

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**7,12-DMBA İLE İNDÜKLENEN RAT
KARACİĞERİNDE ARJİNAZ, NİTRİK
OKSİT METABOLİTLERİ VE ORNİTİN
DÜZEYLERİ ÜZERİNE İYON KANAL
BLOKERLERİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Battal YILDIRIM
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Kadir BATÇIOĞLU**

MALATYA-2009

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**7,12-DMBA İLE İNDÜKLENEN RAT
KARACİĞERİNDE ARJİNAZ, NİTRİK
OKSİT METABOLİTLERİ VE ORNİTİN
DÜZEYLERİ ÜZERİNE İYON KANAL
BLOKERLERİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Battal YILDIRIM

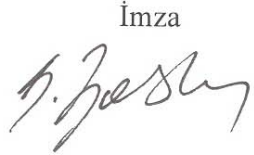
Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Kadir BATÇIOĞLU


Bu araştırma, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2008-33 proje numarası ile desteklenmiştir.

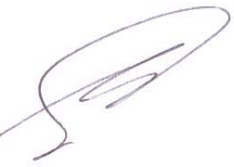
MALATYA-2009

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼'ne

Bu alışma j¼rimiz tarafından Biyokimya(Ecz.Fak.)Anabilim Dalı Programında Y¼ksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

J¼ri Başkanı, Danışman Doç. Dr. Kadir BATIOğLU 

¼ye Doç. Dr. Nurettin AYDOğDU 

¼ye Doç. Dr. Çağatay TAşKAPAN 

ONAY :

Bu tez, İnön¼ Üniversitesi Lisans¼st¼ Eğitim-Öğretim Y¼netmelięi'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki j¼ri ¼yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu...../...../2009 tarih ve 2009/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ali OTLU
Enstit¼ M¼d¼r¼

TEŞEKKÜR

İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında yapmış olduğum tez çalışmam süresince desteğini esirgemeyen, karşılaştığım bütün zorluklarda büyük bir olgunlukla çözüm arayışına giren tez danışmanım Doç. Dr. Kadir BATÇIOĞLU'na, tez çalışmam süresince desteklerini benden esirgemeyen Eczacılık Fakültesi çalışanlarına ve İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkürü borç bilirim.

Bana, bu süreç içerisinde maddi ve manevi her konuda destek olan sevgili aileme ve değerli eşime teşekkür ederim.

**7,12-DMBA İLE İNDÜKLENEN RAT KARACİĞERİNDE ARJİNAZ,
NİTRİK OKSİT METABOLİTLERİ VE ORNİTİN DÜZEYLERİ ÜZERİNE
İYON KANAL BLOKERLERİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ
ÖZET**

Bu çalışmada karsinojenik bir ajan olan 7,12-DMBA ile ratlarda tümör gelişim prosesinin başlatılması ve karaciğerde arjinaz ve NOS enzim aktiviteleri ile ornitin düzeylerinin ölçülmesi planlandı. NOS ile arjinaz aktivitelerinde ve ornitin düzeylerinde gerçekleşen değişimler ve iyon kanal blokeri uygulanmasının muhtemel etkileri araştırıldı. NOS aktivitesinin artırılmasının ve/veya iyon kanal blokeri kullanımının kanser tedavisinde ek bir strateji olabileceği ya da olamayacağı yönünde bir yargıya varılması amaçlandı.

Bu çalışmada; Sprague Dawley türü 4 aylık dişi ratlar kullanıldı. Kontrol grubu (n=18), 7,12-DMBA grubu (n=14) ve 7,12-DMBA+ İKB (iyon kanal blokeri) grubu (n=14) olmak üzere ratlar üç gruba bölündü. Kontrol grubuna sadece mısırözü yağı i.p. olarak enjekte edildi, ikinci ve üçüncü gruptaki ratlara tek doz 10 mg/kg b.w. dozda 7,12-DMBA i.p. olarak enjekte edildi. Üçüncü gruptaki ratlara 7,12-DMBA enjeksiyonundan 150 gün sonra RS100642 kuyruk veninden enjekte edildi. Son enjeksiyondan bir hafta sonra ise eter anestezisi altında dekapite edilen ratların karaciğer dokuları çıkarıldı. Serum fizyolojik ile perfüze edilen dokular pH 7.4 PBS tamponu içerisinde homojenize edildi.

Yapılan ölçümlerde, arjinin aminoasitini ortak substrat olarak kullanan arjinaz ve NOS enzim sistemlerinin arasındaki balansın 7,12-DMBA grubunda arjinaz lehine anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. 7,12-DMBA+ İKB grubunda ise arjinaz aktivitesinin anlamlı derecede azaldığı, NOS aktivitesinin ise arttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi.

Bu bulgular ışığında iyon kanal blokeri kullanımının ve/veya NOS aktivitesinin artırılmasının kanser gelişimini yavaşlatıcı etki gösterebileceği kanısına vardık. Ancak bu konuda daha kapsamlı araştırmalar yapılmalıdır.

Anahtar kelimeler: Dimetilbenz [a] antrasen, Arjinaz, Ornitin İyon Kanal Blokerleri, Nitrik Oksit Sentaz

**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ION CHANNEL BLOCKERS ON
ARGINASE, NITRIC OXIDE METABOLITES AND ORNITINE LEVELS IN
RAT LIVER WHICH IS INDICUED WITH 7,12-DMBA**

ABSTRACT

In this study, it has been planned to initiate the tumour development process in rats by using 7,12-DMBA which is a carcinogenic agent and to measure the omithine levels and enzyme activity levels of NOS and arginase in liver. The possible effects of ion channel blockers treatment and the changes occurred in the levels of omithine, arginase and NOS activities were also investigated. It has been aimed to reach an answer whether induction of NOS activity and/or using ion channel blocker is an additional strategy in cancer treatment. In the study, Sprague Dawley type, 4 months old female rats were used.

The rats were divided into three groups as control (n=19), 7,12-DMBA (n=14) and 7,12-DMBA+IKB (n=18) groups. The rats in control groups were treated with only corn oil. The rats in the second group (7,12-DMBA) were treated with a 7,12-DMBA single dose. The rats in the third group were treated with a 7,12-DMBA and RS100642 (ion channel blocker) was injected in the tail vein. After a week from last injection, the rats were sacrificed by decapitation under ether anaesthesia and the liver tissues of the rats were dissected. The tissues perfused with isotonic solution were homogenized in PBS (PH:7.4) solution.

As a result, it has been observed that the balance between the arginase and NOS enzyme systems which used arginine in common were disturbed in favour of arginase significantly. In the third group, arginase activity was observed to decrease significantly whereas NOS activity was observed to increase insignificantly.

Under the shed of those findings, we considered that using ion channel blockers and/or the induction of NOS activities may have an inhibitory effect on cancer development. But more comprehensive researches are stil needed in the same subject.

Key Words: 7,12-Dimethylbenz [a] anthracene, Arginase, Ornithin, Ion Channel Blockers, Nitric Oxide Synthases

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----------|
| ONAY SAYFASI..... | iii |
| TEŞEKKUR..... | iv |
| ÖZET | v |
| ABSTRACT..... | vi |
| İÇİNDEKİLER..... | vii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ..... | ix |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | x |
| TABLOLAR DİZİNİ..... | xi |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| 2.1. Reaktif Oksijen Türlerinin..... | 3 |
| 2.1.1. ROS Sınıflandırılması..... | 3 |
| 2.1.2. Reaktif oksijen türleri..... | 4 |
| 2.1.3. ROS Kaynakları..... | 5 |
| 2.1.3.1. Normal biyolojik işlemler..... | 5 |
| 2.1.3.2. Oksidatif stres yapıcı durumlar..... | 5 |
| 2.1.3.3. Yaşlanma süreci..... | 6 |
| 2.1.4. Reaktif Oksijen Türlerinin Etkileri..... | 6 |
| 2.2. 7,12-Dimetilbenz[a]antrasen..... | 7 |
| 2.3. Arjinin (Arg, R)..... | 8 |
| 2.4. Arjinaz ve Nitrik Oksit Sentaz..... | 9 |
| 2.4.1. Arjinaz..... | 9 |
| 2.4.2. Nitrik Oksit Sentaz..... | 11 |
| 2.5. İyon Kanalları..... | 13 |
| 2.6. Sodyum Kanal Blokeri..... | 14 |
| 2.7. Poliaminler..... | 16 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 17 |
| 3.1. Lowry Protein Tayini..... | 18 |
| 3.1.1. Çözeltiler..... | 18 |
| 3.1.2. Deneyin yapılışı..... | 19 |

| | |
|--|----|
| 3.2. Nitrit Ve Nitrat Analizi..... | 20 |
| 3.2.1. Çözeltiler..... | 20 |
| 3.2.2. Deneyin Yapılışı..... | 22 |
| 3.2.2.1. Deproteinizasyon..... | 22 |
| 3.2.2.2. Direkt nitrit ölçümü..... | 22 |
| 3.2.2.3. Nitrat Ölçümü..... | 23 |
| 3.3. Arjinaz Aktivitesi Ölçümü..... | 23 |
| 3.3.1. Kimyasal Maddeler..... | 23 |
| 3.3.2. Deneyin Yapılışı..... | 24 |
| 3.3.2.1. Homojenatın Arjinaz Aktivitesinin "TDMU (Tiyosemikarbazid Diasetil Monoksim Üre) Yöntemi" ile Ölçümü..... | 24 |
| 3.3.2.2. Çözeltiler..... | 25 |
| 3.3.2.3. İşlemler..... | 26 |
| 3.3.2.4. Arjinaz Aktivitesinin Hesaplanması..... | 27 |
| 3.4. Ornitin Düzeyinin Ölçümü..... | 28 |
| 3.4.1. Kimyasal Maddeler..... | 28 |
| 3.4.2. Çözeltiler..... | 28 |
| 3.4.3. Deneyin Yapılışı..... | 29 |
| 4. BULGULAR..... | 31 |
| 4.1. Karaciğer Dokusunda Arjinaz Aktivitesi..... | 32 |
| 4.2. Karaciğer Dokusu Nitrat Düzeyleri..... | 33 |
| 4.3. Karaciğer Dokusu Serbest Nitrit Düzeyleri..... | 34 |
| 4.4. Karaciğer Dokusunda Ornitin Düzeyleri..... | 35 |
| 5. TARTIŞMA..... | 36 |
| 6. SONUÇ ve ONERILER..... | 41 |
| KAYNAKÇA..... | 42 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 52 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|-------------------------------|---|
| 7,12-DMBA | : 7,12-Dimetilbenz [a] antrasen |
| Arg | : Arjinin |
| BSA | : Bovin Serum Albumin |
| °C | : Santigrad derece |
| dk | : Dakika |
| DNA | : Deoksiribonükleik asit |
| eNOS | : Endotelyal nitrik oksit sentaz |
| H ₂ O ₂ | : Hidrojen peroksit |
| İKB | : İyon kanal blokeri |
| iNOS | : İndüklenebilir nitrik oksit sentaz |
| Kv | : Voltaj bağımlı potasyum kanalları |
| L-NAME | : N ⁶ -nitro L-arjinin metil ester |
| µg | : Mikrogram |
| mg | : Miligram |
| mL | : Mililitre |
| NNDA | : N-Naftiletilen diamin |
| nNOS | : Nöronal nitrik oksit sentaz |
| NO ₂ | : Nitrit |
| NO ₃ | : Nitrat |
| NO [·] | : Nitrik oksit radikali |
| NOS | : Nitrik oksit Sentaz |
| O ₂ ^{·-} | : Süperoksit radikali |
| OH [·] | : Hidroksil radikali |
| PAH | : Polisiklik aromatik hidrokarbon |
| RNA | : Ribonükleik asit |
| ROS | : Reaktif oksijen türleri |
| RS100642 | : Meksiletin analogu sodyum kanal blokeri |
| TDMU | : Tiyosemikarbazid Dasetil Monoksim Üre |
| VKSK | : Voltaj kapılı Na ⁺ kanalları |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | | |
|-------------------|--|----|
| Şekil 2.1. | 7,12-Dimetilbenz[a]antrasen | 7 |
| Şekil 2.2. | L-arjinin aminoasidi | 8 |
| Şekil 2.3. | Arjinaz enzimi | 10 |
| Şekil 2.4. | Nitrik Oksit Sentaz | 11 |
| Şekil 2.5. | Meksiletin (2-(2-aminopropoxy)-1,3-dimethylbenzene) | 15 |
| Şekil 2.6. | L-Arjinini ortak substrat olarak kullanan iki ensim sisteminin gösterimi | 17 |
| Şekil 3.1. | Protein standart grafiği | 19 |
| Şekil 3.2. | Nitrit düzeyi standart grafiği | 22 |
| Şekil 3.3. | Nitrat düzeyi standart grafiği | 23 |
| Şekil 3.4. | Ornitin miktarı standart grafiği | 29 |
| Şekil 4.1. | Kontrol grubu (1), DMBA grubu (2) ve DMBA+İKB (3) grubu arjinaz aktiviteleri | 32 |
| Şekil 4.2. | Kontrol grubu (1), DMBA grubu (2) ve DMBA+İKB (3) grubu nitrat miktarı | 33 |
| Şekil 4.3. | Kontrol grubu (1), DMBA grubu (2) ve DMBA+İKB (3) grubu nitrit miktarı. | 34 |
| Şekil 4.4. | Kontrol grubu (1), DMBA grubu (2) ve DMBA+İKB (3) grubu ornitin düzeyleri. | 35 |

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. Deney gruplarında karaciğer dokusu nitrit, nitrat, ornitin düzeyleri ile arjinaz aktivitesi

31

1. GİRİŞ

Çeşitli organlarda gelişerek her yaştaki bireyleri etkileyen kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra en sık rastlanan ölüm nedenidir (1).

Tümör gelişiminde hücrenin kontrolsüz gelişmesi ve çoğalmasında artan iyon kanal ekspresyonu sonucu bozulan iyonik dengenin ve değişen membran potansiyelinin etkili olduğu bilinmektedir (2). Tümör gelişiminin baskılanması ve metastaz riskinin en aza indirilmesi amacıyla iyon kanal blokerlerinin kullanılmasının son yıllarda kanser tedavisinde mevcut tedavi protokollerine ek bir yaklaşım olarak değerlendirilip değerlendirilemeyeceği hala araştırılmakta olan bir konudur.

7,12-Dimetilbenz [a] antrasen (7,12-DMBA) polisiklik aromatik hidrokarbon sınıfı bileşiklerden olup potent bir karsinojen ajandır. 7,12-DMBA hem metabolitleri üzerinden Deoksiribonükleik asit (DNA) ile doğrudan etkileşerek hem de yarattığı oksidatif stres aracılığıyla özellikle meme ve deri tümörü oluşumunda önemli rol oynamaktadır (3). Bu çalışmada geçmiş dönemlerde yapılan çalışmalar baz alınarak karsinogenik ajan olarak 7,12-DMBA kullanılmıştır.

Arjinin ve kanser arasındaki ilişki uzun yıllar önce kabul görmüşken son dönemde arjinaz ve kanser arasındaki ilişki ortaya çıkarılmıştır (4). Nitrik Oksit Sentaz (NOS) ve arjinaz, substrat olarak arjinin aminoasitini kullanan iki önemli enzim sistemini oluşturmaktadırlar. Arjinazın, arjinaz I ve II olmak üzere iki izoformu bulunurken NOS enzimi I,II ve III şeklinde 3 izoformdan oluşmaktadır (5). Kanser gelişim prosesinde NOS ve arjinaz arasındaki dengenin bozulduğu, organizmanın bir savunma stratejisi olarak arjinazın baskılanması ve NOS'un aktivasyonu yönünde eğilim gösterdiği ileri sürülmektedir. Literatürde yüksek NOS aktivitesiyle oluşan nitrik oksit aracılığıyla tümör gelişiminin inhibe edildiği yönünde bulgular bulunmaktadır (6). Öte yandan Arjinaz II aktivasyonunun ürünü olan ornitin, ornitin dekarboksilaz etkisiyle poliaminlere metabolize olmakta ve poliaminlerin hücre proliferasyonu üzerinde stimüle edici etkiye sahip olduğu ileri sürülmektedir (7). Bu noktada karsinojen bir ajanın karaciğerde NOS ve arjinaz

aktiviteleri üzerine olan etkisi ve bu etki sonucu ornitin düzeylerindeki muhtemel değişim dikkate değer bir metabolik ilişki oluşturmaktadır.

Bu çalışmada karsinojenik bir ajan olan 7,12-DMBA ile ratlarda tümör gelişim prosesinin başlatılması ve karaciğerde arjinaz ve nitrik oksit sentaz (NOS) enzim aktiviteleri (NOx düzeyleri üzerinden) ile ornitin düzeylerinin ölçülmesi amaçlandı. Çalışma bulgularımız ışığında, NO ile arjinaz aktivitelerinde ve ornitin düzeylerinde gerçekleşen değişimler ve iyon kanal blokeri uygulanmasının muhtemel etkisi değerlendirilerek NOS aktivitesinin artırılmasının ve/veya iyon kanal blokeri kullanımının kanser tedavisinde ek bir strateji olabileceği ya da olamayacağı yönünde bir yargıya varılması düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Tanımı

Atomlarda elektronlar orbital adı verilen uzaysal bölgede elektron çiftleri halinde bulunurlar. Atomlar arasında etkileşim ile bağlar meydana gelmekte ve moleküler yapı oluşmaktadır. Serbest radikal, atomik yada moleküler yapılarda çiftlenmemiş tek elektron bölümleri içeren moleküllere verilen isimdir. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere "oksidan moleküller" veya "reaktif oksijen türleri (ROS)" denmektedir (8).

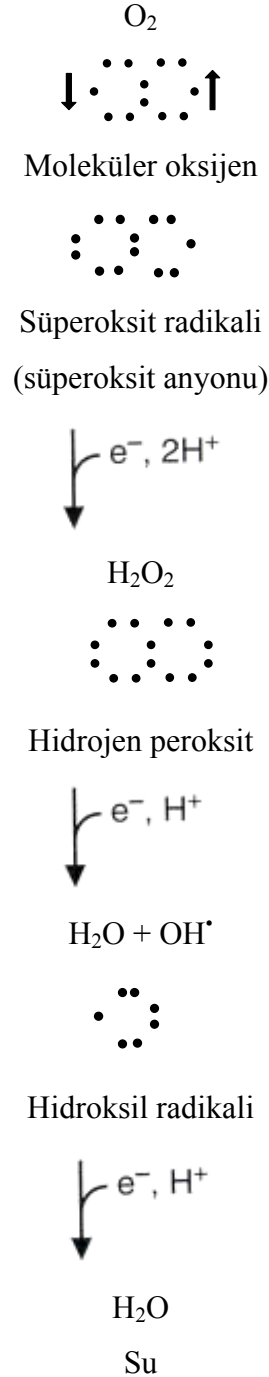
2.1.1. ROS Sınıflandırılması

Organizmada pek çok ROS oluşabilir. Ancak en sık olarak lipid yapılarla oluşur. Doymamış yağ asitlerinin alil grubundan bir hidrojen çıkarsa lipid radikali meydana gelir. Oluşan lipid radikali oksijen ile reaksiyona girer ve lipid peroksi radikalini oluşturur. Lipid peroksi radikali diğer lipidlerle zincir reaksiyonu başlatır ve lipid hidroperoksitler oluşur. Ortamda bulunan demir ve bakır iyonları lipid peroksidasyonunu hızlandırır (9). Lipid radikaller yüksek derecede sitotoksik ürünlere de dönüşebilir. Bunlar arasında en çok bilinen ürün aldehid grubundan malondialdehid dir.

Hidrojen peroksit membranlardan kolaylıkla geçip hücreler üzerinde bazı fizyolojik rollere sahip olabilir, fakat çiftlenmemiş elektrona sahip olmadığından radikal olarak adlandırılmaz. Bu nedenle "reaktif oksijen türleri", süperoksit gibi radikaller, ayrıca hidrojenperoksit gibi radikal olmayanlar için ortak olarak kullanılan bir terimdir (10). Oksijen molekülü, orbitalinde çiftlenmemiş elektron taşıyorsa süperoksit radikali olarak adlandırılır. Diğer ROS grubunda ise normal oksijenden çok daha hızlı bir biyolojik molekül olan "singlet oksijen" bulunmaktadır. Singlet oksijen molekülü yapısında iki adet çiftlenmemiş elektron taşır. Singlet oksijen hücre membranındaki poliansatüre yağ asitleriyle doğrudan reaksiyona girerek lipid peroksitlerin oluşumuna yol açar (8).

2.1.2. Reaktif oksijen türleri

ROS, normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^{\bullet})'dir.



Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller

(R[•]), peroksit radikalleri (ROO[•]), alkoksi radikalleri (RO[•]), tiyil radikalleri (RS[•]), sülfenil radikalleri (RSO[•]), tiyil peroksit radikalleri (RSO₂[•]) gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar (11).

2.1.3. ROS Kaynakları

Mitokondrilerdeki oksijenli solunumda olduğu gibi birçok anabolik ve katabolik işlemler sırasındaki reaksiyonlarda moleküler düzeyde elektron kaçışları olur ve bu sırada ROS'lar oluşur. Aşağıda ROS'ların in vivo ortamda kaynakları görülmektedir (12).

Reaktif oksijen türlerinin kaynakları,

2.1.3.1. Normal biyolojik işlemler

- 1 - Oksijenli solunum
- 2 - Katabolik ve anabolik işlemler

2.1.3.2. Oksidatif stres yapıcı durumlar

- 1 - İskemi - hemoraji - travma - radyoaktivite - intoksikasyon
- 2 - Ksenobiotik maddelerin etkisi
 - a) İnhale edilenler
 - b) Alışkanlık yapan maddeler
 - c) İlaçlar
- 3 - Oksidan enzimler
 - a) Ksantin oksidaz
 - b) İndolamin dioksijenaz
 - c) Triptofan dioksijenaz
 - d) Galaktoz oksidaz
 - e) Siklooksijenaz
 - f) Lipooksijenaz
 - g) Monoamino oksidaz
- 4 - Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu
- 5 - Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eosinofil, endotelial hücreler).

6 - Uzun süreli metabolik hastalıklar

7 - Diğer nedenler: Sıcak yada soğuk şoku, güneş ışını, sigara

2.1.3.3. Yaşlanma süreci

İskemi, hemoraji, travma ve radyoaktivite gibi durumlarda mitokondrilerdeki aerobik oksidatif fosforilasyon dengesi etkilenir ve elektron taşıma sisteminden elektron kaçakları daha fazla olur ve ROS düzeyi artar. ROS düzeyi, yaşlanma süreci ile paralel bir artış gösterir. Yaşlanma ile protein karboksilasyonunun artışı ve katalize edici tüm enzimlerin azalmasının bu dengesizlikte önemli rolleri vardır (12).

2.1.4. Reaktif Oksijen Türlerinin Etkileri

Reaktif oksijen türleri; proteinler, lipidler, lipoproteinler ve DNA dahil olmak üzere çeşitli biyomoleküllere saldırır ve oksidatif hasara sebep olur. Bu oksidatif hasar önemli olup, kronik hastalıklar, kalp hastalıkları, romatizma, diyabet, kanser oluşumunda rol oynamaktadır.

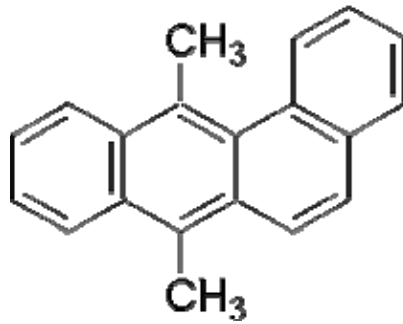
Serbest radikal biyolojisine ilginin artması, kronik hastalıklar için etkili bir tedavi bulunamaması ve bu hastalıklara karşı korunmada antioksidanların yararlı olduğu bilinmektedir. Antioksidanlar, serbest radikallerin etkisini engelleme yeteneğine sahiptir ve bu nedenle kanser, damar sertliği, kalp hastalığı ve bazı diğer hastalıklara karşı dokuları koruduğu düşünülmektedir (13). Son derece reaktif, kısa ömürlü bir serbest radikal olan nitrik oksit önemli bir biyolojik moleküldür. NO[•] metabolitleri nitrit ve nitrat, nitrik oksidin oksijenle ve süperoksitle oksidasyonu sonucunda oluşur (14).

Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) karsinogenesisin hem başlatılmasında hem de devam ettirilmesinde etkili olabilirler. Antioksidanlar ROS ve RNS tarafından hücrel ve moleküler düzeyde olabilecek olan hasarlara karşı koruma görevini üstlenir (15). Antioksidanlar bu koruma

görevlerini peroksidasyon zincir reaksiyonlarını engelleyerek veya serbest radikalleri ortamdan toplayarak yaparlar (16).

2.2. 7,12-Dimetilbenz[a]antrasen

Polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) karsinojenik etkileri ilk olarak 1921 yılında tespit edilmiştir. Bu maddelerin özellikle tümör gelişiminin başlangıç aşamasında etkili oldukları vurgulanmıştır (17).



Şekil 2.1. 7,12-Dimetilbenz[a]antrasen molekülü

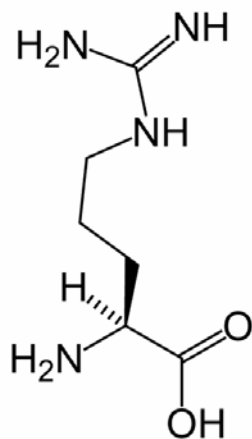
| | | |
|-----------------|---|-----------------|
| Molekül Formülü | : | $C_{20}H_{16}$ |
| Molar kütle | : | 256.34 |
| Erime Sıcaklığı | : | 122-123 °C (18) |

7,12-Dimetilbenz[a]antrasen (DMBA) kanserojen bir madde olup, deneysel meme tümörleri oluşumu ve göğüs kanseri çalışmalarında kullanılmaktadır (19). DMBA metabolizması sırasında meydana gelen serbest radikaller hücre içinde ve diğer hücrelere diffüze olarak da yayılabilirler. Bu radikaller lipit hasarlarına yol açarak hücrede zararlı sonuçlara neden olurlar. DMBA gibi maddeler, DNA'nın yapısını bozarak ve lipit peroksidasyonuna neden olarak, hücrede hidroksil ve süperoksit anyon radikalleri gibi radikallerin oluşmasına neden olmaktadır (20). DMBA ile yapılan çalışmalarda bu maddenin tümör hücresi sayısında önemli ölçüde artışa neden olduğu bildirilmiştir (21).

2.3. Arjinin (Arg, R)

Arjinin bir α -aminoasittir. L-arjinin, doğada bulunan proteinlerin yapısını oluşturan 20 aminoasitten biridir. Memeli hayvanlarda, arjinin temel aminoasitlerden biri olarak kabul edilmektedir. Organizmanın gelişim safhasına ve sağlık durumuna göre bazen dışarıdan beslenme yoluyla temin edilmesi kaçınılmaz olabilmektedir. Bebekler etkili bir şekilde arjinin sentezleyemediklerinden, bebekler için esansiyeldir. Yetişkinler ise arjinini sentezleyebilirler (22).

Arjinin ilk olarak İsviçreli kimyacı Ernst Schüle tarafından acıbadem fidesi ekstresinden izole edilmiştir (22).



Şekil 2.2. L-arjinin aminoasidi (22)

Arjinin bazik özellik taşıyan aminoasitlerden biridir. Uzun yan zinciri hidrofobik özellik taşımasına rağmen bu yan zincirin ucunda bir guanidyum grubu bulunmaktadır. pK_a değeri 12.48 olan guanidyum grubu bazik, nötr ve hatta hafif asidik ortamlarda dahi pozitif yük taşımaktadır. Çift bağ elektronları ve nitrojenlerdeki yalnız elektron çiftleri arasındaki konjugasyon nedeniyle pozitif yük delokalize olabilmektedir. Guanido grubu ayrıca birden fazla hidrojen bağı da yapabilir (22).

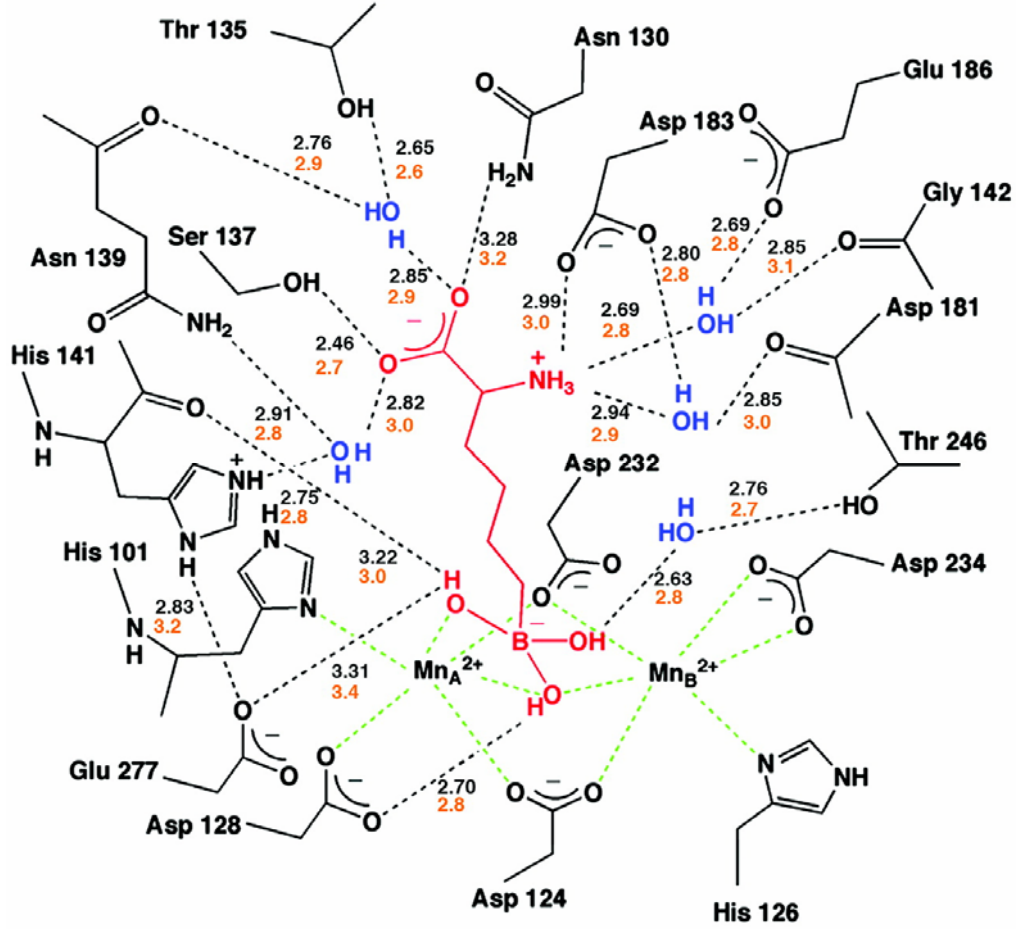
2.4. Arjinaz ve Nitrik Oksit Sentaz

2.4.1. Arjinaz

Arjinaz (E.C. 3.5.3.1), üre döngüsünün son basamağında L-arjinini, üre ve ornitine hidroliz eder. Memelilerde karaciğer başta olmak üzere pek çok dokuda aktivitesi belirlenmiştir (24,25). Arjinazın aktif formu her biri 35.000 daltonluk üç alt üniteden oluşan, farklı dokularda 105-120.000 daltonluk bir yapı oluşturan, bir mangan metalloenzimdir (26,27). Biyolojik sistemlerde arjinaz enziminin önem taşıdığı başlıca metabolik yollar, üre döngüsü, prolin ve poliaminlerin biyosentez yolu (28) ve sitotoksik NO[•] radikalini sentezleyen NOS enzimiyle, paylaştığı substrat için girdiği yarışma yoludur (29). Arjinaz enziminin kanserli hücrelerde normal hücrelere göre daha fazla miktarda bulunduğu, kolorektal kanserler, epidermal papillomalar, sinir dokusu tümörleri, prostat karsinomu ve mide kanserlerinde gösterilmiştir. Serum arjinaz aktivitesinin arttığı diğer başlıca patolojik durumlar, karaciğer hücre harabiyeti, hemolitik anemiler ve miyokard enfarktüsüdür (30-36).

Üre döngüsünün bir enzimi olan arjinaz; arjininin üre ve ornitine hidrolizini katalizler. Karaciğer dışı arjinazın poliamin sağlanmasında rol oynadığı ileri sürülmüştür. Poliaminler kanser hücreleri gibi hızla bölünen ve çoğalan hücreler tarafından fazla miktarlarda sentezlenen organik katyonlardır. Arjinaz aktivitesinin bazı tür kanserlerde değiştiği gösterilmiştir (37,38).

Arjinaz enzim yapısı şekil 2.3'te gösterilmiştir.



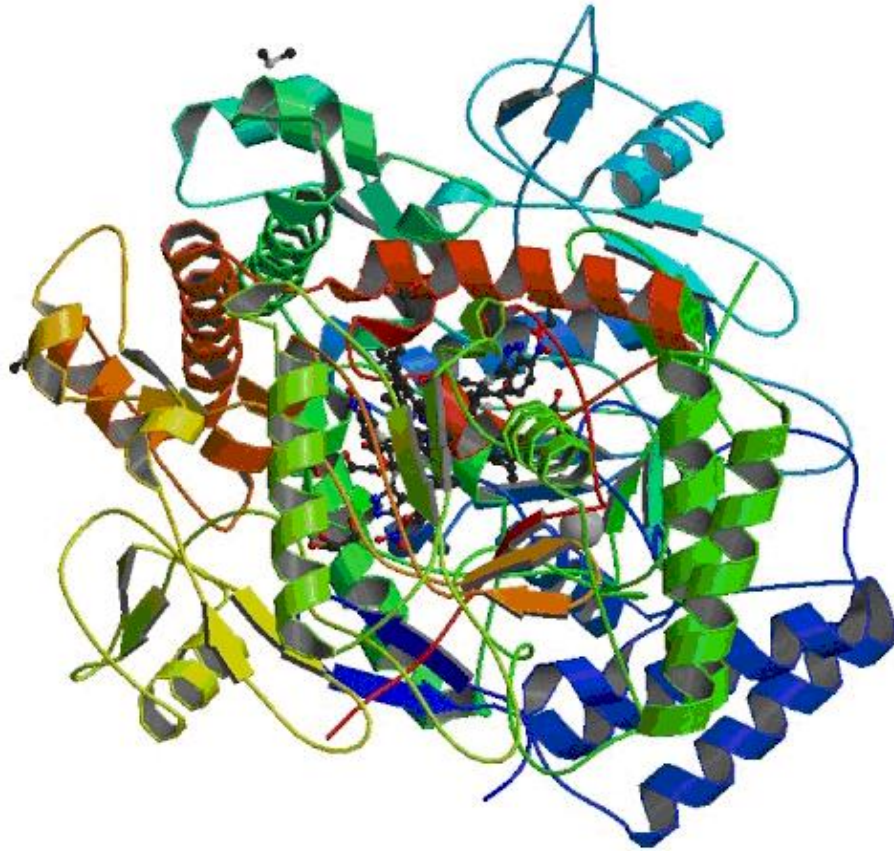
Şekil 2.3. Arjinaz enzimi (39)

Arjinaz'ın tetiklediği tepkimenin üre ve ornitin olmak üzere iki ürünü vardır. Arjininden oluşan ornitin, akut inflamasyona cevap olarak ve hücre proliferasyonunu sağlamak üzere poliaminlere dönüşür. Poliaminler (putresin, spermin ve spermidin) tüm memeli hücrelerinde bulunur. Hücre proliferasyonunun arttığı fizyolojik ve patolojik durumlarda, poliamin düzeylerinin de arttığı gösterilmiştir. Poliaminlerin, DNA ve RNA sentezi ile DNA'nın stabilizasyonunda uyarıcı etki göstermelerine paralel olarak, habis olaylarda artan hücre yapımı nedeniyle hücre içi poliamin metabolizmasının arttığı, özellikle eritrosit poliamin düzeylerinin tümör gelişimi ile doğrudan ilişkili olduğu bildirilmiştir (40,41). Diğer yandan, arjinaz aktivitesi ile kanser türleri arasında yakın bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, arjinaz aktivitesinin özellikle kalın barsak, kolorektal, prostat, pankreas, mide, küçük hücreli akciğer ve meme kanserlerinde arttığı gösterilmiştir (30,33,42-47). Kanserli

hastalarda yükselen arjinaz aktivitesi ile hücre üremesinde önemli bir işlevi olan poliaminler arasındaki ilişki, kanserojenik gelişimin artan poliamin sentezine bağlı olabileceği yargısını güçlendirmiştir (47). Dolayısı ile arjinazın kanser gelişimi sürecinde biyolojik belirteç olarak kullanabileceği vurgulanmıştır (45).

2.4.2. Nitrik Oksit Sentaz

Nitrik oksit ilk olarak 1980'lerde endotel gevşetici faktör olarak tanımlanmıştır; vazodilatasyon ve nörotransmisyon gibi birçok fizyolojik sürece öncülük eden anahtar sinyal molekülüdür (48,49). Ayrıca kanser gibi çeşitli patolojik hastalıklarda da rol oynamaktadır (50,51). NO; NOS diye adlandırılan bir enzim ailesi tarafından endojen olarak oluşturulur (52). 3 izoformu bulunur. 2'si Ca^{+2} bağımlı [nöronal NOS (nNOS)], NOS3 [endotelial NOS (eNOS)] ve biride Ca^{+2} den bağımsız izoform [indüklenebilir NOS2 (iNOS)] dur (53,54).



Şekil 2.4. Nitrik Oksit Sentaz (55)

İndüklenebilir NOS ve nitrik oksit düzeyleri in vivo daki hayvan ve insan kanserlerinin gelişimi ile ilişkilendirilebilir (56). NO kaynaklı birçok aktivite tümör artırıcı etkisine katılabilir, örneğin DNA hasarının indüklenmesi, artmış anjiyogenez, apoptotik hücre ölümü ve immün sistemin baskılanmasıdır (57-60). Diğer yandan bazı raporlar NO'nun tümör hücrelerine sitotoksik olduğunu ve tümörün büyümesi ve metastazını azalttığını göstermektedir. iNOS ve NO'nun tümör gelişimindeki zıt etkileri konsantrasyona bağlı bir fenomen olarak açıklanabilir ki düşük konsantrasyonlar tümör hücresi proliferasyonuna katkı sağlarken, ekzojen kaynaklı yüksek konsantrasyonlar tümör çoğalmasının inhibe ederler (51-64).

Shang ve ark (65) oral sükramoz hücreli karsinomlarda ekzojen NO'nun etkilerini bildirmişlerdir. Yüksek seviyelerdeki ekzojen NO'nun tümör hücrelerin ölümüne neden olduğunu bildirmişlerdir. Tüm bunlar ekzojen NO ile NO seviyelerindeki manipülasyonlarla gelecekte kanser tedavisinde yeni bir yol açılabileceğini göstermektedir. Ancak ekzojen NO'nun yüksek dozları limitlendirilmelidir. Çünkü vazodilatasyon, hipotansyon ve baş ağrısı gibi yan etkileri vardır (66).

Shang ve ark'na göre NO konsantrasyonları da in vitro da oral kanser hücrelerinin ölümüne neden olmakta ancak in vivo da sistemik komplikasyonlar olmadan benzer etkiler yapması olası değildir. Ancak gelecekteki muhtemel kanser terapisi içerisinde başka bir potansiyel alan daha vardır; iNOS'un farmakolojik inhibisyonu NO üretimini azaltacak ve tümörlerdeki anjiogenezde önemli bir azalmaya yol açacaktır (67,68).

Tüm NOS'lar, NO ve L-sitrülin oluşturmak için substrat olarak serbest L-arjinin ve moleküler oksijeni kullanmaktadırlar (69). Üretilen L-sitrülin serbest L-arjinini üreten metabolik döngüye katılır. L-arjinin analogları terminal guanidin nimojende değişiklik yapar ve/veya karboksil uç NO'nun üretimini inhibe etmek için yaygın bir şekilde kullanılır. Bu bileşiklerin birinin örneği metil ester analogu N⁶-nitro L-arjinin metil ester (L-NAME) olan bu bileşik tüm NOS tiplerini selektif

olmayarak inhibe etmektedir. Araştırmacılar aminoguanidini seçici olarak inhibe eden bazı maddelerde bulmuşlardır. Aminoguanidin L-arjininle aynı guanidin grubuna sahiptir. Aminoguanidin iNOS için eNOS tan 10 kat daha seçicidir ve nNOS için seçiciliği minimaldir (70,71).

2.5. İyon Kanalları

İyon kanalları dokuların bir çoğunda eksprese edilen ve sinyal iletiminde önemli rol oynayan protein yapılarıdır. Bu dokularda çeşitli hücresel fonksiyonların belirlenmesinde; proliferasyonda, sıvı transportunda, volüm kontrolünde, enzim aktivitesinde, sekresyonda, invazyonda, gen ekspresyonunda, uyarı ve kasılmada, hücre içi iletişimde önemli rollere sahiptir (72).

Daha önceden güçlü metastatik insan ve sıçan prostat kanser hücrelerinin fonksiyonel voltaj kapılı Na^+ kanallarını (VKSK) aşırı eksprese ettiği gösterilmiştir (73,74). VKSK aktivitesi metastaza özgü olan hücresel büyüme süreci, lateral hareketlilik ve galvanotaksi, transver invazyon ve sekretuar membran aktivitesi gibi çoğu hücresel davranışlara bağlıdır. Buna uygun olarak, endojen VKSK seviyeleri/aktivitesi önemli derecede daha büyük invazyon yeteneği olan zayıf metastatik LNCaP hücrelerinin etkisiyle artırılır ve VKSK'nin tek başına fazla eksprese edilmesi in vitro hücresel invazyon potansiyelini artırmada, VKSK aktivitesinin kanser hücresi invazyon yeteneği için gerekli ve yeterli olduğunu gösterir (75-81).

Membran iyon kanalları hücre proliferasyonu için esastır ve kanser gelişmesinde rolü vardır. Voltaj bağımlı kanalların onkojenik bir fonksiyonunun olduğu rapor edilmiştir. Üstelik, karsinogenez esnasında, iyon kanallarının ekspresyonundaki ya da aktivitesindeki değişiklikler inflamasyon esnasında görülen değişiklikler gibi epitellerdeki elektrolit transport özelliklerini etkiler. Potasyum kanalları prostat, kolon, akciğer ve meme kanserinin gelişiminde yer alır. K^+ kanalları, Ca^{+2} 'nin aktive ettiği ve voltaj bağımlı potasyum kanalları (Kv), a go-go ailesi ve 2P domain K^+ kanalları gibi farklı kanser dokularında tanımlanmıştır. Bununla birlikte Kv kanalları tümör hücrelerinde merkezi bir rol oynamaktadır,

özellikle epitelyal orjinli olanlarda. Eag-1 kanallarıyla düzenlenen hücre döngüsü, normalde sadece oositlerde ve kolay uyarılan dokularda bulunur ve de kanser hücrelerinde bulunur. Bu kanalların aktivasyonu hücre proliferasyonu için esas olan plazma membranının hiperpolarizasyonunu indükler. Membran voltajının hiperpolarizasyonu Ca^{+2} sinyalinin oluşumuna yardım eder ve intraselüler pH'nın düzenlenmesi ve hücre volümü için gereklidir. Bu değişikliklerin tümü (Ca^{+2} , pH ve volüm) açıkça hücre proliferasyonunu etkiler (82-89).

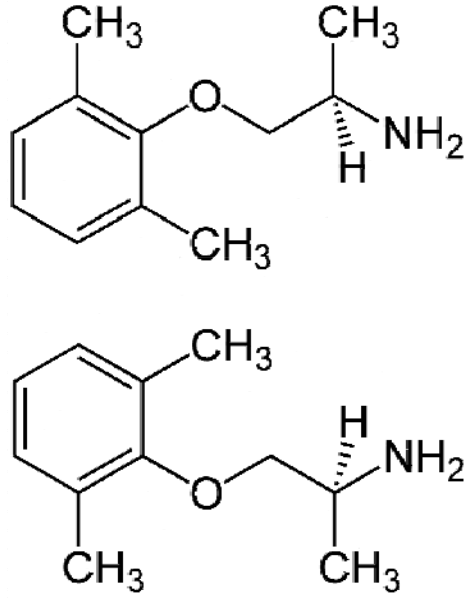
Na^{+} reabsorpsiyonu ve K^{+} sekresyonu, iyon kanalları, Na-K-ATPaz gibi transport proteinlerini içeren iki basamaklı süreçlerdir. Kanal aktivitesinde ya da Na-K-ATPaz'ın turnover oranındaki değişiklikler, K^{+} sekresyonu ve Na^{+} absorpsiyonunda büyük etkilere neden olurlar. Bu fonksiyonlar, bazolateral K^{+} kanallarıyla olur. Birincisi, hücre membran potansiyelini oluşumuna katılırlar. K^{+} sekresyonu ve Na^{+} absorpsiyonu elektrojenik süreçler olduğundan, hücre membran potansiyelinin değişmesi K^{+} sekresyonu ve Na^{+} absorpsiyonu üzerine önemli etkileri olur. Bazolateral K^{+} 'nın Ba^{+} ile iletkenliğinin inhibisyonunun Na^{+} reabsorpsiyon oranını düşürdüğü bulunmuştur. İkinci olarak bazolateral membrandaki K^{+} kanalları bazolateral membran boyunca K^{+} 'nın tekrar döngüsünde bulunur, bu tekrar döngü Na-K-ATPaz'ın fonksiyonunu anlamak için önemli hale gelmektedir. K^{+} 'nın tekrar döngüsü kısa devreyi azaltır (90-93).

2.6. Sodyum Kanal Blokeri

Sodyum kanal blokerleri bu bileşiklerin membran stabilize edici özelliklerinden dolayı tedavi olarak çalışılmıştır. Çoğu terapötik sodyum kanal bloker bileşiği, inaktive olan bölgedeki tek önemli blok kanallarına bağlıdır (94). Sonuç olarak yüksek frekanslı stimülasyon azalırken, toksisiteyi düşüren sodyum kanal fonksiyonunun bazal seviyede ya da düşük sıklıkta olması neredeyse hiç etkilenmemiştir (95).

Yeni bir sodyum kanal blokeri ve nöro-protektif ajan olan RS100642 kullanıma bağlı sodyum blokeri meksiletinin bir analogudur. Daha önce yapılan in

vitro çalışmaları, hipoksi ya da hipoglisemiye ya da Na^+ kanal aktivatörü veratridinin etkisiyle oluşan hasara karşı RS100642 'nin nöron kültürlerinde koruma sağladığı rapor edilmiştir. Aynı kültürlerde veratridin ya da KCl etkisiyle (glutamat hariç) intrasellüler Ca^{+2} artışında bir azalma olmuştur bu da sodyum kanallarının seçici düzenlendiğini gösterildiği bildirilmektedir (96).



Şekil 2.5. Meksiletin (2-(2-aminopropoxy)-1,3-dimethylbenzene) (97)

Molekül Formülü : $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}$
 Molar kütlesi : 179.259 g/mol

RS100642' nin meksiletine benzer olan sodyum kanal bağlama özelliklerine de sahip olduğu fakat sıçan vagus siniri preparatlarıyla belirlendiği gibi aksiyon potansiyeli bileşiklerinde daha güçlü doza bağımlı redüksiyon sergiledikleri belirlenmiştir. 10 mM konsantrasyonlarına kadar ki RS100642 bağlama affinitesi sodyum kanalları için seçicidir ancak diğer opiyat, glutamat, GABA ve diğer voltaj kapılı iyon kanallarına önemli bir affinite göstermemiştir (98-100).

2.7. Poliaminler

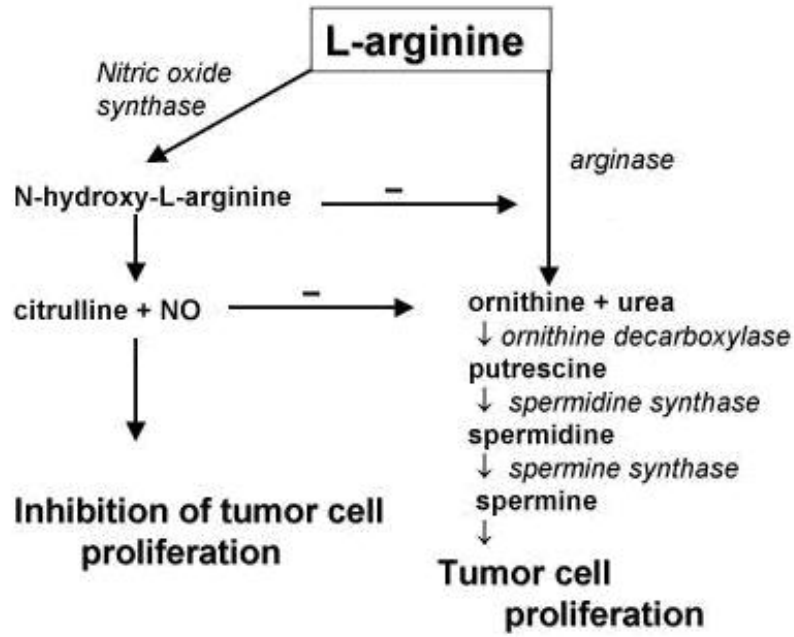
Günümüzde olası bir düzenleyici enzim olan arjinazla yapılan çalışmalarda artış vardır. Bu ilginin nedeni, arjinazın nitrik oksit, poliamin, agmantin, prolin ve glutamat sentezinde oynadığı olası rol olabilir. Arjinaz enzimi, üre sentezindeki vazgeçilmez rolünün yanında, poliamin, prolin ve glutamat sentezi için ornitin üretimini de sağlar. Poliaminlerin hızlı büyüyen hücre ve dokularda yüksek konsantrasyonlarda buldukları ve hücre büyümesi ve farklılaşması için gerekli oldukları gösterilmiştir (40).

Büyüme ile ilişkili genler, örneğin; c-fos ve c-myc protoonkojenleri hücre sel çoğalma sürecinde aktive edilirler. Mitojenik uyarıyı takiben poliamin sentezinde eş zamanlı bir artış ve c-fos protoonkojeninin transkripsiyonu gözlenmiştir. Benzer olarak habis dönüşüm poliamin sentezinde bir artışa neden olmaktadır. Poliaminlerin cmyc ve c-fos transkripsiyonunu artırdığı gösterilmiştir (101). Poliaminler bu yüzden büyüme süreci için gerekli maddeler olup aynı zamanda karsinogenezle de ilişkilidir (102). Biyolojik sıvılarda poliamin ölçümü, kanserlerin teşhisinde, kanser tedavisinin izlenmesinde ve yeniden nüksün değerlendirilmesinde yararlı bir araç olarak kullanılmaktadır. Poliamin konsantrasyonlarının meme kanserinde de arttığı, tümör poliamin konsantrasyonları ile tümörün yeniden nüks etmesi arasında pozitif bir korelasyon olduğu bulunmuştur (30).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda kalın barsak, kolorektal, prostat, mide ve küçük hücreli akciğer kanseri gibi çeşitli kanser vakalarında serum ve doku arjinaz düzeyinin arttığı belirtilmekte ve arjinazın kanser vakaları için belirleyici bir enzim olabileceği ileri sürülmektedir (47,48). Meme kanserli hastalarda yapılan çalışmalarda da serum arjinaz aktivitesi, sağlıklı kadınlardakinden yüksek bulunmuştur (103). Dolayısı ile tüm bu çalışmalar arjinaz enzimi ile kanser vakaları arasında yakın bir ilişkinin varlığını göstermektedir.

Arjinaz enziminin üzerinde durulan diğer bir özelliği ise nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile ortak substrat olan arjinini kullanmasıdır (104). NOS etkisi ile

arjininden nitrik oksit üretilmekte ve bu iki enzimin arjinini tüketmek için birbiriyle yarıştığı vurgulanmaktadır. Bu yolla oluşan NO' nun kanser gelişiminde etkisi olduğu bildirilmiştir (105). Birbiri ile yarışma halinde olan bu iki enzimden biri olan arjinaz enzim aktivitesinin artması, NOS enzimini baskılayarak üretimi ornitin lehine çevirebilir. Bu durum poliamin sentezini artırırken, NO üretiminin azalmasına neden olacaktır.



Şekil 2.6. L-Arjinini ortak substrat olarak kullanan iki enzim sisteminin gösterimi (23)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada; İnönü Üniversitesi Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen, ortalama ağırlığı 205 ± 13 g olan Sprague Dawley türü 4 aylık dişi ratlar kullanıldı. Ratlar öncelikle 30 gün boyunca normal olarak (ad libitum) beslendi ve yaşam ortamlarına uyum sağlamaları sağlandı. Daha sonra her bir kafeste iki rat bulunacak şekilde ratlar üç gruba bölündü: I. Kontrol grubu (n=19), II. 7,12-DMBA grubu (n=14) ve III. 7,12-DMBA+ İKB (iyon kanal blokeri) grubu (n=18). Kontrol grubuna sadece mısırözü yağı i.p. olarak enjekte edildi, ikinci gruptaki ratlara tek doz 10 mg/kg b.w. dozda mısırözü yağı içerisinde çözülmüş 7,12-DMBA i.p. olarak enjekte edildi. Üçüncü gruptaki ratlara 7,12-DMBA enjeksiyonundan 150 gün sonra total doz 1 mg/kg b.w. olacak şekilde 500 µl serum fizyolojik içerisinde çözülen RS100642 (meksiletin analogu olan sodyum kanal blokeri) birer hafta ara ile toplam dört dozda verilecek şekilde kuyruk veninden enjekte edildi. Son enjeksiyondan bir hafta sonra ise eter anestezisi altında dekapite edilen ratların karaciğer dokuları çıkarıldı. Serum fizyolojik ile derhal perfüze edilen dokular pH 7.4 PBS tamponu içerisinde homojenize edildi ve +5 °C'de ve 14 000 g.'de santrifüj edilerek elde edilen süpernatantlar üç ayrı ependrof tüpe alınarak ölçüm zamanına kadar (15 gün boyunca) -40 °C'de saklandı.

3.1. Lowry Protein Tayini

Protein miktar tayini Lowry metoduna göre yapıldı (106). Bu metod, proteinin yapısında bulunan tirozin ve triptofan aminoasitlerinin fosfotungstat kompleksini molibden mavisine indirgemesi prensibine dayanır. Reaksiyon bakır (Cu^{2+}) ile belirginleştirilir.

3.1.1. Çözeltiler

A Çözeltisi: %2'lik Na_2CO_3 'ün 0.1 N NaOH'teki çözeltisi

B Çözeltisi: %1'lik CuSO_4 çözeltisi

C Çözeltisi: %2'lik Sodyum Potasyum tartarat çözeltisi

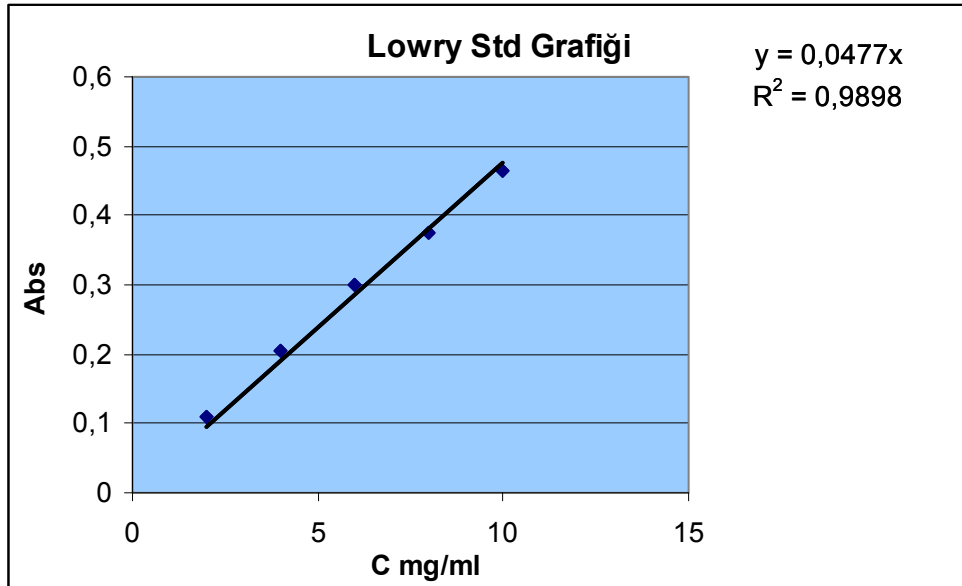
D Çözeltisi: 98 hacim A çözeltisi + 1 hacim B çözeltisi + 1 hacim C çözeltisi karışımı

E Çözeltisi: 1 hacim Folin Fenol belirteci + 1 hacim distile su karışımı

Bovin Serum Albumin (BSA) Çözeltisi: Standart protein çözeltisi olarak kullanılan BSA 10 mg/ml konsantrasyondaki stok çözülden 2,4,6,8,10 mg/ml'lik çözeltileri hazırlandı.

3.1.2. Deneyin yapılışı

Test ve standart tüplerine 490 µl, kör tüpüne 500 µl distile su kondu. Tüm tüplere 2.5 ml D çözeltisi ilave edildikten sonra, test tüplerine dilüe edilmiş numuneden 10 µl; standart tüplerine de 10 µl her bir standarttan ilave edildi ve tüpler vorteks ile iyice karıştırıldı. Oda ısısında karanlıkta 10 dk bekletildikten sonra, tüm tüplere 250 µl E çözeltisi eklendi. 25 °C'de 30 dk bekletildikten sonra, spektrofotometrede 650 nm'de köre karşı sıfırlanarak okuma yapıldı. Standart grafiği yardımıyla numunelerin protein içerikleri hesap edildi.



Şekil 3.1. Protein standart grafiği

3.2. Nitrit Ve Nitrat Analizi

NO oksitlenerek nitrit (NO_2) ve nitrata (NO_3) dönüşür. Nitrat daha kararlı bir yapıdır ve nitrik oksit türevlerinin büyük çoğunluğu nitrat formundadır. Nitrit ve nitrat tayini Cortas N.K. ve ark. geliştirmiş oldukları metod uyarınca gerçekleştirildi (107).

3.2.1. Çözeltiler

Glisin-NaOH tamponu 500 ml pH= 9,7

3,2 gr NaOH tartılıp 40 ml suda çözülerek 2 M'lık NaOH çözeltisi elde edildi. 7,5 gram glisin bir miktar deiyonize suda çözüldü ve üzerine 2 M'lık NaOH çözeltisi eklenerek glisin pH sı 9,7'ye ayarlandı. Daha sonra çözelti 500 ml'ye tamamlandı. Bu tampon çözelti 0 – 8 °C'de buzdolabında saklanarak bir ay süre ile kullanılabilir.

Sülfanilamid Çözeltisi

%37'lik HCl'den 66,2 ml HCl alınıp bir mezür içerisinde hacmi 250 ml'ye tamamlanarak 3M'lık HCl hazırlandı. Bu çözelti içine 2,5 gr sülfanilamid eklendi. Sülfanilamid sıcak HCl içinde iyice çözüldü. Bu çözelti oda sıcaklığında saklandı.

N-Naftiletillen diamin (NDA) çözeltisi

50 mg NDA tartılıp 250 ml deiyonize suda çözüldü. Bu çözelti, 0-8 °C'de iki ay süreyle kullanılabilir.

Bakır sülfat (CuSO_4) çözeltisi

250 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ alınarak deiyonize su ile 200 ml'ye tamamlandı. Bu şekilde 5 mmol/L'lik çözelti hazırlandı.

Çinko sülfat (ZnSO_4) çözeltisi

10,8 gr $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 'dan alınarak deiyonize su ile 500 ml'ye tamamlandı. Bu şekilde 75 mmol/L'lik çözelti hazırlandı.

Sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi

1,1 gr NaOH alınarak deiyonize su ile 500 ml'ye tamamlandı. Bu şekilde 55 mmol/L'lik çözelti hazırlandı.

Sülfürik Asit (H₂SO₄) çözeltisi

%98'lik H₂SO₄'ten 2,8 ml alınarak deiyonize su ile 500 ml'ye tamamlandı. Bu şekilde 0,1 mol/L'lik çözelti hazırlandı.

Standart sodyum nitrit (NaNO₂) çözeltisi

Standartlar hazırlanırken çözücü olarak 10 mmol/L'lik Na₂B₄O₇ çözeltisi kullanıldı. Öncelikle 0,0069 gr NaNO₂ alınarak 100 ml 10 mmol/L'lik Na₂B₄O₇ çözeltisi içinde çözülerek 1 mM'lık stok NaNO₂ çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu stok çözeltisi kullanılarak 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 5; 10 µmol/L konsantrasyonlarında nitrit standartları hazırlandı.

Standart potasyum nitrat (KNO₃) çözeltileri

Standartlar hazırlanırken çözücü olarak yine 10 mmol/L'lik Na₂B₄O₇ çözeltisi kullanıldı. Öncelikle 0,0069 gr KNO₃ alınarak 100 ml 10 mmol/L'lik Na₂B₄O₇ çözeltisi içinde çözülerek 1 mM'lık stok KNO₃ çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu stok çözeltisi kullanılarak 0,5; 1,0; 2,0; 5; 10; 25; 50; 100 µmol/L konsantrasyonlarında nitrat standartları hazırlandı.

Kadmiyum Granüllerinin Hazırlanması

Kadmiyum granülleri 12 saat süresince 0.1 M H₂SO₄ çözeltisi içerisinde bekletildi ve bu işlem sonrasında 5 kez deiyonize su ile iyice yıkandı. Yıkanan granüller 5 mM CuSO₄ çözeltisinde 3 dakika vortekslendi ve CuSO₄ uzaklaştırılarak kadmiyumlar glisin-NaOH tamponu ile 3 defa yıkandı ve kurutma kağıdı ile kurutularak hemen kullanıldı.

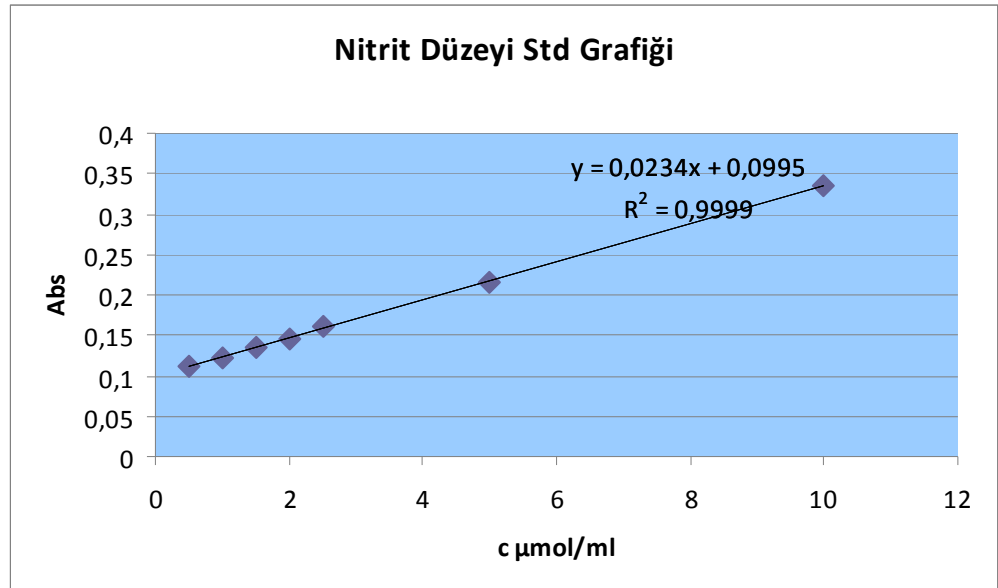
3.2.2. Deneyin Yapılışı

3.2.2.1. Deproteinizasyon

Bu işlem için her bir serumundan 0,5 ml alınıp üzerine 2 ml $ZnSO_4$ çözeltisi ve 2,5 ml NaOH çözeltisi eklendi. Böylelikle elde edilen deproteinize serum 10 kez sulandırılmış oldu. Numuneler vortekslenip iyice karışması sağlandı. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi daha sonra 3500 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Proteinler çöktürülerek, süpernatant kısmı ayrıldı. Bu süpernatantlar deneyin bir sonraki aşamasında numune olarak kullanıldı.

3.2.2.2. Direkt nitrit ölçümü

Örnek tüplerine, deproteinize numunelerden kadmiyum ile reaksiyona sokmadan direkt olarak 2'şer ml konuldu ve üzerine 1 ml sülfanilamid ve 1 ml NNDA eklendi. Vortekslenerek 45 dk karanlıkta bekletildi ve spektrofotometrede 545 nm'de okuma yapıldı. Aynı işlemler farklı konsantrasyonlara dilüe edilmiş olan $NaNO_2$ standart çözeltileri için de uygulandı ve elde edilen Abs-C standart grafiği yardımı ile numunelerin serbest nitrit konsantrasyonları hesaplandı.

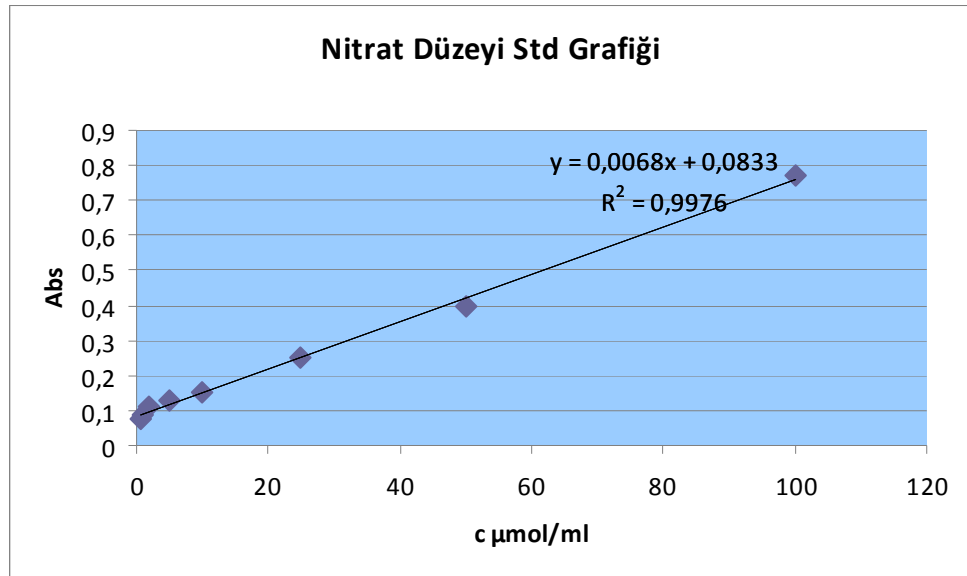


Şekil 3.2. Nitrit düzeyi standart grafiği

3.2.2.3. Nitrat Ölçümü

1 ml glisin-NaOH buffer tüm tüplere konuldu ve örnek tüplerine 1'er ml deproteinize numunelerden, standart tüplerine ise farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standartlardan eklendi. Aktivasyon işleminden geçirilen kadmiyumlardan 2.5 g tüm tüplerin üzerine ilave edildi. 90 dk oda ısısında karıştırılarak bekletildi. Süre sonunda tüplerden 2'şer ml alınarak üzerine 1 ml sülfanilamid ve 1 ml NNDA ilave edildi. Vortekslendikten sonra 45 dk karanlıkta bekletildi ve spektrofotometrede 545 nm'de okuma yapıldı.

Bulunan total nitrit değerlerinden bir önceki aşamada ölçülen serbest nitrit değerleri çıkarılarak nitrite dönüştürülmüş olan nitrat miktarları elde edilmiş oldu.



Şekil 3.3. Nitrat düzeyi standart grafiği

3.3. Arjinaz Aktivesi Ölçümü

3.3.1. Kimyasal Maddeler

HCl

Na₂CO₃

NaHCO_3
 MnCl_2
 FeCl_3
 H_3PO_4
 Diasetilmonoksim
 Tiosemikarbazid ($\text{CH}_5\text{N}_3\text{S}$)
 Üre (H_2NCONH_2)
 Benzoikasit ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$)
 CuSO_4
 NaOH
 L-arjinin ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$)
 H_2SO_4
 Folin
 Albumin
 Na-K Tartarat ($\text{NaK}(\text{COO})_2(\text{CHOH})_2$)

3.3.2. Deneyin Yapılışı

3.3.2.1. Homojenatın Arjinaz Aktivitesinin “TDMU (Tiyosemikarbazid Diasetil Monoksim Üre) Yöntemi” ile Ölçümü

Arjinaz aktivitesinin ölçümü; substrat olarak kullanılan arjininin örnekteki arjinazla hidrolizi sonucu oluşan ürenin miktarının TDMU (Tiyosemikarbazid Diasetil Monoksim Üre) yöntemi ile spektrofotometrik olarak saptanması ile gerçekleştirildi. TDMU spektrofotometrik olarak üre düzeyini ölçen basit ve hassas bir yöntemdir (108).

Diasetilmonoksim, üre ile direkt olarak reaksiyona girmez. İlk önce asit ortamda ısının etkisi ile diasetil ve hidroksilamine hidrolize olur. Diasetil, asit solüsyonda üre ile kondanse olur ve sarı rengi stabilize etmek için tiyosemikarbazid ve Fe iyonları kullanılır. Ortamdaki üre miktarı $0,3 \mu\text{mol/ml}$ 'yi aştığı zaman doğrusallığını kaybetmesi ve Beer-Lambert kanunundan sapmalar olması bu

yöntemin olumsuz bir yönüdür. Ancak, bu olumsuzluk yüksek absorbands değeri veren örneklerin sulandırıldıktan sonra ölçülmesi ile giderilebilmektedir.

3.3.2.2. Çözeltiler

50 mM Arjinin Çözeltisi

L-Arjinin balon jodede bir miktar distile suda çözülür. 0,1 M HCl ile pH'ı 9,7'ye getirilir, üzeri distile suyla 100 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti buzdolabında +4°C'de saklanır.

Karbonat Tamponu: pH 9,7, 100 mM $\text{CO}_3^{2-}\text{H}/\text{CO}_3^{-1}$

1,06 Na_2CO_3 bir miktar distile su ile balon jodede çözülür, sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. 0,1 M Na_2CO_3 elde edilmiş olur.

0,84 g NaHCO_3 bir miktar distile su ile balon jodede çözülür, sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. 0,1 M NaHCO_3 elde edilmiş olur.

Karbonat tamponunun hazırlanması için; 100 ml 0,1 M Na_2CO_3 üzerine; 0,1 M NaHCO_3 ilave edilerek pH 9,7'ye getirilir. Hazırlanan tampon çözelti buzdolabında +4°C'de saklanır.

9 mM MnCl_2 Çözeltisi

1,456 g $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bir miktar distile su ile balon jodede çözülür ve 1000 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti buzdolabında +4°C'de saklanır.

Asit Karışımı

0,12 M FeCl_3 (%56,7'lik H_3PO_4 içinde): 3,24 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ bir miktar distile su ile bir balon jodede çözülür, üzerine %85'lik H_3PO_4 'ten 66,7 ml eklenir. Daha sonra distile suyla 100 ml'ye tamamlanır.

Yukarıda hazırlanan (a) çözeltisinden 1,0 ml alınır ve üzerine 999 ml %20'lik (V/V) H₂SO₄'ten ilave edilir. Deney aşamasında asit karışımı olarak bu çözelti kullanılır. Oda ısısında saklanabilir.

Renk Ayracı

6,238 g (0,0617 M) diasetilmonoksim ile 0,328 g (0,0036 M) tiyosemikarbazid karıştırılarak bir miktar distile suyla balon jodede çözülür. Daha sonra üzeri 1000 ml'ye distile suyla tamamlanır. Ayıraç oda ısısında saklanabilir.

Üre Standardı (0,1 µmol üre/ml)

3 mg üre, 100 ml 0,016 M benzoik asit içinde çözülür, stok olarak kullanılan bu çözelti, deney esnasında 1/5 oranında sulandırılarak 0,1 µmol üre/ml'lik üre standardı elde edilir. Üre stok standart çözeltisi +4°C'de buzdolabında saklanmalıdır.

3.3.2.3. İşlemler

Arjinaz enzim aktivitesi tayini amacıyla iki deney düzeneği kuruldu. Birinci düzeneğe; numaralanmış deney tüpleri, ikinci düzeneğe; kör (blank), standart ve sıfır zaman (zero time blank) tüpleri konuldu. İlk düzenekteki deney tüpleri üçlü, ikinci düzenekteki deney tüpleri ikili hazırlandı. Numaralandırılan tüplerden sıfır zaman tüplerini hazırlamaktaki amacımız, enzim kaynağındaki endojen ürenin arjinaz aktivitesinin hesaplanması esnasında göz ardı edilebilmesidir.

Hazırladığımız süpernatant içerisinde Arjinaz aktivesi çok fazla olduğundan, öncelikle örneklerimizi belli oranda seyrelttik. Enzim kaynağı olarak kullanılmak üzere hazırlanan süpernatant 9 mM MnCl₂ ile 1/3 oranında dilüe edildi. Böylece ortamdaki MnCl₂ konsantrasyonu 6 mM'a getirilmiş oldu. Dilüe edilen örnek 55°C'lik su banyosunda 20 dakika preinkübasyona bırakıldı. Bu sırada deney düzeneğindeki deney ve sıfır zaman tüplerine, 0,4 ml 50 mM'lik arjinin çözeltisinden ve 0,4 ml 100 mM'lik karbonat tamponundan konuldu. Kör tüpüne 1 ml distile su,

standart tüpüne ise 0,1 $\mu\text{mol/ml}$ 'lik üre standardından 1 ml konuldu. 20 dakikalık preinkübasyonun sonunda enzim kaynağı ve hazırlanmış olan deney tüpleri 37°C 'lik su banyosunda 3 dk bekletilerek aynı ısıya gelmeleri sağlandı. Daha sonra 37°C 'ye gelen enzim kaynağından, deney ve sıfır zaman tüplerine 0,2 ml kondu ve vortex karıştırıcı ile iyice karıştırıldı. Deney tüpleri enzimatif reaksiyonun oluşması için sallantılı su banyosunda 37°C 'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyonda 15 dakika bekleyen deney düzeneğine, sürenin sonunda hemen 3'er ml asit karışımı ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Bu işlemleri takiben her iki düzenekteki tüplere 2'şer ml renk ayırıcı ilave edildi, vortex karıştırıcı ile karıştırıldı, tüm tüplerin ağızları kapatıldı ve tüpler 10 dakika kaynar su banyosunda bırakılarak renk oluşumu sağlandı.

Deney sonunda tüpler soğuk su içinde soğutularak spektrofotometre de 520 nm dalga boyunda köre karşı absorbanları okundu.

3.3.2.4. Arjinaz Aktivitesinin Hesaplanması

Her deney tüpünün absorbanından, kendi sıfır zaman (zero time blank) absorbanı çıkartılarak net absorban elde edildi. Böylece enzim kaynağındaki endojen ürenin absorbanı hesabın dışında bırakıldı. Standardın absorbanı, standarttaki üre miktarı ve sulandırma katsayılarından elde edilen seyrelme faktörü hesaba katılarak enzim aktivitesi hesap edildi.

$$U/\text{ml/saat arjinaz} = A \times F \times 4 \times (0,1/0,38)$$

A : Net absorban

F : Toplam seyrelme çarpanı

4 : 15 dakikanın 1 saate dönüştürülmesi çarpanı

0,1 : Standart üre konsantrasyonu

0,38 : Standart ürenin absorbanı

Bir ünite enzim aktivitesi, 1 saatte 37°C'de substrat olarak kullanılan L-Arjiinin'den 1 µmol üre oluşturan enzim aktivitesinin mg protein cinsinden ifadesidir. Enzim aktiviteleri, ml'deki protein miktarına bölünerek özgül ünite olarak tanımlanmıştır.

Özgül Ünite: Ünite/mg protein (µmol üre/mg protein/saat); olarak belirtilmiştir.

3.4. Ornitin Düzeyinin Ölçümü

Chinard Yöntemi prensibi: Bu yöntem ornitinin ninhidrin ile oluşturduğu mor renkli kompleksin kolorimetrik olarak ölçümüne dayanmaktadır (109).

3.4.1. Kimyasal Maddeler

Trikloro asetik asit (TCA)

Ninhidrin

H₃PO₄

Glasiyel asetik asit

L-ornitin

3.4.2. Çözeltiler

%10'luk trikloro asetik asit (TCA) çözeltisi

10 g TCA tartılır, distile su ile çözülür ve 100 ml'ye tamamlanır.

Ninhidrin ayıracı

2.5 g ninhidrin: 40 ml 6 N H₃PO₄ ve 60 ml glasiyel asetik asitin içinde çözülür.

Derişik glasiyel asetik asit

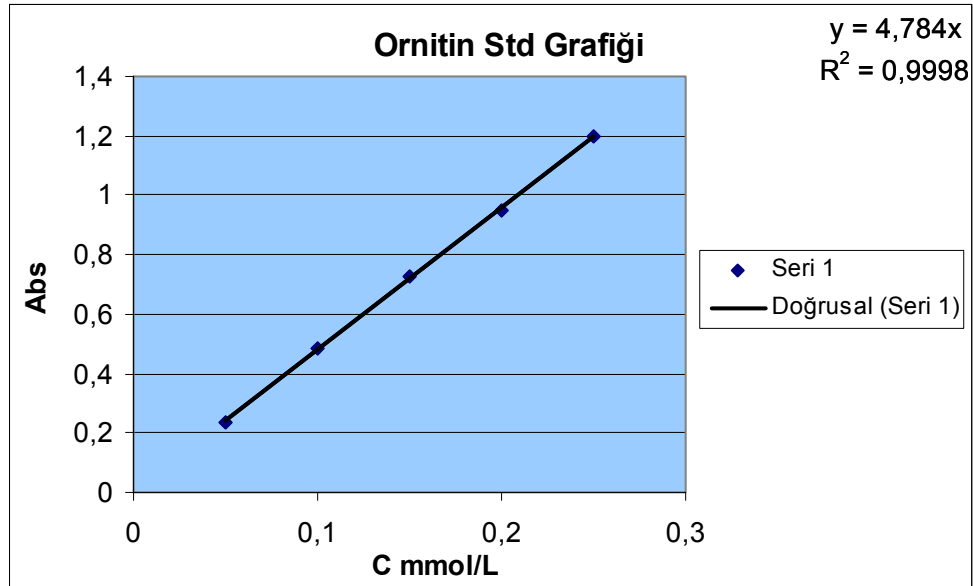
Deney tüpü sayısına göre glasiyel asetik asitten bir miktar alınır.

0.3 µmol/ml standart ornitin solüsyonu

0.0506 g L-ornitin tartılır ve distile su ile çözülür ve 1 litreye tamamlanır. Böylece 0.3 µmol/ml'lik ornitin konsantrasyonu elde edilir. Bu çözeltilerden belli oranlarda seyreltmeler yapılarak 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 ve 0,25 µmol/ml konsantrasyonlarda standart çözeltiler elde edildi ve standart grafiğinin çizilmesinde kullanıldı.

3.4.3. Deneyin Yapılışı

Çalışılacak doku homojenatı %10'luk TCA ile 1/1 oranında muamele edildikten sonra vortekslenerek 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Deney tüpüne 1 ml süpernatant, kör tüpüne 1 ml distile su ve standart tüpüne de 1 ml belli oranlarda değişen konsantrasyonlarda ornitin çözeltisi konuldu. Tüplere sırayla 2.5 ml glasiyel asetik asit ve 0.25 ml ninhidrin ayırıcı konuldu. Tüm tüpler vortekslenerek karıştırıldıktan sonra 30 dakika kaynar su banyosunda tutuldu. Su banyosundan çıkarılan tüpler hızla soğutuldu ve spektrofotometrede 515 nm'de köre karşı absorbansları ölçüldü.



Şekil 3.4. Ornitin miktarı standart grafiği

Ornitin düzeyinin hesaplanması

Ornitin değerinin hesaplanması için Őu formül kullanıldı;

$$\text{Ornitin } (\mu\text{mol/ml}) = \frac{\text{Numunenin absorbansı} \times 2}{4.784}$$

2 : Homojenatın TCA ile sulandırılma katsayısı

4.784 : Standart grafiği yardımı ile belirlenen dönüŐtürme faktörü

Elde edilen ornitin değerleri protein miktarına bölünerek ($\mu\text{mol/mg}$ protein) olarak standardize edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada 7,12-DMBA ile ratlarda tümör gelişim prosesi başlatıldı ve karaciğerde arjinaz ve NOS enzim aktiviteleri (NOx düzeyleri üzerinden) ile ornitin düzeyleri ölçüldü. Elde edilen bulgular tablo ve grafikler halinde gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Deney gruplarında karaciğer dokusu nitrit, nitrat, ornitin düzeyleri ile arjinaz aktivitesi

| GRUPLAR | NİTRİT μmol /ml | NİTRAT μmol /ml | ORNİTİN μmol orn/mg prt | ARJİNAZ U/ml/saat |
|--------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--|-----------------------------------|
| Kontrol Grubu (n=19) | 8,8111 ± 0,1517 ^{b,c} | 129,0011 ± 3,1982 ^b | 0,1222 ± 5,591.10 ⁻³ ^b | 707,3189 ± 39,7290 ^{b,c} |
| DMBA Grubu (n=14) | 7,915 ± 0,1887 ^a | 114,3693 ± 4,3211 ^a | 0,1641 ± 7,271.10 ⁻³ ^{a,c} | 883,0787 ± 42,0340 ^{a,c} |
| DMBA+İKB Grubu (n=18) | 8,1211 ± 0,1266 ^a | 122,1478 ± 3,5193 | 0,1312 ± 8,540.10 ⁻³ ^b | 527,6514 ± 35,8410 ^{a,b} |

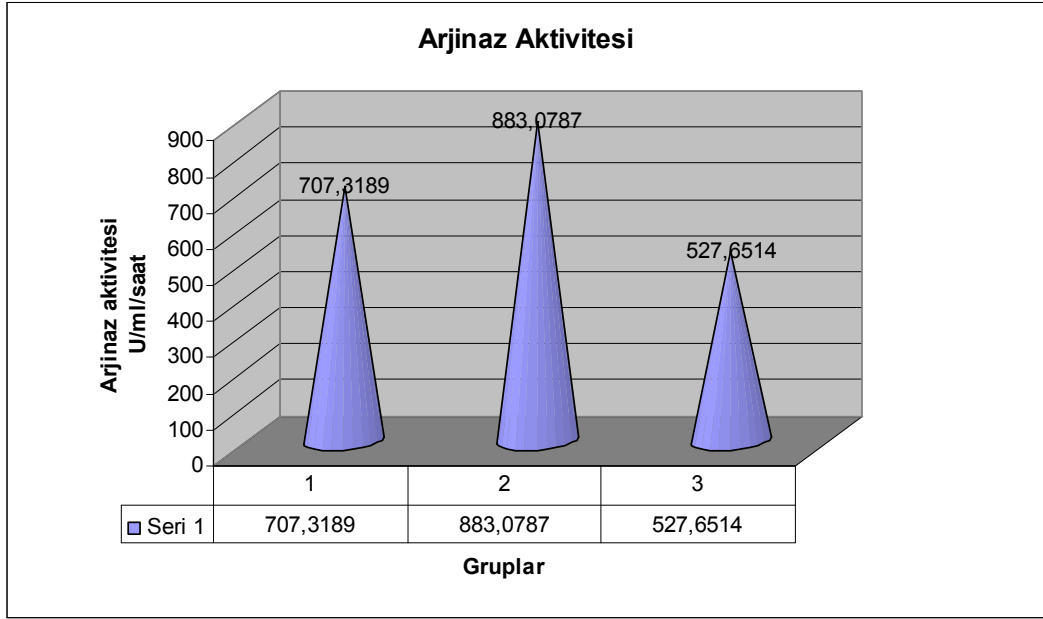
Bulgular “x ± standart hata” olarak verilmiştir.

a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05

b: DMBA grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05

c: DMBA+İKB grubu ile karşılaştırıldığında p<0,05

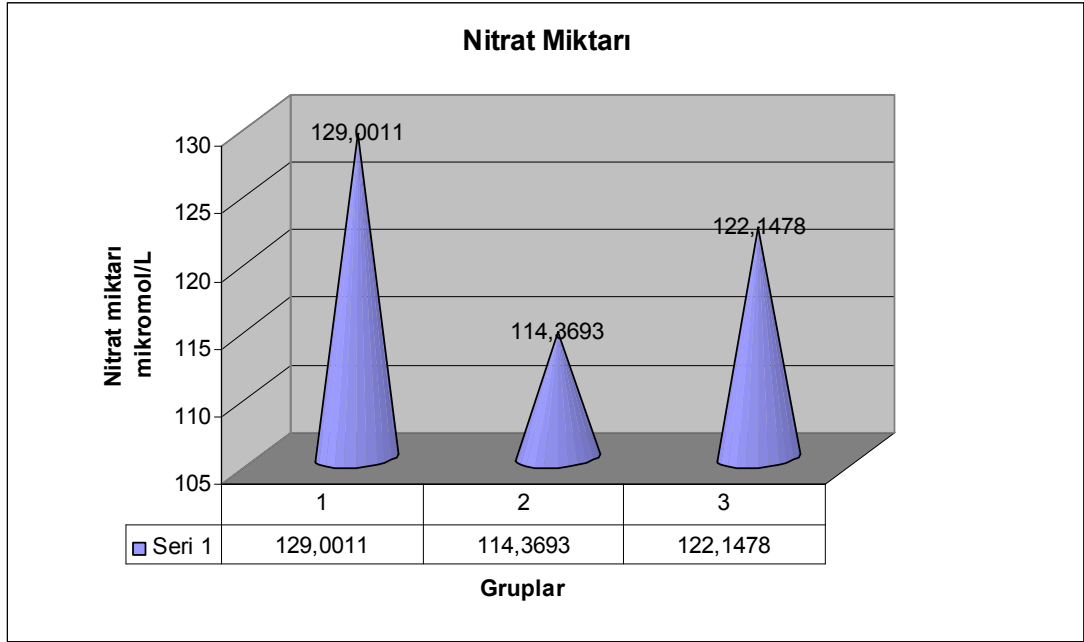
4.1. Karaciğer Dokusunda Arjinaz Aktivitesi



Şekil 4.1. Kontrol grubu (1), DMBA grubu (2) ve DMBA+İKB (3) grubu arjinaz aktiviteleri

Grafikte de görüldüğü üzere DMBA grubu arjinaz aktivitesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,05$). Ayrıca DMBA+İKB grubu arjinaz aktivitesi hem DMBA hem de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulundu ($p < 0,05$).

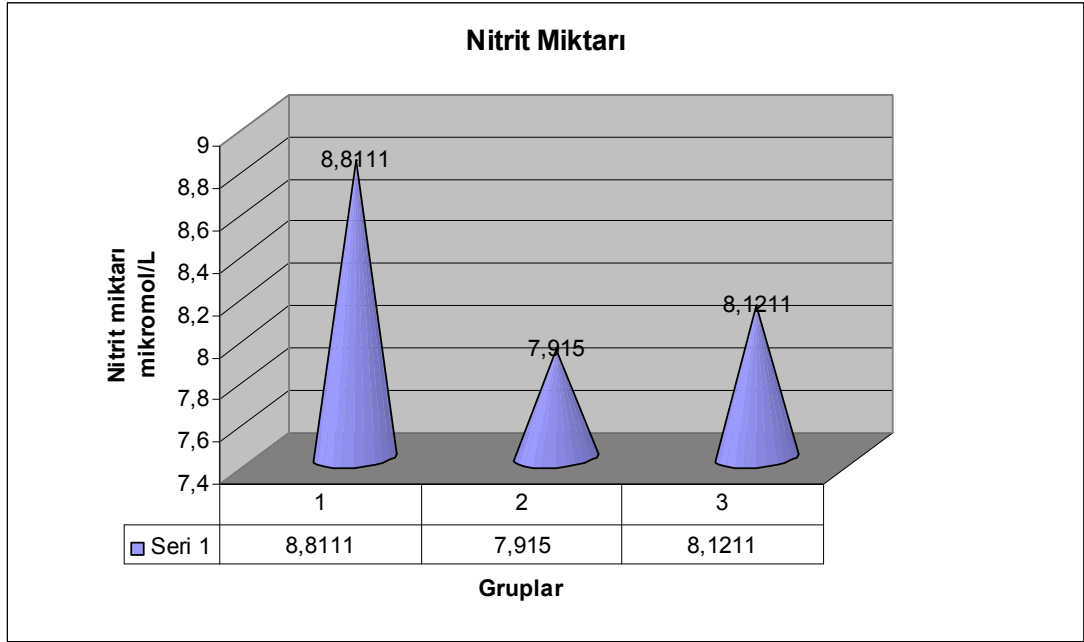
4.2. Karaciğer Dokusu Nitrat Düzeyleri



Şekil 4.2. Kontrol grubu (1), DMBA grubu (2) ve DMBA+İKB (3) grubu nitrat miktarı

Grafikte DMBA grubu nitrat düzeylerinin kontrol grubuna oranla önemli ölçüde düşük olduğu ($p < 0.05$) görülmektedir. Bununla birlikte bu düşüş DMBA+İKB grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı kabul edilebilecek sınırlar içinde değildir ($p < 0.05$).

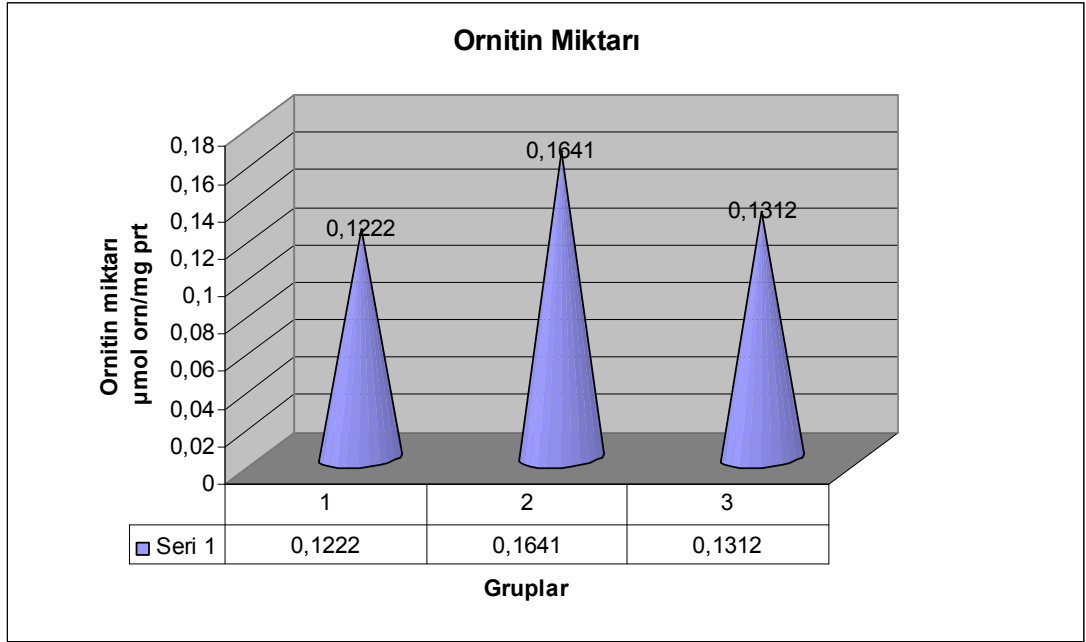
4.3. Karaciğer Dokusu Serbest Nitrit Düzeyleri



Şekil 4.3. Kontrol grubu (1), DMBA grubu (2) ve DMBA+İKİB (3) grubu nitrit miktarı.

Grafikte gösterildiği gibi kontrol grubu nitrit düzeyleri ile hem DMBA grubu hem de DMBA+İKİB grubu nitrit düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulundu ($p < 0,05$). Bununla birlikte DMBA grubu ve DMBA+İKİB grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p > 0,05$).

4.4. Karaciğer Dokusunda Ornitin Düzeyleri



Şekil 4.4. Kontrol grubu (1), DMBA grubu (2) ve DMBA+İKİB (3) grubu ornitin düzeyleri.

DMBA grubu ornitin düzeyleri hem kontrol hem de DMBA+İKİB grubu ornitin düzeylerinden istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulundu ($p < 0.05$). Bununla birlikte DMBA grubu ile DMBA+İKİB grupları arasındaki fark anlamlı değildi ($p > 0.05$).

5. TARTIŞMA

Son yıllarda ve teknolojik gelişmelere paralel olarak kanser vakalarında ve buna bağlı mortalite oranlarında önemli artışlar olması, araştırmacıları, kanseri önlemek ve mortalitenin ana nedenlerinden biri olan metastaz potansiyellerini sınırlandırabilmek amaçlı çalışmalara yoğunlaştırmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmalar genel anlamda kanserin gelişme sürecindeki belirli aşamalara yönelik olarak ya süreci başlamadan önlemeye dönük, ya da daha sonraki aşamalarda oluşmuş olan tümörü yok etmeyi ve metastazı engellemeyi amaçlayan çalışmalar olmuştur. Ancak tümör hücrelerinin normal hücrelerden çok daha dayanıklı ve son derece yüksek adaptasyon yeteneğine sahip olması, bununla birlikte tüm uğraşlara rağmen henüz sağlıklı hücre ile tümör hücresini birbirinden ayıracak, sadece tümör hücresinde etkili seçiciliğe sahip bir ilaç geliştirilememiş olması araştırmalardaki başarı oranını önemli ölçüde sınırlandırmaktadır.

Kanser gelişim sürecinin son derece multifaktöriyel olması, genetik faktörlerin yanı sıra pek çok endojen ve ekzojen etkenin süreçte doğrudan ya da dolaylı rol oynaması ise bir başka önemli engeldir. Pek çok araştırmacı oksidatif stresin neden olduğu oksidatif hasarın kanser gelişiminin, özellikle başlangıç (promotion) ve ilerleme aşamalarında rol oynadığı gerçeğinden yola çıkarak çok sayıda farklı antioksidan moleküllerle gerçekleştirmiş oldukları çalışmalarda henüz tatmin edici bir sonuç alınamamıştır. Kaldı ki pek çok fizyolojik proseste organizmanın lehine fonksiyonlar üstlenen bir takım serbest radikal molekülün antioksidan moleküllerce tümüyle ortadan kaldırılmasının belli düzeyde oksidatif hasara uğraması nedeniyle apoptozise uğrayabilecek başkalaşmış bir hücrenin apoptotik sürecini önleyerek onun bir tümör hücresine dönüşmesine neden olabileceği olasılığı da halen tartışma konusudur.

Bir başka alternatif tedavi yaklaşımı organizmanın anabolik reaksiyonlarında substrat olarak kullanılan biyomoleküllerin analoglarının kullanılarak bu proseslerin işleyişleri bloke edilmek suretiyle tümör hücrelerinin çoğalmalarının baskılanmasıdır. Ancak sözünü ettiğimiz inhibitör analog moleküller

normal hücrelerle tümör hücrelerini ayırma yeteneğine sahip olmadıklarından sağlıklı hücrelerde de hücre yenilenmesini baskılamakta ve özellikle immün sisteminin önemli ölçüde zayıflamasına neden olmaktadır. Antianjiojenik ajanların kullanımı tümörün beslenmede ve metastaz yapmasında rol oynayan damarların oluşum sürecini baskılayarak hem tümör gelişimini hem de metastaz potansiyellerini sınırlandırmayı amaçlamaktadır. Son yıllarda bu alanda yapılan çalışmalardan umut verici sonuçlar elde edilmektedir.

Biz bu çalışmada kanser gelişim sürecinde cereyan eden proseslere farklı bir noktadan yaklaşarak arjinaz/nitrik oksit sentaz ilişkisinin olası rolünü ve yeni geliştirilmiş olan bir sodyum kanal blokerinin sürece etkisini ortaya koymayı amaçladık. Arjinaz ve nitrik oksit sentaz, arjinaz aminoasitini ortak substrat olarak kullanan farklı iki enzim sistemi olup NOS aktivitesi nitrikoksit üretimini sağlarken arjinaz aktivitesi ornitin üzerinden meydana gelen poliaminlerin üretimine neden olarak hücre proliferasyonunun regülasyonunda rol oynamaktadır.

Hipotetik yaklaşımımız kanser gelişim sürecinde arjinaz/NOS dengesinin arjinaz lehine bozulduğu ve NOS aktivitesinin baskılanması sonucu aşırı miktarda üretilen ornitinden türeyen poliaminleri tümör hücrelerinin proliferasyonunu sitümüle ettiği şeklindedir. Çalışma bulgularımız da bu iddiamızı doğrular niteliktedir.

Polisiklik aromatik hidrokarbon sınıfı güçlü bir karsinojen olan 7,12-DMBA enjekte ettiğimiz grupta ornitin düzeyleri kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p < 0,05$). Daha önce yapılmış olan çalışmalarda da araştırmacılar benzer sonuçlar rapor etmişlerdir. Şöyle ki; kolorektal ve meme kanserli olgularda tümör dokusu arjinaz aktivitesinin sağlıklı dokuya oranla daha yüksek düzeylerde bulunduğu rapor edilmiştir (48). Straus ve arkadaşları (110) serum arjinaz aktivitesinin kanser tanısında yeni bir marker olarak değerlendirilebileceğini ileri sürmüşlerdir. Poliaminlerin (putresin, spermin ve spermidin) hücre çoğalmasındaki ve gelişimindeki rolü kanıtlanmış olmakla beraber kanser gelişimindeki olası rolü henüz kesin olarak ortaya konulabilmiş değildir. Yine

de eldeki bulgular kanser hücrelerinin hızla çoğalma ve gelişme eğilimlerinde poliaminlerin sitümülator rol oynama olasılığının bulunabileceğini düşündürmektedir.

Arjinaz ve NOS'ın ortak substrat olarak arjinin amino asidini kullanmalarının doğal sonucu olarak artan arjinaz aktivitesi, NOS aktivitesinin sınırlanmasına ve nitrik oksit üretiminde azalmaya neden olacaktır. Nitrik oksit ve nitrit oksit metabolitleri (nitrit, nitrat, nitrozotiyoller, nitrozaminler ve peroksinitrit) son derece sitotoksik ve genotoksik etkilere sahiptir. Ancak Fukumara ve ark (111) nitrik oksit sentaz aktivitesindeki artışa paralel olarak artan toksik nitrikoksit metabolitlerinin tümör hücrelerinin gelişimini ve metastaz yeteneğini inhibe edebileceğini bildirmişlerdir. Ancak bu güne kadar yayınlanmış olan çalışmalar nitrik oksit düzeyleri ile kanser gelişimi arasındaki olan ilişkiyi sağlıklı bir biçimde değerlendirebilecek ve bir yargıya varabilecek doneler içermemektedir.

Bazı araştırmacılar yüksek nitrik oksit metabolitlerinin genotoksik etkileri nedeni ile kansorejen etki gösterebileceğini iddia ederken (112), Jenkins ve arkadaşları (113) yapmış oldukları çalışmalarında düşük NO düzeylerinin tümör hücrelerinin gelişimini ve çoğalmasını, Edwards ve ark (114) ise metastaz kabiliyetlerini sitümüle ettiğini ortaya koymuşlardır. Tüm bunlara ilaveten Bonavida ve arkadaşları nitrik oksit donörlerinin kanser tedavisinde yeni bir tedavi yaklaşımı olarak değerlendirilmesi gerektiğini rapor etmişlerdir.

Bizim bulgularımız da nitrik oksit düzeyleri ile kanser gelişimi arasında negatif bir korelasyon varlığını düşündürecek niteliktedir. 7,12-DMBA enjekte ettiğimiz grupta nitrik oksit metabolit düzeyleri kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Bu sonuç bizim gerçekten de kansorejen madde maruziyeti sonrasında arjinaz/NOS balansının arjinaz yönüne kaydığı ve poliamin üretimine giden yolağın sitümüle olduğunu ve nitrik oksit üretim yolağının baskılandığını, sonuçta oluşan poliaminlerin tetiklediği aşırı hücre çoğalmasının da kanser gelişim süreciyle örtüşmekte olduğunu rapor edebilmemize olanak vermektedir. Bu noktada arjinaz aktivitesindeki artışın baskılanması ve NOS

aktivitesindeki azalmanın inhibe edilmesinin karsinogenezini baskılayabileceğini öne sürebiliriz.

Öte yandan, pek çok hücrel aktivitenin regülasyonundan hücre içi iyon konsantrasyonu, özellikle de kalsiyum, sodyum ve klor önemli rol oynamaktadır. Sözünü ettiğimiz iyonlarının her birinin intrasellüler konsantrasyonu bir diğerininki ile ilintilidir. Hücre membranı üzerinde lokalize olan iyon kanal proteinleri hücre içi ve hücre dışı ortam arasındaki iyon dengesini devam ettirmekte rol oynamaktadır. Ayrıca iyon kanal aktivasyonunun regülasyonu aynı zamanda hücrel fonksiyonların da düzenlenmesi ile ilişkili bir süreçtir. Son yıllarda yapılmış olan pek çok çalışmada tümör hücrelerinde iyon kanal proteinlerinin aşırı ekspresyonu sonucu iyon dengesinin bozulduğu, membran polarizasyonunun değiştiği ve hücrelerin tutunma kuvvetlerinin azaldığı rapor edilmiştir (76,79).

Günümüzde iyon kanallarının hücrenin yaşam döngüsünde ve onkojenik faaliyetlerinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Malign transformasyon sırasında hücrel başkalaşım proseslerinden bir tanesi de iyon kanal proteinlerinin aşırı ekspresyonudur (115). Bu kanalların artışı doğal olarak hücrelerin çoğalma süreçlerinde bir takım değişikliklere, kontakt inhibisyon özelliklerini ve aynı zamanda büyüme faktörlerine olan bağımlılıklarını yitirmelerine yol açar. Sodyum ve potasyum kanallarının insan meme, akciğer, prostat, kolon ve karaciğer karsinomu hücre serilerinde aşırı miktarda eksprese olduğu, bu yapıların kanal blokaj özelliği olan ajanlarla inhibe edilmesi halinde ise sayılan tümör serilerinde DNA sentezi ve hücre proliferasyonu süreçlerinin yavaşladığı gösterilmiştir (116,117).

Biz ve çalışmamızda benzer bir yaklaşımla çalışma gruplarımızdan bir tanesine kansorejen madde ile birlikte meksiletin analogu bir sodyum kanal blokeri olan RS100642 kodlu bileşiği i.v. olarak enjekte ettik. Bulgularımız daha önceki çalışmaları destekler niteliktedir. 7,12-DMBA enjekte ettiğimiz grupta ornitin ve arjinaz düzeylerindeki artış, 7,12-DMBA ile birlikte iyon kanal blokeri enjekte ettiğimiz grupta anlamlı bir şekilde inhibe olmuştur. Nitrit ve nitrat düzeylerinde ise veriler kontrol grubuna daha yakın olmakla beraber 7,12-DMBA enjeksiyonuna bağlı

azalışın iyon kanal blokeri ile inhibisyonu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bulunamamıştır. İyon kanal blokeri kullanımı kanser gelişimini yavaşlatıcı etki göstermekle birlikte bu konuda moleküler düzeyde daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada 7,12-DMBA verilen ratlarda arjinaz ve NOS enzim sistemi arasındaki balansın bozulduğu yönünde bulgular elde ettik. Kanserojen madde enjeksiyonuna bağlı olarak NOS enzim sisteminin aktivitesi azalırken, arjinaz enzim sisteminin aktivitesi ve ornitin düzeyinin arttığını gördük. Ornitin üzerinden sentezlenen poliaminler hücre proliferasyonunu sitümüle ederek kanser gelişim sürecini hızlandıracaktır.

İyon kanal blokeri enjekte edilen grupta arjinaz aktivitesi ve ornitin düzeylerindeki artış inhibe olurken, NOS aktivitesi artarak kontrol grubu seviyelerine yakın değerlere ulaştı.

Bu bulgular ışığında; kanser gelişim sürecinde, NOS aktivitesinin indüklenmesi ve/veya iyon kanal blokerlerinin kullanılmasının bu süreci yavaşlatıcı etki gösterebileceği kanısına vardık.

KAYNAKÇA

1. Onat R., Emerk K. (1997) *Temel Biyokimya*, İzmir, Saray Medikal Yayıncılık, Cilt 2, 661-662.
2. Tornillo, L., Bubendorf, L., Kunzelmann, K., Schreiber, R., Ousingsawat, J., Spitzner, M., Puntheeranurak, S., Terracciano, L.: Human Cancer Biology Expression of Voltage-Gated Potassium Channels in Human and Mouse Colonic Carcinoma.
3. Heffelfinger, S.C., Yan, M., Gear, R.B., Schneider, J., LaDow, K., Warshawsky, D. (2004). Inhibition of VEGFR2 prevents DMBA-induced mammary tumor formation, Department of Pathology and Laboratory Medicine and Department of Environmental Health, University of Cincinnati, Cincinnati, OH, USA. *Laboratory Investigation*, 84, 989–998.
4. Wheatley DN Scott LA, Lamb J.L., Smith S (2000). Single amino (arjinine) restriction growth and death of cultured HeLa and normal human diploid fibroblasts. *Cell Physiol Biochem* 10:37-55,.
5. Boucher, J.L., Moali, C., Tenu, J.P. (1999). Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arjinase competition for L-arjinine utilization. *Cell Mol Life Sci*, 55, 1015-1028,
6. Dı'az-Troya, S., Najib, S., Sa'nchez-Margalet, V. (2005). eNOS, nNOS, cGMP and protein kinase G mediate the inhibitory effect of pancreastatin, a chromogranin A-derived peptide, on growth and proliferation of hepatoma cells. *Regulatory Peptides*, 125, 41– 46.
7. Wheatley, D.N., Campbell, E. (2002). Arjinine catabolism, liver extracts and cancer, *Pathology Oncology Research*, 8(1).
8. Halliwell B. (1991). *Drug antioxidant effects*. *Drugs*; 42(4):569 - 605.
9. Kour H., Perkins M.J. (1991). *The free radical chemistry of food additives*, New York.
10. McCord J. (1993). Human disease, free radicals and the oxidant / antioxidant balance. *Clin Biochem*; 26: 351 - 357.
11. Erişim 15 Mart 2009
<http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01.pdf>

12. Carroll E. C. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med*; 107: 526 - 545.
13. Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) : A structure-activity relationship study
14. Marley R., Patel R. P., Orié N., Ceaser E., Darley-Usmar V., Moore, K. (2001). Formation of Nanomolar Concentrations of Nitroso- Albumin in Human Plasma by Nitric Oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 31: 688–696.
15. Rasheed, MH., Beevi, SS., Geetha, A. (2007). Enhanced Lipid Peroxidation and Nitric Oxide Products with Deranged Antioxidant Status in Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oral Oncology*, 43, 333– 338.
16. Sinclair AJ., Barnett AH., Junec J. (1990). Free Radicals and Antioxidant Systems in Health and Disease. *Bri. J. Hosp. Med.* 43: 334–344.
17. Cavalieri, E. L., Rogan E.G. (1992). The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis the central role of radical cations in metabolic activation. *Pharmacology-Therapeutics*, 55 (2),183-189.)
18. Sigma Aldrich. Erişim: 20.Nisan.2009
http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=D3254%7CSIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO%7CBRAND_KEY&F=SPEC
19. Guerin, MR. (1978). Energy sources of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Gelboin HV & Ts'o POP (Editors). Polycyclic Hydrocarbons and Cancer: Chemistry, Molecular Biology and Environment. *Academic Press*, New York, 1-42.
20. Gene, M., Bay, A., Öztürk, F., Aydogdu N. (2005). Comparison of chemopreventive effects of vitamin E plus selenium versus metatonin in 7,12-Dimethyl benz[a]anthracene-induced Mouse brain damage. *Cancer Detection and Prevention*, 29, 54-58.
21. Khaidakov, M., Bishop, M.E., Manjanatha, M.G., Lyn-Cook, L.E., Desai, U.G., Chen, J. J., Aidoo, A. (2001). Influence of dietary antioxidants on the mutagenicity of 7,12-Dimethyl benz[a]anthracene and bleomycin in female rats. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 480-481, 163-170.
22. Wikipedi. Erişim: 21 Mayıs 2009-06-11

<http://tr.wikipedia.org/wiki/Arjinin>

23. Erişim 4 Mayıs 2009

<http://www.translational-medicine.com/content/figures/1479-5876-1-5-1.jpg>

24. Aminlari M. (1992). *Novel colorimetric method for assaying arginase activity*. Ciin Biochem. 25:431-436,

25. Halifeoğlu I. (1993). İnsan Karaciğer, Eritrosit Ve Uterus Doku Arginazının Kinetik Özellikleri. Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi, Elazığ.

26. Grody Ö., Dizikes Gj., Cederbaun SD. (1987). Human arginase isoenzymes. *Isoenzymes Curr Top Biol Med Res*,13:181- 214,

27. Bauscur L., Cabello J., Veliz M., Gonzales A. (1966). Molecular Forms of human liver arginase Biochem. Biophys. *Açta*, 28, 149-54,

28. Williams-Ashman HG., Canellakis ZN. (1979). Polyamines in mammalian Biology and Medicine. *The University of Chicago Press. Perspective in Biology and Medicine*. 421- 451,.

29. Gotoh T., Sonoki T., Nagasaki A., Terada K., Takiguchi M., Mori M. (1996). Molecular cloning for cDNA for non-hepatic mitochondrial arginase (arginase II) and comparison of its induction with nitric oxide synthase in a murine macrophage- like celi line. *Febbs Lett.*, 395:119-22

30. Leu SY., Wang SR. (1992). Clinical significance of arginase in colorectal cancer. *Cancer*, 70:5, 733-736.

31. Koza RA., Megosh LC., Palmieri M., O'Brien TC. (1991). Constitutively elevated levels of ornithine and polyamines in Mouse epidermal papillomas. *Carcinogenesis*, 12:9, 1619- 1625.

32. Trapeznikova S.S., Navasardiants D.C., Levchenko L.I. (1986). Comparative study of the activity of arginase isoenzymes in brain tumors of humans and experimental animals. *Vopr Med Khim*. 32:6, 29-34.

33. Harris B.E., Pretlow T.P., Bradley E.L. (1983). Arginase activity in prostatic fluid of patients with benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *Cancer Res*. 43:6, 3008-3012.

34. Wu C.W., Chi C.W., Tsay S.H. (1987). The effects of arginase on neoplasm I. The role of arginase in the immunosuppressive effects of extract from

gastric cancer. *Chung Hua Min Kuo Wei Sheng Wu Chi Mien I Hsueh Cha Chih.* 20:4, 279-289.

35. Tietz NW. (1990). *Clinical Guide to Laboratory Tests*. Ed. NW. Tietz. WB Saunders Company, Philadelphia..

36. Porembaska Z., Kedra M., (1975). Early diagnosis of myocardial infarction by arginase activity determination. *Clin. Chem. Acta*, 60:3, 355-361.

37. Arginase and ornithine, as markers in human non-small cell lung carcinoma. *Cancer Biochem Biophys.* 17, 125-131.

38. Poremnska Z., Luboinski G., Chrzanowska A., Mielczarek M., Magnuska J., Baranczyk-Kuzma A. (2003) Arginase in patients with breast cancer. *Clin Chim Acta.* 328, 105-111.

39. Erişim 15 Mayıs 2009
<http://www.pnas.org/content/102/37/13058/F4.large.jpg>

40. Wallace H.M., Fraser A.V., Hughes A. (2003). A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J.* 376, 1-14.

41. Matthews H.R. (1993). Polyamines, chromatin structure and transcription. *Bioessays.* 15 (8), 561-6.

42. Konarska L., Kolasa T., Albrecht P., Regula A. (1993). Can arginase be a marker of the large bowel neoplasia? *Acta Biochim Pol.* 40 (1), 164-6.

43. Loser C., Folsch U.R., Paprotny C., Creutzfeldt W. (1990) Polyamine concentrations in pancreatic tissue, serum, and urine of patients with pancreatic cancer. *Pancreas* 5 (2), 119-27.

44. Wu C.W., Chi C.W., Lin E.C., Lui W.Y., P'eng F.K., Wang S.R. (1994) Serum arginase level in patients with gastric cancer. *J Clin Gastroenterol.* 18 (1), 84-5.

45. Suer Gokmen S., Yoruk Y., Cakir E., Yorulmaz F., Gulen S. (1999) Arginase and ornithine, as markers in human non-small cell lung carcinoma. *Cancer Biochem Biophys.* 17, 125-31.

46. Porembaska Z., Luboinski G., Chrzanowska A., Mielczarek M., Magnuska J., Baranczyk-Kuzma A. (2003) Arginase in patients with breast cancer. *Clin Chim Acta.* 328 (1-2), 105-11.

47. Bachrach U., Wang Y.C. (2002) Cancer therapy and prevention by green tea: role of ornithine decarboxylase. *Amino Acids* 22 (1), 1-13.
48. Fleming I., Busse R. (1996). NO: the primary EDRF, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 5–14.
49. L.J. Ignarro, Physiology and pathophysiology of nitric oxide, *Kidney Int. (Suppl.)* 2–5.
50. Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharmacol. Rev.* 43 109–142.
51. Ambs S., Hussain S.P., C Harris.C. (1997). Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression. *FASEB J.* 443–448.
52. Marletta M.A. (1994). Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 927–930.
53. Knowles R.G., Moncada S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 249–258.
54. Morris S.M., Billiar T.R. (1994). New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am. J. Physiol.* E829–E839.
55. Wikipedia commons. Erişim 15 Mayıs 2009
http://en.wikipedia.org/wiki/File:PBB_Protein_NOS3_image.jpg
56. Hofseth L.J., Hussain S.P., Wogan G.N., Harris C.C. (2003). Nitric oxide in cancer and chemoprevention. *Free Radic. Biol. Med.* 955–968.
57. Liu R.H., Hotchkiss J.H. (1995). Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. *Mutat. Res.* 73–89.
58. Fukumura D., Jain R.K. (1998). Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumors. *Cancer Metastasis Rev.* 77– 89.
59. Kolb J.P. (2000). Mechanisms involved in the pro and antiapoptotic role of NO in human. *Leukemia* 1685–1694.
60. Lejeune P., Lagadec P., Onler N., Pinard D., Ohshima H., Jeannin J.F. (1994). Nitric oxide involvement in tumor-induced immunosuppression. *J. Immunol.* 5077–5083.

61. Li L., Kilbourn R.G., Adams J., Fidler I.J. (1991). Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells. *Cancer Res.* 2531–2535.
62. Farias-Eisner R., Sherman M.P., Aeberhard E., Chaudhuri G. (1994). Nitric oxide is an important mediator for tumoricidal activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 9407–9411.
63. Xie K., Huang S., Dong Z., Juang S.H., Wang Y., Fidler I.J. (1997). Destruction of bystander cells by tumor cells transfected with inducible nitric oxide (NO) synthase gene. *J. Natl. Cancer Inst.* 421–427.
64. Juang S.H., Xie K., Xu L., Shi Q., Wang Y., Yoneda J., Fidler I.J. (1998). Suppression of tumorigenicity and metastasis of human renal carcinoma cells by infection with retroviral vectors harboring the murine inducible nitric oxide synthase gene. *Hum. Gene.* 845–854.
65. Shang Z.J., Li J.R., Li Z.B. (2002). Effects of exogenous nitric oxide on oral squamous cell carcinoma: an in vitro study. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 60 905–910.
66. Hegardt P., Widegren B., Li L., Sjogren B., Kjellman C., Sur I., H.O. (2001). Sjogren, Nitric oxide synthase inhibitor and IL-18 enhance the anti-tumor immune response of rats carrying an intrahepatic colon carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 50 491–501.
67. Downie I.P., Umar T., Boote D.J., Mellor T.K., Hoffman G.R., Brennan P.A. (2004). Does administration of isosorbide mononitrate affect cellular proliferation in oral squamous cell carcinoma? A prospective randomized clinical study. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 62 1064–1068.
68. Gallo, E. Masini, L. Morbidelli, A. Franchi, I. Fini-Storchi, W.A. Vergari, M. Ziche. (1998). Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 90 587–596.
69. Meller S.T., Gebhart G. (1993). Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 52 127–136.
70. Vallance P., Leiper J. (2002). Blocking NO synthesis: how, where and why?. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 939–950.

71. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357 (pt 3) 593–615.
72. Hille B. (1992). Ionic channels of excitable membranes. 2nd ed. Sunderland (Massachusetts): Sinauer Associates Inc.
73. Grimes J.A., Fraser S.P., Stephens G.J. (1995). Differential expression of voltage-activated Na⁺ currents in two prostatic tumour cell lines: contribution to invasiveness in vitro. *FEBS Lett.* 369-290.
74. Laniado M.E., Lalani E.N., Fraser S.P., (1997). Expression and functional analysis of voltage-activated Na⁺ channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasiveness in vitro. *Am J Pathol.*;150-1213.
75. Fraser S.P., Ding Y., Liu A., Djamgoz M. B. A. (1999). Tetrodotoxin suppresses morphological enhancement of the metastatic MAT-LyLu rat prostate cancer cell line. *Cell Tissue Res.* 295-505.
76. Fraser S.P., Salvador.V., Manning E. (2003). Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviours involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer. I. Lateral motility. *J Cell Physiol*;195-479.
77. Djamgoz M.B.A., Mycielska M., Madeja Z. (2001). Directional movement of rat prostatic cancer cells in directcurrent electric field: involvement of voltage-gated Na⁺ channel activity. *J Cell Sci.* 114-2697.
78. Smith P., Rhodes N.P., Shortland A.P., (1998). Sodium channel protein expression enhances the invasiveness of rat and human prostate cancer cells. *FEBS Letts*, 423-19.
79. Mycielska M.E., Fraser S.P., Szatkowski M., Djamgoz M. B. A. (2003). Contribution of functional voltage-gated Na⁺ channel expression to cell behaviours involved in the metastatic cascade in rat prostate cancer: II. Secretory membrane activity. *J Cell Physiol*;195: 461.
80. Krasowska M., Grzywna Z.J., Mycielska M. E., Djamgoz M.B. (2004). Patterning of endocytic vesicles and its control by voltage-gated Na⁽⁺⁾ channel activity in rat prostate cancer cells: fractal analyses. *Eur Biophys J.* 33-535.
81. Bennett E.S., Smith B.A., Harper J.M. (2004). Voltage-gated Na⁺ channels confer invasive properties on human prostate cancer cells. *Pflugers Arch*;447- 908.

82. Kunzelmann K. (2005). Ion channels and cancer. *JMembr Biol*, 205-159.
83. Pardo L.A. (2004). Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. *Physiology* (Bethesda).
84. Pardo L.A, Contreras-Jurado C., Zientkowska M. (2006). Role of voltage-gated potassium channels in cancer. *JMembr Biol*, 205:115[^]24.
85. Camacho J. (2006). Ether a go-go potassium channels and cancer. *Cancer Lett*, 233:1[^]9.
86. Wonderlin W. F., Strobl J.S. (1996). Potassium channels, proliferation and G1 progression. *JMembr Biol*;154: 91[^]107.
87. Farias L.M., Ocana D.B., Diaz L. (2004). Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers. *Cancer Res*;64:6996[^]7001.
88. Pardo L.A., Del Camino D., Sanchez A. (1999). Oncogenic potential of EAG K⁺ channels. *EMBO J*, 18: 5540[^]7.
89. Schreiber R. (2005). Ca²⁺ signaling, intracellular pH and cell volume in cell proliferation. *JMembr Biol* ,205: 129 [^] 37.
90. Smith, P.R., Benos, D.J. (1991). Epithelial Na channels. *Annu. Rev. Physiol.* 53:509–530.
91. Strieter, J., Stephenson J.L., Giebisch G., Weinstein.A.M. (1992). A mathematical model of the rabbit cortical collecting tubule. *Am. J. Physiol.* 263 F1063–F1075.
92. Strieter, J., Weinstein A.M., Giebisch G., J. Stephenson. (1992). Regulation of K transport in a mathematical model of the cortical collecting tubule. *Am. J. Physiol.* 263, F1076–F1086.
93. Dawson, D.C., Richards N.W. (1990). Basolateral K conductance: role in regulation of NaCl absorption and secretion. *Am. J. Physiol.* 259:C181–C195.
94. Urenjak J., Obrenovitch T. (1998). Neuroprotection—rationale for pharmacological modulation of Na(1)-channels. *Amino Acids*, 14 151–158.
95. Taylor C., . Narasimhan L. (1997). Sodium channels and therapy of central nervous system diseases. *Adv. Pharmacol.* 39 47–98.
96. J Dave., Lin Y., Ved H., Koenig M., Clapp L., Hunter J., Tortella F. (2001). RS-100642-198, a novel sodium channel blocker, provides differential

neuroprotection against hypoxia/hypoglycemia, veratridine or glutamate-mediated neurotoxicity in primary cultures of rat cerebellar neurons. *Neurotoxicity Res.* 3 381–395.

97. Wikipedia commons. Erişim 15 Mayıs 2009

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/01/Mexiletine_Structural_Formulae_of_both_Enantiomers.png

98. Graham S., Chen J., Lan J., Leach M., Simon R. (1994). Neuroprotective effects of a usedependent blocker of voltage-dependent sodium channels, BW619C89, in rat middle cerebral artery occlusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269 854–859.

99. Lee E., Ayoub I., Harris F., Hassan M., Ogilvy C., Maynard K. (1999). Mexiletine and magnesium independently, but not combined, protect against permanent focal cerebral ischemia in Wistar rats. *J. Neurosci. Res.*, 442–448.

100. Smith S., Meldrum B. (1995). Cerebroprotective effect of lamotrigine after focal ischemia in rats. *Stroke* 117–121.

101. Bachrach U, Wang YC, Tabib A. (2001). Polyamines: new cues in cellular signal transduction. *News Physiol Sci.* 16, 106-9.

102. Gugliucci A. (2004). Polyamines as clinical laboratory tools. *Clin Chim Acta.* 344 (1-2), 23-35.

103. Kingsnorth A.N., Wallace H.M., Bundred N.J., Dixon J.M. (1984) Polyamines in breast cancer. *Br J Surg.* 71 (5), 352-6.

104. Grillo M.A., Colombatto S. (2004) Arjinine revisited: minireview article. *Amino Acids.* 26, 345-51.

105. Blantz R.C., Satriano J., Gabbai F., Kelly C. (2000) Biological effects of arjinine metabolites. *Acta Physiol Scand.* 168 (1), 21-5.

106. Lowry O.H, Rosenburg N.J, Farr A.L and Randall R.J. (1951). Protein Measurements with the Fenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193-265

107. Cortas N.K., Wakid N.W. (1990). Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 36:1440-1443.

108. Geyer J.W., Dabich D. (1971). Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal Biochem*, 39:412-417.

- 109.** Chinard F.P. (1952). Photometric estimation of proline and ornithine. *J Biol Chem*;199:91-95.
- 110.** Straus B., Cepelak I., Festa G. (1992). Arginase, a new marker of mammary carcinoma. *Clin Chim Acta*, 210:5–12.
- 111.** Fukumura D., Kashiwagi S., Jain R.K. (2006). The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 6:521e34.
- 112.** Storr J.M., Burton A.F. (1974) The effects of arginine deficiency on lymphoma cells. *Br J Cancer* 30:50-59.
- 113.** Jenkins D.C., Charles I.G., Thomsen L.L., Moss D.W., Holmes L.S., Baylis S.A. (1995). Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:4392e6.
- 114.** Edwards P., Cendan J.C., Topping D.B., Moldawer L.L., MacKay S., Copeland E.M. (1996). Tumour cell nitric oxide inhibits cell growth in vitro, but stimulates tumorigenesis and experimental lung metastasis in vivo. *J Surg Res*, 63:49e52.
- 115.** Fraser S.P., Grimes J.A., Diss J.K.J., Stewart D., Dolly J.O., and Djamgoz M.B.A. (2003). Predominant expression of Kv1.3 voltage-gated K⁺ channel subunit in rat prostate cancer cell lines: electrophysiological, pharmacological and molecular characterisation. *Pflügers Arch* 446: 559–571.
- 116.** Stühmer W. (2002). The EAG potassium channel as a target for marine toxins.: 14. http://www.venomstodrugs.com/Venoms_Abstract_book.pdf
- 117.** Kelle İ. (2007). Biotoxins in Cancer Therapy. *Dicle Tıp Dergisi, Cilt: 34, Sayı: 3*, (226-232)

ÖZGEÇMİŞ

4 Şubat 1978'de Malatya' da doğdum. İlkokul eğitimimi Hidayet İlkokulunda, ortaokul ve lise eğitimimi Malatya Anadolu Lisesinde tamamladım. 2006 yılında İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldum. Aynı yıl İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım. 2008 yılı başında İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezinde Kimyager olarak çalışmaya başladım. Halen görevime devam etmekteyim.