

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DEĞİŞİK TEDAVİ AŞAMALARINDAKİ MEME KANSERLİ HASTALARIN
ERİTROSİT GLUTATYON PEROKSİDAZ AKTİVİTELERİ, ERİTROSİT
MALONDİALDEHİT ve PLAZMA SELENYUM DÜZEYLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

111370

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Adem ÜNAL

111370

Tez Yöneticisi

Yrd. Doç. Dr. Banu SANCAK

ANKARA - 2001

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım ve yüksek lisans eğitimim süresince bana özveri ile destek olan ve yol gösteren değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Banu Sancak'a teşekkürü bir borç bilirim. Tüm çalışmalarım sırasında ve günlük hayatımda desteğini ve arkadaşlığını benden esirgemeyen Araş. Gör. Dr. Sakine Candan'a ne kadar teşekkür etsem azdır. Başta Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Nedret Kılıç olmak üzere tüm Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve Halk Sağlığı Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Işıl Maral'a eğitimimdeki katkılarından dolayı teşekkür ederim. Hasta numunelerinin toplanmasındaki katkıları ve desteklerinden dolayı Medikal Onkoloji Bilim Dalı başkanı Prof. Dr. Nazan Günel'e ve Uzm. Dr. Uğur Coşkun'a, Doç. Dr. Haluk Alagöl ve Ankara Onkoloji Hastanesi 5. Genel Cerrahi Kliniği asistan doktor ve hemşirelerine ayrıca teşekkür ederim. Bugünlere gelmemdeki maddi ve manevi tüm destekleri için aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Serbest radikaller	3
2.1.1. Serbest oksijen radikalleri ve reaktif oksijen türleri	4
2.1.2. Serbest radikal kaynakları	6
2.1.3. Serbest radikallerin oluşturduğu hücre hasarı	8
2.2. Antioksidan sistemler	12
2.2.1. Antioksidan enzimler	14
2.2.1.1. Süperoksit dismutaz	14
2.2.1.2. Katalaz	15
2.2.1.3. Glutasyon peroksidaz	15
2.2.2. Selenyum	18
2.3. Kanser	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM	24
3.1. Kullanılan gereçler	24
3.1.1. Hasta kanları	24
3.1.2. Kullanılan aletler	24
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler	25
3.2. Uygulanan yöntemler	25
3.2.1. Hasta grupları	25
3.2.2. Kan alma ve eritrosit hemolizat hazırlama protokolü	26
3.2.3. Metotların uygulanması	27

3.2.3.1.Eritrosit hemolizatında hemoglobin tayini	27
3.2.3.2.Eritrosit hemolizatında glutatyon peroksidaz aktivitesi	27
3.2.3.3.Eritrosit hemolizatında malondialdehit tayini	29
3.2.3.4.Plazma selenyum düzeylerinin tayini	30
3.3. Sonuçların analizi	31
4. BULGULAR	32
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	39
6. ÖZET	46
7. SUMMARY	47
8. KAYNAKLAR	48
9. ÖZGEÇMİŞ	60

1. GİRİŞ

Kanser hücreleri, normal hücrelerden kontrolsüz çoğalma ve diğer dokulara metastaz özellikleri ile ayrılır.²³ Kanserinin nedeni tam olarak bilinmemesine rağmen çevresel faktörlerin önemli rolleri bulunmaktadır.⁶⁶ Kanser ile serbest radikaller arasındaki ilişkiyi araştıran ve/veya açıklamaya çalışan çok sayıda çalışma vardır.^{1, 3, 29, 49, 74} Serbest radikaller oluşturdıkları hücre hasarı ile pek çok hastalığın etkeni olabilirler.^{5, 19, 37, 38} Hücrelerde serbest radikal oluşumunu ve meydana getirdikleri hasarı önlemeye yönelik, enzimatik ve nonenzimatik mekanizmalar içeren antioksidan savunma sistemleri mevcuttur.^{2, 5, 59} Ancak antioksidan sistemde oluşabilecek olumsuzluklar sonucu hücreler serbest radikal etkilerine karşı koyamazlar ve ciddi hastalıklar ortaya çıkar.^{1, 39, 41, 49}

Glutasyon peroksidaz (GPx) antioksidan sistemin enzimatik elemanlarından birisi olup, hücrede H₂O₂'in detoksifikasyonundan sorumludur. Ayrıca lipid peroksidasyonunun başlama ve gelişmesinin durdurulmasında da rolü vardır. Selenyum, GPx'in hem sentez hem de aktivitesinde önemli rol oynar. Ayrıca selenyum kuvvetli bir antioksidandır ve antikanserojenik olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar vardır.^{11, 35, 70, 72, 84, 92} Selenyum, vücutta selenoprotein halinde başka fonksiyonlarda da önemli roller üstlenir.^{12, 30, 65}

Antioksidan sistem ve serbest radikallerin değişik kanser türlerinde gösterildiği bir çok çalışma vardır. Bu çalışmalar genelde kanserli hastalarla sağlıklı kontrol gruplarının karşılaştırılması şeklindeki çalışmalardır. Ancak serbest radikaller kanserin başlangıç ve ilerleme evrelerinde farklı etkilere sahiptir. Bu bilgiler doğrultusunda, meme kanseri tanısı konan ve henüz tedavi

almamış hastalar ile değişik tedaviler izlenen hastaların serbest radikallere karşı duyarlılığını ve antioksidan sistemlerindeki değişimleri gözlemek amacıyla bu çalışma yapılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllerdir. Vücutta normal yolla veya ısı, ışık, iyonize radyasyon vb. yollarla oluşan serbest radikaller, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler.

Serbest radikaller 3 yolla oluşur.^{2, 15}

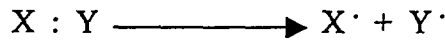
- Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi



- Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi.



- Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi.

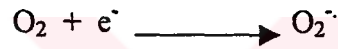


Serbest radikaller biyolojik sistemlerde en çok elektron transferi ile oluşurlar. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler. Aerobik organizmalarda bu radikaller daha çok oksijen radikalleri şeklinde kendini gösterir. Oksijenin elektronları o şekilde dağılmışlardır ki, bu elektronlardan iki tanesi eşleşmemiştir. Bu yüzden oksijen bazen bir 'diradikal' olarak da değerlendirilir. Oksijen bu özelliği ve ortamda sürekli bulunması nedeniyle diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girebilir.^{2, 15, 18, 19, 36, 37}

2.1.1. Serbest oksijen radikalleri ve reaktif oksijen türleri

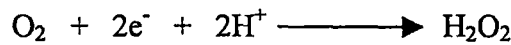
Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalidir. Bunlardan ilk dördünün çeşitli reaksiyonları ile sonuncusu meydana gelir.

Genellikle oluşan ilk ürün, oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşan süperoksit radikal anyonu'dur (süperoksit).

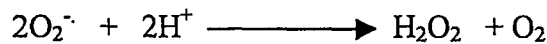


Süperoksit radikalinin en önemli kaynağı mitokondrial elektron transport zinciridir. Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direk olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır.^{2, 15, 33, 41}

Moleküler oksijen, çevresindeki moleküllerden 2 elektron ve 2 hidrojen atomu alarak hidrojen peroksidi oluşturabilir.

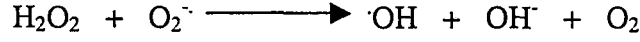


Ancak, hidrojen peroksit biyolojik sistemlerde asıl olarak süperoksit radikalinden oluşur. Şöyle ki; 2 süperoksit molekülü 2 proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluşturur.



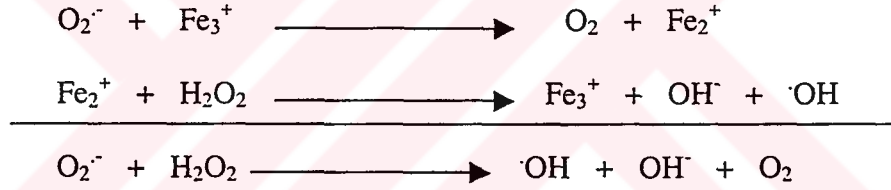
Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir. Dismutasyon reaksiyonu spontandır veya süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenir. Hidrojen peroksit

bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri içindedir. Çünkü süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zararlı serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturur.

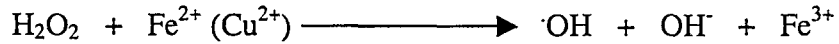


Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu denir. Haber-Weiss reaksiyonu katalizör varlığında veya katalizörsüz gerçekleşir. Katalizör olarak demir kullanan reaksiyon oldukça hızlıdır.

Diğer bir reaksiyon Fenton reaksiyonudur. Bu reaksiyonda ferri demir (Fe_3^+) süperoksit tarafından ferro demire (Fe_2^+) indirgenir. Daha sonra ferro demir kullanılarak H_2O_2 'den hidroksil radikali üretilir.



H_2O_2 geçici metal iyonları varlığında (Fe, Cu) kolayca yıkılır ve hidroksil radikali oluşturur.



Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) son derece reaktif bir oksidan radikaldir. Yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştığı yerde çok büyük hasarlara yol açar. Tioller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak yeni radikallerin oluşmasına sebep olur.

Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) ise ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur.

Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller ($R\cdot$), peroksil radikalleri ($ROO\cdot$), alkoksil radikalleri ($RO\cdot$), tiyil radikalleri ($RS\cdot$) gibi önemli serbest radikaller de meydana gelirler. Tiyil radikalleri daha sonra oksijenle tekrar reaksiyona girip sülfenil ($RSO\cdot$) veya tiyil peroksil ($RSO_2\cdot$) gibi radikaller meydana getirir.

2.1.2. Serbest radikal kaynakları

a. Biyolojik kaynaklar

- Aktive olmuş fagositler (Respiratory Burst)
- Radyasyon (X-ışını) ve ilaç metabolitleri (parasetamol)
- Alışkanlık yapan maddeler (alkol ve uyuşturucular)
- Çevresel ajanlar (hava kirliliği yapan fotokimyasal maddeler)
- Stres (streste katekolamin düzeyinde artış olur ve bunların oksidasyonu iyi bir serbest radikal kaynağıdır.)

b. İntrasellüler kaynaklar

- Küçük moleküllerin otooksidasyonu (tioller, katekolaminler,...)
- Enzimler ve proteinler (ksantin oksidaz, hemoglobin,...)
- Mitokondrial elektron transportu
- Endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri
- Plazma membranı (fagositlerde NADPH oksidaz, lipid peroksidasyonu,...)
- Oksidatif stres yapıcı durumlar (iskemi, travma, intoksikasyon)

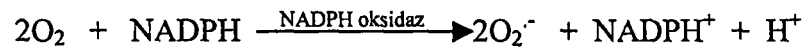
Normalde hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağı, elektron transport zincirinden elektron sızıntısıdır. Mitokondri iç zarına yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri indirgendiği zaman, mitokondrial süperoksit

radikal üretimi artar. Birçok enzimin katalitik siklusları sırasında da serbest radikaller açığa çıkar.

Hücrelerde serbest radikal üretimi bazı yabancı toksik maddeler tarafından da arttırılabilir. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal üretirler ya da antioksidan aktiviteyi düşürürler. Bu tip maddeler 4 grupta toplanabilir.

- Toksinin kendisi bir serbest radikaldir.
- Toksin bir serbest radikale metabolize olur.
- Toksinin metabolizması sonucu serbest oksijen radikali oluşur.
- Toksin, antioksidan aktiviteyi düşürür.

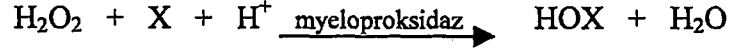
Serbest radikal oluşumunda görevli enzimlerden biri NADPH oksidaz'dır. NADPH'ı NADP'ye oksitler ve süperoksit anyonunu üretir. Bu enzim nötrofil plazma membranında bulunur. Nötrofil gibi fagositik bir hücre uyarı aldığıında 'respiratory burst' denilen bir dizi reaksiyon olur. Respiratory burst'te hücrede aktif maddeyi yok etmek için oksijen radikalleri üretilir.



NADPH oksidaz aktive olduğunda, sitoplazma kaynaklı NADPH'ların elektronlarını oksijene aktarır. Böylece fagositik vakuolün iç yüzeyinde süperoksit radikali meydana gelir.^{5, 56}

Fizyolojik pH'da oluşan süperoksit radikalinden dismutasyon reaksiyonu ile H₂O₂ oluşur. Nötrofillerin içerdiği lizozomal enzimlerinden biri olan myeloperoksidaz, bu H₂O₂'yi kullanarak hipohaloz asitleri (HOX) oluşturur. En sık klor olmak üzere krom ve iyot gibi halojenler mieloperoksidaz enzimi ile H₂O₂ varlığında hipokloroz asit (HOCl), hipobromoz asit (HOBr) ve hipoiyodoz

asiti (HOI) oluřtururlar. Hipohaloz asitler kuvvetli oksidanlardır ve çeşitli biyolojik moleküller ile reaksiyona girerler.²⁴



Oksidatif stres yapıcı durumlarda (iskemi-reperfüzyon, travma, intoksikasyon) bağırsak, akciğer ve karaciğerde bol miktarda bulunan ksantin dehidrogenazın bu dokuların iskemisinde proteaz aracılığı ile ksantin oksidaza dönmesi ve reperfüzyon ile bu enziminde elektron akseptörü olarak oksijeni kullanmasıyla süperoksit anyonu oluşmaktadır.^{41, 69, 78}

2.1.3. Serbest radikallerin oluşturduğu hücre hasarı

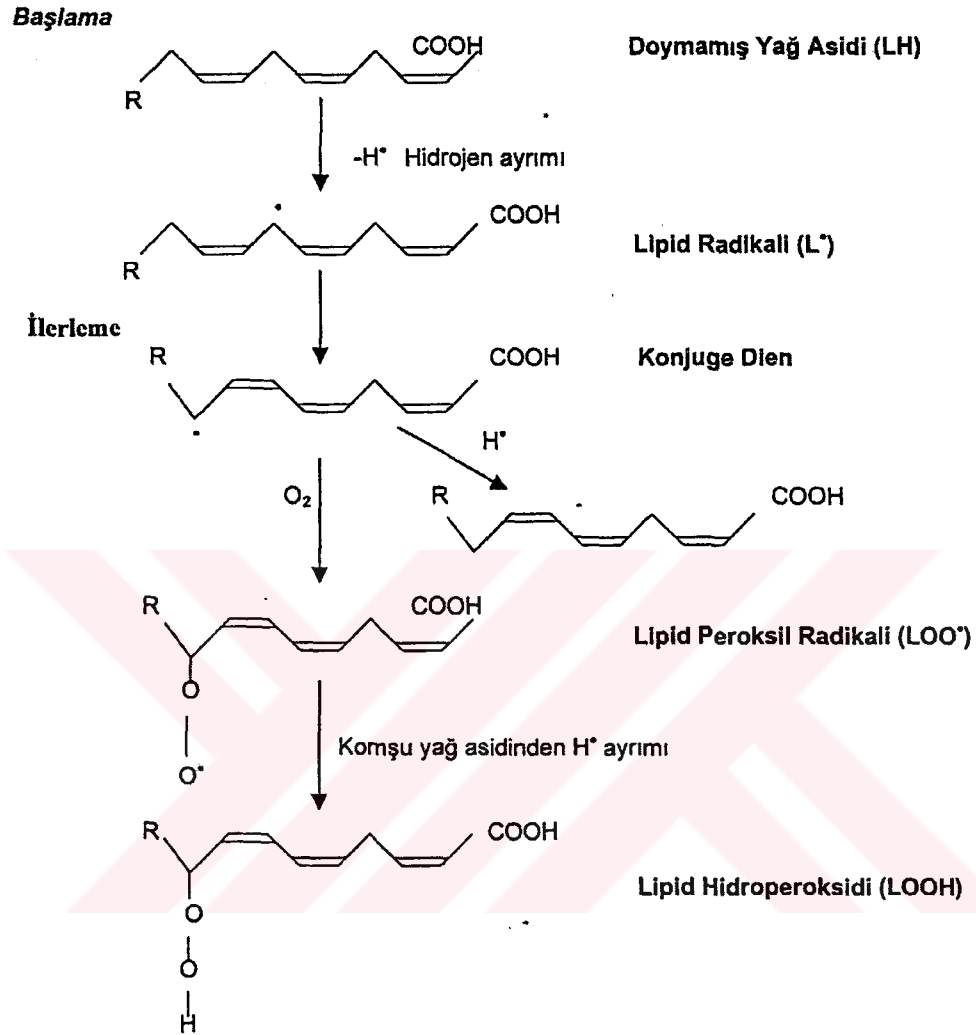
Serbest radikaller çok kısa yaşam süreli olmalarına rağmen çok etkili bileşiklerdir. Tüm hücre bileşenleri ile etkileşme özelliğine sahiptirler. Aktive olmuş oksijen türlerinin artması (süperoksit, hidroksi peroksid radikali, singlet oksijen ve H₂O₂) kontrolsüz çoğalma ve/veya hücre içinde bunların zararsız hale getirilmesinde yetersizlik meydana getirir.⁴⁹ Bu durumda serbest radikallerin protein, lipid ve nükleik asit gibi makro moleküllerle etkileşmeleri hücre yapı ve fonksiyonlarında önemli değişikliğe yol açar. Polisakkaritlerin depolarizasyonuna, nükleik asitlere bağlanarak DNA bütünlüğünün bozulmasına, sülfidril içeren enzimlere bağlanarak bunların inaktivasyonuna, hücre içi oksidasyon-redüksiyon durumunda değişmeye yol açar.^{1, 5, 20, 73}

Plazma membranları, yüksek konsantrasyonda doymamış yağ asidi içerdiği için serbest radikal oluşumunda önemli bölgelerdir. Serbest radikaller, lipid peroksidasyonuna ya da önemli yapısal proteinlerin oksidasyonuna yol

açarak membran permeabilitesinde artışa neden olurlar. Böylece membranlar arası iyon gradienti bozular, sekretuvar fonksiyonlar bozular.¹⁵

Membranlardaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları (çift bağlar), serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluşturur. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipit peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü, kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür.^{5, 15, 48, 59}

Lipit peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal ($R\cdot$) etkisi sonucu membran yapısında bulunan poliansatüre yağ asidi zincirinden (LH) bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipit radikali ($L\cdot$) niteliği kazanır. Oluşan lipit radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Moleküler oksijenle birleşen lipit radikali, peroksi (peroksil) radikalini ($LOO\cdot$) oluşturur. Lipit peroksi radikalleri, membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarlar. Bu sırada kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksidlerine ($LOOH$) dönüşür. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder. Lipit peroksidlerinin yıkımı, geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Lipit hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Lipit peroksidasyonu, lipit peroksidlerinin hidrokarbon gazları ve malondialdehit (MDA) gibi ürünlere dönüşmesi ile sona ermektedir.^{2, 5, 15, 20, 48, 59}



Şekil 1 : Lipit peroksidasyonu ⁷⁵

Lipit peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve indirek olarak reaktif aldehydler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olur. Lipit radikallerinin hidrofobik yapıda olması reaksiyonların çoğunun membrana bağlı moleküllerle meydana gelmesine neden olur. Membran permeabilitesi ve mikroviskozitesi ciddi şekilde etkilenir. Peroksidasyonla oluşan malondialdehit, membran komponentlerinin çapraz bağlanmasına ve polimerizasyonuna neden

olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler malondialdehitin niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar.²

Serbest radikallerin lipid peroksidasyonuna yol açarak çeşitli hastalıkların oluşmasında veya gelişmesinde rol oynadığını gösteren çalışmalar vardır.^{25, 49}

Serbest radikallerin karbohidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehidler meydana gelir. Okzoaldehidler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma etiolojisinde rol oynarlar. Serbest radikallerin oluşturduğu karbohidrat hasarı, sinoviyal sıvının önemli bileşeni olan hyaluronik asit ve diğer proteoglikanların parçalanmasına neden olup, romatoid artrit patogeneğinde önemli role sahip oldukları gösterilmiştir^{2, 94}

Proteinler, poliansatüre yağ asitlerine göre serbest radikallerden daha az etkilenirler. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme dereceleri amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin ve sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolayca etkilenirler.^{2, 25} Proteinlerde oluşan değişiklikler ise; bazı amino asitlerin konformasyonunda veya enzimatik aktivitede değişiklikleri başlatarak proteini serbest radikale duyarlı kılar. Sarkoplazmik retikulumdaki Ca-

ATPaz, plazma membranındaki Na-K ATPaz, elastazın kontrollerini sağlayan α -1 proteinaz bu enzimlerden bazılarıdır.⁹¹ Hidroksil radikali de protein çapraz bağlanmalarını başlatabilir, amino asit bağlarını yıkabilir ve makroproteinlerin fragmentasyonuna yol açabilir.⁵⁴

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller nükleik asit baz modifikasyonları yaparak nokta mutasyonlara veya DNA zincir kırıklarına neden olabilir.⁵⁴ Hidroksil radikali deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu nedenle DNA serbest radikallerden kolay zarar görebilen önemli bir hedeftir.²

2.2. Antioksidan Sistemler

Serbest radikallerin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizması gelişmiştir. Bunlara 'antioksidan savunma sistemleri' veya kısaca antioksidanlar denir.^{2, 5, 59}

Serbest radikallerin oluşumu ile etkisiz hale getirilmeleri dengede olduğu sürece organizma bu bileşiklerden etkilenmemektedir. Eğer antioksidan sistemde bir bozukluk olursa dokular uzun süre serbest radikal etkilerine karşı koyamazlar. Antioksidan enzimlerin anormal seviyelerinde ve total antioksidan dengenin azalmasıyla ve/veya serbest radikallerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa ciddi hastalıklar (arteroskleroz, enflematuar hastalıklar, yaşlanma ve kanser gibi) ortaya çıkar.^{1, 39, 41, 49}

Oksidanlara karşı koruma, oluşan radikallerin detoksifikasyonu, radikal reaksiyonların sona erdirilmesi ve radikal oluşumunun sınırlandırılması ile sağlanır. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu kırarak (enzimatik) ve/veya serbest radikal oluşumunu önleyerek (nonenzimatik) lipid peroksidasyonunu inhibe ederler.^{2, 45, 73}

Enzimatik antioksidanlar (Şekil 2) arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) yer alır. Bu enzimlerin aktivitesi serbest radikal yapım-yıkım hızına ve beslenme ile eser elementlerin (Cu, Mn, Se, Fe, Zn) alınımına bağlıdır.⁵⁴ Nonenzimatik antioksidan olarak da retinol, askorbik asit, α -tokoferol ve glutatyon'u sayabiliriz. Antioksidanları değişik kriterlere göre gruplandırabiliriz (Tablo 1).

Antioksidanlar, serbest radikallere karşı 4 ayrı şekilde etki gösterirler.²

- Toplayıcı (scavenging) etki : Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine denir. Antioksidan enzimler bu tip bir etki gösterir.
- Bastırıcı (quencher) etki : Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme işlemidir. Vitaminler bu tarz etkiye sahiptir.
- Zincir kırıcı (chain breaking) etki : Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyen antioksidanların etki mekanizmasıdır. Hemogloblin, mineraller ve seroloplazmin bu tarz etkiye sahiptir.

Tablo 1: Antioksidanların gruplandırılması ^{2, 79}

Ekzojen Antioksidanlar	Endojen Antioksidanlar
Yiyeceklerdeki doğal antioksidanlar Vitamin A β-karoten Vitamin C Vitamin E	Enzimler Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi Süperoksit dismutaz Katalaz Glutasyon peroksidaz Glutasyon-S-transferaz Hidroperoksidaz
Antioksidan yiyecek aditifleri BHT (Bütile Hidroksitolüen) BHA (Bütile Hidroksianizol) Etoksikin Sodyum benzoat Propil galat Fe-süperoksit dismutaz (bakteriyel)	Enzim olmayanlar a. Lipit fazda bulunanlar α-tokoferol, β-karoten b. Sıvı fazda (hücre sitozolü veya kan plazmasında) bulunanlar Askorbik asit, melatonin, ürat, sistein, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, miyogloblin, hemogloblin, ferritin, metionin, albumin, bilirubin, glutasyon

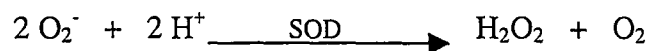
➤ Onarıcı (repair) etki

2.2.1. Antioksidan Enzimler

2.2.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Serbest radikallere karşı ilk savunmayı yapan enzimdir.

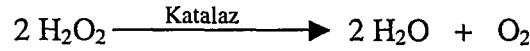
Süperoksidin H_2O_2 'ye dismutasyonunu katalizler. ¹



Ökaryotik hücrede 3 tane SOD izoenzimi tanımlanmıştır. Her 3 izoenzimde de eser element içeriği vardır. Cu-Zn SOD, Mn-SOD Cu-Zn içeren EC-SOD'dur. ⁵²

2.2.1.2.Katalaz (CAT)

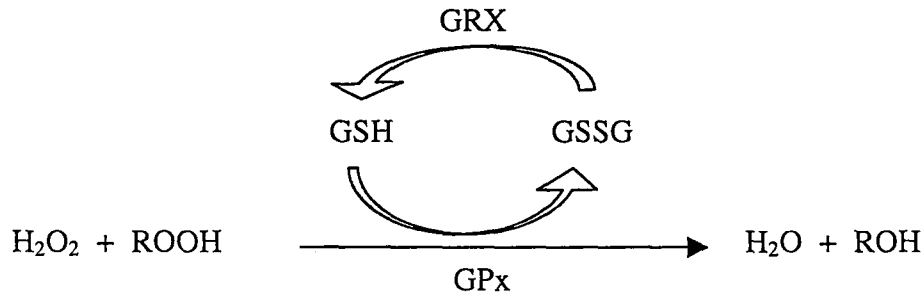
Hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalar.



Katalazın indirgeyici etkisi hidrojen peroksit ve etil, metil hidroperoksidleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllu lipit hidroperoksidlerine ise etki etmez. ²

2.2.1.3.Glutatyon peroksidaz (GPx)

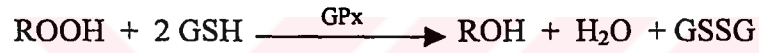
Hücrede H_2O_2 'nin detoksifikasyonundan sorumlu enzimdir. Ayrıca lipit peroksidasyonunun başlaması ve gelişmesinde engelleyici role sahiptir. GPx, peroksitleri detoksifiye etmek için redükte glutatyon (GSH) ihtiyaç duyar. Okside formu olan GSSG, glutatyon redüktaz (GRX) ile yeniden GSH'a döner.



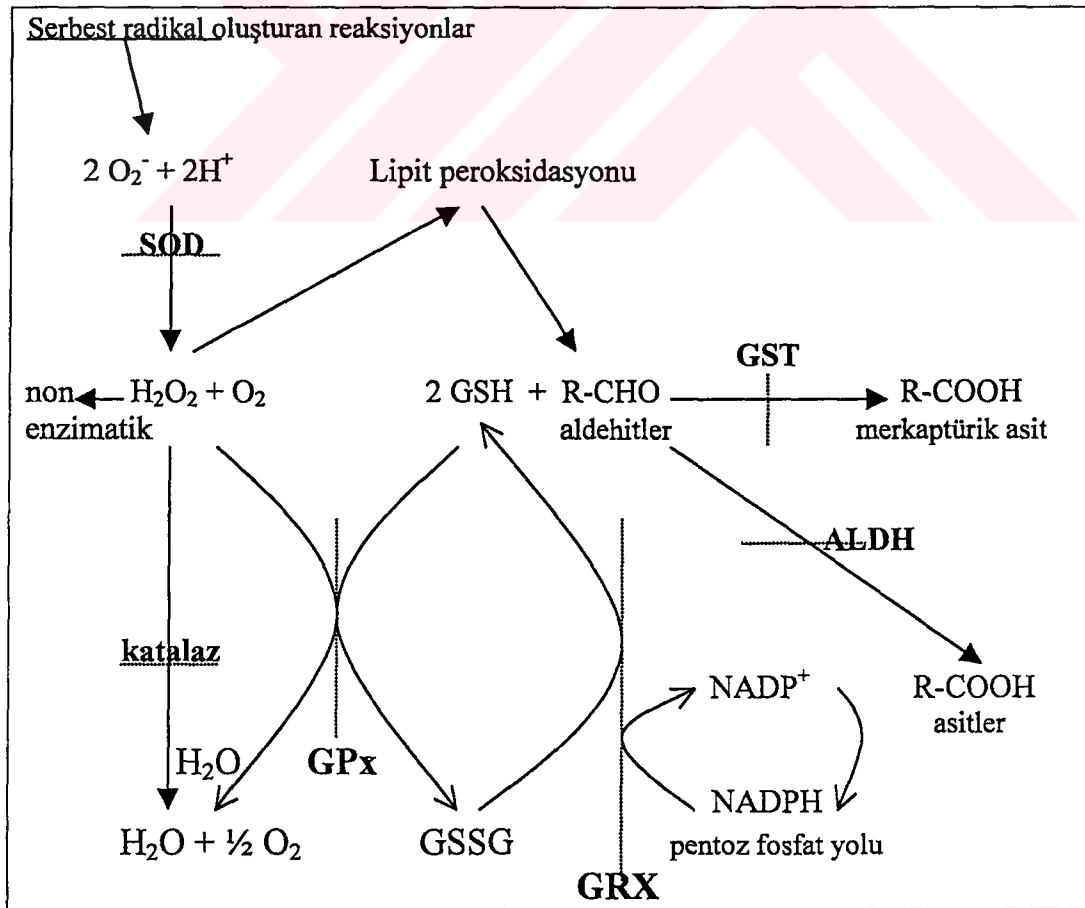
Glutatyon peroksidazın selenyuma bağımlı ve bağımsız olarak 2 tipi vardır. Selenyuma bağımlı olan GPx, hem H_2O_2 hem de lipit hidroperoksidleri metabolize ettiği halde selenyumdan bağımsız tip sadece lipit hidroperoksidleri

metabolize eder. Bu fonksiyonu ile lipid peroksidasyonunun başlama ve ilerlemesini önleyici görev yapar.^{13, 34}

Selenyum bağımlı GPx bir seleno proteindir. GPx; 22 kD ağırlığında, dört eşit alt ünitesi bulunan ve her biri katalitik aktivitesini – selenosistein olarak bulunan selenyumdan- alan bir yapıya sahiptir. Selenyum eksikliği (invivo veya invitro) GPx aktivitesinde dramatik düşüşe neden olur. Enzim aktivitesinin % 60-75'i ökaryot hücrelerin sitoplazmasında, % 20-40'ı da mitokondri içerisinde bulunur.⁵⁴



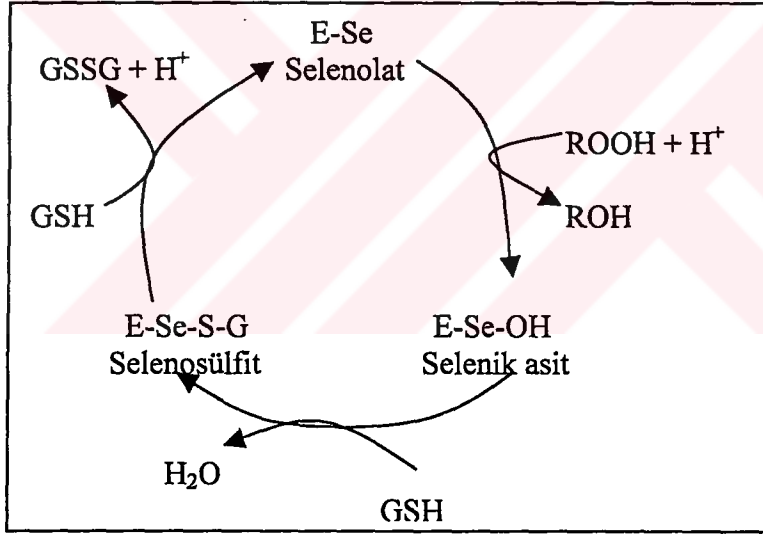
Şekil 2: Serbest radikaller ve sitotoksik aldehitlere karşı korunma mekanizması



GPx, iki molekül GSH'ı okside ederken, H_2O_2 ile lipidik ve lipidik olmayan hidroperoksitleri redükte eder. Bu reaksiyon H donörü (GSH) için son derece spesifik olmakla beraber substrat için daha az spesifiktir.^{22, 54}

GPx'in selenolat formu (E-Se-) peroksit substratını alkole indirgerken kendisi okside selenik aside dönüşür (E-Se-OH). Glutasyon bu evrede reaksiyona katılarak selenosülfite (E-Se-S-G) oluşturur. İkinci bir glutatyonun selenosülfite bağlanması ile enzim, aktif formu olan selenolat formuna dönerken glutatyon okside hale döner (Şekil 3).

Şekil 3: Glutasyon peroksidazın katalitik metabolizması²



Başka glutasyon peroksidazlar da vardır; glutasyon-S-transferazın bazı izoenzimleri GPx aktivitesi gösterir.⁵⁴ Chu ve ark. gastrointestinal glutasyon peroksidazı tanımlamışlardır.¹⁷ Plazmada selenyum içeren glukozile GPx bulunur ve bu extrasellüler GPx'dir.^{14, 83} Bu enzimlerin her biri hücre savunmasında özel fonksiyona sahiptir ve bunların aktiviteleri hücre tipinin fonksiyonlarına göre değişiktir.

Fosfolipit hidroperoksid glutasyon peroksidaz (PHG-Px) enzimi membran fosfolipit hidroperoksitlerini redükte eden glutasyon peroksidaz enzimidir.⁸⁹

PGH-Px 20000 daltonluk sitozolik bir enzim olup monomerik formda 1-gram-atom Se içerir. PHG-Px, GPx'lerde sıklıkla görülmeyen bir özellik olarak biyomembranlar ile ilişki halindedir ve fosfolipit hidroperoksidazları alkole redükte eder.⁸⁸ GPx ve PHG-Px enzimlerinin reaksiyonları Tablo 2'de verilmiştir.

Özel olarak PHG-Px'ın membrana bağlı fosfolipit hidroperoksit substratları ile reaksiyonunun keşfi diyetle vitamin E'nin eksikliğinde selenyumun antioksidan etkisine bir açıklama sağlamaktadır. Membrana bağlı antioksidan olan vitamin E düzeyi azaldığında, PHG-Px membranın peroksidatif korunmasını sağlar.² Diyetle ve membranlardaki vitamin E miktarı yeterli fakat diyetle selenyum miktarı ve PHG-Px aktivitesi azaldığında vitamin E'nin antioksidan aktivitesi, serbest radikal hasarına karşı yeterli olabilir.^{79, 95}

2.2.2. Selenyum

Selenyum (Se), bir eser elementtir ve 1817 yılında İsveç'li bir kimyacı olan Jöns Jacop Berzelius tarafından keşfedilmiştir.^{4, 10, 60} Selenyum doğada; hava, su ve toprakta bulunur. 1925 yılında bitkilerin Se emilimi yaptığı ve 1957 yılında da esansiyel bir eser element olduğu deneysel olarak hayvanlar üzerinde gösterilmiştir.⁶⁰ 1979 yılında Chen ve ark. selenyumun insanlar için esansiyel olduğunu ve koruyucu özelliği olabileceğini söylemişlerdir. Ayrıca Çin'de bir bölgede düşük selenyum seviyesine bağlı olarak meydana gelen ve

Tablo 2: Antioksidan enzimler ⁷⁹

Enzim	Mineral	Reaksiyon
Süperoksit dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1) MA: 32500 d	CuZn Mn Fe(bakteri)	$2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2$
Glutasyon peroksidaz (GPx) (EC 1.11.1.9) MA: 84000 d	Se(4)	$H_2O_2 + 2GSH \longrightarrow GSSG + 2H_2O$ $ROOH + 2GSH \longrightarrow GSSG + ROH + H_2O$
Fosfolipit hidroperoksid Glutasyon peroksidaz (PHG-Px) MA: 20000d	Se(1)	$H_2O_2 + 2GSH \longrightarrow GSSG + 2H_2O$ $ROOH + 2GSH \longrightarrow GSSG + ROH + H_2O$ $PLOOH + 2GSH \longrightarrow GSSG + PLOH + H_2O$
Katalaz (CAT) (EC 1.11.1.6) MA: 250000	Fe	$2 H_2O_2 \longrightarrow 2 H_2O + O_2$
Glutasyon-S-transferaz (GST) (EC 2.5.1.18) MA: değişken	Yok	$ROOH + 2GSH \longrightarrow GSSG + ROH + H_2O$

endemik görülen juvenil kardiyomiyopati'nin tedavisinde iyileştirici olabileceğini söylemişlerdir.¹⁶ Bu hastalık Keshan hastalığı olarak isimlendirilmiştir. Selenyum, 1989'da Recommended Dietary Allowances (RDAs)'ın 10. baskısında nonmetalik bir eser element olarak yerini almıştır.¹²

Selenyum periyodik cetvelde grup VI A'ya dahildir ve kükürt ile tellerium'un arasında bulunur. Kimyasal özellikler açısından kükürtle oldukça benzerlik gösterir. Hatta kükürt içeren aminoasitlerde (metionin ve sistein) kükürtün yerine geçer.⁶⁰ Selenyumun dört doğal formu bulunur.⁴

- Elemental selenyum (Se^0)
- Selenid (Se^{+2})
- Selenit (Se^{+4})
- Selenat (Se^{+6})

Selenyum dokuda en sık iki formda bulunur; selenosistein ve selenometionin. Selenometionin vücutta sentez edilemez ve diyetle alınmalıdır. Selenometionin selenyumun kontrol altında olmayan bölümünü teşkil eder. Selenosistein (Secys), sisteinin Se içeren bir analogudur.^{12, 80} Selenyumun biyolojik aktif formu Secys'dir. Secys, prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin oksido-redüksiyon reaksiyonlarını içeren enzimlerin aktif yüzlerinde bulunur.⁴⁴ Bir çok deneysel çalışma Secys'nin ribozomal protein sentezinde kullanılan bir aminoasit olduğunu göstermiştir.^{7, 46} Tioredoksin redüktaz, selenoprotein W, selenoprotein P, iyodotironin deiyodinaz ve glutatyon peroksidaz gibi selenoproteinlerde selenosistein vardır.^{12, 42} (Tablo 3)

Organizmanın oksidan strese karşı savunmasına yardım eden selenyum tiroid hormonlarının sentez ve metabolizmalarında da kullanılmaktadır. Dört farklı GPx, üç farklı iyodotironin deiyodinaz ve tiyoredoksin redüktazda selenyum bulunmaktadır.^{12, 30} Uzun süren Se eksikliğinde bütün vücut sıvılarında GPx aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir.¹²

Dünyada çeşitli coğrafik bölgelerde alınan Se miktarı arasında çok belirgin farklar vardır. Genel popülasyon için ana kaynak yiyecekler olup bunu su ve hava takip eder. En çok bitkisel kaynaklardan alınır. Selenyuma fizyolojik olarak bitkilerde ihtiyaç olmadığı halde, bitkiler tarafından topraktaki konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak alınır. Coğrafi bölgelerde topraktaki dağılım farklılığı, bazı bölgelerde Se yetersizliğine yol açabilir. Türkiye'deki dağılımı gösteren çok fazla çalışma yoktur. Yapılan bir çalışma Türkiye'deki Se düzeylerinin ABD'den düşük, Yeni Zelanda'dan ve 17 Avrupa ülkesinin 10 tanesinden yüksek olduğunu göstermiştir.^{4, 40, 58, 77, 85}

Kan ve idrar Se tayini vücut Se durumu hakkında fikir verir. Plazma ve serum Se konsantrasyonu daha duyarlı bir göstergedir. Çin'de saç selenyumu kan konsantrasyonu ile orantılı bulunmuştur. Bu nedenle Se eksikliği riski olanlarda saçtan ölçüm yapılmaktadır. Plazmada major Se içeren protein olan selenoprotein P ölçümü de Se alımı hakkında duyarlı bir testtir.¹²

2.3. Kanser

Kanser, anormal doku büyümesidir. Kanser hücreleri ayrıca lokal dokulara invazyon ve vücudun diğer dokularına metastaz özelliklerine sahiptirler. Büyümesi, hızlı gelişen tümörlerde bile normal dokulardan çok farklı değildir.

Ancak büyümenin kontrolsüz olması ve programlanmış hücre ölümünün bulunmaması nedeniyle tümör gelişim göstermektedir. ⁶⁵

Kanserin nedeni tam olarak bilinmemekle beraber insanda tümörlerin büyük bir kısmının çevresel faktörlere bağlı olduğu ileri sürülmektedir.⁶⁶ Bu etkenler kimyasal ajanlar, virüsler, radyasyondur. Kimyasal karsinojenler etkilerini hücresel DNA ile etkileşerek gösterirler. DNA ile etkileştikleri için hemen tüm karsinojenler aynı zamanda mutajeniktirler. Hücre DNA'sı üzerinde etki her zaman neoplastik değişim ile sonlanmayabilir. ⁵⁷

Karsinogenez bakımından önemli radyasyon türleri ultraviyole (UV) ve iyonizan radyasyondur (IR). Ancak ikisi de farklı etkilere sahiptir. UV, güneş ışınlarında bulunmaktadır, mutajenik ve T-lenfosit fonksiyonlarını, hücresel immüniteyi bozmaktadır. Güneş ışınlarına maruz kalan kişilerde çoğunlukla deri kanserleri görülmektedir. İyonizan radyasyon ise yüksek enerji gücü ile derin dokuları etkileyebilir ve kanser oluşturabilir. X ve gama ışınları, dokularda serbest radikallerin oluşmasına neden olurlar. Oluşan serbest radikaller, DNA ve diğer makromoleküller ile etkileşerek moleküler hasara yol açarlar. ⁵⁷

Tablo 3: Selenoprotein bulundugu yerler ve fonksiyonu ⁶⁵

Selenoprotein	Fonksiyonu
Glutasyon peroksidazlar (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4)	Antioksidan enzimlerdir. Hidrojen peroksit, lipid ve fosfolipit hidroperoksitlerinin ortadan kaldırılması.
Mitokondrial kapsül selenoprotein (sperm)	GPx 4; Gelişen sperm hücresinin oksidatif hasardan korunması.
İyodotironin deiyodinaz (3 izoform)	T ₃ ve T ₄ 'ün sentezinin regülasyonu.
Tiyoredoksin reduktaz (olasılıkla 3 izoform)	DNA sentezindeki nükleotidlerin azaltılması, antioksidan sistemin rejenerasyonu, hücre içi redoks potansiyelinin sağlanması, hücre canlılığının korunması ve proliferasyonu, DNA'nın gen düzeyinde regülasyonunun sağlanması
Selenofosfat sentaz, SPS 2	Selenosistein prekürsörü olan selenofosfatın sentezi ve bunun sonucu olarak selenoprotein sentezi
Selenoprotein P	Plazmada bulunur ve endotelial hücrelerle ilişkili. Endotelial hücreleri peroksinitrit hasarına karşı korumak.
Selenoprotein W	Kas fonksiyonu için gerekli.
Prostat epitelyal selenoprotein (15 kDa)	Ventral prostat epitel hücrelerinde bulunur. GPx4'e benzer redox fonksiyonu var ve olasılıkla salgı hücrelerini kanser gelişimine karşı korumak.
DNA'ya bağlı spermatid selenoprotein (34 kDa)	GPx'e benzer aktivite gösterir. Mide ve spermatozoa nükleusunda bulunur. Gelişmekte olan spermi korumak.
18 kDa selenoprotein	Önemli bir selenoproteindir. Böbrek ve diğer birçok dokuda bulunur. Selenyum eksikliğinde koruyucu görev yapar.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Gereçler

3.1.1. Hasta Kanları

Deneylerde kullanılan hasta kanları Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi 4. ve 5. genel cerrahi kliniğinde yatan hastalardan (11 hasta) ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Medikal Onkoloji Polikliniği'nden (22 hasta) temin edildi. Hastalardan alınan kan numunelerinden eritrosit hemolizati hazırlandıktan sonra deney yapılncaya kadar yaklaşık -20°C 'de saklandı.

3.1.2. Kullanılan Aletler

Santrifüj (Hermle Z 380, Almanya)

Spektrofotometre (Milton Roy Spectronic 3000 Array, USA)

Terazi (Schimadzu, Japonya)

pH-metre (Nel Elektronik)

Derin dondurucu (Arçelik 2020D)

Vortex (Heidolph Reax 2000)

Atomik absorbsiyon spektrometre (Unicam 939 AAS ve Unicam VP90 Vapour System, İngiltere)

Hazım fırını

Pyrex hazım tüpleri

Benmari (Heto maxi shake)

Ve araştırma laboratuvarında biyokimyasal tetkikler için gerekli olan diğer malzemeler kullanıldı.

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

HClO₄, HCl, NaBH₄, HNO₃, NaSeO₃, EDTA, NaHCO₃, KCN, K₃[Fe(CN)₆], KH₂PO₄, K₂HPO₄, NaN₃, NaAsO₂, TCA, H₂O₂, NaOH Merck kullanıldı.

GSH, NADPH, Glutasyon reduktaz, Triton X, TBA Sigma kullanıldı.

H₂SO₄ Carlo Elba Reagent kullanıldı.

Serum fizyolojik Eczacıbaşı kullanıldı.

Heparin Mustafa Nevzat kullanıldı.

Asetilen ve Argon gazları BOS tarafından sağlandı.

3.2. Uygulanan Yöntemler

3.2.1. Hasta Grupları

Grup A : Opere edilmiş ve henüz adjuvant kemoterapi uygulanmamış hastalar (n:12)

Grup B : Opere edilmiş, adjuvant kemoterapi uygulanmış ve tam remisyonda izlenen hastalar (n:10)

Grup C : Cerrahi tedavi uygulanmamış, yeni teşhis edilmiş aktif tümörü bulunan hastalar (n:11)

Grup D : Memesinde benign veya malign bir lezyon bulunmayan sağlıklı bireyler (n:11)

	Grup A		Grup B		Grup C	
	n = 12	%	n = 10	%	n = 11	%
Yaş						
Median	57.50		48.00		55.00	
Range	29-68		36-65		30-83	
Menopozal durum						
Premenopozal	3	25	4	40	4	36.4
Postmenopozal	9	75	6	60	7	63.6
Evre						
I	2	16.6	2	20	1	9
IIA	7	58.5	4	40	3	27.3
IIB	2	16.6	3	30	3	27.3
IIIA	--	--	--	--	2	18.2
IIIB	1	8.3	1	10	--	--
IV	--	--	--	--	2	18.2
Axillar lenf nodu durumu						
0	6	50	6	60	6	54.5
1 - 3	4	33.3	3	30	3	27.3
4 - ↑	2	16.7	1	10	2	18.2

Tablo : Hasta özellikleri

3.2.2. Kan Alma ve Eritrosit Hemolizat Hazırlama Protokolü

Eritrosit MDA için 4,5 ml kapasiteli, steril, heparin içeren Vacutainer marka hazır tüpler kullanıldı. Alınan kanlar 3000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Plazma kısımları atıldıktan sonra serum fizyolojik ile 2500 rpm'de 5 dk. olmak üzere iki defa yıkandı. 1,5 ml eritrosit pelletin üzerine 1,5 ml, daha önceden hazırlanmış azidli tampon ilave edilerek hemolizat hazırlandı. Hazırlanan hemolizattan Cyanmethemoglobin metodu kullanılarak hemoglobin tayini yapıldı. Numuneler çalışma gününe kadar -20°C 'de saklandı.

Eritrosit GPX için 2 ml kapasiteli, steril, K3 EDTA içeren Vacuette marka hazır hemogram tüpleri kullanıldı. Alınan kanlar 3000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Plazma kısımları atıldıktan sonra serum fizyolojik ile yıkanarak 2500 rpm'de 5 dk. olmak üzere iki defa santrifüj edildi. 0,5 ml eritrosit pelletin üzerine 1,5 ml soğuk distile su eklenerek eritrosit hemolizatı hazırlandı. Daha

sonra Cyanmethemoglobin metodu kullanılarak hemoglobin tayini yapıldı.

Numuneler çalışma gününe kadar -20°C 'de saklandı.

Plazma selenyum için 10 ml kapasiteli, içerisinde 0,2 ml heparin içeren polipropilen tüpler kullanıldı. Alınan kanlar 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra plazma kısımları ayrı bir tüpe alınarak deney gününe kadar -20°C 'de saklandı.

3.2.3. Metodların Uygulanması

3.2.3.1. Eritrosit Hemolizatında Hemoglobin Tayini

Eritrosit hemolizattaki hemoglobin düzeyleri cyanmethemoglobin metodu ile tayin edildi.

Reaktifler :

- Drabkin's solüsyonu : Toplam 1000 ml çözelti içinde 1 g Na_2CO_3 , 0,2 g $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 0,05 g KCN, 0,5 ml triton X

Deneyin Yapılışı :

50 μl hemolizat 12,5 ml Drabkin's solüsyonu ile karıştırılıp 5 dk oda ısısında inkübe edilir.

540 nm dalga boyunda distile suya karşı okunur.

numune absorbansı x 27

formülüne göre % g / dL hemoglobin hesaplanır.

3.2.3.2.Eritrosit Hemolizatında Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi

Glutasyon peroksidaz aktiviteleri Paglia ve Valentine'ın deney modelindeki teknik ile saptandı.⁶¹ Bu yöntemde GSSG oluşumu 340 nm dalga

boyunda NADPH'ın NADP'ye dönmesi sonucu oluşan absorbans azalmasının kinetik olarak tesbiti ile ölçülmüştür.

Reaktifler:

- Transformasyon karışımı : 0,25 mM KPO₄ tampon pH:7,0 içinde 4,5 mM KCN, 0,45 mM K₃[Fe(CN)₆]
- Reaksiyon karışımı : 50 mM KPO₄ tampon pH:7,0 içinde 3,6 mM NaN₃, 5 mM GSH, 0,3 mM NADPH
- Glutasyon Redüktaz (200 U/mg protein)
- 0,25 mM H₂O₂

Deneyin Yapılışı :

Daha önce hazırlanmış olan hemolizattan ml'de 3 mg Hb olacak şekilde distile su ile sulandırılır. Sulandırılmış numunenin 1 ml'sine 0,5 ml transformasyon karışımı eklenir ve vortekslenir. 5 dk. oda ısısında inkübe edilir.

Hazırlanan bu karışımdan 100 µl, 1 ml reaksiyon karışımı, 10 µl glutasyon redüktaz 1 ml kapasiteli okuma küvetinde iyice karıştırılarak 5 dk oda ısısında inkübe edilir.

Karışıma 25 µl H₂O₂ eklenerek reaksiyon başlatılır. 5 dk boyunca 340 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılır.

$$(\Delta A / 6,22 \times 10^3) \times (\text{total hacim} / \text{numune hacmi}) \times 10^9 \times 1/10^3$$

formülüne göre nmol okside NADPH / dk / ml hesaplanır.

$$\Delta A = (t1 \text{ abs.} - t5 \text{ abs.}) / 5$$

ml'de 3 mg Hb olan numuneden çalışıldığı göz önünde bulundurularak sonuçlar nmol okside NADPH / dk / mg Hb olarak verilir.

3.2.3.3. Eritrosit Hemolizatında Malondialdehit Tayini

Malondialdehit (MDA) düzeyleri Stocks ve Dormandy'nın geliştirdiği yöntemle ölçülmüştür.⁸¹

Reaktifler :

- Tamponlanmış tuzlu su : pH: 7,4 olan 0,09'luk NaCl içinde 0,5 M KH_2PO_4 , 0,5 M K_2HPO_4
- Azid tampon : 26 mg NaN_3 100 ml tamponlanmış tuzlu suda çözülür.
- TCA – Arsenit : 1,3 gr NaAsO_2 50 ml distile suda çözülür. Üzerine % 100'lük TCA'dan 28 ml ilave edilir. Toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.
- H_2O_2 : 0,86 ml H_2O_2 distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Bu karışımdan 10 ml alınıp tamponlanmış tuzlu su ile 100 ml'ye tamamlanır.
- TBA : 100 mg TBA 0,5 ml 1 N NaOH yardımıyla çözülür ve distile su ile 10 ml'ye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı :

Daha önce hemoglobin tayini yapılmış olan eritrosit hemolizati 30 mg/ml Hb olacak şekilde azidli tampon ile sulandırılır.

Bu karışımdan alınan 5 ml'nin üzerine 5 ml H_2O_2 ilave edilir ve iyice karıştırılır. 37 °C'de tüplerin ağzı açık olarak 2 saat inkübe edilir.

Tüpler soğuduktan sonra karışımdan 3 ml alınarak 2 ml TCA-arsenit ile karıştırılır. Kör için 3 ml distile su, 2 ml TCA-arsenit konulur. 2500 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilir.

3 ml süpernatanın üzerine 1 ml TBA ilave edilerek 15 dk boyunca ağzı kapalı olarak kaynatılır.

Soğuduktan sonra 532 nm dalga boyunda köre karşı okunur.

numune absorbansı x 950

formülünden nmol / MDA/ gr Hb hesaplanır.

3.2.3.4. Plazma Selenyum Düzeylerinin Tayini

Plazma selenyum düzeyleri, 1 ml plazmanın ölçüm öncesi hazım işlemine tabi tutulmasından sonra Unicam 939 AAS cihazı ve Unicam VP 90 Vapour System cihazı kullanılarak hidrid jenerasyon teknikli atomik absorpsiyon spektrometre (HGT-AAS) ile tespit edildi.⁸⁷

Ölçüm öncesi hazım işlemi :

1 ml plazma hazım tüplerine konulduktan sonra üzerine 2 ml % 65 (w/v) HNO₃ eklendi ve hazım fırınına yerleştirildi. Sıcaklık 15 dk'da 140 °C'ye çıkarıldı ve bu sıcaklıkta 25 dk tutuldu. Daha sonra oda ısısına soğutulan numunelere 1 ml % 95 (w/v) H₂SO₄ ve 0,4 ml % 70 (w/v) HClO₄ ilave edildi. Sıcaklık 15 dk'da 140 °C'ye çıkarıldı ve burada 15 dk tutuldu. Sonra 10 dk'da 200 °C'ye çıkarıldı ve burada 15 dk tutuldu. Sonra 10 dk'da 250 °C'ye çıkarıldı ve burada 15 dk tutuldu. Daha sonra 10 dk'da 310 °C'ye çıkarıldı ve burada 20 dk tutuldu. Numunelerin kendiliğinden oda sıcaklığına soğuması beklendi. Numunelere 5 ml % 37 (w/v) HCl eklendi ve 20 dk 90 °C'de tutuldu (Şekil 4). Tekrar oda ısısına soğutulan numuneler ultra saf su ile 10 ml'ye tamamlanarak HGT-AAS ile selenyum düzeylerine bakıldı.

Reaktifler :

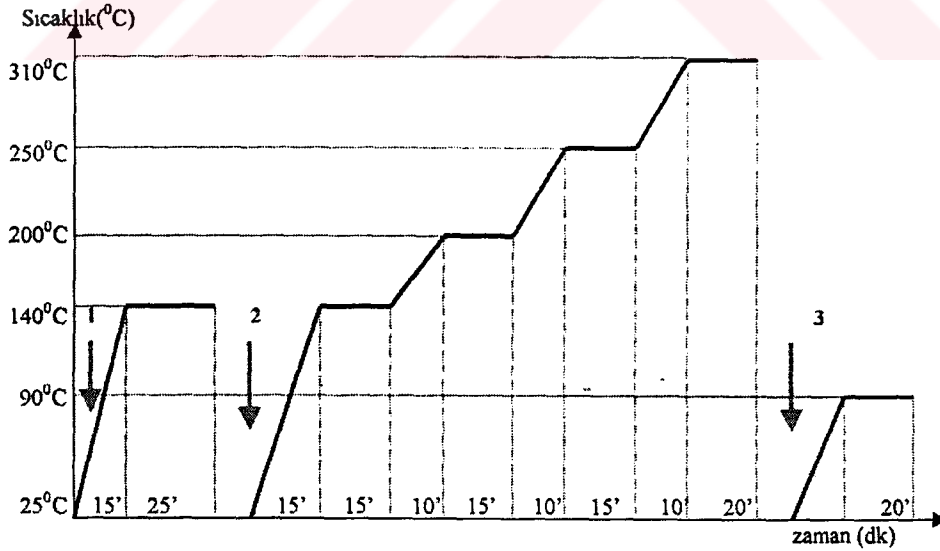
- HCl : Asit blank olarak % 7 (v/v) HCl hazırlanır.
- Borohidrid : % 0,1 NaOH çözeltisiyle % 0,5 NaBH₄ hazırlanır.

Standart solüsyon :

Çalışmada Merck firmasından sağlanan NaSeO₃'den hazırlanan 20 ppb konsantrasyonundaki standart solüsyon kullanıldı.

3.3. Sonuçların Analizi

Verilerin istatistiki bilgileri Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 10.0 for Windows programı ile elde edilmiştir. Gruplar arası farklılıklar Kruskal-Wallis Varyans analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. İkili grup karşılaştırılmasında Mann-Whitney U analizi kullanılmıştır.



1. 1 ml numune + 2 ml % 65'lik HNO₃
2. 1 ml %95'lik H₂SO₄ + 0,4 ml %70'lik HClO₄
3. 5 ml %37'lik HCl

Şekil 4 : Plazma selenyum tayini için ölçüm öncesi hazım işlemi

4. BULGULAR

Bu çalışmada meme kanseri tedavisinde farklı aşamalarda bulunan hastaların eritrosit MDA düzeyi ve GPx aktivitesi ile plazma Se düzeyleri incelendi. Grupların eritrosit GPx değerleri nmol okside NADPH/dk/mg Hb olarak tablo 4’de, istatistiksel değerlendirme ise tablo 5’de gösterilmiştir. Ölçümlerde de görüldüğü gibi; opere edilmiş, henüz adjuvant kemoterapi almamış grup A ile opere edilmiş, adjuvant kemoterapi uygulanmış ve tam remisyonda izlenen grup B ve cerrahi tedavi almamış, yeni teşhis edilmiş aktif tümörü bulunan grup C arasında eritrosit GPx aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0.05$). Ancak göreceli olarak eritrosit GPx aktivitesi $A<B<C$ olacak şekilde yükselmektedir(Şekil 5). Bu 3 grubun eritrosit GPx aktiviteleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak ($p<0.001$) yüksektir.

Grupların plazma Se değerleri ng/ml olarak tablo 6’de, istatistiksel değerlendirme ise tablo 7’de verilmiştir. Plazma Se değerleri incelendiğinde grup A, B ve C arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır($p>0.05$). Ancak grup C’nin plazma Se düzeyi A ve B grubuna göre daha düşük bulunmuştur(Şekil 6). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında grup A ve C ($p<0.001$) anlamlı olarak daha düşük plazma Se değerlerine sahiptir. Grup B ile kontrol grubunu karşılaştırdığımızda ise anlamlı bir fark olmasına ($p<0.05$) rağmen bu oran biraz daha azdır.

Grupların eritrosit MDA değerleri nmol/MDA/g Hb olarak tablo 8’de, istatistiksel değerlendirme ise tablo 9’da verilmiştir. Eritrosit MDA

düzeyleri incelendiğinde diğer iki parametre olan eritrosit GPx aktivitesi ve plazma Se düzeyinden farklı sonuçlarla karşılaşyoruz (Şekil 7). Burada grup A ile grup B arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Ancak grup A; C grubundan anlamlı olarak ($p<0.001$) daha düşük eritrosit MDA değerlerine sahipken, kontrol grubundan da anlamlı olarak ($p<0.05$) daha yüksektir. Grup B ise, grup C'den anlamlı olarak ($p<0.05$) daha düşük iken kontrol grubundan anlamlı olarak yüksektir($p<0.001$). C grubu hastalar; anlamlı olarak A grubu ve kontrolden ($p<0.001$) oranında, B grubundan da ($p<0.05$) oranında daha yüksek eritrosit MDA değerine sahiptir. Kontrol grubu her 3 gruptan da anlamlı olarak ($p<0.001$, $p<0.05$) daha düşük eritrosit MDA değerlerine sahiptir.

Grupların eritrosit GPx aktivitesi, MDA düzeyi ve plazma Se düzeylerinin karşılaştırılmalı grafiği şekil 8'de verilmiştir.

Tablo 4: Eritrosit GPx değerleri, ortalama ve standart sapmaları ile median değerleri (nmol okside NADPH/dk/mg Hb)

<i>Sıra no</i>	<i>Grup A</i>	<i>Grup B</i>	<i>Grup C</i>	<i>Grup D</i>
1	436,24	478,84	439,64	243,77
2	421,30	573,63	467,07	236,05
3	465,19	532,40	569,31	297,45
4	465,21	501,11	540,63	301,27
5	490,00	502,08	598,42	253,04
6	524,44	495,28	556,53	243,14
7	509,45	549,00	474,29	206,69
8	571,08	508,09	573,47	223,29
9	573,11	586,86	569,82	274,73
10	596,81	486,50	565,75	208,06
11	560,47	--	543,06	251,55
12	528,87	--	--	--
Ort $\pm$ SD	511,85 $\pm$ 57,24	521,38 $\pm$ 37,37	536,18 $\pm$ 51,75	249,00 $\pm$ 31,81
Median	516,95	505,09	556,53	243,77

Tablo 5 : Eritrosit GPx aktivitesinin istatistiksel değerlendirilmesi

<i>Grup</i>	<i>Eritrosit GPx¹</i>		<i>P değeri</i>			
	<i>Ort $\pm$ SD</i>	<i>n</i>	Grup A	Grup B	Grup C	Grup D
Grup A	511,85 $\pm$ 57,24	12	---	,722	,288	,000 *
Grup B	521,38 $\pm$ 37,37	10	,722	---	,557	,000 *
Grup C	536,18 $\pm$ 51,75	11	,288	,557	---	,000 *
Grup D	249,00 $\pm$ 31,81	11	,000 *	,000 *	,000 *	---

1 : nmol okside NADPH / dk / mg Hb

* : İstatistiksel olarak farklı

Tablo 6 : Plazma Se değerleri, ortalama ve standart sapmaları ile median değerleri (ng/ml)

<i>Sıra No</i>	<i>Grup A</i>	<i>Grup B</i>	<i>Grup C</i>	<i>Grup D</i>
1	64,61	63,86	47,03	61,95
2	55,96	62,67	35,41	80,24
3	58,93	71,08	29,10	66,24
4	64,25	66,30	60,19	59,40
5	44,64	51,71	60,37	71,86
6	43,61	65,50	42,46	78,26
7	58,86	33,90	52,44	93,65
8	41,58	44,60	57,79	79,18
9	61,62	64,46	45,06	68,73
10	50,11	44,78	53,42	73,89
11	57,28	--	--	--
12	62,40	--	--	--
<i>Ort ±SD</i>	55,32 ± 8,27	56,89 ± 12,28	48,33 ± 10,55	73,34 ± 10,09
<i>Median</i>	58,07	63,27	49,74	72,88

Tablo 7 : Plazma Se düzeylerinin istatistiksel değerlendirilmesi

<i>Grup</i>	<i>Plazma Se¹</i> <i>Ort ±SD</i>	<i>n</i>	<i>P değeri</i>			
			Grup A	Grup B	Grup C	Grup D
Grup A	55,32 ± 8,27	12	---	,314	,140	,000 *
Grup B	56,89 ± 12,28	10	,314	---	,105	,007 *
Grup C	48,33 ± 10,55	10	,140	,105	---	,000 *
Grup D	73,34 ± 10,09	10	,000 *	,007 *	,000 *	---

1 : ng / ml

* : İstatistiksel olarak farklı

Tablo 8 : Eritrosit MDA değerleri, ortalama ve standart sapmaları ile median değerleri (nmol/MDA/g Hb)

<i>Sıra no</i>	<i>Grup A</i>	<i>Grup B</i>	<i>Grup C</i>	<i>Grup D</i>
1	270,75	319,20	354,35	162,45
2	260,30	366,70	300,20	167,20
3	300,20	281,20	384,75	172,90
4	255,55	274,55	278,35	131,30
5	312,55	191,90	337,25	149,55
6	290,70	189,05	323,00	171,00
7	135,85	157,70	336,30	153,90
8	183,35	300,20	301,15	175,75
9	192,85	197,60	291,65	152,00
10	159,60	--	339,15	180,50
11	248,90	--	--	--
<i>Ort ±SD</i>	237,38 ± 59,84	253,12 ± 71,39	324,61 ± 32,29	161,60 ± 15,06
<i>Median</i>	255,55	274,55	329,65	164,83

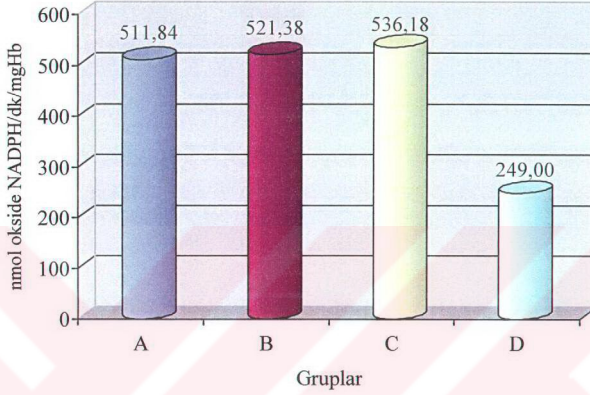
Tablo 9 : Eritrosit MDA düzeylerinin istatistiksel deęerlendirmesi

<i>Grup</i>	<i>Eritrosit MDA ¹</i>		<i>P değeri</i>			
	<i>Ort ±SD</i>	<i>n</i>	Grup A	Grup B	Grup C	Grup D
Grup A	237,38 ± 59,84	11	---	,503	,000 *	,004 *
Grup B	253,12 ± 71,39	9	,503	---	,017 *	,001 *
Grup C	324,61 ± 32,29	10	,000 *	,017 *	---	,000 *
Grup D	161,60 ± 15,06	10	,004 *	,001 *	,000 *	---

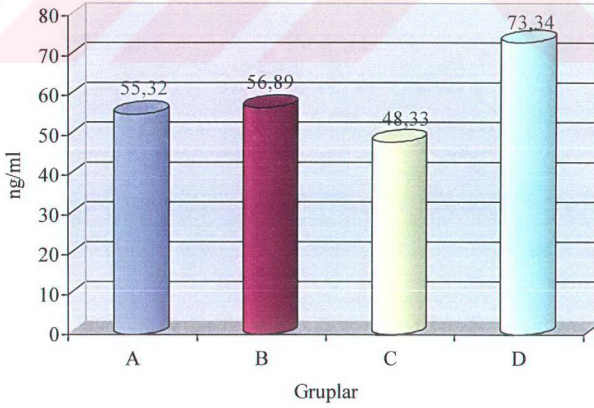
1 : nmol / MDA / g Hb

* : İstatistiksel olarak farklı

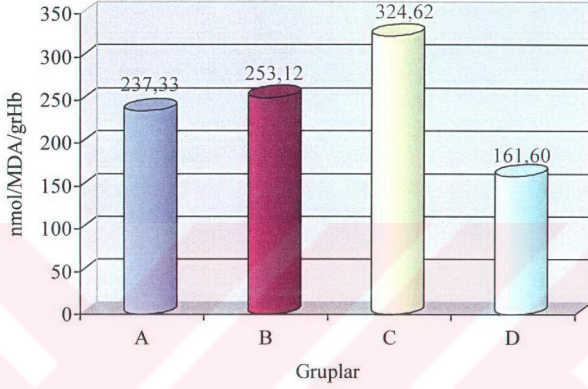
Şekil 5: Eritrosit GPx aktiviteleri



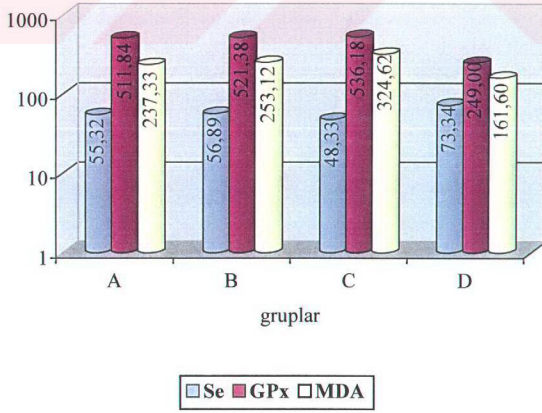
Şekil 6 : Plazma Se düzeyleri



Şekil 7 : Eritrosit MDA düzeyleri



Şekil 8 : Grupların karşılaştırılması



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Oksidatif stresin bazı fizyolojik olaylarda ve kanser gibi bir çok hastalığın gelişiminde etken olduğu bilinmektedir. Son yıllarda MDA'yı oksidatif stresin göstergesi olarak kullanarak, lipit peroksidasyonun kanser gelişimindeki rolü incelenmektedir. Kanser hastalarında tümör büyümesi ve progresyonu ile oksidan-antioksidan denge arasında bir ilişki vardır.³ Reaktif oksijen metabolitlerinin (O_2^- , H_2O_2 , OH , 1O_2), benign ve malign tümör hücrelerinin gelişmesinde patogenetik bir rol oynayabileceği de söylenmektedir.⁴⁷ Özellikle reaktif oksijen türlerinin kanserin başlangıç döneminde artabileceği bilinmektedir. Ancak kanser etiolojisi bir çok faktöre dayalı bir hastalıktır, sadece serbest radikaller sorumlu tutulmamaktadır.

Anormal proliferasyon gösteren hücrelerde artan lipit peroksidasyonu, kanser hastalarında serum lipit peroksidlerinin artışına neden olur.⁸² Dormandy ve ark.²¹ serbest radikaller ile malignansi arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermiştir. Boyd ve McGuire⁹ meme kanserli hastaların eritrosit membranlarında yüksek oranda doymamış yağ asidi bulunduğunu ve bunların serbest radikal hasarlarına karşı hassas olduğunu söylemişlerdir.

Biz de bu çalışmamızda, daha önce yapılan çalışmalara benzer şekilde kontrol grubunu oluşturan sağlıklı kadınların eritrosit MDA düzeyini diğer meme kanseri gelişmiş hastalara göre daha düşük bulduk ($p < 0.001$). Hasta grupları incelendiğinde ise grup C'nin (kansere teşhisi yeni konan hastalar) diğer hasta grupları A,B 'ye göre daha yüksek eritrosit MDA değerine sahip olduğu gözlenmektedir ($p < 0.001$) ($p < 0.05$). Tümör dokusunun serbest radikallerin

kaynağı olduğu göz önünde bulundurulduğunda, yeni teşhis edilen hastalardaki eritrosit MDA düzeyinin opere edilmiş ve opere edilip + tedavi almış hastalara göre yüksek olması beklenen bir sonuçtur. A ve B grubundaki hastaların eritrosit MDA düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,503$).

Wang ve arkadaşları⁹⁰ MDA'nın insan meme dokusuna akkümüle ettiğini ve göreceli olarak meme kanseri olan kadınların meme dokularında yüksek seviyelere ulaştığını göstermişlerdir. Punnonen'de⁶⁴ buna benzer şekilde meme kanserli hastaların serumlarında ve meme dokularında MDA düzeylerini yüksek bulmuştur. Bizim çalışmamızın da sonuçları bu çalışmaları desteklemektedir. Serbest radikallerin artışı sonucu eritrositlerin membran yapısında bulunan doymamış yağ asitlerinin de oksidasyonu artmaktadır.

Prognozu kötü olan meme kanserli hastaların tümör hücrelerindeki doymamış yağ asidi düzeyi, prognozu iyi olan hastalarinkinden daha düşüktür.⁵⁰

Bu sonuçların tam tersine lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehitin (MDA) meme kanserli hastalarda kontrol grubuna göre daha düşük olduğu bazı çalışmalarda vardır.^{67, 96} Buna benzer olarak Alagöl ve ark.³ ileri derecedeki meme kanserli hastalarda MDA seviyesini düşük bulmuşlardır. Bu nedenle kanserin başlangıç evresi ve ileri evrede lipid peroksidasyonu ve antioksidan sistemin aktiviteleri farklı bulunmaktadır. Zaridze ve ark.⁹⁶ eritrosit membranında yüksek oranda doymamış yağ asidi içerenlerin meme kanserine yakalanma riskinin azaldığını göstermişlerdir. Slater ve ark.⁷⁶ antioksidan kapasitenin yükselmesi ve peroksit substratlarının konsantrasyonunun azalmasının

transforme olmuş hücrelere büyümede selektif bir avantaj kazandırdığını ileri sürmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar hızlı proliferasyon gösteren normal hücrelerin de aynı karaktere sahip olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak serbest radikal hasarını gösterilmesinde önemli olan tümörün bulunduğu evredir. Tümörün bulunduğu evreye göre antioksidan sistem ve oksidatif stres arasındaki denge değişebilmektedir.

Meme kanserli hastaların antioksidan savunma sistemleri incelendiğinde, lipid peroksidasyonda olduğu gibi hastalığın farklı evrelerinde değişik sonuçların bulunduğu anlaşılmaktadır.

Afrasyap ve arkadaşları¹ meme kanseri olan hastaların eritrosit GPx aktivitelerini benign meme hastalıklarına ve sağlıklı bireylere göre yüksek bulurken, hastaların plazma total antioksidan kapasitesini kontrol grubundan farksız bulmuşlardır. Bu sonuçları Gerber'in²⁹ bulguları desteklerken (artmış antioksidan kapasite), bazı araştırmacılar antioksidan aktivitenin azaldığını söylemişler,^{8, 49, 62} bazıları da hiçbir değişikliğin olmadığını belirtmişlerdir.³²

Bizim çalışmamızda da opere edilmiş, henüz adjuvant kemoterapi almamış grup A ile opere edilmiş, adjuvant kemoterapi almış ve tam remisyonda izlenen grup B ve cerrahi tedavi almamış, hastalığı yeni teşhis edilmiş, aktif tümörü bulunan grup C eritrosit Gpx aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p < 0.05$). Ancak göreceli olarak eritrosit GPx aktiviteleri $A < B < C$ olacak şekilde yükselmektedir. Deney gruplarının sayılarının artırılması durumunda istatistiksel açıdan fark elde etmekte mümkün olabilir. Kontrol grubunun ise eritrosit GPx aktivitesi tüm hasta gruplarından düşüktür ($p < 0,001$).

MDA ve GPx sonuçları beraber değerlendirildiğinde, meme kanserli hastalarda artmış serbest radikallerle beraber, bunu ortadan kaldırmak için de antioksidan enzim aktivitesinin arttığını düşünmekteyiz. Özellikle yeni teşhis edilen meme kanserli C grubu hastaların GPx aktivitelerinin diğer gruplara göre daha yüksek olması bu açıdan dikkat çekicidir.

Meme kanserinin prognozu ile ilgili yapılan çalışmalarda axilları metastazı olan hastaların eritrosit GPx düzeyleri, olmayanlara göre yüksek bulunmuştur. Kemoterapiye direnç gösteren tümör hücrelerinde yüksek konsantrasyonda glutatyon enzimleri gösterilmiştir.⁶

Tümör hücrelerindeki östrojen reseptörleri ile GPx salınımı arasında ve yine tümör hücresi östrojen reseptörleri ile plazma vitamin E konsantrasyonu arasında ters bir ilişki vardır.^{26,86}

Glutatyonla ilişkili enzimlerin aktiviteleri Se konsantrasyonu ile ilişkilidir. Tedavi edilmiş veya edilmemiş meme kanserli hastaların serum Se düzeyinin azalması GPx ve GST aktivite azalmasının bir nedeni olabilir. Bu bulgular doğrultusunda şunu söyleyebiliriz; Oksidan-antioksidan denge arasındaki değişimler tümör hücrelerinin proliferatif kapasitesindeki değişikliklere eşlik eder.

Reaktif oksijen radikallerinin kanserin başlaması ve gelişmesinde etkili oldukları düşünülmektedir. İlerleyen yaşla beraber kanser insidansının yükselmesi beklenebilir. Şöyle ki; yaşla beraber serbest radikal reaksiyonları artar ve immün sistemin; transforme olmuş hücreleri elimine etme, serbest radikalleri detoksifiye etme yeteneği azalır. Biyolojik moleküllerin enzimatik ve

nonenzimatik oksidasyonunun birçok olayın (kanser, diabet, arterosiklorozis) başlamasıyla ilgili olduğu kabul edilmiştir.³⁸

Son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki birçok eser element birçok enzimatik reaksiyonda aktivatör veya inhibitör olarak rol alır, diğer elementlerle ve metalloproteinlerle aktif bölgeye bağlanmak için yarışarak hücre membranı geçirgenliğini ve diğer biyolojik mekanizmaları etkiler.⁶⁰ Eser elementler direkt veya indirekt olarak karsinogenik reaksiyonlar üzerinde etkili olur. Çeşitli kanser hastalıklarında Fe, Cu, Zn, ve Se'un normal dağılımından farklı bir dağılım gösterdiği rapor edilmiştir. Fenton ve Haber Weiss reaksiyonları ile , H_2O_2 veya süperoksitten hidroksil radikali oluşabilir ve bu ürün patolojik mekanizmaları başlatabilir. Bu olayı eser elementlerin hücre içi konsantrasyonu etkiler.

Serum Fe, Cu, Zn ve Se düzeyleri insan tümör gelişimi ile ilişkilidir. Hayvan deney modellerinde diyetle selenyum ilavesi ile tümör gelişim insidansının azaldığı ve rekürenslerin önlendiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır.^{70,72} Farelerde kimyasal olarak indüklenen meme kanserinde selenyumun kuvvetli bir antioksidan olduğu gösterilmiştir. Özellikle kimyasal olarak indüklenen hayvan kanser modellerinde başlangıç ve ilerleme döneminde selenyumun antikanserojenik etkisi bildirilmiştir.^{84, 92}

Selenyumun antikanserojenik etkisinin mekanizmaları:

1. Selenyum antioksidan enzimlerden GPx'in kofaktörüdür. Özellikle hayvanların diyetlerine selenyum eklendiğinde maksimal enzim aktivitesi sağlanmaktadır.

2. DNA tamir kapasitesini artırır.
3. Humoral ve hücrel immün cevabı artırır.

Selenyumun, deri ¹¹, karaciğer ³⁵, kolon kanseri geliştirilen hayvanlarda antikanserojenik olduğu gösterilmiştir.

Schrauzer, meme kanserine yakalanmış kadınların kan selenyum düzeyini ve diyetlerindeki selenyum miktarıyla beraber selenyumun mortalite hızı üzerine etkisini araştırmıştır. Mortalitenin, selenyum düzeyinin azalmasıyla arttığını söylemiştir. ⁷¹

Piccinini ve ark. ⁶³ 38 meme kanserli hastada yaptıkları çalışmada; saç Se konsantrasyonunda hasta ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulurken aynı farkı plazma Se için bulamamışlardır. Sadece hasta Se konsantrasyonunda hafif bir düşüklük mevcuttur. Biz biliyoruz ki Se, GPX'in bir komponentidir ve antioksidan özellik gösterir. McConnel ve ark. ⁵³ yaptıkları çalışmada meme kanserli hastaların benign meme hastalığı olanlara göre daha düşük Se seviyesi içerdiğini göstermiştir. Bu bulguları destekleyen bir çok çalışma vardır. Willett düşük selenyum düzeyinin kanser riskini artırdığını göstermiştir. ⁹³ Salonen'de selenyum düzeyi ile kanser geliştirme riski arasında negatif bir ilişki olduğunu söylemiştir. ⁶⁸

Biz de çalışmamızda, meme kanserine yakalanmış tüm gruplarımızda (A, B, C) sağlıklı kontrol grubuna göre düşük selenyum düzeyi tespit ettik ($p < 0.05$, $p < 0.001$). Selenyum GPx'in kofaktörüdür. Selenyumu düşük hastaların GPx aktiviteleri yüksektir, selenyum kofaktör olarak kullanıldığından düzeyinin azaldığını düşünmekteyiz. Bunun yanı sıra kanser gelişen hastaların Se

düzeyinin düşük olması, daha önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında da beklenen bir sonuçtur.

Diyetlerinde selenyum düzeyi düşük olanlar meme kanseri için risk grubu oluşturabileceği gibi, meme kanseri gelişiminin bir sonucu olarak ta kan selenyum düzeyinin düşebileceği yorumu yapılabilir. Bu konuda uzun süreli ve geniş hasta gruplarını içeren epidemiyolojik ve klinik çalışmalar yapılması gerektiği düşüncesindeyiz.



6. ÖZET

Amaç : Değişik tedavi aşamalarında bulunan meme kanserli hastaların kan antioksidan enzimleri, selenyum düzeyleri ve oksidatif stres arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmak.

Metod : Meme kanserli hastalarda ve kontrol grubunda eritrosit malondialdehit (MDA), plazma selenyum (Se) düzeyleri ve eritrosit glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi ölçüldü. Plazma selenyum düzeyi atomik absorpsiyon spektrofotometre ile ölçülürken eritrosit MDA düzeyi kolorimetrik metodla çalışıldı. Eritrosit GPx aktivitesi Paglia ve Valentine'nin geliştirdiği kinetik yöntemle ölçüldü.

Bulgular : Meme kanserinin değişik evrelerinde (grup A, B ve C) çalışılan eritrosit GPx aktiviteleri sağlıklı kontrol grubundan anlamlı bir şekilde daha yüksektir ($p<0,001$). Eritrosit MDA düzeylerini ölçerek tespit ettiğimiz lipid peroksidasyonu ise meme kanserli hastalarda kontrol grubuna göre daha yüksektir ($p<0,001$). Ancak plazma selenyum düzeyleri diğer iki parametrenin tersine meme kanserli hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktür ($p<0,001$).

Sonuç : Bu çalışmada meme kanseri ile oksidatif stres, selenyum ve antioksidan sistem arasında bir ilişki olduğu gözlenmiştir.

7. SUMMARY

Objectives : To investigate the roles of oxidative stress, selenium and antioxidant enzyme in breast cancer patients of different clinical stage.

Design and Method : Erythrocyte malondialdehyde (MDA), serum selenium levels and erythrocyte glutathione peroxidase (GPx) activities were measured at study groups and healthy controls. Atomic absorption spectrophotometry and colorimetric method were used to obtain selenium and MDA levels, respectively GPx activities were assessed with kinetic method described by Paglia and Valentine.

Results : In the present study the erythrocyte (GPx) activities of all study groups (group A, group B, group C) were significantly higher than healthy control ($p < 0.001$). Significantly increased lipid peroxidation, measured as erythrocyte MDA, was demonstrated in breast cancer patients compared to the control ($p < 0.001$) with contrast to serum selenium levels which were significantly lower in patients' group than the control ($p < 0.001$).

Conclusion : In the present study the presence of an association among oxidative stress, selenium and antioxidant system was observed in patients with breast cancer.

8. KAYNAKLAR

- 1) AFRASYAP L., GÜVENEN G., TÜRKMEN S.: Plasma and erythrocyte total antioxidant status in patients with benign and malign breast disease. *Cancer Biochem. Biophys.* 16:129-138,1998
- 2) AKKUŞ İ.:Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri.1-61, 106-111 Mimoza yayınları, Konya 1995
- 3) ALAGÖL H., ERDEM E., SANCAK B., TÜRKMEN G., ÇAMLİBEL M., BUĞDAYCI G.: Nitric oxide biosynthesis and malondialdehyde levels in advanced breast cancer. *Aust N.Z.J. Surg* 69:647-650,1999
- 4) BARCELOUX D.G.: Selenium. *J Toxicol Clin Toxicol* 37: 145-172, 1999
- 5) BASAGA H.S.: Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 68:989-997,1990
- 6) BATİST G., TULPULE A., SHINHA B.K., KAKTI A.G., MYERS C.E., COWAN K.H.: Over-expression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug resistant human breast cancer cells. *J Biol. Chem* 261:15544-15549,1986
- 7) BERRY M.J., LARSEN P.R.: Recognition of UGA as a selenocysteine codon in eucaryotes: a review of recent progress. *Biochem Soc Trans* 21:827-832,1993
- 8) BEWICK M., COUTIE W., TUDHOPE G.R.: Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in the red cells of patients with malignant lymphoma. *Br J Haematol* 65:347-350,1987

- 9) BOYD N.F., McGUIRE V.: The possible role of lipid peroxidation in breast cancer patients. *Free Radic Biol and Med* 10:185-190,1991
- 10) BRUCE A.: Swedish views on selenium. *Annals of Clinical Research* 18:8-12,1986
- 11) BURKE K.E., COMBS G.F., GROSS E.G., BHUYAN K.C., ABU-LIBDEH H.: The effect of topical and oral L-selenomethionine on pigmentation and skin cancer induced by ultraviolet irradiation. *Nutr cancer* 17:123-137,1992
- 12) BURTIS C.A., ASHWOOD E.R.: Trace elements. Chapter 30, *Tietz textbook of Clinical Chemistry*. Third Edition s:1047-1049, Saunders 1999
- 13) CHAMPE P.C., HARVEY R.A.: Metabolic effects of insulin and glukagon. *Biochemistry* Second edition s:269-277 Harvey RA(ed) Lipincott Company, Philedelphia 1994
- 14) CHAUDIERE J., WILHELMSSEN E.C., TAPPEL A.L.: Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acids and other mercaptans. *J Biol Chem* 259:1043-1050,1984
- 15) CHEESEMAN K.H., SLATER T.F.: An introduction to free radical biochemistry. *British Med Bulletin* 149:481-493, 1993
- 16) CHEN X., YANG G., CHEN J., CHEN X., WEN Z., GE K.: Studies on the relations of selenium and keishan disease. *Biol Trace Elem Res* 2:91-107,1980
- 17) CHU F.F., DOROSHOW J.H., ESWORTHY R.S.: Expression characterization and tissue distribution of anew cellular selenium dependent glutathione peroxidase, GSHPx-Gi. *J Biol Chem* 168:2571-2576,1993

- 18) COTRAN R.S., KUMAR V., ROBBINS S.L.: Cellular injury and cellular death. In Robbins: Pathologic basis of disease the W.B. Saunders Company, 1994,s:1-34
- 19) CROSS C.E., HALLIWEL B., BORISH E.T., PRYOR W.A., AMES B.N., SAUL R.L., McCORD J.M., HARMAN D.: Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 107:526-545, 1987
- 20) DASGUPTA A., POWELL D., SALDANA S., DOIA L.: Elevated lipid peroxidation products and depleted transferrin levels in the plasma of kidney transplant recipients. *Life sciences* 46:67-72,1989
- 21) DORMANDY T.L.: Free radical oxidation and antioxidant. *Lancet* 1:647-650,1978
- 22) EDIGER M,N., PETTIT G.H., MATCHETTE L.S.: In vitro measurements of cytotoxic effect of 193 nm and 213 nm laser pulses at subablative fluences. *Lasers Surg Med* 21:88-93,1997
- 23) EKMEKÇİ A., ERBAŞ D.: Kanserin moleküler mekanizması: Onkogenler ve büyüme faktörleri. Birinci baskı s19,1991
- 24) FANTONE J.C., WARD P.A.: Polymorpnuclear leukocyte-mediated cell and tissue injury: Oxygen metabolites and their relations to human disease. *Human Pathology* 16:973-978,1985
- 25) FREEMAN B.A., CRAPO J.D.: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47:412-425, 1982

- 26) GERBER M., ASTER C., SEGALA C., SAINTOT M., SCALI J., SIMONY-LAFONTAINE J., GRENIER J., PUJOL H.: Antioxidants in advanced cancer. *Int J Vit Nutr Res* 65:69-71,1995
- 27) GERBER M., RICHARDSON S., CRASTES de PAULET P., CRASTES de PAULET A., PUJOL H.: Relationship between vitamin E and polyunsaturated fatty acids in breast cancer. Nutritional and metabolic aspects. *Cancer* 64:2347-2353,1989
- 28) GERBER M., RICHARDSON S., FAVIER F., CRASTES de PAULET A.: Vitamin and tumor growth. In antioxidants in therapy and medicine. Emerit I, Aualir C(ed) 129-132. Plenum Press NY,1990
- 29) GERBER M., RICHARDSON S., SALKED R., CHAPPUIS P.: Antioxidants in female breast cancer patients. *Cancer Invest* 9:421-428,1991
- 30) GLADYSHEV V.N., JEANG K.T., STADTMAN T.C.: Selenocysteine identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase corresponds to TGA in the human placental gene. *Proc Natl Acad Sci* 93: 6143-51,1996
- 31) GONZALES M.J., SCHEMMEL R.A., GRAY J.I., DUGAN L., SHEFFIELD L.G., WELSH C.W.: Effect of dietary fat on growth of MCF-7 and MDA-MB231 human breast carcinomas in athymic nude mice: Relationship between carcinoma growth and lipid peroxidation product levels. *Carcinogenesis* 12:1231-1235,1991
- 32) GONZALES R., AUCLAIR C., VOISIN E., GANTERO H., DHEMY D., BOIVIN P.: Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in red

- blood cells from patients with malignant disease. *Cancer Res* 44:4137-4139,1984
- 33) GRISHAM M.B., GRANGER N.: Metabolic sources of reactive oxygen metabolites during oxidant stress and ischemia with reperfusion. *Clin Chest Med* 10:71-80, 1989
- 34) GUEMORI I., ARTUR Y., HERBERTH B., JEANDEL C., CUNNY G., SIEST G.: Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. *Clin chem* 37:1932-1937,1991
- 35) HAAR J.R., EXON J.H., WHANGER P.D., WESWIG P.H.: Effect of dietary selenium on N-2-fluorenyl-acetamide-(FAA)-induced cancer in vitamin E supplemented selenium depleted rats. *Clin Toxicol* 1:187-194,1971
- 36) HALLIWELL B., GUTTERIDGE M.C.: The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280:1-8, 1990
- 37) HALLIWELL B.: Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special references to atherosclerosis. *Br J Exp Path* 70: 735-757,1989
- 38) HARMAN D.: Free radical theory of aging: The free radical disease. *Age* 7:111-131,1984
- 39) HEFFNER J.E., REPINE J.E.: Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am rev Respir Dis* 118:531-551,1989
- 40) HINCAL F., YETGİN S., ATAÇERİ N.: Selenium satatus in Turkey. *Biol Trace Elem Res* 20:161-7,1989

- 41) HINDER R.A., STEIN H.J.: Oxygen derivated free radicals. Arch Surg 126:104-105, 1991
- 42) HOLBEN D.H., SMITH A.M.: The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. J Diet Assoc 99:836-843, 1999
- 43) HOLM L.E., NORVADENG E., HJALMER M.L., LIDBRIN K., CALLMER E., NILSSON B.: Treatment failure and dietary habits in women with breast cancer. J Natl Cancer Inst 85:32-36, 1993
- 44) HUBET N., WALCZAK R., STURCHLER C., MYSLINSKI E., SCHUSTER C., WESTHOF E., CARBON P., KROL A.: RNAs mediating cotranslational insertion of selenocysteine in eucaryotic selenoproteins. Biochimie 78:590-6, 1996
- 45) KEHRER P.J.: Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Crit Rev Toxicol 23:21-48, 1993
- 46) KOLLMUS H., FLOHE L., MCCARTHY J.E.: Analysis of eucaryotic mRNA structures directing cotranslational incorporation of selenocysteine. Nucleic Acids Res 14:1195-1201, 1996
- 47) KÖKSOY C., KAVAS G.Ö., AKÇİL E., KOCATÜRK P.A., KARA S., ÖZARSLAN C.: Trace elements and superoxide dismutase in benign and malignant breast diseases. Breast Cancer Research and Treatment 45:1-6, 1997
- 48) KRINSKY N.I.: Membrane antioxidants. Ann N Y Acad Sci 551:17-32, 1988
- 49) KUMAR K., THANGARAJU M., SACHDANANDAM P.: Changes observed in antioxidant system in the blood of post-menapausal women breast cancer. Biochem Int 25:371-380, 1991

- 50) LANSON M., BOUGNOUX P., BESSON P., LANSAC J., HUBERT B., COUET C., LE FLOCH O.: Polyunsaturated fatty acids in human breast carcinoma phosphatylethanolamine in early relapse. *Br J Cancer* 61:776-778,1990
- 51) LARMICHAEL J., MITCHELL J.B., FRIEDMAN N., GAZDAR A.F., RUSSON A.: Glutathione and related enzyme activity in human lung cancer cells lines. *Br J Cancer* 58:437-440,1988
- 52) MARKEY B.A., PHAN S.H., VARANI J., RYAN U.S., WARD P.A.: Inhibition of cytotoxicity by intracellular superoxide dismutase supplementation. *Free Radic Biol Med* 9:307-317,1990
- 53) McCONNELL K.P., JAGER R.M., BLAND K.I., BLOTCKY A.J.: The relationship of dietary selenium and breast cancer. *J Surg Oncol* 15:67-70,1980
- 54) MICHIELS C., RAES M., TOUSSAINT O., REMACLE M.: Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology Medicine* 17:235-248,1994
- 55) MILLER A.C., SAMID D.: tumor resistance to oxidative association with ras oncogene expression and reversal by lovastatin, an inhibitor of p21 ras isoprenylation. *Int J cancer* 60:249-254,1995
- 56) MITTAG T.: Role of oxygen radicals in ocular inflammation and cellular damage. *Exp Eye Res* 39:759-769,1984
- 57) MURRAY R.K., GRANNER D.K., MAYES P.A., RODWELL V.W.: Harper's Biochemistry 24.th ed. Appleton & Lange s757,1996

- 58) NAVARRO M., LOPEZ H., RUIZ M.L., GONZALEZ S., PEREZ V., LOPEZ M.C.: Determination of selenium in serum by hydride generation atomic absorption spectrometry for calculation of daily dietary intake. *The Science of the Total Environment* 175:245-252, 1995
- 59) NIKI E.: Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids* 44:227-253, 1987
- 60) OVERVAD K.: Selenium and cancer. *Bibl Nutr Dieta. Basel, Karger*, 54:141-149, 1998
- 61) PAGLIA D.E., VALENTINE W.N.: Studies on the quantitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab & Clin Med* 70:158-169, 1967
- 62) PAWŁOWICZ Z., ZACHARA B., TRAFIKOWSKA U., MACIAG A., MARCHALUK E., NOWICKI A.: Blood selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in patients with breast cancer and advanced gastrointestinal cancer. *J Trace Elem. Electrolytes Healthy Dis.* 5:275-277, 1991
- 63) PICCININI L., BORELLA P., BARGELLINI A., MEDICI I.C., ZOBOLI A.: A case-control study on selenium, zinc and copper in plasma and hair of subjects affected by breast and lung cancer. *Biol Trace Elem Res* 51:23-30, 1996
- 64) PUNNONEN K., AHOTUPA M., ASAISHI K.: Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in human breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 120:374-7, 1994

- 65) RAYMAN M.P.: The importance of selenium to human health. *Lancet* 356:233-41,2000
- 66) Robbins and Kumar Basic Pathology. 4.th edition s247,1990
- 67) SAINTOT M., ASTRE C., PUJOL H., GERBER M.: Tumor progression and oxidant-antioxidant status. *Carcinogenesis* vol.17:1267-1271,1996
- 68) SALONEN J.T., ALFTHAN G., HUTTUNEN J.K.: Association between serum selenium and the risk of cancer. *Am J Epidemiol* 120:342-349,1984
- 69) SCHOENBERG M.H., BEGER H.G.: Oxygen radicals in intestinal ischemia and reperfusion. *Chem Biol Interact* 76:141-161,1990
- 70) SCHRAUZER G.N., MCGINNES J.E., KUEHN K.: Effect of temporary selenium supplementation on the genesis of spontaneous mammary tumors in inbred female C₃H/St mice. *Carcinogenesis* 1:199-201,1980
- 71) SCHRAUZER G.N., WHITE D.A., SCHNEIDER C.J.: Cancer mortality correlation studies. III. Statistical associations with dietary selenium intakes. *Bioinorg Chem* 7:23-34,1977
- 72) SCHRAUZER G.N., WHITE D.A., SCHNEIDER C.J.: Selenium and cancer: Effects of selenium and of the diet on the genesis of spontaneous mammary tumors in virgin inbred female C₃H/St mice. *Bioinorg Chem* 8:387-396,1978
- 73) SEVEN A., CANDAN G.: Antioksidan savunma sistemleri. *Cerrahpaşa J. Med* 27:41-50.1996
- 74) SEVEN A., ERBİL Y., SEVEN R., İNCİ F., GÜLYAŞAR T., BARUTÇU B., CANDAN G.: Breast cancer and benign breast disease patients evaluated in relation to oxidative stress. *Cancer Biochem. Biophys* vol 16:333-345,1998

- 75) SEVENIAN A., HOCHSTEIN P.: Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Ann Rev Nutr* 5:365-390, 1985
- 76) SLATER T., BENEDETTO C., BURTON G., CHEESEMAN K.H.: A disturbance in the control of cell division. In Thaler-De H, Paoletti R, Crastes de Paulet A(ed) *Icosanoids and cancer* Raven Press 21-29, 1984
- 77) SNOW P.G.: Low selenium status. *New Zeland Med J* 104:480-481, 1991
- 78) SOUTHRN P.A., POWIS G.: Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc* 63:390-408, 1988
- 79) SPALLHOLZ J.E.: Selenium and glutathione peroxidase: Essential nutrient and antioxidant component of the immune system. *Adv Exp Med Biol* 262:145-158, 1990
- 80) STADTMAN T.C.: Selenocysteine. *Annu Rev Biochem* 65:83-100, 1996
- 81) STOCKS J., DORMANDY T.L.: The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br J Haematol* 20:95-109, 1971
- 82) SUBRAMANIAM S., SUBRAMANIAM SHYAMA, DEVI C.S.: Erythrocyte antioxidant enzyme activity in cmf treated breast cancer patients. *Cancer Biochem Biophys* vol. 14:177-182, 1994
- 83) TAKAHASHI K., AVISSAR N., WHITIN J., COHEN H.: Purification and characterization of human glutathione peroxidase: A selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys* 256:677-686, 1987

- 84) THOMPSON H.J., MEEKER L.D., KOKOSKA S.: Effect of an inorganic and organic form of dietary selenium on the promotional stage of mammary carcinogenesis in the rat. *Cancer Res* 44:2803-2806, 1984
- 85) THORLING E.B., OVERVAD K., GEBOERS J.: Selenium status in europe-human data a multicenter study. *Ann Clin Res* 18:3-7, 1986
- 86) TOWNSEND A.J., MORROW C.S., SINHA B.K., COWAN K.H.: Se dependent glutathione peroxidase expression in inversely related to estrogen receptor content of human breast cancer cells. *Cancer Commun* 3:265-270, 1992
- 87) Unicam Atomic Absorption Spectrometry Methods Manual, Unicam Limited, United Kingdom, 1994
- 88) URSINI F., BINDOLI A.: The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chem Phys Lipids* 44:255-276, 1987
- 89) URSINI F., MAIORINO M., GREGOLIN C.: Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Int J Tiss reac* VIII:99-103, 1986
- 90) WANG M.Y., DHINGRA K., HITTELMAN W.N.: Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5:705-10, 1996
- 91) WEISS S.J.: Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand* 548:9-37, 1986
- 92) WELSH C.W., GOODRISH-SMITH M., BROWN C.K., GREENE H.D., HAMEL E.J.: Selenium and the genesis of murine mammary tumors. *Carcinogenesis* 2:19-22, 1981

- 93) WILLETT W.C., POLK B.F., MORRIS J.S., STAMPFER M.J., PRESSEL S., ROSNER B., TAYLOR J.O., SCHNEIDER K., HAMES C.G.: Prediagnostic serum selenium and risk of cancer. *Lancet* ii:130-134,1983
- 94) WINROW V.R., WINYORD R.G., MORRIS C.J., BLOKE D.R.: Free radicals in inflammation: Second messengers and mediators of tissue destruction. *British Medical Bulletin* 49:506-522,1993
- 95) YOKOTA A., SHIGEOKA S., ONISHI G., KITAOKA S.: Selenium as inducer of glutathione peroxidase in low-CO₂ grown *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiol* 86:649-651,1988
- 96) ZARIDZE D.G., CHEVCHENKO V.E., LEUTSHUK A.A., LIFONOVA Y.E., MAXIMOVITCH D.M.: Fatty acid composition of phospholipids in erythrocyte membranes and risk of breast cancer. *Int J Cancer* 45:807-810,1990

9. ÖZGEÇMİŞ

15-10-1974' de Acipayam / Denizli'de doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Acipayam'da, lise öğrenimimi de İzmir Yenişehir Sağlık Meslek Lisesi'nde tamamladım (1992). 1992 yılı Ekim ayında mecburi görevim nedeniyle Ankara Onkoloji Hastanesinde Laboratuvar Teknisyeni olarak göreve başladım. Aynı yıl Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandım (1992-1997). 1997 yılında aynı hastanede Biyolog kadrosuna geçtim ve aynı göreve devam etmekteyim. 1999 yılında Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda (Tıp) yüksek lisansa başladım.

