

## NİTRİK OKSİT SENTAZ 3 (NOS3) GLU298ASP GEN VARYASYONUNUN MEME KANSERLİ HASTALARDA İNCELENMESİ

### INVESTIGATION OF NITRIC OXIDE SYNTHASE 3 (NOS 3) GLU298ASP GENE VARIATION IN BREAST CANCER PATIENTS

**AUTHOR: CANAN CACINA<sup>1</sup>, SOYKAN ARIKAN<sup>2</sup>, YEMLİHA YILDIZ<sup>1</sup>, BAHAR TOPTAŞ<sup>1</sup>, SAİME TURAN<sup>1</sup>, N. EZGİ ÖZKAN<sup>1</sup>, GURBET KORKMAZ<sup>1</sup>, SEDEN KÜÇÜCÜK<sup>3</sup>, İLHAN YAYLIM<sup>1</sup>, TURGAY İSBİR<sup>4</sup>**

**1. İstanbul Üniversitesi DETAE Moleküler Tıp A.B.D**

**2. İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği**

**3. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Onkoloji Enstitüsü Radyasyon Onkolojisi A.B.D**

**4. Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D**

#### ABSTRACT

The role of Nitric Oxide (NO) in tumour biology is not well understood. However, it has been proposed that NO is a highly reactive free radical and plays important roles in growth, progression or metastasis of tumour. Nitric oxide synthases (NOSs) are a family of enzymes that catalyzing the production of (NO) by converting L-arginine to L-citrulline. The aim of present study was to examine Nitric Oxide Synthase 3 (NOS3) Glu298Asp polymorphism in patients with breast cancer. For this purpose, 49 patients with breast cancer and 89 healthy controls were included in the study. The NOS3 Glu298Asp polymorphism were genotyped by PCR-RFLP using peripheral blood samples in our study groups. NOS3 Glu298Asp genotype distribution in the breast cancer patients [GG: 2(4.1%), GT: 22(44.9%), TT: 25(51%)] was statistically different from the healthy control group [GG: 25(28.1%), GT: 34(38.2%), TT: 30(33.7%)] ( $p=0.024$ ). NOS3 Glu298Asp gene variation T allele frequency was significantly higher in breast cancer patients that of controls ( $\chi^2=7.229$ ;  $p=0.007$ ; OR: 1.228;%95 CI: 1.065-1.415).

**Conclusion:** Our finding suggest that NOS3 Glu298Asp might be associated with breast cancer risk.

**Key words:** oxidative stress, NOS3 gene, variation

#### ÖZET

Nitrik Oksit'in (NO) tümör biyolojisindeki rolü tam olarak anlaşılamamış olmasına karşın tümörün büyümesi, gelişmesi ve metastaz gibi durumlarda önemli rol oynayan bir serbest radikal olduğu ileri sürülmektedir. Nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesi L-sitrulinin, L-arginine dönüşümü sırasında Nitrik oksit (NO), sentezine aracılık eden bir grup katalizörlerdir. Bu çalışmanın amacı Nitrik Oksit Sentaz (NOS3) Glu298Asp polimorfizmini meme kanserli hastalarda araştırmaktır. Bu amaçla 49 meme ve 89 sağlıklı kontrol grubu çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışma gruplarımızda NOS3 Glu298Asp polimorfizmi periferik kan örnekleri kullanarak PCR-RFLP yöntemiyle tayin edilmiştir. Meme kanserli hastalarda NOS3 Glu298Asp genotip dağılımı [GG: 2 (4.1%), GT: 22(44.9%), TT: 25(51%)] sağlıklı kontrol grubundan [GG: 25(28.1%), GT: 34(38.2%), TT: 30(33.7%)] istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmuştur ( $p=0.024$ ). NOS3 Glu298Asp gen varyasyonu T allel frekansı meme kanserli hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek olarak saptanmıştır ( $\chi^2=7.229$ ;  $p=0.007$ ; OR: 1.228;%95 CI: 1.065-1.415).

Çalışmamız sonucunda NOS3 Glu298Asp polimorfizminin meme kanseri riski ile ilişkili olabileceği kanısına varılmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** oksidatif stres, NOS3 geni, varyasyon

## GİRİŞ

Meme kanseri dünyada yaygın olarak görülen kanser türlerinden biri olup, kadınlarda ölüme sebebiyet veren ikinci kanser türüdür (1). Meme kanseri için bilinen risk faktörleri arasında aile öyküsü, yaş, ilk gebelik yaşı, alkol tüketimi, menopoz sonrası obezite ve iyonize radyasyon yer almaktadır. Fakat tüm bu faktörler meme kanserinin etiyojisinin ve coğrafik olarak varyasyonlarının anlaşılması açısından yeterli olmamaktadır (2). Oksidatif stres ve karsinojenlerin metabolizmasıyla ilgili genlerdeki heterojenite de meme kanserine olan yatkınlığı etkileyebilmektedir (3-4).

Serbest radikal nitrik oksit (NO), apoptozun uyarılmasında ve çeşitli sitostatik ve sitotoksik fonksiyonlarda rol oynayan önemli bir biyolojik mediatördür. Çeşitli çalışmalarda karsinogenez sürecinde serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı ileri sürülmüştür. Nitrik oksit (NO), Nitrik Oksit Sentaz (NOS) izoformları tarafından L-sitruinin, L-arginine dönüşümü sırasında sentezlenmektedir (5,6). Düşük konsantrasyonlarda tümörün büyümesini, tümör anjiyogenezini uyarıcı ve metastazı aktive edici etkilere sahipken buna karşın yüksek konsantrasyonlarda, tümör hücrelerinin apoptoza yönlendirilmesinde ve tümör büyümesinin durdurulmasında rol oynamaktadır (5,6). Homeostaz hücre proliferasyonu ve ölümü arasındaki denge aracılığı ile sağlanmaktadır. Hücre proliferasyonu ve apoptoz arasındaki denge değişiklikleri pek çok hastalığın patogeneziye katkıda bulunmaktadır. NO, bu dengeyi değiştirebilmektedir. Çünkü NO konsantrasyon oranına, hücre tipine ve çevre şartlarına bağlı olarak toksik veya koruyucu nitelikte özellik gösterebilmekte, apoptoza yol açabilmekte ya da inhibe edebilmektedir (7). Endotel hücrelerinde Nitrik Oksit Sentetaz'ın (NOS) NOS2 geni tarafından kodlanan indüklenbilir NOS ve NOS3 geni tarafından kodlanan endotelial NOS olmak üzere iki formu bulunmaktadır (8). NOS3 7. kromozomda 26 ekzonluk bir gen tarafından kodlanır (9). NOS3 Glu298Asp bu gende görülen yaygın polimorfizmlerden biri olup 894'üncü nükleotidde kodon 298 için (G-T) glutamat-aspartat değişimi ile karakterizedir. Yapılan bazı araştırmalarda NOS3 Glu298Asp (894G>T) mutant TT varyantının meme kanseri ile ilişkili olabileceği kanısına varılmıştır (10).

Çalışmamızda da meme kanserine yatkınlıkta NOS3 Glu298Asp gen polimorfizminin önemini araştırmak amacıyla, hasta ve kontrol bireylerde genotipleme ve allelik frekanslarının tespiti amaçlanmıştır. Aynı zamanda meme kanserli hastalarda hastalığın klinik ve prognostik parametreleri ile NOS3 polimorfizmi arasındaki ilişki olup olmadığı da incelenmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada iki örnek grubu kullanılmıştır. Birinci grupta 89 kişiden oluşan herhangi bir rahatsızlığı olmayan sağlıklı bireyler kontrol grubuna alınmıştır.

İkinci grup ise İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Radyasyon Onkolojisi, İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Cerrahi Kliniği tarafından takip edilen meme kanserli hastalardan oluşmaktadır.

Projemize dahil edilmiş meme kanserli hastaların patolojik olarak tanıları ve klinik değerlendirmeleri ve örnek alımları ilgili klinikler tarafından gerçekleştirilmiştir. Polimorfizm çalışması için sağlıklı ve meme kanserli bireylerin kan örnekleri EDTA'lı tüpe alınıp DNA izolasyonu yapılmış ve 89 sağlıklı bireyde, 49 meme kanserli hastada NOS3 Glu298Asp gen polimorfizm analizi yapılmıştır.

Meme kanserli hasta ve normal bireylerden alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu amonyum asetat ve proteinaz K'nın kullanıldığı tuz çöktürme metoduyla elde edilmiştir (11).

### NOS3 Gen Polimorfizmi

NOS3 Glu298Asp gen polimorfizm ilgili gen bölgesinin çoğaltılmasında 5'- AAG GCA GGA GAC AGT GGA TGG A -3' ve 5'- CCC AGT CAA TCC CTT TGG TGC TCA -3' spesifik primer dizileri kullanılmıştır. PCR reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde, 50-100 ng genomik DNA 1x PCR buffer, 0.2 mM dNTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM primer and 0.5 U Taq polimeraz ( MBI Fermentas, Lithuania) bileşenleri sırası ile 0,2 ml'lik steril tüpe konulmuş ve reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. PCR karışımının hazırlanma işlemleri buz üzerinde soğukta ve steril kabin içerisinde yapılmıştır. PCR reaksiyonu 95 °C 5 dakika denatürasyonu takiben, 94 derecede 1 dak sonrası, 58 derecede 1 dak, 72 derecede 1 dak 35 döngü 72°C 5 dakika uzama evresi şeklinde gerçekleştirilmiştir.

PCR sonrası oluşan amplifikasyon ürünleri %3' lük agaroz jelde yürütülüp kontrol edildikten sonra, Ban II enzimiyle kesim uygulanmış ve kesim sonrası elde edilen ürünler %3'lük agaroz jel elektroforezde yürütülmüş ve U.V görüntüleme sonrasında genotiplendirilmiştir. NOS3 Glu298Asp gen polimorfizminde 248 bp'lik tek band veren örnekler homozigot (TT) olarak değerlendirilirken, Ban II enzim kesimi gerçekleşen ve agaroz jel elektroforezde 163 bp ve 85 bp'lik iki bant veren örneklerde homozigot (GG) , 248 bp, 163 bp ve 85 bp olmak üzere üç band veren örnekler ise heterozigot (GT) olarak değerlendirilmiştir (12).

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 11 paket programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı p<0.05 olarak alınmış olup NOS3 Glu298Asp genotip ile allellerinin görülme sıklığının, gruplar arası farklılıklarla beraber değerlendirilmesinde Ki kareχ<sup>2</sup> ), sayısal verilerin analizi için ise student-t testi kullanılmıştır.

## BULGULAR

Çalışmamızda kullanılan sağlıklı kontroller ve meme kanserli hastalara ait bilgiler Tablo 1’de gösterilmiştir. Buna göre meme kanserli hastalar ile kontrol grubu arasında aile hikayesi, cins, sigara kullanımı ve diğer parametreler açısından istatistiksel anlamlılık mevcut değildi Hasta ve kontrol grupları arasında yaş bakımından da anlamlı fark gözlenmemiştir ( $p>0.05$ ).

**Tablo 1: ÇALIŞMA GRUPLARINA AİT BİLGİLER**

	KONTROL n=89	MEME KANSERLİ HASTALAR n=49
Örnek Sayısı (Kadın/Erkek)	64/ 25	49/49
Yaş Ortalamaları (yıl)	51.14±16.32	54.02±11.04

Tablodaki değerler  $x\pm SD$  olarak verilmiştir. Gruplararası önemlilik derecesi student t testi ile incelenmiştir.

Çalışmamıza katılan meme kanserli hastaların %80’i invaziv duktal, %8.9’u invaziv lobuler , %11.1’i ise kombine tipte olduğu saptanmıştır. Hastaların %29’u menapoz öncesi , %71’i ise menapoz sonrası kadınlardan oluşmaktaydı. Hastaların %15.8’inde ER(-), %13.9’unda da PR (-) olarak saptanmıştır. Meme kanserli hastaların %44.2’sinde vasküler invazyon, %46.3’ünde perinodal invazyon, %50’sinde ise kapsül invazyonuna rastlanmıştır.

**Tablo 2: ÇALIŞMA GRUPLARINA AİT GENOTİP FREKANSLARI**

	KONTROL N(%) n=89	MEME KANSERLİ HASTA N(%) n=49	p değeri
<b>NOS3 Glu298Asp</b>			
<b>GG</b>	25(28.1)	2(4.1)	0.024
<b>GT</b>	34 (38.2)	22 (44.9)	
<b>TT</b>	30(33.7)	25(51.0)	
<b>ALLEL</b>			
<b>G</b>	84(47.2)	26(26.5)	
<b>T</b>	94(52.8)	72(73.5)	0.007

Tablodaki değerler örnek sayısı ve yüzde olarak verilmiştir. Gruplar arasındaki farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir. NOS3 Glu298Asp gen polimorfizmi sonuçları göz önüne alınarak, genotip dağılımı açısından çalışma grubumuz incelendiğinde, meme kanserli hastalarda ve kontrol grubunda NOS3 Glu298Asp genotip dağılımı Tablo 2’de görülmektedir. Çalışmamızda NOS3 T allel frekansı meme kanserli hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek oranda gözlenmiş olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $\chi^2=7.229$ ;  $p=0.007$ ; OR: 1.228;%95 CI: 1.065-1.415).

**Tablo 3: Meme kanserli hastaların özelliklerine göre NOS3 Glu298Asp genotip dağılımı**

	NOS3 Glu298Asp (%)			p değeri
	GG	GT	TT	
<b>Yaş</b>				
45<	3.1	42.4	54.5	$p>0.05$
45≥	9.1	45.5	45.5	
<b>Ailede kanser hikayesi</b>				
Var	8.3	50	41.7	$p>0.05$
Yok	3.8	42.3	53.8	
<b>Sigara kullanımı</b>				
Evet	12.5	50	37.5	$p>0.05$
Hayır	3.0	44.1	52.9	

NOS3 Glu298Asp varyasyonu genotip dağılımı ile hastaların yaş, cins, aile hikayesi, sigara kullanımı gibi parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Meme kanserli hastaların demografik verileri göz önüne alındığında, saptanan genotip dağılımlarının yüzdeleri Tablo 3 ‘de gösterilmiştir.

Tablo 4: Meme kanserli hastaların patolojik verilerine göre NOS3 Glu298Asp gen polimorfizm analizleri

Patolojik veriler	NOS3 Glu298Asp (%)		
	GG	GT	TT
Tümör büyüklüğü			
T1	0	44.4	55.6
T2	0	52.9	47.1
T3	0	33.3	66.7
T4	50	50	0
N safhası			
N0	11.1	55.6	33.3
N1	0	50	50
N2	9.1	36.4	54.5
N3	0	0	100
Uzak metastaz			
Var	0	33.3	66.7
Yok	5.6	47.2	47.2
ER			
ER pozitif	6.9	51.7	41.4
ER negatif	0	33.3	66.7
PR			
PR pozitif	7.1	60.7	32.1
PR negatif	0	0	100
Perinodal invazyon			
Var	5.9	41.2	52.9
Yok	0	52.6	47.4
Vasküler invazyon			
Var	8.7	43.5	47.8
Yok	0	50	50

T3+T4 evresindeki meme kanserli hastalarda G alleli frekansında artış olup, meme kanserli hastalardaki bu veri istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmamıştır ( $X^2=0.023$ ;  $p=0.880$ ). Hasta grubumuzda uzak metastaz varlığına göre NOS3 Glu298Asp gen varyasyonu incelendiğinde, G alleli uzak metastaz durumu negatif olan hastalarda pozitif olanlara göre daha yüksek oranda saptanmış olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca GG genotipi taşıyan meme kanserli hastalarda vasküler invazyon daha yüksek oranda gözlenmiş fakat istatistiksel olarak anlamlı bir veriye ulaşamamıştır. Ancak hasta grubumuzda klinik ve prognostik parametreler ile NOS3 Glu298Asp polimorfizmi genotip ve allel dağılımı arasında herhangi bir anlamlı ilişki bulunamamıştır ( $p>0.05$ ).

Çalışmamıza dahil edilmiş olan meme kanserli hastalardan östrojen reseptörü ER(-) olanların tümünün NOS3 Glu298Asp polimorfizmi T alleleline sahip olması ilginç bir bulgu olarak karşımıza çıkmıştır ( $\chi^2=0.439$ ;  $p=0.980$ ; OR:1.074;%95 CI: 0.973-1.186). Çalışmamızda meme kanserli hastalardan progesteron reseptörü PR(-) olanların tümü TT genotipi taşımaktaydı.

Çalışmada incelenen lenf nodu tutulumu pozitif (N) pozitif olan hastalarda NOS3 Glu298Asp polimorfizm TT genotipi taşıyor olma olasılığı artmış fakat istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulunmamıştır ( $p=0.697$ ). Aynı zamanda bu hastalarda NOS3 T alleli daha yüksek oranda gözlenmiş istatistiki açıdan anlamlı bir veriye ulaşamamıştır ( $\chi^2=1.064$ ;  $p=0.381$ ).

Hasta grubumuzda T3+T4 evresinde olan bireylerde NOS3 T alleli frekansı azalmış ancak istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır. Çalışmamıza dahil edilen

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Tümör biyolojisinde nitrik oksidin rolü tam olarak aydınlatılmamış olmasına karşın, vazodilatasyon, sinir iletimi, immün sistem ve kanserle ilgili pek çok fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde rol oynadığı ileri sürülmüştür (10,13). Endotelial nitrik oksit sentaz (NOS3) ve nöronal izoformu (NOS1) kalsiyum bağımlı olarak bazal NO üretimini düşük seviyede tutan enzimlerdir. Aksine indüklenebilir nitrik oksit sentaz (NOS2) (başlıca makrofajlarda bulunur) uygun fizyolojik uyarı varlığında yüksek seviyede NO üretmektedir. Tüm üç izoform da kalpte mevcut olup, NOS1 sempatik sinir uçlarında, NOS3 vasküler endotel hücrelerinde, NOS2 ise aktive makrofaj ve miyositlerde mevcuttur (13-15). Çeşitli çalışmalarda nitrik oksidin tümörlerin ilerlemesinde ve metastazda tetikleyici rol oynadığı ileri sürülmüştür. Tümör hücrelerinin, antitümöral etkileri baskılayan ve anjiyogenezi uyaran NO aracılı mekanizmaları gelişim, invazyon ve metastaz için kullandığı bildirilmiştir (16). Hücre proliferasyonu ve apoptotik hücre ölümü tümör gelişimini etkileyebilmektedir. Nitrik oksidin yüksek konsantrasyonlarda apoptozu uyardığı düşünülürken, düşük konsantrasyonlarda anti-apoptotik etki gösterebileceği bilinmektedir (17). Mortensen (17) ve arkadaşları NOS3'ün hem meme kanseri hücrelerinde hem de endotelial hücrelerde var olduğunu göstermiş ve meme kanseri etrafındaki normal dokularda NOS3 yüksek yoğunluğunu istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde daha uzun sürvi ile ilişkili bulmuşlardır. Martin ve arkadaşları (18) NOS3'ün meme kanser tümörlerinde ekspres edildiğini ve histolojik derece ve lenf nod durumu ile negatif olarak ilişkili olduğunu göstermişlerdir. NOS3 polimorfizmleri üzerine güncelliğini koruyan araştırmalar mevcuttur. En yaygın olarak araştırılan varyasyonlardan biri ise 7. ekzon üzerindeki Glu298Asp polimorfizmidir (19). Yang ve arkadaşlarının yaptığı 502 meme kanserli hasta ve 505 sağlıklı bireyi kapsayan bir çalışmada Glu298Asp polimorfizmi ile meme kanseri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (20). İspanya'da yapılan 360 kolorektal kanserli hasta ve 550 sağlıklı bireyin dahil edildiği bir araştırmada da hasta ve kontrol grubu arasında Glu298Asp genotip dağılımı ve allel frekansı açısından anlamlı bir fark rapor edilmemiştir (21). Medeiros ve arkadaşları tarafından Portekiz popülasyonunda yapılan bir çalışmada prostat kanseri riski ile Glu298Asp gen polimorfizmi arasında bir ilişki bulunamamıştır (22). Bir diğer çalışmada ise Cheon ve arkadaşları (23) akciğer kanserinde NOS3 gen lokusunun plazma NO düzeylerini etkileyebileceği ve NOS3 polimorfizmi ile akciğer kanseri gelişimi arasında bir ilişki olabileceği görüşünü bildirmişlerdir ancak bu konuda zıt korelasyon olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur (8).

Meme kanseri için Ghilardi ve arkadaşları (8) İtalya'daki 71 hasta ve 91 kontrolü kapsayan çalışmalarında, NOS3 gen polimorfizmi ve meme kanseri riski arasında ilişki bulunmadığını rapor etmişlerdir. Benzer şekilde Royo ve arkadaşları (24) Lu ve arkadaşları yaptıkları araştırmada (25) NOS3 gen polimorfizmi ile meme kanseri arasında herhangi bir

ilişkiye rastlamamışlardır. Ancak Avusturya'da 269 kişilik meme kanserli ve 244 kontrolde yapılan çalışmada Hefler ve arkadaşları (26) NOS3 Glu298Asp polimorfizminin 2 kat artmış riskle ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz meme kanserli hastalar ile kontrol grubu arasında NOS3 Glu298Asp gen polimorfizm dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmış olup ( $p=0.024$ ), bulgularımız Hefler ve arkadaşlarının çalışmalarıyla uygunluk göstermektedir. Çalışmamızda NOS3 T allel taşıma, özellikle meme kanser hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ( $p=0.007$ ). Yaş faktörü ele alındığında ise özellikle 45 yaş ve altında olan meme kanserli hastalarda NOS3 GG genotipinin diğer genotiplere göre daha yüksek frekansta olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda istatistiksel anlamlılığa ulaşmamasına rağmen, meme kanserli NOS3 TT genotipli hastalarda, lenf nod metastazının pozitif olma durumu daha yüksek bulunmuştur. Diğer ilgi çekici bulgu da östrojen veya progesteron reseptörü negatif olan tüm meme kanserli hastaların TT genotipi taşımasıdır. NOS3 Glu298Asp polimorfizmi ile kanser riski arasında yapılan çalışmalar literatürde yer almakta olup sonuçlar tartışmaya açıktır (8,20-30).

Çalışmamız sonucunda NOS3 Glu298Asp polimorfizminin meme kanseri riski ile ilişkili olabileceği kanısına varılmıştır. Ancak oksidatif stres ile ilgili moleküler mekanizmaları aydınlatılabilmek ve bulguları teyit etmek üzere daha büyük örnek gruplarında yapılan kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. American Cancer Society (2006) Cancer Facts and Figures, 2005. Atlanta, GA, American Cancer Society.
2. MacMahon, B. (2006) Epidemiology and the causes of breast cancer. *Int. J. Cancer*, 118, 2373–2378.
3. Lancaster J.R. Jr, Xie K. (2006) Tumors face NO problems? *Cancer Res.*, 66, 6459–6462.
4. Arnhold J. (2004) Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry (Mosc)*, 69, 4–9.
5. Moncada S, Higgs A. (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*, 329:2002–12.
6. Lala PK, Orucevic A. (1998) Role of nitric oxide in tumor progression: lessons From experimental tumors. *Cancer Metastasis Rev*, 17:91–106.
7. Choi BM, Pae HO, Jang SI. et al. (2002) Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator, *J Biochem Mol Biol*. 35(1):116-26.
8. Ghilardi G, Biondi ML, Cecchini F. et al. (2003) Vascular invasion in human breast cancer is correlated to T786C polymorphism of NOS3 gene. *Nitric Oxide* 9, 118–122.
9. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, et al. (1993) Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.*, 268:17478–17488.
10. Hao Y., Montiel R., Huang Y. (2010) Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 894 G>T polymorphism is associated with breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* Dec;124(3):809-13. doi: 10.1007/s10549-010-0833-z. Epub 2010 Mar 19.
11. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215
12. McNamara DM, Holubkov R, Postava L. et al. (2003) Effect of the Asp298 Variant of Endothelial Nitric Oxide Synthase on Survival for Patients With Congestive Heart Failure, *Circulation*, 107;1598-1602.
13. Kelly RA, Balligand JL, Smith TW. (1996) Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res.*, 79:363 380.
14. Drexler H. (1999) Nitric oxide synthases in the failing human heart: a double-edged sword? *Circulation.*, 99:2972–2975.
15. Heymes C, Vanderheyden M, Bronzwaer JGF. et al. (1999) Endomyocardial nitric oxide synthase and left ventricular preload reserve in dilated cardiomyopathy. *Circulation.*, 99:3009–3016.
16. Orucevic A., Bechberger J., Green A.M. et al. (1999) Nitric-oxide production by murine mammary adenocarcinoma cells promotes tumour-cell invasiveness, *Int. J. Cancer* 81, 889–896.
17. K. Mortensen, S. Holck, I.J. Christensen, et al. (1999) Endothelial cell nitric oxide synthase in peritumoral microvessels is a favorable prognostic indicator in premenopausal breast cancer patients, *Clin. Cancer Res.* 5, 1093–1097.
18. Martin J.H., Begum S., Alalami O. et al. (2000) Endothelial nitric oxide synthase: correlation with histologic grade, lymph node status and estrogen receptor expression in human breast cancer, *Tumour Biol.* 21, 90–97.
19. Tesaro M, Thompson WC, Rogliani P, et al. (2000) Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97: 2832–2835.
20. Yang J., Ambrosone CB., Hong CC. et al. (2007) Relationships between polymorphisms in NOS3 and MPO genes, cigarette smoking and risk of post-menopausal breast cancer. *Carcinogenesis*. 2007 Jun;28(6):1247-53. Epub 2007 Jan 27.
21. Conde M.C., Ramirez-Lorca R., Lopez-Jamar JM. et al. (2006) Genetic analysis of caveolin-1 and eNOS genes in colorectal cancer. *Oncol. Rep.*, 16, 353–359.
22. Medeiros R.M., Morais A., Vasconcelos A. et al. (2002) Outcome in prostate cancer: association with endothelial nitric oxide synthase Glu-Asp298 polymorphism at exon 7. *Clin. Cancer Res.*, 8, 3433–3437.
23. Cheon K.T., Choi K.H., Lee, H.B. et al. (2000) Gene polymorphisms of endothelial Nitric Oxide Synthase and angiotensin-converting enzyme in patients with lung cancer, *Lung* 178, 351–360.
24. Royo JL., Moreno-Nogueira JA., Galán JJ. et al. (2006) Lack of association between NOS3 Glu298Asp and breast cancer risk: a case-control study. *Breast Cancer Res.* 100(3):331-3
25. Lu J., Wei Q, Bondy ML. et al. (2006) Promoter polymorphism (-786t.C) in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with risk of sporadic breast cancer in non-Hispanic white women age younger than 55 years. *Cancer*, 107, 2245–2253
26. Hefler L.A., Grimm C., Lantsch T. et al. (2006) Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 98, 151–155.
27. Medeiros R., Morais A., Vasconcelos A. et al. (2002) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and genetic susceptibility to prostate cancer. *Eur. J. Cancer Prev.*, 11, 343–350.
28. Riener E.K., Hefler LA., Grimm C. et al. (2004) Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in women with vulvar cancer. *Gynecol. Oncol.*, 93, 686–690.
29. Choi J.Y. Lee KM., Noh DY. et al. (2006) Genetic polymorphisms of eNOS, hormone receptor status, and survival of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 100, 213–218.
30. Hefler, L.A., Ludwig E., Lampe D., et al. (2002) Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.*, 86, 134–137.