

71332

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**Danışman
Prof. Dr. Beyhan ÖMER**

**MEME KANSERLİLERDE
NÜKLEER DNA ÜZERİNE
OKSİDATİF HASARIN ETKİSİ**

**Doktora Tezi
Ayşe Tülin ÖZDEN
Biyokimya Uzmanı**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

İstanbul, 1998

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimleriyle bana destek olan değerli hocam Prof. Dr. Beyhan Ömer'e, bana yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Müjdat Uysal ve Prof. Dr. Figen Gürdöl'e, çalışma hayatımda hep yakın ilgi ve desteğini gördüğüm Prof. Dr. Günay Saner'e, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp ve İstanbul Tıp Fakülteleri Genel Cerrahi Kliniklerinden hasta bulmamı sağlayan Prof. Dr. Haluk Saner ve Doç. Dr. Mahmut Müslümanoğlu'na, çalışmalarım esnasında yakın desteklerini gördüğüm Doç. Dr. Günnur Deniz, Dr. Gülderen Yanıkaya-Demirel, Kimyager Nurşen Toruş ve Kim. Müh. Hüseyin Yılmazgüç'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-149/ 231095

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	4
GEREÇ VE YÖNTEM	30
BULGULAR.....	46
TARTIŞMA.....	58
ÖZET	69
SUMMARY	71
KAYNAKLAR.....	73
ÖZGEÇMİŞ.....	88

KISALTMALAR

BRCA 1	Meme kanseri 1 (<u>B</u> reast <u>c</u> ancer 1)
BRCA 2	Meme kanseri 2 (<u>B</u> reast <u>c</u> ancer 2)
Ca	Karsinom
Cu	Bakır
DI	DNA indeksi
DNA	Deoksiribonükleik asit
GPx	Glutasyon peroksidaz
MDA	Malondialdehit
PBS	Phosphate-buffered saline (Fosfatla tamponlanmış tuzlu su).
SOD	Süperoksit dismutaz
Zn	Çinko

GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser oluşumu genetik ve çevresel faktörlerin rol oynadığı çok basamaklı bir olaydır (50). Kanser etiolojisinde kalıtsal yatkınlıkla birlikte %80 oranında çevresel faktörler yer alır. Başlıca çevresel faktörleri ise çeşitli kimyasal yapılar, viral ve fiziksel ajanlar oluşturur (106).

Serbest oksijen radikalleri ve lipit peroksitler normal metabolik olaylar sırasında veya çevresel faktörlerin etkisiyle ortaya çıkar (62). Bunlar DNA bazlarında hasar oluşturabilen reaktif bileşiklerdir (5,34,50,66,112). Tümörün başlama, gelişme ve yayılımında patojenik rolünün olduğu ileri sürülmektedir (27,62). Serbest oksijen radikalleri başlıca süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz gibi enzimlerin rol aldığı çeşitli metabolik yollarla uzaklaştırılır. DNA'ya oksidatif hasarın ve antioksidan savunma sistemindeki değişikliklerin karsinogenezde önemli olduğu düşünülmektedir (27,62,110). Serbest radikal oluşum hızı ile onların antioksidan sistemlerle etkisizleştirilme hızı dengede olduğu sürece organizma bu bileşiklerden etkilenmez.

DNA'nın lipit peroksidasyon yıkım ürünü olan MDA (malondialdehit) gibi mutajenlere maruz kalması mitozu indükler ve

mutasyonları artırır. Ancak peroksidasyon ile tümörün büyümesi arasındaki bağlantının derecesi tartışmalıdır (14,15,43).

Çinko ve bakır farklı biyolojik olaylarda önemli rol oynayan eser elementlerdir. Zn genetik mesajların iletimi, organizmanın büyüme ve gelişimi ve Cu'la birlikte SOD'un kofaktörü olarak etki yapar. Bu nedenle bu elementlerin karsinojenik olayları etkileyebileceği düşünülmektedir (99,100).

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür (8,28,48). Tüm yeni malign neoplazmların %32'sini ve kadınlarda kanserden ölümlerin %18'ni oluşturur (48).

Normal meme dokusunun kanser hücreğine dönüşmesi çok aşamalı, karmaşık bir süreçtir. Meme karsinogenezinin karmaşık özellikleri tümörlerin biyolojik özelliklerine de yansır. Bu özelliklerin bir bölümü hastalığın klinik gidişine ışık tutması açısından tanıda önem taşır. Meme kanserlilerde farklılaşma ve proliferasyonu gösteren DNA ploidi ve %S faz fraksiyonu hastanın yaşam süresi açısından ve hastalara farklı tedavilerin seçiminde gerekli olduğu bildirilmiştir (55,56). Ancak akım sitometrik çalışmaların sonuçları tartışmalıdır (38). Meme kanserinde klinik gidiş ve DNA ploidi arasında kompleks bir ilişki gösterilmiştir (55,56).

Nükleer DNA içeriği kanserlerde prognozun takip ve değerlendirilmesi açısından önemli olan objektif bir bulgudur. Nükleer DNA içeriğinin dağılımı ve tipi ile yaşam süresi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (55,56).

Zn ve MDA'nın hücre siklus fazları üzerine etkili olabileceği ileri sürülmüştür (14,15,91).

Biz de bu görüşler ışığında meme kanseri ve meme kanseri için yüksek riskli grup olan selim meme hastalığı saptanan kişilerde lipit peroksidasyon ve eser element düzeylerinde olabilecek değişiklikleri, bunların DNA ploidi ve bir proliferasyon göstergesi olan S faz fraksiyonu üzerine etkilerini araştırmak istedik. Bu amaç için;

- 1) Selim meme hastalığı ve meme kanseri tanısı konmuş kadınlar ile sağlıklı kontrollerden kan alınarak serumda Zn, Cu düzeyleri,
- 2) Meme kanserlilerde tümör ve tümör dışındaki normal meme dokusu ile selim meme hastalığı saptanan grubun biyopsi örneklerinde MDA, Zn, Cu düzeyleri ile tümör ve biyopsi örneklerinde akım sitometresi ile DNA ploidi, DNA indeksi ve S faz fraksiyonları incelendi.

GENEL BİLGİLER

MEME

Meme değişmiş bir ter bezi olarak kabul edilir ve kadının yaşamı boyunca sürekli değişim içinde bulunur. Pübertedeki değişiklikleri, her bir menstrüel siklüsdeki, gebelikteki, laktasyondaki değişiklikler ve menopozdaki gerileme izler (8,52).

Meme çok sayıda loblardan oluşmuştur. Bunlar birbirlerinden yağ dokusuyla karışık yoğun fibroz dokudan oluşmuş bölmelerle ayrılır. Her lob ayrı bir kanalla meme başına açılır. Bu kanallardan herbiri içeriye uzadıkça dallara ve yan dallara ayrılır. Gebelik ve laktasyon döneminde asinüslere dönüşen terminal tomurcuklar ile bunları çevreleyen stroma, lobların alt birimleri olan lobulusları oluşturur. Lobulusların stroması özeldir, hormonlara duyarlıdır. Bu stroma asit mukopolisakkaritten oluşmuş bir matriks içinde genellikle gevşek dağılmış kollajen liflerden oluşmuştur, çok sayıda kapiller içerir, birkaç lenfosit, histiosit, plazma hücresi ve mast hücresi de bulunur. İntralobüler stroma çevresinde bulunan fibroz bağ ve yağ dokusundan keskin bir sınırla ayrılmıştır (7,8,52). Fetal gelişme sırasında ve doğumdan sonra yaklaşık 4.aya kadar memede 15 ile 25 arasında dallanan epitel kanallarından oluşmuş bir kanal

sistemi vardır. Puberteye kadar sessiz bir dönem geçer, pubertede kanallarda yeniden büyüme başlar. Kadınlarda, adolesan döneminde duktus gelişmesi devam eder buna çevre fibroz ve yağlı dokuda artış, tubulus veya duktusların ucundaki hücre tomurcuklarında gelişme eşlik eder. Hormon uyarıları ile bu tomurcuklardan asinüs benzeri yapılar farklılaşır, gebelik ve laktasyon oluştuğunda asinüs gelişmesi en üst noktadadır ve asinüsler salgı aktivitesi gösterir. Her menstrüel siklüste hiperplazi ve bunu izleyen gerilemeden oluşan hafif siklüs değişiklikleri görülür. Memenin pübertedeki normal gelişmesi ile gebelikte bağ dokusunun kanal bölümünün gelişmesinde östrojenin belirgin rolü vardır, buna karşılık asinüs gelişmesinden progesteron sorumludur. Gebelik sırasında memenin tam gelişmesini sağlamada prolaktin ve büyüme hormonu, östrojen ve progesteron ile sinerjik etkilidir. Tiroksin, hidrokortizon ve insülin gibi diğer hormonlar da meme epitelinin tam gelişmesi için gereklidir. Gebelik ve laktasyon sırasında memedeki yoğun bez yapısı ve aşırı aktif epitel, fizyolojik olarak hormonla uyarılmanın sonucudur. Menopozdan sonra gerileme oluşur, yoğun yağ dokusunun yavaş yavaş bez dokusunun yerini almasına neden olur.

Memedeki patolojik değişiklikler; hormona bağlı siklus aktivitesindeki bozukluklar, birikmiş salgıların tahriş edici etkileri, akut ve kronik enfeksiyonlar ile tümörlerdir (8,52).

Selim Meme Hastalıkları

Meme displazisinin özelliği meme epitelinde ve bağ dokusunda değişik derecelerde proliferasyondur, buna çoğu kez kanallarda kistik genişleme eşlik eder. Hastalığın çeşitli evreler veya türlerinin göstergesi olarak şu terimler kullanılmaktadır. Fibrokistik hastalık, fibrokistik mastit, kistik hiperplazi, memenin kistik hastalığı, meme adenozisi ve adenofibrozis (48,50). Meme displazisi, memeyi etkileyen hormonların (östrojen ve progesteron) bir dengesizliğinden veya meme dokusunun bu hormon etkilerine karşı düzensiz ve anormal yanıt vermesinden oluşmaktadır. Atılamayan salgıların ve dökülen maddelerin tahriş edici etkileri de, başka bir etken olarak kabul edilmektedir. Östrojen fazlalığı en sık rastlanılan nedendir. Östrojenin farelere injeksiyonu kistik oluşumlara ve hiperplaziye neden olmuştur (8).

Meme displazisinin üç türü ayrı ayrı tanımlanmıştır, ancak tek bir lezyon içinde bunların karışımı da bulunabilir.

1) Lobuler Fibrozis: En az derecede değişikliğin görüldüğü türdür. Klinik olarak ayırıcı tanı özellikleri, periyodik şişme, rahatsızlık duygusu ve memede küçük nodüllerin bulunmasıdır. Ağrı ve şişme en çok menstrüasyon öncesi dönemde görülebilir. Mikroskopik olarak memenin bağ dokusu stromasıyla kaynaşan intralobüler fibrozis vardır, lobüler kanallar genişlemiştir, ancak kist yoktur. Karsinomla etyolojik ilişkisi bulunmaz (8).

2) Adenozis. Yaygın nodüller bulunur. Bu nodüller epitel hiperplazisi, fibrozis ve mikroskopik kist oluşumu nedeniyle. En büyük özelliği epitel hiperplazisidir. Küçük kanallarda proliferasyon vardır.

Bunlardan bazıları genişlemiş ve mikrokistik olabilir. Adenoziste çoğu kez intralobüler fibrozis gelişir ve proliferen olan epitel kitlelerine baskı yaparak bunların büzölüp çekilmesine neden olur. Adenofibrozis veya sklerozan adenozis olarak bilinen böyle bir lezyon karsinomla karıştırılabilir. Bu selim lezyonda en aktif dönemi dışında mitoz yoktur (8).

3) Fibrokistik hastalık: Meme displazisinin çok görülen bu türü makroskopik olarak çoğu kez kistlerin varlığı ile belirlenir. Kadınların %80' inden fazlasında içi yumrulu göğüslere rastlanır. Tutulmuş alanlar grimsi renkte veya renksiz elastik kıvamlıdır, sınırları kesin belirli değildir. Bazen kist içeriği parçalanmış kan pigmentleri nedeniyle kahverengi veya sarıdır. Mikroskopik özellikler; epitel değişiklikleri, kist oluşumu, fibröz hiperplazi, lenfosit infiltrasyonundan oluşur. Bu özellikler değişik oranlarda bulunur veya bazen hiç olmayabilir. Fibrokistik hastalık puberteden önce pek görülmez. 20-40 yaşlar arasında sıkça rastlanır ve menopoza öncesi pik yapar. (8,28,61).

Fibrokistik hastalığın en sık rastlanılan tipi basit kistik ve fibrokistik değişiklikler içerir. 3 mm' den küçük kistler mikrokist olarak adlandırılır ve orta yaş kadınların hemen tümünde görülebilir. Bu kistik değişimlere kanal epitelinde yer alan hiperplazinin eklenmesi ileriye dönük kanser riskini artırır. Fibrokistik hastalığa sahip olan kadınlarda meme kanseri riskinin 1.86 ile 2.13 kat değiştiği ileri sürülmüştür (67). Meme dokusundaki hangi selim değişikliklerin histolojik olarak prekanseröz olabileceği araştırılmıştır. Meme biopsisinde proliferatif değişikliklere (sklerozis, adenozis, papilloma) sahip olan ve grubun %5'ini oluşturan kadınlarda meme kanseri riski, proliferatif değişikliği bulunmayan kadınlardan 1.9 kat

fazla olduğu bulunmuştur. Atipik hiperplazi saptanan kadınlarda meme kanseri oluşma riski 4.4 kat, atipik hiperplazi ile birlikte ailede meme kanseri hikayesi olanlarda aile hikayesi olmayanlara göre kanser oluşma riskinin 9 kat fazla olduğu görölmüştür (33).

Meme Kanseri

Kadınlarda en sık görölen kanser tiplerinden biri olan meme kanseri tüm yeni malign tümörlerin %32'sini ve kanserden ölen kadınların %18'inin ölüm nedenini oluşturur. Kanser, memenin duktal ve glandular yapısından gelişmektedir (48,90)

Meme kanseri oluşumunda yaş, aile hikayesi, endojen hormonal faktörler, radyasyon, alkol alımı, selim meme hastalığı, geçirilmiş meme kanseri ve çevre faktörleri önemli risk faktörleri olarak tanımlanmasına rağmen meme kanseri oluşan kadınların %70'de hiç bir risk faktörü tanımlanamamaktadır (28,61,78) (Tablo 1).

Yaşın önemli bağımsız risk faktörü olduğu belirtilmektedir. Meme kanseri menopoö öncesi dönemde nispeten azdır. Yaşlanmayla birlikte görölme sıklığı artar. Amerika Birleşik Devletlerinde yaşla meme kanseri görölme sıklığı arasında yapılan araştırmada görölme sıklığının 25 yaşında 100.000'de 5, 50 yaş ve üstünde 100.000'de 150 ve 75 yaş çevresinde ise 100.000'de 200 olduğu saptanmıştır (48).

Ailesinde meme kanseri olanlarda meme kanseri olma riski yüksektir. Birinci derecede akrabalarda meme kanseri riski (anne, kızkardeş, kızı) genel popülasyonu oluşturanların 2/3'sini kapsar. 50 yaşını geçen birinde

artık ailesel meme hastalığına bağı yüksek risk periyodu geçmiştir (78). Meme kanserinin genç yaşta ortaya çıkması genetik yatkınlığın en önemli belirtisidir. Aile hikayesi olanların üçte biri 17. kromozomdaki BRCA 1 geninin mutasyonu ile ilgilidir.

BRCA 1, bir tümör baskılayıcı genin bir çok özelliğine sahiptir. Kalıtımla geçen mutant allel, değişken tip homologunun inaktivasyonu veya kaybıyla birlikteyse BRCA 1 taşıyıcılarında meme kanseri gelişir.

İkinci bir herediter meme kanseri geni (BRCA 2) 13. kromozomun uzun kolunda tanımlanmıştır. Bu iki gen herediter meme kanserlerinin %60'dan, tüm meme kanserlilerin %2'sinden sorumludur (12,58,70,74). Kadınların meme kanserine yakalanma riski menarş'dan menopoza kadar artar (101). Bir çok araştırmacı meme kanseri görülme sıklığı ile menarş, menopoz ve ilk doğum yaşı arasında ilişki kurmuştur. İlk doğum yaşı 18-19 olanlara kıyasla 30 ve üstünde olanların meme kanseri olma riski 4-5 kat fazladır. Erken menarş, menopozun geç başlaması, evlenmemiş kadınlarda, evli çocuksuz kadınlarda, geç evlenen ve ilk doğumunu 30 yaştan üstünde yapan kadınlarda meme kanseri gelişme eğilimi, büyük olasılıkla uzun bir üreme yaşamı boyunca dengelenmemiş östrojen aktivitesinden dolayı olabilir (8,50,101). Meme kanseri ve menopoz yaşı arasındaki ilişki bir diğer anlamlı faktördür. 45 yaşında menopoza giren kadınların meme kanserine yakalanma olasılığı, 55 yaşında menopoza girenlerden daha düşüktür (73 kadına karşılık 100 kadın) (56). Oral kontraseptiflerin 4 yıl veya daha fazla süreyle ve ilk hamilelikten önce alınması bazı çalışmalarda meme kanseri riski olarak gösterilmiştir (94).

Toplumun beslenme alışkanlığı da meme kanserinin ortaya çıkmasında rol oynar. Kişi başına yağ tüketimi ile meme kanseri görülme sıklığı arasında ilişki saptanmıştır (59,75,98). Deneysel olarak yüksek yağlı diyet ile beslenen farelerde meme kanseri insidansı yüksek bulunmuştur (109). Besinsel faktörlerin, karsinogenezin tüm basamaklarında yani başlama, çoğalma, ilerleme, immun kaçış ve metastazlarda rol oynadığı ileri sürülmektedir (98).

Çevresel faktörler ile meme kanseri arasında sıkı bir ilişki vardır. Elektromanyetik alanlara mesleki olarak maruz kalmanın meme kanser riskini artırdığı belirtilmiştir (78). Epidemiyolojik çalışmalarda nükleer savaş veya tanı ve tedavi nedeniyle iyonize radyasyona maruz kalanlarda meme kanserinin arttığı bildirilmiştir (50,78). Nagasaki ve Hiroşima'da atom bombasının patlaması sırasında 10-14 yaşları arasında olan kız çocuklarının çoğunluğu 30-49 yaşlarında meme kanserine yakalanmışlardır (50). Epidemiyolojik bilgiler, meme kanserinin gelişmesinde başlama veya çoğalmasında genetik, endokrin ve çevresel faktörlerin etkili olabileceğini göstermiştir (39,74). Dünya üzerinde meme kanserinin görülme sıklığının ülkeden ülkeye değişmesi ve göç eden insanlarda artan meme kanseri sıklığının göç ettikleri ülkeye uyan bir sıklığa erişmesi dikkatlerin çevresel etkenler ve beslenme şekli üzerinde toplanmasına neden olmuştur (28).

Tablo 2'de görüldüğü gibi habis tümörlerin heterojen bir grubunu oluşturan meme kanseri, kanser türleri arasında en yaygın olanı, bununla birlikte tedaviye en iyi cevap verenidir (50,68).

Gelişmiş erken tanı ve tedavi yöntemleri ile ölümcül vakaların sayısı önemli miktarda azalmıştır. Halen sıklıkla kullanılan tarama yöntemleri kendi kendine meme muayenesi, mamografi ve klinik muayenedir. Meme bir çok fiziksel metotla görüntülenebilir. Mamografi klinik olarak belirtisi olmayan, meme kanserini erken dönemde saptayabilen, tarama amacı ile kullanılan en güçlü tanı yöntemidir. Buna rağmen bazen yanlış pozitifliklere de neden olur (73). Meme kanserin de geleneksel prognostik faktörler primer tümörün ölçüsü, evre ve aksiller nod durumu gibi histolojik değişkenlerdir. Son yıllarda birer biokimyasal molekül olan bazı yeni güçlü prognostik göstergeler bulunmuştur. Bunlar östradiol ve progesteron reseptörleri, epidermal büyüme faktör reseptörleri, aktiflenmiş proto-onkogenler (c-erb-B2 proto-onkogen), bazı proteolitik enzimlerdir (2,13,26,32,63). Bu yeni göstergelerin hiçbiri aksiller nod durumuna tercih edilemez. Ancak biokimyasal göstergeler küçük ameliyatlarda değerli olabilir ve aksiller nod negatif olan küçük bir hasta grubunu ayırt etmeye yarar (32,68). Esas problem iyi prognozlu tümörle kötü prognozlu tümörün nasıl ayırdedilebileceğidir. Hastaların aldığı tedavinin yeterli olup olmadığını, adjuvan bir tedaviye gerek olup olmadığını saptamak için yeni ve güçlü prognostik faktörlere ihtiyaç vardır (10,26,32,49,64). Meme kanserli hastaların prognozunu etkileyebilecek farklılaşma ve proliferasyonu gösteren timidin işaretleme indeksi ve DNA ploidi son yıllarda hastanın hayatta kalma süresi (sürvi) açısından çok önem kazanmıştır (26,32).

Tablo-1: Tanımlanmamış Meme Kanseri Risk Faktörleri (78)

Yüksek risk: Nispi risk 4.0

İleri yaş

Geçirilmiş meme kanseri (in sitü ve invaziv)

Kuvvetli aile hikayesi

Biopsi ile saptanmış atipi ile birlikte proliferatif lezyon

Orta risk: Nispi risk 2-4.0

Obesite (postmenopozal)

Birinci derece akrabada meme kanseri

Geçirilmiş over veya endometriyum kanseri

Göğüs üzerine radyasyon

İlk gebelik yaşı > 30

Hiç doğum yapmama

Düşük risk: Nispi risk 1.1-1.9

Alkol alımı

Menarşyaşı > 12

Menopoz yaşı > 55

Tam belirlenemeyen:

Oral kontraseptif kullanımı

Östrojen replasman tedavisi

Tablo-2: Meme Tümörlerinin Histopatolojik Sınıflandırılması (9)

I- Epitelyal tümörler

A-Selim

- 1- İntraduktal papillom
- 2- Memebaşı adenomu
- 3- Adenom
 - a) Tubuler
 - b) Laktasyon

B- Malign

1- İnvaziv Olmayan

- a) İntraduktal (in situ duktal) karsinom
- b) İn situ lobuler karsinom

2- İnvaziv

- a) İnvaziv duktal karsinom
- b) İntraduktal komponenti baskın invaziv duktal karsinom
- c) İnvaziv lobüler karsinom
- d) Müsinoz karsinom
- e) Medüller karsinom
- f) Papiller karsinom
- g) Tubuler karsinom
- h) Adenoid kistik karsinom
- I) Sekretuar (juvenil) karsinom
- j) Apokrin karsinom
- k) Metaplastik karsinom

- Skuamöz tip
- İğsi hücreli tip
- Kıkırdak ve kemiksi tip
- Miks tip

1) Diğerleri

3- Meme başının paget hastalığı

II- Mikst konnektif doku ve epitelyal tümörler

- a - Fibroadenom
- b - Filloides tümör (sistosarkoma filloides)
- c - Karsinosarkom

III- Çeşitli tümörler

- a) Yumuşak doku tümörleri
- b) Deri tümörleri
- c) Hematopoetik ve lenfoid dokuların tümörü

IV- Sınıflandırılmayan Tümörler

V- Meme Displazisi / Fibrokistik Hastalık

HÜCRE SIKLUSU VE HÜCRELERİN DNA İÇERİĞİ

Memeli hücreleri diploiddir ve 46 kromozom içerir. Vücudun çeşitli bölümlerinde bulunan hücreler farklı bölünme yeteneğine sahiptir. Kemik iliği ve gastrointestinal yolun epitelyal hücreleri gibi hücreler normal fonksiyonlarının bir parçası olarak bölünürler. Hepatositler gibi hücreler ise hücre kaybı gibi bir stimulasyon altında bölünürler. Nöronlar ve başka bazı hücreleri de içine alan 3. grup hücreler ise organogenez esnasında farklılaşırlar ve bir daha hiç bölünmezler. Bölünme esnasında hücreler “hücre siklusu” olarak bilinen bir seri evreden geçer (Şekil:1). Hücre siklusu birbirini takip eden iki mitoz arasındaki olaylar dizisidir. Ökaryotik organizmalarda istirahat halindeki çoğalmayan (nonreplicating) hücreler $2N$ olmak üzere çiftleşmiş kromozomlara ve sabit bir DNA içeriğine sahiptir. Bu dönemdeki hücreler G_0 dinlenme fazında bulunur. G_0 fazı inaktif fazdır. Hücre bölünmesi için bir uyarı geldiğinde mRNA sentezi başlar ve hücreler G_1 fazına girer. Bu fazda mRNA sentezi artar ve DNA sentezi başlar, DNA sentez fazı S fazıdır. Bu fazda tüm kromozomlar $2N$ 'den $4N$ 'e yükselir ve hücrenin DNA içeriği iki katına çıkar. S fazını kısa bir G_2 fazı takip eder ve mitozla sonlanır. Hücre bölünmesi için başka bir uyarı alınmadıkça, stabil hücreler mitotik sıklüse tekrar tekrar girerek devamlı replike olurlar. İnaktif faz G_0 'a girmesi için uyarı gelinceye kadar replikasyon devam eder (89).

DNA içeriğinin analizi akım sitometresi ile DNA'ya spesifik boyalarla (etidyum bromid, propidyum iyodid) boyanarak yapılır. Bu analizlerden iki tip bilgi edinilir.

1) G_0 ve G_1 fazında bulunan hücrelerin ortalama DNA içerikleri.

2) Hücre siklusünde her fazda bulunan hücre sayıları.

Akım sitometresi, analiz edilen hücre siklusünün dağılımını G_2+M (G_2M), S fazı, G_0/G_1 fazı gibi bölümlere ayırır ve DNA histogramlarını istatistiksel olarak verir (89). (Şekil 2). Normal bir DNA histogramında G_0/G_1 fazındaki hücreler en yüksek fraksiyon ve diploid ($2N$) DNA içeriğine sahiptir. $G_2 M$ fazında ise tetraploid $4N$ lik bir DNA içeriği bulunur. S fazındaki hücreler ise DNA açısından iki dönemin arasına düşmektedir (31,89) (Şekil:1).

DNA indeksi (DI): Bir hücre siklusündeki G_0/G_1 fazındaki hücrelerin DNA içeriklerinin, normal hücrelerin G_0/G_1 fazındaki DNA içeriklerine oranıdır. (31,89)

DNA indeksinin değerlendirilmesi:

$DI=1$ ise diploidi

$DI> 1$ ise hiperdiploidi

$DI< 1$ ise hipodiploidi

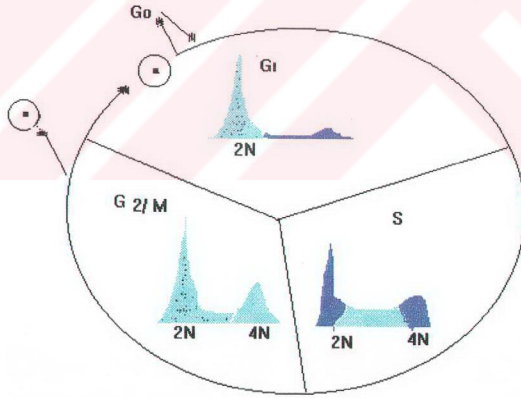
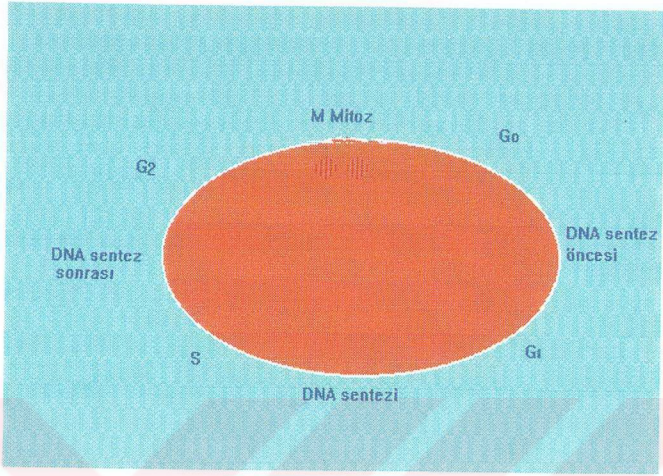
DNA içeriğinin normalden az veya fazla olması anöploidi olarak tanımlanır (50,89).

DNA ploidi tümör hücrelerinde DNA içeriğini belirtir.

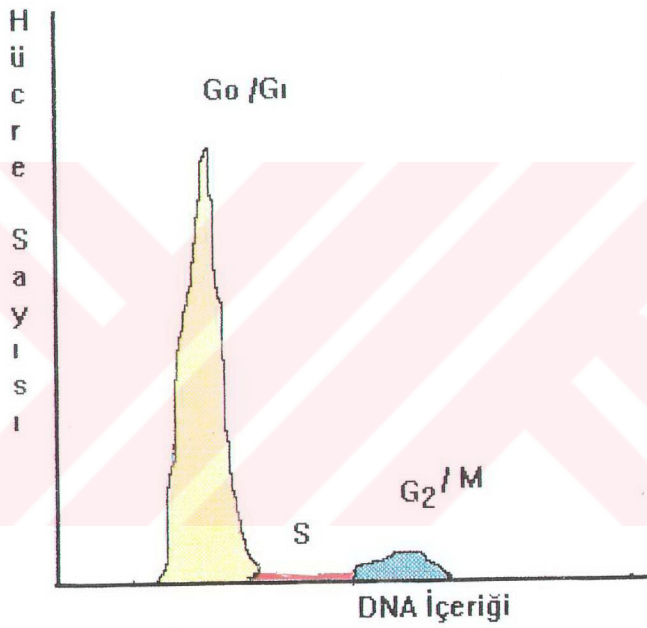
Normal (diploid) hücrelerle karşılaştırıldığında kanser hücrelerinin anormal bir DNA (anöploid) içeriğine sahip olduğu gösterilmiştir. Anöploidinin neoplastik hücrelerde sayısal ve yapısal kromozom değişikliklerini yansıttığı düşünülmektedir. Kanserın saptanmasında diğer yöntemlerle gözden kaçabilen anöploidik küçük hücre populasyonları, akım sitometresi ile kolayca saptanabilmektedir (26,89).

Hücre siklusu ölçümleriyle saptanan tümör hücrelerinde yer alan DNA'nın miktarındaki anormallikler, tümörün özelliklerine ışık tutabilir. Tümörlerde nükleer DNA içeriğinin belirlenmesi ile hastalığın prognozu, histolojik evre ve lenf düğümü tutulumu arasında ilişki olduğu düşünülmektedir. Diploid DNA içeriğine sahip tümörün genel olarak anöploid tümörlerden daha iyi olduğu kabul edilir (36,50,54,64,90,114). Anöploid hücrelerin çoğalmayı uyaran ve baskılayan genler arasındaki dengenin bozulmasına bağlı olarak belirli çoğalma avantajlarına sahip olduğu düşünülür. Birbirinden bağımsız olarak çalışan araştırmacılar meme kanser tümörlerinde anöploid tümörlerin %53-73 arasında olduğunu belirtmektedirler (26,38).

Yüksek S fraksiyonunun, meme kanserinde, hastalığın tekrarı ve erken ölümle ilgili olduğu gösterilmiştir (36,38,71).



Şekil 1: Hücre Siklusu ve fazları



Şekil 2: Diploid hücre popülasyonunun akım sitometresi ile normal DNA histogramı

ÇİNKO

Çinko (Zn) bir çok biyolojik moleküle bağlanan, bağlandığı molekülün yapısını, stabilitesini ve aktivitesini etkileyen önemli bir eser elementtir (82). 1860 yıllarında mikroorganizmalarda, 40 yıl sonra bitkilerde, 1930'lu yıllarda hayvanlarda varlığı anlaşılmıştır (35). Son yıllarda yapılan bir çok çalışmada, çeşitli vücut ve hücre fonksiyonları üzerine çinkonun rolü gösterilmiştir (73,86). Hücre bölünmesinde, farklılaşmasında, programlanmış hücre ölümünde, gen transkripsiyonunda, birçok enzim aktivitesinde ve organizmanın tam fonksiyonunu yapmasında ilk embriyonik evreden hayatın son evresine kadar Zn temel bir element olarak düşünülür (51,69,113). Doğada az bulunur. Konsantre bir yüke, 0.65 A° luk küçük bir yarıçapa sahiptir, değişen valansı yoktur. Bu özelliği nedeni ile serbest radikal oluşturma riski zayıftır. Zn; asid katalisti, yapısal iyon ve kontrol iyon olarak başlıca üç önemli biyolojik role sahiptir (35).

Çinko'nun Biyolojik Özellikleri

Katalitik Etki: 200'den fazla enzimde katalitik etkiye sahiptir. Enzime çinko bağlanması substrata çok noktalı bağlanmayı azaltır ve reaksiyon hızını artırır. Esterleri veya amidleri hidroliz eden enzimler için katalitik bir faktör olarak Zn için gereksinim çok açık değildir, çünkü bu substratlar Zn gerektirmeyen enzimlerle de tutulabilir. Ancak çinkolu enzimlerin avantajı metalsiz enzimler için gereken, substrata çok noktalı tutunmayı azaltmaktır. Substrata bağlanma daha az seçicidir fakat çok

daha hızlıdır. Bu özellikle hormon salgılanması ve yıkımı gibi hızlı reaksiyonlaşmalar için önemli olabilir (19,35).

Yapısal Etki: Bazı enzimlerin, hormonların, nöropeptidlerin, hormon reseptörlerinin ve aynı zamanda polinükleotidlerin yapısal bir elementidir. Yapısal rolü son zamanlarda bulunmuştur. Sistein ve histidine yüksek oranda bağlanarak bu amino asitlerden zengin proteinleri spesifik olarak katlar ve biyolojik özelliklerle birlikte yeni konformasyonel yapı (çinko parmakları) verir. Bu yapı DNA tanınması için bir motif oluşturur. Zn bağlayıcı bölgeler çeşitli regülatör proteinlerde bulunur. Bu gibi Zn parmakları orijinal olarak transkriptaz III A'da ve daha sonra da steroid hormonlarda ve ilişkili hormon reseptörlerinde bulunmuştur. Sinyal iletide önemli bir role sahip protein kinaz C, Zn parmakları oluşturan sisteinden zengin iki bölgeye sahiptir. Bu yapı aktivasyon için gereklidir (35).

Regülatör etki: Serbest Zn^{++} iyon konsantrasyonu hem katalitik ve hemde yapısal etkiler için (genellikle her moleküle birden fazla) Zn bağlanma yerlerinde çinko saturasyon derecesini düzenler. Bir biyolojik sistemde serbest Zn iyonlarının miktarı bu proteinlerin fonksiyonel aktivitesini düzenleyebilir (35).

Çinkonun başlıca fonksiyonları:

- Zn membran protein ve enzimlerinin integral bir oluşumdur. Biyomembranların stabilizasyonunda sülfidril gruplarına bağlanarak ve merkaptidler oluşturarak hassas bir rol oynar (35,82).

- Zn eksikliği membranlarda oksidatif strese, membrana bağlı enzimlerin aktivitesinin değişmesine ve membran reseptörlerinde değişikliğe neden olur. Membran akışkanlığı Zn ile etkilenir (35,8).
- Tiollerin veya diğer grupların demirle reaksiyonlaşmasını engeller böylece serbest radikal oluşumunu önler (35).
- Serbest radikali tahrip eden enzim olan süperoksit dismutazın esas bir oluşumudur (35,62).
- Serbest radikalleri tutma özelliğine sahip olduğu düşünülen metallotioneinlerin fizyolojik düzeyini devam ettirmek için gereklidir (51).
- Nükleik asit tamir enzimlerinin gerekli bir elemanıdır (19,35).
- Hücre siklusunun G₁'den S'e, S'den G₂'ye, G₂'den mitozaya geçişi esnasındaki biyokimyasal olaylarda önemli rol oynar (86,91).
- DNA sentezi ve özellikle DNA polimeraz ve timidin kinazlar için gereklidir (19,35,91).
- RNA polimerazlarda ve tRNA sentetazda da yapısal ve katalitik role sahiptir (Zn bağlayıcı parmaklar yoluyla) (35).
- Zn'nun gen ekspresyonu üzerine direkt rolü gösterilmiştir. Transkriptaz III A, 5 S genin transkripsiyonu için gerekli bir metallo enzimdir (35).

Ekstrasellüler matriks üzerine hidrolitik etkisi nedeniyle kollajenazlar ve diğer proteazlar gibi Zn'lu enzimler büyüyen dokular için önemli olabilir. Ekstrasellüler matriksin hidrolizi, büyüme ve gelişme için hücrelerin matriksten çıkışını kolaylaştırır. Bakırla ters yönde çalışır.

Bakırın Zn ile dengesi bir organizmanın yumuşak dokusunun büyümesi ve stabilitesinin devamlılığı için gereklidir (19).

Birçok sistemde bir antioksidan role sahip olduğu açıklanan çinkonun eksikliği lipid peroksidasyon artışına neden olur ve Cu, Zn SOD aktivitesi bozulur. Çinkonun hücresel sisteme eklenmesi ultraviyole A, radyasyon gibi oksidatif bir strese karşı koruma sağlar. Ancak çinkonun pro-oksidan etkiye sahip olduğu da ileri sürülmüştür (11,23). Yapılan bir çalışmada Zn'nun kültür fibroblastlarına uygulanan hidrojen peroksidin sitotoksitesini arttırdığı bulunmuştur (82). Diğer taraftan Zn; proteinlerin tiol gruplarına bağlanarak oksidasyonu önler. Bu koruyucu etkisinin bir mekanizmasıdır (35). Çinko geçiş metalleri ile reaktif oksijen türlerinin oluşumunu inhibe ederek yağ asidlerini peroksidasyondan korur (35).

Araştırmalar, neoplastik gelişimin değişmiş Zn turnoverı ile ilişkisi olduğunu göstermektedir (35,82). Plazma Zn düzeyinde azalma sık görülen bir bulgudur. Fakat sebepleri henüz belli değildir; kötü beslenme (35) veya neoplastik hücrelere aşırı miktarda bağlanma olabilir. Lösemide aktif neoplastik proliferasyon ve Zn eksikliği arasında korelasyon gözlenmiştir. Özetlenecek olursa çinko, birçok biyolojik moleküle bağlanan ve bağlandığı molekülün yapısını, stabilitesini ve aktivitesini etkileyen bir eser elementtir (82). Bu nedenlerle bu elementin karsinogenik olayları etkilemesi de beklenmektedir (99).

BAKIR

Biyolojik sistemlerde bakırın (Cu) varlığı 19. yüzyılın ilk yarısında keşfedilmiştir. 70 kg lık bir insanda yaklaşık 80 mg total Cu bulunur. Bazı etnik gruplarda vücuttaki Cu oranı değişebilir. Farklılık diyet ve maruz kalınan çevresel bakır düzeyine bağlıdır (111). Çeşitli organlardaki Cu konsantrasyonları ölçülmüştür. Bakırca en zengin olan karaciğer ve beyin, vücut totalinin 1/3'ünü içerir. Kaslarda oran düşük olmakla beraber büyük kas kitlesi nedeniyle vücut bakır toplamının üçte biri bulunur (111). Süt ile beslenen hayvanlarda bakır eksikliğinde de demir gibi aneminin oluştuğu gösterilmiştir. Cu ve Zn benzer kimyasal ve fiziksel özellikleri nedeniyle birbirlerinin antagonistidir. Aşırı Zn alımı, bakırın barsak emilimini, karaciğere birikimini ve plasentaya geçişini bozar, klinik ve biyokimyasal Cu eksikliği belirtilerinin oluşmasına yol açar (16). Aşırı Cu alımı da, bazı türlerde karaciğer Zn metabolizmasını bozar, ancak Zn absorpsiyonunun bu nedenle bozulduğunu gösteren bilgiler yoktur (47).

Cu^{+1} ve Zn^{+2} iyonları periyodik tabloda yakın konumda bulunur. Bu nedenle benzer elektron dağılımı ve iyonik çapa sahiptir. Her iki metal de oksijen, kükürt veya azot içeren ligantlarla kolaylıkla kelatlaşır. Ancak devamlı aynı stereokimyasal düzende bağlanmazlar. Zn^{+2} her zaman tek valans, bakır ise Cu^{+1} ve Cu^{+2} durumunda bulunur. Cu^{+3} geçici bir durumdur. Bu nedenle Cu redoks reaksiyonlarında önemli bir rol oynar ve serbest oksijen radikallerinin oluştuğu Haber-Weis reaksiyonuna katılır. Buna karşılık çinkonun stabilize edici fonksiyonu vardır ve oksidasyona karşı sülfidril gruplarını ve lipid peroksidasyona karşı hücre membranlarını koruduğu düşünülmektedir (112). Cu'nun oksidaz enzimlerinde iki

oksidasyon durumunda bulunabilmesi enzim aktivitesi için gereklidir. Zn ve Cu içeren tek enzim superoksit dismutazdır. Bu enzimde çinko yapısal bir role sahiptir, aktif yerde bulunan bakır ise redoks fonksiyonu yapar.

Zn, kollajenazın ve ekstraselüler matriksi parçalayan proteazların bir bileşenidir. Böylece hücre hareketlerini sağlar. Buna karşılık Cu, matriksin bir integral oluşumu olan kollajenin çapraz bağlanmasında ve kuvvetlenmesinde rol oynar. Zn ve Cu arasındaki bu denge organizmanın yumuşak yapılarının büyümesi, gelişmesi ve kararlılığının devamı için gereklidir (17). Yüksek düzeyde çinkoya maruz kalan hücrelerde ve hayvanlarda, Cu enzim aktivitesinde değişiklik meydana gelebilmesine rağmen, çinkonun enzimlerde Cu'la yer değiştirdiği hakkında bilgi yoktur. Daha ziyade bakırın azaldığı gözlenir. Plazma proteinlerinden seruloplazmin ve transküprein sadece bakır, buna karşılık α_2 -Makroglobulin sadece çinkoya'ya bağlanır. Her iki metal albumininin farklı bölgelerine bağlanarak bağırsaktan karaciğere taşınır (17,111).

Cu içeren birçok enzim, insanlarda ve hayvanlarda bir çok fizyolojik fonksiyonlara sahiptir. Bakır;

- Kardiovasküler ve iskelet sistemi bütünlüğü,
- Santral sinir sisteminin yapısı ve fonksiyonları,
- Demir metabolizmasını içeren eritropoetik fonksiyonun devamında ve gelişmesinde rol oynar (17).

Araştırmalar antioksidan savunma sisteminin meme kanserini içeren neoplastik hastalıkların başlaması ve ilerlemesini etkileyebileceği üzerinde yoğunlaşmıştır. Esansiyel eser elementlerin ve antioksidan savunma sisteminin diğer parametrelerinin değerlendirilmesi çok önemlidir (69).

Düşük Cu düzeyleri antioksidan enzim olan süperoksit dismutazın inhibisyonuna neden olarak kanser riskini arttırabilir. Buna karşılık yüksek Cu düzeyleri serbest radikal oluşumunu katalizleyerek kanser riskini arttırabilir (61,76,83). Meme kanserinin görülme sıklığı veya artmış riski kan Cu düzeyleri ile ilişkili bulunmuştur (49,59).

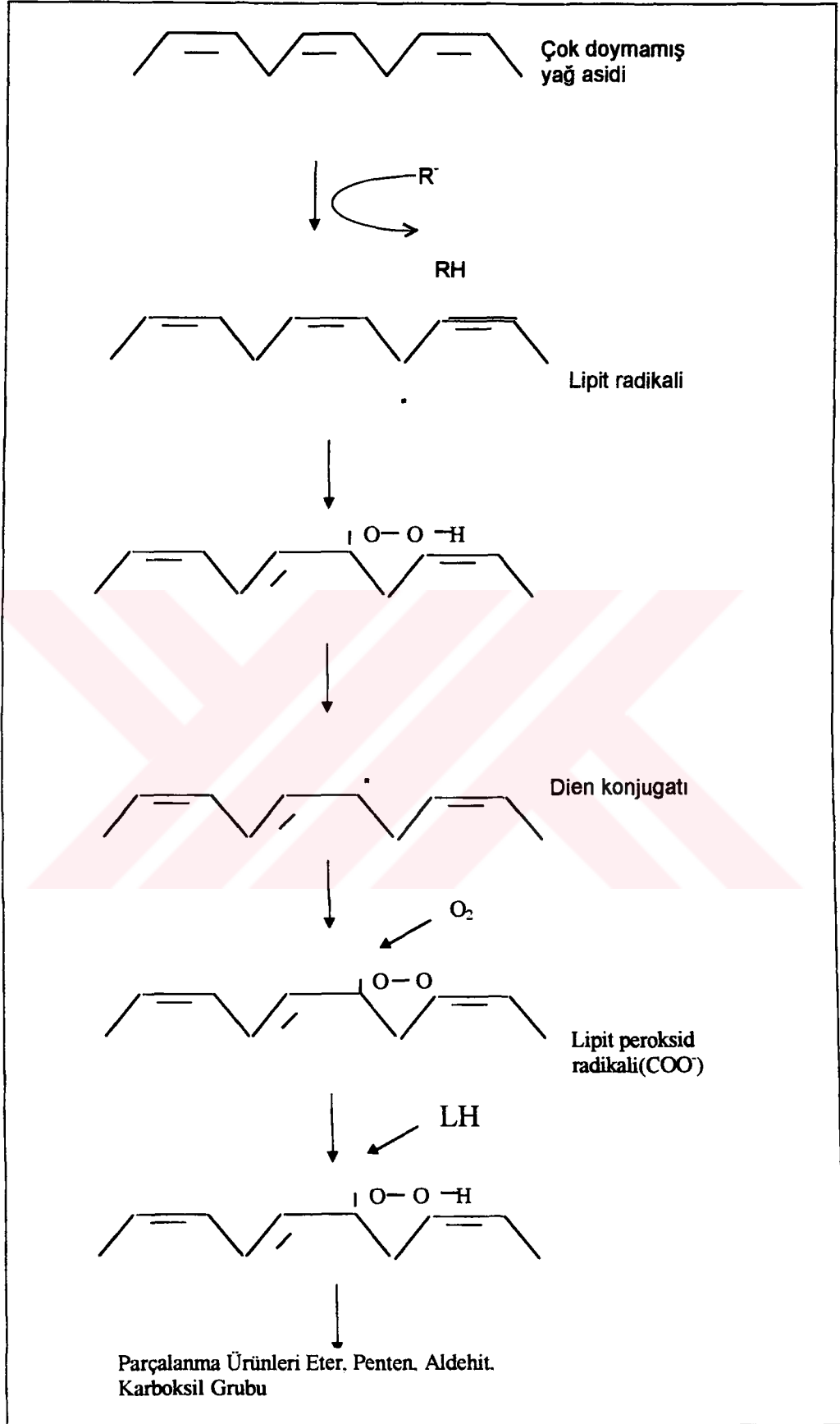
Prospektif çalışmaların birinde kanserden ve kardiovasküler hastalıklardan ölüm ile yüksek serum Cu düzeyleri arasında ilişki görülmüştür. Yine başka birkaç çalışmada kanserde ve kardiovasküler hastalıklarda serumda ve dokuda yüksek Cu düzeyleri belirtilmiştir. Malignitede ve aterosklerozda Cu'un rolü süperoksit radikallerinin yol açtığı biyolojik hasarda görev alması ile ilişkilidir (61,62). Doku Cu'nun büyük kısmı spesifik olarak süperoksit dismutaz enzimine bağlanır. Düşük Cu, bu enzimin aktivasyonunu inhibe ederek peroksidatif hasarı stimüle eder (76,83).

Lipit Peroksidasyonu

Meme kanserinin esas nedeni bilinmemesine rağmen oksidatif stres ve lipit peroksidasyonun, meme karsinogenezinde rol oynadığı bir çok çalışmada gösterilmiştir (15,107). Lipit peroksidasyonu; insanlarda, hayvanlarda, bitkilerde ve diğer canlılarda meydana geldiği bilinen kompleks bir olaydır. Lipit radikallerinin oluşumu ve yayılması, oksijen alımı, çok doymamış lipitlerde çift bağların tekrar düzenlenmesi ve sonuçta membran lipitlerinin yıkımı alkoller, ketonlar, aldehidler ve eterleri içeren bir çok yıkım ürünleri meydana getirir. Sadece linoleik asidin peroksidasyonu en az 20 yıkım ürünü oluşturur. Biyolojik membranlar genellikle çok doymamış yağ asidinden zengindir ve oksijenden zengin metal içeren sıvı ile kaplıdır. Bu nedenle membran lipitleri peroksidatif atığa daima maruz kalırlar. Çok doymamış yağ asidinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması sonucu bir lipit radikali oluşur (Şekil 3). Konjuge dien oluşumunda çift bağlar tekrar düzenlenir. Moleküler oksijenin olaya katılmasıyla lipit peroksit radikali meydana gelir. Komşu lipitten bir hidrojen alınarak lipit hidroperoksit veya lipit endoperoksit oluşturabilir. En az üç çift bağ içeren lipit endoperoksidin oluşumu bir yıkım ürünü olan malondialdehiti oluşturur (18,29,30). Lipit peroksit radikallerinin yan ürünleri olan aldehidler ve hidrokarbon gazları kolayca difüze olarak mutajenez, vasküler permeabilite artışı, inflamasyon, kemotaksis, fosfolipazın aktivasyonu, prostaglandin ve çeşitli endoperoksidlerin oluşumuna yol açarak bir seri patolojik olaylara neden olabilir (18,29,30). Bazı çalışmalarda lipit peroksidasyonunun hücre yaralanması ve karsinogenezde başlatıcı bir faktör olduğu gösterilmektedir (7). Lipit

peroksidasyon yıkım ürünü olan malondialdehidin mutajen ve potansiyel bir karsinojen olduğu lipid peroksitlerin ve son ürünlerinin membrana bağı enzimleri ve DNA'yı içeren makromolekülleri tahrip ettiğı bildirilmektedir (7). Lipid peroksidasyonunun, karsinogenezin promosyon safhası ile ilişkili olduğı düşünölmektedir (6). Bazı çalışmalarda peroksidasyonun kimyasal ürünleri ve hastalık durumu arasındaki bir ilişkinin sadece hastalığın varlığını gösterebileceğı, ancak hastalığın sebebi olmayacağı belirtilmiştir (15).





Şekil 3: Lipit peroksidasyon reaksiyon şeması

GEREÇ VE YÖNTEM

Olguların seçimi:

Bu çalışmada kullanılan olgular, göğüslerinde ağrı ya da ele gelen sertlik şikayeti ile İstanbul ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, SSK İstanbul Hastanesi, Şişli Etfal Hastanesi Genel Cerrahi birimlerine başvuran radyolojik ve histopatolojik incelemeler ile selim meme hastalığı ve meme kanseri tanısı konmuş hasta gruplarından ve sağlıklı kontrollerden oluşmuştur. Bu olgularda çalışma göstergelerini etkileyecek başka bir patoloji olmamasına dikkat edilmiştir.

Çalışma grupları; yaşları 28-60 arasında değişen (42.85 ± 8.58) 20 sağlıklı kadın ile yaşları 20-76 arasında değişen (49.14 ± 13.25) 14 selim meme hastalıklı ve yaşları 32-74 arasında değişen (52.36 ± 12.52) 25 meme kanserli hastadan oluşmuştur.

Örneklerin alınışı

a) Ameliyat öncesi 12 saat'lik açlıktan sonra tek kullanımlık tüplere alınan kanlar, santrifüj edilerek serumları ayrıldı. -35°C 'de analiz yapılacak güne kadar saklandı.

b) Meme kanserli hastaların tümör ve tümör dışındaki normal meme dokusundan alınan doku örnekleri ile selim meme hastalığı düşünülen hastalardan alınan biyopsi örnekleri özel kaplar içinde buza konularak laboratuvara ulaştırıldı. Dokuların bir kısmı DNA analizi için formalin içine alındı. Kalanı -35°C’de derin dondurucuda analiz yapılacak güne kadar saklandı.

YÖNTEMLER

I- Biyokimyasal İncelemeler

1) Akım Sitometresi ile DNA Tayini: (89)

Prensip: Doku örneklerinden hazırlanan tek hücre süspansiyonlarının DNA’ya spesifik boyalarla boyanarak akım sitometresinde 488 nm’de incelenmesi temeline dayanır.

DNA tayini için örneklerin hazırlanması: (89)

Formalin içinde fikse edilen örneklerden parafin bloklar hazırlandı. Hazırlanan parafin bloklardan 30 µm’lik 3 kesit alınarak santrifüj tüplerine konuldu (Şekil 4).

Bu kesitlere: 1) Deparafinizasyon, 2) Rehidratasyon, 3) Ayırıştırma işlemi uygulandı.

1) Deparafinizasyon: Doku örnekleri çeker ocak altında 10 ml ksilen ile 10 dakika ara ile 2 defa deparafinize edildi parafinli ksilenler atıldı.

2) Rehidratasyon: Doku örnekleri 10 dakika ara ile sırasıyla ikişer defa %100, %95, %75 ve %50’lik etanol ile yıkandı. Her defasında 10 ml etanol kullanıldı.

3) Ayırıştırma: Doku örnekleri oda sıcaklığında bir gece distile suda inkübe edildi. Ertesi gün distile su ile tekrar yıkandı.

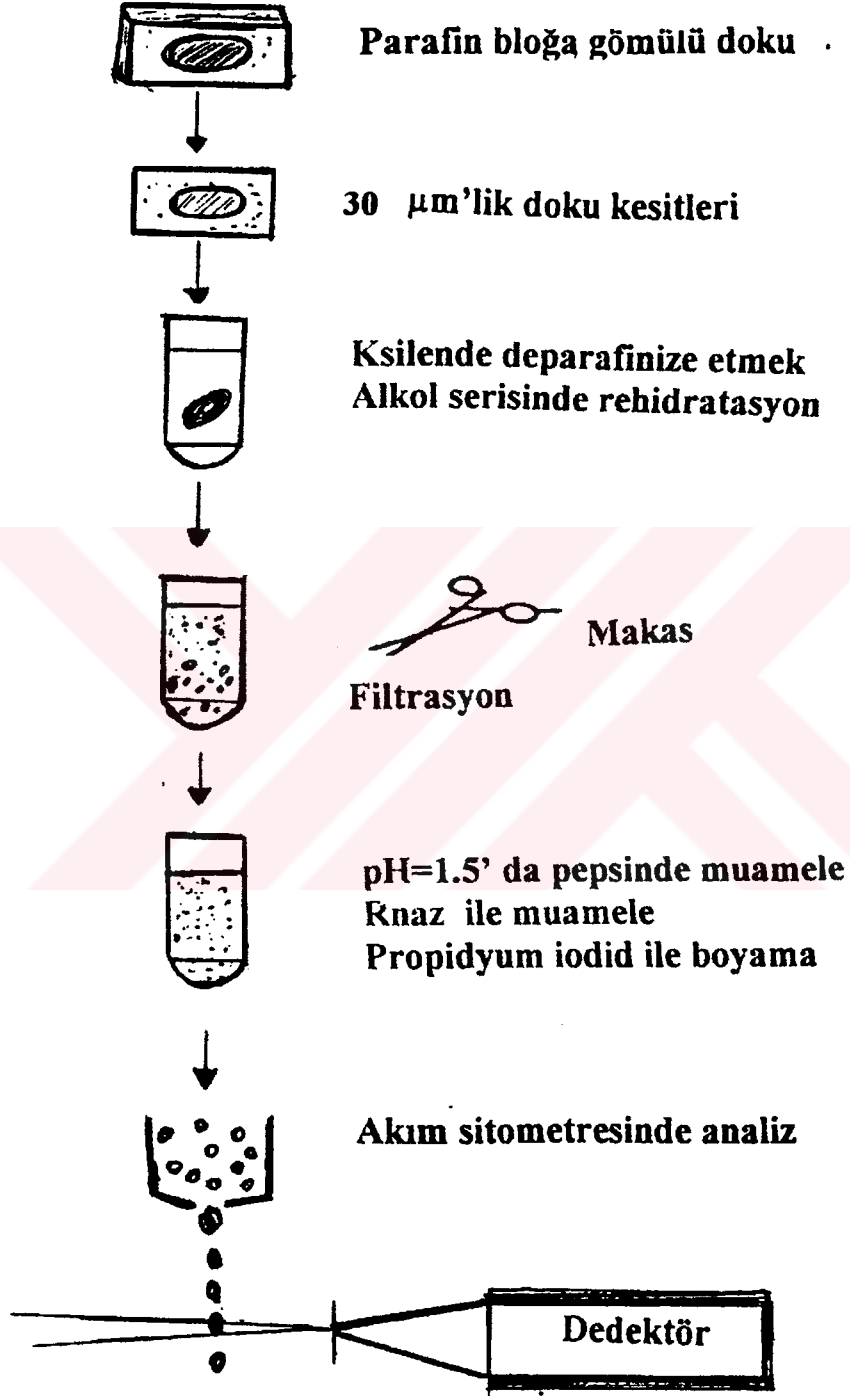
Dokunun Parçalanması:

Doku örnekleri bir saat camı üzerine alındı. Üzerine 1-2 damla pepsin konularak ıslatıldı, küçük parçalar halinde kesildi. Tekrar santrifüj tübüne konularak üstüne taze hazırlanmış pH=1.5 olan %0.5'lik pepsinden 1 ml ilave edildi. 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Her 5 dakikada bir defa vortekslenerek, ara ara pastör pipeti ile karıştırıldı. 30 dakika sonunda 300g'de 10 dakika santrifüj edildi ve üst faz atıldı. Tüpün dibinde kalan hücreler fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. Gözenek aralığı 37 µm olan naylon süzgeçten süzüldü. Hücre ayarı ml'de 10^5 - 10^6 hücre olacak şekilde hücre sayımı yapıldı. Akım sitometre sayımına hazır hale getirildi.

Akım-sitometre sayımı:

1) 100 µl hücre süspansiyonu üzerine 100 µl DNA prep konuldu bu işlemle örneklerin RNA zincirleri kırıldı.

2) 2 ml propidyum iyodid ilave edilerek DNA boyanması sağlandı. 10 dakika oda ısısında karanlıkta bekletildi. Akım sitometresi (Coulter Electronics, profil II. UK) cihazında, argon-lazerle eksitasyon: 488 nm'de 10.000 hücre sayılarak DNA analizi yapıldı. Her fazdaki DNA içeriği, DNA indeksi ve S fazı belirtildi. Akım sitometresi DNA check (plastik beads) ile standardize edildi. DNA analizinde kontrol olarak tavuk eritrositleri kullanıldı. Her DNA analiz çalışmasından önce bu işlemler yapıldı.



Şekil 4: Parafinli dokunun akım sitometresinde analize hazırlanması

Hücre siklusunda kullanılan tanımlar: (Şekil:1) (68,89)

DNA içeriği : Hücre içindeki DNA miktarıdır

G₀/ G₁ fazı : Hücre siklusundaki presentez fazı

S fazı : DNA sentez fazı

G₂ fazı : DNA postsentez fazı

M fazı : DNA mitoz fazı

Normal bir DNA histogramında G₀/G₁ fazındaki hücreler en yüksek fraksiyona ve diploid (2N) DNA içeriğine sahiptir. G₂ ve M fazında ise tetraploid DNA içeriği bulunur. S fazındaki hücreler ise DNA açısından iki dönemin arasına düşmektedir.

DNA indeksi (Dİ): Hücre popülasyonunun DNA içeriği veya ploidiyi ifade eder (89).

$$Dİ = \frac{\text{Patolojik hücrelerin DNA içeriği}}{\text{Diploid hücrelerin DNA içeriği}}$$

Anöplöid: Hücredeki DNA içeriğinin normalden fazla veya az olması durumudur. DNA indeksi birden farklı olan pikler total preparata göre %10' dan fazla hücre taşıyorsa anöplöid olarak değerlendirilir (Şekil 5).

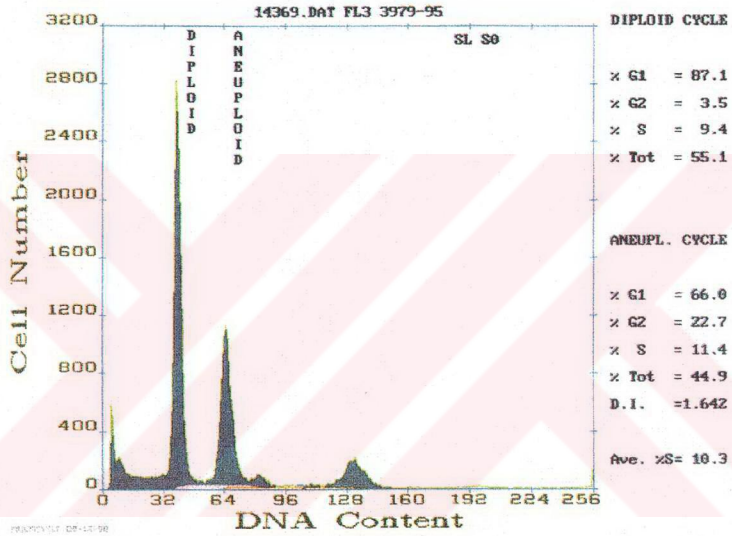
Diploid: Bir çift kromozom içeren (2N) normal hücrelerdir (Şekil 2,6).

Hipodiploid: Hücrede kromozom sayısının 46'dan az olması veya DNA içeriğinin 2N'den az olmasıdır (Dİ<1).

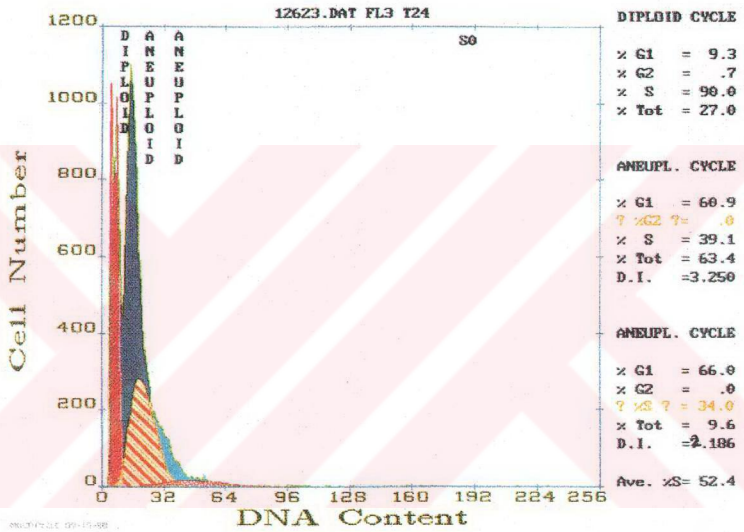
Hiperdiploid: Hücrede kromozom sayısının 46'dan fazla olmasıdır ($DI > 1$).

Multidiploid: İki veya daha fazla anöloid populasyon ve DI içeren hücre populasyonlarıdır (Şekil 7).

Anöloid hücre populasyonları DNA histogramında ekstra pikler şeklinde görülür (Şekil 5). G_0/G_1 , S ve G_2/M fazındaki hücrelerin oranı ile anöloid hücre oranı iki değişkenli DNA histogramından MULTICYCLE Software (Phoneix Flow Systems, San Diego, USA) kullanılarak analiz edildi. Proliferasyon indeksi olarak $S+G_2/M$ fazları. DNA indeksi (DI) olarak patolojik hücrelerin DNA içeriğinin diploid hücrelerin DNA içeriğine oranı alındı.



Şekil 5: Anöplöid hücre popölasyonu



Şekil 7: Mültiploid hücre popülasyonu

Kullanılan Kit ve Ayır  lar (DNA)

1) DNA -Prep Reagent (Coulter, PN 6604452) (Kit).

Kit içeriği:

a) DNA-prep LPR; %0.1 potassium cyanide, %0.1 NaN₃, noniyonik deterjanlar ve stabilizer.

b) DNA prep Stain; %0.5 propidium iodide (50 µg/ml), RNase (type III-A), Bovine pancrease (5KU/mL), %0.1 NaN₃, saline ve stabilizer.

c) DNA prep Reference; Chicken eritrosit nukleusu, %5 propidium iodide (500 µg/mL), %0.1 NaN₃, noniyonik deterjanlar, saline ve stabilizer

2) Ksilen (Merck)

3) Etanol %100, %95, %75, %50 lik

4) %0.9 NaCl (Merck)

5) Pepsin (Sigma) (2800 unite/mg protein, P-7012). %0.5 lik pepsin serum fizyolojik (%0.9 NaCl) içinde hazırlandı pH:1.5'a ayarlandı (Kullanmadan hemen önce).

6) Fosfat tamponlu salin (pH= 7.4).

0.2 gr KCl

0.2 gr KH₂PO₄

8.0 gr NaCl

1.44 gr Na₂HPO₄

Bir litre distile suda çözülür.

2) Serum ve dokuda bakır, çinko tayini:

Eser element tayini için alet ve gereçlerin kullanıma hazırlanması

Payreks cam kaplar, ependorf serum saklama kapları ve doku saklama kapları Isoclean® ile 60°C’de 2-3 saat ultrasonik yıkayıcıda yıkandı ve durulandı. Bir gece 1N HCl’de bekletildi. Ertesi gün 4-5 defa taze bidistile su ile yıkanıp etüvde kurutuldu. Özel torbalarda muhafaza edildi. Dokular bu şekilde hazırlanmış kaplara kondu. Kanlar tek kullanımlık polipropilen tüplere alındı. Serum ayrıldıktan sonra ependorf saklama kapları içinde saklandı.

a) Serum Bakır Ölçümü: (4)

Atomik Absorpsiyon spektrofotometresinin grafit fırın sisteminde, atomik absorpsiyon tekniğine göre bakır oyuk katod lambası kullanılarak:

Dalga boyu: 324.7 nm,

Slit: 0.5

Lamba akımı: 5 m Amp

Argon gazı akımın: ortalama 3 lt/dak,

Kurutma: 85-120°C’de 55 saniye

Ayrışma: 800°C’de 8 saniye,

Atomizasyon: 2300°C’de 5 saniye olacak şekilde alet ayarlandı.

Serum bakır analizi yapılmak üzere serumlar 26 defa %1’lik nitrik asit ile sulandırıldı. 1000 µg/ml stok standarttan 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 75 ng/ml, 100 ng/ml’lik çalışma standartları hazırlandı. Standartlar

%1'lik nitrik asit ile sulandırıldı. Atomik absorpsiyonun spektrofotometresi, grafit fırın ünitesi ve bilgisayar ünitesi 10, 25, 50, 75, 100 ng/ml'lik standartlara göre ayarlanıp kalibre edildi ve standart eğri çizildi. %1'lik nitrik asitle sulandırılmış serum örnekleri aletin grafit fırın ünitesinin pirolitik kaplı grafit tübünün içine her defasında 10 µl olmak üzere pipetlenerek, bilgisayar ünitesinden numüne konsantrasyonları hesaplanmış olarak alındı.

b) Serum Zn ölçümü: (24)

Atomik absorpsiyon spektrofotometresinin flame sisteminde, atomik absorpsiyon tekniğine göre çinko oyuk katod lambası kullanılarak 213.9 nm dalga boyunda, 1.5 lt/dak hava-asetilen akımında, slit:1'de serum çinko analizi yapılmak üzere serumlar 1/5 oranında %1 nitrik asit ile sulandırıldı. Stok standarttan 1000 µg/ml; 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 300 ng/ml, 500 ng/ml konsantrasyonlarda çalışma standartları hazırlandı. Sulandırma %1'lik nitrik asit ile yapıldı. Varian marka Atomik absorpsiyon cihazının mikro örnek alıcıya sahip alev ünitesinde önce standartlar üç defa verilerek alet kalibre edildi ve standart eğri çizildi. Daha sonra %1'lik nitrik asitle sulandırılmış örnekler mikroörnekleme ünitesinde ikişer defa okutularak değerler alındı. Her bir okumadan sonra alete %1'lik nitrik asit verilerek alet sıfıra ayarlandı.

c) Dokuda Bakır ve Çinko Ölçümü: (4,24)

- 1) Payreks kapaklı cam kaplar daraları alındıktan sonra 100°C'de sabit tartıma gelinceye kadar ara ara tartılmak sureti ile 36 saat bekletildi.

- 2) Dokular sabit tartıma gelmiş bu kaplara tartılarak konuldu.
- 3) İçinde doku örnekleri bulunan kaplar 36 saat sabit tartıma gelinceye kadar 100°C'de bekletildi ve tartılar kaydedildi.
- 4) Dietil eter ve petrol eterinin yarı yarıya karışımı ekstraksiyon için kullanıldı. 5ml dietil eter- petrol eteri karışımında dokular 30'ar dakika bekletilerek üst faz atıldı, bu işlem üç defa tekrarlandı.
- 5) Taze hazırlanmış distile su ile üç defa yıkandı.
- 6) 100°C'lık etüvde sabit tartıma getirildi.
- 7) Sabit tartıma gelmiş dokular 10 ml'lik polipropilen Falcon marka tüplere tartılarak alındı.
- 8) Üzerlerine %30'luk hidrojen peroksit'den 1'er ml kondu 70°C'de 16 saat bekletildi. Bu işlem dokunun parçalanma durumuna göre 2 veya 3 kez tekrarlandı, kurutuldu.
- 9) Tüpte kalan materyalin üzerine 0.5M 2 ml HNO₃ kondu. 2 saat bekletildi, vortekslendi.
- 10) Dokuda bakır çinko ölçümü, serum çinko ve bakırda anlatılan şekilde, atomik absorpsiyon spektrofotometresinde çizilen standart eğriye göre konsantrasyonları okundu.

Eser Element tayininde kullanılan ayraçlar:

- 1) Zn Atomik absorpsiyon stok çözeltisi (Merck)
- 2) Cu Atomik absorpsiyon stok çözeltisi (Merck)
- 3) Konsantre nitrik asit (Merck)
- 4) Konsantre hidroklorik asit (Merck)
- 5) Dilüsyon çözeltisi %1lik nitrik asit

- 6) Isoclean (isolab)
- 7) Hidroklorik asit (1N)
- 8) Dietil eter (Merck)
- 9) Petrol eteri (Merck)
- 10) Hidrojen peroksit (%30)
- 11) Asetilen gazı (Habaş)
- 12) Argon gazı (Habaş)

3) Dokuda Malondialdehit tayini: (77)

Lipit peroksidasyonun son ürünü olarak oluşan malondialdehidin (MDA) tiobarbütirik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi sonucunda oluşan rengin absorbansı florometrede ölçüldü. Tümör ve normal meme dokusundan soğuk 0.15 M KCl içinde %10'luk (w/v) homojenat hazırlandı. Homojenizasyon bıçaklı ultratoraks ve sonikasyon cihazı yardımı ile buz içinde yapıldı.

Deneyin Yapılışı:

0.2 ml doku homojenatı üzerine 0.2 ml %8.1 sodyum dodesil sülfat, 1.5 ml asetat tamponu, 1.5 ml %0.8 TBA konuldu. 4 ml'ye distile suyla tamamlandı, kaynar suda 60 dakika kaynatıldı, soğutuldu ve 1ml distile su konuldu. 5ml bütanol-piridin (15:1) eklendi, vortekslendi, 15 dak. santrifüj edildi ve organik faz ayrıldı. Florometrede, eksitasyon 515, emisyon 535 nm'de okundu.

Ayıracılar:

- 1) 0.15 M KCl (%1.15 KCl)
- 2) %8.1 Na dodesil sülfat (Lauryl sülfat)
- 3) %20 Asetik Asit pH: 3.5 (NaOH ile pH:3.5'a ayarlanır)
- 4) %0.8 TBA: 0.08 gr Tiobarbutirik asit 1ml 0.5 M NaOH'de çözülür ve su ile 10 ml'ye tamamlanır
- 5) Butanol-Piridin (15:1)
- 6) Tetra etoksi propan standartı: Stok standarttan 22 mg tartılıp, 10 ml distile suda çözülür
- 7) Çalışma standartı: Stok standart 1000 kez sulandırılırsa 10 nmol/ml'lik standart elde edilir

Kullanılan aletler ve malzemeler:

- 1) Çift ışınlı duterium background düzeltmeli bilgisayar kontrollü Atomik absorpsiyon spektrofotometre (Varian spectrAA-200)
- 2) Bilgisayar kontrollü Varian marka grafit fırın (Varian GTA -100)
- 3) Atomik absorpsiyon mikro örnekleyici flame ünitesi (Varian spectrAA-200)
- 4) Mikrosampler (Varian marka)
- 5) Kodlu Zn çukur katod lambası (Varian marka)
- 6) Kodlu Cu çukur katod lambası (Varian marka)
- 7) Bilgi işlem ünitesi
- 8) Ultrasonik yıkayıcı LC 30 (Elma marka)
- 9) Payrex kapaklı cam kaplar (özel imalattır)

- 10) 10 ml polipropilen tüpler (Falcon)
- 11) 10 µl, 20 µl ve 1000 µl Brand marka otomatik pipetler, sarı ve mavi plastik uçlar
- 12) Pirolitik kaplı grafit tüp (Varian marka)
- 13) Akım sitometresi (Coulter Electronics Profil II. UK)
- 14) Spektroflorometre (Jasco FP-750)
- 15) Ultratoraks (IKA- Labortechnik)
- 16) Sonikasyon aleti. Virsonic (Virtis)

Biyoistatistik yöntemler:

Kontrol ve deney gruplarına ait bulguların birbirleriyle kıyaslanmasında Mann-Whitney U, Wilcoxon- rank, korelasyon değerlendirilmesinde ise Spearman korelasyon testi uygulandı.

BULGULAR

Çalışmalarımız; 20 sağlıklı kadının kanında, histopatolojik olarak meme kanseri tanısı konmuş 25 kadının kan, tümör ve normal meme dokusunda, histopatolojik incelemede selim meme hastalığı tanısı konmuş 14 kadının kan ve meme dokusunda yapıldı.

Selim meme hastalıklı kadınların histopatolojik incelenmesinde, 8'inde fibrokistik hastalık, 2'sinde fibrokistik + fibroadenom, 4'inde fibrozis olduğu belirlendi (Tablo 3).

Meme kanseri tanısı konan 25 hastanın ise 13'inin invaziv duktal karsinom, 3'nün infiltratif duktal karsinom, 4'nün insitu duktal karsinom, 1'nin invaziv lobuler karsinom, 1'nin infiltratif lobuler karsinom ve 3'ünün metaplastik karsinom olduğu saptandı (Tablo 4).

Tüm olgularda 12 saat açlıktan sonra ameliyat öncesi alınan kanlardan elde edilen serumlardan çinko (Zn) ve bakır (Cu) tayinleri yapıldı. Ayrıca kanserli hastalardan alınan tümör, tümör dışı normal meme dokularında ve selim meme hastalıklı hastalardan alınan dokularda Zn, Cu ve lipit peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeyleri saptandı.

Her iki grubun tümör dokusunda DNA ploidi tayini yapıldı. DNA indeksi ve S fazı incelendi.

I- Kontroller ile selim meme hastalıklı ve meme kanserli hastaların serum Zn ve Cu değerleri, Cu/Zn oranları istatistiksel açıdan incelendiğinde (Tablo 5, Şekil 8):

- 1) Selim meme hastalıklı grubun serum Zn düzeyi kontrollerin serum Zn düzeyinden anlamlı düşük olduğu ($p < 0.05$),
- 2) Kanserli grubun serum Zn değerlerinin kontrol grubundan anlamlı düşük olduğu ($p < 0.01$),
- 3) Meme kanserli grubun serum Cu düzeylerinin kontrol ve selim meme hastalıklı grubun serum Cu düzeylerinden anlamlı düşük olduğu ($p < 0.01$, $p < 0.05$),

II- Meme kanseri olduğu saptanan hastaların tümör ve tümör dışı normal dokuları ile selim meme hastalığı tanısı konmuş doku örneklerinde; Zn, Cu ve malondialdehit değerleri istatistiksel olarak incelendiğinde (Tablo 6);

- 1) Tümör Zn düzeyinin; normal doku Zn düzeyinden ($p < 0.001$) ve selim meme Zn düzeyinden ($p < 0.01$), selim meme Zn düzeyinin normal doku Zn düzeyinden ($p < 0.01$) anlamlı yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 9).
- 2) Tümör dokusu Cu düzeyinin, normal doku Cu düzeyinden ($p < 0.05$) ve selim meme dokusu Cu düzeyinden ($p < 0.001$) anlamlı yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 10).

- 3) Tümör dokusu MDA düzeyinin, normal doku MDA düzeyinden ($p < 0.05$) anlamlı düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 11).

III- Selim meme dokusu ile meme kanserli grubun tümör dokularında akım sitometresi ile yapılan DNA analizinde;

- 1) 14 selim meme hastalıklı grup DNA ploidi açısından incelendiğinde 6'sı diploid (%43), 8'i anöploid (%57), 8 anöploidin 2 tanesinin hipodiploid olduğu, 21 tümör dokusunda yapılan incelemede birinin diploid (%5), 20'sinin anöploidi olduğu (%95), 20 anöploidinin ise 3'ünün multiploid, 1'inin hipodiploid yapıda olduğu saptanmıştır (Tablo 4).
- 2) Ortalama S faz fraksiyonu incelendiğinde selim meme dokusunda 3.59 ± 0.82 , kanserli memenin tümör dokusunda 31.6 ± 4.86 olduğu, bu farkın ileri derecede anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.001$), (Tablo 6).

IV- Selim meme dokusunu anöploid ve diploid olarak ayırdıktan sonra serum Zn ve Cu ile doku Zn,Cu,MDA, DNA ploidi ve ortalama %S değerleri istatistiksel olarak incelendiğinde (Tablo7);

- 1) Anöploid tipte olanların %S değerleri, diploidilerin %S değerlerinden anlamlı yüksek olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 12).

Korelasyon analiz sonuçları:

Korelasyon analizi normal, selim ve malign meme hastalıklıların serum ve doku değerleri arasında aynı parametrede ve aynı doku veya serumun farklı parametreleri arasında bakıldı.

- 1) Selim meme hastalıklı grupta serum Zn düzeyi ile serum Cu düzeyleri arasında pozitif korelasyon gözlemlendi ($r= 0.633$, $p= 0.020$).
- 2) Malign meme hastalıklı grupta tümör Zn düzeyi ile normal doku Zn düzeyleri arasında pozitif korelasyon bulundu ($r=0.510$, $p=0.010$), buna karşılık Cu düzeyleri arasında korelasyon görülmedi.
- 3) Malign meme hastalıklı grubun tümör MDA ve normal meme dokusu MDA arasında pozitif korelasyon görüldü ($r=0.500$, $p= 0.029$) .

Tablo 3: Selim meme hastalıklı grup

<i>No</i>	<i>Yaş</i>	<i>Histopatolojik Tanı</i>	<i>DNA ploidi</i>	<i>Ort. %S</i>
1	60	Fibrozis	Anöploid	4.2
2	61	Fibrozis	Anöploid	9.9
3	44	Fibrokistik	Diploid	2.8
4	41	Fibrokistik	Hipodiploid	1.3
5	39	Fibrokistik	Anöploid	35.6*
6	48	Fibrokistik	Anöploid	4.5
7	20	Fibrokistik	Diploid	0.7
8	47	Fibrokistik	Hipodiploid	6.0
9	44	Fibrokist+Fibroadenom	Diploid	0.7
10	76	Fibrokist+Fibroadenom	Diploid	1.3
11	48	Fibrozis	Diploid	1.5
12	61	Fibrokistik	Diploid	3.1
13	43	Fibrokistik	Anöploid	8.4
14	56	Fibrozis	Anöploid	2.3

* Ortalama % S değeri istatistik dışı bırakıldı.

Tablo 4: Meme kanseri hasta grubu

<i>No</i>	<i>Yaş</i>	<i>Histopatolojik Tanı</i>	<i>Grade</i>	<i>DNA ploidi</i>	<i>Ort %S</i>
1	62	Insitu duktal Ca*	2	Anöploid	11.9
2	60	Infiltratif duktal Ca		Anöploid	4.5
3	43	Infiltratif lobüler Ca	2	Anöploid	42.8
4	65	Invaziv duktal Ca	2	Diploid	76.9
5	46	Invaziv duktal Ca	2	Multiploid*	59.3
6	35	Invaziv duktal Ca		Multiploid*	50.1
7	62	Invaziv duktal Ca	3	Anöploid	4.5
8	42	Metaplastik Ca	3	Anöploid	8.9
9	32	Invaziv duktal Ca	3	Anöploid	9.9
10	55	Invaziv lobüler Ca	3	Anöploid	54.2
11	37	Infiltratif duktal Ca		Anöploid	3.9
12	75	Invaziv duktal Ca	3	Anöploid	10.0
13	51	Invaziv duktal Ca	3	Multiploid**	31.0
14	53	Insitu duktal Ca	3	Anöploid	55.1
15	74	Invaziv duktal Ca	2	Anöploid	46.2
16	51	Insitu duktal Ca		Anöploid	42.0
17	52	Invaziv duktal Ca		Anöploid	12.0
18	37	Metaplastik Ca	3	Hipodiploid	6.0
19	54	Invaziv duktal Ca	3	Anöploid	49.7
20	66	Insitu duktal Ca		Anöploid	31.6
21	36	Invaziv duktal Ca	2	Anöploid	14.0
22	57	Infiltratif duktal Ca	2		
23	40	Invaziv duktal Ca			
24	70	Invaziv duktal Ca			
25	54	Invaziv duktal Ca			

*Ca** = Karsinom

*Multiploid** = 2 anöploid.

*Multiploid*** = 1 anöploid, 1 hipodiploid.

Tablo 5: Normal kişilerde, selim ve malign meme hastalığı olan kişilerde serum çinko ve bakır düzeyleri ile Cu/Zn oranları (Ort $\pm$ S.E.).

	Serum Zn ($\mu\text{g/ml}$)	Serum Cu ($\mu\text{g/ml}$)	Cu/Zn
Kontrol grup (n=20)	0.950 $\pm$ 0.02	1.19 $\pm$ 0.03	1.265 $\pm$ 0.04
Selim meme grup (n=14)	0.875 $\pm$ 0.02*	1.11 $\pm$ 0.04	1.249 $\pm$ 0.04
Malign grup (n=22)	0.836 $\pm$ 0.02**	1.02 $\pm$ 0.03** ^a	1.210 $\pm$ 0.03

Kontrolle karşılaştırılması : * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Selim meme grubu ile karşılaştırılması : ^a $p < 0.05$

Tablo 6: Normal, malign ve selim meme dokularında Zn, Cu, MDA ile malign ve selim meme dokularında ort. % S düzeyleri (Ort $\pm$ S.E.).

	Doku Zn $\mu\text{g} / \text{gr}$ kuru doku	Doku Cu $\mu\text{g} / \text{gr}$ kuru doku	Doku MDA nmol / gr doku	Ortalama % S
Normal	10.46 $\pm$ 1.61 n= 25	0.68 $\pm$ 0.15 n= 23	232.31 $\pm$ 56.27 n= 21	
Malign	42.97 $\pm$ 5.58*** ^a n= 25	1.33 $\pm$ 0.24* ^b n= 22	93.44 $\pm$ 8.76* n= 24	31.64 $\pm$ 4.86 ^b n= 21
Selim meme	20.08 $\pm$ 3.86** n= 14	0.30 $\pm$ 0.06 n= 14	167.72 $\pm$ 54.02 n= 11	3.59 $\pm$ 0.82 n= 13

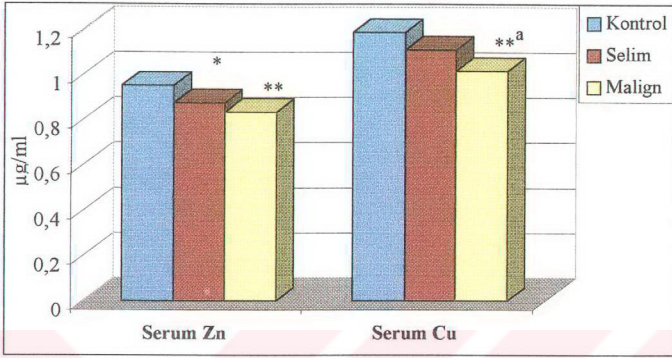
Normal doku ile karşılaştırılması : ***p < 0.001 **p < 0.01 *p < 0.05

Selim meme dokusuyla karşılaştırılması : ^a p < 0.01 ^b p < 0.001

Tablo 7: Anöplöid ve diploid olarak sınıflandırılan selim meme hastalarının serum ve meme dokusunda çinko ve bakır düzeyleri ile doku malondialdehit(MDA) ve %S değerleri (Ort $\pm$ S.E.).

	Serum Zn $\mu\text{g/ml}$	Serum Cu $\mu\text{g/ml}$	Cu/Zn	Doku Zn $\mu\text{g/gr doku}$	Doku Cu $\mu\text{g/gr doku}$	Doku MDA nmol/gr doku	%S
Diploid	0.89 $\pm$ 0.04 n= 5	1.03 $\pm$ 0.045 n=5	1.16 $\pm$ 0.06 n=5	20.42 $\pm$ 3.16 n= 6	0.38 $\pm$ 0.057 n=6	209.6 $\pm$ 105.9 n=5	1.68 $\pm$ 0.42 n=6
Anöplöid	0.91 $\pm$ 0.05 n=8	1.06 $\pm$ 0.06 n= 8	1.31 $\pm$ 0.03 n=8	19.17 $\pm$ 6.65 n=8	0.24 $\pm$ 0.095 n=8	132.8 $\pm$ 53.03 n=6	5.23 $\pm$ 1.10* n= 7

*Anöplöid grubun diploid gruba karşılaştırılması *p<0.05*

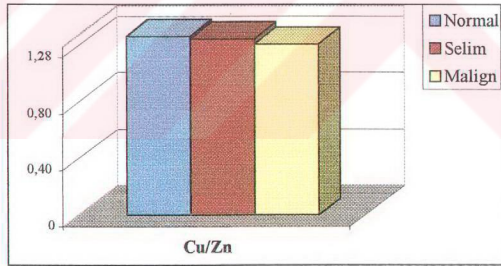


Kontrolle karşılaştırılması :

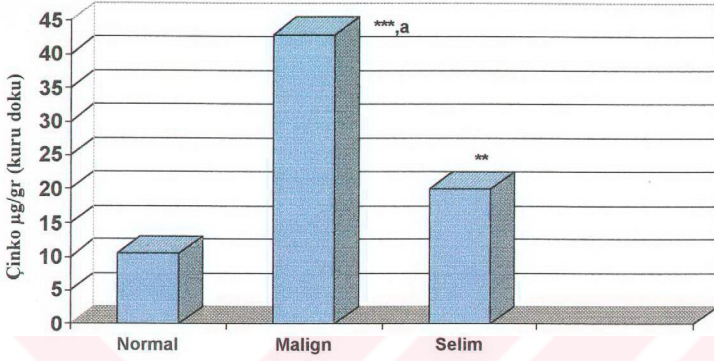
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Selim meme grubu ile karşılaştırılması:

^a $p < 0.05$



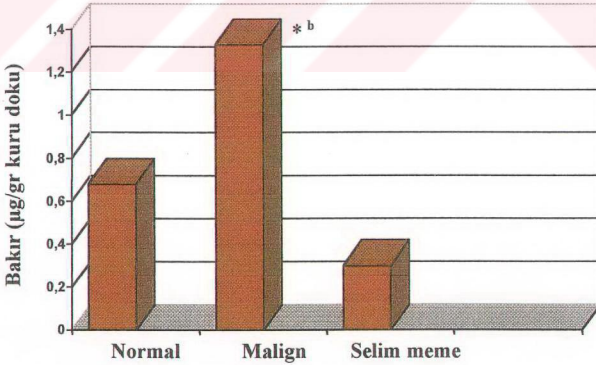
Şekil 8: Normal kişilerde, selim ve malign meme hastalığı olan kişilerde serum Zn, Cu düzeyleri ile Cu/Zn oranları.



Normal doku ile karşılaştırılması : *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$

Selim meme doku ile karşılaştırılması : ^a $p < 0.01$

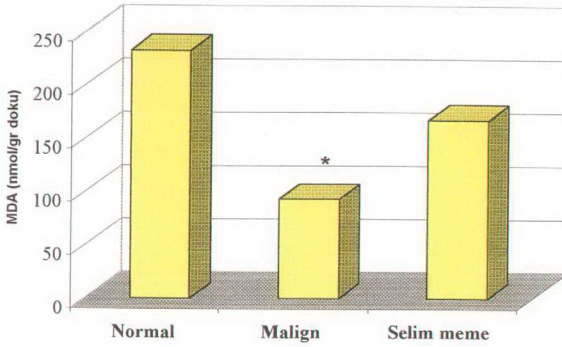
Şekil 9: Normal, malign ve selim meme dokularında Zn düzeyleri



Normal doku ile karşılaştırılması : * $p < 0.05$

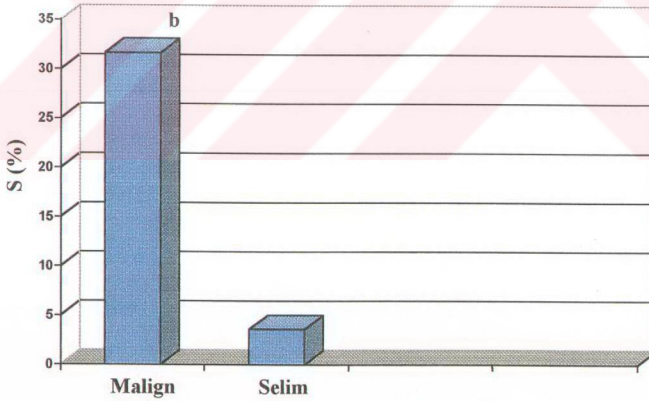
Selim meme dokusu ile karşılaştırılması : ^b $p < 0.001$

Şekil 10: Normal, malign ve selim meme dokularında Cu düzeyleri



* $p < 0,05$ normal dokuyla karşılaştırılması

Şekil 11: Normal, malign ve selim meme dokularında MDA değerleri



Selim meme dokusu ile karşılaştırılması ^b $p < 0.01$

Şekil 12: Malign ve selim meme dokularında ortalama % S faz düzeyleri

TARTIŞMA

Meme kanseri tüm kadınlarda özellikle endüstriyel ülkelerdeki kadınlarda en sık görülen kanser türüdür (44). Heterojen ve kompleks bir hastalık olup pek çok faktörden etkilenir (108).

Epidemiyolojik çalışmalar insanlarda tümör gelişimine yol açan faktörlerin çoğunluğunun çevresel faktörlerden kaynaklandığını ortaya koymaktadır (28,62,92,108). Tümör oluşumu, gelişimi ve yayılım hızının başlıca etkenlerini kimyasal karsinojenler, fiziksel ajanlar ve virüsler gibi eksojen faktörler ile endojen faktörler oluşturur (62,108). Bütün bu ajanların mutasyonlara neden olabileceği ve kromozomal mutasyonların da insanda kanser ortaya çıkış ve gelişimi ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (28, 65, 90, 102).

Serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksitler normal metabolik olaylar sırasında endojen kaynaklı olarak veya çevresel faktörler tarafından eksojen kaynaklı olarak oluşmaktadır (28,52,62,108). Serbest oksijen radikalleri başlıca süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi enzimlerin rol aldığı çeşitli savunma sistemleriyle elimine edilir. Antioksidan savunma sistemindeki değişikliklerin karsinogeneizde önemli olduğu düşünülmektedir (27,37,65,86, 95,106,108).

Eser elementler çok sayıda biyolojik olayda temel bir rol oynar. Çoğunlukla bağlanma yerleri için protein ve diğer elementlerle yarışarak enzimatik reaksiyonların aktivatörü veya inhibitörü olarak, hücre membranlarının permeabilitesini etkileyerek veya diğer mekanizmalar aracılığıyla etkilerini gösterir. Bu nedenle bu elementlerin direkt veya indirekt olarak karsinojenik olaylarda rol aldıkları ileri sürülmektedir (25,73,99, 100,104).

Normal meme dokusunun kanser hücrelerine dönüşmesi çok aşamalı, karmaşık bir süreçtir. Meme karsinogenezininin karmaşık özellikleri tümörlerin biyolojik özelliklerine de yansır. Bu özelliklerin bir bölümü hastalığın klinik gidişine ışık tutması açısından tanıda önem taşır. Meme kanserli hastaların prognozunu tayin etmede timidin işaretleme indeksi ile DNA ploidi yöntemleri son yıllarda çok önem kazanmıştır (1,10,26,34, 64,79,105).

Bir selim meme hastalığı türü olan fibrokistik hastalığa sahip kadınlarda meme kanseri riskinin 1.86-2.13 kat arasında değiştiği ileri sürülmüştür (67). Meme dokusundaki hangi selim değişikliklerin histolojik olarak prekanseröz olabileceğini araştıran en önemli çalışma Dupont ve Page (33) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada 3303 hasta 17 yıl takip edilmiş ve çeşitli histolojik alt tipleri ile meme kanseri oluşumu arasındaki ilişki araştırılmıştır. Meme biopsisinde proliferatif değişikliklere (sklerozis, adenozis, papiloma) sahip olan kadınlarda, biopsisinde proliferatif değişiklik bulunmayan kadınlara nazaran kansere yakalanma oranının 1.9 kat fazla olduğu bulunmuştur. Atipik hiperplazi saptanan kadınlarda ise kanser oluşma riski 4.4 kat daha fazla görülmüştür. Atipik hiperplazi ile

birlikte ailevi meme kanseri hikayesi olanlarda, olmayanlara oranla meme kanseri oluşma riskinin 9 kat fazla olduğu ileri sürölmüştür (28).

Çeşitli çalışmalarda lipit peroksidasyonu göstergesi olan malondialdehidin mutajen ve potansiyel bir karsinojen olduğu, membrana bağlı enzimleri ve DNA'yı içeren makromolekülleri tahrip ettiği bildirilmektedir (7,5,14,15,43). Bazı araştırıcılar lipit peroksidasyonunun karsinogenezin başlama safhasında (6,7), bazıları ise kanserin gelişme ve ilerlemesinde de etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir (62). Bu nedenle meme kanseri ile lipit peroksidasyon artışı arasında bir ilişki olabileceği ileri sürölmüştür (44). Bazı araştırıcılar lipit peroksidasyonun kimyasal ürünleri ile hastalık durumu arasında bir ilişkinin bulunmasının sadece hastalığın varlığını yansıtabileceğini, ancak hastalığın sebebi olamayacağını belirtmişlerdir (15). Çeşitli alışmalarda MDA ile kanser ilişkisi araştırılmıştır. Mamografik displazi gösteren 50 yaşın altındaki kadınların meme kanseri açısından yüksek risk grubunda olduğu bildirilmiş bu kadınların idrarında MDA konsantrasyonu mamografisi normal olan hastalara göre daha yüksek bulunmuştur (14,44). Sıçanlarda yapılan deneysel meme kanseri çalışmasında ise karsinojen verilmesinden bir ay sonra, plazma MDA değeri kontrollerden yüksek bulunmuşken tümör oluşumundan sonra kontrollerle aynı düzeye indiği gösterilmiştir (80). Wang ve arkadaşları (107) MDA ile oluşan DNA eklentilerini meme dokularında analiz etmişler, kanserli dokuda normal dokuya göre düşük bulmuşlardır. Ancak peroksidasyon olayı ve neoplazmanın büyümesi arasındaki bağlantının yapısı tartışmalıdır (44). Bir yandan lipit peroksidasyon konsantrasyonunun neoplastik dokularda ve neoplastik hasta-

ların kan plazmasında arttığı (44), öte yandan sadece neoplastik hücrelerde ve dokularda değil, hızlı bölünen normal hücrelerde de düşük düzeyde görülebileceği bildirilmiştir (43).

Bazı çalışmalarda hücre proliferasyonu ile lipit peroksidasyonu arasındaki bağlantı karaciğer rejenerasyonunda, embriyonik dokuda ve embriyonik dokuya benziyen bazı tümör hücrelerinde gösterilmiştir. Bu üç dokuda da lipit peroksidasyonun çok düşük olduğu bulunmuş ve bu durum muhtemelen lipit peroksidasyon ürünlerinin hücre bölünmesinin kontrolünde işe karışabileceğini düşündürmüştür (12,43). Tümör büyümesi ve yayılımı gibi hücre bölünme hızının arttığı koşullarda lipit peroksidasyonuna karşı bir direnç geliştiği ileri sürülmektedir (43). Lipit peroksidasyonunun farklı mekanizmalarla tümör büyümesini inhibe ettiği düşünülmektedir. Lipit peroksidasyonun özellikle tümörlerin hücre proliferasyonunda çok önemli rol oynadığı, hücre bölünmesi için gerekli olan çeşitli hücre olaylarını ve siklus fazlarını inhibe ederek tümör büyümesini azalttığı ileri sürülmüştür (43).

Lipit peroksit ile oluşan hücre ve doku hasarı tek bir faktöre bağlanamaz. Tümör hücrelerinde normal hücrelerle kıyaslandığında anormal bir lipit bileşimi ve düşük düzeyde sitokrom P₄₅₀ sisteminin enzimleri bulunmuştur (22). Normal komşu dokuyla kıyaslandığında, meme karsinom dokusunda azalmış lipit peroksit ve yüksek antioksidan düzeyleri gösterilmiştir (42). Sonuç olarak, lipit peroksidasyonunun tümör büyümesi ile tersine bir ilişki gösterdiği ileri sürülmüştür (43).

Çalışmamızda doku MDA ortalama değerlerine bakıldığında en az tümör dokusunda en yüksek normal dokuda olduğu görülmüştür. Bu da

literatürlerde bildirilen sonuç ve açıklamalara uygun olup lipid peroksit ile tümör büyümesi arasında tersine bir bağıntı olduğu fikrini desteklemektedir (43, 107).

Meme dokusu karmaşık yapıya sahiptir, bu nedenle farklı bölgelerdeki doku örneklerinden farklı değerler çıkabilir. Küçük tümör örnekleri bile tümör hücreleri yanı sıra, stroma hücrelerini ve immün hücreleri kapsar (84). Bazı araştırmacılar memenin normal ve tümör dokusunda glutatyon düzeyi ile glutatyon peroksidaz ve glutatyon S transferaz aktivitelerini çalışmışlar, kişiden kişiye ve aynı histolojik tipte bile aynı dokunun farklı bölgelerinde farklı sonuçlar bulmuşlardır. Enzimlerdeki farklılığın kişiden kişiye değişmesini genetik, çevresel ve fizyolojik (hormon, yaş) faktörlere bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir (3,45,46,84,87). Bu nedenle, bu çalışmada MDA değerlerinde kişiden kişiye görülen farklılığın meme dokusunun yapısal değişkenliğinden ve çevresel şartların etkisinden kaynaklandığı düşünülebilir.

Son zamanlarda ilgi neoplastik hastalıklarda antioksidan savunma sistemine yönelmiştir (43). Bu görüşe göre eser elementler ve antioksidan savunma sisteminin diğer parametreleri çok önemlidir. Cu ve Zn oksidatif doku hasarı ile ilişkili olan eser elementlerdir (60,61). Son yıllarda, antioksidan özellikleri nedeniyle bu elementlerdeki dengesizliğin kronik hastalıkların nedeni olabileceği ileri sürülmüştür (61). Meme kanserli kadınlarda Cu ve Zn ilişkisi ancak bir kaç çalışmada araştırılmış ve bu çalışmaların sonuçları da çelişkili bulunmuştur (25,40,41,69,92).

Çeşitli çalışmalardaki serum Zn değerlerinin, selim meme hastalığı ve meme kanserlilerde kontrolden hafif yüksek olduğu (62) veya kontrole

göre anlamlı azaldığı (69) ya da değişmemiş olduğu bulunmuştur (21,61,92). Zn hem karsinojenik hem de antikarsinojenik role sahiptir. Zn bir taraftan serbest radikal hasarına karşı koruyarak karsinogenezi inhibe eder, diğer taraftan gen transkripsiyonu ve hücre proliferasyonundaki rolü nedeniyle tümör büyümesi için gereklidir. Zn ve kanser arasındaki ilişki üzerine epidemiyolojik bilgiler sınırlı ve belirsizdir (40). Yaptığımız çalışmada selim meme hastalığı ve meme kanseri bulunan grupların serum Zn değerinin kontrole göre anlamlı düşük olduğu görülmüştür. Bizim sonuçlarımız Magalova ve arkadaşlarının (69) sonuçlarıyla uyumludur. Zn'nin tümör dokusu tarafından seçici olarak kullanılması serum Zn düzeyini azaltabilir. Yapılan bir çalışmada azalan plazma çinko düzeyi ile neoplazmanın büyüme ve yayılması arasında korelasyon görülmüştür (72,103).

Neoplastik hastaların serum veya plazmalarında Cu düzeyinin çeşitli çalışmalarda normal veya yüksek olduğu gösterilmiştir (25,62,69). Selim ve malign meme hastalıklı kadınların serum Cu değerleri arasında anlamlı farkı gösteren yayınlara karşılık (40,41) fark bulunmayan çalışmalar da vardır (69). Bizim çalışmamızda selim meme hastalıklı ve meme kanserli grubun serum Cu düzeyinin kontrolden anlamlı olarak düşük olduğu görülmüştür. Gerek yüksek, gerekse düşük bakır düzeylerinin kanser riskini artırdığı ileri sürülmüştür (40,41,61). Düşük Cu düzeyleri antioksidan enzim olan SOD'un inhibisyonuna neden olmakta (76,83), buna karşılık yüksek Cu düzeyleri ise serbest radikal oluşumunu katalizlemektedir (62,97).

Çeşitli çalışmalarda kanser göstergesi olarak Cu/Zn oranının önemli faktör olabileceği (100,110) veya öneminin olmadığı bildirilmiştir (85). Bizim çalışmamızda ise Cu/Zn oranı kanserli grupta, her iki gruptan da az olduğu, fakat bu azalmanın istatistiksel anlamı olmadığı bulunmuştur.

Tümör büyümesinde Zn'ya gereksinim normal hücreden fazla olduğu için Zn ihtiyacı artmaktadır (100). Buna karşılık Zn düzeyini kanser hücrelerinde normal hücrelere göre düşük bulan çalışma da vardır (72). Bu çalışmada, hücreler arası Zn kullanımı için yarış olmasının ortamdaki Zn'nun paylaşılmasına neden olacağı, bunun da hücrede Zn düzeyinin azalmasına yol açacağı ileri sürülmüştür (72). Bu nedenle optimal hücresel Zn konsantrasyonunun devamlılığının tümör büyümesinin önlenmesinde önemli olabileceği ileri sürülmektedir (100). İn vitro çalışmalarda Zn eksikliğinin hücre proliferasyonunun azalmasına ve kültürlerde düşük yaşam süresine neden olduğu, buna karşılık Zn ilavesinin programlanmış hücre ölümünün önlenmesi üzerine etkileri olduğu bildirilmiştir (81).

Çalışmamızda meme kanserli tümör dokularında, normal dokulara göre Zn düzeyinin yüksek olması malign dokuda artan hücresel aktiviteden ve kan akımındaki artış sonucu dokuya eser elementin birikiminden kaynaklanabilir (69,73). Selim meme dokusuna ait sonuçlarımız bu hastaların meme dokusunda da hücresel aktivitenin ve kan akımının değiştiğini, eser element transportunun arttığını göstermektedir. Bununla birlikte tümör dokusu Cu düzeyinin normal doku Cu düzeyinden ve selim meme dokusu Cu düzeyinden yüksek olması, diğer araştırmacıların Zn ve Cu'a ait bulgularıyla desteklenmektedir (69,73).

Normal (diploid) hücrelerle karşılaştırıldığında kanser hücrelerinin anormal bir DNA (anöploid) içeriğine sahip olduğu gösterilmiştir. Anöploidi neoplastik hücrelerde sayısal ve yapısal kromozom değişikliklerini yansıtmaktadır (50). Kanserın saptanmasında diğerk yöntemlerle gözden kaçabilen anöploidik küçük hücre popölasyonları akım sitometresi ile kolayca saptanabilmektedir (89). Anöploid hücrelerin çoğalmayı uyaran ve baskılayan genler arasındaki dengenin bozulmasına bağılı olarak belirli çoğalma avantajlarına sahip olduğı düşünölür (89,90,95).

Hücre siklusu ölçümleriyle saptanan tümör hücrelerinde yer alan DNA'nın miktarındaki anormallikler, tümörün özelliklerine ışık tutabilir (89,90). Tümörlerde nükleer DNA içeriğinin belirlenmesi ile hastalığın prognozu, histolojik evre ve lenf nodu tutulumu arasında ilişki olduğı düşünölmektedir (1,10,27,33,64). Diploid DNA içerikli tümörlere sahip meme kanserli hastaların prognozu anöploid tümörlerden daha iyi olduğı kabul edilmektedir (8,36,50,53,88,89,90).

Meme kanserinde DNA ploidi bağımsız bir prognostik faktör olabilir veya diğerk güçlü prognostik faktörlerle ilişkilidir (1). Lenf nodu, tümör ölçüsü ve DNA ploidi gibi bir çok değişkenin kullanıldığı prognostik indeks tek başına bir prognostik faktör olarak kullanılan lenf nodundan çok daha güçlüdür. Bu prognostik indeksin kullanımı hastalara farklı tedavilerin seçiminde gereklidir (33). Çoğı organ sistemlerinde selim ve premalign lezyonların değerkendirilmesinde ploidi analizi yapılmıştır. Bu prognostik parametre çok küçük tümör örneğinde bile çalışılabilmektedir (96).

Akım sitometresiyle yapılan DNA ploidi analizinde DNA indeksi değeri 1 olanlar diploid, 1'in dışında kalanlar anöplöid olarak değerlendirilmektedir (68). Yaptığımız çalışmada 21 meme kanserli hastaların %95'i anöplöidi, %5'i diploidi, 14 selim meme hastalıklı grubun %43'ü diploid, %57'si anöplöidi olduğu saptanmıştır. Meme kanserlilerde yapılan DNA analizi çalışmalarında anöplöidi oranı %53-73 arasında bulunmuştur (26,38). Meme kanseri görülme sıklığı ve ölüm oranının ülkeden ülkeye değişmesinin, genetik, çevresel ve hormonal şartlarla ilişkil olduğu ileri sürülmektedir. Meme hastalıklı Türk kadınlarında ise böyle bir çalışmaya rastlanmamıştır. Olgu sayımızın az olmasına rağmen, bizim çalışmamızda anöplöid oranının yüksek çıkması genetik, çevresel ve diet gibi şartlara bağlı olarak Türk toplumunda tümörlerin daha malign karakterli olabileceğini düşündürmektedir.

Anöplöidi, pre-invaziv lezyonları önceden haber veren biyolojik olarak en agresif değer olabilir (38). Hücre DNA'sı, proliferatif aktivitenin artmasından ve nükleer kromatin içeriğindeki değişikliklerden dolayı malign değişim esnasında artar (38). Selim meme hastalıklı hastaların 1/4'de anöplöid hücrelerin bulunduğu, bunlarda sonradan invaziv karsinom geliştiği belirtilmektedir. Hücre DNA içeriği, pre-invaziv meme hastalığının değerlendirilmesinde başlıca prognostik indeks olabilir (20). Genellikle anormal DNA içeriği ve hasta survisi arasında direkt bir ilişki vardır. Ancak bazı tümörlerde (lösemi, nöroblastom) kemoterapötik ajanların atipik DNA içerikli hücre popülasyonları için seçici olduğu ve böyle tümörlü hastaların diploid tümörlü hastalardan daha uzun bir yaşam süresine sahip olabileceği belirtilmiştir (89,90). Öte

yandan, bazı çalışmalarda S faz fraksiyonunun DNA ploididen daha faydalı prognostik faktör olduğu ileri sürülmektedir (55).

Bizim çalışmamızda ortalama %S faz fraksiyonu selim meme hastalığında 3.59 ± 0.82 , meme kanserlilerde 31.64 ± 4.86 olduğu görülmüştür. Bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Çalışmalarımızdaki %S'lerin ortalama değişim katsayısı (Cv) selim meme hastalığında 6.53 ± 0.40 , meme kanserlilerde 5.56 ± 0.39 bulunmuştur. Bu değerler diğer çalışmaların değişim katsayıları (Cv) ile uygunluk göstermektedir (65,102).

İnsan karaciğer hücre kültürlerinde $ZnCl_2$ 'ün belirli konsantrasyonlarının hücre siklusunu etkilediğini ve genomik DNA'nın Zn konsantrasyonuna göre değişiklik gösterdiğini bulmuşlardır (81). Bu sonuç muhtemelen tümör dokusunda Zn konsantrasyonunun artışının DNA ploidinin proliferasyon fazının değişmesine ve anöploidinin oluşmasına neden olmaktadır. Yüksek S fraksiyonunun, meme kanserinde hastalığın tekrarı ve erken ölümle ilgili olduğu gösterilmiştir (36,38,50). S faz fraksiyonu ve DNA diploid ve DNA anöploid neoplazmaların kadınlar için prognostik öneme sahip olduğu ve DNA ploidinin bağımsız bir prognostik faktör olduğunu bir çok çalışmada gösterilmiştir (20,54, 55,56).

Selim meme hastalığı grubunu diploid ve anöploid olarak sınıflandırarak incelediğimizde diploidlilerde anöploidlilere göre Zn düzeylerinin değişmediği, doku Cu ve MDA konsantrasyonlarının daha yüksek olduğu, ortalama %S değerlerinin ise anlamlı düşük olduğu saptanmıştır.

Yapılan bazı çalışmalarda genç hastaların (50 yaşın altındaki) genellikle yaşlılardan daha yüksek S faz fraksiyonuna ve DNA anöplodine sahip olduğu bildirilmiştir (93,102). Başka bir çalışmada ise yaşın önemi olmadığı belirtilmiştir (57). Biz de çalışmamızda meme kanserli grubu 50 yaş altı ve 50 yaş üstü olmak üzere sınıflandırarak tüm parametreler istatistiksel açıdan incelenmiştir. Genç grubun; serum Zn düzeyinin, tümör ve normal dokusunun Zn ve Cu değerlerinin yüksek olduğu, buna karşılık S faz fraksiyonunda önemli değişiklik olmadığı bulunmuştur. DNA ploidi incelenmesinde ise çalışmamızda saptadığımız tek diploid tümör 50 yaşın üstündeki grupta bulunmaktadır. Bizim sonuçlarımıza göre yaş faktörü diğer çalışmanın aksine klinik açıdan önemli görünmemektedir.

Sonuç olarak: Meme kanserinde doku Zn ve Cu düzeylerindeki artışın tümördeki kan akımı ve hücresel aktivitedeki artışa bağlı olduğu, bu elementlerin artışının tümör büyümesini ve hücre siklus fazlarını etkileyerek proliferasyon göstergesi faz artışı ve anöplod oluşumuna yol açtığı, MDA'nın ise belki de SOD etkisiyle düşük bulunduğu ve tümör büyümesi ile tersine ilişkili olduğu düşünülmektedir. Selim meme hastalığında, doku Zn artışının serum Zn'da azalışa neden olduğu, doku Cu'nun azalmasının muhtemelen SOD'un inhibisyonuna yol açarak MDA oluşumunu arttırdığı, %S düzeylerinin anöplodli grupta diploidden yüksek fakat kanserli gruptan düşük olduğu, MDA değerlerinin anöplodli arttıkça azaldığı görülmüştür. Bu bulgulara göre selim meme hastalığı bulunan kişilerde meme kanseri riskinin artacağı ileri sürülebilir.

ÖZET

Bu çalışma meme kanseri ve kanser için yüksek riskli grup olan selim meme hastalığı tanısı konmuş kişilerde lipit peroksidasyonu ve eser element düzeylerinde olabilecek değişiklikler ve bunların DNA ploidi ve proliferasyon göstergesi olan S faz fraksiyonu ile bağlantılarını araştırmak üzere planlandı.

Bu amaçla sağlıklı kontrol ile selim meme hastalığı ve meme kanseri tanısı konmuş üç gruptan kan alınarak serumda Zn, Cu düzeylerine bakıldı. Doku çalışmaları ise selim meme hastalığı saptanan grubun biopsi örneklerinde, meme kanseri tanısı konan grubun tümör dokusu ile tümör dışındaki sağlam meme dokusunda yapıldı. Dokuda MDA, Zn, Cu ve akım sitometresi ile DNA ploidi, DNA İndeksi ve %S faz fraksiyonu incelendi.

Elde edilen bulgulara göre:

- 1) Selim meme hastalıklı ve meme kanserlilerin serum Zn düzeylerinin kontrollere göre, meme kanserlilerin serum Cu değerlerinin ise kontrol ve selim meme hastalıklarına göre anlamlı düşük olduğu,
- 2) Tümör Zn ve Cu düzeyinin normal meme dokusu ve selim meme dokusuna göre anlamlı arttığı,

- 3) Doku MDA düzeyleri ortalamalarına bakıldığında normal meme dokusunda en yüksek, tümör dokusunda en düşük olduğu görüldü.
- 4) Malign ve selim meme dokuları DNA ploidi açısından incelendiğinde meme kanserli hastaların %95'i anöploid, %5'i diploid, selim meme hastalıklı grubun ise %43'ü diploid, %57'si anöploid olarak değerlendirildi. Ortalama %S faz fraksiyonunun tümör dokusunda, selim meme dokusundan anlamlı yüksek olduğu saptandı.
- 5) Selim meme hastalığı grubu diploid ve anöploid olarak incelendiğinde diploidlilerde anöploidlilere göre Zn düzeylerinin değişmediği, doku Cu ve MDA değerlerinin biraz yükseldiği, ortalama %S düzeylerinin ise anlamlı düşük olduğu saptandı.

Bu çalışmanın bulguları, meme kanserinde doku Zn ve Cu düzeylerindeki artışın tümördeki kan akımı ve hücresel aktivitedeki artışa bağlı olduğunu, bu artışın serum Zn ve Cu düzeylerinin azalmasına neden olduğunu, dokuda bu elementlerin artışının DNA siklus fazlarını etkileyerek S faz artışı ve anöploid oluşumuna yol açtığını, MDA'nın ise tümör büyümesi ile tersine ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Selim meme hastalığında, doku Zn artışının serum Zn düzeylerinde azalışa neden olduğu, doku Cu'nun azalmasına bağlı SOD inhibisyonunun MDA'nın kanserlilere göre daha yüksek olmasına yol açtığı, ortalama %S düzeylerinin anöploid grupta diploid gruptan yüksek fakat kanserli gruptan düşük olduğu ve anöploidi arttıkça MDA değerlerinin azaldığı görülmüştür. Bütün bu veriler, selim meme hastalığı bulunan kişilerde meme kanseri riskinin arttığını düşündürmektedir.

SUMMARY

This study was planned to determine the levels of lipid peroxidation and trace elements and their relationship to DNA ploidy and the S phase fraction, which is a marker for proliferation in patients with breast cancer or benign breast disease.

Blood samples obtained from the control and breast disease patients were investigated for Zn and Cu levels. Tissue studies were carried out on biopsy materials obtained from both benign breast disease group and breast cancer group. Both tumor tissue and unaffected mammary gland were examined in latter. DNA ploidy, DNA index and %S phase fraction were determined using flow cytometry .MDA, Zn, Cu levels in tissue samples were also determined .

According to the results obtained:

- 1) Serum Zn levels were significantly lower in both benign breast disease and breast cancer groups than those of compared to control group. Serum Cu levels of breast cancer group were significantly lower than those of control and benign breast disease groups.
- 2) Zn and Cu levels were found significantly increased in tumor tissue.

- 3) Tissue MDA levels were highest in normal breast and lowest in tumor tissue.
- 4) When malignant and benign breast tissues were examined for DNA ploidy, the cancer group showed 95%aneuploidy and 5%diploidy. on the other hand, benign breast disease group showed 43% diploidy and 57% aneuploidy. Mean % S phase fraction was found significantly higher in tumour tissue than benign mammary disease tissue.
- 5) When benign mammary disease group was classified as diploid and aneuploid, it was observed Zn levels were similiar in two groups, whereas tissue Cu and MDA levels were slightly high and mean %S levels were significantly low in diploid group.

It was suggested that high levels of Zn and Cu Zn are due to the increase of blood flow and cell activity, leading to a decrease in serum Zn and Cu levels. The increase of these elements may effect the cell cycle phases resulting in an increase of S phase fraction and aneuploidy formation. The observation in relation to MDA levels which were inversely related with tumor growth, was in good agreement with previous reports.

In benign breast disease, mean % S level was higher in aneuploid group than in diploid group, but it was lower than the cancer group. It was observed that MDA values were negatively correlated with aneuploidy. All these findings suggest that benign breast disease patients do have an increased risk for mammary cancer.

KAYNAKLAR

1. Aasmunstad, T.A. and Haugen, O.A.: DNA ploidy in intraductal breast carcinomas. *Eur. J. Cancer*, 26: 956-959, 1990.
2. Adnane, J., Gaudray, P., Simon, M.P., Lafontaine, S.J., Jeanteur, P., Theillet, C.: Proto-oncogene amplification and human breast tumor phenotype. *Oncogene*, 4:1389-1395, 1989.
3. Albin, N., Massaad, L., Toussaint, C., Mathieu, M.C., Morizet, J., Parise, O., Gouyette, A., Chabot, G.G.: Main drug-metabolizing enzyme systems in human breast tumors and peritumoral tissues. *Cancer Res.*, 53:3541- 3546, 1993.
4. Alcock, N.W.: Copper. "Methods in Clinical Chemistry" Eds.: Amadeo J. Pesce, Lawrence A. Kaplan, pp: 527-538, The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1987.
5. Ames, B.N.: Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, 221:1256-1264, 1983.
6. Ames, B.N., Hollstein, M.C., Cathcart, S.: Lipid peroxidation and oxidative damage to DNA "Lipid peroxides in Biology and Medicine" Ed: Yagi K., pp: 339-351, Academic Press, New York, 1982

7. Anghileri, L. J.: Iron, intracellular calcium ion, lipid peroxidation and carcinogenesis. *Anticancer Res.*, 15: 1395-1400, 1995.
8. Aykan, T. B., Tüzüner, N., Sav, A., İnce, Ü.: Kısa Patoloji, çeviri kitabı, (Synopsis of Pathology, Ed:W.A.D. Anderson), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 1987.
9. Azzopardi, J.G., Chepick, O.F., Hastmann, W.H.: The World Health Organization histological typing of breast tumors. Second edition. *Am. J. Clin. Pathol.*, 78:806-816, 1982.
10. Balslev, I., Christensen, J., Rasmussen, B.B., Larsen, J.K., Lykkesfeldt, A.E., Thorpe, S.M., Rose, C., Briand, P., Mouridsen, H. T.: Flow cytometric DNA ploidy defines patients with poor prognosis in node-negative breast cancer. *Int. J. Cancer*, 56: 16-25, 1994.
11. Bemheim, F.: Biochemical implications of pro-oxidant and antioxidants. *Rad. Res. Suppl.*, 3:17-32, 1963.
12. Black, D. M.: The genetics of breast cancer. *Eur. J. Cancer.*, 30: 1957-1961, 1994.
13. Borgiani, L., Cogorno, P., Buccaran, G., Gallo, L., Rovida, S., Canepa, M.: Human breast cancer: Prognostic significance of DNA ploidy compared with c-erbB2 expression, cathepsin D and silver binding nucleolar organizer region. *Pathologica*, 86:350-355, 1994
14. Boyd, N.F., Mc Guire, V.: Evidence of lipid peroxidation in premenopausal women with mammographic dysplasia. *Cancer Lett.*, 50: 31-37, 1990 .

15. Boyd, N. F., Mc Guire, V.: The possible role of lipid peroxidation in breast cancer risk. *Free Radical Biol. Med.*, 10:185-190, 1991.
16. Bremner, I., Young, B. W., Mills, C.F.: Protective effect of zinc supplementation against copper toxicosis in sheep. *Br. J. Nutr.*, 36:551-561, 1976.
17. Bremner, B.I., Beattie, J. H.: Copper and zinc metabolism in health and disease: Speciation and interaction. *Proc. Nutr. Soc.*, 54: 489-499, 1995.
18. Buege, J.A., Aust, S.D.: Microsomal lipid peroxidation. *Method-Enzymol.*, 52:302-310, 1978.
19. Burnet, F. M.: New horizons in the role of zinc in cellular function. "Clinical Applications of Recent Advances in Zinc Metabolism" Ed: F.M. Burnet, pp:181-192, Alan R. Liss. Inc., New York, 1982.
20. Carpenter, R., Gibbs, N., Matthews, J. and Cooke, T.: Importance of cellular DNA content in pre-malignant breast disease and pre-invasive carcinoma of the female breast. *Br. J. Surg.*, 74:905-906, 1987.
21. Cavallo, F., Gerber, M., Marubini, E., Richardson, S., Barbieri, A., Costa, A., Pujol, H.: Zinc and copper in breast cancer. A joint study in Northern Italy and Southern France. *Cancer*, 17: 738-745, 1991.
22. Cheeseman, K.H., Burton, G.W., Ingold, K.U., Slater, T. F.: Lipid peroxidation and lipid antioxidants in normal and tumor cells. *Toxicol. Path.*, 12:235-239, 1984.

23. Cherr, S.Z. and Keen, C. L.: Essential trace elements in antioxidant processes. "Trace Elements, Micronutrients and Free Radicals" Ed: I. E. Dreosti, pp: 107-127, The Human Press Inc., New Jarsey, 1991.
24. Chou, P.P.: Zinc "Methods in Clinical Chemistry" Ed: Amadeo J. Pesce, Lawrence A. Kaplan, pp: 596-602, The C.V.Mosby Company, St. Louis, 1987.
25. Coates, R.J., Weiss, N.S., Daling, J.R., Rettmer, R.L., Warnic, G.R.: Cancer risk in relation to serum copper levels. Cancer Res., 49: 4353-4356, 1989.
26. Cufer, T., Lamovec, J., Bracko, M., Lindtner, J., Krasovec, M.: Prognostic value of DNA ploidy in breast cancer stage I-II. Neoplasma, 44:127-132, 1997.
27. Dabrosin, C., Öllinger, K., Ungerstedt, U. and Hammar, M.: Variability of glutathione levels in normal breast tissue and subcutaneous fat during the menstrual cycle: An in vivo study with microdialysis technique. J. Clin. Endoc. Metab., 82:1382-1384, 1997.
28. Darendeliler, E.: Meme kanserinin epidemiyolojisi ve etyolojisi "Meme Kanseri " Ed: E. Topuz, pp:16-40, İst. Üniv. Onkoloji Ens. Yayınları 3, İstanbul, 1997.
29. Del Maestro, R.F.: An approach to free radicals in medicine and biology. Acta. Physiol. Scand. (suppl), 492:153-168, 1980.
30. Del Maestro, R.F.: Increase in microvascular permeability induced by enzymatically generated free radicals. II. Role of superoxide anion

- radicals, hydrogen peroxide and hydroxyl radical. *Microvasc. Res.*, 22:255-270, 1981.
31. Dowle, A., Owainati, A., Robins, A.: Prognostic significance of the DNA content of human breast cancer. *Br. J. Surg.*, 74:133-136, 1987.
 32. Duffy, M, J.: Biochemical markers as prognostic indices in breast cancer. *Clin. Chem.*, 36: 188-191, 1990.
 33. Dupont, W., Page, D.L.: Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N. Engl. J. Med.*, 312: 146-151, 1985.
 34. Eskelinen, M., Collan, Yrjö., Pajarinen, P., Pesonen, E.: An improved prognostic index of axillary node involvement in breast cancer incorporating DNA ploidy and tumour size. *Acta. Chir Scand.*, 156: 521-527, 1990.
 35. Fabris, N. and Mocchegiani, E.: Zinc, human diseases and aging. *Aging Clin. Exp. Res.*, 7: 77-93, 1995 .
 36. Fallenius, A. G., Auer, G. U. and Cartensen, J. M.: Prognostic significance of DNA measurement in 409 consecutive breast cancer patients. *Cancer*, 62: 331-341, 1988.
 37. Fridovich, I.: Superoxide radical and superoxide dismutase. *Oxygen and Living Process*. Ed: D. L.Gilbert, pp: 250-272, Springer Verlag, New York, 1981.
 38. Frierson, H.F.: Ploidy analysis and S-phase fraction determination by flow cytometry of invasive adenocarcinomas of the breast. *Am. J. Surg. Pathol.*, 15: 358-367, 1991.

39. Futreal, P.A., Luie, Q., Shattuch, E. D., Cochran, C., Harshman, K., Tavtigian, S., Bennett, L.M., Haugen-Strano, A., Swensen, J., Miki, Y.:BCRA I mutation in primary breast and ovarian carcinomas. *Science*, 266: 120-122, 1994.
40. Garland, M., Morris, J.S., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Spate, V.L., Baskett, C.K., Rosner, B., Speizer, F.E., Willett, W.C., Hunter, D. J.: Toenail trace element levels and breast cancer: A prospective study. *Am. J. Epidemiol.*, 144: 653-660, 1996.
41. Garofalo, J., Ashikari, H., Lesser, M. L., Botet, M. B., Rundles, C.S., Schwartz, M. K., Good, R.A.: Serum zinc and copper the Cu/Zn ratio in benign and malignant breast lesions. *Cancer*, 46: 2682-2685, 1980.
42. Gerber, M., Richardson, S., De Paluet, P. C., Pujol, H., De Paulet A.C.: Relationship between vitamin E and polyunsaturated fatty acids in breast cancer. *Cancer*, 64: 2347-2353, 1989.
43. Gonzalez, M.J.: Lipid peroxidation and tumor growth: an inverse relationship. *Med. Hypotheses*, 38:106-110, 1992.
44. Gromadzinka, J., Sklodowska, M., Wolkanin, P., Wasowicz, W., Quispe, O.Z. and Pluzanska, A.: Lipid peroxide levels and antioxidant enzyme activities in blood of breast cancer patients. *J Clin. Biochem. Nutr.*, 13: 127-135, 1992.
45. Gromadzinska, J., Wasowicz, W., Andrijewski, M., Sklodowska, M., Quispe, O.Z., Wolkanin, P., Olborski, B., Pluzanka, A.: Glutathione and glutathione metabolizing enzymes in tissues and blood of breast cancer patients. *Neoplasma*, 44: 45-51, 1997.

46. Gromadzinska, J., Wasowicz, W., Sklodowska, M., Perek, D. and Popadiuk, S.: Glutathione peroxidase activity, selenium and lipid peroxides levels in blood of cancer patients. *Ann. Clin. Res.*, 20:177-183, 1988.
47. Hall, A.C., Young, B.W., Bremner, I.: Intestinal metallothionein and the mutual antagonism between copper and zinc in the rat. *J. Inorg. Biochem.*, 11: 57-66, 1980.
48. Haskel, C.M. and Casciato, D.A.: Breast Cancer. " Manual of Oncology " Eds: A. Casciato, Barry Blowitz, . 3. edition, pp: 183-199, Little Brown Inc., Boston, 1995.
49. Hedley, D.W., Rugg, C.A., Gelber, R.D.: Association of DNA index and S-phase fraction with prognosis of nodes positive early breast cancer. *Cancer Res.*, 47: 4729-4735, 1987.
50. Henderson, C.: Breast Cancer. " Harrison Principles of Internal Medicine" Eds: Jean D.Wilson, Eugene Braunwald, Kurt J.I.Bacher, Robert G. Petersdorf, Joseph B. Martin, Anthony S. Fauci, Richard K. Root, pp:1612-1621, Mc Graw-Hill Inc., Health Professions Division, New York, 1991.
51. Hurnanen, D., Chan, H.M. and Kubow, S.: Protective effect of metallothionein against lipid peroxidation caused by retinoic acid in human breast cancer cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 283: 1520-1528, 1997.
52. İnce, Ü.: Memenin Anatomisi "Meme Kanseri"Ed:E.Topuz, pp: 1-15, İst. Üniv. Onkoloji Enst. Yayınları 3, İstanbul, 1997.

53. Jamilton, D.: Oxygen Toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals *Free Radical Biol. Med.*, 7:87-108, 1989.
54. Kallioniemi, O. P., Hietanen, M., Mattila, J., Lehtinen, M., Lauslahti, K., Koivula, T.: Aneuploid DNA content and high S-phase fraction of tumour cells are related to poor prognosis in patients with primary breast cancer. *Eur. J. Cancer. Clin. Oncol.*, 23: 277-282, 1987.
55. Kallioniemi, O.P., Blanco, G., Alavaikko, M., Hietanen, T., Mattila, J., Lauslahti, K., Koivula, T.: Tumour DNA ploidy as an independent prognostic factor in breast cancer. *Br. J. Cancer*, 56: 637-642, 1987.
56. Kallioniemi, O.P., Blanco, G., Alavaikko, M., Hietanen, T., Mattila, J., Lauslahti, K., Lehtinen, M., Koivula, T.: Improving the prognostic value of DNA flow cytometry in breast cancer by combining DNA index and S- phase fraction. *Cancer*, 62:2183- 2190, 1988.
57. Katsouyanni, K., Signorello, L.B., Laggiou, P., Egan, K., Trichopoulos, D.: Evidence that adult life risk factors influence the expression of familial propensity to breast cancer. *Epidemiol.*, 8: 592-595, 1997.
58. King, M.C.: Breast cancer genes: How many, where and who are they? *Nature Genetics*, 2: 89-90, 1992.
59. King, M.M., Bailey, D.M., Gibson, D.G., Pitha, J.V., McCay P.B.: Incidence and growth of mammary tumors induced by 7, 12-dimethylbenzanthracene as related to the dietary content of fat and antioxidant. *J Natl. Cancer Inst.*, 63: 657-663, 1979.

60. Kobussch, A.B., Bock, K.W.: Zinc increases EGF- stimulated DNA synthesis in primary mouse hepatocytes: Studies in tumor promoter-treated cell cultures. *Biochem. Pharmacol.*, 39: 555-558, 1990.
61. Kok, J.F., Van Duijn, C.M., Hofman, A., Van der Voet, G.B., De Wolff, F.A., Paays, C.H., Valkenburg, H.A.: Serum copper and zinc and the risk of death from cancer and cardiovascular disease. *Am. J. Epidemiol.*, 128: 352-359, 1988.
62. Köksoy, C., Kavas, G.Ö., Akçıl, E., Kocatürk, P.A., Kara, S., Özarslan, C.: Trace elements and superoxide dismutase in benign and malignant breast diseases. *Breast Cancer Res. Treat.*, 45: 1-6, 1997.
63. Laval-J.: Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress. *Pathol. Biol.*, 44: 14-24, 1996.
64. Lewis, W. E.: Prognostic significance of flow cytometric DNA analysis in node-negative breast cancer patients. *Cancer*, 65: 2315-2320, 1990.
65. Li, P., Yokomori, K., Tsuchida, Y., Fujita, M., Shimizu, K., Tanaka, E., Pianovski, M.A.d., Takemura, T.: Flow cytometric nuclear DNA content analysis of renal tumors in children: Prognostic significance of nuclear DNA ploidy. *Tumor Biol.*, 16:385-393, 1995.
66. Loft, S., Poulsen, H.E.:Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med.*, 74: 297-312, 1996.
67. Love, S.M., Gelmen, R.S., Silen, W.: Fibrocytic disease of the breast-A nondisease. *N. Eng. J. Med.*, 307: 1010-1014, 1982.
68. Lönn, U., Lönn, S., Nilsson, B., Stenkvist, B.: Breast cancer: Prognostic significance of c-erb-B2 and int-2 amplification compared

- with DNA ploidy, S-phase fraction, and conventional clinicopathological features. *Breast Cancer Res. Treat.*, 29: 237-245, 1994.
69. Magalova, T., Bella, V., Babinska, K., Brtkova, A., Kudlackova, M. and Bederova, A.: Zinc and copper in breast cancer "Therapeutic Uses of Trace Elements" Eds: Neve et al, pp:373-375, Plenum Press, New York, 1996.
 70. Mars, W.M. and Saunders, G.F.: Chromosomal abnormalities in human breast cancer. *Cancer Metastasis Rew.*, 9: 35-43, 1990.
 71. Mc Guire, W.L.: Prognostic factors for recurrence and survival in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 10: 5-9 1987
 72. Mc Quitty, J., DeWys, W.D., Monaco, L., Strain, W.H., Rob, C.G., Apgar, J., Pories, W.J.: Inhibition of tumor growth by dietary zinc deficiency. *Cancer*, 30: 1387-1390, 1970.
 73. Mipsemb, N.G., Bradley D.A., Looi, L.M.: Elevated trace element concentrations in malignant breast tissues. *Br. J. Radiol.*, 70: 375-382, 1997
 74. Newman, B., Millikan, R. C., King, M-C.: Genetic epidemiology of breast and ovarian cancers. *Epidemiol Rev.*, 19: 69-79, 1997.
 75. Nordevang, E., Azavedo, E., Svane, G., Nilsson, B. and Holm, L-E.: Dietary habits and mamographic patterns with breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 26: 207-215, 1993.
 76. Oberly, L.W., Buettner, G.R.: Role of superoxide dismutase in cancer: A review. *Cancer Res.*, 38:1141-1150, 1979.

77. Ohkawa, H., Ohisiti, N. and Yagi, K.: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.*, 95:351-358, 1979.
78. Onat, H.: Meme kanseri risk faktörleri ve korunma ‘‘Meme Kanseri’’Ed:Topuz E. pp: 102-117, İst.Üniv. Onkoloji Enst.Yayınları 3, İstanbul, 1997
79. O'Reily, S.M., Complejoh, R.S., Barnes, D.M., Millis, R.R.: DNA index, S-phase fraction, histological grade and prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer.*, 61:671-674, 1990.
80. Ömer, B., Akköse, A., Kolancı, Ç., Öner, P., Özden, İ., Tuzlalı, S.: Inhibition of mammary carcinogenesis in rats by parenteral high-dose vitamin E. *J. Nat.Cancer. Inst.*, 89: 972-973, 1997.
81. Paramanantham, R., Sit, K.H., Bay, B.H.: Adding Zn^{+2} induces DNA fragmentation and cell condensation in cultured human chang liver cells. *Biol Trace Element Res.*, 58: 135-147, 1997.
82. Parat, M.O., Richard, M.J., Beani, J.C., Favier, A.: Involvement of zinc in intracellular oxidant / antioxidant balance. *Biol. Trace Element Res.*, 60: 187-204, 1997.
83. Paynter, D.I.: The role of dietary copper, manganese, selenium, and vitamin E in lipid peroxidation in tissues of the rat. *Biol. Trace Element Res.*, 2:121-135, 1980.
84. Perry, R.M., Mazetta, J.A., Levin, M., Barranco, S.C.: Glutathione levels and variability in breast tumors and normal tissue. *Cancer*, 72: 783-787, 1993.

85. Poukkula, A., Halala, M., Huhti, E.: Serum copper, zinc and ceruloplasmin concentrations in patients with lung cancer. *Respiration*, 51:272-2276, 1978 .
86. Prasad, A.S.: Clinical and biochemical spectrum of zinc deficiency in human subjects "Clinical, Biocemical, and Nutritional Aspects of Trace Elements" Ed:Ananda S. Prasad, pp: 3-62, Alan R. Liss Inc., New York, 1982
87. Richie, J.P.: The role of glutathione in aging and cancer. *Exper Geront.*, 27:615-626, 1992
88. Richter, C.: Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 27: 647-653, 1995.
89. Riley, R.S, Mahin, E.J., Ross, W: DNA ploidy and cell cycle analysis "Flow Cytometry" Ed:Roger S.Riley, pp: 251-320, FCBN New York, 1993.
90. Riley, R.S.:Clinical applications of DNA ploidy and cell cycle analysis "Flow Cytometry"Ed:Roger S.Riley, pp: 414-451, FCBN New York, 1993.
91. Riordan, J. F.: Zinc of biochemistry. *Med. Clin. North America*, 69: 661-685, 1976.
92. Rizk, S.L., Sky-peck, H.H.: Comparison between concentrations of trace elements in normal and neoplastic human breast tissue. *Cancer Res.*, 44: 5390-5394, 1994.
93. Rochefordiere, De la A., Asselain, B., Campana, F., Scholl, S. M., Fenton, J., Vilcoq, J. R., Durand, J. C., Pouillart, P., Magdelenat, H.,

- Fourquet, A.: Age as prognostic factor in premenopausal breast carcinoma. *Lancet*, 341: 1039-1043, 1993.
94. Rookus, M. A., Van Leeuwen F.E.: Oral contraceptives and risk of breast cancer in women aged 20-54 years. *Lancet*, 344:844-851, 1994.
 95. Rooney, M.T., Henry, J.B.: Molecular markers of malignant neoplasms. "Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods." Ed: John Bernard Henry, pp: 285-384, 18th ed., WB. Saunders Comp., Philadelphia, 1991.
 96. Ruby, S.G., McNally, A.C.: Quality control of imprint and tissue section DNA ploidy analysis in image analysis systems utilizing cell culture-based control materials. *Am. J. Clin. Pathol.*, 104: 167-171, 1995.
 97. Samuni, A., Chevion, M., Czapski, G.: Unusual copper-induced sensitization of the biological damage due to superoxide radicals. *J.Biol. Chem.*, 256:12632-12635, 1981,
 98. Sanders, B. G., Kline, K.: Nutrition, immunology and cancer: An overview " Nutrition and Biotechnology in Heart Disease and Cancer", Eds: J.B.Longenecker et al., pp: 185-194, Plenum Press, New York, 1995.
 99. Schartz M.K.: Role of trace elements in cancer. *Cancer Res.*, 35: 3481-3488, 1975
 100. Song, K. M., Madalene C., Heng Y., Rolandelli.R., Ament, E. M., Heng, K. M.: Possible link between zinc intake and colon cancer. *J Nat. Cancer Inst.*, 85: 667-669, 1993.

101. Spicer, D.V., Kreckler, E A., and Pike, M C., : The endocrine prevention of breast cancer. *Cancer Invest.*, 13: 495-504, 1995.
102. Stal, O., Carstensen, J., Hatsheck, T., Nodenskjöld, B.: Significance of S-phase fraction and hormone receptor content in the management of young breast cancer patients. *Br. J.Cancer*, 66: 706-711, 1992.
103. Takeda, A., Goto, K. and Okada, S.: Zinc depletion supresses tumor growth in mice. *Biol. Trace. Element Res.*, 9:23-29, 1997.
104. Takikawa, S.: Changes in serum Zn, Cu, Se, and Mn levels in patients with chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *J.Clin. Biochem. Nutr.*, 8:153-164, 1990.
105. Toikkanen, S., Joensuu, H., Klemi, P.: The prognostic significance of nuclear DNA content in invasive breast cancer. A study with long-term follow-up. *Br. J. Cancer*, 60:693-700, 1989
106. Vineis, P. and Brandt-Rauf, P. W.: Mechanism of carcinogenesis: Exposure and molecular changes. *Eur. J. Cancer*, 29A: 1344-1347, 1993.
107. Wang, K., Dhingra, K., Hittelman, W.N., Liehr, J.G., Andrade, M.: Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adduct in human breast tissue. *Cancer Epid. Biomark.*, 5:705-710, 1996.
108. Weinstein, I.D.: The origins of human cancer. *Cancer Res.*, 48:4135-4148, 1998.
109. Welsch, C.W.: Review of the effect of dietary fat on experimental mammary gland tumorigenesis: Role of lipid peroxidation. *Free Rad. Biol. Med.*, 18:757-773, 1995.

110. Westin, T., Ahlibom, E., Johansson, E., Sandström, B., Karlberg, I., Edström, S.: Circulating levels of selenium and zinc in relation to nutritional status in patients with head and neck cancer. Arch. Otolaryngol Head Neck Surg., 115:1079-1082, 1989.
111. William, M. D.:Clinical significance of copper deficiency and toxicity in the world population "Clinical, Biochemical and Nutritional Aspects of Trace Elements", Ed: Ananda S. Prasad, pp: 277-299, Alan R. Liss Inc., New York, 1982 .
112. Wilson, R.L.: Zinc and iron in free radical pathology and cellular control. "In Zinc in Human Biology " Ed: C.F. Mills, pp: 147-172 Springer-Verlag, London, 1989.
113. Zalewski, P.D., Forbes, I.J.: Intracellular zinc and the regulation of apoptosis in programmed cell death "The Cellular and Molecular Biology of Apoptosis " Ed: M. Lavin, D. Watters, pp: 73-85, Harwood Academic Publishers, GmbH. Chur., Switzerland, 1993.
114. Zarbo, R. J., Nakhleh, R. E., Ronald, D. B., Kubus, J. J., Chan, K. M., Mackowiah, P.: Prognostic significance of DNA ploidy and proliferation in 309 colorectal carcinomas as determined by two color multiparametric DNA flow cytometry. Cancer, 79: 2073-2085, 1997.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

ÖZGEÇMİŞ

Şanlıurfa’da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Şanlıurfa’da yaptım. Ankara Gazi Üniversitesi Mühendislik Fakültesi (Ankara Devlet Mühendislik Mimarlık Akademisi) Kimya Mühendisliği Bölümü’nü bitirdim. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı’nda tıpta uzmanlık eğitimi yaptım. Halen İst.Üniv.Çocuk Sağlığı Enstitüsü’ne bağlı Eser Element Ünitesi’nde çalışmaktayım.