayrılmadığı evrimin erken safhalarında sitozolik formdan orijin aldığı göstermektedir (Bordo et al, 1994). Zelko ve arkadaşlarının yapılan ve tüm bilinen vertebralara ait SOD genlerinin filogenetik analizi de SOD1 ve SOD3 genlerinin birbirine çok benzediği fakat SOD2 ile homoloji göstermediklerini ortaya koymaktadır. SOD1'in ana yapısal bölgesi sekiz tane β "barrel" motifi içermektedir (Getzoff et al, 1989). Amino asid değişimleri, delesyonlar ve insersiyonlar genellikle bu yapısal motifin dışında meydana gelmektedir. Bu veri *CuZn-SOD* evriminin ekson I ve III'ün eklenmesi ile sonuçlanan gen duplikasyonu ve füzyonunu içerdiğine dair teoriyi desteklemektedir. İlginç olarak da, *Cu/Zn-* ve *Mn-SOD*'ın evrimsel oranları son bir milyar yıl boyunca önemli ölçüde farklılık göstermektedir. *Mn-SOD* proteinlerinin oldukça sabit evrimine karşılık, *CuZn-SOD*'lar başlangıçta yavaş bir oranda evrimleşirken son 100 milyon yılda oldukça yüksek bir oranla evrimleşmiştir, yani sabit bir evrim oranı göstermediği bulunmuştur (Smith and Doolittle, 1992; Rodriguez-Trelles et al, 2001). *Cu/Zn-SOD*'ın evrim oranlarının bu şekilde anormal seyretmesi henüz açıklanmış bir şey değildir fakat olası bir açıklama *CuZn SOD*'nin zararlı değişimleri tolere edememiş olabileceğidir. *Cu/Zn-SOD*'da zamanla biriken sessiz mutasyonların bu evrimsel duraklamadan çıkmasına neden olarak

daha hızlı bir evrimsel oran yakalamasına olanak sağlamış olabileceği düşünülmektedir. Bu teorinin henüz kesinlik kazanmamış olmasına rağmen yeryüzündeki aerobik hayatın varlığı SOD'ın oksijenin zararlı etkisine karşı başarılı bir şekilde evrimleştiğini göstermektedir (Zelko et al, 2002).

1.3 DNA POLİMORFİZMİ

Doğada, aynı türden organizmalar genellikle, bazı görünümleri ile farklıdırlar. Bu farklılıklar genetik olarak belirlenmiştir ve polimorfizm olarak isimlendirilmektedir. Polimorfizm, tüm birey düzeyinde (fenotip), proteinlerin ve kan grubu bileşiklerinin varyant formlarında (biyokimyasal polimorfizm), kromozomların morfolojik özelliklerinde (kromozomal polimorfizm) veya DNA düzeyinde nükleotid farklılıkları (DNA polimorfizmi) şeklinde görülebilir.

Diğer organizmaların genomları gibi insan genomu da statik bir yapı değildir. İnsan genomu kalıtılabilir birçok değişikliğe (mutasyon) maruz kalmaktadır. Geniş kapsamlı mutasyonlar yeni kromozom kazanımını veya kaybını veya kromatidler arasındaki değişimi içermektedirler. Daha küçük kapsamlı mutasyonlar ise baz süstitüsyonları, delesyonları ve insersiyonları içermektedir. Baz süstitüsyonlarından kasıt genellikle tek baz değişimidir fakat nadir de olsa bazen birkaç baz da aynı anda değişebilmektedir. Bir veya birkaç bazın diziden elimine olmasına delesyon kazanımına da insersiyon adı verilir. Bu tür mutasyonlar ayrıca basit mutasyonlar olarak da adlandırılır (Strachan and Read, 2004).

DNA polimorfizmlerinin genetik marker olarak kullanılması karmaşık genomların haritalanmasına, manipule edilmesine ve ilginç biyolojik özelliklere sahip olan genlerin klonlanmasına imkân vermektedir. Birçok organizmanın DNA'sında bireysel çeşitlilik görüldüğünden DNA polimorfizimleri genetik analizlerde oldukça kullanışlıdır. İlk defa 1980 yılında RFLP kullanarak tanımlanan DNA varyasyonları memeli genomunu incelemek için genetik marker kaynakları sağlamışlardır. Bunun sonucunda birçok organizmanın DNA polimorfizm haritaları oluşturulmuştur (NIH/CEPH Collaborative Mapping Group, 1992).

DNA polimorfizmini baz alan genetik markırların identifikasyonu, genetik haritanın *de novo* konsturiksiyonların belirlenmesi (ör. tüm genomu veya kromozomları kapsayan), mevcut olan haritaya yeni genetik markırların eklenmesi veya mutasyon spesifik markırların oluşturulması yönünden önem taşımaktadır.

Genetik markır olarak en çok kullanılan DNA polimorfizmleri, SNP'ler (ör. tek baz substitusyonlar, delesyonlar ve insersiyonlar), RFLP'ler (restriksiyon bölgelerini değiştiren tek nükleotid değişimleri) ve tandem tekrar sayılarında farklılıktan dolayı oluşan polimorfizmlerdir.

1.3.1 DNA Polimorfizm tipleri

1.3.1.1. Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP)

Tek nükleotid pozisyonundaki değişikliği (substitusyonlar, delesyonlar ve insersiyonlar) temsil eden tek baz çifti polimorfizmi ya da tek nükleotid polimorfizmi (SNP) olarak tanımlanmaktadır. Bu polimorfizmlerin çoğu bialleliktir. Birçok SNP'nin kodlamayan genomik bölgelerde bulunmasına rağmen, önemli bir kısmını hastalıkla veya diğer fenotiplerle ilgili mutasyonlar teşkil etmektedir.

SNP'ler birçok genomda sıklıkla meydana gelmektedirler ve mutasyon oranları düşüktür. Bu özelliklerinden dolayı karşılaştırılmalı genetik haritaların oluşturulmasında tercih edilmektedirler. SNP'leri içeren genetik haritalar karmaşık özelliklere etki eden genetik faktörlerin belirlenmesini amaçlayan linkage disequilibrium çalışmalarında kullanılmaktadırlar (Collins et al, 1997).

İnsan genomunda DNA'nın %1,5 kodlayan DNA'dan oluşur, SNP'ler ise çoğunlukla intron ve intergenik diziler gibi genomun kodlamayan kısmını oluşturan bölgelerde yer almaktadırlar. Ayrıca SNP'lerin kromozomal dağılımı uniform değildir: çok az SNP bulunan bölgelerin hemen yanında çok fazla SNP içeren bölgeler bulunabilmektedir (Strachan and Read, 2004).

Bir DNA segmentinin yaklaşık her 100 baz çiftindeki nükleotid dizisi bireylerde değişiklik gösterir. Bazen SNP'ler restriksiyon enzimi tanıma bölgelerinde değişikliğe

neden olurlar. Bu durumda, restriksiyon fragman büyüklükleri bu bölge için farklıdır (restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi, RFLP). Bu da bu bölgelerde oluşan mutasyonların belirlenmesinde kullanılmaktadır.

1.3.1.2. VNTR

Bazı baz dizileri yanyana tekrarlanabilir (ardarda tekrarlar). Tekrarların sayısındaki değişiklikler polimorfizm oluşturur (değişken sayıda ardarda tekrarlar, VNTR). VNTR'ler iki sınıfta toplanabilir: mikrosatellitler ve minisatellitler. Böyle bir segmentte mevcut tekrarların sayısı fragmanların büyüklüğünü belirler. Çeşitli büyüklüklerde birçok DNA fragmanı oluşur. Örneğin 2.0, 2.5, 3.0 ve 3.5 kb'lık dört farklı fragman halinde bulunabilen bir DNA segmenti toplam 10 farklı allelik kombinasyonda görülebilir. Her birey bu kombinasyonlardan birine sahiptir ve birbiri ile ilişkisi olmayan iki bireyin belli bir DNA segmenti için farklılık göstermesi olasılığı yüksektir. Genetik analizlerde bundan yararlanılabilir. Kesin bireysellik gösteren bazı DNA markır sistemleri adli tıp amaçlarıyla kullanılabilir. Son zamanlarda, birkaç baz çiftli polimorfik tekrarlar, örn. CA tekrarları, DNA'nın bölgelerinin tanımlanmasında kullanılmaktadır (Passarge, 1995).

Bunlara ilaveten insan genomunda transpozon tekrarı polimorfizmleri, geniş- alan VNTR polimorfizmleri, inversiyon polimorfizmleri ve kromozomal polimorfizmler mevcuttur (Strachan and Read, 2004).

2.AMAÇ VE KAPSAM

Meme kanseri dünyada kadınlarda en sık görülen habis tümörlerdendir. Ülkemiz Sağlık Bakanlığının 1999 yılı verilerine göre Türkiyede de kadınlarda meme kanseri en çok görülen on kanser türü arasında %24,1 ile birinci sırayı almaktadır. Ayrıca Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında yatırılarak tedavi görmüş 100 kanserli kadın hastanın 27'si meme kanseri olarak tespit edilmiştir .

Steroidogenesisin metabolik ve biyosentetik yolların kişiler arasında genetik varyasyon göstermektedir. Bu varyasyon da kişilerin üreme sistemi ve hormonal olaylara bağlı kanser geliştirme yatkınlığının farklı olmasını açıklamaktadır. Kanserleşmeye neden olan potansiyel mekanizmalardan birinin de reaktif oksijen türlerinin (ROT) yarattığı oksidatif hasar olduğu düşünülmektedir. ROT'leri östrojen ve metabolitleri ile bazı ksenobiotikler tarafından üretilir. Hücrelerde ROT'nin birikmesi DNA'ya, proteinlere ve lipidlere hasar vermektedir, bu da kanserleşmeyi tetiklemektedir. Superoksid dismutaz (SOD) ROT'ne karşı antioksidant etkiye sahip en önemli enzimlerden biridir. SOD2 veya mangenez içeren SOD (*Mn-SOD*) mitokondride superoksidleri yok eden tek enzim olduğundan enzimin antioksidant etkisi oldukça önemlidir. Ayrıca *Mn-SOD* hücreleri ve dokuları hiperoksidten, sitokinlerden ve sitotoksik ajanlardan koruduğunu gösteren bazı çalışmalar mevcuttur. *Mn-SOD* enzimini kodlayan gende meydana gelen bir transisyon (C-T) mutasyonu 9. kodonda alanin aminoasidinin valin amino asidine dönüşmesini sağlamaktadır, bu da enzimin yapısında değişikliğe neden olmaktadır. Bu değişim enzimin mitokondriye taşınmasında sorun yaratmaktadır.

Bu çalışmanın amacı antioksidant etkiye sahip en önemli enzimlerden biri olan ve bir transisyon mutasyonundan dolayı polimorfik yapıda bulunan *Mn-SOD* genin meme kanseri ile ilişkisini araştırmaktır.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Enzimler

Taq DNA polimeraz (MBI)

Proteinaz *K* (Sigma)

*Bsa*WI (New England Biolabs)

3.1.2. Primerler

Mn-SOD geni primer dizisi

F: 5'-CAG CCC AGC CTG CGT AGA CG-3'

R: 5'-GCG TTG ATG TGA GGT TCC AG-3'

3.1.3. Kimyasallar

Agaroz	Sigma	
Akrilamid	Sigma	A 9099
Amonyum asetat	Merck	A174189
Amonyum persülfat	Sigma	A 9164
Asetik asit	Sigma	A6283
Bisakrilamid	Sigma	M 7279
Borik asit	Sigma	B 6768
Brom fenol mavisi	Sigma	B5525
Etanol	Sigma	E7023

Etidium bromid	Sigma	E8751
EDTA	Sigma	E 5134
Formaldehit	Sigma	F 8775
Formamid	Sigma	F 9037
Gümüş nitrat	Sigma	S8157
Ksilen siyanol	Sigma	X4126
Sodyum hidroksit	Merck	B1900662
Sodyum klorid	Merck	K26744400
Sodyum karbonat	Sigma	S 7277
TEMED	Sigma	T 7024
Tris baz	Sigma	T 8524

3.1.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

3.1.4.1. DNA İzolasyon Çözeltileri

RBCL (eritrosit parçalama solisyonu) pH 7,4

0.15 M NH₄Cl

0.01 M KHCO₃

0.01 M EDTA (pH 8,0)

WBL (beyaz hücre parçalama solüsyonu)

0.1 M NaCl

0.025 M EDTA (pH 8,0)

Amonyum asetat solüsyonu

9.5 M NH₄Ac (sterilizasyon için 0.2 mikronluk filtreden geçirilir)

TE tamponu (pH 8.0)

10 mM Tris HCl

1 mM EDTA pH 8.0 (+20°C)

SDS stok solüsyonu

10% (w/v) SDS

0.2-0.45 µm membran ile filtre edilmiş

3.1.3.2. Elektroforez Solüsyonları

Yükleme tamponları

6 X agaroz jel yükleme tamponu

% 0.25 bromfenol mavisi

% 0.25 Xanal cyanol

% 30 gliserol

Etidyum bromür stok solüsyonu

10 mg/ml etidyum Bromür

50X TAE

2 M Tris-Asetat

0.05 M EDTA (pH 8,0)

5X TBE

0.45 M Tris Borat

0.01 M EDTA (pH 8,0)

% 10'luk non-denatüre poliakrilamid jel solüsyonu (29:1 akrilamid: bisakrilamid)

%10 Akrilamid-Bisakrilamid

1X TBE

Polimerizasyon için;

0.001 M amonyumpersülfat (APS),

% 0,1 TEMED ilave edildi.

3.1.4.3. Gümüş Boyama Solüsyonları

10 X A solüsyonu: %5 asetik asit % 95 absolüt etil alkol

10 X B solüsyonu: %1 gümüş nitrat

C solüsyonu: 3 g NaOH, 0.02 g Boraks, %0,2 formaldehit

10 X D solüsyonu: 22,5 g Sodyum bikarbonat/ 1lt (opsiyonel)

3.1.5. Kullanılan Cihazlar

Thermocycler (Eppendorf Mastercycler)

Dikey elektroforez(BIORAD)

Yatay elektroforez(BIORAD)

Güç kaynağı (BIORAD Power Pac 3000)

UV transilimünatör (BIORAD)

Spektrofotometre (SHIMADZU)

CanoScan N670U (Canon)

Bilgisayar

3.1.6 Hasta Grubu

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'na başvuran, aynı anabilim dalında tedavi gören ve daha önce kemoterapi ve/veya radyoterapi almamış meme kanseri hastalardan EDTA'lı tüplere 10'ar cc kan alındı. Hastalara ayrıntılı bilgi verdikten sonra onam formları imzalatıldı.

3.1.7 Kontrol Grubu

Ailesinde meme kanseri bulunmayan gönüllü bayanlardan EDTA'lı tüplere 10'ar cc kan alındı. Kişilere ayrıntılı bilgi verilerek onam formları imzalatıldı.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

1. 10 ml periferik kan 50 ml'lik falkon tüpüne aktarılarak üzerine 1:3 oranında eritrosit lizis tamponu eklendi. +4°C'de 20 dakika bekletilip, 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
2. Örnek santrifüjden alınarak üzerindeki süpernatant atıldı. Pellet süspansiyon edildi ve üzerine 20 ml eritrosit lizis tamponu eklendi. Tekrar 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
3. Pellet tamamen süspansiyon edilip üzerine 500 µl SDS (%10'luk), 50µl proteinaz K (20mg/ml) ve 9,4 ml WBL (White Blood-Cell Lysis) tamponu eklenerek 56°C'de gece boyu bekletildi.
4. İnkübasyon sonrası üzerine 4 ml Amonyum asetat (9.5M) eklenip iyice karıştırıldı. 20 dakika 4500 rpm'de santrifüj edildi.
5. Üstteki temiz kısım alınarak yeni bir falkon tüpe aktarıldı, pellet atıldı. Süpernatantın üzerine 20 ml etanol eklendi ve DNA'nın toplanması beklendi. DNA alınarak bir

eppendorf tüpe aktarıldı ve üzerine 1ml % 70 etanol koyuldu. Maksimum hızda (13.200 rpm) 10 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürüldü ve süpernatant atıldı. Kurutma işlemi ile kalan alkol uçuruldu

6. Elde edilen DNA'nın miktarına göre 100–300µl kadar TE (Tris-EDTA, pH=8.0) tamponu eklenerek 56°C'de 1 saat bekletilerek +4°C'de muhafaza edildi.

3.2.2. DNA Konsantrasyonu ve Saflığının Ölçümü

1. Stok DNA tüpünden 1µl örnek alındı ve 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı.
2. Üzerine 99µl TE eklenerek 1/100 oranında sulandırıldı.
3. Örneğin spektrofotometrede 260 ve 280 nm ultraviyole dalgaboyunda absorpsiyon değerleri okundu
4. DNA miktarı formüle göre hesaplandı:
Konsantrasyon= 100 (sulandırma) x 50 (sabit) x OD 260= ng/µl DNA
5. OD 260/280 > 1,8 RNA, < 1,8 protein kontaminasyonu olarak değerlendirildi.

3.2.3. GENOTİPLEME

Genotipleme alınan kan örneklerinden izole edilen DNA'lardan Polimeraz Zincir Reaksiyonu- Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (Polymerase Chain Reaction-Restriction Length Polymorphism (PCR-RFLP)) metodu ile yapıldı.

3.2.3.1. PCR

Mn-SOD polimorfizmi Shimoda-Matsubayashi ve ark. (1996) yayınladığı metod ile incelendi ve analiz yapıldı. PCR reaksiyonu için 100 ng genomic DNA, 10 pmol forward (F: 5'- CAG CCC AGC CTG CGT AGA CG-3') ve reverse (R: 5'-GCG TTG ATG TGA GGT TCC AG-3') primerler kullanarak amplifiye edildi. PCR şartları: 94°C de 3 dk. denaturasyonu takiben 94°C 1dk, 66 °C'de 1dk. ve 72 °C'de 1dk. 35 döngü ve son olarak 72 °C'de 7dk. şeklinde yapıldı. Total miktarı 25µl olan PCR mix'i 10mM

Tris-Cl (pH 8,8), 50 mM KCl, %0.08 Nonidet P40 ve 1,5mM MgCl₂, 200 µM dNTP ve 1,0 U *Taq* DNA polimeraz (MBI Fermentas) içecek şekilde hazırlandı.

3.2.3.1.1. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

Toplam 25µl hacimde gerçekleştirilen reaksiyondan kontrol amacı ile 5µl alınarak 6X agaroz yükleme tamponu ile karıştırıldı. %2'lik agaroz jelle pUC-Mix (MBI) size markır ile birlikte yüklenen PCR ürünleri, 50 V akımda yaklaşık 1 saat yürütüldü. UV transilüminatörde görüntülenerek fotoğrafları çekildi.

3.2.3.2. RFLP

BsaW I restriksiyon enzim kesimi total olarak 15 µl olup 1X *BsaWI* tamponu (NE Buffer), 5U *BsaW* I enzimi, 5 µl PCR ürünü ve 6 µl steril distile su içecek şekilde hazırlandı ve gece boyunca 60° C'de bekletilerek yapıldı. Kesim ürünleri %10'luk poliakrilamid jelde (29:1) yürütülüp, gümüş nitrat metodu ile boyanarak görüntülendi. Tarayıcı yardımı ile tüm görüntüler bilgisayara kaydedildi. *MnSOD Ala* için karakteristik olan 86 bç bantlar elde edildi.

3.2.3.2.1. Kesim Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektroforezi

35 cm x 10 cm ebatlarında hazırlanan jelin elektroforezi için dikey elektroferez cihazı kullanıldı. Jelin kalınlığı 0,5 mm olarak ayarlandı. Yüzde onluk PAGE stok solüsyonuna sırası ile % 10'luk APS stoğundan % 1 hacim ve TEMED'den % 0,1 hacim ilave edilip 0,5 mm'lik cam aralığına döküldü. Polimerizasyonun tamamlanması için en az 1/2 saat beklendi.

Polimerizasyon sonrası camlar elektroferez cihazına yerleştirildi, 1X TBE içeren yürütme tamponu ilave edildi. Örnekler jel kuyucuklarına yüklendi. Yükleme tamponu içinde bulunan ve elektrik alanda hareket eden brom fenol mavisi ve ksilen siyanol boyalarının yürüdükleri mesafe takip edilerek akım aşağıdaki çizelgelere

verildiği gibi ayarlandı. Çizelgelerde verilen süreler sonunda jel çıkartılarak gümüş boyama işlemine geçildi.

Çizelge 3.4: Mn-SOD Ala-9Val polimorfizmi için poliakrilamid jel elektroforezi koşulları

Akım			PAGE (%)	Yürüme zamanı (dk)
mA	V	W		
~50	~150	20	10	25

3.2.3.2.2. Gümüş Boyama

Solüsyonlarda ve yıkamada kullanılan suyun kalitesi önemli olduğundan test edilmiş distile su kullanıldı. Elde hafif çalkalama ile aşağıdaki solüsyonlarda sıra ile bekletildi. C solüsyonu kullanımdan hemen önce hazırlandı. Sonraki solüsyonlara geçerken aralarda distile su ile bir kaç saniyelik kısa süreler ile yıkandı.

A solüsyonu (Asetik asit-etanol): 200 ml distile suya stok solüsyondan 10 ml ilave edilerek hazırlandı ve jel bu solüsyonla 5 dakika muamele edildi.

B solüsyonu (Gümüş nitrat): 200 ml distile suya stok solüsyondan 10 ml ilave edilerek hazırlandı ve jel bu solüsyonla 10 dakika muamele edildi.

C solüsyonu (NaOH-Boraks-Formaldehit): 200 ml distile suya 2.5 gr NaOH ve 0.02 gr boraks ilave edildi ve jel bu solüsyona alındıktan sonra solüsyonun içerisine 1ml formaldehit ilave edilerek bantlar görülünceye kadar jel solüsyon içerisinde tutuldu.

D solüsyonunu (NaHCO₃): 200 ml distile suya stok solüsyondan 20 ml ilave edilerek hazırlandı ve jel bu solüsyonla 5 dakika muamele edildi.

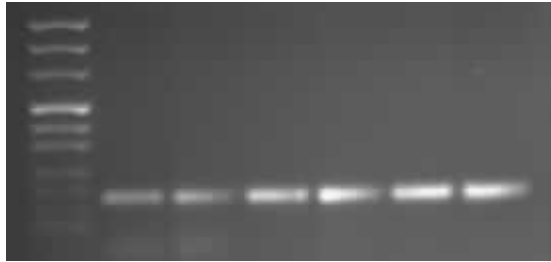
Distile suda yıkanan jel nemli olarak asetat arasına alındı ve naylon dosya poşeti içine alınarak hava alması engellenecek şekilde saklandı.

3.2.5. İstatiksel Analiz:

Odds ratio, %95 güven aralığı ve χ^2 analizi, conditional logistic regression analizi kullanarak yapıldı. Hücre frekansları 5'ten az olduğunda gerçek metodlar kullanılarak risk oranları hesaplandı. Tüm analizler PC için SPSS 12,0 versiyonu kullanılarak yapıldı.

4.BULGULAR

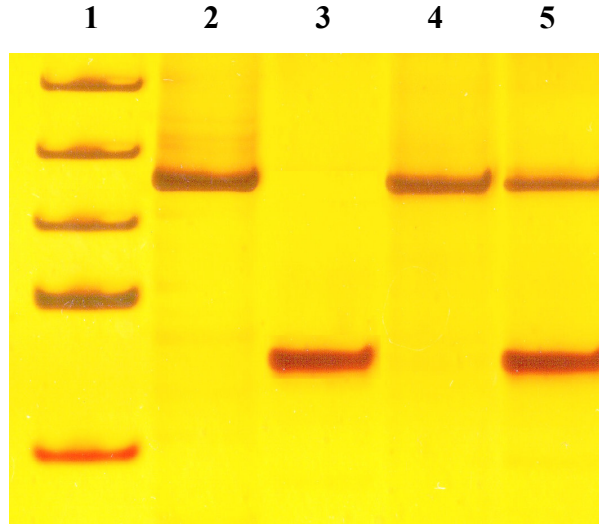
Mn-SOD geni ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi inceleyen bu çalışmamızda PCR-RFLP yöntemi ile Mn-SOD ala-9val polimorfizmi bakımından 156 meme kanseri vakasının ve 226 kontrolün genotiplemesi yapıldı. İstatistiksel analize göre hastalarla kontroller arasında allelik ilişki bulunamadı ($\chi^2 = 3.447$, $df=2$, $P= 0.178$). Fakat ala/val genotipinin odds ratio'su 1.476 olarak bulundu (OR=1.476, 95% CI=0.978-2.229, $df=1$, $P=0.063$). Buna göre hastalarda genotip dağılımı %24.4 VV, %56,6 AV, %16 AA ve kontrollerde ise %30.3 VV, %50 AV, %19.7 AA olarak bulundu (A= ala, V= val). Allelik frekanslar val alleli için, hastalarda %54.16 kontrollerde %55.26, ala alleli için de hastalarda %45.83 kontrollerde %44.73 olarak hesaplandı. Bunların beklenen oranları da val alleli için hastalarda %54.83 kontrollerde %54.80; ala alleli hastalarda %45.16 kontrollerde %45.19 olarak hesaplandı. Hasta ve kontrollerde gözlenen ve beklenen allel frekanslarının birbirine yakın olmasından dolayı grupların Hardy-Weinberg eşitliğine uyum gösterdikleri kabul edildi. Buna göre Mn-SOD ala-9val polimorfizminin meme kanseri oluşumunda bağımsız olarak risk oluşturmadığı bulundu.



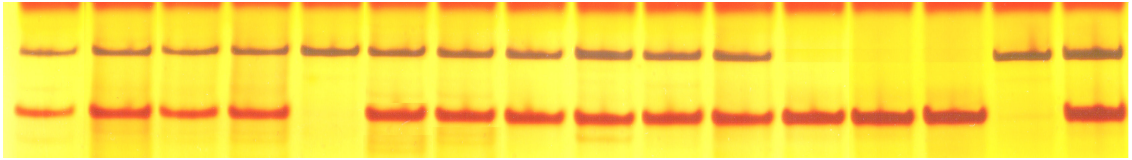
Şekil 4.1 PCR ile çoğaltılan *Mn*-SOD ala-9val polimorfizmini içeren gen bölgesinin agaroz jel görüntüsü

Çizelge 4.1 PCR ile çoğaltılan *Mn*-SOD ala-9val polimorfizmini içeren gen dizisi

Uzunluk (bç)	Dizi
172	<u>5'-CAGCCCAGCCTGCGTAGACGGTCCC</u> CGGCGCTGACT GACCGGGCTGTGCTTTCTCGTCTTCAGCACCAGCAGG CAGCTGGCTCCG <u>GTTT</u> TTGGGGTATCTGGGCTCCAGGC AGAAGCACAGCCTCCCCGACCTGCCCTACGACTACG <u>GCGCCCTGGAACCTCACATCAACGC-3'</u>



Şekil 4.2 *Bsw*I enzimi ile kesilen *Mn*-SOD ala-9val polimorfizmini içeren gen bölgesinin poliakrilamid jel görüntüsü (1: pUC mix 8 M, 2: kesilmemiş PCR ürünü, 3: AA, 4: VV, 5: AV).



Şekil 4.3 *Bsw*I enzimi ile kesilen *Mn*-SOD ala-9val polimorfizmini içeren gen bölgesinin total poliakrilamid jel görüntüsü (Total jel görüntüsü).

Çizelge 4.2 Enzim kesimi sonrası oluşan bant dizileri ve uzunlukları.

Uzunluk (bp)	5' Base	3' Base	Dizi
86	86	172	GTTTTGG GGTATCTGGG CTCCAGGCAG AAGCACAGCC TCCCCGACCT GCCCTACGAC TACGGCGCCC TGGAACCTCA CATCAACGC
86	1	86	CAGCCCAGCC TGCGTAGACG GTCCCCGCGGC GCTGACTGAC CGGGCTGTGC TTTCTCGTCT TCAGCACCAG CAGGCAGCTG GCTCCG

Çizelge 4.3 Mn-SOD gen polimorfizminin hasta ve kontrol gruplarına göre genotip dağılımları.

			SOD			Toplam
			V V	A V	A A	
Gruplar	Kontrol	Gözlenen	69	114	45	228
		Beklenen	63,5	122,9	41,6	228,0
		%	%30,3	%50,0	%19,7	%100,0
	Hasta	Gözlenen	38	93	25	156
		Beklenen	43,5	84,1	28,4	156,0
		%	%24,4	%59,6	%16,0	%100,0
Toplam		Gözlenen	107	207	70	384
		Beklenen	107,0	207,0	70,0	384,0
		%	%27,9	%53,9	%18,2	%100,0

Çizelge 4.4 Hasta ve kontrol gruplarına göre allel dağılımı

Allelik Frekanslar			
		Hasta (%)	Kontrol(%)
V(val) alleli	Gözlenen	54.16	55.26
	Beklenen	54.83	54.80
A(ala) alleli	Gözlenen	45.85	44.73
	Beklenen	45.16	45.19

Çizelge 4.5 Hasta ve kontrol gruplarının yaş ortalamaları

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Std. Sapma
Kontrol	228	25	62	44,75	7,572
Hasta	156	30	59	44,39	7,483

Çizelge 4.6 Hasta grubunda patolojik tanıların dağılımı

Tanı	n	%
İnvazif duktal karsinom	65	74.4
İn situ duktal karsinom	8	10.5
İnv.duktal+lobular karsinom	7	8.1
İnvasif lobular karsinom	3	3.5
Diğer	5	4.7
Total	86	100

5.TARTIŞMA

Vaka-kontrol çalışması olan bu çalışmamızda Mn-SOD ala-9val polimorfizminin meme kanserine yatkınlık sağlayan bağımsız bir risk faktörü olmadığı bulunmuştur. Odds ratio değerlendirildiğinde az da olsa Mn-SOD ala-9val polimorfizmi bakımından heterozigot bireylerin odds ratiosunun (OR=1.476, 95% CI=0.978–2.229, df=1, P=0.063) anlamlı olduğu gözlenmiştir. Fakat bu değer istatistiksel olarak anlamsızdır. Bu çalışmada hastaların diyeti, oral kontraseptif kullanımı, hormon replasman tedavisi (HRT), sigara ve alkol gibi çevresel etmenlerin genotip ile olan ilişkisi araştırılmamıştır.

Oksidatif stresin meme kanserine neden olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur. Oksidatif stresin DNA hasarı ve DNA zincir kırıklarına neden olduğu da gösterilmiştir (Ambrosone et al, 1999). Wang ve arkadaşları meme kanser dokularında oksidatif stres sonucu meydana gelen lipid peroksidasyonundan dolayı oluşan DNA-malondialdehid yan ürünlerinin bulunduğunu ortaya koymuşlardır (Wang et al, 1996). Mamografik olarak meme displazisi tespit edilmiş kadınların idrarında da yüksek seviyede malondialdehid bulunmuştur (Boyd et al, 1991).

SOD'ler ROT'ne karşı özellikle de superoksid anyonuna karşı en önemli antioksidant enzimlerdir. Memelilerde üç değişik SOD izoformu bulunmaktadır. Bu üç izoform farklı kromozomlar üzerinde bulunan farklı genler tarafından kodlanmaktadır (Zelko et al, 2002) Üç SOD geni de polimorfiktir. Belki bu üç genin aynı anda incelenmesi gen-gen etkileşimlerini ortaya koyarak meme kanser mekanizması açısından aydınlatıcı olabilir. $O_2^{\cdot-}$ anyonu SOD tarafından yok edilmezse nitrik oksid(NO^{\cdot}) radikali ile etkileşerek daha etkili bir oksidant olan peroksinitrite ($ONOO^{\cdot}$) dönüşebilir (Mruk et al, 2002). Mn-SOD $O_2^{\cdot-}$ di H_2O_2 'e dönüştürür, H_2O_2 'de mitokondride GPX1tarafından etkisiz hale getirilir. Eğer bu gerçekleşmezse H_2O_2 daha toksik olan hidroksil ($^{\cdot}OH$) radikaline dönüşür. Bu nedenle oksidatif stresin kanserde oynadığı rolü daha iyi anlayabilmek için GPX1 polimorfizmini de çalışmak gerekebilir (Cai et al, 2004).

Mn-SOD ala-9val polimorfizi enzimin mitokondriye transferini etkilemektedir (Shimoda-Matsubayashi et al, 1996; Rosenblum et al, 1996). Sutton ve arkadaşları (2003) fare karaciğerinde *Mn-SOD* alanin variantının valin variantından %30–40 oranında daha aktif olduğunu ortaya koymuşlardır (Sutton et al, 2003). Bazı tümör hücrelerinin *Mn-SOD* aktivitesini kaybettikleri ve bunun malign fenotipe neden olduğu bulunmuştur (Oberley and Oberley, 1984;1988). *Mn-SOD* “knockout” farelerin oksidatif DNA hasarına aşırı duyarlı oldukları saptanmıştır (Melov et al,1999). MnSOD’nin overekspresyonu MCF-7 hücre hattında malignant fenotipi baskılayabildiği gözlemlenmiştir (Li et al, 1995). Soini ve arkadaşları (2001) *Mn-SOD* ekspresyonunun invazif meme karsinomlarında *in situ* karsinomlara veya non-neoplastik meme epiteliyal hücrelerine göre düşük olduğu tespit edilmişlerdir (Soini et al, 2001).

Mn-SOD ala-9val polimorfizminin prostat kanseri, kolorektal kanser, akciğer kanseri, mesane kanseri, over kanseri ve meme kanseri gibi değişik kanserlerle ilişkisini araştıran birçok çalışma yapılmıştır fakat sonuçlar oldukça çelişkilidir. Bu çalışmalarda *Mn-SOD* ala-9val polimorfizminin alanin allelinin prostat kanserinde (OR=1.72 %95CI=0.96-3.08), over kanserinde (OR=2.1 %95CI=1.1-4.0)) kolon kanserinde (sadece genç Hispanik kökenli hastalarda) risk oluşturduğu bulunmuştur (Woodson et al, 2003; Olson et al, 2004; Stoehlmacher et al, 2002). Fakat bu kanserlerle ilgili diğer çalışmalar bu bulguları desteklememiştir. Örneğin Levine ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Mn-SOD* ala-9val polimorfizminin risk oluşturmadığı bulunmuştur (Levine et al, 2002).

Mn-SOD val/val genotipinin ise mesane kanser riski (OR=1.91, 95 % CI=1.20–3.04) ve akciğer kanser riski (OR=1.67, 95% CI=1.27–2.20) oluşturduğu bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmalarla ala/val heterozigotlarında akciğer ve mesane kanser riski taşıdığı tespit edilmiştir (Hung et al, 2004; Wang et al, 2001).

Mn-SOD ala-9val polimorfizmi en fazla meme kanserinde çalışılmıştır. Diğer kanserlerde olduğu gibi burada da sonuçlar oldukça çelişkilidir. Ambrosone ve arkadaşlarının (1999) yaptığı çalışmada ala/ala genotipi taşıyan özellikle premenopoz kadınların bir veya iki valin alleli taşıyanlara göre 4 kat fazla meme kanseri riski (OR= 4.3, 95% CI=1.7–10.8) taşıdıkları bulunmuştur. Risk az meyve tüketen bayanlar arasında

daha da belirgindir. Fakat postmenopozal bayanlarda risk iki kat olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir (OR=1.8, 95% CI=0.9–3.6). Bu bayanların antioksidantça zengin bir diyetle beslenmeleri de bu riskin azalmasında önemli rol oynamamaktadır (Ambrosone et al, 1999).

Mitrunen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise ala/ala genotipini taşıyan postmenopozal kadınların val/val taşıyanlara göre meme kanserine yakalanma riski 2,5'tir (95% CI=1.3–4.8) (Mitrunen et al, 2001). Egan ve arkadaşları da postmenopoz döneminde olan ve ala/ala genotipi taşıyan bayanlarda bu riskin 1.26 (95% CI=0.79–2.03) olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca heterozigot ve premenopozal dönemde olan bayanlarda riskin 1.88 (95% CI=1.04–3.39) olduğu bulunmuştur (Egan et al, 2003).

Cai ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da ala/ala genotipinin özellikle premenopozal bayanlarda meme kanser riskini arttırdığı bulunmuştur (OR=1.3, 95% CI=0.7-2.3). Özellikle riskin BM indeksi yüksek olan bayanlarda daha da fazla olduğu saptanmıştır (OR= 2.5, 95% CI= 0.9–7.0) (Cai et al, 2004).

Bergman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise genç meme kanseri vakaları ve val/val genotipi arasında bağlantı bulunmuşlardır. Buna göre val/val genotipi taşıyan genç bayanlarda meme kanserine yakalanma riski yüksektir (OR=2.7; 95% CI= 2.2-5.5; p=0.01) (Bergman et al, 2005).

Yapılan diğer çalışmalara göre de meme kanseri ve *Mn-SOD* ala-9val polimorfizmi arasında ilişki bulunamamıştır (Egan et al, 2003; Knight et al, 2004; Tamimi et al, 2004).

Sonuçların bu kadar farklı olmasının birçok sebebi olabilir. Wang ve arkadaşlarının düşündüğü gibi *Mn-SOD* polimorfizminin etkisi dokuya ve tümör bölgesine göre değişiklik gösterebilir. Ayrıca şimdiye kadar yapılmış çalışmaların sonuçlarını yorumlamanın diğer bir zorluğu da; valin varyantı hatalı taşınmaya sebep olduğu halde normal aktivite gösteren alanin varyantının değişik kanser gruplarında daha fazla risk oluşturmasıdır. Bunun bir açıklaması *Mn-SOD* tarafından üretilen H_2O_2 'in detoksifiye edilmediği takdirde toksik etki yaratabileceğidir. Bu da H_2O_2 'i etkisiz hale getiren enzimlerin, Glutation peroksidaz, katalaz gibi, ne kadar etkin çalıştığına bağlıdır. Diğer taraftan meme, over ve prostat gibi hormona bağlı olarak

çalışan organlarda alanin alleli rol oynarken akciğer mesane gibi organlarda valin allelinin rol oynaması da ilginçtir. Bu mekanizmaların nasıl olduğuna dair ilave araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Bu çelişkili sonuçların diğer bir sebebi de *Mn-SOD* allel frekanslarının etnik gruplara göre çok farklı olmasıdır (Çizelge 1.4, 1.5). Shimoda-Matsubayashi ve ark. (1996) ve van Landeghem ve ark. (1999) *MnSOD* ala allelinin Japon ve Çin popülasyonlarında sırsıyla %12 ve %30 olarak bulmuşlardır. Oysa Caucasian'larda bu oran oldukça yüksektir (%50). van Landeghem ve arkadaşları *Mn-SOD*'nin allel frekansını değişik dil gruplarında incelemişlerdir ve alanin allel frekansının gruplar arasında farklı olduğunu tespit etmişlerdir. Saamis ve Lituonianların ala alleli frekansı yüksek iken (sırsıyla %62 ve %56) İsveçlilerde bu frekansın (%41) daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca *Mn-SOD* genotipinin etkisi çevresel etmenlerin etkisiyle ROT azalması veya artmasına göre de değişebilmektedir. Bu etkileşimde yine popülasyonlara göre değişkenlik gösterebilir. Yine *Mn-SOD-9val* allelinin, linkage disequilibrium gösteren ve enzimin transportunu ve/veya aktivitesini etkileyen karakterize edilmemiş variantlar da olabilir. Birçok SNP için olduğu gibi *Mn-SOD* ala-9val polimorfizmine dair mekanizmanın da çok daha karmaşık olabileceği düşünölmektedir (Chanock and Wacholder , 2002, Weiss et al, 2000; Millikan et al, 2004).

Çalışmamızda incelenen hasta ve kontrol popülasyonumuz diğer çalışmalara göre küçük olmakla birlikte bu çalışmada elde edilen bulgular Egan et al, (2003), Knight et al, (2004) ve Tamimi et al, (2004) yaptığı çalışma sonuçları ile uyum göstererek *Mn-SOD* ala-9-val polimorfizminin meme kanserine yatkınlık sağlayan bağımsız bir risk faktörü olmadığını göstermektedir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda *Mn*-SOD ala-9val polimorfizminin meme kanserine yatkınlık sağlayan bağımsız bir risk faktörü olmadığı bulunmuştur. Odds ratio değerlendirildiğinde az da olsa *Mn*-SOD ala-9val polimorfizmi bakımından heterozigot bireylerin odds ratiosunun (OR=1.476, 95% CI=0.978–2.229, df=1, P=0.063) anlamlı olduğu gözlenmiştir. Fakat bu değer istatistiksel olarak anlamsızdır.

Daha net sonuçların elde edilebilmesi için daha geniş hasta ve kontrol popülasyonuna ihtiyaç vardır. Hastaların ve kontrollerin etnik kökeni ve menopoz durumu göz önüne alınarak geniş kapsamlı çalışmalar yapılması sonuçların aydınlatılmasında önem taşımaktadır. Ayrıca hastaların genotiplerinin hastalık açısından değerlendirilebilmesi için çok geniş klinik bilgiler gerekmektedir.

Mn-SOD'nin yanında diğer iki SOD genindeki polimorfizmlerinin incelenmesi bunların gen-gen etkileşimlerini ortaya koyması bakımından aydınlatıcı olabilir. Ayrıca horman metabolizması, redoks homeostazisi, DNA tamiri gibi kanserleşme açısından önemli olan olaylarda rol oynayan diğer genlerin de (GPX1, CYP, GST, NAT, ER, PR, VDR, ADH, XRCC1, TNF α ve Hsp70de) *Mn*-SOD ala-9-val polimorfizmi ile ilişkisinin araştırılması meme kanser mekanizmasını aydınlatmak açısından önemli olabilir.

KAYNAKLAR

- Agrawal, S., and Eng, C., (2006). Differential expression of novel naturally occurring splice variants of PTEN and their functional consequences in Cowden syndrome and sporadic breast cancer. *Hum. Mol. Genet.* 15(5):777-87.
- Akkuş, İ., (1995). Serbest Radikaller. *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri* Konya: Mimoza Yayınları s.1–10.
- Akyol, O., Herken, H., U.Z., E., Fadillioglu, E., Unal, S., Sogut, S., Ozyurt, H., Savas, H.A., (2002). The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients. The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry.* 26(5): 995-1005.
- Akyol, O., Yanik, M., Elyas, H., Namli, M., Canatan, H., Akin, H., Yuce, H., Yilmaz, H.R., Tutkun, H., Sogut, S., Herken, H., Ozyurt, H., Savas, H.A., Zoroglu, S.S., (2005). Association between Ala-9Val polymorphism of Mn-SOD gene and schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 29(1):123-31.
- Ambrosone, C.B, Freudenheim, J.L., Thompson, P.A., Bowman, E., Vena J.E., Marshall, J.R., Graham, S., Laughlin, R., Nemoto, T., Shields, P.G., (1999). Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. *Cancer Res.* 59(3): 602–6.
- Andersen, P.M., Nilsson, P., Keranen, M.L., Forsgren, L., Hagglund, J., Karlsborg, M., Ronnevi, L.O., Gredal, O., Marklund, S.L. (1997). Phenotypic heterogeneity in motor neuron disease patients with CuZn-superoxide dismutase mutations in Scandinavia. *Brain.* 120 (Pt 10):1723–37.
- Andreasen, N.C., (1995). Symptoms, signs, and diagnosis of schizophrenia. *Lancet.* 346: 477-481.
- Armes, J.E., Trute, L., White, D., Southey, M.C., Hammet, F., Tesoriero, A., Hutchins, A.M., Dite, G.S., McCreddie, MR., Giles, G.G., Hopper, J.L., Venter, D.J., (1999). Distinct molecular pathogenesis of early-onset breast cancers in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a population-based study. *Cancer Res.* 59(8):2011-7
- Athma, P., Rappaport, R., Swift, M., (1996). Molecular genotyping shows that ataxia-telangiectasia heterozygotes are predisposed to breast cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 92: 130-134.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S-Y., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, NI., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., Ziv, Y., (1998). Enhanced Phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science.* 281: 1674-1677.
- Bergman, M, Ahnstrom M, Palmeback-Wegman P, Wingren S., (2005). Polymorphism in the manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene and risk of breast cancer in

- young women. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 131(7):439-44.
- Bingham, S.A., Luben, R., Welch, A., Wareham, N., Khaw, K.T., Day N., (2003). Are imprecise methods obscuring a relation between fat and breast cancer? *Lancet.* 362(9379): 212-4.
- Bordo, D., Djinić, K., Bolognesi, M., (1994). Conserved patterns in the Cu,Zn superoxide dismutase family. *J. Mol. Biol.* 238(3): 366-86.
- Boyd, N.F., McGuire, V., (1991). The possible role of lipid peroxidation in breast cancer risk. *Free Radic. Biol. Med.* 10(3-4):185-90.
- Cai, Q., Shu, X.O., Wen, W., Cheng, J.R., Dai, Q., Gao, Y.T., Zheng, W., (2004). Genetic polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene, antioxidant intake, and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study. *Breast Cancer Res.* 6(6): 647-55.
- Carpenter, C.L., Ross, R.K., Paganini-Hill, A., Bernstein, L., (2003). Effect of family history, obesity and exercise on breast cancer risk among postmenopausal women. *Int. J. Cancer.* 106(1): 96-102.
- Cerutti, P.A., Trump, B.F., (1991). Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. *Cancer Cells.* 3(1):1-7.
- Chanock, S. and Wacholder S., (2002). One gene and one outcome? No way. *Trends. Mol. Med.* 8(6): 266-9.
- Colditz, G.A., (1998). Relationship between estrogen levels, use of hormone replacement therapy, and breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 90(11): 814-23.
- Collins, F.S., Guyer, M.S., Chakravarti, A., (1997). Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science.* 278(5343): 1580-1.
- Das, K.C., Guo, X.L., White, C.W., (1998). Protein kinase C-dependent induction of manganese superoxide dismutase gene expression by microtubule-active anticancer drugs. *J. Biol. Chem.* 273(51):34639-45.
- Davis, C.A., Hearn, A.S., Fletcher, B., Bickford, J., Garcia, J.E., Leveque, V., Melendez, J.A., Silverman, D.N., Zucali, J., Agarwal, A., Nick, H.S., (2004). Potent anti-tumor effects of an active site mutant of human manganese-superoxide dismutase. Evolutionary conservation of product inhibition. *J. Biol. Chem.* 279 (13): 12769-76.
- Deligezer, U., Akisik, E.E., Dalay, N., (2005). Homozygosity at the C677T of the MTHFR gene is associated with increased breast cancer risk in the Turkish population. *In Vivo.* 19(5): 889-93.
- Dumitrescu, R.G. and Cotarla I., (2005). Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005? *J. Cell Mol. Med.* 9(1): 208-21.

- Egan, K.M., Thompson, P.A., Titus-Ernstoff, L., Moore, J.H., Ambrosone, C.B., (2003). MnSOD polymorphism and breast cancer in a population-based case-control study. *Cancer Lett.* 199(1): 27-33.
- Ergul, E., Sazci, A., Utkan, Z., Canturk, N.Z., (2003). Polymorphisms in the MTHFR gene are associated with breast cancer. *Tumour Biol.* 24(6): 286-90.
- Fahl, W.E., Lalwani, N.D., Watanabe, T., Goel, S.K., Reddy, J.K., (1984). DNA damage related to increased hydrogen peroxide generation by hypolipidemic drug-induced liver peroxisomes. *Proc. Nat.l Acad. Sci U.S.A.* 81(24): 7827-30.
- Faraci, F.M. and Didion, S.P., (2004). Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24(8): 1367-73.
- Faraci, F.M., (2003). Vascular protection. *Stroke.* 34(2): 327-9
- Farin, F.M., Hitosis, Y., Hallagan, S.E., Kushleika, J., Woods, J.S., Janssen, P.S., Smith-Weller, T., Franklin, G.M., Swanson, P.D., Checkoway, H., (2001). Genetic polymorphisms of superoxide dismutase in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 16(4): 705-7.
- Fearon, E.R. and Cho, K.R., (1997). The Molecular Biology of Cancer. *Principles and Practice of Medical Genetics* (Eds. DL. Rimoin, JM. Connor and RE. Pyeritz) Pearson Professional Limited. New York, pp: 405-438
- FitzGerald, M.G., MacDonald, D.J., Krainer, M., Hoover, I., O'Neil, E., Unsal, H., Silva-Arrieto, S., Finkelstein, D.M., Beer-Romero, P., Englert, C., Sgroi, D.C., Smith, B.L., Younger, J.W., Garber, J.E., Duda, R.B., Mayzel, K.A., Isselbacher, K.J., Friend, S.H., Haber, D.A., (1996). Germ-line BRCA1 mutations in Jewish and non-Jewish women with early-onset breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 334: 143-149
- Ford, D., Easton, D.F., Bishop, D.T., Narod, S.A., Goldgar, D.E., (1994). Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet* 343(8899): 692-5
- Fridovich, I., (1998). The trail to superoxide dismutase. *Protein Sci.* 7(12): 2688-90.
- Getzoff, E.D., Tainer, J.A., Stempien, M.M., Bell, G.I., Hallewell, R.A., (1989). Evolution of CuZn superoxide dismutase and the Greek key beta-barrel structural motif. *Proteins.* 5(4):322-36.
- Göksel, HA., (1991). Meme Hastalıkları. Genel Cerrahi, Ed.: İskender Sayek. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. S. 526-527
- Grasbon-Frodl, E.M, Kosel, S., Riess, O., Muller, U., Mehraein, P., Graeber, M.B., (1999). Analysis of mitochondrial targeting sequence and coding region polymorphisms of the manganese superoxide dismutase gene in German Parkinson disease patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255(3): 749-52.

- Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M., Harris, C.C., (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 54(18): 4855-78
- Haas, R.H., Nasirian, F., Nakano, K., Ward, D., Pay, M., Hill, R., Shults, C.W., (1995). Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 37(6): 714-22.
- Hanf, V. and Gonder, U. (2005). Nutrition and primary prevention of breast cancer: foods, nutrients and breast cancer risk. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 123(2): 139-49.
- Heller, R.A., Schena, M., Chai, A., Shalon, D., Bedilion, T., Gilmore, J., Woolley, D.E., Davis R.W., (1997). Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94(6): 2150-5.
- Henderson, B.E. and Feigelson, H.S., (1997). Epidemiology and Screening, Textbook of Breast Cancer-A Clinical Guide to Therapy (Eds. G. Bonadonna, GN. Hortobagyi and AM. Gianni) Martin Dunitz Ltd. London pp:1-16
- Holbro, T., Civenni, G., Hynes, N.E., (2003). The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp. Cell. Res.* 284(1): 99-110.
- Holla LI, Kankova K, Vasku A. (2006) Functional polymorphism in the manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene in patients with asthma. *Clin Biochem.* 39(3):299-302.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Haris, C.C., (1991). p53 mutations in human cancers. *Science.* 253(5015): 49-53.
- Hori, H., Ohmori, O., Shinkai, T., Kojima, H., Okano, C., Suzuki, T., Nakamura, J., (2000). Manganese superoxide dismutase gene polymorphism and schizophrenia: relation to tardive dyskinesia. *Neuropsychopharmacology.* 23(2): 170-7.
- Hsu, J.L., Hsieh, Y., Tu, C., O'Connor, D., Nick, H.S., Silverman, D.N., (1996). Catalytic properties of human manganese superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 271(30): 17687-91.
- Huang, C.S., Chern, H.D., Chang, K.J., Cheng, C.W., Hsu, S.M., Shen, C.Y., (1999). Breast cancer risk associated with genotype polymorphism of the estrogen-metabolizing genes CYP17, CYP1A1, and COMT: a multigenic study on cancer susceptibility. *Cancer Res.* 59(19): 4870-5.
- Hung, R.J., Boffetta, P., Brennan, P., Malaveille, C., Gelatti, U., Placidi, D., Carta, A., Hautefeuille, A., Porru, S., (2004). Genetic polymorphisms of MPO, COMT, MnSOD, NQO1, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk. *Carcinogenesis.* 25(6): 973-8.
- Inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M., Park, A.M., Kira, Y., Imada, I., Utsumi, K., (2003).

Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life.
Curr. Med. Chem. 10(23): 2495-505.

- Jackson, J.H., (1994). Potential molecular mechanisms of oxidant-induced carcinogenesis.
Environ. Health. Perspect. 102 Suppl 10: 155-7.
- Janetzky, B., Hauck, S., Youdim, M.B., Riederer, P., Jellinger, K., Pantucek, F., Zochling, R., Boissl, K.W., Reichmann, H., (1994). Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 169(1-2): 126-8.
- Jones, N.C., Rigby, P.W., Ziff, E.B., (1988). Trans-acting protein factors and the regulation of eukaryotic transcription: lessons from studies on DNA tumor viruses. *Genes Dev.* 2(3): 267-81.
- Jordan, V.C., (2004). Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in cancer. *Cancer Cell.* 5(3): 207-13.
- Kalemi, T.G., Lambropoulos, A.F., Gueorguiev, M., Chrisafi, S., Papazisis, K.T., Kotsis, A., (2005). The association of p53 mutations and p53 codon 72, Her 2 codon 655 and MTHFR C677T polymorphisms with breast cancer in Northern Greece. *Cancer Lett.* 222(1): 57-65.
- Khanna, K.K., Chenevix-Trench, G., (2004). ATM and genome maintenance: defining its role in breast cancer susceptibility. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia.* 9(3): 247-62.
- Kim, H.P., Roe, J.H., Chock, P.B., Yim, M.B., (1999). Transcriptional activation of the human manganese superoxide dismutase gene mediated by tetradecanoylphorbol acetate. *J. Biol. Chem.* 274(52): 37455-60.
- Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M., (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44: 239-67.
- Knight, J.A., Onay, U.V., Wells, S., Li, H., Shi, E.J., Andrulis, I.L., Ozelik, H. (2004) Genetic variants of GPX1 and SOD2 and breast cancer risk at the Ontario site of the Breast Cancer Family Registry. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13(1): 146-9.
- Kovach, J.S., Hartmann, A., Blaszyk, H., Cunningham, J., Schaid, D., Sommer, S.S., (1996). Mutation detection by highly sensitive methods indicates that p53 gene mutations in breast cancer can have important prognostic value. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(3): 1093-6.
- Lachman, H.M., Papolos, D.F., Saito, T., Yu, Y.M., Szumlanski, C.L., Weinshilboum, R.M., (1996). Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics.* 6(3): 243-50.
- Lander, H.M., Ogiste, J.S., Teng, K.K., Novogrodsky, A., (1995). p21ras as a common

signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress. *J. Biol. Chem.* 270(36): 21195-8.

- Lebovitz, R.M., Zhang, H., Vogel, H., Cartwright, J.R., Dionne, L., Lu, N., Huang, S., Matzuk, M.M., (1996). Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(18):9782-7.
- Levine AJ, Elkhoully E, Diep AT, Lee ER, Frankl H, Haile RW (2002) The MnSOD A16V mitochondrial targeting sequence polymorphism is not associated with increased risk of distal colorectal adenomas: data from a sigmoidoscopy-based case control study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11(10 Pt 1): 1140-1.
- Li, H., Kantoff, P.W., Giovannucci, E., Leitzmann, M.F., Gaziano, J.M., Stampfer, M.J., Ma, J., (2005). Manganese superoxide dismutase polymorphism, prediagnostic antioxidant status, and risk of clinical significant prostate cancer. *Cancer Res.* 65(6): 2498-504.
- Li, J.J., Oberley, L.W., Clair, D.K., Ridnour, L.A., Oberley, T.D., (1995). Phenotypic changes induced in human breast cancer cells by overexpression of manganese-containing superoxide dismutase. *Oncogene.* 10(10): 1989-2000.
- Li, F.P., (1990). Familial Cancer Syndromes and Clusters. *Curr. Probl. Cancer.* 14: 73-144
- Lin, P., Hsueh, Y.M., Ko, J.L., Liang, Y.F., Tsai, K.J., Chen, C.Y., (2003). Analysis of NQO1, GSTP1, and MnSOD genetic polymorphisms on lung cancer risk in Taiwan. *Lung Cancer.* 40(2): 123-9.
- Liu, G., Zhou, W., Park, S., Wang, L.I., Miller, D.P., Wain, J.C., Lynch, T.J., Su, L., Christiani, D.C., (2004). The SOD2 Val/Val genotype enhances the risk of nonsmall cell lung carcinoma by p53 and XRCC1 polymorphisms. *Cancer.* 101(12): 2802-8.
- Macmillan-Crow, L.A., Cruthirds, D.L., (2001). Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic. Res.* 34(4): 325-36.
- Mahadik, S.P., Mukherjee, S., (1996). Free radical pathology and antioxidant defense in schizophrenia: a review. *Schizophr. Res.* 19(1): 1-17.
- Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., Fraumeni, J.F., Nelson, C.E., Kim, D.H., Kassel, J., Gryka, M.A., Bischoff, F.Z., Tainsky, M.A., Friend, S.H., (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science.* 250(4985): 1233-8.
- McDonnell, D.P. and Norris, J.D., (2002). Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science.* 296(5573): 1642-4.
- Melov, S., Coskun, P., Patel, M., Tuinstra, R., Cottrell, B., Jun, A.S., Zastawny, T.H.,

- Dizdaroglu, M., Goodman, S.I., Huang, T.T., Mizioroko, H., Epstein, C.J., Wallace, D.C., (1999). Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96(3): 846-51.
- Mitrunen, K. and Hirvonen, A., (2003). Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. *Mutat. Res.* 544(1): 9-41.
- Mitrunen, K., Sillanpaa, P., Kataja, V., Eskelinen, M., Kosma, V.M., Benhamou, S., Uusitupa, M., Hirvonen, A., (2001). Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and breast cancer risk. *Carcinogenesis.* 22(5): 827-9.
- Mruk, D.D., Silvestrini, B., Mo, M.Y., Cheng, C.Y., (2002). Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception.* 65(4): 305-11.
- Nigro, J.M., Baker, S.J., Preisinger, A.C., Milburn- Jessup, J., Hosteller, R., Cleary, K., Signer, S.H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P., Glover, T., Collins, F.S., Weslon, A., Modali, R., Haris, C.C., Vogelstein, B., (1989). Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature.* 342(6250): 705-8.
- Oberley, L.W. and Oberley, T.D., (1984). The role of superoxide dismutase and gene amplification in carcinogenesis. *J. Theor. Biol.* 106(3): 403-22.
- Oberley, L.W. and Oberley, T.D., (1988). Role of antioxidant enzymes in cell immortalization and transformation. *Mol. Cell Biochem.* 84(2): 147-53.
- Oesterreich, S. And Fuqua, S.A., (1999). Tumor suppressor genes in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer.* 6(3): 405-19.
- Olson, S.H., Carlson, M.D., Ostrer, H., Harlap, S., Stone, A., Winters, M., Ambrosone, C.B., (2004). Genetic variants in SOD2, MPO, and NQO1, and risk of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 93(3): 615-20.
- Overgaard, J., Yilmaz, M., Guldborg, P., Hansen, L.L., Alsner, J., (2000). TP53 mutation is an independent prognostic marker for poor outcome in both node-negative and node-positive breast cancer. *Acta Oncol.* 39(3):327-33.
- Parboosingh, J.S., Rouleau, G.A., Meninger, V., McKenna-Yasek, D., Brown, R.H., Figlewicz, D.A., (1995). Absence of mutations in the Mn superoxide dismutase or catalase genes in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscul. Disord.* 5(1): 7-10.
- Parboosingh, J.S., Rousseau, M., Rogan, F., Amit, Z., Chertkow, H., Johnson, W.G., Manganaro, F., Schipper, H.N., Curran, T.J., Stoessl, J., (1995). Absence of mutations in superoxide dismutase and catalase genes in patients with Parkinson's disease. *Arch. Neurol.* 52(12): 1160-3.
- Ramilo, C.A., Leveque, V., Guan, Y., Lepock, J.R., Tainer, J.A., Nick, H.S., Silverman, D.N.,

- (1999). Interrupting the Hydrogen Bond Network at the Active Site of Human Manganese Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* 274(39): 27711–27716.
- Rebbeck, T.R., (1999). Inherited genetic predisposition in breast cancer. A population-based perspective. *Cancer.* 86(11 Suppl): 2493–501.
- Rodriguez, C. and Theillet, C., (1997). Ataxia-telangiectasia and cancer: an open question. *Bull. Cancer.* 84(7): 763-6
- Rodriguez-Trelles, F., Tarrio, R., Ayala, F.J., (2001). Erratic overdispersion of three molecular clocks: GPDH, SOD, and XDH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(20): 11405-10.
- Rosenblum, J.S., Gilula, N.B., Lerner, R.A., (1996). On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93(9):4471-3.
- Ross, R.K., Paganini-Hill, A., Wan, P.C., Pike, M.C., (2000). Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. *J. Natl. Cancer Inst.* 92(4):.328-32.
- Sazci, A., Ergul, E., Utkan, N.Z., Canturk, N.Z., Kaya, G., (2004). Catechol-O-methyltransferase Val 108/158 Met polymorphism in premenopausal breast cancer patients. *Toxicology.* 204(2-3): 197-202.
- Schulz, W.A., (2005). Breast Cancer. *Molecular Biology of Human Cancers. An Advanced Student's Textbook* Netherland Springer s.357-382
- Semenza, J.C., Delfino, R.J., Ziogas, A., Anton-Culver, H., (2003). Breast cancer risk and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism. *Breast Cancer Res. Treat.* 77(3): 217-23.
- Service, R.F., (1998). New Role for Estrogen in Cancer? *Science.* 279: 1631-1633
- Shimoda-Matsubayashi, S., Matsumine, H., Kobayashi, T., Nakagawa-Hattori, Y., Shimizu, Y., Mizuno, Y., (1996). Structural Dimorphism in the Mitochondrial Targeting Sequence in the Human Manganese Superoxide Dismutase Gene *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226(2): 561-5.
- Shishikura, T., Ichimiya, S., Ozaki, T., Nimura, Y., Kageyama, H., Nakamura, Y., Sakiyama, S., Miyauchi, M., Yamamoto, N., Suzuki, M., Nakajima, N., Nakagawara, A., (1998). Mutational analysis of the p73 gene in human breast cancers. *Int J Cancer.* 84(3): 321-5
- Smith, M.W. and Doolittle, R.F., (1992). A comparison of evolutionary rates of the two major kinds of superoxide dismutase. *J Mol Evol.* 34(2):175-84.
- Smith, PD., Crossland, S., Parker, G., Osin, P., Brooks, L., Waller, J., Philp, E., Crompton, M.R., Gusterson, B.A., Allday, M.J., Crook, T., (1999). Novel p53 mutants selected in BRCA-associated tumours which dissociate transformation suppression from other wild-type p53 functions. *Oncogene.* 18(15): 2451-9

- Soini, Y., Vakkala, M., Kahlos, K., Paakko, P., Kinnula, V., (2001). MnSOD expression is less frequent in tumour cells of invasive breast carcinomas than in in situ carcinomas or non-neoplastic breast epithelial cells. *J. Pathol.* 195(2): 156-62.
- Stal, O., Stenmark-Askmal, M., Wingren, S., Rutqvist, L.E., Skoog, L., Ferraud, L., Sullivan, S., Carstensen, J., Nordenskjold, B., (1995). p53 expression and the result of adjuvant therapy of breast cancer. *Acta Oncol.* 34(6): 767-70.
- Stoehlmacher, J., Ingles, S.A., Park, D.J., Zhang, W., Lenz, H.J., (2002). The -9Ala/-9Val polymorphism in the mitochondrial targeting sequence of the manganese superoxide dismutase gene (MnSOD) is associated with age among Hispanics with colorectal carcinoma. *Oncol. Rep.* 9(2): 235-8.
- Strachan, T. and Read, A.P., (2004). *Human Molecular Genetics* 3. Garland Science, Taylor and Francis Group, London and New York.
- Strehlow, K., Rotter, S., Wassmann, S., Adam, O., Grohe, C., Laufs, K., Bohm, M., Nickenig, G., (2003). Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ. Res.* 93(2): 170-7.
- Sunpaweravong, S., and Sunpaweravong, P., (2005). Recent developments in critical genes in the molecular biology of breast cancer. *Asian J. Surg.* 28(1):71-5.
- Sutton, A., Khoury, H., Prip-Buus, C., Capanec, C., Pessayre, D., Degoul, F., (2003). The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics.* 13(3):145-57.
- Tamimi, R.M., Hankinson, S.E., Spiegelman, D., Colditz, G.A., Hunter, D.J., (2004). Manganese superoxide dismutase polymorphism, plasma antioxidants, cigarette smoking, and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13(6): 989-96.
- Terry, P.D., Umbach, D.M., Taylor, J.A., (2005). No association between SOD2 or NQO1 genotypes and risk of bladder cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14(3): 753-4.
- Thompson, P.A., Shields, P.G., Freudenheim, J.L., Stone, A., Vena, J.E., Marshall, J.R., Graham, S., Laughlin, R., Nemoto, T., Kadlubar, F.F., Ambrosone, C.B., (1998). Genetic polymorphisms in catechol-O-methyltransferase, menopausal status, and breast cancer risk. *Cancer Res.* 58(10): 2107-10.
- Tomkins, J., Banner S.J., McDermott, C.J., Shaw, P.J., (2001). Mutation screening of manganese superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport.* 12(11):2 19-22.
- Ueda, K., Nishijima, M., Inui, H., Watatani, M., Yayoi, E., Okamura, J., Yasutomi, M., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., (1998). Infrequent Mutations In The Pten/Mmac1 gene among primary breast cancers. *Jpn. J. Cancer Res.* 89(1): 17-21

- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J., (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell Biochem.* 266(1-2):37-56.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*
- Van Landeghem, G.F., Tabatabaie, P., Beckman, G., Beckman, L., Andersen, P.M., (1999). Manganese-containing superoxide dismutase signal sequence polymorphism associated with sporadic motor neuron disease. *Eur. J. Neurol.* 6(6): 639-44.
- Van Landeghem, G.F., Tabatabaie, P., Kucinkas, V., Saha, N., Beckman, G., (1999). Ethnic variation in the mitochondrial targeting sequence polymorphism of MnSOD. *Hum. Hered.* 49(4): 190-3.
- Velculescu, V. and El-Deiry, W.S., (1996). Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor. *Gene Clin Chem.* 42(6): 858-868
- Wan, X.S., Devalaraja, M.N., Clair, D.K., (1994). Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol.* 13(11): 1127-36.
- Wang, L.I., Miller, D.P., Sai, Y., Liu, G., Su, L., Wain, J.C., Lynch, T.J., Christiani, D.C., (2001). Manganese superoxide dismutase alanine-to-valine polymorphism at codon 16 and lung cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* 93(23): 1818-21.
- Wang, M., Dhingra, K., Hittelman, W.N., Liehr, J.G., de Andrade, M., Li, D., (1996). Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5(9): 705-10
- Wassmann, S., Wassmann, K., Nickenig, G., (2004). Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension.* 44(4): 381-6.
- Weinshilboum, R.M., Raymond, F.A., (1977). Inheritance of low erythrocyte catechol-o-methyltransferase activity in man. *Am. J. Hum. Genet.* 29(2): 125-35.
- Weiss, K.M., Terwilliger, J.D., (2000). How many diseases does it take to map a gene with SNPs? *Nat Genet.* 26(2): 151-7.
- Woodson, K., Tangrea, J.A., Lehman, T.A., Modali, R., Taylor, K.M., Snyder, K., Taylor, P.R., Virtamo, J., Albanes, D., (2003). Manganese superoxide dismutase (MnSOD) polymorphism, alpha-tocopherol supplementation and prostate cancer risk in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study (Finland). *Cancer Causes Control.* 14(6):513-8.

www.gebelik-rehberi.com/meme/doku.asp

www.saglik.gov.tr

- Xu, Y., Krishnan, A., Wan, X.S., Majima, H., Yeh, C.C., Ludewig, G., Kasarskis, E.J., Clair, D.K., (1999). Mutations in the promoter reveal a cause for the reduced expression of the human manganese superoxide dismutase gene in cancer cells. *Oncogene*. 18(1): 93-102.
- Yan, T., Li, S., Jiang, X., Oberley, L.W., (1999). Altered levels of primary antioxidant enzymes in progeria skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257(1):163-7.
- Yen, J.H., Chen, C.J., Tsai, W.C., Lin, C.H., Ou, T.T., Hu, C.J., Liu, H.W., (2003). Manganese superoxide dismutase and cytochrome P450 1A1 genes polymorphisms in rheumatoid arthritis in Taiwan. *Hum. Immunol.* 64(3): 366-73.
- Yim, D.S., Parkb, S.K., Yoo, K.Y., Yoon, K.S., Chung, H.H., Kang, H.L., Ahn, S.H., Noh, D.Y., Choe, K.J., Jang, I.J., Shin, S.G., Strickland, P.T., Hirvonen, A., Kang, D., (2001). Relationship between the Val158Met polymorphism of catechol O-methyl transferase and breast cancer. *Pharmacogenetics*. 11(4): 279-86.
- Yue, W., Santen, R.J., Wang, J.P., Li, Y., Verderame, M.F., Bocchinfuso, W.P., Korach, K.S., Devanesan, P., Todorovic, R., Rogan, E.G., Cavalieri, E.L., (2003). Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 86(3-5): 477-86.
- Zelko, I.N., Mariani, T.J., Folz, R.J., (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 33(3): 337-49
- Zhang, H.J., Yan, T., Oberley, T.D., Oberley, L.W., (1999). Comparison of effects of two polymorphic variants of manganese superoxide dismutase on human breast MCF-7 cancer cell phenotype. *Cancer Res.* 59(24): 6276-83.

ÖZGEÇMİŞ

1974 Plovdiv (Bulgaristan) doğumluyum. İlk ve Ortaokulu Bulgaristan'da okudum. Liseye 1988 yılında Sliven Rus Lisesi'nde (Bulgaristan) başladım. 1989 yılında Türkiye'ye geldim ve 1991 yılında Bursa Cumhuriyet Lisesi'nden mezun oldum. 1996 yılında Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesinden mezun oldum. 1997 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji A.B.D. yüksek lisans programına kaydoldum. Yüksek lisansın ders aşamasını Uludağ Üniversitesinde tamamlayarak 1998 yılında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün Tıbbi Biyoloji A.B.D yüksek lisans programına yatay geçiş yaptım ve 2001 yılında Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünden Yüksek Lisansımı aldım. 2002 yılında Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji A.B.D. Doktora programına kaydoldum. Halen Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.