

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**AKCİĞER KANSERİNDE SÜPEROKSİT DİSMUTAZ
KATALAZ VE GLUTATYON PEROKSİDAZ GEN
POLİMORFİZMLERİNİN OKSİDAN-ANTIOKSİDAN
SİSTEM İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

BRUNİLDA MEZANİ

**DANIŞMAN
PROF. DR. İLHAN YAYLIM**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Brunilda Mezani tarafından hazırlanan "Akciğer Kanserinde Süperoksit Dismutaz, Katalaz ve Glutasyon Peroksidaz Gen Polimorfizmlerinin Oksidan-Antioksidan Sistem ile İlişkisinin İncelenmesi" başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

30 / 07 / 2015

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. İlhan YAYLIM (Danışman) İ.Ü. DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı	
2.Prof. Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU İ.Ü. DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı	
3.Prof. Dr. Ahmet BELCE Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi	
4.Doç. Dr. Elif ÖZKÖK İ.Ü. DETAE Sinirbilim Anabilim Dalı	
5.Doç. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

BRUNİLDA MEZANİ

(İmza)



İTHAF

Desteğini her zaman hissettiğim aileme ve çalışma arkadaşlarıma ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı kurucusu, emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Turgay İsbir'e,

Yüksek lisans eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen ve benden desteğini, iyi niyetini hiçbir zaman esirgemeyen çok kıymetli danışman hocam İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhan Yaylım'a,

Yüksek lisans eğitimim süresince verdikleri zaman ve değerli bilgileri için Prof. Dr. Oğuz Öztürk, Prof. Dr. Sadrettin Pençe, Prof. Dr. Hülya Yılmaz Aydoğan, Prof. Dr. Bedia Çakmakoglu, Prof. Dr. S. Ümit Zeybek, Prof. Dr. Arzu Ergen, Dr. Özlem Küçükhüseyin olmak üzere tüm Moleküler Tıp Anabilim Dalı çalışanlarına,

Tezim için gerekli hastaların seçimi, örneklerin sağlanması ile klinik değerlendirmelerindeki destek ve katkılarından dolayı İstanbul Üniversitesi

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi Göğüs cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Akif Turna ve Dr. Elvin Hekimoğlu'na,

Çalışmalarım süresince her türlü laboratuvar imkanı sağlayan Analitik Kimya Anabilim Dalı'na, deneyim ve bilgisini paylaşan değerli hocalarım Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Reşat Apak'a ve bu bölümdeki Sayın Doç. Dr. Sema Demirci Çekiç ve arkadaşım Aslı Neslihan Avan'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca, tez çalışmam boyunca, başta her zaman deneyim ve bilgileriyle beni yönlendiren Dr. Bahar Toptaş, Msc Saime Turan olmak üzere, tezimin her aşamasında bana büyük bir sabırla, özveriyle yardım eden, desteklerini hiç esirgemeyen çok sevgili çalışma arkadaşlarım Fatih Yanar, Burcu Kaya, Özge Özgen, Haniye Azhari, Sinem Demirbağ'a çok özel teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu çalışmaya katılmayı kabul etmiş olan tüm kanser hastaları ve ailelerine de teşekkür ederim.

Son olarak, sevgili aileme ve eşime teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 40769

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	Xİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	Xİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET.....	XV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. AKCİĞER KANSERİ	7
2.1.1. EPİDEMİYOLOJİ	7
2.1.2. ETİYOLOJİ.....	11
2.1.3. TNM SINIFLAMASI VE EVRELEME	12
2.2. OKSİDATİF STRES VE KANSER.....	15
2.2.1. SERBEST RADİKALLER	15
2.2.1.1. Reaktif Oksijen Türleri.....	17
2.3. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ	19
2.3.1. ANTİOKSİDANLARIN ETKİ ŞEKİLLERİ:.....	20
2.3.2. ENZİMATİK OLMAYAN ANTİOKSİDAN SİSTEMLER	20
2.3.3. ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR	21
2.3.3.1. KATALAZ.....	21
2.3.3.2. GLUTATYON PEROKSİDAZ	21
2.3.3.3. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD)	23
2.4. SERBEST RADİKAL TAYİNİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER.....	25
2.4.1. N,N-Dimetil-p-fenilendiamin (DMPD) Yöntemi	25
2.4.2. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler (TBARS) Yöntemi	26

2.5. ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ	27
2.5.1. TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) Metodu.....	28
2.5.2. CUPRAC (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite) Yöntemi.....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1. GEREÇ.....	30
3.1.1. SEÇİLEN ÖRNEKLERİN TANIMI	30
3.1.2. ÇALIŞMAMIZDA KULLANILAN CİHAZLAR	30
3.1.3. ÇALIŞMAMIZDA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE ÇÖZELTİLER.....	31
3.1.3.1. DNA izolasyonunda Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	31
3.1.3.2. Antioksidan-Oksidan parametrelerin ölçümünde Kullanılan Kimyasal Maddeler:	31
3.1.4. DNA İZOLASYONUNDA KULLANILAN ÇÖZELTİLER.....	32
3.1.4.1. Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer).....	32
3.1.4.2. 0.5 M Disodyumetilendiaminteraasetat (EDTA) (pH 8.0)	32
3.1.4.3. 4 M Sodyum Klorür (NaCl).....	32
3.1.4.4. Lökositleri Parçalama Tamponu (White Blood Cell Buffer-WBL).....	32
3.1.4.5. 1 M Tris Tamponu (Stok).....	32
3.1.4.6. 9.5 M Amonyum Asetat	33
3.1.4.7. %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS).....	33
3.1.4.8. Proteinaz K (20 mg/ml)	33
3.1.5. AGAROS JEL ELEKTROFOREZİNDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER	33
3.1.5.1. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5X).....	33
3.1.5.2. Etidyum Bromür (10 mg/ml)	33
3.1.5.3. 5X Tris-Borik Asit-Etilendiamintetraasetat (TBE).....	33
3.1.6. ANTİOKSİDAN TAYİNİNDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER.....	33
3.1.6.1. Glutasyon Çözeltisi.....	33
3.1.6.2. CuCl ₂ .2H ₂ O Çözeltisi.....	34
3.1.6.3. Neokuproin Çözeltisi.....	34
3.1.6.4. pH 7 Üreli Tampon.....	34
3.1.6.5. ABTS / Persülfat Çözeltisi.....	34
3.1.6.6. PBS (Phosphate Buffered Saline) Tampon Çözeltisi.....	34
3.1.7. OKSİDAN TAYİNİNDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER.....	34

3.1.7.1. pH 7,0 Fosfat Tamponu	34
3.1.7.2. 2-Deoksi-D-Riboz Çözeltisi	34
3.1.7.3. Na ₂ EDTA Çözeltisi	34
3.1.7.4. Amonyum Demir (II) Sülfat ((NH ₄) ₂ Fe (SO ₄).6H ₂ O) Çözeltisi	35
3.1.7.5. H ₂ O ₂ Çözeltisi	35
3.1.7.6. TCA (Trikloroasetik Asit) Çözeltisi.....	35
3.1.7.7. 2-Tiyobarbitürik Asit (TBA) Çözeltisi.....	35
3.1.7.8. Demir (III) Klorür (FeCl ₃) Çözeltisi	35
3.1.7.9. pH 5,7 Asetat Tamponu.....	35
3.1.7.10. H ₂ O ₂ Çözeltisi	35
3.1.7.11. N,N-Dimetil-p-Fenilendiamin (DPMD) Çözeltisi	35
3.2. ÇALIŞMAMIZDA KULLANILAN LABORATUVAR YÖNTEMLERİ	35
3.2.1. PERİFERİK KANDAN DNA İZOLASYONU	36
3.2.2. ELDE EDİLEN DNA'NIN KONSANTRASYON VE KALİTESİNİN TAYİNİ	36
3.2.3. SOD1, KATALAZ VE GPX GEN POLİMORFİZMLERİNİN PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI.....	37
3.2.3.1. SOD1 rs2070424 Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Primer Dizileri	37
3.2.3.2. Katalaz rs7943316 Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Primer Dizileri	37
3.2.3.3. GPX rs1050450 Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Primer Dizileri	37
3.2.4. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (POLYMERASE CHAIN REACTİON-PZR)'DA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE PZR'İN HAZIRLANIŞI.....	38
3.2.5. PCR ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE KONTROLÜ	40
3.2.5.1. %2'lik Agaroz Jel Hazırlanması:	40
3.2.5.2. PZR Ürünlerinin %2'lik Jele Yüklenmesi:.....	40
3.2.5.3. PZR Ürünlerinin Kontrolü:.....	41
3.2.6. SOD1 GENİ PCR ÜRÜNÜNDE RESTRİKSİYON FRAGMENT UZUNLUK POLİMORFİZMİ (RFLP) YÖNTEMİNİN UYGULANMASI.....	41

3.2.6.1. Katalaz geni PCR Ürününde Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Yönteminin Uygulanması.....	42
3.2.6.2. GPX geni PCR Ürününde Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Yönteminin Uygulanması.....	42
3.2.7. ENZİM KESİM ÜRÜNLERİNİN AGAROZ JEL ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE KONTROLÜ	43
3.2.7.1. MspI Enzim Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi	43
3.2.7.2. HinfI Enzim Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi	44
3.2.7.3. ApaI Enzim Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	44
3.2.8. TOTAL ANTİOKSİDAN VE OKSİDAN ÖLÇÜMÜNDE KULLANILAN YÖNTEMLER	45
3.2.8.1. CUPRAC (Bakır (II) İndirgeme Antioksidan Kapasitesi) Yöntemi	45
3.2.8.2. ABTS/Persülfat Yöntemi.....	45
3.2.8.3. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler (TBARS) Yöntemi.....	46
3.2.8.4. N,N-Dimetil-p-Fenilendiamin (DMPD) Yöntemi	46
3.2.8.5. N,N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD) Yönteminin Optimizasyonu:.....	46
3.2.8.6. İnsan Serumunun TAC ve TOC Yöntemlerine Uygulanması	47
3.2.8.7. Kalibrasyon Denklemlerinin Belirlenmesi	47
3.2.8.8. Kalibrasyon Denklemleri.....	47
4. BULGULAR.....	49
4.1. PZR ÜRÜNLERİNİN KONTROLÜNE AİT BULGULAR	49
4.1.1. GPX-1 -198 C/T Polimorfizmi PZR Ürünlerine Ait Bulgular	49
4.1.2. SOD-1 -251 A/G Polimorfizmi PZR Ürünlerine Ait Bulgular.....	49
4.1.3. Katalaz-21 A/G Polimorfizmi PZR Ürünlerine Ait Bulgular.....	50
4.2. KESİM ÜRÜNLERİNİN KONTROLÜNE AİT BULGULAR	50
4.2.1. RFLP Yöntemi ApaI Enzim Kesimi ile GPX-1 Kesim Ürünlerine Ait Bulgular	50
4.2.2. RFLP Yöntemi MspI Enzim Kesimi ile SOD1 Kesim Ürünlerine Ait Bulgular	51
4.2.3. RFLP Yöntemi HinfI Enzim Kesimi ile Katalaz Kesim Ürünlerine Ait Bulgular	51
4.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONRASINDA ELDE EDİLEN BULGULAR	52
KONTROL	52
5. TARTIŞMA	62

KAYNAKLAR	71
HAM VERİLER.....	87
FORMLAR	88
ETİK KURUL KARARI	89
PATENT HAKKI İZİNİ.....	91
TELİF HAKKI İZİNİ	92
ÖZGEÇMİŞ	93

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: PZR Karışımının Hazırlanması.....	38
Tablo 3-2: SOD1 geni PZR Çoğalma Koşulları	39
Tablo 3-3: Katalaz geni PZR Çoğalma Koşulları	39
Tablo 3-4: GPX geni PZR Çoğalma Koşulları	40
Tablo 3-5: MspI Enzimi Kesim Protokolü	41
Tablo 3-6: HinfI Enzimi Kesim Protokolü	42
Tablo 3-7: ApaI Enzimi Kesim Protokolü.....	43
Tablo 3-8: Kalibrasyon Denkleminin Belirlenmesinde Kullanılan GSH Molariteleri...47	
Tablo 3-9: Kullanılan antioksidanların yöntemlere göre kalibrasyon denklemleri	48
Tablo 4-1: Çalışma gruplarına ait veriler	52
Tablo 4-2: Akciğer kanserli hastalarda GPX -198 C/T, SOD1 -251A/G ve KAT -21 A/T gen polimorfizmlerine ait genotip ve allel dağılımları.....	53
Tablo 4-3: Hasta grubunda GPX -198 C/T, SOD1 -251A/G ve KAT -21 A/T Genotiplerinin Klinik ve Patolojik Parametrelere Göre Dağılımı.....	55
Tablo 4-4: Akciğer Kanserli Hasta ve Kontrol Grubunda CUPRAC, ABTS, DMPD ve TBARS yöntemlerine göre serumdaki total oksidan-antioksidan düzeyleri (GSH Ekv. mM)	56
Tablo 4-5: Akciğer Kanserli Hasta ve Kontrol Grubunda genotiplere göre serumdaki total antioksidan düzeyleri (GSH Ekv. mM)	57
Tablo 4-6: Akciğer Kanserli Hasta ve Kontrol Grubunda genotiplere göre serumdaki total antioksidan düzeyleri (GSH Ekv. mM)	58
Tablo 4-7: Akciğer Kanserli Hasta ve Kontrol Grubunda genotiplere göre serumdaki total oksidan düzeyleri (GSH Ekv. mM)	59
Tablo 4-8: Akciğer Kanserli Hasta ve Kontrol Grubunda genotiplere göre serumdaki total oksidan düzeyleri (GSH Ekv. mM)	60

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Dünya sağlık örgütü 2008 yılı cinsiyete göre kanser nedenli tahmini ölüm ve oranları (27)	7
Şekil 2-2: Oksidatif stress Mekanizması ve Etkileri	16
Şekil 2-3: Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların hücrede buldukları yerler	19
Şekil 2-4: MnSOD, CuZnSOD ve FeSOD Enzimlerine Ait Oksidasyon-Redüksiyon Reaksiyonları	25
Şekil 2-5: 2- Deoksi -D- Riboz	26
Şekil 2-6: TBA ₂ -MDA oluşum reaksiyonu	27
Şekil 2-7: ABTS.+ radikal kationunun yapısı.....	28
Şekil 2-8: CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu (II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla (Ar (OH) _n) reaksiyonu sonucu Cu (I)-Nc renkli kelatının oluşumu	29
Şekil 3-1 MspI Restriksiyon Enzimine ait Kesim tanıma bölgesi	41
Şekil 3-2: HinfI Restriksiyon Enzimine ait Kesim tanıma bölgesi.....	42
Şekil 3-3: ApaI Restriksiyon Enzimine ait Kesim tanıma bölgesi	42
Şekil 3-4: RFLP sonrası oluşabilecek SOD1 genine ait DNA parçalarının % 3'lük agaroz jeldeki bant şeklinin şematik görüntüsü.....	44
Şekil 3-5: RFLP sonrası oluşabilecek Katalaz genine ait DNA parçalarının % 3'lük agaroz jeldeki bant şeklinin şematik görüntüsü.....	44
Şekil 3-6: RFLP sonrası oluşabilecek GPX genine ait DNA parçalarının % 3'lük agaroz jeldeki bant şeklinin şematik görüntüsü.....	45
Şekil 4-1: GPX-1 geni primerleriyle çoğaltılan 192 bç'lik PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. Marker: MBI Fermentas 100 bç DNA marker.....	49
Şekil 4-2: SOD-1 geni primerleriyle çoğaltılan 570 bç'lik PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. Marker: MBI Fermentas 100 bç DNA marker.....	49
Şekil 4-3: Katalaz geni primerleriyle çoğaltılan 250 bç'lik PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. Marker: MBI Fermentas 100 bç DNA marker.....	50
Şekil 4-4: ApaI enzim kesimi sonucunda ürünlerin %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü...50	50
Şekil 4-5: MspI enzim kesimi sonucunda ürünlerin %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü. .51	51
Şekil 4-6: HinfI enzim kesimi sonucunda ürünlerin %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü. .51	51

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

DNA	: Deoksiribonükleik asit
CAT	: Katalaz
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSSG	: Okside glutasyon
SOD	: Süperoksit Dismutaz
Cu/Zn SOD	: Bakır/çinko süperoksit dismutaz
MnSOD	: Mangan süperoksit dismutaz
FeSOD	: Demir süperoksit dismutaz
ROS	: Reaktif oksijen türleri
AOx	: Antioksidan
TAC	: Toplam antioksidan kapasite
TOC	: Toplam oksidatif dönüşüm
MDA	: Malondialdehit
ABTS	: 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiyazolin-6-sulfonat)
TBARS	: Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler
DMPD	: N,N-dimetil-p-fenilendiamin
CUPRAC	: Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite tayini
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
¹ O ₂	: Singlet oksijen
O ₂ ⁻	: Süperoksit radikali
OH·	: Hidroksil radikali
HO ₂ ·	: Hidroperoksil radikali
HOCl	: Hipokloröz asit
R·	: Karbon merkezli radikal
ROO·	: Peroksil radikali
RO·	: Alkoksil radikali
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
L·	: Lipid radikali
LOO·	: Lipid peroksit radikali

LOOH	: Lipid hidroperoksit
TNM	: Classification of Malignant Tumours
AJCC	: American Joint Committee on Cancer
3'UTR	: 3' untranslated region
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
SDS	: Sodyum Dedodesil Sülfat
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA

ÖZET

Mezani, B. (2014). Akciğer Kanserinde Süperoksit Dismutaz, Katalaz ve Glutasyon Peroksidaz Gen Polimorfizmlerinin Oksidan-Antioksidan Sistem ile İlişkisinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp AD. Yüksek Lisans. İstanbul.

Akciğer kanseri dünyada kanser vakaları arasında en yüksek görülme sıklığına sahip kanser türüdür. Sigara en önemli risk faktörleri arasındadır. Sigara dumanıyla birlikte kirli havaya maruz kalan akciğerlerde serbest radikal ve reaktif oksijen türlerinde artış meydana gelmektedir. Canlı organizmada oluşan serbest radikal seviyesini belirli bir düzeyde tutarak birikimini önlemek ve oluşan bu serbest radikallerin oluşturabileceği hasarlardan korunmak için savunma mekanizmaları gelişmiştir. SOD, GPX ve Katalaz antioksidan sistemde görev alan önemli enzimatik antioksidanlardır. Karsinogenez ve tümör gelişimi ile ilişkili olduğu düşünülen serbest radikallerin oluşturduğu hasarların ortadan kaldırılması açısından antioksidan mekanizmaların bilinmesi de önemlidir. Bu enzimleri kodlayan genlerdeki genetik varyasyonlar enzimlerin aktivitelerinde azalmaya neden olabilmektedir. Antioksidan sistem üyeleri katalaz (CAT), süperoksid dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GPX) kodlayan genlerdeki tek nükleotid varyasyonları (SNPs) ile oksidan-antioksidan kapasite düzeylerinin akciğer kanseri hastalarında incelenmesi amaçlanmıştır.

GPX1 -198 C/T, SOD1-252 ve KAT-21 bir genlerine ait polimorfizm sonuçları değerlendirildiğinde genotip dağılımı ve allel frekansları açısından kontrol grubu ve akciğer kanserli hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamamıştır ($p>0.05$). CUPRAC ve TBARS yöntemlerine göre akciğer kanseri hastalarında total antioksidan miktarı kontrollere göre yükselmiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark yakalanamamıştır. Aynı hastaların serumlarındaki total oksidan miktarları DMPD ve TBARS yöntemiyle ölçülmüştür. DMPD yöntemi kullanılarak elde edilen bulgulara göre akciğer kanseri hastalarında oksidan seviyesi kontrollere göre düşük bulunmuştur ve istatistiksel olarak da anlamlılık yakalanmıştır.

Bu çalışmada elde edilen verilerle hasta serumlarındaki yüksek oksidatif hasar ve bunu dengelemek üzere aktivasyon gösteren antioksidan sistemin akciğer kanseri gelişiminde önemli rol alabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, CAT, GPX, SOD, Polimorfizm, CUPRAC, ABTS, DMPD, TBARS.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 40769

ABSTRACT

Mezani, B. (2014). Genetic polymorphisms of Superoxide Dismutases, Catalase, Glutathione peroxidase in lung cancer patient and the measurement of Total Antioxidant Capacity with Reactive Oxygen Species (ROS) Consumption Measured by Oxidative Conversion. İstanbul University, Institute of Health Science, Molecular Medicine Department. Master Thesis. İstanbul (2015).

lung cancer is one of the cancer with the highest incidence rate among the others worldwide. Smoking is most severe risk factors for the lung cancer. By inhalation of polluted air, amount of free radicals and reactive oxygen species increases in lungs.

For holding the amount of free radical at a certain level and protecting the organisms from damages caused those free radicals some defense mechanisms have been developed. bu serbest and prevent the resulting free radicals level in the living organisms SOD, GPX and catalase are some important enzymatic antioxidants involved in antioxidant system. Since the elimination of damages of free radicals which is thought to be associated with Carcinogenesis and tumor growth, antioxidant mechanisms are crucial. Genetic variations in the genes encoding this enzyme may lead to a decrease in activity of the enzyme.

In this research, investigation of single nucleotide variations in the genes encoding members of antioxidant system, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) and the oxidant-antioxidant capacity of those enzymes in lung cancer patients are aimed. When the polimorphism results belongs to GPX1 -198 C/T, SOD1-252 and KAT-21 genes are evaluated, statistically significant difference between the control group in terms of genotype distribution and allele frequencies and lung cancer patients could not be detected.

According to CUPRAC and TBARS methods, total amount of antioxidant in lung cancer patients has increased in comparison to control groups but any statistically significant difference could be captured. Total antioxidant amounts in the serum of same patients was measured by DMPD and TBARS. The results obtained from DMPD method showed that oxidant level of lung cancer patients was lower compared to controls. Depends on data obtained from this study, we suggested that high oxidative activation in the serum of patients and antioxidant system associated with balancing of this oxidative activation may have a important role in lung cancer development.

Key Words: Lung cancer, CAT, GPX, SOD, Polimorphism, CUPRAC, ABTS, DMPD, TBARS.

This study has been supported by İstanbul University Scientific Research Projects Unit.

Project No: 40769The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 40769

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bu çalışmanın amacı, antioksidan sistem üyeleri katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPX) kodlayan genlerdeki tek nükleotid varyasyonları (SNPs) ile oksidan-antioksidan kapasite düzeylerinin akciğer kanseri hastalarında incelenmesidir. Yapılan araştırmalar sonucu akciğer kanserinin oluşumunda katkı sağlayan bir çok genetik ve çevresel faktörler tanımlanmıştır. Akciğer kanseri vakalarına %10–15 sigara içmeyenlerde rastlanır. Genetik faktörler (1), radyoaktif maddeler, nikel, krom, demir oksit, radon gazı, asbest, puro, pipo kullanımı ve hava kirliliği akciğer kanseri riskini arttırmaktadır (2). Birçok radikal türü olmasına rağmen biyolojik sistemlerde en çok görülen, oksijenden oluşan ve genel olarak reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılan radikallerdir. Bu reaktif moleküllerden bazıları: süperoksit radikali, hidroksil radikali, peroksid radikali, nitrik oksit, alkoksil radikali ve hidrojen peroksittir (3). ROS genelde mitokondri gibi organellerin fonksiyonlarından yada iyonize radyasyon gibi dış etkenlerden hücre içinde üretilmiştir. Nispeten radikalik bir tür olmasına rağmen moleküler oksijenin (O₂) ardışık olarak indirgenmesiyle reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Bir e- kazanarak süperoksit (O₂•-) radikaline, 2 e- alarak hidrojen peroksit (H₂O₂) radikaline, 3 e- alarak hidroksil (OH•) radikaline dönüşür (4). Oluşan süperoksit anyonu "birincil" ROS olarak kabul edilir ve "ikincil" ROS oluşturmak için diğer moleküller ile etkileşime girebilir. Süperoksitlerin, hidrojen peroksite çevrilmesi katalitik aktivitesi çok yüksek bakırlı bir enzim olan SOD tarafından gerçekleştirilir. SOD enzimleri biyolojik sistemlerde bu reaksiyonu hızlandırır. SOD tarafından katalizlenen bu tepkime dismutasyon tepkimesi olarak adlandırılır. SOD enziminin yüksek katalitik etkisi nedeniyle hücrelerde süperoksit birikimine izin verilmez. Ancak çeşitli durumlarda süperoksit yapımının artmasıyla süperoksitde özgü tepkimeler görülmeye başlar. Süperoksit radikali, metal iyonlarını indirgeyerek bağlı olduğu proteinlerden salınışına neden olabilir. Demir (III)'ün demir (II)'ye indirgenmesi Fenton reaksiyonunu hızlandırmaktadır (5). H₂O₂ zayıf bir oksidan ve geçiş metali iyonları yokluğunda nispeten kararlı olan zayıf bir indirgen maddedir (6). Hidrojen peroksit bir serbest radikal değildir; fakat ROS olarak kabul edilir. Yüksek konsantrasyonlarda güçlü oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına yol açarak zararlı etki gösterebilir. H₂O₂ serbest radikal biyokimyasında önemli bir bileşiktir ve çok kolay bozular. Özellikle geçiş metal iyonların (Demir (Fe), Bakır

(Cu), Çinko (Zn), Nikel (Ni), Mangan (Mn), Kobalt (Co), Kurşun (Pb) vb.) varlığında en reaktif ve hasar verici ROS olan hidroksil radikali ($\text{OH}\bullet$) üretilir (7). Hidroksil radikali kaynağı büyük olasılıkla Haber-Weiss reaksiyonudur. $\text{O}_2\bullet^-$ radikali hücrel Fe^{3+} ' ü Fe^{2+} 'ye indirger. Bu şekilde Fe^{2+} ve hidrojen peroksit arasında Fenton reaksiyonunu başlatır (8).

ROS, genomik dengesizliğe, düzensiz kopyalamaya, mitojenik iletim sinyallerine ve yanlış çoğalmaya devamlı yöneltebilen, mitojen hücrelerin (çoğalma, büyüme, hayatta kalma, apoptoz ve yayılma) sürecinin ayarlanmasına sorumlu genlerinin bozulmasına neden olabilir. Bütün bu değişiklikler kanser riskini arttırmaktadır. Serbest radikallerin yararlı ve zararlı etkileri arasındaki hassas bir denge çok önemlidir. Bu denge "redoks düzenleme" olarak adlandırılan mekanizmalar ile elde edilir. Redoks düzenlemesi, yaşayan organizmaları çeşitli oksidatif streslerden korur. Organizmalar oksidatif stres'e karşı katalaz (CAT), süperoksid dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPX) gibi antioksidan enzimlerin interaktif bir ağı vasıtasıyla korunmaktadırlar. Bu enzimler reaktif tehlikeli oluşumları oksijen ve suya ayrıştırırlar. Bu şekilde bir hücreden stres verici durumları uzaklaştırabilirler. Ürik asid, askorbik asid, α -tokoferol ve ubiquinal gibi bazı nonprotein moleküllerde antioksidant sistem içinde kabul edilirler (9,10).

Antioksidan enzimlerin etkinliğindeki azalmalar, diabet, kanser ve yaşlanma gibi pek çok patolojik süreçle ilişkilidir (11). Antioksidant enzimler arasında SOD savunmada önemli bir antioksidan olarak sayılmıştır (12). SOD, süperoksidi hidrojen perokside dönüştürür. CAT, Hidrojen peroksidi çözeltisini su ve oksijene katalize eder ve bu şekilde yüksek ROS seviyelerinden hücrenin zarar görmesini engeller. GPXs, glutatyonun organik peroksidlerini ve hidrojen peroksidlerini azaltan selenoproteinlerdir (13). SOD, reaktif süperoksid'in iyonun dismutasyonunu O_2 (oksijen)e ve H_2O_2 reaktif türlerine katalize eden bir enzimdir. Peroksidler, CAT, GPX enzimleri reaksiyonlardan tahrip olabilirler (14). İnsanlarda üç sod türü mevcut: sitozolik CU/ZN-SOD, mitokondrial MN-SOD ve ekstra hücrel SOD (EC-SOD). SOD1 geni 21p22.11 kromozonunda lokalize edilmiştir, SOD1 geninde tanımlanmış olan 251A/G varyasyonu (rs2070424) en çok araştırılan SOD1 varyasyonlarından biridir (15). Glutatyon peroksidaz, yapısında selenyum bulunan bir peroksittir. Bu enzimin, dört alt birimde, enzim aktivitesi için önemli olan bir radikal seleno-cistein (sec) içerir. GPX (80kda),

glutasyon (gsh) kullanarak hidroperoksidin azalmasını katalize eder. Bu şekilde oksidatif hasara karşı hücreleri korur. Onların mevcudiyeti her yerde bulunmasına rağmen izoformların herbirinin seviyesi dokuların türlerine bağlı olarak değişir. Sitozolik ve mitokondrial glutasyon peroksidaz, hidroperoksidlerin yağlı asitlerini ve glutasyonun harcamasında H₂O₂'yi azaltır. GPX, hidroperoksidleri azaltan ve hidrojen peroksidlerini suya dönüştüren antioksidan enzimlerinin bir başka önemli ailesini oluşturur. İnsanlarda bulunan 8 tane gpx enzim alt grubu bulunmakta ve bazıları selenyum içermektedir. GPXs'in hücre içi patolojik süreçlerinin önlenmelerine önemli bir rol oynadıkları bilinmektedir. Glutasyon peroksidazın, apoptozun önlenmesine, zehirlere karşı savunmaya ve DNA hasarlanmalarının azalmasına neden olduğuna dair çalışma sonuçları bulunmaktadır (16). Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, GPX1 ve GPX2 genlerinde oluşan delesyon ve diğer varyasyonların kanser tiplerinin duyarlılığını artırdığına dair sonuçlar elde edilmiştir. GPX enziminin tümör gelişimine ve metastaza karşı koruyucu olduğuna dair sonuçlar bulunmaktadır. GPX'in etkinliğinin, servikal, meme, gastrit, tiroid, kolon, prostat kanseri gibi bir çok kanser türünde azaldığına dair çalışma sonuçları belirlenmiştir (17). GPX1 geni 3p21.3 kromozonunda lokalizedir. Daha çok, GPX genlerinin fonksiyonel genetik değişikliklerinin kanser risk duyarlılığına katkı sağlayabileceğini düşünülmektedir. GPX'in izoenzimlerinin değişik yoğunluğu farklı hücreler ve dokular vasıtasıyla değişmesine rağmen, GPX1 geninde fonksiyonel polimorfizmlerin, karsinogenez riskini değiştirebildiği bildirilmiştir. Moscow ve arkadaşlarının çalışmasında, GPX geninde 198 (GPX1-593C/T, rs1050450, pro 198leu) pozisyonunda prolin (pro) için lizin (leu) değişimini belirlemiştir (18). Katalaz, tetrahedral yapıda, bir alt birim için sadece bir ferriprotopofirin, bir alt birim 60kda'dan organize edilen, 240kda luk bir enzimdir . CAT, su ve moleküle oksijen oluşturmak için H₂O₂ ile çok verimlilikle hareket eder. CAT geni 11p13.31 kromozonunda lokalize edilmiş ve 13 ekzon içerir. 21. kodonunda A'dan T'ye değişikliğini içeren CAT geninin promoter bölgesinde oluşan ve yaygın görülen bir varyasyondur (19). SOD1-251A/G (rs2070424), CAT-21A/T (rs7943316) ve GPX1-198C/T (rs1050450) polimorfizleri (20). SOD, CAT VE GPX enzimlerinin etkinliğinin azalmasına ve bu sebepten dolayı ROS'un detoksifikasyonunun azalmasına neden olmaktadır. ROS'a karşı hücreyi koruyan antioksidan enzimleri kodlayan genlerdeki varyasyonlar, ROS türlerinin sebebiyet verdiği başta kanser olmak üzere bir çok hastalığının riskinin arttırabilmektedir (21).

Toplam antioksidan kapasite tayinleri için CUPRAC ve ABTS/persülfat yöntemleri, serbest radikal tayinleri için de Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler Yöntemi (TBARS) ve N,N-Dimetil-p-Fenilendiamin (DMPD) Yöntemi kullanılmaktadır. TBARS ve N,N-dimetil-p-fenilendiamin: DMPD Yöntemi ile tayin edilen, “Toplam Oksidatif Dönüşüm (TOC)” (TOC, Total Oxidative Conversion) ile aynı ortama eklenen ve “Toplam Antioksidan Kapasitesi (TAC)”, Bakır (II) İndirgeme Esaslı Antioksidan Kapasite, CUPric Reducing Antioxidant Capacity, CUPRAC ve troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi: ABTS/TEAC yöntemleri ile belirlenen antioksidanlar arasındaki olası ilişki araştırılır (22). DMPD ve TBARS yöntemlerinde ise serbest radikal miktarı ortam içindeki antioksidan miktarının artması ile azalmış ve serbest radikallerin miktarını gösteren absorbans değerlerinde de azalma gözlenir. Bu azalma DMPD için neredeyse doğrusal iken TBARS için ise doğrusallıktan sapma gösterir (23). N,N-Dimetil-p-fenilendiamin (DMPD) yöntemi, reaktif oksijen türlerinin ölçümü için kullanılan yöntem daha önce Hirayama ve Unohara tarafından eser miktardaki Fe (III)’ün belirlenmesi için geliştirilmiştir. Yöntem zayıf asidik ortamda N, N-dimetil-p-fenilendiaminin hidrojen peroksit ile oksidasyonu üzerinde demir (III)’ün etkisine dayanmaktadır. Demir (III) burada katalizör olarak görev almaktadır. Reaksiyon katalitik demir olmadan çok yavaş gerçekleşir. Reaksiyon sonucunda iki tane koyu pembe renkte DMPD’nin yarı kinon (DMPDQ) türevleri oluşmakta ve kinon radikali olarak adlandırılmaktadır. Reaksiyon sonucunda 514 ve 550 nm dalgaboylarında, oluşan DMPDQ’dan kaynaklanan iki absorpsiyon piki gözlenmektedir. Reaksiyon sonunda oluşan ürün 514 nm’de spektrofotometrik olarak takip edilir. TBARS testi lipit peroksidasyonu sonucunda oluşan malondialdehit (MDA) ölçümüne dayanır. TBARS testi biyolojik sistemlerde ve gıdalarda lipit peroksidasyonunu değerlendirmek için en sık kullanılan ve bilinen en eski testlerden biridir, son zamanlarda kompleks biyolojik metaryallerde uygulanması artmıştır. Oluşan hidroksil radikali deoksiriboza hidrojen çıkarma mekanizması yoluyla saldırarak TBA reaktif maddeler (TBARS) açığa çıkartır. TBARS denemesinde Fenton reaksiyonuyla üretilen hidroksil radikallerinin 37°C’lik inkübasyon sırasında dedektör molekül deoksiriboza saldırması sonucunda oluşan malondialdehit düşük pH da ısıtıldığında iki molekül TBA ile reaksiyona girerek kromojen ürün (TBA2-MDA) oluşturur. Renk gelişimi reaksiyon karışımına trikloroasetik asitin (TCA) sulu çözeltisi ve bunu takiben sodyum hidroksitte hazırlanmış tiyobarbitürik asit çözeltisinin eklenmesiyle meydana gelir.

Reaktifler iyice karıştırıldıktan sonra tüpler 10-15 dakika 100°C'de (kaynar su banyosunda) bekletilir ve sonra soğutulur. Pembe TBA ürününün ($\lambda_{max} = 532 \text{ nm}$) absorbansı suya karşı ölçülür. Reaksiyon karışımına hidroksil radikal süpürücü bileşik eklendiğinde hidroksil radikalleri için deoksiriboz ile yarışır ve deoksiriboz bozunmasını azaltır (24) Antioksidan kapasite tayin yöntemlerinden TEAC (Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) Metodu 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) (ABTS) bileşiğinden radikal katyonu oluşturarak, bu katyonun antioksidanlar tarafından inhibe edilmesi yöntemine dayanmaktadır. ABTS radikali, H₂O₂ ve HRP (Horse Radish Peroksidaz) varlığında enzimatik sistemlerde oluşturulabilir. Bu ABTS radikali (ABTS+.); renklidir, oda sıcaklığında kararlı olmasına rağmen 35 °C'nin üzerinde ve pH 7,5 üzerinde kararsızdır. Re ve arkadaşları tarafından modifiye edilmiş ve geliştirilmiş yönteminde potasyum persülfatla ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat))'nin oksidasyonu sonucu üretilen ABTS.+ radikal katyonları kullanılır (25). CUPRAC (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite) Yönteminde Cu (II) klorür çözeltisi, neokuproin (Nc) çözeltisi ve amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, üzerine tayin edilecek herhangi bir antioksidan çözeltisi (direkt veya asit hidrolizi sonunda) ilave edilmesi ve bunu takip eden 30 dakika sonunda içerisinde antioksidan bulunmayan referansa karşı 450 nm'de absorbans değerlerinin ölçülmesinden ibarettir. Antioksidan bileşiklerin (AOx) yükseltgenmesi reaksiyonunda antioksidan bileşikler aynı zamanda indirgen maddeler olduklarından, kromojen bir oksidasyon aracı olan Cu (II)-Nc reaktifini indirgemektedirler. Bakır (II)-neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) reaktifi (Cu (II)-Nc) kullanılarak polifenolik bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin tayini için geliştirilen spektrofotometrik CUPRAC yöntemi antioksidan bileşikler varlığında Cu (II)-Neokuproin kompleksinin renkli Cu (I)-Nc kelatına indirgenmesi ve bu kelatın maksimum ışığı soğurduğu 450 nm'de absorbans değerlerinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır (26).

SOD, CAT VE GPX enzimlerinin etkinliğinin azalmasına ve bu sebepten dolayı ROS'un detoksifikasyonunun azalmasına neden olmaktadır. ROS'a karşı hücreyi koruyan antioksidan enzimleri kodlayan genlerdeki varyasyonlar, ROS türlerinin sebebiyet verdiği başta kanser olmak üzere bir çok hastalığının riskinin arttırabilmektedir (21).

Çalışmamızda , akciğer kanserli hastalarda SOD, CAT VE GPX enzimlerinin etkinliğinde değişikliklere sebep olabilecek SNP lerle, hasta serumlarında DPMD, ABTS, TBARS ve CUPRAC metodlarıyla tayin edilecek oksidan-antioksidan sistemle ilgili verilerin, hastalığın etyopatogenezi ve prognozundaki olası etkileri hakkında bilgiler edinilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. AKCİĞER KANSERİ

2.1.1. EPİDEMİYOLOJİ

Akciğer kanseri sigara içme alışkanlığındaki artışla orantılı olarak 20. yüzyılın başlarındaki yaygınlığına oranla giderek artmıştır ve dünyada en sık görülen kanser türü olarak nitelendirilmiştir.

Tahmini Vaka

		Erkek	Kadın		
241,740	29%	Prostat	Meme	226,870	29%
116,470	14%	Akciğer & bronşlar	Akciğer & bronşlar	109,690	14%
73,420	9%	Kolon & rektum	Kolon & rektum	70,040	9%
55,600	7%	Mesane	Rahim Ağzı	47,130	6%
44,250	5%	Melanom cilt kanseri	Tiroid	43,210	5%
40,250	5%	Böbrek & renal pelvis	Gırtlak & ağız kanseri	32,000	4%
38,160	4%	Non-Hodgkin lenfoma	Non-Hodgkin lenfoma	31,970	4%
28,540	3%	Gırtlak & ağız kanseri	Böbrek & renal pelvis	24,520	3%
26,830	3%	Lösemi	Ovaryum	22,280	3%
22,090	3%	Pankreas	Pankreas	21,830	3%
848,170	100%	Tümü	Tümü	790,740	100%

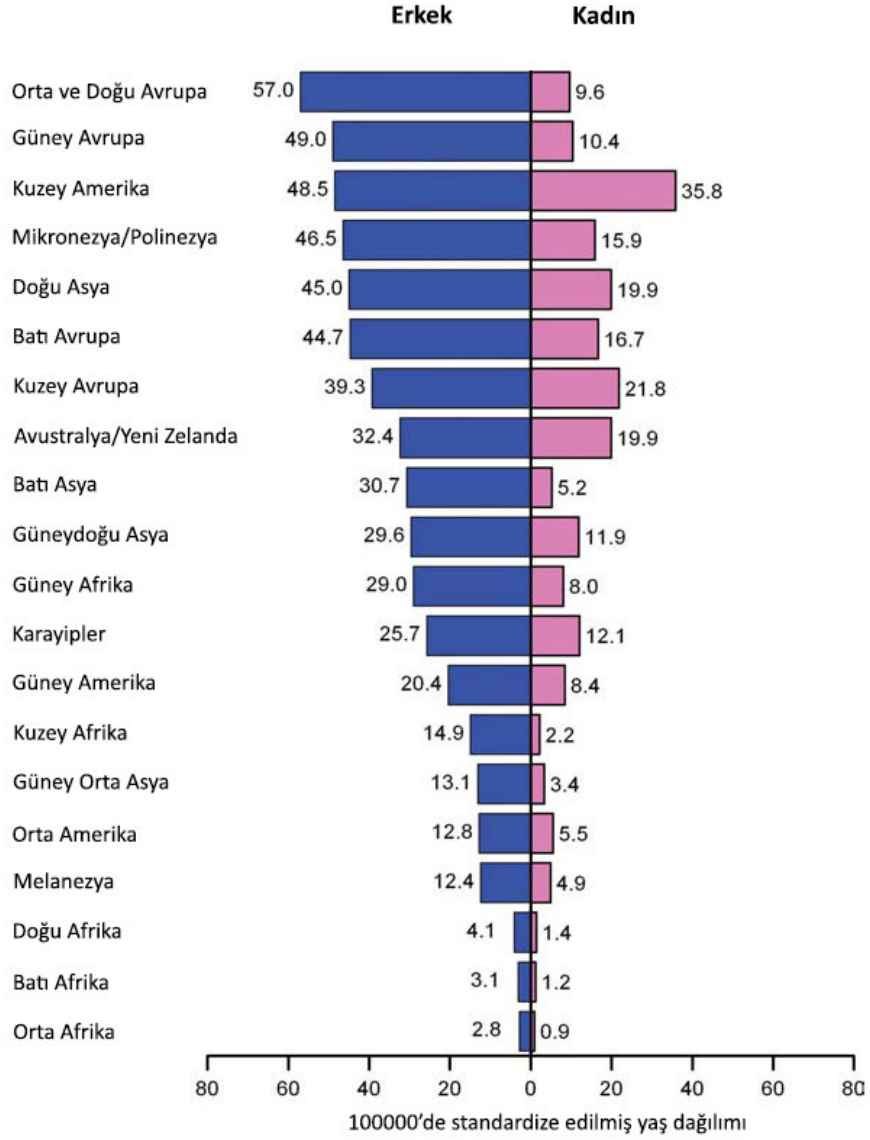
Tahmini Ölüm

		Erkek	Kadın		
87,750	29%	Akciğer & bronşlar	Akciğer & bronşlar	72,590	26%
28,170	9%	Prostat	Meme	39,510	14%
26,470	9%	Kolon & rektum	Kolon & rektum	25,220	9%
18,850	6%	Pankreas	Pankreas	18,540	7%
13,980	5%	Karaciğer & intrahepatik safra kanalı	Ovaryum	15,500	6%
13,500	4%	Lösemi	Lösemi	10,040	4%
12,040	4%	Özofagus	Non-Hodgkin lenfoma	8,620	3%
10,510	3%	Mesane	Rahim Ağzı	8,010	3%
10,320	3%	Non-Hodgkin lenfoma	Karaciğer & intrahepatik safra kanalı	6,570	2%
8,650	3%	Böbrek & renal pelvis	Beyin & diğer sinir sistemi	5,980	2%
301,820	100%	Tümü	Tümü	275,370	100%

Şekil 2-1: Dünya sağlık örgütü 2008 yılı cinsiyete göre kanser nedenli tahmini ölüm ve oranları (27)

1950 yılına kadar yapılan olgu kontrol çalışmalarında sigara içiminden kaynaklanan etkinin fazla olduğu epidemiyolojik araştırmalarla gösterilmiştir. Sigaranın akciğer kanserinin gelişimine sebep olduğu yönündeki ilk yayın 1962 yılında yayınlanmıştır. Akciğer kanseri önlenebilen bir hastalıktır (28). Akciğer kanseri dünyadaki kanser olgularının %12.8 ini, kanser ölümlerinin ise %17.8 ini kapsar (29). Akciğer kanserli olguların tanı sonrası yaşam süreleri 1974-1976 yılları arasında %12 iken, 1992-1997 arasında bu oran %3 artarak %15 e çıkmıştır (30).Cinsiyet, yaş, ırk, meslek, diyet, hava kirliliği, radyasyon, geğirilmiş akciğer hastalığı sonrasında ortaya çıkan patolojik değişimler, viral enfeksiyonlar, genetik ve immünolojik faktörlerin tümünün akciğer kanseri gelişimine etkisi % 6'dır (31).

Akciğer kanseri insidansı yaşla artmaktadır. 60-70 yaşlarındaki bireylerin akciğer kanseri olma sıklığı hızlı bir artışla çok yüksek düzeydedir. 50 yaş altında sıklığı daha azdır. (% 5-10 dolayında) (28,31).



Akciğer kanseri oluşan bu bireylerin ailelerinde de genellikle bir akciğer kanseri öyküsü vardır ve adenokanser en sık gözlemlenen kanser tipidir (28).

Ancak ülkemizde gençlerde adenokanser yaşlılara göre daha fazla izlenmekle birlikte en sık izlenen kanser tipi skuamöz hücreli kanserdir (33). Ülkemizdeki akciğer kanseri özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan ulusal, hastane bazlı geriye dönük çalışmada, 11849 akciğer kanserli olgunun % 90,4'ü erkek, % 9,6'sı kadın olup, olgular büyük oranda (% 56,7) 46-65 yaşları arasında yer almaktadır. Olguların yaklaşık % 90'ında sigara kullanma öyküsü saptanmıştır (%77,9 aktif sigara içici, % 10,8 sigarayı bırakmıştır (34). Kanserli hastaların birinci derece yakınlarında akciğer kanseri riski 2,4 kat artmaktadır (35). Dünya Sağlık Örgütü 2008 raporunda akciğer kanserine bağlı ölümlerin oranı erkeklerde % 29,3, kadınlarda % 11'dir (36).

Akciğer kanseri insidansı ülkemizde Sağlık Bakanlığı'nın bütün sağlık kuruluşlarında tanı koyulmuş olgularının kaydedildiği pasif kanser kayıtlarına göre 11.5/100.000'dir (37). Akciğer kanserli olguların büyük bir çoğunluğu ileri evre olan Evre IV ya da lokal ileri evre olan Evre IIIA ve IIIB'de saptanmaktadır. Bu olguların %70'i radikal bir tedavi yöntemi olan cerrahi şansına sahip olamamaktadır (28). Ülkemizde bu oran daha yüksektir ve olguların % 86,7'si ileri evrede yer almaktadır (38).

Table 2-1 Akciğer kanserli hastaların tanı anındaki evrelere göre dağılımı (38).

EVRE	%
Evre I	5.6
Evre II	7.7
Evre IIIA	14.2
Evre IIIB	32.1
Evre IV	40.4

2.1.2. ETİYOLOJİ

Akciğer kanserinde sigara en yüksek risk faktörünü oluştururken sigara dışında , hava kirliliği gibi çevresel faktörler, mesleki karsinojenler, diyet, viral enfeksiyonlar, geçirilmiş akciğer hastalıkları, genetik ve immünolojik faktörler de diğer önemli etiyolojik faktörleri oluşturmaktadır (39,40). Akciğer kanseri hastalarının yaklaşık %90'ından fazlasının sigara kullandığı saptanmıştır (41).

Sigara içenlerde akciğer kanseri riski 20-30 kat daha fazla olup bu oran pasif içicilerde ise %3.5'tur (39,40). Sigara dumanında prokarsinojenik olarak tanımlanmış N-nitrozami, poliklinik hidrokarbonlar ve radyoaktif özellikte olan radon, kurşun, bismut ve polonyum gibi karsinojenler yer almaktadır.İçilen sigara miktarı, sigara içim süresi, inhalasyon derecesi, sigara başlama yaşı ve sigara dumanına maruziyet gibi etkenler de bu riski artıran nedenler arasındadır (42). Erken evrede tanısı yapılan akciğer kanserli bireylerde sigarayı bırakmanın ohastalığın prognozu üzerinde olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir.

Akciğer kanseri hastalarının ortalama yaşı 50-70 arasında olup artan yaşla birlikte hastalığın insidansı artmaktadır. Yapılan kohort çalışmalarıyla hastalığın erkeklerde daha sık görüldüğü buna ek olarak etnik ve irksal farklılıkların da hastalığın etiyolojisinde önem rol oynadığı saptanmıştır (43). Asbest, radon, arsenik maruziyeti, diklorometil eter, krom, formaldehit, nikel önemli mesleki ve çevresel karsinojenleri oluşturmaktadır. Kimyasala maruz kalma oranı, süresi ve kimyasal içeriği akciğer kanseri oluşma olasılığını etkilerken erkeklerde %15, kadınlarda %5 oranında mesleki maruziyet sorumlu tutulmuştur (44).

Beslenme ile ilişkili olarak Vitamin A ve beta karotenden fakir beslenmenin hayvan modellerinde akciğer kanseri riskini artırdığı saptanmıştır. İnsanlardaki çalışmalarda da diyetin de betakaroten/retinol miktarı yüksek olanlarda akciğer kanseri riskinin %40 azaldığını tespit etmiştir. Ayrıca yüksek yağlı diyetle beslenen sigara içicilerinde kanser riski daha yüksek olmakla birlikte, sarı-yeşil sebze ve meyvelerin yeterli alımı riski azaltmaktadır.

Sosyoekonomik durumu kötü olanlarda akciğer kanseri riski 2-6 kat artmaktadır ve bu durumun, grubun etyolojideki faktörlere daha fazla maruziyeti nedeniyle oluştuğu düşünülmektedir (45). Geçirilmiş akciğer hastalıklarının da kanser riskini arttırdığı

bilinmektedir. Sarkoidozda akciğer kanseri gelişim riski 3 kat fazla bulunurken Tüberküloza bağlı skar mevcudiyetinde bu riski 8 kat artırmaktadır. Sistemik sklerozda da risk yüksektir. Skar zemininde gelişen akciğer kanserinde özellikle adenokarsinom tipi gelişmektedir (46).

Akciğer kanseri gelişimin kalıtsal olup olmadığı araştırıldığında, birinci derece akrabalarında kanser olanlarda akciğer kanseri riski 2.4 kat artmış bulunmuştur. Hücre büyümesi ile ilgili işlevleri olan bazı genlerde dış etkenlerle (radyasyon, kimyasal maddeler, virüsler) değişiklik meydana gelerek “onkogen” haline gelmesi karsinogenezde rol oynamaktadır. Bu onkogenlerin en önemli grupları “myc” (C-myc, L-myc, N-myc) ve “ras” (K-ras, H-ras, N-ras) aileleridir. Buna karşılık kanser hastalarının retinoblaston ve p53 geni gibi bazı tümör supresör genlerinde mutasyonlar saptanmıştır. Bu mutasyonlara sSigarada bulunan polisiklik aromatik hidrokarbonların neden olabileceği düşünülmektedir. Hidrokarbonlar DNA bağlarını parçalar, DNA tamir, apopitoz ve hücre döngüsünü ayarlayan p53 geninde mutasyona neden olur. Akciğer kanseri hastalarının p53 geninde %50-70 oranında defekt bulunmuştur (47,48,49).

2.1.3. TNM SINIFLAMASI VE EVRELEME

Tümör evresi, akciğer kanserli olguların uygun şekilde evrelendirme yapılması, tedavi yönteminin seçimi ve hastalığın prognozu açısından önemlidir. TNM sınıflaması tablo 3’de, TNM sınıflamasına göre evreleme ise tablo 4’de belirtilmiştir.

Tanı sonrası evrelendirme yapılması hastalığın prognozu açısından ve tedavi yönteminin seçilmesinde önemlidir. TNM evrelendirme primer akciğer kanseri olan tüm hastalara uygulanabilen bir yöntemdir. TNM evreleme sistemi, primer tümörün büyüklüğü ve yayılımını (T), bölgesel lenf nodu tutulumunu (N), uzak metastaz varlığını ya da yokluğunu (M) gösterir. T, N, M derecelendirmesi sayesinde evre I ila IV arasında genel bir hastalık evresi tespit edilmiş olur.

American Joint Committee on Cancer (AJCC) ve Union for International Cancer Control (UICC) tarafından uluslararası akciğer kanseri evreleme sistemi yeniden revize edilerek 2010 yılında kabul edilmiştir (50).

Table 2-2: TNM Değerlendirmesi (T Faktörü; Primer Tümör Değerlendirmesi)

T_x	Primer tümörün belirlenememesi. Balgam veya bronş lavaj sıvısında malign hücreler görülmesine rağmen radyolojik veya bronkoskopi ile tümörün saptanamaması.
T₀	Primer tümör belirtisi yok
T_{is}	In situ karsinom
T₁	En geniş çapı ≤ 3 cm olan, Akciğer veya visseral plevra ile çevrili, bronkoskopik olarak lob bronşundan daha proksimale (ana bronşa) invazyon yapmayan tümör ¹
T_{1a}	Tümör en büyük çapı ≤ 2 cm
T_{1b}	Tümör en büyük çapı > 2 cm fakat ≤ 3 cm
T₂	Tümörün en geniş çapı >3 cm ancak ≤ 7 cm veya aşağıdaki özelliklerden birini içeren tümör: <ul style="list-style-type: none"> • Ana bronşa invaze ancak ana karinadan ≥ 2cm mesafede • Visseral plevra invazyonu, • Hiler bölgeye uzanarak tüm akciğeri tutmayan atelektazi veya obstrüktif pnömoniye neden olması
T_{2a}	Tümör en büyük çapı > 3 cm fakat ≤ 5 cm
T_{2b}	Tümörün en geniş çapı >5 cm ancak ≤ 7 cm.
T₃	Tümörün en geniş çapı >7 cm veya herhangi bir büyüklükte; göğüs duvarı (superior sulkus tümörleri dahil), diyafragma, frenik sinir, mediastinal plevra veya parietal perikarddan herhangi birine invaze veya karinaya <2 cm yakın fakat karinayı invaze etmeyen ana bronştaki tümör veya bütün bir akciğerde atelektazi ya da obstrüktif pnömoniye neden olan tümör veya tümör ile aynı lobda ayrı bir tümöral nodül (ler).
T₄	Herhangi bir büyüklükte; mediasten, kalp (myokard), büyük damarlar, perikard içi pulmoner arter ve ven tutulumu, trakea, reküren laringeal sinir, özofagus, vertebra korpusu, trakeal karinadan herhangi birine invaze tümör veya tümörle aynı akciğerde farklı bir lob içerisinde tümöral nodül (ler) bulunması.

Table 2-3 TNM değerlendirmesi (N Faktörü; Bölgesel Lenf Nodu değerlendirme)

N_x	Bölgesel lenf nodlarının değerlendirilememesi
N₀	Lenf nodu metastazı yok.
N₁	Aynı taraf peribronşiyal ve/veya aynı taraf hiler lenf bezlerine metastaz ve primer tümörün direkt yayılması ile intrapulmoner bezlerin tutulması.
N₂	Aynı taraf mediastinal ve/veya subkarinal lenf nod (lar)una metastaz.
N₃	Karşı taraf mediastinal- hiler, aynı veya karşı taraf skalen veya supraklavikuler lenf nodlarına metastaz.

Table 2-4 TNM değerlendirmesi (M Faktörü; Uzak Metastaz Değerlendirme)

M_x	Uzak metastaz varlığının değerlendirilememesi.
M₀	Uzak metastaz yok
M₁	Uzak metastaz var.
M_{1a}	Karşı akciğerde tümöral nodül (ler), plevral nodüller veya malign plevral (veya perikardiyal) effüzyon ile birlikte olan tümör.
M_{1b}	Uzak metastaz

Table 2-5 Evre gruplandırılması

Okült karsinoma	TX	N ₀	M ₀
Evre 0	T _{is}	N ₀	M ₀
Evre IA	T _{1a,b}	N ₀	M ₀
Evre IB	T _{2a}	N ₀	M ₀
Evre IIA	T _{2b}	N ₀	M ₀
	T _{1a,b}	N ₁	M ₀
	T _{2a}	N ₁	M ₀
Evre IIB	T _{2b}	N ₁	M ₀
	T ₃	N ₀	M ₀
Evre IIIA	T _{1a,b} , T _{2a,b}	N ₂	M ₀
	T ₃	N ₁ , N ₂	M ₀
	T ₄	N ₀ , N ₁	M ₀
Evre IIIB	T ₄	N ₂	M ₀
	Herhangi bir T	N ₃	M ₀
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M ₁

2.2. OKSİDATİF STRES VE KANSER

Akciğer kanser genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin birlikte rol aldığı multifaktöriyel bir hastalıktır (51). Oksijenli solunum yapan organizmalarda doğal olarak oluşan reaktif oksijen türlerinin artışına bağlı olarak antioksidan sistemin yetersiz kalması sonucu oksidatif hasarın oluşmasının da kanser oluşum mekanizmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (52). Birçok faktöre bağlı olarak oluşan oksidanların antioksidan mekanizma tarafından elimine edilememesi DNA'da mutasyonların oluşmasına neden olur. Biriken mutasyonlar DNA hasarı oluşturmakla birlikte tümör baskılayıcı genlerin, onkogenlerin ve hücre büyümesi ve farklılaşmasında görev alan genlerin ekspresyonunda değişikliklere neden olur (54,55). Çeşitli kanser türlerinde yapılan çalışmalarda serbest radikallerin ve antioksidan sistemde görev alan birçok enzimde meydana gelen fonksiyon bozuklukları tümör oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (56).

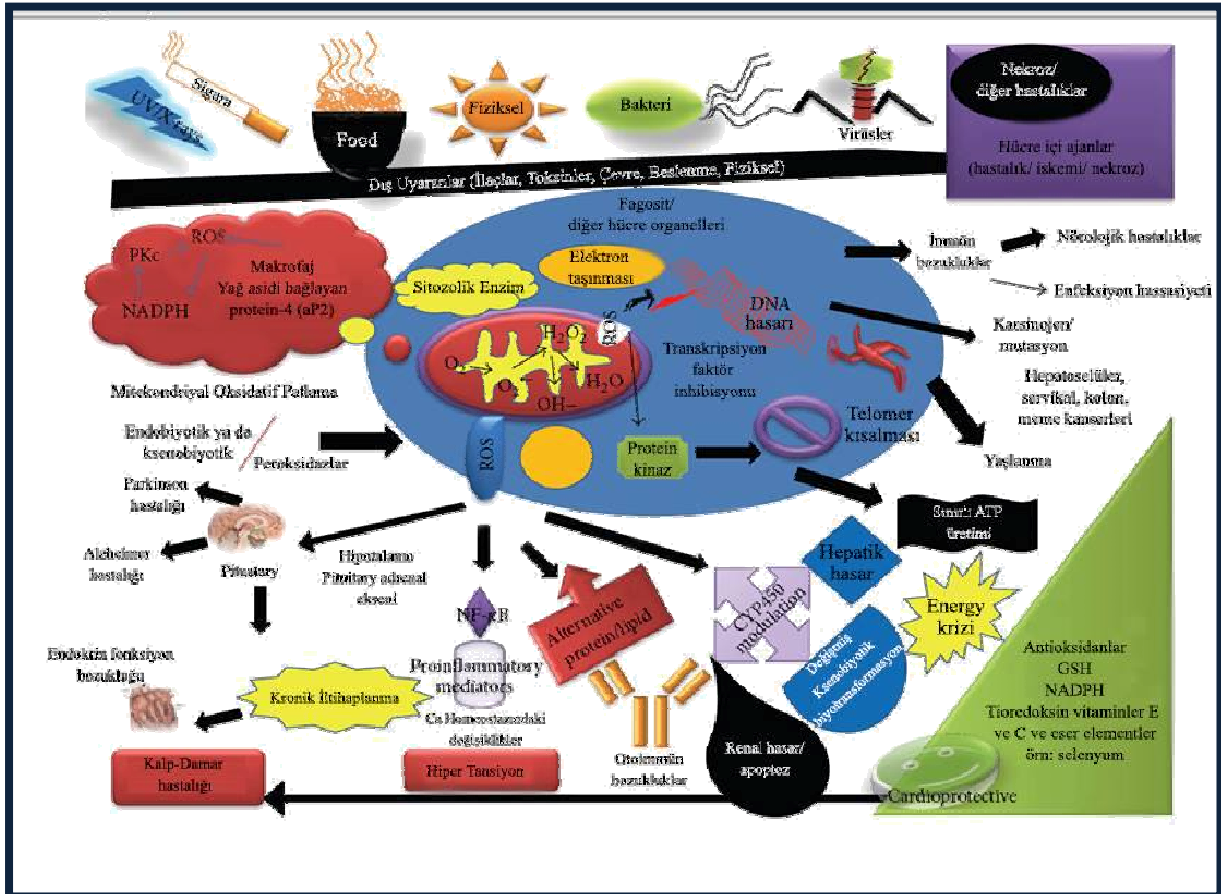
Buna ek olarak son yapılan akciğer kanseri genomik analizleri göstermiştir ki genlerdeki yüksek mutasyon frekansı endojen bir antioksidan programını aktive ederek reaktif oksijen türlerinin miktarını azaltarak tümör gelişimini desteklemektedir (57).

2.2.1. SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulduran kararsız moleküller olarak tanımlanırlar. Stabil olmayan bu moleküller dış orbitallerinde tek elektron buldurmaları nedeniyle reaktif özellik gösterirler (58). Serbest radikaller kovalent bağların homolitik bölünmesi, normal bir molekülün elektron kaybetmesi ya da normal bir moleküle elektron transferi sonucu oluşurlar. Bu reaksiyonlar endojen veya ekzojen kaynaklara bağlı olarak oluşabilir (59,60).

Güneş ışığı, radyasyon, ilaçlar, atmosferdeki hava kirleticiler, diyet ürünleri ve diğer çevresel faktörler ekzojen kaynaklara örnek verilebilir. Endojen kaynaklı serbest radikaller ise inflamasyon esnasında nötrofil ve makrofajlar tarafından üretilenler, metal katalizli reaksiyonların ürünü olarak ortaya çıkabilirler veya mitokondri-katalizli reaksiyonların yan ürünü olarak meydana gelebilirler (61,62,63).

Organizmada biyolojik önemi olan serbest radikaller başta oksijen türevli olmak üzere karbon merkezli (peroksil, alkoksil), azot merkezli (nitrik oksit) ya da kükürt merkezli olabilir (64,65,66).



Şekil 2-2: Oksidatif stress Mekanizması ve Etkileri

Table 2-6 Biyolojik öneme sahip Serbest radikaller, Azot ve Oksijen Türevleri

Radikaller		Radikal olmayan O ₂ türevleri	
Hidroksil	OH [•]	Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂
Alkoksil	RO [•]	Singlet oksijen	O [•]
Peroksil	ROO [•]	Ozon	O ₃
Süperoksit	O ₂ ^{•-}	Hipoklorid asit	HOCl
Nitrik oksit	NO [•]	Lipit hidroperoksit	L (R)OOH [•]
Azotdioksit	NO ₂ [•]	Peroksinitrit	ONOO ⁻

2.2.1.1. Reaktif Oksijen Türleri

Oksijenden türevlenen serbest radikallere reaktif oksijen türleri adı verilir. Reaktif oksijenlerin önemli bir kısmı mitokondrial elektron transport sisteminde oksijenin 4 elektron alarak suya indirgenmesi sırasında gerçekleşir. Moleküler oksijen bir elektron alarak süper oksit radikaline (O₂[•]), iki elektronla hidrojen peroksite (H₂O₂), üç elektronla hidroksil radikaline (OH[•]) ve son olarak 4 elektronla en son su molekülüne (H₂O) indirgenir. Oksidatif metabolizma sonucu oluşan moleküler oksijenin büyük bir kısmı bu yolla suya indirgenirken çok az bir kısmı reaktif oksijen türlerine dönüşür (67,68).

Hem oksidan hem indirgen bir molekül olan süper oksit radikali çok zararlı olmasa da H₂O₂ nin kaynağı olması ve geçiş metallerini indirgeyebilme yeteneğinden dolayı hücre için oldukça önem taşımaktadır. Lipid membranın geçirgenliğini azaltan süper oksit radikali üretildiği yerde kalırken, hidrojen peroksit molekülü yapısındaki su molekülünden dolayı hücre membranından kolayca geçebilmektedir. H₂O₂, zayıf indirgeyici özellik gösterse de ortamdaki geçiş metalleriyle indirgenildiğinde (Fenton reaksiyonu) ya da süperoksit radikali ile reaksiyonu (Haber-Weiss) sonucunda, hücre için oldukça tehlikeli olan hidroksil iyonunun oluşmasına neden olur. Bu iki reaksiyonda geçiş metali olan demir önemli rol oynar. Oluşan hidroksil iyonu ise oldukça oksidan bir molekül olup lipid, protein ve nükleik asitler dahil bir çok biyolojik molekülü okside edebilir. Özellikle hücre zarının yapısında bulunan lipid ve proteinlere hasar vererek hücre fonksiyonlarının bozulmasına neden olur (58,69,70,71). Singlet

oksijen ise radikal olmayan bir reaktif oksijen türüdür. Bunların dışında organik peroksitler (ROOH^\bullet), alkoksi (RO^\bullet) ve hidroperoksil (ROO^\bullet) reaktif oksijen türlerinin diğeri bir grubunu oluşturur (64).

Serbest Radikallerin Hücre ve Hücre Yapılarında Meydana Getirdiği Hasarlar

Lipit peroksidasyonu oluşması

Lipit ve proteinlerle kovalent bağ oluşumu

Zar proteinlerinde hasar, Protein agregasyonu ve çapraz bağlanmalar

Zarın yapısında ve işlevinde değişim

Hücre tiyol/disülfid oranının değişimi

Proteinlerin tiyol gruplarında hasar ve buna bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarında bozulma

Elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipoksigenaz, siklooksigenaz, ksantinoksidaz gibi litik enzim aktivitelerinde değişimler

Nükleotid yapılı koenzimlerin yıkımı

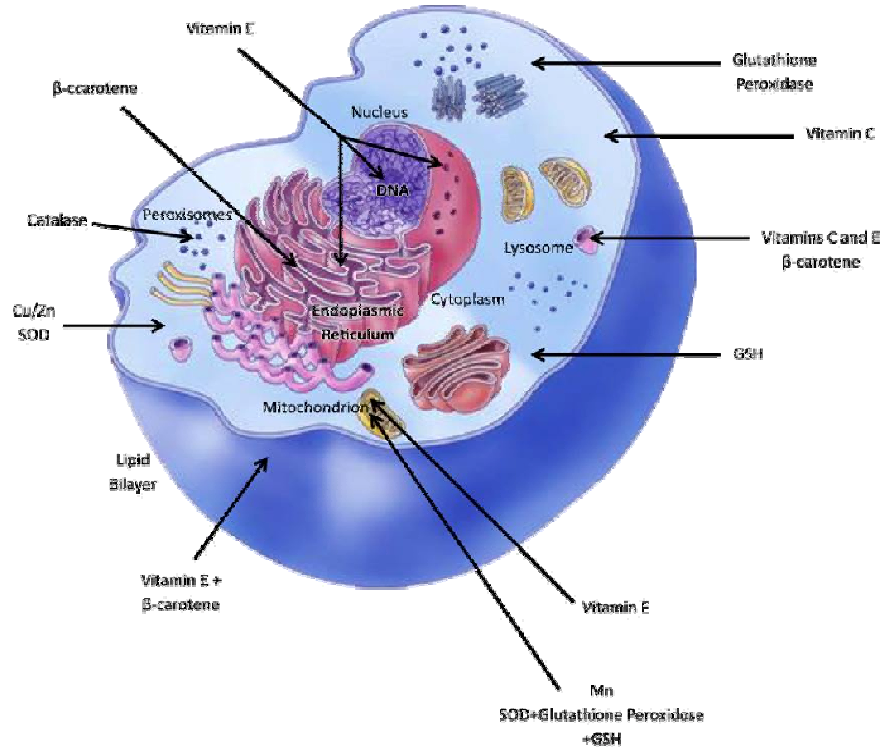
DNA hasarı

Hücre içi K^+ kaybını arttırmaları

Platelet agregasyonunda artma (58,72,73,74,75,21).

2.3. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Canlı organizmada oluşan serbest radikal seviyesini belirli bir düzeyde tutarak birikimini önlemek ve oluşan bu serbest radikallerin oluşturabileceği hasarlardan korunmak için savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bu mekanizmalar 'Antioksidan savunma sistemleri' ya da 'antioksidanlar' olarak bilinir.



Şekil 2-3: Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların hücrede buldukları yerler

Antioksidanlar genellikle yapılarına göre enzimatik ve enzimatik olmayanlar olarak sınıflandırıldıkları gibi bazı kaynaklarda çözünürlüklerine ve yerleşim yerlerine ve kaynaklarına göre farklı şekilde de sınıflandırılırlar (65,76,77).

2.3.1. ANTIOKSİDANLARIN ETKİ ŞEKİLLERİ:

Antioksidanlar etkilerini serbest radikal oluşumunun engellenmesi ya da oluşan serbest radikalin etkisizleştirilmesi şeklinde başlıca 2 şekilde gösterirler.

1- Mekanizma başlatıcı reaktif oksijen türevlerinin uzaklaştırılması, Oksijenin uzaklaştırılması ya da konsantrasyonun azaltılması ve son olarak katalitik metal iyonlarının uzaklaştırılmasıyla serbest radikal oluşumunun engellenmesi gerçekleştirilir.

2- Toplayıcı etki, baskılayıcı etki, onarıcı etki ve zincir kırıcı etki yoluyla serbest radikaller etkisiz hale getirilir. Antioksidanlar toplayıcı etkiyle serbest oksijen radikalleriyle etkileşime girerler ve daha az reaktif moleküllere dönüştürürler. Örnek verecek olursak antioksidan enzimler bu şekilde etkilerini gösterirler. Flavonoidler ve vitaminler gibi antioksidan maddeler ise bastırıcı etkiyle, serbest oksijen radikallerine bir hidrojen ekleyerek aktivite kaybına neden olurlar. Antioksidan sistem enzimleri, yağda ve suda çözünen radikal tutucular ya da metal iyonlarını bağlayan proteinler de onarıcı etkiyle oluşan oksidatif hasarın onarılmasını sağlarlar. Seruloplazmin, hemoglobin, çeşitli mineraller ve vitaminler zincirleme reaksiyon başlatacak olan molekülleri kendilerine bağlarlar ve reaksiyon zincirini kırarak önleyici etki oluştururlar. Bu etki şekli ise zincir kırıcı etki olarak adlandırılır (65,78,79).

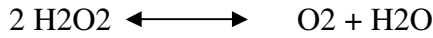
2.3.2. ENZİMATİK OLMAYAN ANTIOKSİDAN SİSTEMLER

Enzimatik olmayan savunma sistemlerinde başlıca Glutasyon (GSH), A,C,E vitaminleri, selenyum, flavonoidler, albümin, bilirubin görev alır (80). Suda çözünebilir yapıdaki glutasyon; glutamat, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptid olup hücrede en fazla sitozol, mitokondri ve nükleusta yer alan önemli bir endojen antioksidandır (65, 81, 82). Hücre içi glutasyonun önemli bir kısmı indirgenmiş olarak tiyol formundadır (83,84). Okside glutasyon ise glutasyon disülfid (GSSG) formundadır. Antioksidan etkiden sorumlu en önemli kısmı bu sülfidril grubudur. GPX için kofaktör görevi yaparken aynı zamanda aminoasitlerin hücre içerisine taşınmasını ve biyolojik zarlardaki doymamış yağ asitlerinin oksidatif hasara karşı korunmasını da sağlamaktadır (79,85,86).

2.3.3. ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR

2.3.3.1. KATALAZ

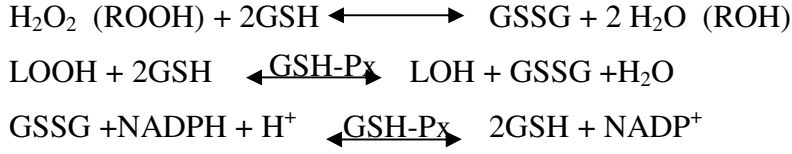
Katalaz enzimi ilk olarak 1937 yılında Sumner ve Dounce tarafından sığır karaciğerinden izole edilmiş molekül ağırlığı 240kDa olan bir hemoproteindir. Yapısında dört hem grubu (Fe⁺³-protofilin) bulunup ve her bir alt birimi enzimin kararlılığında rol oynayan NADPH içerir (65,70,77,87). Enzim sitokrom sistemi içeren tüm oksijenli solunum yapan hücrelerde mevcuttur. Hücre içerisinde başta peroksizomlarda olmak üzere sitozolde ve endoplazmik retikulumda bol miktarda bulunur. Çeşitli metabolik reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan H₂O₂'i katalitik aktivitesiyle su ve oksijene indirgeyerek özellikle membranlarda oluşabilecek geri dönüşümsüz hasarı önler. Bir molekül hidrojen peroksiti, elektron verici bir substrat olarak diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir. Dakikada 6 milyon molekül H₂O₂'i su ve oksijene dönüşümünü sağlayan katalaz en yüksek dönüşüm oranına sahiptir (60,21).



Kromozomun 11p13 lokalize, 12 intron ve 13 ekzondan oluşan katalaz geni tarafından kodlanır (88). Gen üzerinde çok sayıda tek nükleotid değişimleri olup bunlardan en çok çalışılan katalaz geninin 262. Pozisyonundaki C→T baz değişimidir. Yapılan çalışmalarda beyaz ırk T allelini taşımanın enzim aktivitesinde düşmeye neden olduğu düşünülmektedir. Buna bağlı olarak C allelini taşımanın reaktif oksijen türlerinin azaltması nedeniyle meme kanserinde %17 oranında koruyucu etki gösterdiği rapor edilmiştir (89).

2.3.3.2. GLUTATYON PEROKSİDAZ

Antioksidan etkili bir enzim olan glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ilk defa Mills tarafından memeli eritrositinden izole edilmiştir (90). Genellikle hücre içinde mitokondri ve sitoplazmada aktivite gösterir. Enzim H₂O₂ in organik peroksitlerin (ROOH) indirgenmesini katalizler ve elektron kaynağı olarak Glutatyonu kullanır. H₂O₂ ve lipid hidroperoksitler indirgenirken, glutatyon GSSG'ye yükseltgenir. Böylece Lipid peroksidasyonun başlaması ve ilerlemesi engellenir (59,91,92).



Selenyum (Se) bağımlı GPx ve Se bağımsız (glutatyon-S-transferaz) olmak üzere 2 formu vardır. Sahip oldukları alt ünite sayıları, selenyuma bağlanma şekilleri ve etki mekanizmalarına ve yerleşim yerlerine göre farklılık göstermektedir. Tetramerik yapıda olan Se bağımlı GPx in herbir alt birimi Se atomu içerir (93).

Table 2-7 GPX alt birimlerinin kodlandığı kromozom bölgeleri

Tipi	Hücredeki Yerleşim yeri	Kromozomdaki Yerleşim yeri	Ekson
GPx I	Sitoplazmik/mitokondrial	3p21.3	2
GPx II	Gastrointestinal	14q24.1	2
GPx III	Ekstrasellüler/Plazma	5q32-33.1	5
GPx IV	Fosfolipit hidroperoksidaz	19p13.3	7

GPx I ve II, GSH'ı kullanarak H₂O₂ ve hidroperoksitleri metabolize ederken, GPx III fosfatidil kolin gibi kompleks lipidlerin hidroperoksitleri metabolizasyonunda rol alır. GPx IV ise diğer glutatyon peroksidazlardan farklı olarak monomerik yapıdadır. Hücre membranında peroksidasyona uğramış olan kolesterol ve fosfolipidleri alkole indirgeyerek E vitamini eksikliğinde membranı peroksidasyona karşı korur (93,94,95).

GPX I genindeki tek nükleotid değişimlerinin kanser, diyabet gibi bazı hastalıklar için risk oluşturabileceği yönünde çeşitli çalışmalar mevcuttur. -592 bölgesindeki A/G değişimi, Ekson I ve II de görülen PolyAla, +2 deki C/T ve -198 C/T değişimi GPX I genindeki önemli polimorfizmlerdir. Ekson 2 de görülen -198 C/T değişimi prolin aminoasitinin lösin aminoasitine dönüşmesine neden olur. Pro198Leu olarak da bilinen bu polimorfizmde CC genotipi: Pro-Pro, CT genotipi: Pro-Leu ve TT genotipi: Leu-Leu olarak tanımlanır.

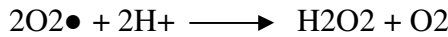
Prolin aminoasitinin lösin aminoasitine değişiminin selenyumun enzime bağlanmasında değişikliğe neden olarak enzim aktivitesinin azalmasında rol aldığı bildirilmektedir. Bu değişim aynı zamanda enzimde konformasyonel değişikliğe neden olduğu ve buna bağlı olarak enzimde fonksiyon bozukluğuna yol açtığı rapor edilmiştir (96,97,98,99).

Yapılan bazı çalışmalarda TT genotipini (Leu/Leu) taşıyan bireylerin kansere yatkın olduğu ileri sürülmüştür. Ratnasinghe ve ark.ın akciğer kanseri bireylerde yapmış olduğu bir çalışmada TT genotipini taşıyan bireylerin CC genotipi taşıyanlardan 2.3 kat kansere yakalanma riski taşıdığını bildirmişlerdir (96).

Meme, mesane ve kolorektal kanser gibi diğer kanser türlerinde yapılan çalışmalarda -198 C/T polimorfizmi ile kanser riski ilişkisi açısından farklı sonuçlar rapor edilmiştir (100,101).

2.3.3.3. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD)

Antioksidan etkisi ilk defa 1969 yılında McCord Fridovich tarafından gösterilen SOD metalloenzim ailesinin bir üyesidir (102), Oksijen kullanımının yüksek olduğu dokularda aktivitesi fazla olmasına karşın hücre dışı alanda oldukça düşük aktiviteye sahiptir. Süperoksit radikallerinin H₂O₂ ve oksijene dönüşümü reaksiyonu kendiliğinden olabildiği gibi SOD enziminin kataliziyle de gerçekleşir. SOD enzimi katalizlemesi sonucu 4000 kat daha hızlı gerçekleşen bu reaksiyon sonucunda membrandan geçemeyen süperoksit radikali, membrandan geçebilen H₂O₂'e dönüşmektedir.

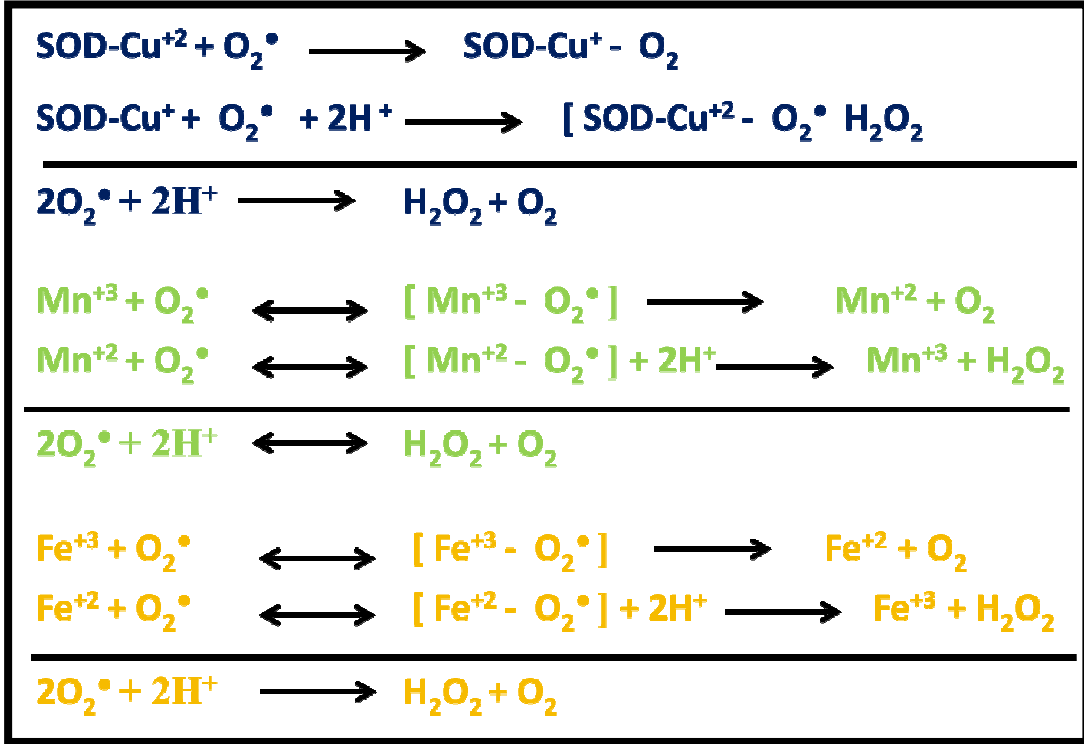


Oluşan H₂O₂ ise metal iyonlarının varlığında oldukça hızlı gerçekleşen Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları sonucu hücrede oksidatif hasar oluşturabilecek son derece zararlı hidroksil radikaline dönüşür. SOD aktivitesi hücre içindeki süperoksit miktarı düşük tutulurken hücre dışında biriken H₂O₂ in etkisinin diğer antioksidan enzimler olan katalaz ve GSH-Px enzimleri sayesinde dengede tutulabileceği düşünülmektedir (103,104,105).

SOD enzimi yapısında bulunan metal iyonlarına göre farklı şekilde isimlendirilirler. Hücredeki dağılım yerlerine, aktif metal kısımlarına ve aminoasit dizilimlerine göre farklılık göstererek prokaryotlarda Mn-SOD ve Fe-SOD, ökaryotlarda ise Mn-SOD, CuZn-SOD ve ECSOD formlarında bulunur (65,106,107).

Table 2-8 SOD enzim formlarına ait genel bilgiler

	SOD1	SOD2	SOD3 (EC-SOD)	Fe-SOD
Metal İyonu	Cu, Zn	Mn (Mangan)	Cu, Zn	Fe
Hücre Tipi	Ökaryot	Ökaryot, Prokaryot	Ökaryot	Prokaryot
Hücredeki Yerleşim yeri	Sitoplazma	Mitokondri	Hücre dışı	-
Molekül Ağırlığı	32kDa	88 kDa	135.000 kDa	41 kDa
Kromozomdaki yeri	21q22.1	6q25	4p-q21	-
Ekson Sayısı	5	5	3	-



Şekil 2-4: MnSOD, CuZnSOD ve FeSOD Enzimlerine Ait Oksidasyon-Redüksiyon Reaksiyonları

Metal iyonlarına göre farklı isimlendirilen SOD'un her formu temelde süperoksit radikalının moleküler oksijene ve hidrojen perokside dönüşümünü kataliz eder ve hücrel kısımlarda süperoksit düzeyinin kontrolünde önemli rol oynar.

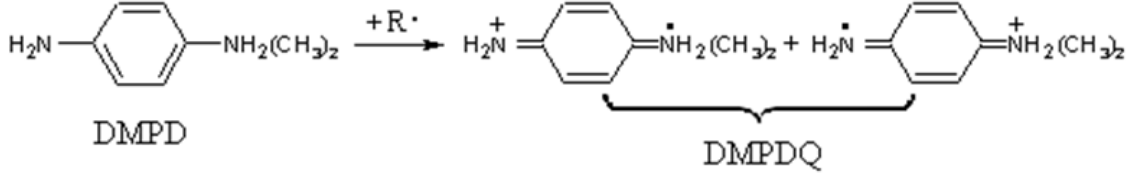
2.4. SERBEST RADİKAL TAYİNİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

2.4.1. N,N-Dimetil-p-fenilendiamin (DMPD) Yöntemi

Bu yöntem reaktif oksijen türlerinin ölçümü için kullanılmaktadır. Hirayama ve Unohara tarafından ilk olarak aslında eser miktardaki Fe (III)'ün belirlenmesi için geliştirilmiştir. Yöntem temelde zayıf asidik ortamda N, N-dimetil-p-fenilendiaminin hidrojen peroksit ile oksidasyonu üzerinde demir (III)'ün etkisine dayanmaktadır. Demir (III) olmadan çok yavaş gerçekleşen bu reaksiyonda demir (III) katalizör olarak görev alır. Reaksiyon sonrası kinon radikali olarak bilinen iki tane DMPD'nin yarı kinon (DMPDQ) türevleri oluşur (23). Oluşan DMPDQ koyu pembe renktedir ve bu

renk değişimine bağlı olarak 514nm’de spektrofotometrik ölçüm yapılır. 514 ve 550 nm dalgaboylarında yapılan ölçüm sonucunda DMPDQ’dan kaynaklanan iki absorpsiyon piki gözlenir.

Reaksiyon basamakları aşağıdaki verildiği şekildedir;

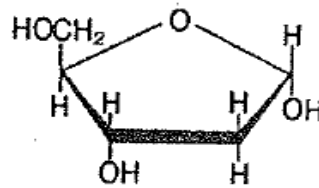


Yöntemin modifiye edilmemiş halinde sırayla 2,4 ng/mL Fe³⁺ + 1 mL pH 5,7 asetat tamponu + 1 mL %3,5’ lik H₂O₂ eklenir ve hacim saf su ile 24 mL’ye tamamlanır. Karışım 25°C’de 5 dakika su banyosunda bekletilir daha sonra 1 mL 2,4x10⁻² M DMPD (N,N-Dimetil-p- fenilendiamin) ilave edilir. Su banyosundan alınarak oda sıcaklığında 5 dk tutulduktan sonra absorbands 30 saniye içinde su kör olarak alınır ve 514 nm’de okunur (108).

2.4.2. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler (TBARS) Yöntemi

Oksidatif strese bağlı olarak bir çok hastalığın etiolojisinde rol alan serbest radikallerin ölçümünü yapmak çok reaktif ve kısa ömürlü olmalarından dolayı oldukça güçtür. Serbest radikallerin direkt ölçümü yerine etkinliğinin belirteci olarak bu moleküllerin makromoleküller (lipitler, proteinler ve DNA) ile yaptığı reaksiyonları sonucu oluşan ürünlerin ölçümü yapılır. TBARS yöntemi de lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit (MDA) ölçümüne dayanan oldukça sık kullanılan bir yöntemdir. (24). Biyolojik materyallerde kullanımı artan bu yöntem yüksek duyarlılıkta olup laboratuvar kullanımı için uygundur. (66). H₂O₂ den hidroksil radikalinin oluşumu geçiş metal iyonlarının varlığında Fenton reaksiyonuyla oldukça hızlı gerçekleşir. (109,110). Hidroksil radikalinin ölçümü, radikal deoksiriboza saldırması sonucu oluşan açığa çıkan TBA reaktif maddelerin (TBARS) ölçümüne dayanır.

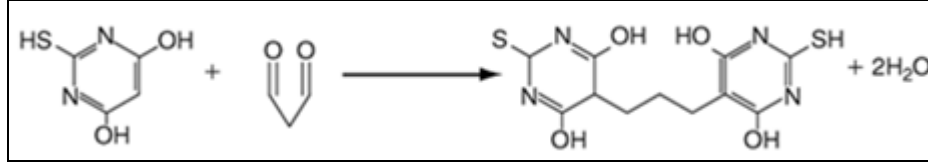
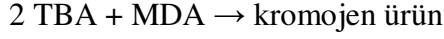
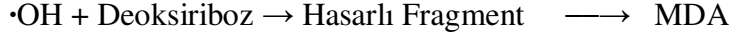
Bu yöntemde hidroksil radikali, saldırması için 37



Fenton reaksiyonuyla oluşan ortamdaki deoksiriboza °C’de inkübasyona bırakılır.

Şekil 2-5: 2- Deoksi -D- Riboz

Reaksiyon sonucu malondialdehit oluşur ve oluşan malodialdetin de düşük pH aralığında ısıtılmasıyla 2 molekül TBA ile reaksiyona girmesi sağlanır. Bu reaksiyon sonucunda da TBA₂-MDA kromojen ürünü oluşur.



Şekil 2-6: TBA₂-MDA oluşum reaksiyonu

Reaksiyon karışımına trikloroasetik asitin (TCA) sulu çözeltisi ve hemen ardından sodyum hidroksitte hazırlanmış tiyobarbitürik asit çözeltisinin eklenmesiyle renk oluşumu meydana getirilir. Reaktifler iyice karıştırıldıktan sonra tüpler kaynar su banyosunda 10-15 dakika bekletilir ve sonrasında soğutulma işlemi yapılır. Pembe renkli TBA ürününün ($\lambda_{\text{max}} = 532 \text{ nm}$) suya karşı absorpsiyonu ölçülür. Reaksiyon karışımına hidroksil radikal süpürücü bileşik eklenirse deoksiriboz ile hidroksil radikalleri için yarışır ve deoksiribozun bozunmasını azaltır. Süpürücünün hidroksil radikalının üretimini engellememesi ve süpürücüye saldıran hidroksil radikalının kromojen ürün oluşturmaması yöntem aşamasında dikkat edilmesi gereken diğer noktalar (109).

2.5. ANTIOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ

Antioksidan kapasite ölçüm metotlarını iki ana gruba ayırabiliriz.

1- Hidrojen Atomu Transferi (HAT) esasına dayanan metotlar: Serbest radikallerin antioksidan maddenin hidrojeni ile etkisiz hale gelmesinin ölçülmesi ile tayin edilir.

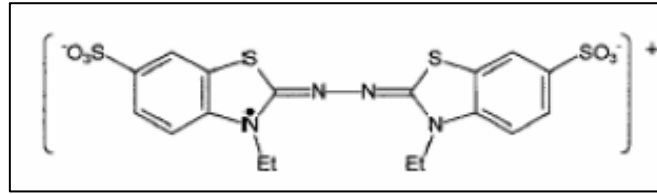
2- Elektron Transferi (ET) esasına dayanan metotlar: Antioksidanların elektron transfer etmesi ile metal, karbonil ve radikal içeren bileşiklerinin indirgenmesine dayanan metotlardır.

2.5.1. TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) Metodu

İlk defa Miller ve arkadaşları tarafından bulunan bu yöntem Metot 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) (ABTS) bileşiğinden radikal katyonunun oluşması ve bu katyonun antioksidanlar tarafından inhibe edilmesi yöntemine dayanmaktadır.

ABTS radikali ortamda H₂O₂ ve HRP olduğu durumlarda enzimatik sistemlerde oluşturulabilir. Oda sıcaklığında kararlı ve renkli olan ABTS radikali (ABTS+.), sıcaklığın 35 °C'nin üzerinde ve pH 7.5'in üzerinde olduğu durumda kararsızdır (7).

Re ve arkadaşları tarafından modifiye edilmiş ve geliştirilmiş yönteminde potasyum persülfatla ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin- 6-sülfonat))'nin oksidasyonu sonucu oluşan ABTS.+ radikal katyonları kullanılır. Oluşan bu ABTS radikalleri oda sıcaklığında karanlık ortamdayken 2 gün kararlı haldedirler.

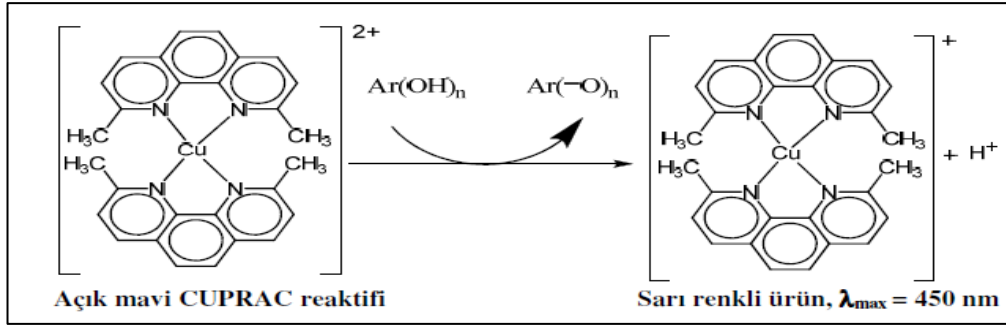


Şekil 2-7: ABTS.+ radikal katyonunun yapısı

Yöntem ABTS.+ katyonunun antioksidanlar tarafından indirgenmesi esasına dayanır, yani bir renksizleşme yöntemidir. Ortamdaki antioksidan varlığına bağlı olarak ABTS.+ radikal katyonunun absorbansında belirli bir süre içindeki azalma olur ve bu azalmadan yararlanılarak toplam antioksidan kapasitesi bulunur. Ortamda bulunan antioksidan bileşikler, radikal çözeltisinin rengini gittikçe açarken bu süreçte absorbans değerleri de zamana bağlı olarak düşer. 6.dk'lık gibi bir süre sonunda 734 nm de absorbans değeri okunur Yağda ve suda çözünebilen antioksidanlara, saf maddelere ve bitki ekstraktlarına uygulanabilen bir yöntemdir (25).

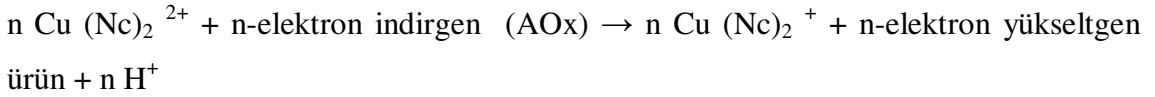
2.5.2. CUPRAC (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite) Yöntemi

Antioksidan kapasitelerinin tayini için geliştirilen spektrofotometrik CUPRAC yönteminde Bakır (II)-neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) reaktifi (Cu (II)-Nc) kullanılır. Temelde Polifenolik bileşiklerin antioksidan bileşikler varlığında Cu (II)-Neokuproin kompleksinin renkli Cu (I)-Nc kelatına indirgenmesi ve bu kelatın maksimum ışığı soğurduğu 450 nm'de absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır (111,26).



Şekil 2-8: CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu (II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla (Ar (OH)_n) reaksiyonu sonucu Cu (I)-Nc renkli kelatının oluşumu

Bu yöntem; Cu (II) klorür çözeltisi, neokuproin (Nc) çözeltisi ve amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltilerinden oluşan çözelti karışımına tayin edilecek herhangi bir antioksidan (direkt veya asit hidrolizi yapılan) çözeltisinin ilave edilmesiyle yapılan ölçüm esasına dayanır. 30 dakika sonunda içerisinde antioksidan bulunmayan referansa karşı 450 nm'de absorbans ölçümü yapılır. Antioksidan bileşikler (AOx) yükseltgenme reaksiyonlarında aynı zamanda indirgen maddeler olduklarından, kromojen bir oksidasyon aracı olan Cu (II)-Nc reaktifini indirgerler (112).



CUPRAC toplam antioksidan kapasitesi (TAC) yöntemiyle gıda maddelerinde bulunan polifenoller, C ve E vitamini gibi antioksidanların tayininde, insan serumunda TAC belirlenmesinde hidroksil radikal süpürücü maddeler üzerinde kullanılan ve hem lipofilik hem de hidrofilik maddeler için uygun pratik, seçici ve duyarlı bir total antioksidan tayin metodudur. (113,114). Bu yöntem daha sonraları ise proteinlerin, kolay yükseltgenebilen bazı amino asit gruplarının, özellikle tiyol içeren proteinlerin de TAC üzerine katkısının belirlenmesi amacıyla modifiye edilmiştir (26,115).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. SEÇİLEN ÖRNEKLERİN TANIMI

Bu çalışmada iki örnek grubu kullanılmıştır. Birinci grupta, 70 kişiden oluşan herhangi bir malignite bulgusu ve tercihen ailede kanser hikayesi olmayan sağlıklı bireyler kontrol grubuna alınmıştır.

İkinci grupta, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi servisinde akciğer kanseri tanısı konulan 70 kişi dahil edilmiştir. Projemize dahil edilen, akciğer kanseri tanısı konmuş hastalarımızın, klinik, histopatolojik değerlendirmeleri ve örnek alımları ilgili klinik tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. ÇALIŞMAMIZDA KULLANILAN CİHAZLAR

- Buzdolabı (+4 Beko)
- Derin Dondurucu (-20 Uğur)
- Derin Donudurucu (-80°C Sanyo)
- Distile Su Cihazı (Millipore)
- Hassas terazi (Radwag AS 220/C/2)
- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Elektromag)
- pHmetre (Hanna)
- Soğutmalı Santrifüj (Hereaus)
- Vorteks karıştırıcı, Spin (Biosan)
- Girdap karıştırıcı (Wisemix VM-10)
- Su banyosu (Elektromag)
- Spektrofotometre (NanoDrop2000)
- UV-görünür alan spektrofotometresi (Varian Cary 1E model)
- Pipet takımı (Gilson)

- PZR cihazı (BioRad)
- Etüv (Nüve)
- Güç Kaynağı (Titan plus Helena Laboratories)
- Mikrodalga Fırın (Philco)
- Isı Bloğu (Biosan)
- Elektroforez sistemi (LKB 2013 miniphor electrophoresis, LKB 2012 maxiphor electrophoresis)
- UV transilluminator (Stratagen UV/White light Transilluminator)

3.1.3. ÇALIŞMAMIZDA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE ÇÖZELTİLER

3.1.3.1. DNA izolasyonunda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Agaroz (İnvitrogen MBG), Amonyum asetat (Sigma A-8920), Amonyum klorür (Sigma A-5666), Borik asit (Sigma B-6768), Bromfenol blue (Sigma B-6896), DNA marker (Fermentas), EDTA (Merck K-90602121), Etanol (%99 Merck), Etidyum Bromid (Sigma E-8751), Hidroklorik asit (% 37 Merck K-13190114), İzopropanol, Potasyum bikarbonat (Merck K-126223552), Potasyum hidroksit (Sigma P 1767) Primerler (İnvitrogen), Proteinaz K (İnvitrogen) Sodyum dodesil (lauryl) sülfat (Sigma L-5750), Sodyum hidroksit (Merck C754962), Sodyum klorür (Carlo Erba 368257), Trizma baz (Sigma T-1503), Taqpolimeraz (Intron), 100bp marker (Intron).

3.1.3.2. Antioksidan-Oksidan parametrelerin ölçümünde Kullanılan Kimyasal Maddeler:

Bakır (II) klorür dihidrat ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), neokuproin (2,9-dimetil 1,10-fenantrolin) hidroklorür (Nc), amonyum asetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), demir (III) klorür heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), asetik asit (CH_3COOH), sodyum asetat (CH_3COONa), sodyum hidroksit (NaOH), sülfirik asit (H_2SO_4), H_2O_2 (%30'luk), N,N-Dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür (DPD), dipotasyum monohidrojen fosfat (K_2HPO_4), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), sodyum klorür (NaCl), 2-deoksi-D-riboz, etilen diamin tetraasetik asit disodyum tuzu, amonyum demir (II) sülfat heksahidrat (

(NH₄)₂Fe (SO₄).6H₂O), hidroklorik asit (HCl), trikloroasetik asit (TCA), 2-tiyobarbitürük asit (TBA), etanol (EtOH), 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) diamonyum tuzu (ABTS, C₁₈H₂₄N₆O₆S₄), potasyum persülfat (K₂S₂O₈), glutatyon (GSH).

3.1.4. DNA İZOLASYONUNDA KULLANILAN ÇÖZELTİLER

3.1.4.1. Eritrosit Parçalama Tamponu (Lysis Buffer)

8.74 gram Amonyum klorür, 1 gram Potasyum bikarbonat, 200 µl 0.5 M Etilen diaminetetraasetat (EDTA)'ın tartımları yapılarak erlen içine alındı. 900 mililitre distile su eklendi ve çözeltinin pH'sı 1N NaOH ile 7.4'e ayarlandı. Daha sonra balon joje içine alınarak 1 litreye tamamlandı. Çözelti ısıya dayanıklı cam şişelere aktarılarak 120°C'de 15 dakika otoklavlandı ve +4°C'de saklandı.

3.1.4.2. 0.5 M Disodyumetilendiaminteraasetat (EDTA) (pH 8.0)

186.1 gram Etilendiamintetraasetat (EDTA) tartılarak beher içine alındı ve 800 ml distile su eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımıyla çözüldürüldü ve pH'sı NaOH çözeltisi ile 8.0'e ayarlanarak distile su ile 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3.1.4.3. 4 M Sodyum Klorür (NaCl)

233.6 gram NaCl tartılarak erlene alındı. Üzerine 800 mililitre distile su ilave edildi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözüldürüldü. Balon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlandı. 120°C 'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3.1.4.4. Lökositleri Parçalama Tamponu (White Blood Cell Buffer-WBL)

25 mililitre 4 M NaCl ve 50 mililitre 0.5 M Etilendiaminasetat (EDTA) balon jojeye konularak 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında saklandı.

3.1.4.5. 1 M Tris Tamponu (Stok)

121.1 gram Tris baz tartılarak bir behere alındı. Üzerine 42 µl hidroklorik asit (HCl) ile yaklaşık 800 mililitre distile su eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözüldürüldü. Daha sonra balon jojeye aktarıldı ve 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3.1.4.6. 9.5 M Amonyum Asetat

73.22 gram amonyum asetat tartılarak beher içine alındı. Üzerine 80 mililitre distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda çözüldürüldü. Balon jojeye aktarıldı ve distile su ile 100 mililitreye tamamlandı. 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve +4°C'de saklandı.

3.1.4.7. %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

10 gram Sodyum dodesil sülfat tartıldı. Beher içine alınarak üzerine 80 mililitre distile su eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldürüldü ve pH'sı 7.2'ye ayarlandı. 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

3.1.4.8. Proteinaz K (20 mg/ml)

20 miligram Proteinaz K tartılarak steril bir tüp içinde steril distile su ile 1 mililitreye tamamlandı. -20 °C'de saklandı.

3.1.5. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİNDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER

3.1.5.1. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5X)

20 gram Ficoll 400, 1 gram SDS, 0.2 mililitre 0.5 M ,etilendiamintetraasetat, 1 mililitre 1M Tris (pH 8.0), 200 miligram Bromfenol blue, 200 miligram xylene cyanol tartılarak steril distile su ile 100 mililitreye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

3.1.5.2. Etidyum Bromür (10 mg/ml)

1 gram Etidyum bromür tartılarak steril distile su ile 10 mililitreye tamamlandı.

3.1.5.3. 5X Tris-Borik Asit-Etilendiamintetraasetat (TBE)

54 gram Tris baz ve 27,5 gram borik asit tartılarak beher içine aktarıldı. Üzerine 20 mililitre 0.5 M EDTA (pH 8.0) ve 800 ml. distile su ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözüldürüldü.Çözelti balon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlandı ve 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında saklandı.

3.1.6. ANTIOKSİDAN TAYİNİNDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER

3.1.6.1. Glutatyon Çözeltisi

Saf su ile çözümlenerek $1,0 \times 10^{-2}$ M konsantrasyonunda stok çözeltisi hazırlandı. Çalışma çözeltilerini hazırlamak için stok çözeltiden alınan hacim uygun oranda saf su ile seyreltildi.

3.1.6.2. CuCl₂.2H₂O Çözeltisi

Saf su ile çözülerek $1,0 \times 10^{-2}$ M konsantrasyonunda çözelti hazırlandı.

3.1.6.3. Neokuproin Çözeltisi

Neokuproin (Nc) EtOH ile çözülerek $7,5 \times 10^{-3}$ M konsantrasyonda çözeltisi hazırlandı.

3.1.6.4. pH 7 Üreli Tampon

Serum analizleri için amonyum asetat yerine üreli tampon kullanıldı. 0,086 M Tris (hidroksimetil)aminometan, 0,09 M Glisin, ve 4 mM Sitrat'tan oluşan karışım 8 M üre çözeltisi içinde çözüldü ve pH'sı 6 M HCl ile 7'ye ayarlandı.

3.1.6.5. ABTS / Persülfat Çözeltisi

7,0 mM ABTS sulu çözeltisi 2,45 mM K₂S₂O₈ ile karıştırılarak karanlıkta 12-16 saat bekletildi. Süre sonunda elde edilen ABTS çözeltisi etanolla 1:50 oranında seyreltilerek kullanıldı.

3.1.6.6. PBS (Phosphate Buffered Saline) Tampon Çözeltisi

Serum örnekleri için etanol yerine PBS tampon çözeltisi kullanıldı. 100 mM 50 mL K₂HPO₄ çözeltisi üzerine 100 mM KH₂PO₄ çözeltisinden damla damla ekleyerek pH 7,4 e ayarlandı. Sonra içine 0,2 g NaCl ilave edilip 100 mL'ye tamamlandı.

3.1.7. OKSİDAN TAYİNİNDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER

3.1.7.1. pH 7,0 Fosfat Tamponu

K₂HPO₄ ve KH₂PO₄ ayrı ayrı su ile çözülüp 100 mL'ye tamamlanarak 0,1 M'lık çözeltileri hazırlanıp sırasıyla 57,8 mL ve 42,2 mL alınıp karıştırılarak pH 7 fosfat tamponu hazırlandı.

3.1.7.2. 2-Deoksi-D-Riboz Çözeltisi

2-deoksi-D-riboz saf su ile çözülerek 2×10^{-3} M konsantrasyonunda çözelti hazırlandı.

3.1.7.3. Na₂EDTA Çözeltisi

Na₂-EDTA saf su ile çözülerek 20 mM konsantrasyonunda çözelti hazırlandı.

3.1.7.4. Amonyum Demir (II) Sülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4).6\text{H}_2\text{O}$) Çözeltisi

Amonyum demir (II) sülfat 2×10^{-2} M olacak şekilde tartılıp 1,0 mL 1M HCl ile çözülüp saf su ile 25 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.1.7.5. H_2O_2 Çözeltisi

% 30'luk H_2O_2 saf su ile seyreltilerek 10 mM'lık çözeltisi hazırlandı.

3.1.7.6. TCA (Trikloroasetik Asit) Çözeltisi

Trikloroasetik asit saf su ile çözülerek % 2.8'lik çözeltisi hazırlandı.

3.1.7.7. 2-Tiyobarbitürik Asit (TBA) Çözeltisi

TBA 5×10^{-2} M NaOH ile çözülerek % 1'lik çözeltisi hazırlandı.

3.1.7.8. Demir (III) Klorür (FeCl_3) Çözeltisi

FeCl_3 tartılıp 1 mL 0,5 M H_2SO_4 ile çözülüp saf su ile hacmi tamamlandı ve 10^{-2} M'lık stok çözeltisi hazırlandı. 10^{-7} M'a seyreltme işlemi 10^{-2} M H_2SO_4 ile yapıldı.

3.1.7.9. pH 5,7 Asetat Tamponu

Asetik asit ve sodyum asetatın ve ayrı ayrı 2 M'lık çözeltileri hazırlandı. Sırasıyla 4,75 mL ve 45,25 mL alınıp su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.1.7.10. H_2O_2 Çözeltisi

% 30'luk H_2O_2 saf su ile seyreltilerek % 3'lük çözeltisi hazırlandı.

3.1.7.11. N,N-Dimetil-p-Fenilendiamin (DPMD) Çözeltisi

DPMD bir miktar saf su ile çözülüp üzerine 0,5 M 0,25 mL H_2SO_4 çözeltisi eklenip su ile tamamlanarak $1,2 \times 10^{-2}$ M konsantrasyonunda çözeltisi hazırlandı. 10^{-2} M H_2SO_4 çözeltisi ile 5 kat seyreltildi.

3.2. ÇALIŞMAMIZDA KULLANILAN LABORATUVAR YÖNTEMLERİ

Proje kapsamında ilk olarak daha önce belirtilen klinik parametrelere uygun olan olgular çalışmaya dahil edilmiştir. Seçilen olgulardan izin alınarak 10 ml'lik kan örnekleri EDTA'lı ve kuru tüplere toplanmıştır. EDTA'lı tüplere alınmış olan periferik kan lökositlerinden en geç 1 gün içinde DNA izolasyonu yapılmış ve DNA saflığı tespit edilerek DNA konsantrasyonları hesaplanmıştır. İzole edilen DNA örneklerinden, SOD, Katalaz ve GPX genlerindeki polimorfizmleri saptayabilmek için, PCR ile çoğaltılmış, RFLP yöntemi ile varyasyon tespiti yapılmıştır. Kuru tüplerle alınan kan örneklerinden ise santrifüjleme

yöntemi ile serum elde edilmiş ve çalışılmak üzere -40°C 'de saklanmıştır. Ayrılan serum örneklerinden TAC ve TOC düzeyleri tayin edilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarındaki genotip ve allel dağılımlarının belirlenmesi ve biyokimyasal parametrelere ilişkin dağılımlar istatistiksel analizlerle yapılmış olup hastalık gelişiminde risk oluşturup oluşturmadıkları tespit edilmeye çalışılmıştır.

3.2.1. PERİFERİK KANDAN DNA İZOLASYONU

10 ml periferik kan örneği steril EDTA'lı tüplere alındıktan sonra çalışma için falkon tüpüne aktarıldı. Üzerine 1:3 oranında (30 ml) eritrosit parçalama çözeltisi eklenerek karıştırıldı ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika bekletildi. $+4^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılan örneklerin 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları atıldı ve pelletleri tamamen süspansiyon edilerek üzerine tekrar 15-20 ml. eritrosit parçalama çözeltisi eklendi. Örnekler $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika bekletildikten sonra 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantları atılarak süspansiyon edildi. Süspansiyon olan pellet üzerine 500 μl %10'luk SDS, 75 μl proteinaz K (20mg/ml) ve 9.4 ml lökosit parçalama çözeltisi (WBL) eklenerek 56°C su banyosunda 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her 1 ml. örnek başına 0.37 ml. olacak şekilde 9.5 M Amonyum asetat çözeltisi eklendikten sonra yavaşça karıştırıldı ve 3000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı 50ml'lik temiz bir tüpe aktarıldı ve üzerine 1:2 oranında %99'luk absölu alkol eklendi ve DNA'nın presipitasyonu sağlandı. Yoğunlaşan DNA'nın alkol yüzeyine çıkması beklenip ve DNA mikropipet ucuyla alındı. DNA %70'lik alkolde yıkandı ve korunmak üzere Tris-EDTA çözeltisinde çözündürülerek $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

3.2.2. ELDE EDİLEN DNA'NIN KONSANTRASYON VE KALİTESİNİN TAYİNİ

Spektrofotometrik olarak, 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle DNA'nın saflığı ve konsantrasyonu belirlendi. 50 $\mu\text{g/ml}$ çift iplikçikli DNA içeriğinin 260 nm dalga boyunda 1 optik densite (OD) verdiği kabul edilmektedir. 260 nm'deki ölçüm değeri aşağıdaki formüle uygulanarak DNA konsantrasyonu hesaplandı.

DNA Konsantrasyonu: $\text{OD}_{260} \times 50\mu\text{g/ml}$

DNA örneklerinin saflığı OD_{260}/OD_{280} oranı kullanılarak belirlendi. Yeterince iyi saflıkta kabul edilen DNA'nın OD_{260}/OD_{280} değeri yaklaşık 1.8'dir. Ortamda fenol veya protein mevcutsa bu oran 1.8'den küçük olacaktır. OD_{260}/OD_{280} değeri 2'den büyükse ortamda RNA bulunduğu anlamına gelir.

3.2.3. SOD1, KATALAZ VE GPX GEN POLİMORFİZMLERİNİN PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI

3.2.3.1. SOD1 rs2070424 Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Primer Dizileri

SOD1 gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir. Bu primerler uluslararası yayınlarda doğrulanmış primer dizileridir.

SOD1 İleri Primer: 5' AGTACTGTCAACCACTAGCA'3

SOD1 Geri Primer: 5' CCAGTGTGCGGCCAATGATG'3

3.2.3.2. Katalaz rs7943316 Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Primer Dizileri

Katalaz gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir. Bu primerler uluslararası yayınlarda doğrulanmış primer dizileridir.

Katalaz İleri Primer: 5' AATCAGAAGGCAGTCCTCCC'3

Katalaz Geri Primer: 5' TCGGGGAGCACAGAGTGTAC'3

3.2.3.3. GPX rs1050450 Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Primer Dizileri

GPX gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir. Bu primerler uluslararası yayınlarda doğrulanmış primer dizileridir.

GPX İleri Primer: 5' AAGGTGTTCCCTCCCTCGTAGGT'3

GPX Geri Primer: 5' CTACGCAGGTACAGCCGCCGCT'3

3.2.4. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (POLYMERASE CHAIN REACTION-PZR)'DA KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE PZR'İN HAZIRLANIŞI

Genomik DNA örneklerinde SOD1 geni 570 bç'lik gen bölgesi, Katalaz geni 249 bç'lik gen bölgesi ve GPX geni 252bç'lik gen bölgesi PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Bu amaçla toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde, Tablo 3.2.4-1'deki bileşenler sırası ile 0.2 ml'lik steril tüpe konuldu. 10 örnek çalışılacak ise pozitif ve negatif kontrol için birer tane ve pipetleme hataları için de bir tane olmak üzere toplam 13 örnek üzerinden reaksiyon karışımı hazırlandı. PCR karışımının hazırlanma işlemlerinin hepsi buz üzerinde soğukta ve steril kabin içerisinde yapıldı.

Tablo 3-1: PZR Karışımının Hazırlanması

MALZEMELER	KULLANILAN HACİM
Mg Free 10XPCR Tamponu (750 mM Tris-HCl, pH:8.8, 200mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1% (v/v) Tween 20)	2,5 µl
dNTP (200 µM) (herbir nükleotidden 25 mM)	1,5 µl
Primer karışımı (10 pmol)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM/ml)	1,5 µl
Taq DNA polimeraz	0,3 µl
PCR grade dH ₂ O	17.20µl
DNA (100 ng/µl)	1 µl

Taq DNA polimeraz eklendikten sonra hiç vakit kaybetmeden tüp içine konan bileşenlerin iyice karışması için pipetleme işlemi yapıldı. Örnek sayısı kadar 0.2 ml'lik tüplere 24 µl reaksiyon karışımı dağıtıldı. Daha sonra I.PCR ürünü için her tüpe 1 µl genomik DNA ve Nested PCR uygulaması için I. PCR ürünü eklenerek pipetleme yapıldı ve daha önceden 95 °C sıcaklığa çıkarılmış PCR cihazına örnekler yerleştirilerek PCR işlemi başlatıldı.

SOD1 Gen Polimorfizmini tespit etmek için kullanılan ileri ve geri primerler için annealing derecesi optimize edilerek 59 °C sıcaklık kullanıldı (Tablo 3.2).

Tablo 3-2: SOD1 geni PZR Çoğalma Koşulları

°C	Süre	Döngü Sayısı
95	5dk	1
94	45 sn	35
59	45 sn	
72	45 sn	
72	5dk	1

Katalaz Gen Polimorfizmini tespit etmek için kullanılan ileri ve geri primerler için annealing derecesi optimize edilerek 60 °C sıcaklık kullanıldı (Tablo 3.2.4-1).

Tablo 3-3: Katalaz geni PZR Çoğalma Koşulları

°C	Süre	Döngü Sayısı
95	5dk	1
94	45 sn	35
60	45 sn	
72	45 sn	
72	5dk	1

GPX Gen Polimorfizmini tespit etmek için kullanılan ileri ve geri primerler için annealing derecesi optimize edilerek 61.1 °C sıcaklık kullanıldı (Tablo 3.2.4-4).

Tablo 3-4: GPX geni PZR Çoğalma Koşulları

°C	Süre	Döngü Sayısı
95	5dk	1
94	45 sn	35
61.1	45 sn	
72	45 sn	
72	5dk	1

3.2.5. PCR ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE KONTROLÜ

3.2.5.1. %2'lik Agaroz Jel Hazırlanması:

- 4 gr. agaroz (İnvitrogen) tartılarak erlen içine konuldu. Üzerine son hacim 200 ml. olacak şekilde 1X TBE tamponu eklenerek, mikrodalga fırında kaynatma yolu ile çözündürüldü.
- Erlenin sıcaklığı elle tutulabilecek sıcaklığa düştüğünde (50-55°C) çözülmüş agaroz jel içine 4,5 µl etidyum bromür (10mg/ml) ilave edildi.
- Hazırlanan jel yatay jel yatağı içine dökülerek, yükleme kuyucuklarının oluşması için tarak yerleştirilerek donmaya bırakıldı.
- Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve jel örnek yüklenmesi için hazır duruma geldi.

3.2.5.2. PZR Ürünlerinin %2'lik Jele Yüklenmesi:

- %2'lik jel hazırlandıktan sonra 1X TBE tamponu içeren jel tankı içine uygun şekilde konuldu.
- Agaroz jelin üzerini 2-3 ml gelecek şekilde 1X TBE tamponu jel üzerine eklendi.
- 7 µl PZR ürününe, 3 µl yükleme tamponu (6X) eklenip pipetleme yapılarak karıştırıldı. 10 µl'lik örnek karışımı kuyucuklara sırasıyla yüklendi.

Yükleme işleminden sonra jel tankının kapağı kapatıldı. Güç kaynağı (E-C apparatus Corporation, E-C4000P) 500 miliamper 120 volt elektrik gücüne ayarlanarak elektroforez jel yürütülmesi gerçekleştirildi.

3.2.5.3. PZR Ürünlerinin Kontrolü:

PZR ürünlerinin oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacıyla PZR tüplerinden alınan 7 µl örnek 3 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak yukarıda tanımlanan elektroforez sisteminde yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel UV ışık altında (304 nm dalga boyunda) PZR ürünleri incelendi ve fotoğrafı UV transillüminator düzeneğinde çekildi.

3.2.6. SOD1 GENİ PCR ÜRÜNÜNDE RESTRIKSİYON FRAGMENT UZUNLUK POLİMORFİZMİ (RFLP) YÖNTEMİNİN UYGULANMASI

MspI enzimi 10X Buffer Tango ile birlikte SOD1 -251 A/G gen polimorfizminin belirlenmesi için kullanıldı. MspI enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri:



Şekil 3-1 MspI Restriksiyon Enzimine ait Kesim tanıma bölgesi

PCR ürünü saptanmış örneklerden toplam hacmi 8,2 µl olacak şekilde restriksiyon enzim kesimi Tablo 3.2.6-1'de belirtilen çözeltilere, MspI enziminin eklenmesi ile gerçekleştirildi. Bu kesim işleminde kullanılan enzim için optimum sıcaklık 37°C'de 16 saat olmuştur.

Tablo 3-5: MspI Enzimi Kesim Protokolü

Kimyasallar	Kullanılan Hacim
PCR ürünü	5µl
Distile Su	4,5µl
10X Buffer	0,5µl
Enzim	0,3µl

3.2.6.1. Katalaz geni PCR Ürününde Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Yönteminin Uygulanması

Hinfi enzimi 10X Buffer Tango ile birlikte Katalaz -21 A/T gen polimorfizminin belirlenmesi için kullanıldı. Hinfi enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri:



Şekil 3-2: Hinfi Restriksiyon Enzimine ait Kesim tanıma bölgesi

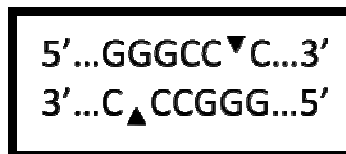
PCR ürünü saptanmış örneklerden toplam hacmi 8,2 µl olacak şekilde restriksiyon enzim kesimi Tablo 3.2.6-2'de belirtilen çözeltilere, Hinfi enziminin eklenmesi ile gerçekleştirildi. Bu kesim işleminde kullanılan enzim için optimum sıcaklık 37°C'de 16 saat olmuştur.

Tablo 3-6: Hinfi Enzimi Kesim Protokolü

Kimyasallar	Kullanılan Hacim
PCR ürünü	5µl
Distile Su	4,5µl
10X Buffer	0,5µl
Enzim	0,3µl

3.2.6.2. GPX geni PCR Ürününde Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Yönteminin Uygulanması

ApaI enzimi 10X Buffer Tango ile birlikte GPX -198 C/T gen polimorfizminin belirlenmesi için kullanıldı. ApaI enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri:



Şekil 3-3: ApaI Restriksiyon Enzimine ait Kesim tanıma bölgesi

PCR ürünü saptanmış örneklerden toplam hacmi 8,2 μ l olacak şekilde restriksiyon enzim kesimi Tablo 3.3.6-3'de belirtilen çözeltilere, ApaI enziminin eklenmesi ile gerçekleştirildi. Bu kesim işleminde kullanılan enzim için optimum sıcaklık 37°C'de 16 saat olmuştur.

Tablo 3-7: ApaI Enzimi Kesim Protokolü

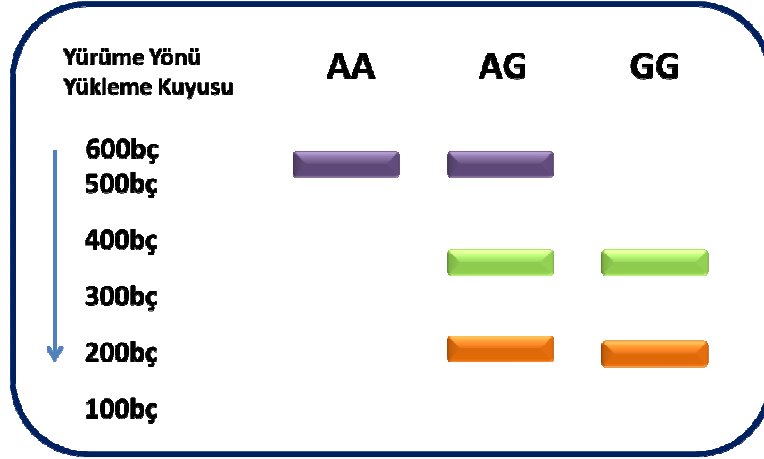
Kimyasallar	Kullanılan Hacim
PCR ürünü	5 μ l
Distile Su	4,5 μ l
10X Buffer	0,5 μ l
Enzim	0,3 μ l

3.2.7. ENZİM KESİM ÜRÜNLERİNİN AGAROZ JEL ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE KONTROLÜ

%3'lük agaroz jel hazırlandı. Kesim ürünlerinden 10 μ l ve yükleme tamponundan 3 μ l alınarak karıştırılıp %3'lük agaroz jeldeki kuyulara yükleme yapıldı. Kesim ürünleri 50 bç'lik DNA moleküler marker ile birlikte yürütüldü. Yürütme sonrası jel üzerindeki bantlar, UV ışık (304 nm) altında incelendi.

3.2.7.1. MspI Enzim Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi

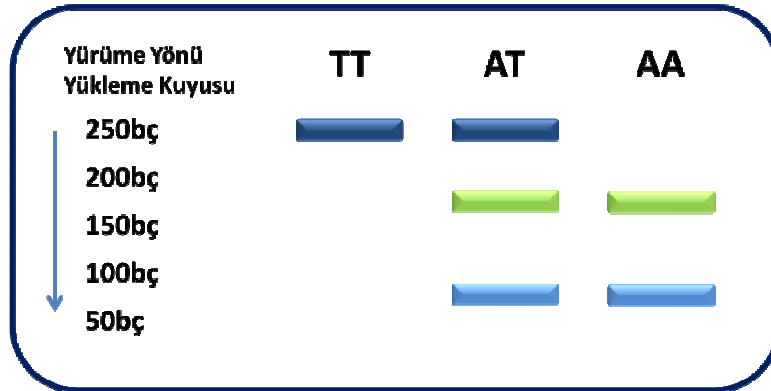
Kesim işlemi yapılmadan önce elde edilen PCR ürünlerinin bant büyüklüklerinin 570 bç olduğu saptandı. MspI enzimi ile kesim sonrasında sadece 570 bç'lik bant görüldüğünde AA (homozigot doğal genotip), 570, 369 ve 201 bç'lik bantlar görüldüğünde AG (heterozigot mutant genotip), 369 ve 201 bç'lik bantlar görüldüğünde ise GG (homozigot mutant genotip) olarak değerlendirildi (Şekil 3.2.7-1).



Şekil 3-4: RFLP sonrası oluşabilecek SOD1 genine ait DNA parçalarının % 3'lük agaroz jeldeki bant şeklinin şematik görüntüsü.

3.2.7.2. Hinfl Enzim Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kesim işlemi yapılmadan önce elde edilen PCR ürünlerinin bant büyüklüklerinin 250 bç olduğu saptandı. Hinfl enzimi ile kesim sonrasında sadece 250 bç'lik bant görüldüğünde TT (homozigot mutant genotip), 250, 177 ve 73 bç'lik bantlar görüldüğünde AT (heterozigot mutant genotip), 177 ve 73 bç'lik bantlar görüldüğünde ise AA (homozigot doğal genotip) olarak değerlendirildi (Şekil 3.2.7-2).

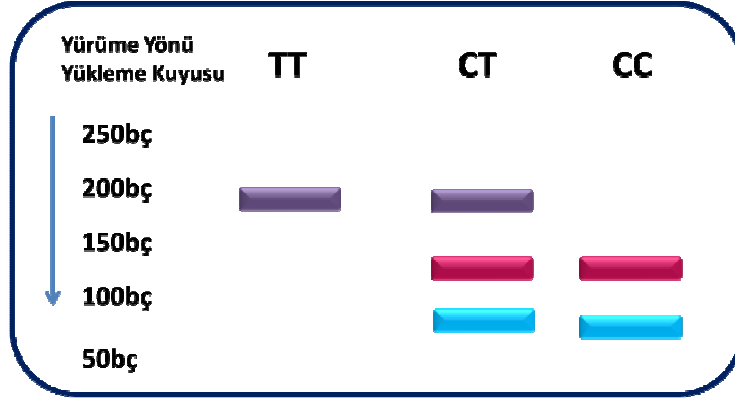


Şekil 3-5: RFLP sonrası oluşabilecek Katalaz genine ait DNA parçalarının % 3'lük agaroz jeldeki bant şeklinin şematik görüntüsü.

3.2.7.3. ApaI Enzim Kesim Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kesim işlemi yapılmadan önce elde edilen PCR ürünlerinin bant büyüklüklerinin 192 bç olduğu saptandı. ApaI enzimi ile kesim sonrasında sadece 192 bç'lik bant görüldüğünde TT (homozigot mutant genotip), 192, 122 ve 70 bç'lik bantlar

görüldüğünde CT (heterozigot mutant genotip), 122 ve 70 bç'lik bantlar görüldüğünde ise CC (homozigot doğal genotip) olarak değerlendirildi (Şekil 3.2.7-3).



Şekil 3-6: RFLP sonrası oluşabilecek GPX genine ait DNA parçalarının % 3'lük agaroz jeldeki bant şeklinin şematik görüntüsü.

3.2.8. TOTAL ANTİOKSİDAN VE OKSİDAN ÖLÇÜMÜNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Toplam antioksidan kapasite tayinleri için CUPRAC ve ABTS/persülfat yöntemleri, serbest radikal tayinleri için de Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler Yöntemi (TBARS) ve N,N-Dimetil-p-Fenilendiamin (DMPD) Yöntemi kullanıldı.

3.2.8.1. CUPRAC (Bakır (II) İndirgeme Antioksidan Kapasitesi) Yöntemi

Bir deney tüpü içerisine sırasıyla 1 mL $1,0 \times 10^{-2}$ M Cu (II) klorür çözeltisi, 1 mL $7,5 \times 10^{-3}$ M neokuproin çözeltisi ve 1 mL 1 M amonyum asetat tampon (pH=7,0) çözeltisi ilave edildi. Daha sonra x mL antioksidan standart çözeltilerinden veya serum örneklerinden eklenip son olarak (2-x) mL distile su ilave edilerek çözeltiler karıştırıldı. Karışımın son hacmi 5mL'dir. Tüpler oda sıcaklığında ağzı kapalı olarak 30 dakika bekletildi. Süre sonunda çözeltilerin içinde örnek bulunmayan referans çözeltiye karşı 450 nm'deki absorbansları ölçüldü. Serumlu örnekler için 1 mL 1 M amonyum asetat tamponu yerine 2 mL pH 7 üreli tampon kullanıldı.

3.2.8.2. ABTS/Persülfat Yöntemi

Deney tüpü içerisine x mL antioksidan çözeltilisinden konulup hacim EtOH ile 1 mL'ye tamamlandı. Üzerine 2 mL ABTS/persülfat çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı.

Karışım 6 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve absorbans EtOH'e karşı 734 nm'de ölçüldü. Serumlu örneklerde EtOH yerine PBS tamponu kullanıldı.

3.2.8.3. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler (TBARS) Yöntemi

Deney tüpü içerisine sırasıyla, 3 mL pH 7,0 fosfat tamponu + 1 mL $2,0 \times 10^{-3}$ M 2-deoksi-D-riboz + 0,5 mL 20 mM Na₂EDTA + 0,5 mL 20 mM FeCl₂ + (4-x) mL H₂O + x mL süpürücü (antioksidan, antioksidan karışımı ve/veya serum) + 1 mL 10 mM H₂O₂ çözeltileri eklendi. Karışım 30 dakika 37 °C su banyosunda bekletildi. Bu süre sonunda karışıma 5 mL % 2,8'lik TCA ve 5 mL % 1'lik TBA çözeltileri ilave edilip girdap karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra 100 °C'lik su banyosunda 10 dakika boyunca bekletildi. Daha sonra akan musluk suyu altında soğutulan çözeltilerin suya karşı 532 nm dalgaboyunda absorbansları ölçüldü.

3.2.8.4. N,N-Dimetil-p-Fenilendiamin (DMPD) Yöntemi

ROS tayininde kullanılan DMPD yöntemi Hirayama ve Unohara tarafından ultra-eser demir (III) tayini amacıyla geliştirilen N,N-dimetil-p-fenilendiamin yönteminden modifiye edildi. Orijinal yöntemde sırayla 2,4 ng/mL Fe³⁺ + 1 mL pH 5,7 asetat tamponu + 1 mL % 3,5' lik H₂O₂ eklenir ve hacim saf su ile 24 mL' ye tamamlanır. Karışım 25 °C'de 5 dakika su banyosunda bekletildikten sonra; 1 mL $2,4 \times 10^{-2}$ M DMPD (N,N-Dimetil-p-fenilendiamin) ilave edilir. Su banyosundan çıkarılıp oda sıcaklığında 5 dk tutulduktan sonra absorbans 30 saniye içinde suya karşı 514 nm'de okunur (45).

Modifiye edilmiş yöntemde ise deney tüpü içerisine sırasıyla 0,25 mL 10^{-7} M Fe³⁺ + 0,5 mL pH 5,7 asetat tamponu + 0,5 mL %3' lük H₂O₂ ve x mL süpürücü eklenip hacmi saf su ile 9 mL'ye tamamlandı. 25 °C'de 5 dakika su banyosunda bekletildi. Su banyosundan sonra; 1 mL $2,4 \times 10^{-2}$ M'dan 1:5 oranında seyreltilmiş DMPD (N,N-Dimetil-p-fenilendiamin) ilave edilip çalkalandı. 25 °C'de 20 dakika daha su banyosunda bekletildi. Su banyosundan çıkarılıp suya karşı 514 nm de absorbansı okundu.

3.2.8.5. N,N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD) Yönteminin Optimizasyonu:

Hirayama ve Unohara tarafından geliştirilen eser miktarda demir tayininden uyarlanan ve ROS tayininde kullanılan DMPD yöntemi aşağıdaki parametreler incelenerek optimize edildi.

pH Denemesi:

Modifiye DMPD Yönteminin optimum koşullarını belirlemek için pH çalışması yapıldı. 2,0 M HAc ve 2,0 M NaAC'in çözeltileri uygun miktarlarda karıştırılarak pH= 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 5,7 olacak şekilde tampon çözeltiler hazırlandı. Modifiye edilmiş DMPD Yöntemi her bir pH için Bölüm 3.5.4'de anlatılan şekilde süpürücü olarak 0,5 mL $1,0 \times 10^{-4}$ M QR varlığında ve süpürücü yokluğunda (referans) uygulandı.

3.2.8.6. İnsan Serumunun TAC ve TOC Yöntemlerine Uygulanması

İnsan serum örnekleri saf su ile farklı oranlarda seyreltilip içinden 0,2 mL kullanılarak DMPD ve TBARS metotlarıyla ROS süpürme etkileri, CUPRAC ve ABTS metotları ile de toplam antioksidan kapasiteleri ölçüldü.

TBARS yönteminde TCA ve TBA eklenmesinin ardından 100 °C'de 10 dakika bekletildiğinde serum proteinlerinden kaynaklanan bulanıklık çözeltinin santrifüj edilmesiyle giderildi. Süpernatant fazı alınarak absorbansı ölçüldü. ABTS metodunda 1:10 seyreltilmiş serum örneklerinden 0,2 mL eklendiğinde absorbanslar ölçülemedi çünkü oluşan yeşil renk serum eklendiğinde 6 dakikan önce tamamen kayboldu.

3.2.8.7. Kalibrasyon Denklemlerinin Belirlenmesi

ROS için temsili süpürücüler olarak seçilen tüm antioksidanların denemelerde kullanılan her dört yöntem için ayrı ayrı kalibrasyon grafikleri çizildi. Bunun için Tablo 3.2.9-1'de verilen molaritede GSH kullanıldı.

Tablo 3-8: Kalibrasyon Denkleminin Belirlenmesinde Kullanılan GSH Molariteleri

Metodlar	CUPRAC	ABTS	DMPD	TBARS
GSH (M)	5×10^{-4} M	10^{-4} M	10^{-3} M	10^{-2} M

3.2.8.8. Kalibrasyon Denklemleri

Denemelerde kullanılan tüm antioksidanların TAC ve ROS ölçümleri için seçilen her dört yöntem için ayrı ayrı kalibrasyon denklemleri hesaplandı ve sonuçlar aşağıdaki tabloda toplandı.

Tablo 3-9: Kullanılan antioksidanların yöntemlere göre kalibrasyon denklemleri

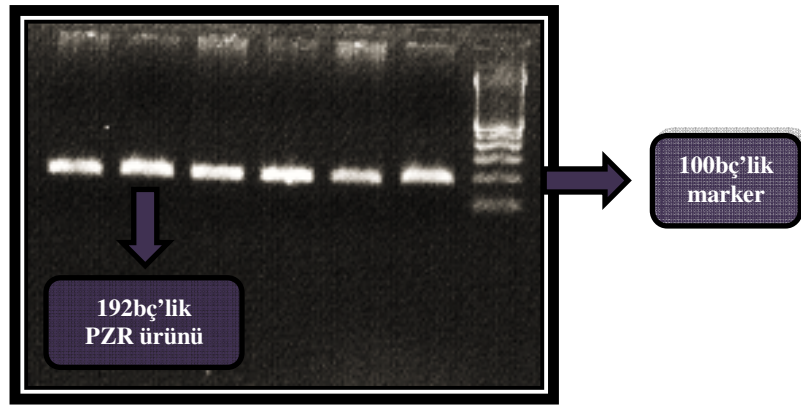
ANTIOKSİDANLAR	CUPRAC	ABTS	DMPD YÖNTEMİ	TBARS
GSH	$y = 8624.4x + 0.0001$	$y = 34563x + 0.0001$	$y = 6681.1x - 0.0824$	$y = 535.96x + 0.0209$
	$R^2 = 0.99996$	$R^2 = 0.99176$	$R^2 = 0.99553$	$R^2 = 0.99136$

4. BULGULAR

4.1. PZR ÜRÜNLERİNİN KONTROLÜNE AİT BULGULAR

4.1.1. GPX-1 -198 C/T Polimorfizmi PZR Ürünlerine Ait Bulgular

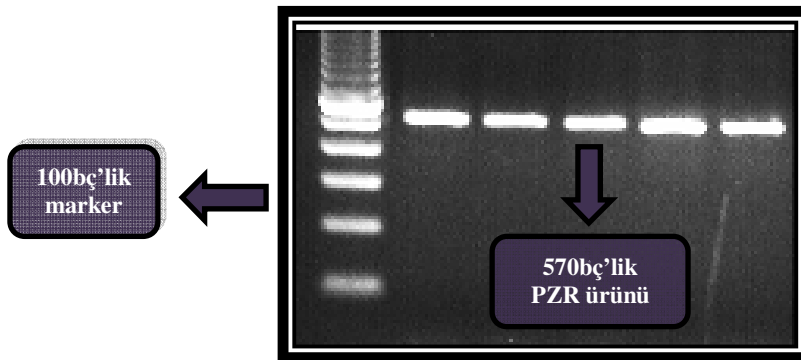
GPX1 gen bölgesinin polimorfizmine ait PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Agaroz jelde ilgili gen varyasyonunun tespiti için 192 bç'lik özgül PZR ürününe ait bantlar elde edildiği gözlemlendikten sonra bu PZR ürünlerinin ApaI enzimi kullanılarak kesimi gerçekleştirildi (Şekil 4.1.1-1).



Şekil 4-1: GPX-1 geni primerleriyle çoğaltılan 192 bç'lik PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. Marker: MBI Fermentas 100 bç DNA marker

4.1.2. SOD-1 -251 A/G Polimorfizmi PZR Ürünlerine Ait Bulgular

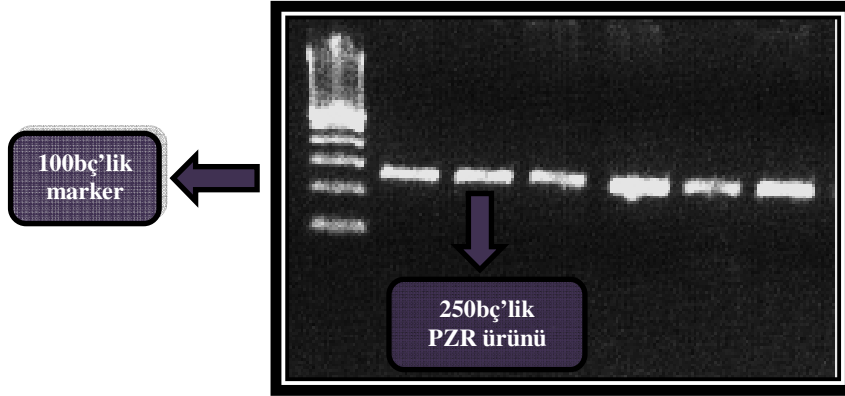
SOD 1 gen bölgesinin polimorfizmine ait PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Agaroz jelde ilgili gen varyasyonunun tespiti için 570 bç'lik özgül PZR ürününe ait bantlar elde edildiği gözlemlendikten sonra bu PZR ürünlerinin MspI enzimi kullanılarak kesimi gerçekleştirildi (Şekil 4.1.2-2).



Şekil 4-2: SOD-1 geni primerleriyle çoğaltılan 570 bç'lik PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. Marker: MBI Fermentas 100 bç DNA marker

4.1.3. Katalaz-21 A/G Polimorfizmi PZR Ürünlerine Ait Bulgular

Katalaz gen bölgesinin polimorfizmine ait PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Agaroz jelde ilgili gen varyasyonunun tespiti için 250 bç'lik özgül PZR ürününe ait bantlar elde edildiği gözlemlendikten sonra bu PZR ürünlerinin Hinfl enzimi kullanılarak kesimi gerçekleştirildi (Şekil 4.1.3-3).

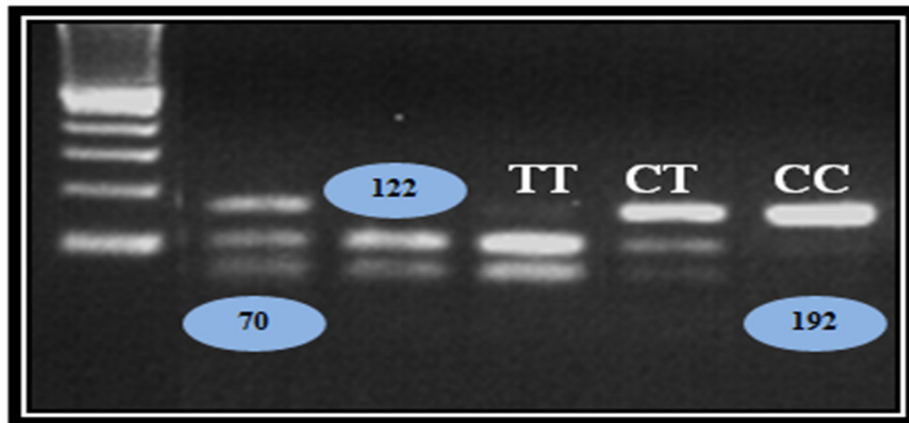


Şekil 4-3: Katalaz geni primerleriyle çoğaltılan 250 bç'lik PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. Marker: MBI Fermentas 100 bç DNA marker

4.2. KESİM ÜRÜNLERİNİN KONTROLÜNE AİT BULGULAR

4.2.1. RFLP Yöntemi ApaI Enzim Kesimi ile GPX-1 Kesim Ürünlerine Ait Bulgular

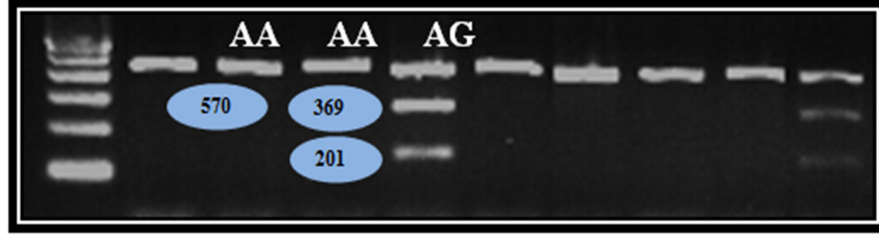
1. ve 4. kuyu 192, 122 ve 70 bç heterozigot tip (CT); 2. ve 3. kuyu 122 ve 70 bç homozigot mutant (TT); 5. kuyu 192 bç homozigot doğal tip (CC). Marker: Fermentas 100bç marker.



Şekil 4-4: ApaI enzim kesimi sonucunda ürünlerin %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü.

4.2.2. RFLP Yöntemi MspI Enzim Kesimi ile SOD1 Kesim Ürünlerine Ait Bulgular

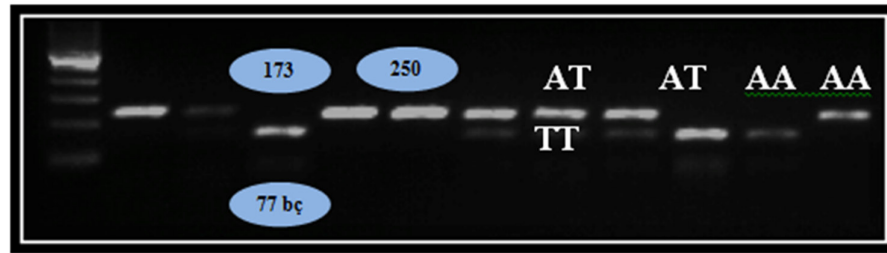
1. ve 2. kuyu 570 bç homozigot doğal tip (AA); 4. ve 9. kuyu ve 570, 369 ve 201 bç heterozigot tip (AG); 369 ve 201 bç'lik homozigot mutant tip bulunamadı. Marker: Fermentas 100bç marker.



Şekil 4-5: MspI enzim kesimi sonucunda ürünlerin %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü.

4.2.3. RFLP Yöntemi HinfI Enzim Kesimi ile Katalaz Kesim Ürünlerine Ait Bulgular

1., 4. ve 5. kuyular 250 bç homozigot mutant tip (TT); 2.,6.,7. ve 8. kuyular 250, 173 ve 77 bç heterozigot tip (AT); 3.,9. Ve 10. kuyular 173 ve 77 bç homozigot doğal tip (AA). Marker: Fermentas 100bç marker.



Şekil 4-6: HinfI enzim kesimi sonucunda ürünlerin %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü.

4.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONRASINDA ELDE EDİLEN BULGULAR

Çalışmamıza İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi servisinde akciğer kanseri tanısı konulan hastalar ile tercihen yaş ortalaması 50'nin üzerinde olan, ailede kanser hikayesi bulunmayan, sigara ve alkol kullanmayan sağlıklı bireyler dahil edilmiştir. Gönüllüler önce yapılacak araştırma ile ilgili bilgilendirilmiş ve gönüllü onam formu okutularak imzalatılmıştır.

Akciğer Kanseri olgularına ve kontrol grubuna ait cinsiyet, yaş, sigara içme (paket/yıl), alkol kullanımı ile ilgili bilgiler Tablo 4.1'de verilmektedir.

Tablo 4-1: Çalışma gruplarına ait veriler

	KONTROL	AKCİĞER KANSERİ HASTALAR
Cins		
Kadın (%)	43.7	15.9
Erkek (%)	56.3	84.1
Yaş Ortalamaları (yıl)	56.8±11.5	60.8±9.7
Ailede Kanser Hikayesi		
Pozitif (%)	0	38.2
Negatif (%)	100	61.8
Alkol Kullanımı		
Pozitif (%)	6	45.5
Negatif (%)	94	54.5
Sigara Kullanımı		
İçenler (%)	25.4	98.2
İçmeyenler (%)	74.6	1.8
Sigara (paket/yıl)		
Ortalama Değer Standart Sapma (X±SS)	-	59,5±33,9

Tablodaki değerler $X \pm SD$ olarak verilmiştir; gruplararası analiz student t testi ve Kikare (χ^2) ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışma grubumuza dahil edilen akciğer kanserli hastaların %84,1'i erkek, %15,6'sı kadın bireylerden oluşmaktaydı. Kontrol ve hasta grubu yaş ortalamaları açısından değerlendirildiğinde yaş ortalamaları kontrollerde $60,8 \pm 9,7$ ve hastalarda $56,8 \pm 11,5$ olup her iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$).

Çalışma grubumuza dahil edilen hastaların klinik ve patolojik verileri değerlendirildiğinde % 34,5'u erken evre, % 65,5'i geç evre akciğer kanseri hastalarıydı. Hastalar lenf nodu tutulumu açısından incelendiğinde N0 %61,8, N1 %25,5 ve N2 %12,7, 9 olarak değerlendirildi. Tümör patolojisi açısından değerlendirildiğinde ise % 41,8'i adenokarsinom, % 41,8'i squamöz hücreli karsinom, %3,6'ı küçük hücreli dışı, % 5,5'i nöroendokrin, %3,6'ı büyük hücreli dışı, %1,8'i pleomorfik ve %1,8'i sarkomatoid karsinom olarak gözlenmiştir. Akciğer kanseri hastalarına ait yıllık ortalama sigara paket tüketimi $59,5 \pm 33,9$ olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4-2: Akciğer kanserli hastalarda GPX -198 C/T, SOD1 -251A/G ve KAT -21 A/T gen polimorfizmlerine ait genotip ve allel dağılımları

Genotipler ve Alleller	Akciğer Kanserli Hastalar n (%)	Kontroller n (%)	P
GPX -198 C/T			
CC	8.7	16.9	0.275
CT	58	47.9	
TT	33.3	35.2	
C Alleli	37.6	40.8	0.59
T alleli	62.3	59.1	
SOD1 -251A/G			
AA	92.8	92.2	0.902
AG	7.2	7.8	
GG	0	0	
A alleli	96.3	96.0	0.903
G alleli	3.6	3.9	
KAT -21 A/T			
AA	10.1	40	0.343
AT	58	45.7	
TT	31.9	40	
A alleli	39.1	37.1	0.732
T alleli	60.8	62.8	

GPX1 bir genine ait -198 C/T polimorfizmi sonuçları değerlendirildiğinde, genotip dağılımı ve allel frekansları açısından kontrol grubu ve akciğer kanserli hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Akciğer kanserli hastalarda CC genotipi % 8.7, CT genotipi % 58 ve TT genotipi % 33.3 iken kontrol grubunda CC genotipi % 16.9, CT genotipi %47.9 ve TT genotipinin %35.2 olduğu gözlemlendi ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4.2).

SOD1 geni -251 A/G polimorfizm sonuçları değerlendirildiğinde, hasta bireylerin %92,8'inin AA genotipini taşıdığı, %7,2'sinin AG genotipini taşıdığı tespit edildi. Hasta ve kontrol gruplarının her ikisinde de GG genotipi bulunamamıştır. Kontrol grubundaki genotip dağılımı incelendiğinde de AA genotipinin oldukça yüksek frekansta olduğu gözlenmiştir. Hasta ve kontrol bireyleri arasında genotip dağılımları açısından anlamlı bir bulgu elde edilememiştir ($p>0.05$) (Tablo 4.2).

Çalışmamıza dahil ettiğimiz katalaz genindeki -21 A/T polimorfizmine ait genotip dağılımları incelendiğimizde de anlamlı bir bulgu elde edemedik. Hasta grubunun %10.1'i AA genotipini, %58'i AT genotipini ve % 31.9'u TT genotipini taşıdığı bulunmuştur. Kontrol grubunda ise AA genotipini taşıyanların % 14.3, AG genotipini taşıyanların % 45.7 ve TT genotipi taşıyanların % 40 olduğu bulunmuştur. Gruplararası genotip ve allel dağılımları açısından değerlendirme yapıldığında anlamlı bir fark elde edilememiştir.

Tablo 4-3: Hasta grubunda GPX -198 C/T, SOD1 -251A/G ve KAT -21 A/T Genotiplerinin Klinik ve Patolojik Parametrelere Göre Dağılımı

Klinik Veriler	GPX -198 C/T			SOD1 -251A/G			KAT -21 A/T		
	CC (%)	CT (%)	TT (%)	AA (%)	AG (%)	GG (%)	TT (%)	AT (%)	AA (%)
Cinsiyet									
Kadın	-	63,6	36,4	100	-	-	18,2	54,5	27,3
Erkek	10,3	56,9	32,8	91,4	8,6	-	34,5	58,6	6,9
T evre									
İleri Evre	5,6	58,3	36,1	88,9	11,1	-	30,6	61,1	8,3
Erken Evre	15,8	63,2	21,1	100	-	-	31,6	57,9	10,5
Lenf Nod Tutulumu									
N1+N2	14,3	61,9	23,8	90,5	9,5	-	38,1	57,1	4,8
N0	5,9	58,8	35,3	94,1	5,9	-	26,5	61,8	11,8
Sigara Kullanımı									
Evet	8,9	62,5	28,6	92,9	7,1	-	32,1	58,9	8,9
Hayır	-	-	100	1	-	-	100	-	-
Alkol Kullanımı									
Evet	16	52,0	32	88	12,0	-	32,0	64,0	4,0
Hayır	3,3	66,7	30,0	96,7	3,3	-	30,0	56,7	13,3

Tablodaki değerler $X \pm SD$ olarak verilmiştir; gruplararası analiz student t testi ve Kikare (χ^2) ile gerçekleştirilmiştir

Akciğer kanserli bireylerin -198 C/T değişimine ait gerek C alleli gerekse de T alleli taşıma durumu cinsiyet, tümör evresi, lenf nodu tutulumu, sigara kullanımı ve alkol kullanımı açısından incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$) (Tablo 4.3). -21 A/T polimorfizmine ait TT genotipi erkeklerde % 34.5 iken bu oran kadınlarda % 18.2 olarak bulunmuştur. TT genotipi taşımanın erkekler bireylerde daha yüksek olduğu bulunsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşamamıştır. AA genotipi ise kadınlarda % 27.3 iken erkeklerde % 6.9

tespit edildi ancak anlamlılık bulunamamıştır. SOD1 geninde ait polimorfizm sonuçları da hastaların klinik parametreleriyle birlikte değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

Akciğer kanseri hastaları ve kontrol bireylerine ait serum oksidan ve antioksidan düzeylerine ait bulgular Tablo 4.4’de verilmiştir.

Tablo 4-4: Akciğer Kanserli Hasta ve Kontrol Grubunda CUPRAC, ABTS, DMPD ve TBARS yöntemlerine göre serumdaki total oksidan-antioksidan düzeyleri (GSH Ekv. mM)

Kullanılan Yöntemler	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	P değeri
	Ortalama Değer Standart Hata (GSH Ekv. mM) ($\bar{X} \pm SE$)	Ortalama Değer Standart Hata (GSH Ekv. mM) ($\bar{X} \pm SE$)	
CUPRAC	1,43±0,37	1,35±0,31	0,101
ABTS	3,45±0,82	3,01±0,94	0,001**
DMPD	9,53±0,66	11,69±0,59	0,017*
TBARS	125,24±6,19	112,8±3,08	0,074

Tablodaki değerler $\bar{X} \pm SE$ (Standart Hata) olarak verilmiştir. n: sayısı hasta grubu: 69 ; kontrol grubu: 70

Çalışma grupları arasında serum CUPRAC, ABTS, DMPD, TBARS düzeyi karşılaştırılması Student-T testi ile gerçekleştirilmiştir. *:p<0,05,**:p<0,001

CUPRAC yöntemi verilerine göre akciğer kanserli hastalarda ortalama serum total antioksidan miktarı 1,43±0,37 (GSH Ekv. mM) iken kontrol grubunda bu ortalama 1,35±0,31 (GSH Ekv. mM) bulunmuştur. hasta grubunda antioksidan miktarı kontrollere göre yüksek bulunsada anlamlı bir fark saptanamamıştır. Diğer bir tayin yöntemi TBARS sonuçlarına göre serum total antioksidan miktarı hasta grubunda ortalama 125,24±6,19 (GSH Ekv. mM) iken kontrollerde bu ortalama 112,8±3,08 (GSH Ekv. mM) olup bu fark istatistiksel olarak anlamlılığa oldukça yakın bulunmuştur (p=0,074) (Tablo 4.4). Total antioksidan düzeyleri karşılaştırıldığında ise hasta ve kontroller arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur. ABTS yöntemine göre ortalama total antioksidan miktarı hastalarda kontrollere göre yüksek bulunmuştur ve bu fark istatistiksel olarak da anlamlıdır (3,45±0,82 & 3,01±0,94 (GSH Ekv. mM)

p=0,001). Hasta ve kontrollerdeki total oksidan miktarı DMPD yöntemine göre ölçüldüğünde kontrollerde ortalama oksidan miktarının arttığı gözlenmiştir. Hastalarda ortalama total oksidan miktarı $9,53\pm 0,66$ (GSH Ekv. mM) iken kontrollerde $11,69\pm 0,59$ (GSH Ekv. mM) bu fark istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur (p=0,017) (Tablo 4.4).

Tablo 4-5: Akciğer Kanseri Hasta ve Kontrol Grubunda genotiplere göre serumdaki total antioksidan düzeyleri (GSH Ekv. mM)

CUPRAC	Hasta Grubu		P değeri	Kontrol Grubu	
	Ortalama Değer Standart (GSH Ekv. mM) Hata (X±SE)			Ortalama Değer Standart (GSH Ekv. mM) Hata (X±SE)	P değeri
Genotipler					
GPX -198 C/T	CC	1,54±0,098	0,604	1,34±0,101	0,912
	CT	1,43±0,052		1,36±0,04	
	TT	1,39±0,06		1,33±0,046	
SOD1 -251A/G	AA	1,43±0,039	0,856	1,32±0,032	0,145
	AG	1,41±0,11		1,49±0,027	
	GG	-		-	
KAT -21 A/T	AA	1,30±0,15	0,520	1,25±0,104	0,322
	AT	1,44±0,046		1,39±0,043	
	TT	1,45±0,066		1,34±0,045	

Tablodaki değerler X±SE (Standard Hata) olarak verilmiştir.

Çalışma gruplarının kendi içlerinde serum total antioksidan düzeylerinin genotiplere göre karşılaştırılması One-Way Anova ile gerçekleştirilmiştir.

Hasta ve kontrol grupları kendi aralarında GPX 1 -198 C/T polimorfizmi genotip dağılımları değerlendirildiğinde CUPRAC metodu total antioksidan miktarlarında anlamlı bir fark saptanamamıştır. KAT -21 A/T polimorfizmi genotip dağılımı açısından değerlendirildiğinde AA genotipi taşıyan hasta bireylerdeki total antioksidan miktarları diğer genotipi taşıyan bireylere göre düşük bulunsa da bu fark istatistiksel

olarak anlamlı değildi. Hasta ve Kontrol grupları yine kendi içlerinde ortalama total antioksidan miktarları açısından karşılaştırıldığında -251 A/G genotip dağılımlarına göre anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo: 4.5)

Tablo 4-6: Akciğer Kanserli Hasta ve Kontrol Grubunda genotiplere göre serumdaki total antioksidan düzeyleri (GSH Ekv. mM)

ABTS		Hasta Grubu Ortalama Değer Standart (GSH Ekv. mM) Hata ($\bar{X}\pm SE$)	P değeri	Kontrol Grubu Ortalama Değer Standart (GSH Ekv. mM) Hata ($\bar{X}\pm SE$)	P değeri
Genotipler					
GPX -198 C/T	CC	3,47±0.21	0,998	2,97±0,24	0,957
	CT	3,45±0.10		3,03±0,134	
	TT	3,45±0.16		2,99±0,166	
SOD1 -251A/G	AA	3,49±0,08	0,092	3,02±0,093	0,637
	AG	2,96±0,47		3,19±0,55	
	GG	-		-	
KAT -21 A/T	AA	3,29±0,32	0,787	2,87±0,35	0,729
	AT	3,48±0,10		2,98±0,149	
	TT	3,46±0,15		3,09±0.11	

Tablodaki değerler $\bar{X}\pm SE$ (Standard Hata) olarak verilmiştir.

Çalışma gruplarının kendi içlerinde serum total antioksidan düzeylerinin genotiplere göre karşılaştırılması One-Way Anova ile gerçekleştirilmiştir.

Hasta ve kontrol grupları kendi içlerinde GPX 1 -198 C/T ve KAT-21 A/T polimorfizmleri genotip dağılımlarına göre değerlendirildiğinde ABTS metodu total antioksidan miktarlarında anlamlı bir fark saptanamamıştır. Akciğer kanseri bireylere ait SOD1 -251A/G polimorfizmi genotip dağılımı açısından değerlendirildiğinde GG

genotipi taşıyan bireylerdeki total antioksidan miktarları AA genotipi taşıyan bireylere göre yüksek olup bu fark istatistiksel olarak da anlamlılığa yakın bulunmuştur ($p=0,092$). Kontrol grubuna ait ortalama total antioksidan miktarları, SOD 1 genotip dağılımları açısından değerlendirildiğinde ise anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). (Tablo 4.6)

DMPD		Hasta Grubu Ortalama Değer Standart (GSH Ekv. mM) Hata ($\bar{X}\pm SE$)	P değeri	Kontrol Grubu Ortalama Değer Standart Hata (GSH Ekv. mM) ($\bar{X}\pm SE$)	P değeri
Genotipler					
GPX -198 C/T	CC	9,78±2,26	0,982	10,06±1,52	0,462
	CT	9,42±0,910		12,1±0,86	
	TT	9,64±1,09		11,8±1,03	
SOD1 -251A/G	AA	9,54±0,68	0,916	11,8±0,66	0,075
	AG	9,27±3,08		7,6±1,87	
	GG	-		-	
KAT -21 A/T	AA	8,46±1,79	0,791	14,02±1,38	0,144
	AT	9,87±0,89		12,00±0,88	
	TT	9,24±1,18		10,49±0,96	

Tablo 4-7: Akciğer Kanseri Hasta ve Kontrol Grubunda genotiplere göre serumdaki total oksidan düzeyleri (GSH Ekv. mM)

Tablodaki değerler $\bar{X}\pm SE$ (Standard Hata) olarak verilmiştir.

Çalışma gruplarının kendi içlerinde serum total oksidan düzeylerinin genotiplere göre karşılaştırılması One-Way Anova ile gerçekleştirilmiştir.

Hasta ve kontrol grupları kendi içlerinde GPX 1 -198 C/T ve KAT-21 A/T polimorfizmleri genotip dağılımlarına göre değerlendirildiğinde DMPD metodu total oksidan miktarlarında anlamlı bir fark saptanamamıştır. Kontrol grubu SOD 1 -251 A/G genotip dağılımlarına göre ortalama total oksidan miktarları değerlendirildiğinde

AA genotipi taşıyan bireylerde ortalama 11.8 ± 0.66 iken AG genotipi taşıyan bireylerde bu ortalama $7,6 \pm 1,87$ bulunmuştur. Kontrollerde ortalama total oksidan miktarı AA genotipi taşıyan bireylerde yüksek olup bu fark istatistiksel olarak anlamlılığa yakın bulunmuştur ($p=0.075$) (Tablo 4.7).

TBARS		Hasta Grubu Ortalama Değer Standart (GSH Ekv. mM) Hata ($X \pm SE$)	P değeri	Kontrol Grubu Ortalama Değer Standart (GSH Ekv. mM) Hata ($X \pm SE$)	P değeri
Genotipler					
GPX -198 C/T	CC	148,9 \pm 14,6	0,468	114,4 \pm 3,54	0,955
	CT	124,9 \pm 8,64		112,9 \pm 4,62	
	TT	119,6 \pm 10,2		111,6 \pm 6,04	
SOD1 -251A/G	AA	124,9 \pm 6,41	0,865	112,7 \pm 3,46	0,378
	AG	129,0 \pm 26,6		101,9 \pm 9,74	
	GG	-		-	
KAT -21 A/T	AA	128,5 \pm 22,1	0,942	110,5 \pm 3,51	0,344
	AT	123,4 \pm 7,66		117,6 \pm 4,08	
	TT	127,5 \pm 12,0		108,0 \pm 5,95	

Tablo 4-8: Akciğer Kanserli Hasta ve Kontrol Grubunda genotiplere göre serumdaki total oksidan düzeyleri (GSH Ekv. mM)

Tablodaki değerler $X \pm SE$ (Standard Hata) olarak verilmiştir.

Çalışma gruplarının kendi içlerinde serum total oksidan düzeylerinin genotiplere göre karşılaştırılması One-Way Anova ile gerçekleştirilmiştir.

Akciğer kanseri bireylerde GPX 1 -198 C/T polimorfizmleri genotip dağılımlarına göre değerlendirildiğinde, TBARS metodu total antioksidan miktarları CC genotipi taşıyanlarda ($148,9 \pm 14,6$) diğer genotiplere göre yüksek bulunmuş ancak bu

fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Hasta ve kontrol grupları kendi içlerinde SOD 1 -251 A/G ve KAT-21 A/T polimorfizmleri genotip dağılımlarına göre değerlendirildiğinde TBARS metodu total oksidan miktarlarında anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p>0,05$). (Tablo: 4.8).

5. TARTIŞMA

Günümüzde dünyadaki kanser vakaları arasında en yüksek görülme sıklığı ile akciğer kanseri başı çekmektedir (116). Akciğer kanserinin, 20. yüzyıl başında görülme sıklığı günümüze göre daha az iken, sigara kullanımı artışı gibi etmenler ile vaka sayısında yüksek oranda artışlar gözlenmiştir (117).

Akciğer kanseri vakalarının %40'ından fazlası ilerlemiş hastalık durumunda tedavi için başvurmaktadır. Bu grupta 5 yıllık sağ kalım %1'in altındadır. Bu grup hastalarda hastalığın evresi ve hastanın performans durumu prognostik ve sağ kalım süresini etkileyen faktörlerdir (118).

Akciğer kanserinin etiolojisinde genetik ve çevresel faktörler birlikte rol alır. Çevresel faktörlerden sigaranın, hastalığın en önemli risk faktörünü oluşturduğu ve akciğer kanseri hastalarının %90'ından fazlasının sigara içtiği bildirilmektedir (119).

Sigara dumanıyla birlikte kirli havaya maruz kalan akciğerlerde serbest radikal ve reaktif oksijen türlerinde artış meydana gelmektedir. Serbest radikallerin önemli bir kaynağı olan oksijene de sürekli maruz kalan akciğerler aslında oksidana maruziyeti minimum indirmek ve oksidan-antioksidanlar arasındaki dengeyi korumak için önemli antioksidanlara sahiptir (120).

Serbest radikallerin artışı ve üretiminde denge oksidanlar yönünde olduğunda bu koruyucu sistem yetersiz kalmakta ve oksidatif hasar meydana gelmektedir. Bu da hücrelerin büyümesini ve diferansiyasyonunu kontrol eden genlerde hasara neden olarak benign ve malign pek çok akciğer hastalığının etyopatogenezinde rol almaktadır.

Karsinogenez ve tümör gelişimi ile ilişkili olduğu düşünülen serbest radikallerin oluşturduğu hasarların ortadan kaldırılması açısından antioksidan mekanizmaların bilinmesi de önemlidir. Enzimatik antioksidanlar olarak bilinen SOD, KAT ve GPX enzimleri en etkili endojen antioksidanlardır. Bu enzimleri kodlayan genlerdeki genetik varyasyonlar enzimlerin aktivitelerinde azalmaya ve ROS detoksifikasyonunda değişimlere neden olabilmektedir.

SOD1 geni için -251A/G (rs2070424), Katalaz geni için C-262T ve promoter bölgesinde yer alan -21A/T (rs1001179 rs7943316) ve GPX1 geni için -198C/T (Pro198Leu) (rs1050450) en çok çalışılan polimorfizmlerdir (121,122,123,124).

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Oksidatif strese karşı etkisini özellikle eritrositlerde gösterir (125). Yapılan çalışmalar sonucunda şiddetli oksidatif stress durumunda, GPX1 aktivitesinin apoptozu inhibe edebileceği (126,127) antikanser ilaçlara ve reaktif oksijen türlerine karşı tümör hassasiyetini azaltabileceği bildirilmiştir (128). Bu gende en çok çalışılan -198 C/T (Pro198Leu) polimorfizminin akciğer, mesane, meme ve prostat kanserleri ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (129,130,131,132,133). Yapılan çalışmalarda Prolinlölün değişiminin selenyumun enzime bağlanmasını etkileyerek enzimin aktivitesinde değişikliğe neden olduğu düşünülmektedir. Enzim aktivasyonundaki farklılığa bağlı olarak biriken H₂O₂'in DNA'da mutasyonlara neden olduğu ve bu mutasyonların birikimi sonucu da kanser gelişimine katkıda bulunabileceği bildirilmektedir (134,135,136,137). Ravn-Haren ve ark. postmenapoz meme kanserli kadınlarda sigara kullanımı ile GPx aktivitesi arasındaki ilişkiyi incelemiş ve GPx aktivitesinin, Leu/Leu genotipi taşıyan sigara kullanan bireylerde yine aynı genotipi taşıyan ancak sigara kullanmayan bireylere göre düşük olduğunu bildirmişlerdir (138).

Ratnasinghe ve ark. ın akciğer kanseri hastalarında yapmış olduğu bir çalışmada Leu/Leu genotipini taşıyan bireylerin Pro/Pro genotipi taşıyan bireylere göre daha fazla risk taşıdığı rapor edilmiştir (139). Akciğer kanseri hastalarında yapılan yine başka bir çalışmada da Pro/Leu ve Leu/Leu genotiplerini taşıyanların hastalık riski açısından Ratnasinghe nin çalışmasını destekler niteliktedir (140). Jarworska ve ark. larinks kanseri hastalarındaki genotip dağılımını incelediğinde CT genotipinin kontrollere oranla düşük olduğunu ve bu düşüklüğün istatistiksel olarak da anlamlı olduğunu rapor etmişlerdir.

Jaworska ve ark.ın akciğer kanserli hastalarla yapmış olduğu aynı çalışmada C/T genotipini kontrollere göre daha düşük bulmuşlardır (OR:0,54 (0.31-0.95); p=0,03). Bu sonuçlara göre 'T' allelinin hastalarda daha az bulunmasının akciğer kanseri gelişimi açısından bir risk olabileceğini ileri sürmüşlerdir (141). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise akciğer kanserli hastalarda CC genotipi (%8,7), TT genotipini (%33.3) taşıyanlardan oldukça düşük bulunmuştur. Bu oran kontrollerle kıyaslandığında ise

anlamli bir fark elde edilememiştir ($p>0.05$). Küçükgergin ve ark. Türk populasyonundaki prostat kanseri hastalarında yapmiş olduğu çalışmada Pro/Leu ve Leu/Leu genotipini taşıyanların Pro/Pro taşıyanlara göre yüksek riske sahip olduklarını bildirmişlerdir. Aynı zamanda Leu/leu genotip frekansının ileri evre hastalarda daha yüksek olduğunu ileri sürmüşlerdir. Leu/Leu genotipinin yine hem hasta hem de kontrollerde düşük GPx aktivitesiyle ilişkili olabileceğini de rapor etmişlerdir (142).

MnSOD ile GPX arasındaki ilişkiyi inceleyen Oberley ve ark, aşırı CuZnSOD ifade edilmesinin, GPX aktivitesine bağılı olarak insan glioma hücrelerinde büyümeyi inhibe ettiğini ileri sürmüşlerdir (143). Cu-ZnSOD enziminin aşırı ekspresyonundaki artışın MnSOD, katalaz ve GPX dahil olmak üzere antioksidan enzim profillerinde değişikliğe neden olabileceği bildirilmiştir (144).

Süperoksit dismutaz (SODS) Süperoksit serbest radikalının ve hidrojen peroksit (H_2O_2) radikallerinin moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. Sitoplazmada ve mitokondride eksprese edilen SOD1 in primer meme kanseri hücrelerinin sitoplazma ve nükleusunda biriktiği ve kanser hücrelerinin hayatta kalımında önemli rol oynayabileceği bildirilmiştir. Luena ark meme kanseri çalışmasında SOD1 in aşırı eksprese olduğunu rapor etmişlerdir (145,146,147). Lemarie ark. yapmiş olduğu çalışmada aşırı eksprese SOD1 in akciğer kanseri hücrelerinin büyümesini ve apoptozu azalttığı teşvik ettiği bildirilmiştir (148). Bunlara ek olarak Huang ve arkadaşları SOD1 i lösemide anti kanser ajan olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (149). Rajaraman ve arkadaşları daha önce çalışılmamış olan rs202445 polimorfizminin geç gliomada azalan risk ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir (OR: 0.37; 95%CI: 0.18 – 0.74 homozigot CC genotipi için). Yine yapmiş oldukları başka bir çalışmada rs2070424 polimorfizminin ise kanser ile ilişkisini bulamamışlardır (150,151). Biz de çalışmamızda SOD1 geni -251 A/G (rs2070424) polimorfizmi ve akciğer kanseri riski arasında bir ilişki bulamadık.

Diğer bir antioksidan enzim olan katalaz ise hidrojen peroksidi (H_2O_2) ve hidroksil (OH) radikallerinin oluşumunu önlemek için bu bileşikleri su ve oksijene dönüşümünü katalizlemektedir. Öztürk ve ark. kronik lenfsitik lösemili hastalardaki eritrosit içi katalaz aktivitelerinin kontrollere göre anlamlı derecede düşük olduğunu bildirmişlerdir (152).

-262 C/T değişimi katalaz genine ait en çok çalışılan polimorfizmdir. Genin promoter bölgesinin 262. baz çiftinde görülen C/T değişimi, genin transkripsiyon bağlanma faktörlerini etkileyerek kandaki enzim aktivitesi üzerinde önemli değişikliklere neden olduğu bilinmektedir.

Bizim çalışmış olduğumuz katalaz gen bölgesine ait -21 A/T değişimi de transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı bölgede yer alması ve kandaki katalaz seviyesiyle de ilişkisinin olması sebebiyle önem taşımaktadır. Bu polimorfizmin hipertansiyon ve bronşiyal astımla ilişkili olabileceği buna karşı kardiyovasküler hastalıklarla bir ilişkisinin olmadığı rapor edilmiştir. LourduMary ark ın güney hindistan popülasyonunda yapmış olduğu bir çalışmada en yüksek TT (%70) genotipini, en az AA genotipini (%7) belirlemişlerdir. Bizim yaptığımız çalışmada da AA genotipi %10,1 oranla en az bulunan genotip olup AT genotipi %58 ve %31,9 TT genotipi bulunmuştur. Akciğer kanserli hasta ve kontroller arasında bir değerlendirme yapıldığında istatistiksel olarak anlamlılık yakalayamadık.

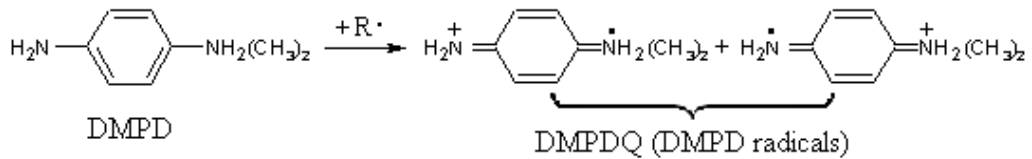
Aerobik organizmalarda, ROS ve serbest radikalleri etkisizleştiren antioksidan sistem daha karmaşıktır. Bu sistem, dokuda ve hücrede oksidatif hasara etki eden ROS ve serbest radikallerini önleyebilir ya da azaltabilir (153). İnvivo organizmalarda antioksidan durumunu anlamak için, bilinen ve bilinmeyen total antioksidanların seviyesinin ölçülmesi önemlidir. Farklı biyolojik örneklerde farklı antioksidanların yayılma dinamiğinin ve onların etkileşim potansiyelinin, bağımsız bir şekilde ele alarak her bir antioksidan seviyesinin ölçülmesi buna bağlı olarak ve vücuttaki antioksidan maddelerin bütün seviyelerinin varlığını göstermek de oldukça zordur.

Buna rağmen, kanser hastalığına yakalanmış olanlardaki antioksidanlar ile ilgili yapılan daha önceki araştırmalarda, elde edilen birçok sonuç bağımsız bir şekilde bir veya bir kaç antioksidan maddenin ölçüldüğünü göstermektedir (154, 155, 156, 157, 158). Ancak bu sonuçlar hastalardaki total antioksidan seviyesini göstermemektedirler. Çalışmamızda, antioksidan-oksidan etkileşiminden dolayı, organizmadaki oksidan-antioksidan total seviyesinin ölçümünün yapılmasını amaçladık. Daha önce yapılmış bir çok çalışma kanser hastalarında yüksek oksidatif stress miktarını ortaya koymuştur (159, 160,161,162,163, 164).

İnsan serumunun antioksidan aktivite/kapasite düzeylerinin ölçülmesi oksidatif stress kaynaklı hastalıkların teşhisi ve tedavisi amacıyla kullanılabilen önemli bir parametredir. Örneğin Koracevic ve diğerleri yaptıkları çalışmada akut miyokardiyal enfarktüs ve lösemi hastaları ile sağlıklı bireylerin serum TAC seviyelerini ölçerek sağlıklı bireylerin serum TAC düzeylerinin hastalara oranla daha yüksek olduğunu rapor etmiştir (165). Bir başka çalışmada ise Bean ve diğerleri tıkanmış ve normal tavşan mesane kaslarının TAC değerlerini FRAP ve CUPRAC yöntemlerini kullanarak karşılaştırmış ve serbest radikallerin yükseldiği durumlarda koruyucu antioksidan seviyesinin azaldığını belirtmişlerdir. Yapılan çalışmada FRAP yöntemi bu farkı yansıtmazken CUPRAC sonuçları tıkalı mesane kas ve mukozasında TAC seviyesinin azaldığını gösterebilmiştir (166) Bir diğer örnekte ise Mehdi ve Rizvi CUPRAC yöntemini kullanarak yaşlanma ile birlikte insan serumdaki TAC düzeyinin azaldığını saptamıştır (167).

Serbest radikal oluşumu biyolojik sistemlerdeki oksidasyonun bir ifadesi olduğundan serbest radikal süpürülmesini ölçen yöntemler de bu olayın değerlendirilmesinde önemlidir. Her ikisi de renkli katyonik radikallerin süpürülmesine dayanan ABTS^{•+} (2-azinobis- (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)) radikal katyonunun süpürülmesi TEAC (GSH eşdeğer toplam antioksidan kapasite) yöntemi veya DMPD^{•+} (N,N-dimetil-p-parafenilendiamin) yöntemleri bu alanda önemli bir yer tutmaktadır. DMPD yöntemi aynı zamanda reaktif türlerin saldırısı altında oksidatif hasarın ya da dönüşümün ölçülmesinde kullanılmaktadır (168).

DMPD yöntemi farklı çalışmalarda bazı değişiklikler ile hem ROS (169) hem de TAC (170) tayin yöntemi olarak kullanılmıştır. Buradaki ortak nokta DMPD'nin parçalanmasıyla oluşan pembe renkli radikalik parçalanma ürünlerinin oluşumunun ya da tüketiminin spektrofotometrik olarak ölçülmesidir.



Yukarıda şematize edilen reaksiyonu gereği ortamda bulunan ROS, DMPD yi parçalayarak DMPDQ radikallerinin oluşumuna neden olur. Oluşan DMPDQ radikalleri ROS miktarı ile orantılı olduğundan oluşan pembe renkli radikalik türlerin ölçümü ROS miktarının ölçüsünü vermektedir. Diğer taraftan reaksiyon ortamında antioksidan bileşiklerin bulunması durumunda ROS türleri tüketileceğinden DMPDQ oluşumu azalacaktır.

İnsan serumu yapısında bulunan doğal antioksidanlar nedeniyle ROS süpürücü özellik taşımaktadır. Serumun TAC düzeyi azaldıkça ROS süpürme aktivitesi de azalır, ancak süpürülen reaktif türlerin karakterine de bağlı olan ROS giderme etkinliği TAC ile bire bir aynı anlama gelmez.

Oksidatif hasarın belirlenmesinde kullanılan en yaygın testlerden biri de Tiyobarbütirik asit-reaktif maddeler (TBARS) yöntemidir. Bu yöntem oksidatif düzeyin belirteci olarak malondialdehit (MDA) ve diğer reaktif türlerin (lipid peroksidasyonunun son ürünleri gibi) ölçülmesine dayanmaktadır. Ancak yöntem sıklıkla spesifik olmadığı konusunda eleştirilmektedir. Lipid peroksidasyonunun ölçülmesinde kullanılan en yaygın yöntem olmakla birlikte TBARS testi birçok antioksidana karşı duyarlı değildir (sistein ve askorbik aside karşı kısmen ve ürik aside tamamen), bu durum yöntemin konsantrasyon ile lineer orantılı cevap vermesini olumsuz etkilemektedir. Benzer şekilde toplamsallık ve tekrarlanabilirlik özellikleri de göreceli olarak zayıftır. Oksidatif dönüşüm reaksiyonlarıyla oluşan ikincil ürünler (MDA) bir dizi komplike reaksiyonlar oluşumuyla çeşitli girişimlere yol açar. Daha önce yapılan bir çalışmada oksidatif dönüşüm ile TAC arasındaki ilişki incelenmiş ve DMPD testinin konsantrasyona bağlı oksidasyon inhibisyonunu TBARS yöntemine göre daha iyi yansıttığı ifade edilmiştir (168).

CUPRAC ve ABTS insan serumda TAC tayininde sıklıkla kullanılan yöntemlerdir. Ancak ABTS yöntemi tiyollerin gerçek fizyolojik antioksidan işlevlerini tam olarak yansıtamamaktadır. Tiyoller fizyolojik ortamda aşırı bir ROS saldırısı ile karşılaşmadıkça öncelikle tersinir olarak karşılık gelen disüfürlere dönüşürler (171) Ancak ABTS/TEAC yöntemiyle tiyoller için belirlenen yüksek elektron katsayısı yöntemin uygulanışı sırasında ortamda bulunan tiyol bileşiklerinin karşılık gelen tiyollere değil sülfenik asitler üzerinden sülfenik ve sülfonik asitlere kadar

yükseltgendiklerini düşündürmektedir. Bu durum ABTS nin özellikle ortamda tiyollerin bulunması durumunda fizyolojik ortamları iyi modelleyememektedir. Bu durum özellikle tiyollerin bulunduğu ortamlarda ABTS'nin modelleme yeteneğini zayıflatarak antioksidan kapasitenin olduğundan daha yüksek görünmesine neden olabilmektedir (172). CUPRAC yönteminde ise tiyollerin fizyolojik ortamdakine benzer şekilde elektron verici indirgenler olduğu daha önce açıklanmıştır (173)

Arteosklerosis hastaları olan bazı bireylerde görülen serumun toplam antioksidan kapasite düzeylerindeki artışın serumda ürik asit düzeylerindeki artış ile bağlantılı olabileceği gerçeği literatürde bildirilmiştir (174).

Çalışma grubumuzda akciğer kanserli hastalarımızda total oksidan kapasiteyi gösterebilecek bir parametre olan DMPD istatistiksel anlamlı olarak kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda mezataloymalarda bir çalışmada artmış reaktif oksijen seviyelerini gösteren TOL değerleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Yine hasta grubumuzda antioksidan göstergesi olarak kullandığımız CUPRAC yöntemiyle tayin edilen total antioksidan seviyeleri ise hasta grubumuzda kontrol grubuna göre bir miktar yüksek bulunmuştur. Bu yüksekliğin hasta grubumuzda yüksek oksidan etkinin dengeye getirilmesi için antioksidan düzeyi yükseltilmeye çalışılması olarak yorumlayabiliriz. Ancak bu değer istatistiksel anlamlılığa ulaşmadığından bu tip bir yorumu hasta grubunda elde ettiğimiz ve istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulduğumuz DMPD değeri ile yorumlamak gerekebilir.

Erhola ve diğ. 1997 (175) yılında yayımladıkları bir araştırmada, gerek toplam plazma peroksil radikal tutma kapasitesi (TRAP) parametresinin ve gerekse bu parametrenin unsurlarından biri olan plazma protein tiyol içeriklerinin, akciğer kanseri hastalarında sağlıklı kontrol grubuna nazaran anlamlı biçimde daha düşük çıktığını bulmuşlardır (175). Ancak elektron transfer (ET-) esaslı toplam antioksidan kapasite (TAC) testleri için akciğer kanseri hastalarında normal bireylere nazaran aynı biçimde rapor edilmiş farklılıklara literatürde rastlanmamaktadır. Bu durum TAC ile radikal süpürme kapasitesinin eş anlamlı olmamasından, bir diğer deyişle (radikalin cinsine göre değişen) radikal süpürücü antioksidanların elektron verici (indirgen) antioksidanlarla özdeş olmamasından kaynaklanabilir. Dolayısıyla hasta ve kontrol

gruplarında farklılık anlamında ET-esaslı TAC testleriyle radikal süpürme etkinliği testlerinin paralel sonuçlar vermesi zorunluluğu yoktur.

DMPD yöntemi ile ölçülen serumlardaki ROS süpürme etkinliğidir. Kullanılan DMPD yöntemiyle reaksiyon ortamında fenton yöntemiyle oluşturulan radikaller DMPD yi parçalayarak DMPDQ katyonik radikalleri oluşumuna neden olmaktadır. Oluşan pembe renk ise bu radikallerin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Ortamda antioksidan özellik taşıyan radikal süpürücülerin olması durumunda fenton yoluyla oluşturulan radikaller tüketileceğinden DMPD nin parçalanması azalarak açığa çıkan pembe rengin şiddeti de azalacaktır. Yani TAC düzeyi ne kadar yüksek olursa glutatyon eş değeri de o kadar yüksek olacaktır. DMPD yöntemiyle dolaylı olarak ölçülen TOC düzeyinin hastalarda düşük çıkmasının nedeni ise hasta serumlarında reaktif oksijen türlerini süpürebilecek antioksidanların olasılıkla yüksek oluşundan kaynaklanmaktadır.

DMPD seviyesinin antioksidan seviyesi daha yüksek gözlenen akciğer kanserli grupta kontrole göre düşük olması bu hasta serumlarındaki oksidan süpürme özelliğinin kontrole göre daha düşük olmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

ABTS yöntemi de ortamda bulunan ABTS radikal katyonunun süpürülmesine dayanmaktadır. Tiyoller hastalık durumunda vücut savunmasında kullanılan en önemli maddelerdir. Ancak ABTS yönteminde tiyollerin fizyolojik ortamda olduğu düşünülen aksine karşılık gelen disülfürlere değil sülfenik ve sülfenik asitlere dönüştüğü ve aslında olması gerektiğinden daha yüksek değerler verdiği de bilinmektedir.

Ayrıca ortamda hücre yıkımından kaynaklanabilecek ürik asidin bulunması durumunda ABTS yönteminde antioksidan olarak reaksiyon veren ürik asidin (174) de antioksidan düzeylerindeki bu yüksekliğe sebep olabileceği gözden kaçırılmamalıdır. Çalışmamızda bu şekilde ölçülen ABTS değeri de beklenildiği üzere akciğer kanserli hastalarımızda kontrol grubuna göre ileri düzeyde anlamlı çıkmış ve bu da antioksidan seviyelerini hasta serumlarındaki bir şekilde gerek ortamdaki hücre yıkımı gerekse de oksidan ortamın artması gibi etkenlerden dolayı kontrol grubuna göre yüksek antioksidan durumu belirtmektedir.

Çalışmamızın sonucunda;

CUPRAC yöntemine göre akciğer kanseri hastalarında total antioksidan miktarı (kontrollere) göre yükselmiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark yakalanamamıştır. TBARS yöntemine göre antioksidan seviyesi akciğer kanseri hastalarında kontrollere göre yine yüksek olup anlamlılığa yakın bulunmuştur ($p=0,074$).

Aynı hastaların serumlarındaki total oksidan miktarları DMPD ve TBARS yöntemiyle ölçülmüştür. DMPD yöntemi kullanılarak elde edilen bulgulara göre akciğer kanseri hastalarında oksidan seviyesi kontrollere göre düşük bulunmuştur ve istatistiksel olarak da anlamlılık yakalanmıştır ($p=0,017$). Ancak ABTS yöntemi sonuçlarına göre hastalarda antioksidan miktarı daha yüksek bulunmuştur. Akciğer kanseri hastalarda ortalama oksidan miktarı $3,45\pm 0,82$ iken kontrollerde $3,01\pm 0,942$ olup aradaki bu fark istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$).

Oksidan-antioksidan parametreleri hastaların sigara ve alkol içme ve tümör evrelerine göre değerlendirilmiştir ancak anlamlı farklılıklar bulunamamıştır.

SOD1, GPX1 ve Katalaz genlerindeki varyasyonlar enzimlerin aktivitelerini etkilemesi nedeniyle bireylerin genotiplerine göre oksidan ve antioksidan seviyeleri birlikte değerlendirilmiş olup aralarında anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir.

Çalışmamız, oksidan ve antioksidan sistemleri çeşitli öncü biyomoleküller üzerinden değerlendirilmeyi amaçlayan TBARS, CUPRAC, ABTS ve DMPD ölçüm metotları kullanılarak akciğer kanserli hastalar ile sağlıklı bireylerin serumlarındaki durumu çeşitli antioksidan enzimlerin genetik varyantları ile beraber ele alan literatürdeki ilk çalışmadır. Bu çalışmada elde edilen verilerle hasta serumlarındaki yüksek oksidatif hasar ve bunu kompanse etmek üzere aktivasyon gösteren antioksidan sistemin ön planda rol alabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Jackson JH. Potential molecular mechanisms of oxidant-induced carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1994;102 Suppl 10:155–157.
2. Hakan Akca, Aydin Demiray, Mutay Aslan, İbrahim Acikbaş, Onur Tokgün, Tumour suppressor PTEN enhanced enzyme activity of GPx, SOD and catalase by suppression of PI3K/AKT pathway in non-small cell lung cancer cell lines, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2013; 28 (3): 539-544
3. Arseniy E. Yuzhalin¹ & Anton G. Kutikhin, Inherited variations in the SOD and GPX gene families and cancer risk *Free Radical Research*, May 2012; 46 (5): 581–599
SHAHIDI, F., 1996, *Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects and Applications*, AOCS Press, Champaign, Illinois, 0-935315-77-2.
4. Cash T. P., Yi Pan, Simon M. C., 2007, Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing, *Free Radical Biology & Medicine*, 43, 1219–1225.
5. BEKTAŞOĞLU B., 2007, Hidroksil radikal süpürülmesine dayalı antioksidan aktivite ölçümünde yeni bir yöntem geliştirilmesi, Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
6. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., "Antioxidant Activity Applying And Improved Abts Radical Cation decolorization assay ", *Free Radical Biol. Med.*, 26 (1999) 1231.
7. Kara N., 2011, Serumda Toplam Antioksidan Kapasitenin Modifiye Cuprac (Bakır (I) İndirgeme Esaslı Antioksidan Kapasite) Metoduyla Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
8. Özyürek M., Bektaşoğlu B., Güçlü K., Apak R., 2008, Hydroxyl Radical Scavenging Assay Of Phenolics And Flavonoids With A Modified Cupric Reducing Antioxidant Capacity (Cuprac) Method Using Catalase For Hydrogen Peroxide Degradation, *Analytica Chimica Acta*, 616, 196–206.
9. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J., 2007, Free Radicals And Antioxidants In Normal Physiological Functions And human disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84
10. Arseniy E. Yzhalin, Anton G. Kutikhin, Inherited variations in the SOD and GPX gene families and cancer risk, *Free Radical Research*, May 2012; 46 (5): 581-599

11. Tang H, Dong X, Day RS, Hassan MM, Li D. Antioxidant genes, diabetes and dietary antioxidants in association with risk of pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 2010; 31:607-13. (PMID: 20097730)
12. Rajkumar S, Praveen MR, Gajjar D, Vasavada AR, Alapure B, Patel D, Kapur S. Activity of superoxide dismutase isoenzymes in lens epithelial cells derived from different types of age-related cataract. *J Cataract Refract Surg* 2008; 34:470-4. (PMID: 18299074).
13. Teixeira HD, Schumacher RI, Meneghini R. Lower intracellular hydrogen peroxide levels in cells overexpressing CuZn-superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 7872–5.
14. Tiwari AK, Prasad P, Kumar BKT, Ammini AC, Gupta A, Gupta R. Oxidative stress pathway genes and chronic renal insufficiency in Asian Indians with Type 2 diabetes. *J Diabetes Complications* 2009; 23:102-11. (PMID: 18413200)
15. Oxidative response gene polymorphisms and risk of adult brain tumors. *Neuro-oncol* 2008; 10:709-15. (PMID:18682580)
16. Baliga MS, Wang H, Zhuo P, Schwartz JL, Diamond AM. Selenium and GPx-1 overexpression protect mammalian cells against UV-induced DNA damage. *Biol Trace Elem Res* 2007; 115:227–42.
17. Zhang X, Yang JJ, Kim YS, Kim KY, Ahn WS, Yang S. An 8-gene signature, including methylated and down-regulated glutathione peroxidase 3, of gastric cancer. *Int J Oncol* 2010; 36:405–414.
18. Moscow JA, Schmidt L, Ingram DT, Gnarr J, Johnson B, Cowan KH, et al. Loss of heterozygosity of the human cytosolic glutathione peroxidase I gene in lung cancer. *Carcinogenesis* 1994; 15:2769–2773.
19. Flekac M, Skrha J, Hilgertova J, Lacinova Z, Jarolimkova M. Gene polymorphisms of superoxide dismutases and catalase in diabetes mellitus. *BMC Med Genet* 2008; 9:30. (PMID:18179706)
20. Cebrian A, Pharoah PD, Ahmed S, Smith PL, Luccarini C, Luben R, Redman K, Munday H, Easton DF, Dunning AM, Ponder BA. Tagging Single-Nucleotide Polymorphisms in Antioxidant Defense Enzymes and Susceptibility to Breast Cancer. *Cancer Res* 2006; 66:1225-33. (PMID: 16424062)

21. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160:1–40.
22. Wang.D, FengJF , Zeng.P, Yang.YH, Luo.Jand i Yang.YW. Total oxidant/antioxidant status in sera of patients with thyroid cancers .*Endocrine-Related Cancer* (2011) 18 773–782
23. Demirci Çekiç, Çetinkaya. A, Neslihan Avan.A And Apak, R., 2013, Correlation of total antioxidant capacity with reactive oxygen species (ROS) consumption measured by oxidative conversion.dx.doi/10.1021/jf3051297.
24. Pihlanto, A., 2006, Antioxidative Peptides Derived From Milk Proteins, *International Dairy Journal*, 16, 1306-1314.
25. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., "Antioxidant Activity Applying And Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay ", *Free Radical Biol. Med.*, 26 (1999) 1231.
26. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004, Novel Total Antioxidant Index For Dietary Polyphenols And Vitamins C And E, Using Their Cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981
27. Ten Leading Cancer Types for the Estimated New Cancer Cases and Deaths by Sex, United States, 2012.
28. Spiro SG, Porter JC: Lung Cancer-Where Are We Today? Current Advances In Staging And Nonsurgical Treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1166-96
29. Parkin GM, Pisani P, Ferlay J. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 1999; 49: 33-64
30. Jemal A, Thomas A, Murray T Et Al. Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2002;52: 23-47
31. Halilçolar H, Tatar D, Ertuğrul G Ve Ark. Epidemiyoloji. In: Akkoçlu A, Öztürk C; Eds. Akciğer Kanseri Multidisipliner Yaklaşım. Toraks Kitapları, Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 1999:17-22
32. Radzikowska E, Raszkowski K, Glaz P. Lung Cancer In Patients Under 50 Years Old. *Lung Cancer* 2001;33:203-11.

33. Çırak K, Tatar D, Özacar R, Halilçolar H. 40 Yaş Altı Akciğer Kanseri Olgularımız. XXI. Ulusal Türk Tüberküloz Ve Göğüs Hastalıkları Kongresi Kitabı 1996; 417-22
34. Turkish Thoracic Society, Lung And Pleural Malignancies Study Group. Pattern Of Lung Cancer In Turkey 1994-1998. *Respiration* 2002;69:207-10
35. İtil O. Akciğer Kanserlerinin Epidemiyolojisi Ve Etyolojisi. In: Haydaroğlu A; Ed. Akciğer Kanserleri: Tanı Ve Tedavi. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi; 2000:15-34.
36. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011 Mar-Apr;61 (2):69-90.
37. Arslan S, Bölükbağ N, (2003) Kanserli Hastalarda Yaşam Kalitesinin Değerlendirilmesi, *AÜHYO Dergisi*, 6 (3):38-48
38. Turkish Thoracic Society, Lung And Pleural Malignancies Study Group. Pattern Of Lung Cancer In Turkey 1994-1998. *Respiration* 2002;69:207-10
39. Akciğer ve Plevra Maligniteleri Çalışma Grubu. Akciğer kanseri tanı ve tedavi rehberi. *Toraks Dergisi* 2006; 7 (Ek 2): 1-37.
40. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest* 2003; 123: 21s-49s.
41. Crofton J, Douglas A. Lung cancer. In: Crofton J, Douglas A, eds. *Respiratory diseases*. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science 1981;631-69.
42. Fraser RS, Müller NL, Colman N, Pare PD. *Diagnosis of Diseases of the Chest Pulmonary Carcinoma*. 4th edition. Philadelphia. 1999. 1070-1228
43. Haiman CA, Stram DO, Wilkens LR, et al. Ethnic and racial differences in the smoking-related risk of lung cancer. *N Engl J Med.* 2006; 354:333.
44. Chen CL, Hsu LI, Chiou HY, et al. Ingested arsenic, cigarette smoking, and lung cancer risk: A follow-up study in arseniasis-endemic areas in Taiwan. *JAMA.* 2004; 292:2984.
45. İtil O. Akciğer kanserlerinin epidemiyolojisi ve etyolojisi. In: Haydaroğlu A; ed. Akciğer kanserleri: Tanı ve tedavi. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi; 2000:15-34.
46. Turkish Thoracic Society, Lung and Pleural Malignancies Study Group. Pattern of lung cancer in Turkey 1994-1998. *Respiration* 2002;69:207-10.
47. Spitz MR, Hong WK, Amos CI, Wu X, Schabath MB, Dong Q, Shete S, Etzel CJ. A risk model for prediction of lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:715-26.

48. Ishii Y. (Smoking and respiratory diseases). *Nihon Rinsho*. 2013 Mar;71 (3):416-20. Review. Japanese. PubMed PMID: 23631228.
49. Papa L, Manfredi G, Germain D. SOD1, an unexpected novel target for cancer therapy. *Genes Cancer*. 2014 Apr;5 (1-2):15-21. Review. PubMed PMID: 24955214;PubMed Central PMCID: PMC4063254.
50. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer:the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010 Jun;17 (6):1471-4. PubMed PMID: 20180029.
51. Du Y, He Y, Mei Z, Qian L, Shi J, Jie Z. Association between genetic polymorphisms in XPD and XRCC1 genes and risks of non-small cell lung cancer in East Chinese Han population. *Clin Respir J*. 2014 Oct 13. doi: 10.1111/crj.12218. (Epub ahead of print) PubMed PMID: 25308691.
52. (*Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri ile İlişkisi* Buket AYDEMİR, Ebru KARADAĞ SARI derleme *Kocatepe Vet J* (2009) 2 (2):56-60)
53. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; **21** (3): 361-70.
54. Schumacker PT. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell* 2006; **10**: 175–6.
55. A. Singh, V. Misra, R. K. Thimmulappa, H. Lee, S. Ames, M. O. Hoque, J. G. Herman, S. B. Baylin,D. Sidransky, E. Gabrielson, M. V. Brock, S. Biswal, Dysfunctional KEAP1–NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLOS Med*. 3, e420 (2006).12. *Cancer*
56. Nishikawa M. Reactive oxygen species in tumor metastasis. *Cancer Lett*. 2008 Jul 18;266 (1):53-9. doi: 10.1016/j.canlet.2008.02.031. Epub 2008 Mar 24. Review. PubMed PMID: 18362051.
57. Genome Atlas Research Network, Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 489, 519–525 (2012.)
58. Halliwell B. Reactive Oxygen Species In Living System:Source, Biochemistry And Role In Human Disease. *Am J Med* 1991; 91: 14S-21S.
59. Cheeseman KH, Slater. An Introduction To Free Radical Biochemistry. *Br Med Bull* Jul TF. 1993; 49 (3): 481-93.
60. Wu D.,Cederbauma.J. Alcohol,Oxidative Stres And Free Radical Damage. *Alcohol Research And Health*. 2003; 4: 277-284

61. Cadenas E, Biochemistry Of Oxygen Toxicity, Ann. Rev. Biochem. 1989;58:79–110.
62. Carroll E. Cross. Oxygen Radicals And Human Disease. Ann Intern Med 1987; 107: 526 - 545.
63. Rice-Evans C, Halliwell B, Lunt GG. 1995. Free Radicals And Oxidative Stress: Environment, Drugs And Food Additives. Biochemical Society Symposium, 61: 247-258.
64. Sorg O., Oxidative Stress: A Theoretical Model Or Biological Reality?. C. R. Biologies 2004; 327, 649-662.
65. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radical In Biology And Medicine. Oxford:Oxford Sci Publ; 1999.
66. Halliwell, B. And Gutteridge, J.M.C., Free Radicals In Biology And Medicine, 3.Ed. 2000; Oxford New York
67. Wickens, A.P., Ageing And Free Radical Theory. Respiration Physiology, 2001;128, 379–391.
68. Halliwell, B., Gutteridge, J.M., Free Radicals In Biology And Medicine, Second Ed 1989; Oxford University Press, Oxford.
69. Vishal-Tandon, M. D., B. M. Gupta, And R. Tandon. "Free Radicals/Reactive Oxygen Species." *JK Practitioner* 12.3 (2005): 143-148.
70. NORDBERG, J. And ARNÉR, E.S.J Reactive Oxygen Species, Antioxidants, And The Mammalian Thioredoxin System. Free Radical Biol. Med., ., 2001; 31, 1287–1312.
71. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free Radicals, Antioxidants, And Nutrition. Nutrition. 2002 Oct;18 (10):872-9. Review. Pubmed PMID: 12361782.
72. Thornaley, P.J. And Vasak M.,. Possible Role Of Metallothionein In Protection Against Radiation-Induced Oxidative Stress: Kinetics And Mechanism Of Its Reaction With Superoxide And Hydroxyl Radicals, Biochem. Biophys. Acta., 1985;827, 35–44.
73. Shacter, E.,. Protein Oxidative Damage. Methods Enzymol. 2000;319, 428-436.
74. Erenel, G., Erbaş, D. Ve Arıcıoğlu, A.,. Serbest Radikaller Ve Antioksidan Sistemler. Gazi Tıp Derg., 1992;3, 243-250.
75. Halliwell B, And Gutteridge JMC. Free Radicals In Biology And Medicine. Newyork: Oxford University Press Đnc 2007: 55-79.

76. Kehrer, J. P., , Free Radicals As Mediators Of Tissue Injury And Disease, Crit. Rev. Toxicol, 1993; 23, 21-28.
77. Aydin, A., Sayal, A. Ve Işimer, A.,. Serbest Radikaller Ve Antioksidan Savunma Sistemi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Ayın Kitabı. 2001
78. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological Aspects Of Active Oxygens/Free Radicals. Jpn J Physiol 1996; 46: 15-32.
79. Yalçın AS. Antioksidanlar. *Klinik Gelisim* 1998; 11: 342-346.
80. Mccall MR, Frei B. Can Antioxidant Vitamins Materially Reduce Oxidative Damage In Humans? *Free Rad. Biol. Med* 1999 Apr; **26 (7-8)**: 1034-53.
81. Dickinson, D.A. And Forman, H.J.,. Cellular Glutathione And Thiols Metabolism. *Biochem. Pharmacol.*, 2002;64, 1019-1026.
82. Mytilineou, C., Kramer, B.C. And Yabut, J.A., 2002. Glutathione Depletion And Oxidative Stress. *Parkinsonism Relat. D*, 8, 385-387.
83. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis Of Glutathione: Implication In Redox And Detoxification. *Clin Chim Acta*, 2003;333, 19-39
84. Zahide Çavdar, Mehtap Yüksel Eğrilmez, Memduh Bülbül, Gül Güner, Semra Koçtürk Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İle Eritrositlerde Toplam Ve İndirgenmiş Glutatyon Miktarının Tayini Türk Biyokimya Dergisi (Turkish Journal Of Biochemistry–Turk J Biochem) 2006; 31 (4) ; 187–193
85. Helmut S. Oxidative Stress: Oxidants And Antioxidants. *Exp Physiol*. 1997; 82: 291- 295.
86. Mates JM, Sanchez-Jimenez F. Antioxidant Enzymes And Their Implications In Pathophysiologic Processes. *Front Biosci*. 1999; 4: 339-345.
87. Sumner, James B., And Dounce, Alexander L. Crystalline Catalase. *J. Biol. Chem.*, 1937;12, 417-424.
88. Goth, L., Rass, P., Pay, A.. Catalase Enzyme Mutations And Their Associations With Diseases. *Mol. Diagn*. 2004;8 (3): 141-149.
89. Ahn J, Nowell S, Mccann SE, Yu J, Carter L, Lang NP, Kadlubar FF, Ratnasinghe LD, Ambrosone CB. Associations Between Catalase Phenotype And Genotype: Modification By Epidemiologic Factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Jun;15 (6):1217-22. Pubmed PMID: 16775184.
90. MILLS, G. C., *J. Biol. Chem.*, 234, 502 (1959).

91. Frei B Reactive Oxygen Species And Antioxidant Vitamins: Mechanisms Of Action. *Am J Med.* 1994 Sep 26;97 (3A):5S-13S; Discussion 22S-28S. Review. Pubmed PMID: 8085584.
92. Awasthi YC, Dao DD, Lal AK, Srivastava SK. Purification And Properties Of Glutathione Peroxidase From Human Placenta. *Biochem J* 1979; **177**: 471-6.
93. Deponte M. Glutathione Catalysis And The Reaction Mechanisms Of Glutathione-Dependent Enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 2013 May;1830 (5):3217-66.
94. Grossmann A, Wendel A. Non-Reactivity Of The Selenoenzyme Glutathione Peroxidase With Enzymically Hydroperoxidised Phospholipids. *Eur J Biochem* 1983;**135**: 549–52.
95. Sunde RA. Molecular Biology Of Selenoproteins. *Annu Rev Nutr* 1990; **10**: 451–74.
96. Ratnasinghe D, Tangrea JA, Andersen MR, Barrett MJ, Virtamo J, Taylor PR, Albanes D. Glutathione Peroxidase Codon 198 Polymorphism Variant Increases Lung Cancer Risk. *Cancer Res.* 2000 Nov 15;60 (22):6381-3.
97. Hu Y, Benya RV, Carroll RE, Diamond AL. Allelic Loss Of The Gene For The GPX1 Selenium-Containing Protein Is A Common Event In Cancer. *International Conference On Diet, Nutrition, And Cancer. J Nutr.* 2005; 135:3021-3024
98. Hu YJ, Diamond AM. Role Of Glutathione Peroxidase 1 In Breast Cancer: Loss Of Heterozygosity And Allelic Differences In The Response To Selenium. *Cancer Res.* 2003; 63:3347–3351
99. Ravn-Haren G, Olsen A, Tjønneland A, Dragsted LO, Nexø BA, Wallin H, Overvad K, Raaschou-Nielsen O, Vogel U. Associations Between GPX1 Pro198Leu Polymorphism, Erythrocyte GPX Activity, Alcohol Consumption And Breast Cancer Risk In A Prospective Cohort Study. *Carcinogenesis.* 2006; 27: 820–825.
100. Ahn J, Gammon MD, Santella RM, Gaudet MM, Britton JA, Teitelbaum SL, Terry MB, Neugut AI, Ambrosone CB.. No Association Between Glutathione Peroxidase Pro198Leu Polymorphism And Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005; 14: 2459-2461.
101. Hansen R, Saebo M, Skjelbred CF, Nexø BA, Hagen PC, Bock G, Lothe B, Johnson E, Aase S, Hansteen I GPX Pro198Leu And OGG1 Ser326-Cys

- Polymorphisms And Risk Of Development Of Colorectal Adenomas And Colorectal Cancer. *Cancer Lett* .2005; 229:85–91.
102. Mccord JM, Fridovich I. Superoxide Dismutase. An Enzymic Function For Erythrocyte (Hemocytin). *J Biol Chem*. 1969 Nov 25;244 (22):6049-55.
103. AKKUS, I., 1995. Serbest Radikaller Ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, 38, Kuzucular Ofset, Konya-Türkiye.
104. Rıgo, A., Stevanato, R., Finazzi-Agro, A. And Rotilio, G., An Attempt To Evaluate The Rate Of The Haber-Weiss Reaction By Using Oh Radical Scavengers. *Febs Lett* 1977; 80, 130-132.
105. Deaton C.M. And Marlin D.J., 2003. Exercise-Associated Oxidative Stress, *Clin. Tech. Equine Pract*, Vol 2, No 3, 278-291.
106. Buettner GR. *Antioxidant Enzymes And Functions*. Washington D.C: Sunrise Free Radical School; 1998
107. Fridovich, I. Oxidative Stress. *Encyclopedia Of Life Sciences*, Nature Publishing Group, [Www.Els.Com](http://www.Els.Com), 2001
108. Hirayama K., Unohara N., Spectrophotometric Catalytic Determination Of An Ultratrace Amount Of Iron (III) In Water Based On The Oxidation Of N,N-Dimethyl-P-Phenylenediamine By Hydrogen Peroxide, *Anal. Chem.*, 1988;60, 2573-2577.
109. Bektaşoğlu B., , *Hidroksil Radikal Süpürülmesine Dayalı Antioksidan Aktivite Ölçümünde Yeni Bir Yöntem Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2007
110. Gutteridge, J.M.C., , Ferrous Salt Promoted Damage To Deoxyribose And Benzoate, *Biochemical Journal*, 1987;243, 709-714.
111. Özyürek M., Güçlü K., Apak R., The Main And Modified CUPRAC Methods Of Antioxidant Measurement, *Trends In Analytical Chemistry*, 2011;30 (4), 652-664.
112. Özyürek M., *Reaktif Oksijen Türleri Süpürücü Antioksidan Aktivitenin Ölçümünde Modifiye Cuprac Yöntemlerinin Geliştirilmesi*, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü. 2009
113. Bektaşoğlu B., Özyürek M., Güçlü K., Apak R., , Hydroxyl Radical Detection With A Salicylate Probe Using Modified CUPRAC Spectrophotometry And HPLC, *Talanta*, 2008;77, 90–97.

114. Apak, R.; Güçlü, K.; Özyürek, M.; Karademir, S.E. And M. Altun, Total Antioxidant Capacity Assay Of Human Serum Using Copper (II)- Neocuproine As Chromogenic Oxidant: The CUPRAC Method, *Free Radical Research*, 2005;39, 949.
115. Demirci Çekiç, S., Sözgen Başkan, K., Tütem, E. And Apak, R., Modified Cupric Reducing Antioxidant Capacities Of Thiol-Containing Proteins In Admixture With Polyphenols, *Talanta*, 2009;79, 344-351.
116. Gao W, Liu L, Lu X, Shu Y. Circulating microRNAs: possible prediction biomarkers for personalized therapy of non-small-cell lung carcinoma. *Clin Lung Cancer*. 2011 Jan;12 (1):14-7. Review.
117. Türk Toraks Dergisi Ek - Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavi Rehberi August 2006, Cilt 7, Sayı 2, Sayfa (lar) 001-035
http://toraks.dergisi.org/pdf/pdf_Toraksder_494.pdf
118. Paesmans M. Stage IV NSCLC. Prognostic factors. *Rev. Mal. Respir.* 2008 Oct ; 25 (8.Pt.2) 3S 99-106
119. Crofton J, Douglas A. Lung cancer. In: Crofton J, Douglas A, eds. *Respiratory diseases*. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science 1981;631-69.
120. Can Oxidative Stress be an Index in the Differential Diagnosis of Benign and Malign Pulmonary Diseases? *Mehmet Gencer**, *Erkan Ceylan**, *Nurten Aksoy***, *Kürşat Uzun**** *Turkiye Klinikleri Arch Lung* 2005;6 (3):89-92
121. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol* 1996; 46: 15-32.
122. Yu BP. Cellular defences againts damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994; 74: 139-162.
123. Erythrocyte Catalase Activities in Chronic Leukemias (Kronik lösemili hastalarda eritrosit içi katalaz aktiviteleri) İ. Çetin Öztürk, Engin M. Gözükara, V. Akın Uysal JIUTF, 1997; 4 (1) 7-9
124. Buket AYDEMİR, Ebru KARADAĞ SARI *Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri ile İlişkisi* derleme *Kocatepe Vet J* (2009) 2 (2):56-60
125. Sorg O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *C R Biol.* 2004 Jul;327 (7):649-62. Review. PubMed PMID: 15344815.

126. Faucher K, Rabinovitch-Chable H, Cook-Moreau J, Barriere G, Sturtz F, Rigaud M. Overexpression of human GPX1 modifies Bax to Bcl-2 apoptotic ratio in human endothelial cells. *Mol Cell Biochem* 2005; 277: 81–7.
127. De Haan JB, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea RD, Cheung NS, et al. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1998 Aug 28; 273 (35): 22528-36.
128. Ho JC, Chan-Yeung M, Ho SP, Mak JC, Ip MS, Ooi GC, et al. Disturbance of systemic antioxidant profile in nonsmall cell lung carcinoma. *Eur Respir J* 2007; 29:273–8.
129. Ratnasinghe, D, Tangrea J.A, Andersen MR, Barrett Mj, Virtamo J, Taylor PR, Albanes D. Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. *Cancer Res.* 2000; 60:6381-6383.
130. Lee CH, Lee KY, Choe KH, Hong YC, Noh SI, Eom SY, Ko YJ, Zhang YW, Yim DH, Kang JW, Kim H, Kim YD. (Effects of oxidative DNA damage and genetic polymorphism of the glutathione peroxidase 1 (GPX1) and 8-oxoguanine glycosylase 1 (hOGG1) on lung cancer). *J Prev Med Public Health.* 2006 Mar; 39 (2):130-4. Korean. PubMed PMID: 16615267.
131. Paz-y-Miño C, Muñoz MJ, López-Cortés A, Cabrera A, Palacios A, Castro B, Paz-y-Miño N, Sánchez ME. Frequency of polymorphisms pro198leu in GPX-1 gene and ile58thr in MnSOD gene in the altitude Ecuadorian population with bladder cancer. *Oncol Res.* 2010; 18 (8):395-400.
132. Ravn-Haren G, Olsen A, Tjønneland A, Dragsted LO, Nexø BA, Wallin H, Overvad K, Raaschou-Nielsen O, Vogel U. Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis.* 2006; 27: 820–825.
133. Arsova-Sara Wnovska Z, Matevska N, Eken A, Petrovski D, Banev S, Dzikova S, Georgiev V, Sikole A, Erdem O, Sayal A, Aydin A, Dimovski AJ (2009) Glutathione peroxidase 1 (GPX1) genetic polymorphism, erythrocyte GPX activity, and prostate cancer risk. *Int Urol Nephrol* 41 (1):63–70
134. Moscow JA, Schmidt L, Ingram DT, Gnarr J, Johnson B and Cowan KW. Loss of heterozygosity of the human cytosolic glutathione peroxidase I gene in lung cancer. *Carcinogenesis.* 1994; 15: 2769-2773.

135. Xin GL, Cheng WH, McClung JP. Metabolic Regulation and Function of Glutathione Peroxidase-1. *Annu Rev Nutr.* 2007; 27:41–61.
136. Ichimura Y, Habuchi T, Tsuchiya N, Wang L, Oyama C Sato K, Nishiyama H, Ogawa O, Kato T. Increased risk of bladder cancer associated with a glutathione peroxidase 1 codon-198 variant. *J Urol.* 2004; 172: 728–732.
137. Cebrian A, Pharoah PD, Ahmed S, Smith PL, Luccarini C, Luben R, Redman K, Munday H, Easton DF, Dunning AM, Ponder BA. Tagging singlenucleotide polymorphisms in antioxidant defense enzymes and susceptibility to breast cancer. *Cancer Res.* 2006; 66: 1225–1233.
138. Ravn-Haren G, Olsen A, Tjønneland A, Dragsted LO, Nexø BA, Wallin H, Overvad K, Raaschou-Nielsen O, Vogel U. Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis.* 2006; 27: 820–825.
139. Ratnasinghe, D, Tangrea J.A, Andersen MR, Barrett Mj, Virtamo J, Taylor PR, Albanes D. Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. *Cancer Res.* 2000; 60:6381-6383.
140. Lee CH, Lee KY, Choe KH, Hong YC, Noh SI, Eom SY, Ko YJ, Zhang YW, Yim DH, Kang JW, Kim H, Kim YD. (Effects of oxidative DNA damage and genetic polymorphism of the glutathione peroxidase 1 (GPX1) and 8-oxoguanine glycosylase 1 (hOGG1) on lung cancer). *J Prev Med Public Health.* 2006 Mar;39 (2):130-4. Korean. PubMed PMID: 16615267.
141. Jaworska K, Gupta S, Durda K, Muszyńska M, Sukiennicki G, Jaworowska E, Grodzki T, Sulikowski M, Waloszczyk P, Wójcik J, Lubiński J, Cybulski C, Dębniak T, Lener M, Morawski AW, Krzystolik K, Narod SA, Sun P, Lubiński J, Jakubowska A. A low selenium level is associated with lung and laryngeal cancers. *PLoS One.* 2013;8 (3):e59051.
142. Kucukgergin C, Gokpınar M, Sanlı O, Tefik T, Oktar T, Seckin S. Association between genetic variants in glutathione peroxidase 1 (GPx1) gene, GPx activity and the risk of prostate cancer. *Minerva Urol Nefrol.* 2011 Sep;6 (3):183-90.
- Ratnasinghe D, Tangrea JA, Andersen MR, Barrett MJ, Virtamo J, Taylor PR, Albanes D (2000) Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. *Cancer Res* 60 (22):6381–6383

143. Li S, Yan T, Yang JQ, Oberley TD, Oberley LW. The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res* 2000 Jul 15; 60 (14): 3927-39.
144. Zhang Y, Zhao W, Zhang HJ, Domann FE, Oberley LW. Overexpression of copper zinc superoxide dismutase suppresses human glioma cell growth. *Cancer Res* 2002 Feb 15; 62 (4): 1205-12.
145. Lu, W., Ogasawara, M. A., and Huang, P. (2007) Models of reactive oxygen species in cancer. *Drug Discov. Today Dis. Models* 4, 67–73
146. Bellot, G. L., Liu, D., and Pervaiz, S. (2013) ROS, autophagy, mitochondria and cancer: Ras, the hidden master? *Mitochondrion* 13, 155–162
- Papa, Luena, et al. "SOD2 to SOD1 switch in breast cancer." *Journal of Biological Chemistry* 289.9 (2014): 5412-5416
147. Papa Luena, Giovanni Manfredi, and Doris Germain. "SOD1, an unexpected novel target for cancer therapy." *Genes & cancer* 5.1-2 (2014): 15.
148. Lemarie A, Grimm S. Mitochondrial respiratory chain complexes: apoptosis sensors mutated in cancer? *Oncogene*. 30 (38):3985–4003.
149. Huang P, Feng L, Oldham EA, Keating MJ, Plunkett W. Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature*. 2000;407 (6802):390–395
150. Rajaraman P, Brenner AV, Butler MA, Wang SS, Pfeiffer RM, Ruder AM, et al. Common variation in genes related to innate immunity and risk of adult glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:1651 – 1658.
151. Rajaraman P, Hutchinson A, Rothman N, Black PM, Fine HA, Loeffler JS, et al. Oxidative response gene polymorphisms and risk of adult brain tumors. *Neuro Oncol* 2008;10:709 – 715
152. Erythrocyte Catalase Activities in Chronic Leukemias İ. Çetin Öztürk, Engin M Gözükara, Akın Uysal Turgut Özal *Tıp Merkezi dergisi* (1997;4 (1):7-9)
153. Wells PG, McCallum GP, Chen CS, Henderson JT, Lee CJ, Perstin J, Preston TJ, Wiley MJ & Wong AW 2009 Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicological Sciences* 108 4–18. (doi:10.1093/toxsci/kfn263)
154. Senthil N & Manoharan S 2004 Lipid peroxidation and antioxidants status in patients with papillary thyroid carcinoma in India. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 13 391–395.

155. Akinci M, Kosova F, Cetin B, Sepici A, Altan N, Aslan S & Cetin A 2008 Oxidant/antioxidant balance in patients with thyroid cancer. *Acta Cirúrgica Brasileira* 23 551–554. (doi:10.1590/S0102-86502008000600013)
156. Lin JC, Kuo WR, Chiang FY, Hsiao PJ, Lee KW, Wu CW & Juo SH 2009 Glutathione peroxidase 3 gene polymorphisms and risk of differentiated thyroid cancer. *Surgery* 145 508–513. (doi:10.1016/j.surg.2008.12.008)
157. Laatikainen LE, Castellone MD, Hebrant A, Hoste C, Cantisani MC, Laurila JP, Salvatore G, Salerno P, Basolo F, Naqisman J et al. 2010 Extracellular superoxide dismutase is a thyroid differentiation marker down-regulated in cancer. *Endocrine-Related Cancer* 17 785–796. (doi:10.1677/ERC-10-0021)
158. Young O, Crotty T, O’Connell R, O’Sullivan J & Curran AJ 2010 Levels of oxidative damage and lipid peroxidation in thyroid neoplasia. *Head & Neck* 32 750–756. (doi:10.1002/hed.21247)
159. Sezgi C, Taylan M, Selimoglu Sen H, EvliyaoLlu O, Kaya H, Abakay O, Abakay A, Cetin TanrJkulu A, SenyiLit A, Oxidative Status and Acute Phase Reactants in Patients with Environmental Asbestos Exposure and Mesothelioma Hindawi Publishing Corporation The Scientific World Journal Volume 2014, Article ID 902748, 5 pages
160. Chukka K, Z. Vishnuvardhan Lipid Peroxidation, Free Radical Production and Antioxidant Status in Esophageal Cancer Patients *International Journal of Health Sciences & Research* (www.ijhsr.org) Vol.3; Issue: 11; November 2013
161. Abiaka C, Al-Awadi F, Al-Sayer H, Gulshan S, Behbehani A, Farghally M & Simbeye A 2001 Serum antioxidant and cholesterol levels in patients with different types of cancer. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 15 324–330. (doi:10.1002/jcla.1045)
162. Du ZX, Zhang HY, Meng X, Guan Y & Wang HQ 2009 Role of oxidative stress and intracellular glutathione in the sensitivity to apoptosis induced by proteasome inhibitor in thyroid cancer cells. *BMC Cancer* 9 56–67. (doi:10.1186/1471-2407-9-56)
163. Laatikainen LE, Castellone MD, Hebrant A, Hoste C, Cantisani MC, Laurila JP, Salvatore G, Salerno P, Basolo F, Naqisman J et al. 2010 Extracellular superoxide dismutase is a thyroid differentiation marker down-regulated in cancer. *Endocrine-Related Cancer* 17 785–796. (doi:10.1677/ERC-10-0021)

164. Erdamar H, Cimen B, Gu ĩlcemal H, Saraymen R, Yerer B & Demirci H 2010
Increased lipid peroxidation and impaired enzymatic antioxidant defense mechanism in
thyroid tissue with multinodular goiter and papillary carcinoma. *Clinical Biochemistry* 43
650–654. (doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.02.005)
165. “Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids” D. Koracevic, G.
Koracevic, V. Djordjevic, S. Andrejevic, V. Cosic, *J Clin Pathol*, 2001;54:356–361.
166. “Comparative evaluation of antioxidant reactivity within obstructed and control rabbit
urinary bladder tissue using FRAP and CUPRAC assays” H. Bean, F., Radu, E. De, C., .
Schuler, R. E. Leggett, R. M. Levin, **Mol Cell Biochem** (2009) 323:139–142.
167. “Erythrocyte sialic acid content during aging in humans: Correlation with markers of
oxidative stress”, M. M. Mehdi, P. Singh and S. I. Rizvi, **Disease Markers**, 32 (2012) 179–
186.
168. “Correlation of total antioxidant capacity with reactive oxygen species (ROS)
consumption measured by oxidative conversion” Sema Demirci ĀekiĀ, Aydan Āetinkaya,
Aslı Neslihan Avan, Resat Apak, **J. Agric. Food Chem.**, 2013, 61 (22), pp 5260–5270,
DOI: 10.1021/jf3051297
169. “Spectrophotometric Determination of Free Radicals and Reactive Oxygen Species with
N,N-Dimethyl-p-phenylenediamine” Kubo, K.; Arai, K.; Yoshimura, Y. **Bunseki Kagaku**,
2008, 57, 667-671.
170. “Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger
activity, and biomarkers of oxidative stress methodologies” Rivero-Pérez, M.D.; Muñiz, P.;
González-Sanjosé, M.L. **J. Agric. Food Chem.** 2007, 55, 5476-5483
171. “Total antioxidant capacity assay of human serum using copper (II)-neocuproine as
chromogenic oxidant: The CUPRAC method”. Apak, R., K. Gu ĩçlu ĩ, M. Özyu ĩrek, S.E.
Karademir, and M. Altun. **Free Radical Res.** 2005, 39 (9): 949-961.
172. “Protein-Incorporated Serum Total Antioxidant Capacity Measurement by a Modified
CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity) Method”, Sema Demirci ĀekiĀ, Nilay
Kara, Esmā Tütem, Kevser Sözgen Başkan, Reşat Apak, **Analytical Letters**, 45: 754-763,
2012.
173. “Comparative evaluation of antioxidant capacities of thiol-based antioxidants
measured by different in vitro methods” Nilay Gu ĩngör, Mustafa Özyu ĩrek,
Kubilay Gu ĩçlu ĩ, Sema Demirci ĀekiĀ, Reşat Apak, **Talanta**, 83 (2011) 1650–165
174. “Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis?” Nieto, F. J.;
Iribarren, C.; Gross, M. D.; Comstock G. W.; Cutler, R. G. **Atherosclerosis**. 2000, 148,
131–139.

175. (M. Erhola, M. M. Nieminen, P. Kellokumpu-Lehtinen, T. Metsä-Keelä, T. Poussa, and H. Alho, Plasma Peroxyl Radical Trapping Capacity in Lung Cancer Patients: A Case-Control Study, *Free Radical Research* 1997, Vol. 26, No. 5 , Pages 439-447).

HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 83045809/ 868
Konu:

İstanbul/...../.....

10 Ocak 2014

İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
Müdürlüğüne

İLGİ: 17.12.2013 tarihli,683 sayılı yazınıza:

Enstitünüz Moleküler Tıp Anabilim Dalı Prof.Dr. İlham YAYLIM'ın danışmanlığında Yüksek Lisans Öğr. Burnilda MEZANİ'nin sorumluluğunda yürütülecek olan " Akciğer Kanserinde Süperoksit Dismutaz, Katalaz ve Glutasyon Peroksidaz Gen Polimorfizmlerinin Oksidan-Antioksidan Sistem ile İlişkisinin İncelenmesi" başlıklı Yüksek Lisans Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 07 Ocak 2014 tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi,durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini rica ederim.

Prof.Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Eki
1 dosya

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:A-16	Tarih:07 Ocak 2014
Prof.Dr.İlhan YAYLIM'ın danışmanlığında Yüksek Lisans Öğr. Brunilda MEZANI'nin sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.		
ÇALIŞMA ESASI	İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI:	Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR	

ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR (Başkan)	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mehmet Faik ÖZÇELİK (Başkan Yard.)	Genel Cerrahi	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Muhlis Cem AR (Raportör)	İç Hastalıkları Hematoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Sebahattin SAIP	Nöroloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mahmut Reha BAYAR	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Nuran Şenel BEŞE	Radyasyon Onkolojisi	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Zeki ÖNGEN	Kardiyoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ertan YURDAKOŞ	Fizyoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Hatun Hanzade DOĞAN	Deontoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Sibel Özmen ÖZYAZGAN	Farmakoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Suphi VEHİD	Halk Sağlığı	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr.Yusuf TUNALI	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. Mutlu NIYAZOĞLU	İç Hastalıkları	İst. Eğitim ve Araştırma Hast.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Avukat Ayfer DİKMEN	Ticaret ve Sağlık Hukuku	Serbest Hukuk Bürosu	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Zümrüt GAMLI	Emekli Öğretmen	Sivil Üye	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

* :Araştırma ile ilişki

** :Toplantıda Bulunma

PATENT HAKKI İZİNİ

TELİF HAKKI İZİNİ

ÖZGEÇMİŞ

Ad:	BRUNİLDA
Soyad:	MEZANİ
Doğum Yeri:	BERAT, ARNAVUTLUK
Doğum Tarihi:	29.07.1983
Yabancı Dil:	İngilizce, Türkçe, Arnavutçe
E-Posta Adresi	fetahubrunilda@yahoo.com

Tarih	Eğitim
1998 – 2002	Ali Demi Lisesi, Vlore, Arnavutluk
2002 – 2006	Tirana Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya-Biyoloji Bölümü
2011 – 2012	Ankara Üniversitesi, TÖMER
2012-	İst.Ünv. DETAE Moleküler Tıp AD Yüksek Lisans
Mesleki Tecrübe	
20–30 nisan 2005	Lagün Makrobentosu'nun Araştırma Yöntemlerinin üzerinde Çalışmalar, Leçe Üniversitesi, İtali .
2007	Diploma Tezi: Patok, Karavasta ve Narta Lagünlerinin Makrozoobentos üzerinde Araştırmalarının Önsuçları.
Nisan 2009	TEMPO Projesi: Öğretme Yöntemleri Yarışmasında, “Eğitim Sürecinde Teknoloji” konulu projenin sunumu .
Mayıs 2010	TEMPO Projesi: Öğretme Yöntemleri Yarışmasında, “Eğitim Sürecinde Gösterme İşlemi” konulu projenin sunumu.
Mayıs 2011	Research work; Food diet decreases iron’s level in blood.
Akademik Etkinliklere Katılma	
2004	“Arnavutluk Sahil Lagünlerinin Makrobentos'unun Araştırılması. INTERREG 3 CADSES Projesi: Management and sustainable development of the transitional waters”
2006	“Vlora Körfezi'nin sualtı değerlerinden Bilinçlenme” Projesinde biyolog danışmanı. ADRIATIK, GEF/SGP Projesi

	INTERREG 3B CADSES Konferansı, Konuşmacı, Konu: “Study of macrozoobenthos of the Albanian coastal lagoons”; “ <i>Management and sustainable development of protected transitional waters</i> ”. Universiteti i Leçes, Itali.
2006	Seminar, Tirana Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji ABD, Konu: “Patok, Karavasta ve Narta Lagünlerinin Zoobentosu'nun Araştırma Sonuçları”, Konuşmacı
İş Teçrübesi	
2006 – 2007	Aulona & Xhyheri Özel Okulları, Part-time, Biyoloji – Kimi Öğretmeni
2007 – 2010	Aulona Özel Lisesi, Biyoloji – Kimi Öğretmeni
2010 – 2011	Internacional Özel Lisesi, Biyoloji Öğretmeni
Uluslararası Kongrelerde Yayınlanan Bildiri ve Posterler	
2007	Akademik Araştırmanın Waters Bulletin'de yayınlanması, TWB 3 (2007): Preliminary data on the macrozoobenthos of Albanian coastal lagoons (lagoons of Patok, Karavasta, Narta).
Temuz 2013	A Possible Association Between Manganese Superoxide Dismutase Genotypes and Antioxidants Markers in Acromegaly Patients, Paris
	Investigation of Myosin Heavy Chain Gene 11 (MYH11) ALA1234THR, TGF-β1 C-509T Polymorphisms and, TGF-β1 Levels on Coronary Artery Disease and Diabetes Mellitus Development in the Turkish Population, Paris.
Eylül 2014	5th International Congress on Cell membranes and Oxidative Stress: The Individual and Combined Effects of CTLA4-Cd28 variants and oxidant-antioxidant status on the development of colorectal Cancer, Isparta
Ekim 2014	Possible Association Between Manganese Superoxide Dismutase Genotypes and Antioxidants Markers in Acromegaly patients, İstanbul
Ekim 2014	MNSOD Serum Levels and Genetic variants: Possible Associations Between the Risk of Colorectal Cancer and Oxidant-Antioxidant status. İstanbul
Katıldığı Kongre-Staj	
Mayıs 2013	Sağlıkta İnovasyon, Üniversiteden Sanayiye, İzmir
Eylül 2014	5th International Congress on Cell membranes and Oxidative Stress,

	09-12 September.
Kasım 2014	Galektin-3 Gen Varyantlarının Larinks Kanseri Gelişimi ve Prognozu Üzerine Etkisinin İncelenmesi, İstanbul

Özgeçmiş Sahibinin Adı ve Soyadı:

Tarih: 22/12/2014

İmza: