

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. İlker DİBİRDİK

**LUTEOLİN'İN MEME KANSERİNDE OLASI
İYİLEŞTİRİCİ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Nihayet KANDEMİR

Referans no: 10026328

EDİRNE – 2015

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. İlker DİBİRDİK

**LUTEOLİN'İN MEME KANSERİNDE OLASI
İYİLEŞTİRİCİ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Nihayet KANDEMİR

Destekleyen Kurum : TÜBAP 2014/27

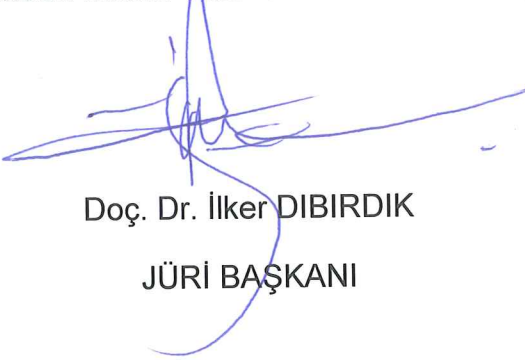
Tez No:

EDİRNE – 2015

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç. Dr. İlker DİBİRDİK danışmanlığında Yüksek lisans öğrencisi Nihayet KANDEMİR tarafından tez başlığı "LUTEOLİN'İN MEME KANSERİNDE OLASI İYİLEŞTİRİCİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 06/11/2015 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "Yüksek lisans Tezi" olarak kabul edilmiştir.


Doç. Dr. İlker DİBİRDİK
JÜRİ BAŞKANI


Prof. Dr. Kadir BATÇIOĞLU

ÜYE


Prof. Dr. Hakan ERBAŞ

ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Tammam SİPAHI

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda gerçekleőtirdiđim yüksek lisans eğitimim süresince bana emek veren ve yönlendiren tez danışman hocam sayın Doç. Dr. İlker DİBİRDİK baőtta olmak üzere benden yardımlarını esirgemeyen, bilimsel katkıları ile bana yol gösteren sayın Prof. Dr. Hakan ERBAŞ'a, Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Erol ÇAKIR'a, sayın Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN'e, sayın Prof. Dr. Sevgi ESKİOCAK'a, sayın Öğr. Gör. Dr. Gülben SAYILAN ÖZGÜN'e, bu çalışmada desteklerini esirgemeyen sayın Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU'ya, çalıőmamızı destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne ve baőtta Biyolog Aycan ÜNAL olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
MEME KANSERİ	3
MEME ANATOMİSİ	5
ARGİNAZ ENZİMİ	11
POLİAMİNLER	16
NİTRİK OKSİT	21
LUTEOLİN	24
GEREÇ VE YÖNTEMLER	28
BULGULAR	46
TARTIŞMA	57
SONUÇLAR	64
ÖZET	66
SUMMARY	68
KAYNAKLAR	70
RESİMLEMELER LİSTESİ	83
ÖZGEÇMİŞ	86
EKLER	87

SİMGE VE KISALTMALAR

A I	: Hepatik arginaz
A II	: Ekstrahepatik arginaz
ADC	: Arginine decarboxylase
APT	: Aminopropyl transferase
CDK	: Cyclin dependent kinase
cGMP	: Cyclic guanosine monophosphate
COX-2	: Cyclooxygenase-2
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DMSO	: Dimetil sülfoksit
eNOS	: Endotelial nitrik oksit sentaz
GTP	: Guanosine triphosphate
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
ISPF	: α -isonitro-sopropiophenone
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
MDA	: Malondialdehit
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NF-κB	: Nükleer faktör kabba B
NNDA	: N-naphthylethylene diamine
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz

ODC	: Ornithine decarboxylase
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reactive oxygen species
SAM	: S-adenozilmetiyonin
SOD	: Süperoksit dismutaz
TCA	: Trichloroacetic acid
TNF-α	: Tümör nekroz faktör α

GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, akciğer kanserinden sonra dünyada görülme sıklığı en yüksek olan kanser türüdür ve gelişmiş ülkelerde her 10 kadından birinin, yaşamının herhangi bir döneminde yakalandığı bir hastalıktır (1).

Meme kanseri, meme ve epitelyum dokusundan kaynaklanan malign bir tümördür (2). Tümörün tedaviye verdiği yanıtın değerlendirilmesi ve metastazların erken dönemde önlenmesi için bazı tümör belirteçleri kullanılır. Kanser türlerinde artan enzim aktivitesi, arginaz enziminin kanserde bir belirteç olarak kullanılma potansiyelini ortaya koymaktadır (3).

Arginaz, L-argininin üre ve L-ornitine hidrolizinden sorumlu bir metalloenzimdir. Arginazın memelilerde arginaz I (hepatik) ve arginaz II (ekstrahepatik) olmak üzere iki izoformu vardır (4). Birinci izoenzim karaciğerde baskın olan sitozolik bir enzimdir ve üre döngüsünden sorumludur. İkinci izoenzim birçok dokunun mitokondrisinde yer alır ve hücredeki arginin/ornitin konsantrasyonunun düzenlenmesinden sorumludur. Bu izoenzim ayrıca hücreye prolin, glutamik asit, poliamin sağlanmasında rol oynamaktadır (5).

Hücre içi poliamin seviyesi belli sınırlar içerisinde tutulmaktadır. Poliamin seviyesindeki azalma hücre büyümesini engellerken, poliaminlerin aşırı artışı da hücreler için toksiktir. Bu yüzden, hücreler hızlı ve hassas bir şekilde poliamin seviyesini düzenleyici mekanizmalara sahiptir (6).

Nitrik Oksit Sentaz (NOS) L-argininin, nitrik oksit (NO) ve L-sitrülline oksidasyonunun katalizinden sorumlu enzimdir (7). NO, normal fizyolojik koşullarda dengenin sürdürülmesinde önemli bir etkidir (8). Nitrik oksitin önemli fonksiyonları arasında, vasküler tonusun sağlanması, trombosit aktivasyonunun önlenmesi ve endotele lökosit adezyonunun sınırlandırılması vardır (9). İndüklenebilir NOS (iNOS) ile üretilen yüksek konsantrasyonlardaki NO ise hasarı artırır. Bundan dolayı NO akut inflamatuvar olaylarda hem koruyucu hem de hasar verici bir molekül olarak etki gösterebilir (8).

Luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone), bitkilerde yaygın olarak bulunan, antioksidan, pro-oksidan, antiinflamatuvar, anti kanserojen, anti anjiyogenez ve anti metastatik aktivitelere sahip bir flavonoidtir (10,11).

Bu çalışmada antikarsinojenik özelliği ortaya konmuş olan luteolinin; meme kanseri üzerine olan etkilerinin araştırılması planlanmıştır. İlk kez bu çalışma ile luteolinin kanser ile ilişkili bulunan arginaz enzim aktivitesi, ornitin, nitrik oksit ve poliamin düzeyleri üzerine olan etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

GENEL BİLGİLER

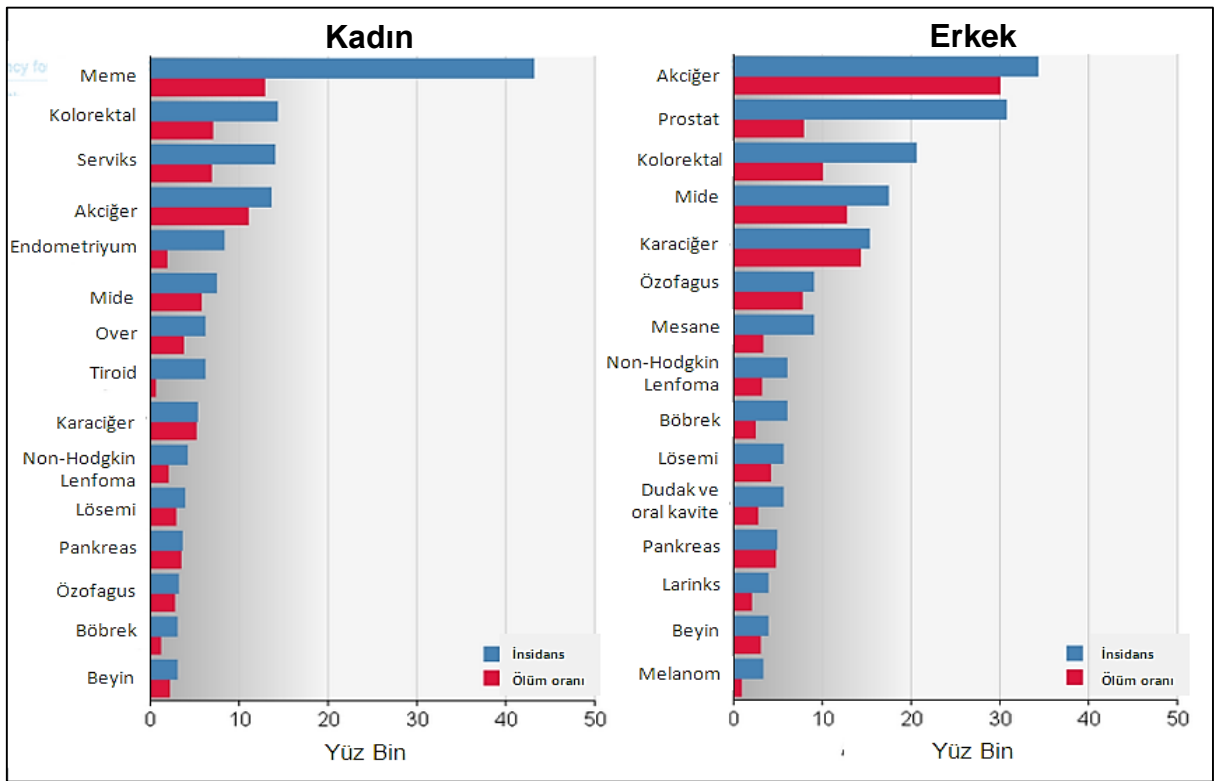
MEME KANSERİ

Meme kanseri kadınlarda kanserin en sık görülen tipidir, özellikle postmenapozal dönemdeki kadınlarda en sık görülen kanserdir ve insidansı giderek artmaktadır (12-14). 2006 yılında Avrupa'da yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre, kadınlarda ortaya çıkan kanserlerin %28.9'u, ve kansere bağlı ölümlerin %17.6'sı meme kanserine bağlıdır (15,16). Ülkemizdeki kadınlarda ise kanser vakalarının %24.5'i ve buna bağlı ölümlerin %5.7'sine meme kanseri neden olmaktadır (17).

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, invazif nitelik kazanması ve metastaz yapması ile kendini gösteren ve halen gelişmiş ülkelerin ölüm istatistiklerinde kalp ve damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alan öldürücü bir hastalıktır (Tablo 1) (18,19). Meme kanseri 30 yaşından önce az görülmeyle birlikte, 30 yaşından sonra görülme hızı artmaktadır. Bir kadının tüm yaşamı boyunca meme kanserine yakalanma ihtimali %10'dur (20). Uluslararası kanser araştırmaları ajansı tarafından 2013'de yapılan çalışmaya bakıldığında, erkeklerde en sık akciğer ve prostat kanseri, kadınlarda ise meme ve kolorektal kanserler başta gelmektedir (Şekil 1,2) (17).

Meme kanserinin mortalitesi, çeşitli nedenlerle, oldukça sabit kalmıştır; mortalite 1971'den beri 50 yaşın altındakilerde %6 artmıştır. Öte yandan, insidansı yılda %1 oranında artış göstermektedir.

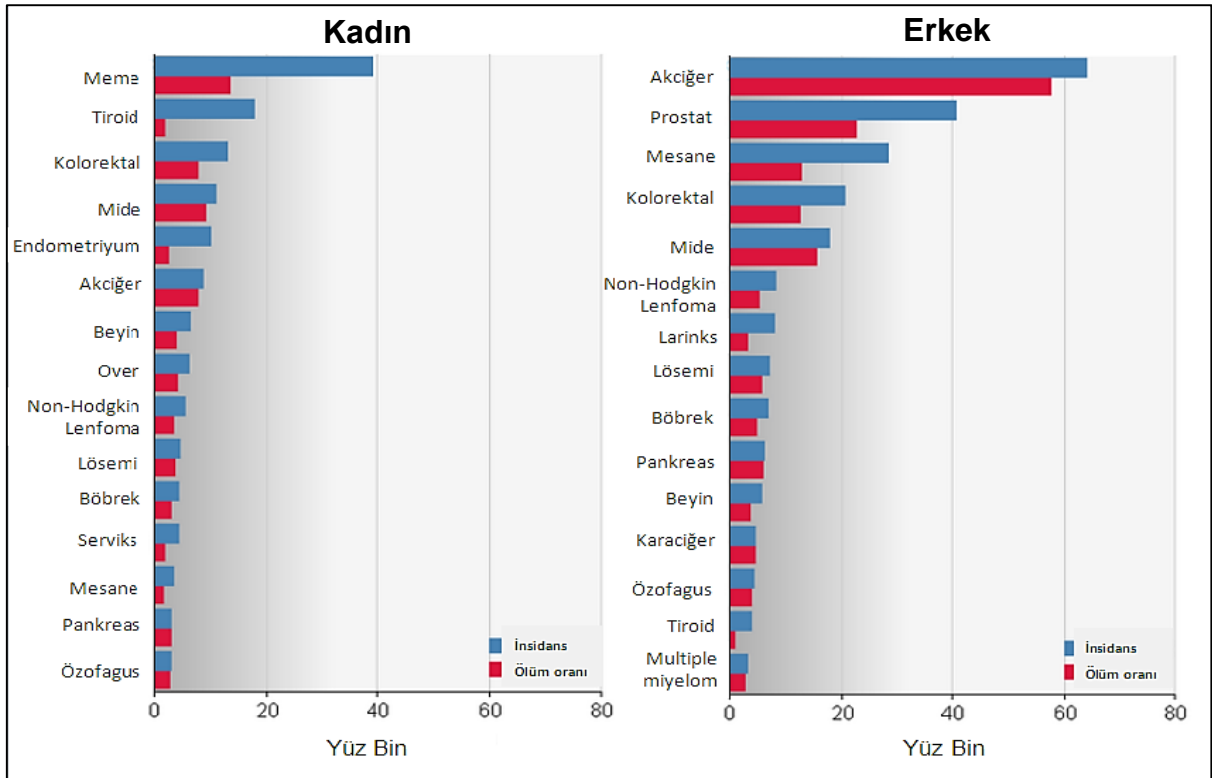
Erkeklerde meme kanseri Batılı ülkelerde tüm meme kanserlerinin %1'ini oluşturur. Hastalığın biyolojisi ve etiyolojisi iyi anlaşılmış olmasa da, Klinefelter sendromu, hiperöstrojenik durumlar, travma ve radyasyon etkisiyle ilişkisi ileri sürülmüştür (21).



Şekil 1. 2012 yılı dünya çapında kanser tiplerinin cinsiyete göre insidans ve ölüm oranları (17).

Tablo 1. 2009 yılında Türkiye’de ölüm nedenlerinin cinsiyete göre dağılımı

	Kadın	Erkek	Toplam
Kalp ve damar hastalıkları	44.4	36.2	39.9
Kanser	16.0	24.4	20.7
Solunum yolu hastalıkları	7.4	10.1	8.9
Metabolik hastalıklar	8.3	4.8	6.4
Zehirlenme ve travma	2.0	4.9	4.0
Diğer	21.0	19.6	20.2



Şekil 2. 2012 yılı Türkiye’de kanser tiplerinin cinsiyete göre insidans ve ölüm oranları (17).

MEME ANATOMİSİ

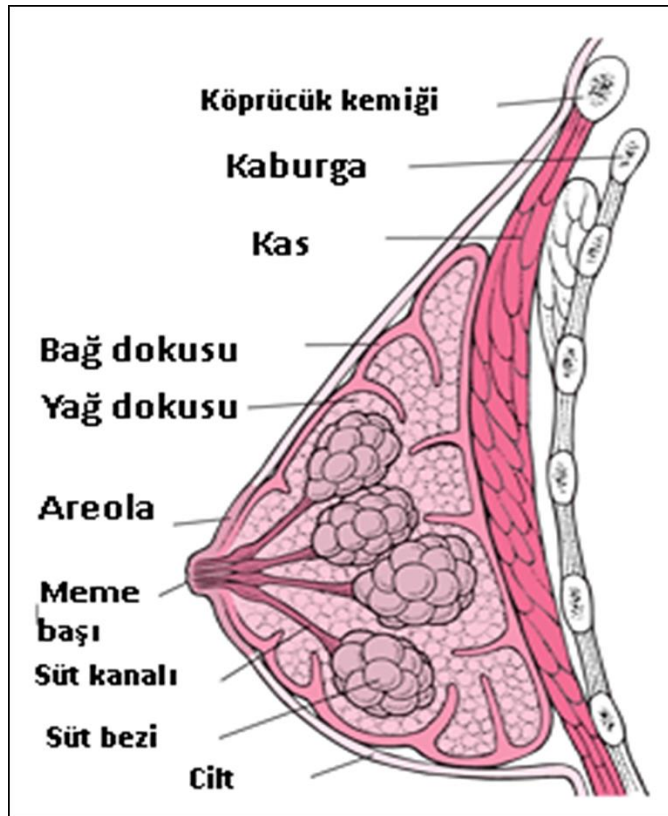
Memeler, klavikula ile altıncı-sekizinci kostalar arasında yer alırlar (22). Mediolateral yerleşimleri de sternum ile orta çizgi arasındadır (23). Toraksın önünde yüzeysel fasyadadırlar ve derinde pektoral kaslardan derin fasya ile ayrılırlar. Meme

derin fasyadan kolayca ayrılabilir. Ancak Cooper ligamanları ile cilde sıkıca bağlanmıştır (24). Derinde memenin büyük kesimi pektoralis major kası üzerindedir. Lateralde serratus anterior kasının, medialde rektus kası kılıfının üst kısmını örter (Şekil 3) (25).

Kan Dolaşımı

Arterler: Beslenmesi internal torasik arterin (internal mamarian arter) perforan dalları, interkostal arterler ve aksiller arterden çıkan çok sayıdaki daldan olur (27).

Venöz drenaj: Drenajın büyük bir kısmı aksiller venedir. Ayrıca internal torasik, lateral torasik ve interkostal venedir (24).



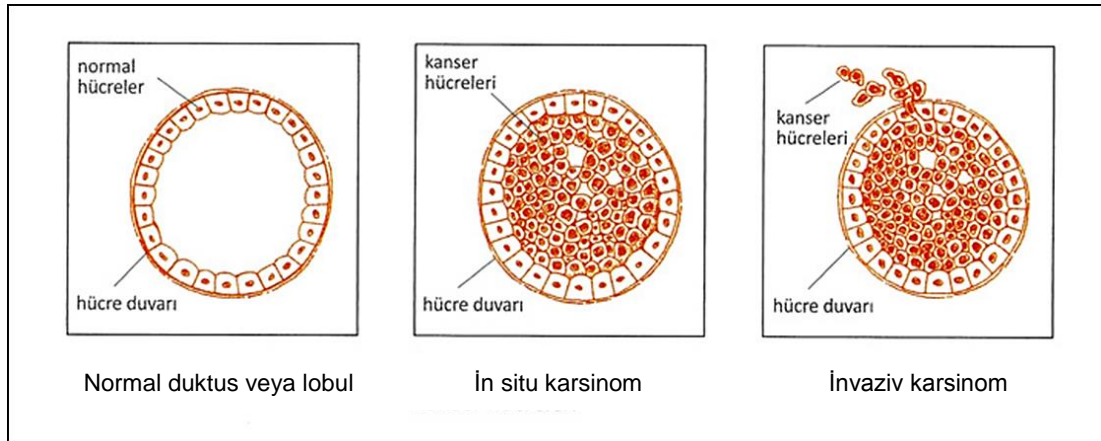
Şekil 3. Meme anatomisi (26).

Lenfatik Drenaj

Lenf damarlarının çoğu venleri aksillaya doğru takip ederler. Drenajın % 75 kadarı aksiller lenf nodlarıdır (24). Dış yarı anterior aksiller veya pektoral nodlara drene olur. Medial yarı interkostal boşlukları geçer ve toraksta yer alan internal torasik arter boyunca uzanan nodlara drene olur. Bazıları posterior interkostal nodlara, diğer memenin lenf damarlarına ve anterior abdominal duvar lenf damarlarına açılırlar (27).

Meme Kanserinin Histopatolojisi

Memeyi oluşturan süt bezleri ve üretilen sütü taşıyan kanalları döşeyen hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmaları sonucunda meme kanseri gelişir (28). Histolojik olarak meme karsinomları insitu ve invaziv karsinomlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Kanser hücreleri, çevresindeki bazal hücreleri aştığında invaziv, aşmadığında in situ olarak isimlendirilir (Şekil 4) (29).



Şekil 4. Meme kanseri tipleri (30).

Memenin patolojik olarak sınıflaması (WHO sınıflaması) :

1. İn situ karsinom
 - İn situ duktal karsinom
 - İn situ lobuler karsinom

2. İnvaziv karsinom

- İnvaziv duktal karsinom
- İnvaziv lobuler karsinom
- Tubuler karsinom
- İnvaziv kribriform karsinom
- Medüller karsinom
- Müsinöz karsinom
- İnvaziv papiller karsinom
- İnvaziv mikropapiller karsinom
- Apokrin karsinom
- Sekretuar (juvenil) karsinom
- Adenoid kistik karsinom
- Metaplastik karsinom
- Nöroendokrin karsinom
- Mikst tip karsinom
- Skuamoz tip karsinom
- İnflamatuar karsinom olarak sınıflandırılmıştır (31).

Risk Faktörleri

Yaş: Meme kanseri 20-30 yaşları arasında çok seyrek görülür. Bir kadının meme kanserine yakalanma olasılığı yaşa bağlı olarak giderek artar. Genellikle meme kanseri postmenapozal dönemde görülür (32).

Ailede meme kanseri öyküsü: Bir kadının ailesinde meme kanseri öyküsü bulunması, kendisinde de meme kanseri gelişmesi olasılığını artırır. Bu olasılık aile bireyleri arasında genetik ve çevresel faktörlerin ortak oluşuna bağlıdır. Birincisi

spesifik bir genetik defektin doğrudan doğruya kalıtımla geçmesi, ikincisi ise çevresel faktörlere dayalı bir eğilim olabilir. Kalıtımla geçen hastalıkların birçoğu gibi meme kanserinin genetik tipleri de hastalığın daha erken yaşta ortaya çıkması, bilateral oluşu ve yüksek bir penetrans ile karakterizedir (21).

Genetik faktörler: Dominant olarak kalıtımla geçen meme kanserinin, ailesel meme kanserinin küçük bir dalı olduğu vurgulanmalıdır. Bu genetik tip, meme kanserlerinin sadece %7-8'iyle ilgilidir.

BRCA1, meme ve over kanserlerine eğilimi çok artıran spesifik bir gen dir. Kalıtımla geçen meme kanserlerinin önemli bir kısmından sorumlu bu gen 17'nci kromozomda lokalizedir. Mutasyona uğrayan bu gen otozomal dominant geçer. 300 kadından biri bu geni taşır. Tüm yaş gruplarındaki meme kanserlerinin %4'ünde, 40 yaşın altında ortaya çıkan meme kanserlerinin %25'inde bu gen bulunmaktadır (21).

Çevresel faktörler: Dünyanın çeşitli bölgelerinde meme kanser insidansları farklılık gösterir. Bu farkların sadece genetik olmadığı, göçmenlerde meme kanseri insidansının da değişmesinden anlaşılabilir. Örneğin, ABD'ye göç eden Japon kadınlarında meme kanseri insidansı kendi yaşamları süresince pek değişmez; ama kendilerinden sonraki jenerasyonlarda insidans giderek artar ve beyaz Amerikan kadınlarındaki insidansa ulaşır.

Gelişmiş ülkelerde meme kanserinin insidansı, gelişmekte olan ülkelerdekinden önemli derecede yüksektir. Bu ülkeler arasında Japonya farklılık gösterir. Japonya' da meme kanseri insidansı, Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa'dakinin yarısı kadardır; fakat son yıllarda Japonya' da da artış gözlenmektedir (21).

Diyet: Çevresel faktörler incelendiğinde en çok ele alınan diyetle ilgili faktörlerdir. Yağdan zengin diyetle beslenen kadınlarda yapılan çalışmaların bazıları meme kanseri insidansının arttığı, bazıları da değişmediği sonucunu vermiştir. Fazla miktarda yağ/kalori ile beslenmenin deney hayvanlarında meme tümörü gelişmesini stimüle ettiği kanıtlanmıştır.

İnsanlar diyetlerinde kompleks bir karsinojenik ve antikarsinojenik karışım almaktadırlar. Örneğin ızgara ya da kızartma et ve kızartma balığının çeşitli mutajenik

heterosiklik aminler içerdığı bilinmektedir. Bu maddenin laboratuvar hayvanlarında meme kanserine neden olduğu kanıtlanmıştır ve insan karsinogenezinde de önemli olduğu düşünülmektedir. Diğer yandan antioksidan vitaminlerden C, E ve A'nın meme kanseri riskini azalttığı ileri sürülsede, prospektif çalışmalarda bu vitaminlerin meme kanseri insidansı üzerinde etkisi görülmemiştir (21).

Alkol: Meme kanseri riski ile en güçlü bağlantı alkol alınmasıdır. Çeşitli çalışmaların sonuçlarına topluca baktığımızda günlük alınan alkol miktarının artışıyla rölatif riskin de arttığı gözlemlenmiştir (21).

Sigara: Sigara ile meme kanseri arasında net bir ilişki saptanmamasına karşın pasif sigara dumanına maruz kalmanın bazı çalışmalarda meme kanseri riskini arttırdığı saptanmıştır (32).

Radyasyon: Kadın memesinin iyonizan radyasyon etkisine kanser oluşumu bakımından duyarlılığı, atom bombasından sonra sağ kalan Japonların ve tüberküloz, skolyoz tedavisi için ya da selim hastalıklar için radyoterapi uygulanan kadınların incelenmesiyle gösterilmiştir. Toraks duvarına yüksek dozda iyonizan radyasyon meme kanseri riskini artırır (21).

İmmünosüpresyon: İmmünosüpresyon yapılan hastalarda (örneğin, organ transplantı alıcılarında) genellikle kanser insidansı yüksektir.

Daha önce meme kanseri geçirmiş olmak: İnvaziv kanser nedeniyle mastektomi yapıldıktan sonra öteki meme izlenirken, bu memede de bir kanser ortaya çıkma riski her yıl için %0.5-1'dir. Bir meme kanseri geçiren kadın, olası bir ikinci meme kanserinin erken tanısı amacıyla dikkatle izlenmelidir (21).

Endojen endokrin faktörler: Hormonlar meme kanseri riskini ve prognozunu etkiler, erkeklerin meme kanserine yakalanma riskinin düşük oluşu da farklı hormonal ortamı akla getirir. Bir kadının regl olmaya başladığı yaş (menarş), menopoza girdiği yaş, doğum yapmış olması ve ilk doğum yaptığı yaş, meme kanserinin belirlenmesinde önemli faktörlerdir. Menarş ile ilk gebelik arasında geçen zamanın ileride meme kanseri riski bakımından önemli olayların cereyan ettiği bir dönem olduğu belirtilmiştir. Bu konuda "estrogen window" hipotezi vardır: İlk gebelikten

önceki ovulatuvar siklüslerin sayısı bir kadının yaşamı boyunca meme kanseri riskini belirler (21).

Benign meme hastalığı: Benign meme hastalığı ile meme kanseri riski arasındaki ilişki proliferasyonun olup olmamasına bağlı değişebilir. Atipik hiperplazi olan kadınlarda 4-5 kat, atipik hiperplazi yanında birinci derece yakınında meme kanseri öyküsü olanlarda 9 kez risk artışı bulunmuştur (32).

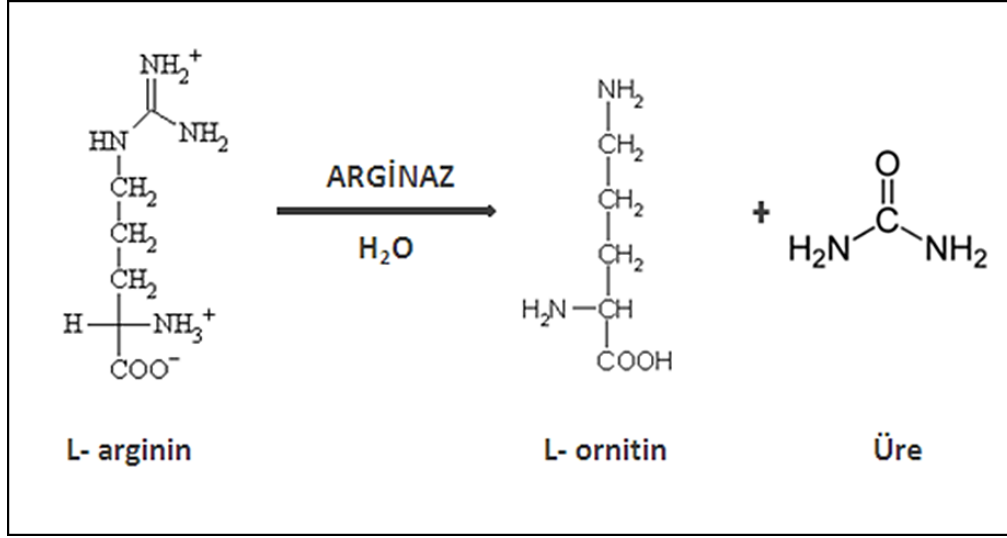
Hormon replasman tedavisi: Hormon replasman tedavisinin meme kanseri riski üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmemiştir (21).

Herediter sendromlar: Meme kanseri riski bazı sendromlarda artar. Bunlar; Lynch Tip II, Li-Fraumeni Sendromu, Cowden Hastalığı ve Ataksi Telenjektazidir (32).

ARGİNAZ ENZİMİ

Üre döngüsünde L-argininin, üre ve L-ornitine metabolize edilmesini sağlayan enzim olan Arginaz, aynı zamanda hücre çoğalması için gerekli olan biyokimyasal yollarda da bulunur (Şekil 5) (33,34). Arginaz enziminin A I (hepatik arginaz) ve A II (ekstrahepatik arginaz) olmak üzere iki izoformu vardır. A I sitozolik bir enzimdir ve karaciğerde yer alır, A II ise mitokondriyal matrikste lokalize olmuştur (35). A I'in primer görevi üre sentezi ve amonyağın detoksifikasyonu iken, A II ornitin, prolin ve glutamatin sentezi gibi biyosentetik fonksiyonlarda görev alır (33).

Arginaz bakımından en zengin organ üre döngüsünün bulunduğu karaciğerdir (36,37). Ancak, böbrek, beyin, tiroid bezi, tükrük bezi, eritrosit, trombosit, rumen, meme dokusu, iskelet kası, fibroblast, makrofaj, bağırsak, dalak, uterus, testis, bronş lavaj sıvısı gibi ekstrahepatik dokularda da arginaz enziminin olduğu belirtilmiştir (38). Arginin, metabolik olarak çok yönlü aminoasitlerin en önemlilerinden biridir. Üre sentezindeki görevi dışında örneğin; nitrik oksit sentaz (NOS) ile nitrik oksit (NO) ve L-sitrulin, arginin dekarboksilaz (ADC) ile agmatin ve karbondioksit (CO₂) oluşturur (39-41).



Şekil 5. L-argininden L- ornitin ve üre oluşumu.

Üre, protein metabolizmasındaki son üründür, karaciğerde sentezlenir, kana bırakılır ve böbrekler tarafından temizlenir; bu da, atılan azotun %80-90'ını oluşturur (42). Artan amonyak miktarı santral sinir sistemi üzerinde toksik etki oluşturduğundan, karaciğer tarafından hızlıca üreye dönüştürülür. Bu dönüşüm üre döngüsü ile meydana gelir. Bu döngü Krebs ve Henseleit tarafından bulunduğu için aynı zamanda Krebs ve Henseleit döngüsü olarak da isimlendirilir (Şekil 6) (43). Arginazın katalizlediği basamağın diğer ürünü olan ornitin, bir sonraki üre döngüsü çevrimi için tekrar karaciğer mitokondrilerine girer. Bu görevine ek olarak özgün memeli ve bakteriyel poliaminler olan spermidin ve sperminin öncülleri olarak hizmet görür (Şekil 7) (42).

Arginaz Enziminin Kinetik Özellikleri

Ökaryotik ve prokaryotik orjinli tüm arginazların özellikleri aynıdır. Fizyolojik aktivatörü Mn^{+2} olan arginazın Ni^{+2} , Co^{+2} , V^{+2} , Cd^{+2} ve Fe^{+2} gibi metal iyonlarında kofaktör olarak kullanılmaktadır. Maksimum aktivite gösterebilmek için metal iyonlarına ihtiyaç duyan arginaz, en yüksek aktiviteyi Mn^{+2} varlığında gösterir. Hg^{+2} ve Ag^{+2} gibi ağır metal iyonları enzimin aktivitesini azaltmaktadır (44). Arginaz enzimi, maksimum aktivitesini gösterebilmesi için Mn^{+2} iyonları yanında 55°C 'de preinkübasyon

gerektirmektedir. 55°C'de yapılan preinkübasyon, enzim aktivitesini Mn^{+2} varlığında %110 artırır (46). Arginazın arginini hidroliz edebilmesi için gerekli optimum pH, 9.4 ile 9.8 arasındadır (38).

Metal iyonları varlığında aktiflenen arginaz enziminin ornitin ve lizin kompetitif inhibitör iken, valin, lösin, izolösin gibi dallı amino asitler unkompetitif inhibitörleridir. Arginaz enzimi katalizörlüğünde oluşan ürenin, ornitin gibi inhibitör etkisi yoktur. Karaciğerde yüksek miktarlarda bulunan arginaz I'in hem anyonik hem de katyonik formları tanımlanırken, böbrekte de arginaz II'nin katyonik ve anyonik formları belirlenmiştir (47).

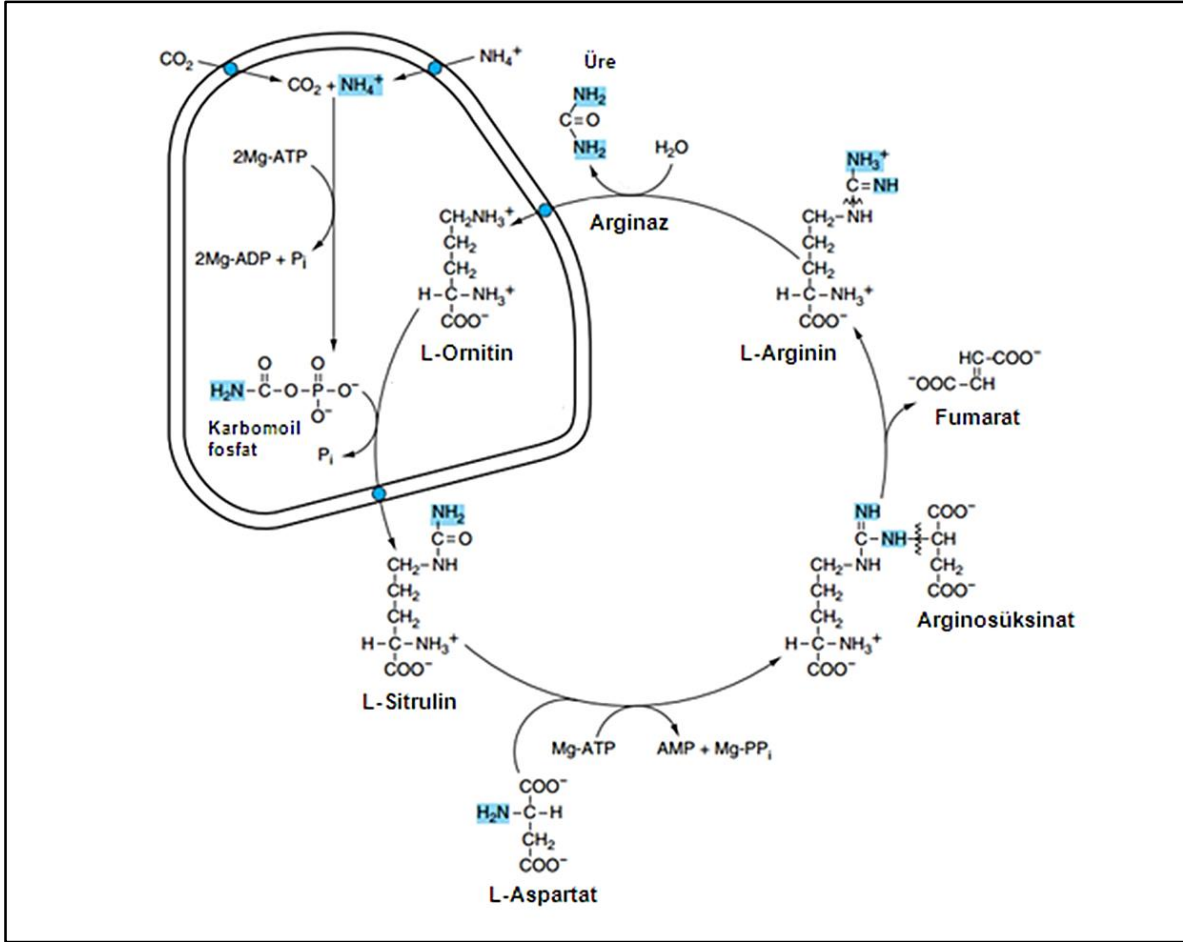
Arginaz enzim mekanizmasında anahtar rol oynayan özellik, substrat özgüllüğüdür. Arginaz enzimi yan zincirinde bulunan aminoasit substrat özgüllüğünde rol oynar. Arginaz enziminin yan zincirinde bulunan aminoasitin guanidium grubunun olması, yan zincirin uygun uzunlukta olması ve hidrofobikliği substrat özgüllüğünde önemli rol oynar. Arginaz enzim aktivitesi için gerekli olan metal iyonları bu aktiviteyi hidroksil grubuna bağlanarak sağlar. Arginaz enziminin substratı olan guanidium, yapısında hidroksil iyonu içerir. Mn^{+2} guanidium üzerindeki hidroksil iyonunu aktive ederek arginaz enzim aktivasyonu sağlar. Arginaz enziminin aktif bölgesinde bulunan aminoasit kalıntıları ya direkt olarak ya da Mn^{+2} üzerinde fonksiyon görerek kataliz için kritik rol oynamaktadır (47,48).

Arginaz Enziminin Klinik Önemi ve Kansere Olan İlişkisi

Azot detoksifikasyonunda önemli olması, NOS aktivitesini indüklemesi, poliaminler, agmatin, prolin ve glutamat sentezi için argininin kullanılabilirliğini düzenleme potansiyelinden dolayı düzenleyici enzim olarak arginaza olan ilgi artmaktadır.

Arginaz enzimi ve NOS yara iyileşmesi, inflamatuvar süreç, hücrelerde immün cevap regülasyonu, diyabet ve tümör biyolojisinde önemli rol oynamaktadır (50,51). Arginaz, hücrelerin büyümesi ve gelişmesi için önemli moleküller olan prolin ve poliaminlerin sentezi için ornitin sağlarlar (52). Bağışıklık sisteminde Arginaz I ve II'nin artışı, immünsitokin cevabına yol açar. Arginaz I ve II'nin artışı, bağışıklığın

yetersizliği ile ilgili hastalıkların patofizyolojisinin anlaşılmasında önemli rol oynayabilir (50).

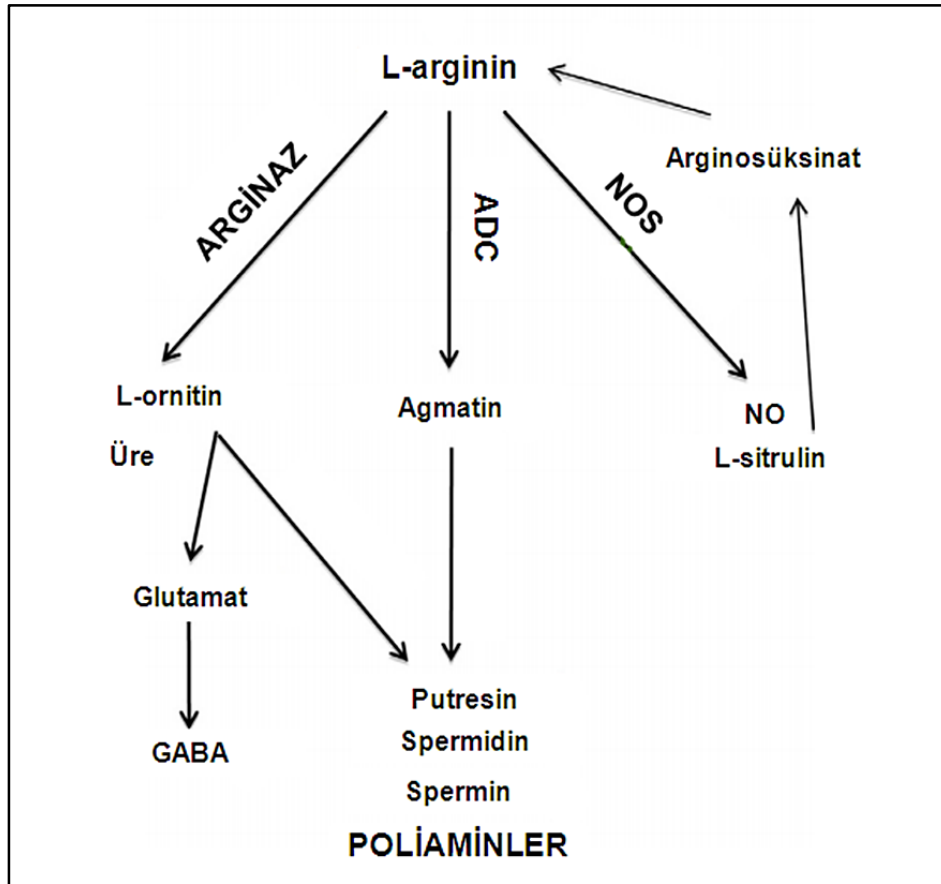


Şekil 6. Üre döngüsü (45).

Sağlıklı kişilerde serum arginaz aktivitesi düşüktür (53). Arginaz aktivitesinin psöriasis hastalığı gibi bazı cilt hastalıklarında ve hiperkeratinizasyonda arttığı belirtilmiştir (54). Serum arginaz aktivitesinin akut hepatitis, safra kanallarının malign tümörü, karaciğer metastazları, siroz gibi hücre harabiyetine neden olan malign ve benign karaciğer hastalıklarında arttığı görülmüştür. Bazı kanser vakalarında da, serum ve doku arginaz düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (55,56).

Arginazın olası kanser durumları için belirleyici enzim olabileceği düşünülmektedir. Birçok araştırmacı tarafından arginazın kanserle olan yakın ilişkisi, çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (55-57). Akciğer kanserli hastalarda doku

arginaz düzeyleri araştırılmış ve tümör dokularındaki enzim düzeylerinin sağlıklı dokulara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu artış, poliamin biyosentezinin hızlandırılması nedeniyle kanser gelişiminde önemli rol oynayabileceği şeklinde açıklanmıştır (58). Kolorektal kanserli hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada, doku arginaz aktivitesi normal dokudan daha yüksek bulunmuştur (59). Kalın bağırsaktaki kanserli dokularda da arginaz aktivitesinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir (60).



Şekil 7. L-argininden poliamin, GABA ve NO sentezi (49).

Arginaz enzimi, karaciğerde yüksek konsantrasyonlarda bulunan, karaciğere özgü bir enzimdir. Ashamiss ve arkadaşlarının karaciğer nakli olan hastalar üzerinde yaptıkları bir çalışmada nakilden sonra serum arginaz enzim aktivitesinin karaciğer fonksiyonlarını belirlemede kesin ve önemli bir parametre olduğu belirtilmiştir (61). Hormonlar ve arginaz enzim aktiviteleri üzerinde yapılan çalışmalarda, kortikosteroidler, glukagon ve östrojen hormonlarının arginaz aktivitelerini indüklediği

ve bu hormon seviyelerindeki değişimlerin enzim aktivitelerinde de değişim meydana getirdiğini belirtmektedir. Yine yapılan çalışmalarda kortikosteroidlerin karaciğer arginazını aktive ettiği, ancak hormonların böbrek arginazı üzerine bir etkisi olmadığı saptanmıştır (51,62).

Diyabet ve diyabetik retinopati üzerinde yapılan çalışmalarda arginaz II enzim aktivitesinin bu hastalıkların gelişiminde önemli rolünün olduğunu ve arginaz II enzim aktivitesinin inhibisyonunun terapötik amaçlı kullanılabileceği belirtilmiştir (63). Arginaz enzim aktivasyonunun NO sinyalizasyonu, kollajen sentezi, poliamin bağımlı vasküler düz kas proliferasyonunu kapsayan mekanizmalarla yaşa bağlı vasküler ve kardiyovasküler hastalıklarda önemli fonksiyonlara sahiptir (64,65). Orak hücre hastalığına bağlı olarak eritrosit arginazında artış olduğu ve bu artışın heterozigot grubun homozigot gruba göre daha az aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (66). Depresyon geçiren hastalarda antidepresan ilaç tedavisi öncesi ve sonrasındaki arginaz aktivitelerine bakılmış ve meydana gelen arginaz aktivite artışı, arginaz ve nitrik oksit arasındaki ilişkiden kaynaklanacağı sonucuna varılmıştır (67).

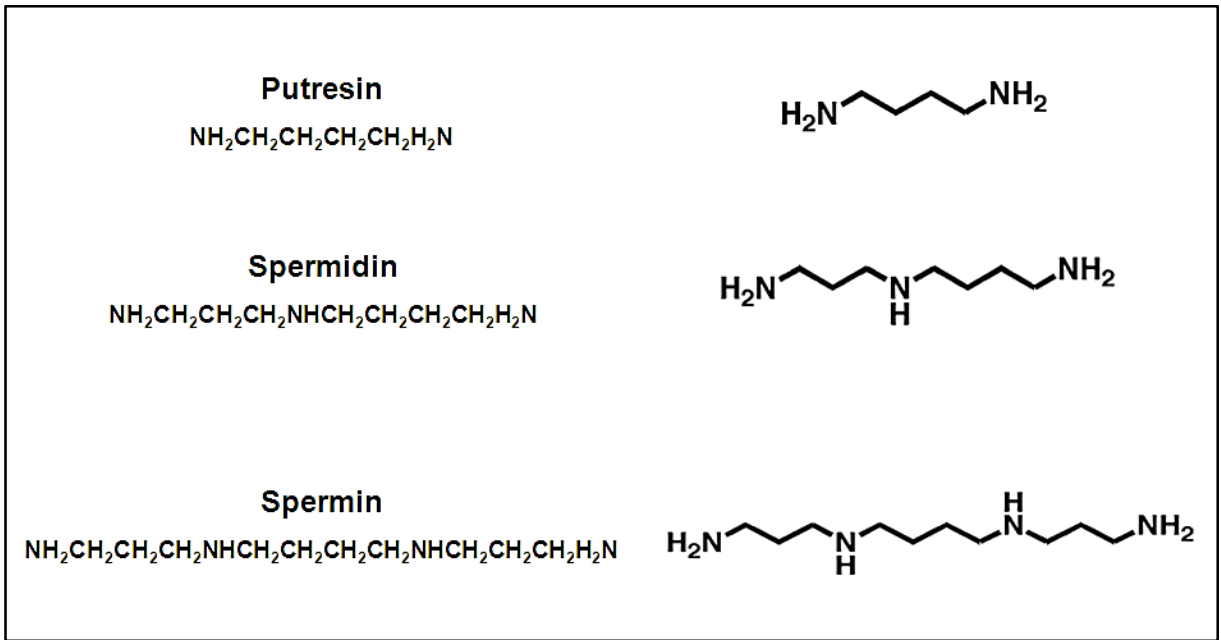
İnsanda arginazı şifreleyen iki farklı yapısal gen lokusunun olduğu bilinmektedir (68,69). Birinci lokus, eritrosit ve karaciğerdeki enzim aktivitesinin %90'ından; böbrek, mide, bağırsak ve beyindeki aktivitenin ise yaklaşık %50'sinden sorumludur. İkinci lokus ise karaciğer ve eritrositlerdeki aktivitenin %5'inden sorumlu iken böbrek, mide, bağırsak ve beyindeki aktivitenin ise %50'sinden sorumludur (68).

POLİAMİNLER

Memeli hücrelerinin tümünde poliaminler bulunur. Bunlar putresin (diamin), spermidin (triamin) ve spermin (tetraamin)'dir (şekil 8) (70). Ornitinden ornitin dekarboksilaz (ODC) enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonla putresin, spermin ve spermidin gibi poliaminler sentezlenir (şekil 9). İlk reaksiyon ODC aracılığıyla bir molekül CO₂ çıkması ile putresin oluşur. Putresin; spermidin sentaz ile spermidine, spermidin de spermin sentaz tarafından spermine dönüştürölür ki bu esnada her iki reaksiyonda da dekarboksillenmiş S-adenozilmetiyonin, metiltiyoadenozine çevrilir (45). Fizyolojik pH'da poliaminlerin proton grupları protonlanmaktadır. Yapısal olarak

bakıldığında poliaminler pozitif yükleri alifatik karbon zinciri boyunca dağılan moleküllerdir (73).

Poliaminler, tüm hücrelerde büyüme, gelişme ve farklılaşma için anahtar rol oynar (74). Prokaryotlar putresin ve spermidine sahip iken, ökaryotlar bu poliaminlere ek olarak spermine de sahiptirler. Arkeobakter, algler ve bazı yüksek bitkiler bu üç poliaminin homolog analoglarını içerirler. Poliaminlerin "vazgeçilmez ubik" olarak

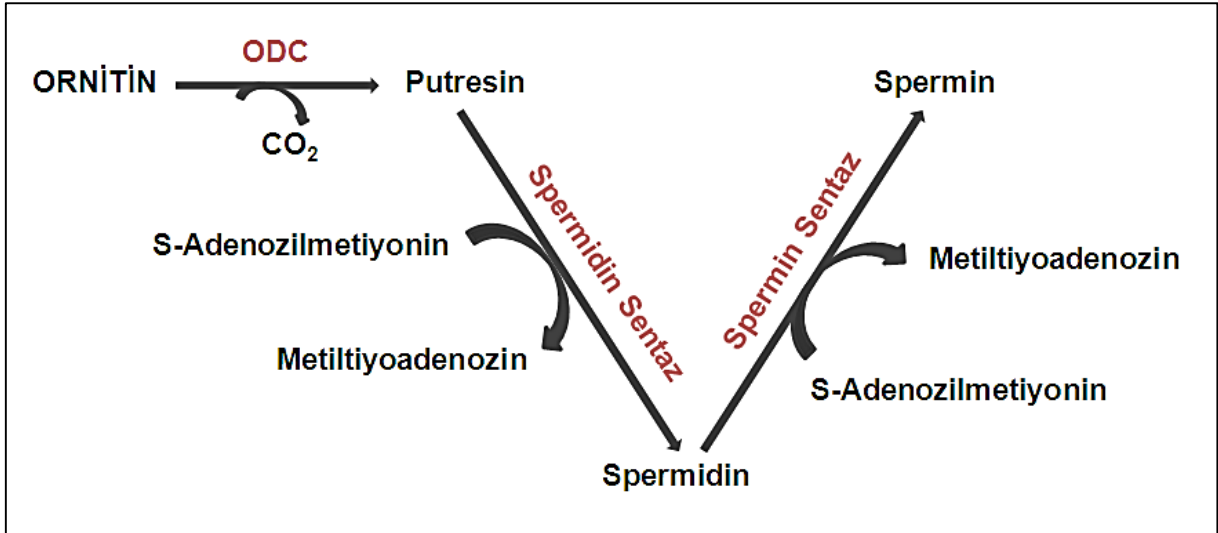


Şekil 8. Poliaminlerin kimyasal yapıları (71,72).

adlandırılmalarının nedeni, onların bütün hücrelerde bulunmalarının yanı sıra, evrimin hem ilk evrelerinde hem de evrim boyunca varlıklarını sürdürmelerinden kaynaklanmaktadır. Poliaminlerin inaktive edilmesi, proliferasyonu önlediği gibi, büyüme hızını da yavaşlatır, hatta durmasına yol açar. Proliferasyonun durması ise bir süre sonra o canlı hücre ya da organizmanın ölümü ile sonlanacaktır.

Poliaminler (rutin olarak) ihtiyaca yönelik sentezlenirler. Hücresel konsantrasyonları çok hassas olarak düzenlenir (73). Poliamin seviyesindeki azalma hücre büyümesini engellerken, poliaminlerin aşırı artışı da hücreler için toksiktir. Bu yüzden, hücreler hızlı ve hassas bir şekilde poliamin seviyesini düzenleyici

mekanizmalara sahiptir. Hücreler ihtiyaçlarına göre yeni poliaminler sentezleyebilirler veya her bir poliamini birbirine dönüştürebilirler (6). Hızlı çoğalan hücrelerde büyüme faktörleri veya hormonlar ile meydana gelen uyarılma, hücre içi poliamin seviyesinin yükselmesine sebep olur (75).



Şekil 9. Ornitinden poliaminlerin sentezi.

Poliaminlerin fonksiyonlarının çoğu DNA, RNA protein ve membranın negatif yüklü molekülleri ile kurulan bağlantılar ile gerçekleşir (74). Çeşitli kanser türleri üzerinde yapılan çalışmalarda hücre içi poliamin sentezinin arttığı belirtilmiştir. Hücre büyümesi için gerekli olan putresin, spermidin ve spermin, transkripsiyon, translasyon ve protein sentezinin başlamasında fonksiyon gören alifatik poliaminlerdir (51,76,77).

Poliamin Metabolizması

Poliamin biyosentezi iki yolla gerçekleşir. Birinci yolda arginin üre kaybederek önce ornitin, daha sonra ODC ile CO₂ kaybederek putresini oluşturur. İkinci yolda ise arginin, arginin dekarboksilaz tarafından dekarboksile edilerek önce agmatin ve bundan da üre çıkışıyla putresin meydana getirilir. Spermidin ve spermin ise ya putresinden ya da bazik bir amino asit olan metiyonin üzerinden sentezlenmektedir.

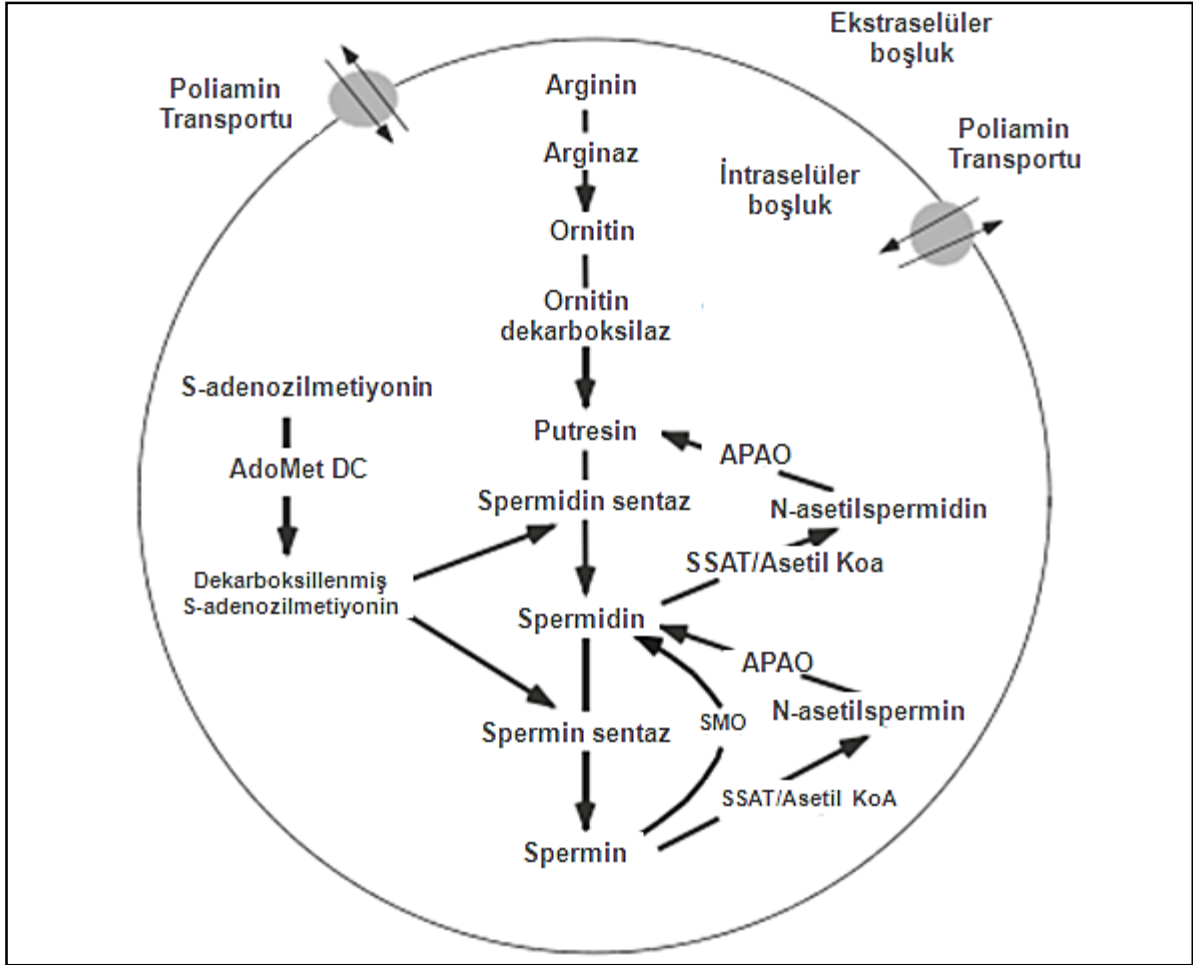
Metiyoninden önce S-adenozilmetiyonin (SAM) sentezlenir, sonra bundan SAM dekarboksilaz enziminin katalizörlüğünde dekarboksile olmuş SAM meydana gelir ve bundan da aminopropil transferaz (APT) enzimi yardımıyla spermidin ve spermin sentezi gerçekleştirilir (Şekil 10) (78). İlk reaksiyonu katalizleyen ODC enzimi; arginaz enzim aktivitesinin yükselmesi ile doğru orantılı olarak aktive olmaktadır (42,79,80). Çeşitli biyokimyasal çalışmalarda, her biri kalıntı subünitten oluşmuş, iki aktif alan içeren homodimer yapısında olduğu gösterilmiştir (81). SAM dekarboksilaz, poliamin biyosentezindeki ikinci hız kısıtlayıcı enzimdir (82). S-adenozilmetiyoninin dekarboksilasyonu bu bileşiği poliamin sentezine sokar ve bir metil vericisi olarak görev alır. Bu yüzden, spermidin ve spermin biyosentezi için gerekli bir enzimdir (83). Her iki enzim de poliamin biyosentezi ve degradasyonunun hız sınırlayıcı enzimleridir (84).

Poliaminlerin Klinik Önemi ve Kansere Olan İlişkisi

Poliaminler hücrelerin büyümesi ve gelişmesi için önemli biyomoleküllerdir, hızlı büyüyen hücre ve dokularda yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar (86,87). Büyüme ile ilişkili genler, örneğin; c-fos ve c-myc protoonkogenleri hücresel çoğalma sürecinde aktive edilirler. Mitojenik uyarıyı takiben poliamin sentezinde eş zamanlı bir artış ve c-fos protoonkogeninin transkripsiyonu gözlenmiştir. Benzer olarak kötü huylu dönüşüm poliamin sentezinde bir artışa neden olmaktadır. Poliaminlerin c-myc ve c-fos transkripsiyonunu artırdığı gösterilmiştir (88). Poliaminler bu yüzden büyüme süreci için gerekli maddeler olup aynı zamanda karsinogenezle de ilişkilidir (89). 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 (90).

Poliaminlerin hücre içinde anabolik etkileri ve çoğalması için gerekli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle otonom hücre çoğalması olan neoplastik hastalıklarda, gerek kanserli dokularda gerekse vücut sıvılarında poliaminlerin yüksek olması beklenir. 1800'lerde, lösemili hastaların dalağının spermin yönünden zengin olduğu,

bundan 100 yıl sonra lösemiden ölmüş bir hastanın kemik iliği ve karaciğerinde poliamin düzeylerinin yüksek olduğu bildirilmiştir. 1971 yılında Russel ve arkadaşları, kanserli hastaların idrarında poliaminlerin artışı saptadıktan sonra çalışmalar, kanserli hastaların diğer vücut sıvılarına ve kanserli dokularına yönlendirildi (91).



Şekil 10. Poliamin biyosentezi ve metabolizması: AdoMet DC: S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz, APAO: N-asetilpoliamin oksidaz, SMO: Spermin oksidaz, SSAT: N-asetiltrasnferaz (92).

Indamar ve arkadaşları, erken dönem meme kanserinde, serum putresini %59, spermidini %39 ve spermini %94 oranında yüksek bulmuşlardır (93). Löser ve arkadaşları, pankreas kanseri olan hastaların idrarında putresini %93.4 ve spermidini %81.5 oranında yükseldiğini bulmuşlardır. Aynı çalışmada idrardaki putresin

konsantrasyonu ile tümör boyutları arasında önemli bir ilişki saptanmıştır (94). Yine Löser ve arkadaşları kolon kanserli hastaların serum, idrar ve kolon mukozalarında, poliamin seviyelerini hem kolon kanserli hastalarda, hem de malign olmayan gastrointestinal hastalıklarda yüksek bulmuşlardır (95).

Horn ve arkadaşları, meme, prostat, jinekolojik kökenli ve orjini bilinmeyen metastatik kanserli hastalardan alınan örnekleri incelemişler ve poliamin seviyelerini anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır (96). Kubota ve Umeki, üriner poliamin düzeylerinin malignitelere tanı ve tedaviyi takip açısından iyi bir marker olduğunu çalışmalarında göstermişlerdir (97,98). Sonuç olarak poliaminlerin hücre kinetiği hızlı olan tümörlerde, vücut sıvılarında ve kanserli dokularda belirgin derecede arttığı; bunun tanı açısından özellikle de tedavi sonucunun ve nükslerin değerlendirmesinde iyi bir marker olduğu ve klinikte kullanılması gerektiği düşüncesi yaygınlaşmıştır (85).

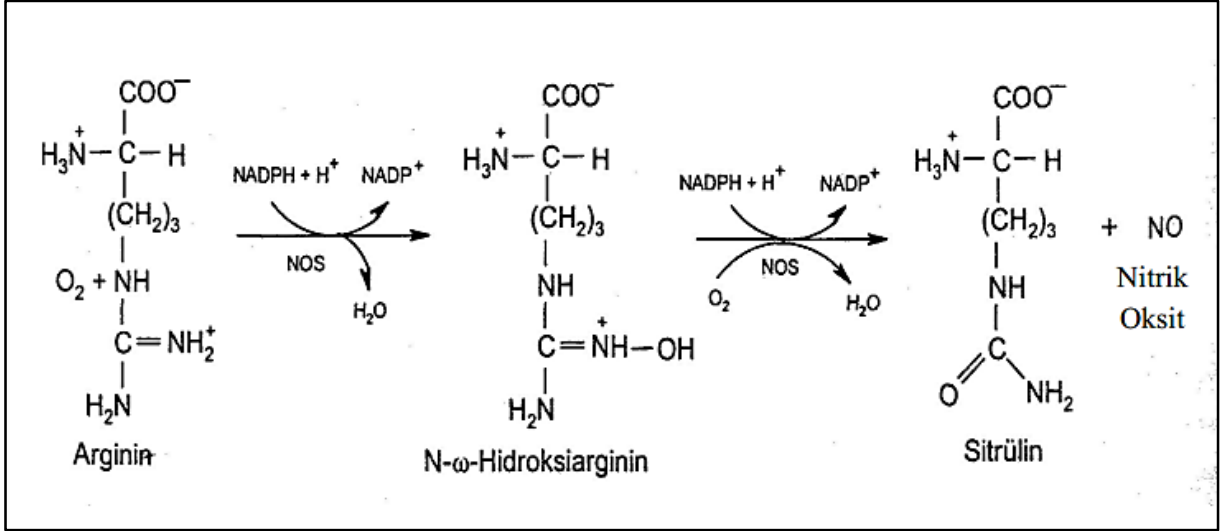
NİTRİK OKSİT

Nitrik oksit (NO), biyolojik membranlardan kolayca difüze olabilen hem otokrin hem de parakrin özellikte benzersiz bir moleküldür. NO, L-arginin'in 2 guanido nitrojeninin birinden, nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi aracılığı ile L-sitrulin oluşumu esnasında sentezlenir. Bu reaksiyonlarda NADPH kofaktör olarak rol oynar (Şekil 11) (99).

NO üç farklı NOS enzimi kullanılarak üretilir. Nöronlarda baskın olarak bulunan NOS-1 veya nNOS, sinapslar arasında retrograd haberleşmeyi sağlar. İndüklenebilen bir form olan iNOS veya NOS-2 ise bağışıklık hücrelerinde ve diğer birçok dokuda bulunur. Hücresel bağışıklık yanıtında görev alır (101). Endotelial dokuda baskın olarak bulunan ise NOS-3 veya eNOS formudur ve birinci fonksiyonu vasküler tonusu ayarlamaktadır.

Nitrik oksit sentaz enziminin aktivasyonunda, asetil kolin gibi bir haberci endotel hücreleri üzerindeki reseptörüne bağlandıktan sonra, Ca^{+2} iyon kanalları açılarak, hücre içi Ca^{+2} düzeyi yükselir. Kalsiyumun kalmoduline bağlanmasıyla oluşan kompleks tarafından, yapısal bir enzim olan eNOS uyarılır ve L-argininden NO ve sitrüllin oluşur. Oluşan NO, endotelden çıkarak komşu düz kas hücrelerine girer.

Düz kas hücrelerinin sitozolündeki guanilat siklazın hem grubundaki demire bağlanır, onu aktive eder ve GTP'den cGMP oluşumunun artmasına neden olur. Artan cGMP damarlarda vazodilatasyona neden olur. Diğer bir yapısal enzim olan nNOS'da aynı mekanizma ile uyarılmaktadır (Şekil 12) (102).



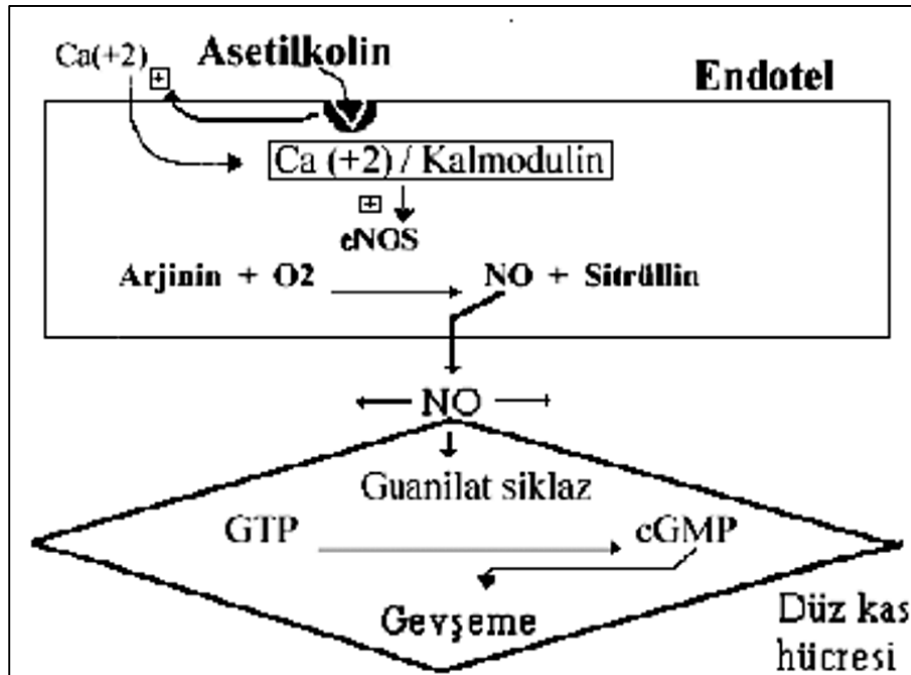
Şekil 11. L-argininden nitrik oksitin sentezlenmesi (100).

Hücre içi kalsiyum konsantrasyonları normal olduğunda iNOS ile NO üretimi, yalnız var olan enzim, substrat veya kofaktör miktarı ile sınırlıdır (103). Tam tersi eNOS ve nNOS normal kalsiyum konsantrasyonunda inaktiftir. Belli koşullarda NOS enzimi oksijen radikali ve ONOO⁻ oluşturarak *in vitro* hücre hasara neden olur (104). Nitrik oksit aktivitesi büyük oranda membran permeabilitesi ve difüzyonu ile oluşur. Difüzyon kapasitesi herhangi bir biyolojik molekülden daha yüksektir ve taşıdığı eşleşmemiş elektron sebebiyle serbest radikal özelliği gösterir. Özellikle serbest radikallerle ve hem demiri gibi metallerle de reaksiyona girer. Nitrik oksit, diğer moleküllerle yüksek reaksiyon hızına sahiptir ve oksijen ve süperoksitle tepkime vermesinden ötürü yarı ömrü kısadır (105,106).

NO, insan vücudunda bazı organ ve hücrelerin fonksiyonunda önemli rol oynar. Bir hormon, ROS, nörotransmitter, mediator, sitoprotektif molekül ve sitotoksik molekül olarak görev yapan tek endojen moleküldür (107). Endotel kaynaklı NO,

damar düz kaslarının gevşemesini sağlayarak kan akışı ve basıncının ayarlanmasını sağlamaktadır. Bu etki, sistemik dolaşımda meydana geldiği gibi lokal olarak kalp, beyin, karaciğer, gastrointestinal sistemde de izlenebilmektedir (108).

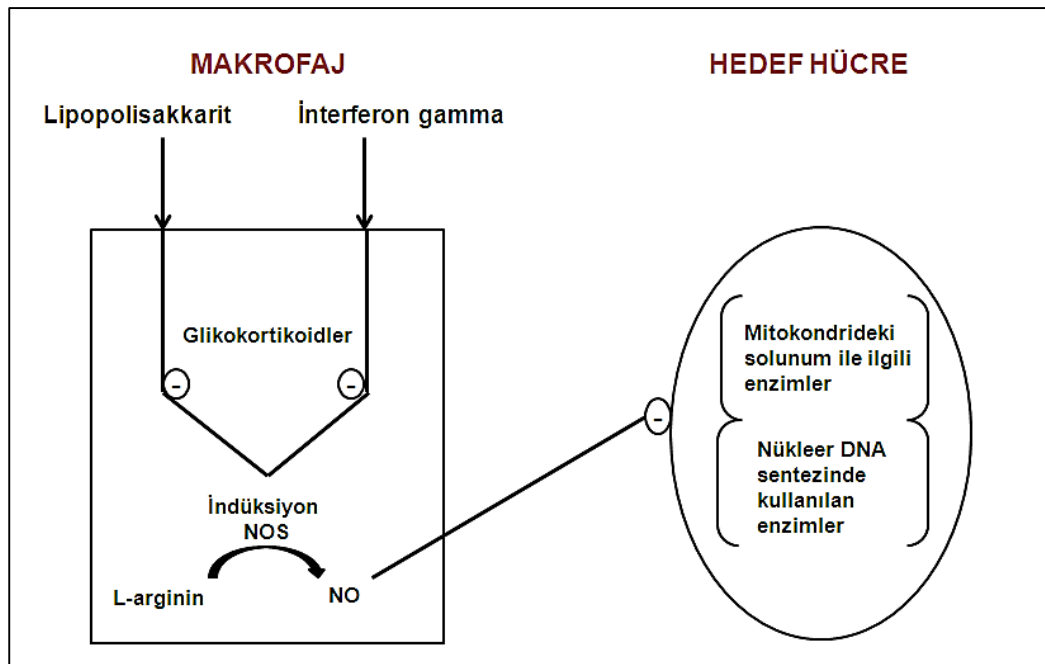
Nitrik oksit, merkezi sinir sisteminde hafıza oluşumu, denge, uyarı geçişi, koku alma gibi birçok fonksiyonları destekleyen bir nörotransmitter olarak fonksiyon göstermektedir (109). İmmün uyarılara ve yangılı mediatörlere karşı makrofajlar NO salgılayarak cevap verirler. iNOS'un ürettiği NO'nun majör fonksiyonu, mikroorganizmalar veya tümör hücrelerine sitotoksik ve sitostatik etki oluşturmaktır (110). NO, bakteri ve parazit gibi birçok patojenin ve tümör hücrelerinin ATP üreten oksidatif fosforilasyonunun (ubikinon redüktaz), glikolizin (gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz), trikarboksilik asit (TCA) siklusunun demir içeren bazı enzimlerini (cis-akonitaz) inhibe etmekte ve sonuçta bakteri, parazit ve tümör hücrelerini öldürmektedir (Şekil 13) (111-113).



Şekil 12. eNOS'un uyarılması ve düz kas hücrelerine etkisi.

İndüklenebilir NOS (iNOS) ile üretilen yüksek konsantrasyonlardaki NO hasarı artırır. Bundan dolayı NO akut inflamatuvar olaylarda hem koruyucu hem de hasar

verici bir molekül olarak etki gösterebilir (8). Patolojik koşullarda iNOS'a bağlı aşırı NO üretimi; lipid peroksidasyonuna, serbest radikal oluşumuna, DNA hasarına, mitokondriyal elektron transport zinciri enzimlerine etki ederek mitokondriyal solunumun durmasına ve dolayısıyla hücresel enerji kaybına, DNA replikasyonunu inhibe ederek hücre ölümüne yol açabilir (115). NO'un, kanser gelişiminde koruyucu rol oynadığı, kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ve antiproliferatif özellik gösterdiği belirtilmektedir (116).

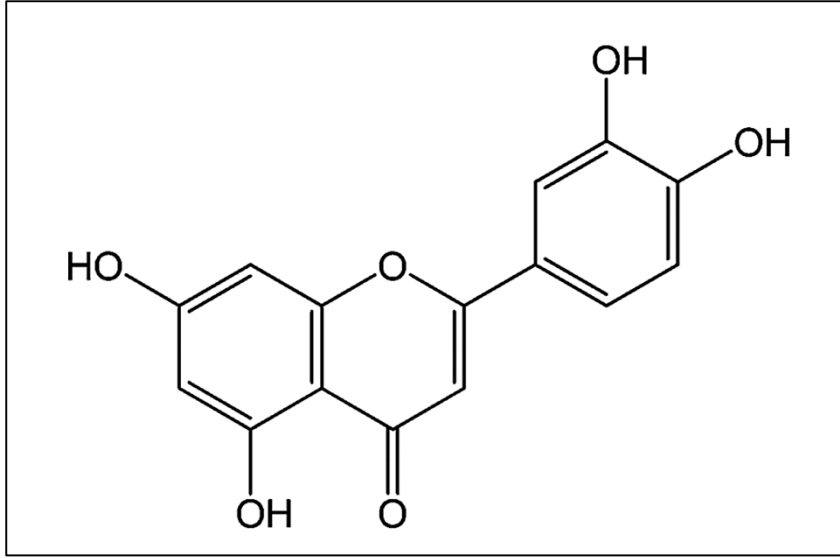


Şekil 13. Makrofaj kaynaklı NO'nun parazit ve tümör hücre üzerine etkisi (114).

LUTEOLİN

Luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone), bitkilerde yaygın olarak bulunan flavonoid bileşikler grubuna aittir (şekil 14) (10). Luteolin; kereviz, maydanoz, brokoli, soğan yaprakları, havuç, biber, lahana ve elma kabuğu gibi sebze ve meyvelerde bulunmaktadır (117,118,119). Flavonların genel antioksidan aktivitesi bilinmektedir. Flavon halkasında bulunan iki noktadan biri serbest radikallere hidrojen veya elektron sağlayarak nötralizasyonda işlev görür, diğeri de serbest radikallerin oluşumunda rol oynayan 8 geçiş metalleri (bakır, demir) için bağlanma bölgesi oluşturur (120,121).

Luteolinde hidroksile flavinoid olmasından dolayı güçlü antioksidan özelliktedir (122). Aynı zamanda luteolin prooksidan enzimleri inhibe ederek, antioksidan enzimleri de aktive ederek antioksidan etkinlik gösterir (123,124). Bu özellikleri luteolini güçlü bir antioksidan yapmaktadır.



Şekil 14. Luteolinin moleküler yapısı (125).

Luteolinin farmakolojik aktiviteleri fonksiyonel olarak birbirleriyle ilişkilidir. Örneğin, anti-inflamatuar etkisi aynı zamanda antikanser fonksiyonuyla bağlantılıdır. Luteolinin antikanser özelliği; redoks düzenlemesi, DNA hasarı, kanser hücrelerinin çoğalmasını, metastazını ve anjiogenezini engelleyen protein kinazlar ile uyarılmış apoptoz ile ilişkilidir. Ayrıca, luteolin çeşitli kanser hücrelerini hücre sağ kalım yollarını baskılayarak ve apoptoz yollarını uyararak sitotoksositeye duyarlı hale getirir. Luteolinin önemli özelliklerinden biri kan beyin bariyerini geçebilmesidir, bu özelliği nedeniyle beyin kanserlerinde, santral sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde kullanılabilir (126).

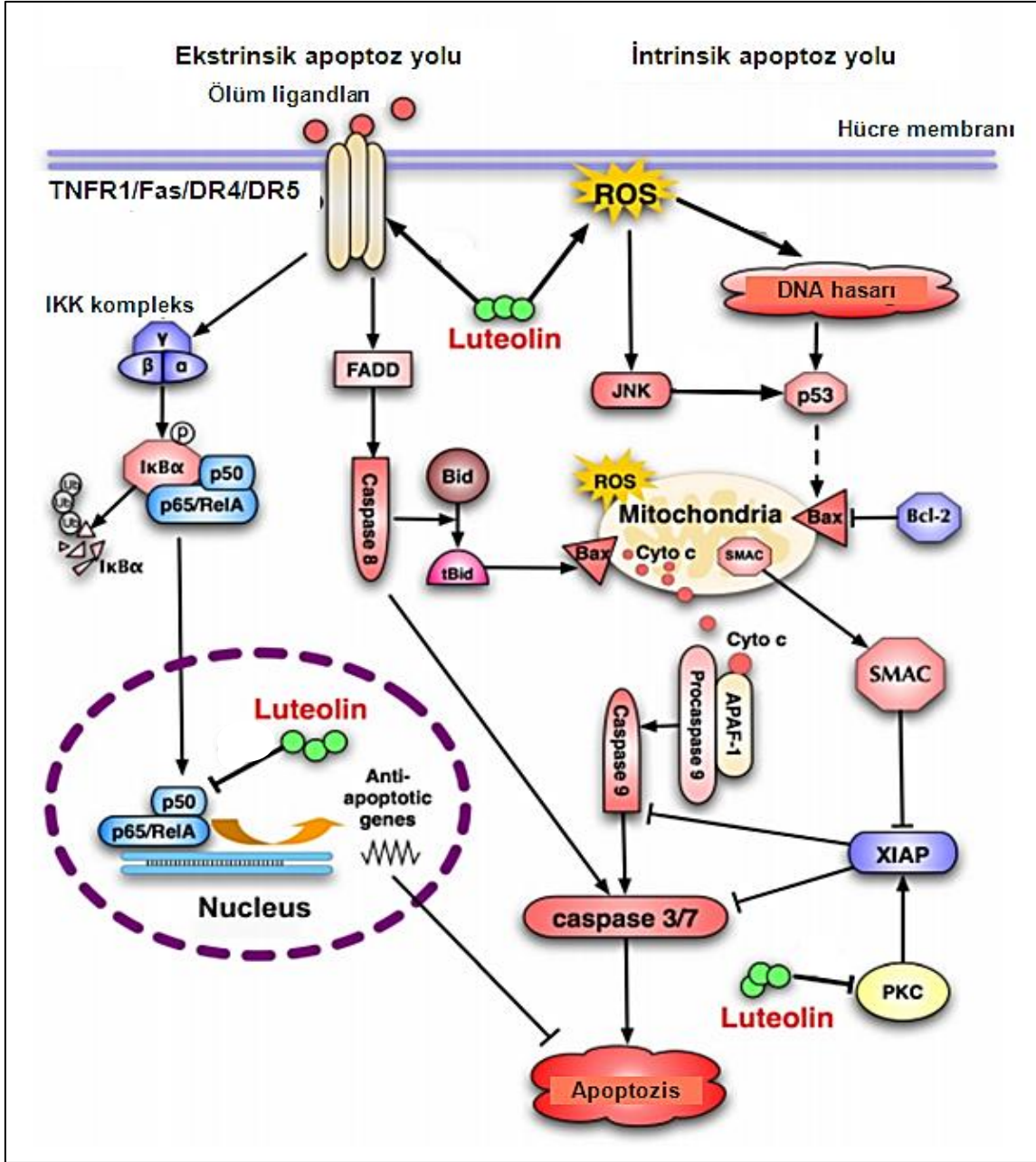
Kanserler, genellikle hücre bölünmesinin kontrolsüz olduğu durumlarda ortaya çıkar. Diğer flavonoidlerde olduğu gibi luteolinde, hemen hemen tüm kanser tiplerinde hücre çoğalmasını inhibe etme yeteneğindedir (127-129). Flavonoidlerin bu işlevlerini ya G1/S ya da G2/S kontrol noktasında hücre bölünmesini durdurarak

yerine getirdikleri bulunmuştur (130,131). Luteolin mide, prostat ve melanom hücrelerde G1 fazında iken hücre bölünmesini durdurma yeteneğindedir (131,132). Luteolinin yaptığı hücre G1 fazında durdurulma melanom OCM-1 ve kolon kanseri HT-29 hücrelerinin inhibisyonu ile ilişkilidir. Bu durdurulma, CDK inhibitörleri p27/kip1 ve p21/waf1'nin up-regülasyonu ya da CDK2 aktivitesinde direk inhibisyon ile gerçekleştirilir (133,134). Luteolinin bu etkisi p53 aracılı p21/waf1'in ekspresyonuyla olur (133).

Luteolinin bir diğer etkisi de, inflamasyon yanıtının başlatılması ve sürdürülmesinde rol oynayan birtakım sitokinlerin (TNF, IL-1, IL-6, IL-8) salınmasını sağlayan NF-κB transkripsiyonel sisteminin ekspresyonunu azaltması ve bu yolla hücre kültürlerinde de gösterilebilmiş bir antiinflamatuvar etkinlik göstermesidir (135). Luteolinin bu yolla kanser hücrelerinin büyümelerini de engellediği gözlemlenmiştir (136). Nükleer faktör kappa B (NF-κB) aynı zamanda hücre çoğalması, invazyonu, metastaz ve anjiyogenezle ilgili gen ekspresyonu için gerekli bir nükleer transkripsiyon faktörüdür (137). NF-κB'nin bazı kanser türlerinde apoptotik hücre engellenmesinde önemli rol oynadığını belirten yayınlar mevcuttur (138). Yine yapılan bir çalışmada luteolinin NF-κB'yi inhibe ederek NO in sekresyonunu artırdığı belirtilmiştir (139).

Yapılan bir diğer çalışmada da hücre kültürlerinde luteolinin mikroglial inflamasyonu inhibe ettiği ve nöroprotektif olduğu gösterilmiştir. Luteolin, bu etkilerini iNOS, COX-2, TNF-α, interlökin-1β inhibisyonu aracılığıyla yapmaktadır (Şekil 15) (140). Yapılan bir diğer çalışmada da ratlarda luteolinin karaciğer dokusunda iskemi reperfüzyon hasarını serum MDA miktarını azaltarak, SOD aktivitesini artırarak engellediği gösterilmiştir (141).

Luteolinin hücre koruyucu ve sinir dokuları üzerine koruyucu etkilerinden yola çıkılarak diğer flavinoidlerle kombine ticari preparatları bulunmaktadır ve bunlar çocuklarda otizm, yetişkinlerde sinir harabiyeti ile giden hastalıklarda kullanılmaktadır. Ancak luteolin şimdiye kadar Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmamıştır. İnsanlar üzerinde yapılacak emilim, dağılım ve toksisite çalışmalarının yeterli sayıda yapılması luteolinin klinik kullanıma girmesini sağlayacaktır (141).



Şekil 15. Luteolinin etki mekanizması (142).

Bu çalışmada birçok iyileştirici etkisi önceki çalışmalar ile gösterilmiş bir flavonoid olan luteolinin, meme kanseri üzerindeki olası tedavi edici rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada yerel etik kurul onayı alınarak Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir (Ek 1).

GEREÇLER

Çalışma Grupları

Çalışmada ortalama ağırlıkları 25-30 gram arasında değişen (ortalama 27 gram), 10-12 haftalık, 50 adet dişi Balb/c fare kullanıldı. Çalışmadaki fareler, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edildi. Denekler rastgele seçilerek, her biri 10 fareden oluşan beş grup oluşturuldu. Tüm fareler deneyin sonuna kadar ayrı kafeslerde, %50-60 nem oranı, $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ ısıda, 12 saat gece – 12 saat gündüz ışık periyodu olan ortamda tutuldu. Beş gruba da standart fare yemi günlük olarak verildi.

Hayvanlar 12 haftalık olduğunda 3., 4. ve 5. gruba Erhlich asit tümör hücresi 200 µl subkutan olarak sol bacağa enjekte edildi. 8. günün sonunda tümör çapının 1 cm olduğu tespit edildi.

1) Grup (n=9): Sağlıklı kontrol grubu olarak kabul edildi. Tedavinin 3. Günü ölen hayvan gruptan çıkarıldı.

2) Grup (n=9): Sağlıklı tedavi grubu olarak kabul edildi. Bu gruba deney süresince (12 gün) her gün intraperitoneal olarak 5 mg/kg luteolin verildi. Tedavinin 11. Günü ölen hayvan gruptan çıkarıldı.

3) Grup (n=10): Tümör kontrol grubu olarak kabul edildi. Bu gruba Ehrlich asit tümörü enjekte edildikten bir hafta sonra başlamak üzere, deney süresince (12 gün) her gün intraperitoneal olarak 100 µl %8'lik dimetil sülfoksit (DMSO) verildi.

4) Grup (n=9): Tedavi grubu 1 olarak kabul edildi. Bu gruba Ehrlich asit tümörü enjekte edildikten bir hafta sonra başlamak üzere, deney süresince (12 gün) her gün intraperitoneal olarak 5 mg/kg luteolin verildi. Tedavinin 3. günü ölen hayvan gruptan çıkarıldı.

5) Grup (n=10): Tedavi grubu 2 olarak kabul edildi. Bu gruba Ehrlich asit tümörü enjekte edildikten bir hafta sonra başlamak üzere, deney süresince (12 gün) her gün intraperitoneal olarak 10 mg/kg luteolin verildi.

Deney beş grup fare için de anestezi altında intrakardiyak kan alınması ve doku çıkarılması işlemi ile sonlandırıldı. Sakrifikasyon öncesi; ksilazin (5 mg/kg), ketamin (60 mg/kg) im olarak anestezi amaçlı verildi. Ardından meme tümör dokuları çıkarıldı ve buzlu %0.9'luk serum fizyolojik ile yıkandı. Kan örnekleri 4000 rpm de 10 dakika santrifüj edildikten sonra serum ve doku örnekleri -80°C'de deneyin yapılacağı güne kadar saklandı.

Kullanılan kimyasal maddeler

1,7-diaminoheptan ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_7\text{NH}_2$)	(Sigma, USA)
Albümin	(Sigma, Almanya)
Asetik asit (CH_3COOH)	(Merck, Almanya)
Bakır sülfat (CuSO_4)	(Merck, Almanya)
Benzoik asit ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$)	(Merck, Almanya)
Benzoil klorid ($\text{C}_7\text{H}_5\text{ClO}$)	(Sigma, ABD)

Demir klorür (FeCl_3)	(Merck, Almanya)
Diasetilmonoksim ($\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}$)	(Merck, Almanya)
Fosforik asit (H_3PO_4)	(Merck, Almanya)
Hidroklorik asit (HCl)	(Merck, Almanya)
Mangan klorür (MnCl_2)	(Merck, Almanya)
Ninhidrin ($\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$)	(Merck, Almanya)
L-ornitin hidroklorür ($\text{C}_5\text{H}_9\text{ClN}_2\text{O}_2$)	(Merck, Almanya)
Potasyum klorür (KCl)	(Merck, Almanya)
L-sitrulin ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$)	(Merck, Almanya)
Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	(Merck, Almanya)
Sodyum bikarbonat (NaHCO_3)	(Merck, Almanya)
Sodyumhidroksit (NaOH)	(Merck, Almanya)
Trikloroasetik asit (CCl_3COOH)	(Merck, Almanya)
Tiyosemikarbazid ($\text{CH}_5\text{N}_3\text{S}$)	(Merck, Almanya)
Tiyüre (H_2NCONH_2)	(Merck, Almanya)
Üre (H_2NCONH_2)	(Merck, Almanya)
L-arginin ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$)	(Merck, Almanya)
Sülfirik asit (H_2SO_4)	(Sigma, Almanya)
Folin	(Sigma, Almanya)
Na-K tartarat ($\text{NaK}(\text{COO})_2(\text{CHOH})_2$)	(Panreac, İspanya)
Triton-X-100	(Merck, Almanya)
Tris ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$)	(Carlo Erba Reagenti – Milano)
α -isonitrosopropiophenone ($\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_2$)	(Sigma, Almanya)

Metanol (CH ₄ O)	(Sigma, Almanya)
Spermidin (C ₇ H ₁₉ N ₃)	(Sigma, İsviçre)
Spermin(C ₁₀ H ₂₆ N ₄)	(Sigma, İsviçre)
Putresin (NH ₂ (CH ₂) ₄ NH ₂)	(Sigma, ABD)

Alet ve malzemeler

Etüv	Memmert 400, Almanya
Homojenizatör	DIA X900, Almanya
Manyatik karıştırıcı	Daihan, Kore
Soğutmalı santrifüj	Heraeus, Almanya
Soğutmalı santrifüj	Hettich-mikro 220r, Almanya
Spektrofotometre	UV-160A, Japonya
Su banyosu	GFL-1083, Almanya
Elektronik tartı	Sartorius, Almanya
pH metre	pH level1, Almanya
HPLC cihazı	Waters 2690, Milford, USA
Distile su cihazı	Millipore, Fransa
UV dedektör	Waters2487, Milford,USA
Vorteks	Velp, İtalya
Kolon	Waters 15×0.46 cm (3 µm) Taunton, MA USA
Guard kolon	Waters 3×0.46 cm (5 µm) Taunton, MA USA
Otomatik pipet	Eppendorf, Almanya
Cam malzemeler	Deney tüpleri, balon jojeler, beherler v.b

Doku örneklerinin homojenize edilmesi

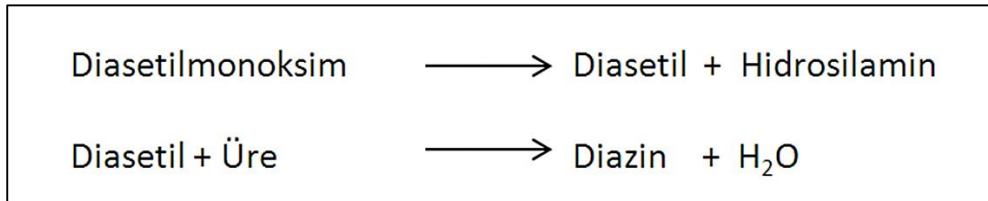
Tüm gruplardan elde edilen tümör dokularının homojenizasyonunda Tris tamponu kullanıldı. Derin dondurucudan çıkarılan dokular DIAX 900 model otohomojenizatör kullanılarak ağırlıklarının 10 katı soğuk 0.05 M Tris/HCl tamponu (pH 8.05) ile homojenize edildi. Doku homojenizatları 8.000×g 4°C'de 20 dakika süre ile santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi.

YÖNTEMLER

Meme Dokusu Arginaz Aktivitesinin TDMU Yöntemi İle Ölçümü

Arginaz aktivitesi; substrat olan argininin örnekteki arginazla hidrolizi sonucunda oluşan üre miktarının Tiyosemikarbazid diasetilmonoksim (TDMU) yöntemi ile spektrofotometrik olarak saptanması ile belirlenmiştir (143).

Üre için kullanılan birçok kimyasal metod gibi, TDMU yöntemi de Feron reaksiyonunu temel alır (Şekil 16). Diasetilmonoksim, üre ile doğrudan olarak reaksiyona girmez. İlk önce asit ortamda ısı etkisi ile hidrosilamin ve diasetile hidrolize olur. Diasetil, asit çözeltide üre ile kondanse olur ve H₂O ve renkli bir bileşik olan diazin meydana gelir. Bu rengi stabilize etmek için tiyosemikarbazid ve Fe⁺² iyonları kullanılır.



Şekil 16. Feron reaksiyonu (144).

Örnekteki üre düzeyinin 0.3 µM/ml'den fazla olması sebebi ile Beer-Lambert kanununa uymaması bu metodun dezavantajıdır. Ancak, bu olumsuzluk yüksek absorbanans değeri veren örneklerin sulandırıldıktan sonra ölçülmesiyle önlenir.

Gerekli Ayıraçlar

Asit karışımı: 0.12 M FeCl₃ (%56.7'lik H₃PO₄ içinde) ve 3.24 g FeCl₃.6H₂O bir miktar distile su ile balon jodede çözülür, üzerine %85'lik H₃PO₄'den 39.1 ml eklenir. Daha sonra distile suyla 100 ml'ye tamamlanır. Oda ısısında saklanır.

Hazırlanan çözeltilerden 1 ml alınıp, üzerine 999 ml %20'lik (v/v) H₂SO₄ ilave edilir. Deney aşamasında asit karışımı olarak kullanılır. Oda ısısında saklanır.

Renk ayırıcı (3.6 mM Tiyosemikarbazid (TSC) + 61.7 mM Diasetilmonoksim (DAM)): Bu karışım 0.0036 M TSC (91.14 g/mol) ve 0.0617 M DAM (101.1g/mol) içermektedir. 6.238 g DAM ile 0.328 g TSC karıştırılarak bir miktar distile suda çözüldükten sonra, distile su ile litreye tamamlanır. Oda ısısında koyu renkli şişede uzun süre saklanabilir.

Karbonat tamponu (pH:9.7 100 mM CO₃/HCO₃):

a) 1.06 g Na₂CO₃ bir miktar distile su ile balon jodede çözülür ve distile su ile 100 ml ye tamamlanır, 0.1 M Na₂CO₃ elde edilir.

b) 0.84 g NaHCO₃ bir miktar distile su ile balon jodede çözülür ve distile su ile 100 ml ye tamamlanır, 0.1 M NaHCO₃ elde edilir.

Karbonat tamponu hazırlanması için; 100 ml 0.1 M Na₂CO₃ çözeltisi üzerine, 0.1 M NaHCO₃ ilave edilerek pH 9.7'ye ayarlanır. Hazırlanan tampon çözelti 4 °C ısıda saklanır.

50 mM arginin çözeltisi: 0.87 g L-arginin balon jodede bir miktar distile suda çözülür. 0.1 M HCl ile pH 9.7'ye getirilir. Distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 4 °C ısıda saklanır.

9 mM MnCl₂ çözeltisi: 1.456 g MnCl₂.2H₂O bir miktar su ile balon jodede çözülür ve 1000 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 4 °C ısıda saklanır.

Üre standardı (0.5 µM üre/ml): 3 mg üre, 100 ml 0.016 M benzoik asit içinde çözülür. Deney sırasında kullanılan standart konsantrasyonu 0.2 µM üre/ml olarak belirlenmiştir. Bu nedenle stok çözelti sulandırılarak kullanılacak olan konsantrasyon elde edilir. Üre standart çözeltisi 4 °C ısıda saklanmalıdır.

Deneysel İşlemler

Doku arginaz enzim aktivitesi tayini için iki deney düzeneği kuruldu. Birinci düzeneğe; numaralandırılmış deney tüpleri, ikinci düzeneğe ise kör, standart ve sıfır zaman tüpleri konuldu. İlk düzenekteki deney tüpleri üçlü, ikinci düzenekteki deney tüpleri ikili hazırlandı. Enzim kaynağındaki endojen üre aktivitesinin eliminasyonu amacı ile sıfır zaman tüpleri hazırlandı.

Enzim kaynağı olarak kullanılacak olan süpernatant, 9 mM $MnCl_2$ ile 1/10 oranında sulandırıldı. Örnek 55 °C su banyosunda preinkübasyona bırakıldı. Bu aşamada deney ve sıfır zaman tüplerine, 0.4 ml 50 mM'lık arginin çözeltisi ve 0.4 ml'lık 100 mM'lık karbonat tamponundan konuldu. Kör tüpüne 1 ml distile su, standart tüpüne ise 1 ml üre standardı (0.2 μM üre/ml) konuldu. Ardından da enzimatik reaksiyonu engellemek amacıyla sıfır zaman, standart ve kör tüplerine 3'er ml asit karışımı konuldu.

20 dakikalık preinkübasyonun ardından, enzim kaynağı ve hazırlanmış olan deney tüpleri 37 °C'de su banyosunda 3 dakika bekletilerek aynı ısılara gelmeleri sağlandı.

Daha sonra 37 °C'deki enzim kaynağından, deney ve sıfır zaman tüplerine 0.2 ml konarak, vorteks karıştırıcı ile iyice karıştırıldı. Deney tüpleri enzimatik reaksiyonun oluşması için sallantılı su banyosunda 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi. 15 dakika inkübe edilen 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 ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı. Ardından tüpler 10 dakika kaynar suda bırakılarak renk oluşumu sağlandı.

Deney sonunda tüpler musluk suyu altında soğutularak, renkli çözeltilerin absorbanları 520 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüldü.

Doku Arginaz Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

Gerçek arginaz absorbansı için, deney tüplerinden sıfır zaman tüplerinin absorbansı çıkarılarak hesap yapıldı. Tüm deney tüplerinin absorbansından, kendi sıfır zaman absorbansı çıkarılarak net absorbans elde edildi. Böylece enzim kaynağındaki endojen ürenin absorbansı hesabın dışında bırakıldı.

$$\text{Faktör} = \frac{(0.2 \mu\text{mol üre/ml}) \times 50 \times 5 \times 4}{0.2 \mu\text{mol üre/ml'nin absorbansı}}$$

50: Süpernatantın MnCl_2 sulandırılma katsayısı

5: Süpernatantın inkübasyon ortamındaki sulanma katsayısı

4: İnkübasyon süresinin 1 saate tamamlanma katsayısı

0.2 $\mu\text{mol üre/ml}$ ' nin absorbansı: 0.811 olarak okunmuştur (Standart ürenin absorbansı)

$$\text{Faktör} = (0.2 \mu\text{mol üre/ml}) \times 50 \times 5 \times 4 / 0.811$$

Faktör = 246.61 olarak hesaplandı.

Tümör dokusu için enzim aktivitesi, ünite olarak tanımlanmıştır. Bir ünite enzim aktivitesi, 1 saatte 37°C 'de substrat olarak kullanılan L-arginin'den 1 $\mu\text{mol üre}$ oluşturan enzim aktivitesinin mg protein cinsinden ifadesidir. Enzim aktivitesinin hesaplanmasında net örnek absorbansları faktör ile çarpılmıştır. Tümör dokusu için, $\mu\text{mol üre/ml/saat}$ olarak enzim aktiviteleri bulunmuş ve ünite olarak tanımlanmıştır.

$$\text{Ünite} = \mu\text{mol üre/ml/saat}$$

Enzim aktiviteleri, ml'deki protein miktarına bölünerek standardize edilmeye çalışıldı ve özgül ünite olarak tanımlandı.

Bir özgül ünite, enzim aktivitesinin mg/ml protein cinsinden ifadesidir.

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

Meme Dokusu Ornitin Düzeyinin Chinard Yöntemi ile Ölçümü

Doku ornitin düzeyleri Chinard yöntemi ile tayin edildi. Bu yöntemin prensibi; ornitin ninhidrin ile oluşturduğu mor renkli kompleksin kolorimetrik olarak ölçümüne dayanır (145).

Gerekli Ayırıcılar

%10'luk trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi: 10 g TCA tartılır, distile su ile çözündürülür ve 100 ml'ye tamamlanır.

Ninhidrin ayıracı: 2.5 g ninhidrin, 40 ml 6 N H_3PO_4 ve 60 ml glasiyel asetik asitin içinde çözündürülür.

Derişik glasiyel asetik asit: Deney tüpü sayısına göre glasiyel asetik asitten bir miktar alınır.

0.3 $\mu\text{mol/ml}$ standart ornitin solüsyonu: 0.0506 g L-ornitin tartılır ve distile su ile çözündürülür ve 1 litreye tamamlanır. Böylece 0.3 $\mu\text{mol/ml}$ 'lik ornitin konsantrasyonu elde edilir. Deneyde kullanılan standart konsantrasyonu 0.18 $\mu\text{mol/ml}$ olarak belirlendiğinden, stok ornitin çözeltisi sulandırılarak bu konsantrasyon elde edildi.

DeneySEL İşlemler

Çalışılacak doku homojenatı % 10'luk TCA ile 1/1 oranında muamele edildikten sonra 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve böylece süpernatant elde edilmiş oldu. Deney tüpüne 1 ml süpernatant, kör tüpüne 1 ml distile su ve standart tüpüne de 1 ml 0.18 $\mu\text{mol/ml}$ 'lik ornitin solüsyonu konuldu. Tüplere sırayla 2.5 ml glasiyel asetik asit ve 0.25 ml ninhidrin ayıracı konuldu. Tüm tüpler vortekslenerek karıştırıldıktan sonra 30 dakika kaynar su banyosunda tutuldu. Su banyosundan çıkarılan tüpler hızla soğutulularak 515 nm'de absorbanları spektrofotometrede ölçüldü.

Ornitin Düzeyinin Hesaplanması

Ornitin değerlerinin hesaplanması için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\text{Ornitin } (\mu\text{mol/ml}) = \frac{\text{Deney absorbansı} \times 2 \times (0.18 \mu\text{mol ornitin/ml})}{\text{Standart ornitin absorbans değeri}}$$

2: Homojenatın TCA ile sulandırılma katsayısı

0.18 $\mu\text{mol/ml}$: Standart ornitin konsantrasyonu

1.104: Standart ornitin absorbans değeri

$$\text{Ornitin } (\mu\text{mol/ml}) = \frac{\text{Deney absorbansı} \times 2 \times (0.18)}{1.104}$$

Ornitin ($\mu\text{mol/ml}$) = Deney absorbansı x 0.413 olarak formüle edildi ve elde edilen ornitin değerleri protein miktarına bölünerek ($\mu\text{mol/mg}$ protein) olarak standardize edildi.

Meme Dokusu Protein Düzeyinin Lowry Yöntemi ile Ölçülmesi

Doku protein düzeyleri, alkali bakır tartarat ayırıcının peptid bağları ile kompleks yapması prensibine dayanan Lowry yöntemi ile saptandı (146). Her 7 yada 8 amino asit artığı 1 bakır atomunu bağlar. Fenol ayırıcı; bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mavi-mor renk oluşur. Oluşan renk 660 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Gerekli Ayıraçlar

Fenol ayıracı: 2 N folin ayırıcından 2.5 ml alınarak distile su ile 45 ml'ye tamamlanır. Bu ayıraç her kullanım için taze hazırlanmalıdır.

Alkali bakır ayıracı: 10 g Na₂CO₃, 0.25 g Na-K Tartarat, 0.05 g CuSO₄; ayrı ayrı tartılarak 0.5 N NaOH içinde balon jodede çözülür ve çözelti 0.5 N NaOH ile 100 ml'ye tamamlanır. Bu çözelti 4°C'de 1 ay saklanabilir.

%5 mg'lık Albumin standardı: %5 mg'lık albumin standardı hazırlamak için mevcut 5 g/dl' lik albumin standardı kullanılmıştır. Albumin solüsyonundan 0.1 ml alınarak ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak %5 mg'lık albumin standardı elde edilmiş olur. Deneyde kullanılacak standart protein konsantrasyonu %2 mg olarak belirlendiğinden, stok protein standardı sulandırılarak istenilen konsantrasyon elde edildi.

DeneySEL İşlemler

Doku süpernatantları 1/50 oranında serum fizyolojik ile sulandırılıp vorteks yardımı ile iyice karıştırılarak protein ölçümü için elverişli hale getirildi. Numaralandırılmış deney, kör ve standart tüpleri hazırlandı. Deney tüpüne 1/50 oranında sulandırılmış olan süpernatanttan 0.5 ml standart tüpüne %2'lik standarttan 0.5 ml ve kör tüpüne de 0.5 ml distile su konuldu. Ardından her tüpe 0.5 ml alkali bakır ayıracı ilave edildi. Tüpler vortekslenerek iyice karışmaları sağlandı. 10 dakika oda ısısında bekletildikten sonra her tüpe 2 ml fenol ayıracı eklendi ve tekrar vortekslendi. 30 dakika 37°C'lik su banyosunda bekletildikten sonra; tüplerin köre karşı absorbanları 660 nm. dalga boyunda spektrofotometre ile okundu.

Protein Düzeyinin Hesaplanması

Protein değerlerinin hesaplanması için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\text{Protein miktarı (\% mg protein)} = \frac{\text{Deney absorbanı} \times 50 \times 2 \times 2}{\text{Standart protein absorban değeri}}$$

10: Süpernatantın serum fizyolojik ile sulandırılma katsayısı

2: Süpernatantın 1 ml' ye tamamlanma katsayısı

2: Protein standardının konsantrasyonu

0.055: Standart proteinin absorbansı

$$\text{Protein miktarı (\% mg protein)} = \frac{\text{Deney absorbansı} \times 10 \times 2 \times 2}{0.055}$$

Protein miktarı (% mg protein) = Deney Absorbansı x 727.27 olarak formüle edildi. Elde edilen % mg protein, 100 ml'deki protein değeridir. Sonuç 100'e bölünerek protein miktarı mg/ml olarak hesaplandı.

Serum Arginaz Enzim Aktivitesinin Munder Yöntemi İle Ölçülmesi

Serum arginaz aktivitesi, substrat olan argininin örnekteki arginazla hidrolizi sonucunda oluşan üre miktarının Munder yöntemi ile spektrofotometrik olarak saptanmasıyla belirlenmiştir (147). Yöntemde bazı revizyonlar yapılmıştır.

Gerekli Ayıraçlar

%0.1'lik Triton-X-100: 0.1 ml Triton-X-100 alınıp 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

Asit karışımı: H₂SO₄ (%96), H₃PO₄ (%85), H₂O 1:3:7 oranlarında alınarak karışım hazırlanır.

%9'lük ISPF (α -isonitrosopropiophenone): 0.9 g ISPF tartılır ve %100'lük etanol içerisinde çözülerek 10 ml'ye tamamlanır.

HCl (2 M): 8.28 ml HCl alınır ve distile su ile 50 ml'ye tamamlanır.

Arginin çözeltisi (0.5 M): 8.71 g L-arginin balon jodede bir miktar distile suda çözündürülür. 0.1 M HCl ile pH 9.7'ye ayarlanır. Distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 4 °C ısıda saklanır.

MnCl₂ çözeltisi (10 mM): 1.6187 g MnCl₂.2H₂O bir miktar distile su ile balon jodede çözündürülür ve distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 4°C ısıda saklanır.

Tris-HCl çözeltisi (25 mM): 3.0285 g tris tartılır bir miktar distile su ile balon jodede çözülür ve 1000 ml'ye tamamlanır. 2 M'lık HCl çözeltisi ile pH 7.5'e ayarlanır.

DeneySEL İşlemler

Numaralandırılmış deney, kör ve standart tüpleri hazırlandı. Deney tüplerine 100 µl örnek üzerine 100 µl triton-X-100 konuldu ve 30 dakika Oda ısısında çalkalamaya bırakıldı. Daha sonra bu tüplerden 100 µl alınarak üzerine 100 µl tris ilave edilerek vorteks yardımıyla karıştırıldı. Bu tüplerden 100 µl çekilerek üzerine 10 µl MnCl₂ ilavesi yapıldı. 10 dakika 56°C'de preinkübasyona bırakıldı. Üzerine 100 µl arginin ilavesinden sonra 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edildi. Daha sonra üzerine 900 µl asit karışımı ve 40 µl ISPF ilave edilerek 30 dakika kaynar su banyosuna bırakıldı. Tüplerin absorbansı mikro ELISA plaka okuyucu kullanılarak 540 nm. dalga boyunda ölçüldü.

Serum Arginaz Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

Serum arginaz enzim aktivitesi, üre standart grafiği üzerinden hesaplandı (Şekil 17).

NO Tayini

NO tayini: Cartos ve Wakid yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü (148).

Gerekli Ayıraçlar

Kadmiyum granülleri: 0.1 mol H₂SO₄ içinde saklandığı sürece 9 ay stabildir.

Glisin-NaOH buffer: 7.5 g glisin bir miktar distile suda çözüldü. 2 mol NaOH çözeltisi ile pH'sı 9.7'ye ayarlandı. Bu çözelti 1 ay 0-8 °C'de stabildir.

Sülfanilamid: 5 g sülfanilamid 3 mol sıcak HCl içinde çözülür ve daha sonra soğumaya bırakıldı. 1 yıl oda sıcaklığında stabil kalabilir.

N-naphthylethylene diamine (NNDA): 50 g NNDA 250 ml distile su içinde çözüldü. 2 ay 0-8 °C'de stabildir.

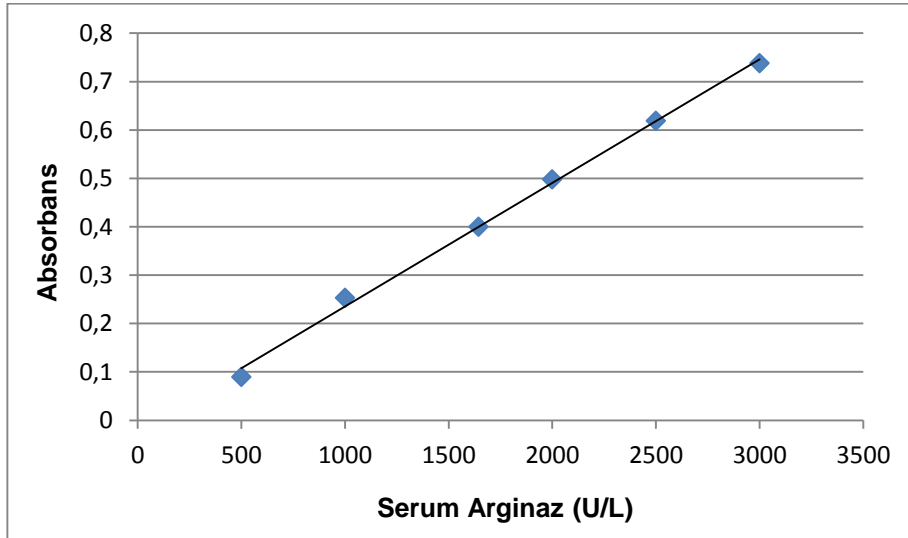
Çinko sülfat (ZnSO₄): 75 mM; 10.8 mg alınıp 500 ml'ye tamamlandı .

Bakır sülfat (CuSO₄): 5 mM; 250 mg alınıp 200 ml'ye tamamlandı .

Sodyum hidroksit (NaOH): 55 mM; 1.1 g alınıp 500 ml ye tamamlandı.

Standartlar: NaNO₂ standardı 10 mM'lik sodyum tetra borat çözeltisi içinde hazırlandı (69 mg NaNO₂, 380 mg borat (Na₂B₄O₇.10H₂O) 100 ml içinde çözüldü).

KNO₃ standardı: 102 mg potasyum nitrat alınıp 10 mM'lik 100 ml sodyum tetra borat içinde çözüldü.



Şekil 17. Üre standart çalışması regresyon grafiği.

DeneySEL İşlemler

Deproteinizasyon: Test tüpüne 0.5 ml distile su, 2 ml ZnSO₄, 2.5 ml NaOH ilave edilip 10 dakika oda ısısında beklettikten sonra 4000 g'de 20 dakika santrifüj edildi.

Kadmiyum granüllerinin aktivasyonu: Granüller 3 defa distile su ile yıkanır. 1-2 dakika içinde CuSO₄ içinde çalkalanarak bekletilip, 3 defa da glisin-NaOH ile yıkanıp 10 dakika içinde kullanılmak üzere kurutma kağıdı ile kurutuldu.

Sonucun hesaplanması: KNO₃'ün 10 milimolarlık çözeltisinden 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 200 milimolarlık seri dilisyonlar hazırlandı ve numunelere uygulanan tüm işlemler standartlara da uygulandı.

1 ml glisin-NaOH tamponu tüm tüplere konuldu. 1'er ml deproteinize numunelerden ve standartlardan alındı. 2.5 g tartılan ve aktivasyon işleminden geçirilen kadmiyumlardan tüm tüplerin üzerine konuldu. 90 dakika oda ısısında karıştırılarak beklendi. Süre sonunda nitrit ölçümü için bu tüplerden 2'şer ml alınarak üzerine 1 ml sülfanilamid ve 1 ml N-naphiletillen diamin (NNDA) ilave edildi. Karıştırıldı ve 45 dakika beklendikten sonra 545 nm'de okuma yapıldı.

Direkt nitrit ölçümü: NaNO₂ standartları 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 200 milimolarlık seri dilisyonlar hazırlandı ve deproteinize numunelerden kadmiyum ile reaksiyona sokmadan direkt olarak 2'şer ml alınarak ayrı tüplere konuldu. Üzerine 1 ml sülfanilamid ve 1 ml NNDA eklendi. 45 dakika sonra 545 nm'de okuma yapıldı.

Nitrat Aktivitesinin Hesaplanması

Bulunan nitrat değerlerinden nitrit değerleri çıkarıldıktan sonra sulandırma faktörü olan 20 ile çarpılıp yine nitrat standardından elde edilen faktör ile çarptıktan sonra çıkan sonuç mMol olarak hesaplanmış olur.

Meme Dokusu ve Serum Poliamin Düzeylerinin HPLC ile Ölçülmesi

Poliamin düzeyleri, HPLC yöntemi ile Taibi tarafından geliştirilen bir metod ile ölçüldü (149). Yöntem alkali ortamda benzoil kloridin poliaminlere bağlanması prensibine dayanmaktadır (Şekil 18).

Gerekli Ayıraçlar

2 M NaOH: 20 g NaOH tartılır, distile suda çözülür ve 250 ml'ye tamamlanır.

0.1 M NaOH: 2 g NaOH tartılır, distile suda çözünür ve 500 ml'ye tamamlanır.

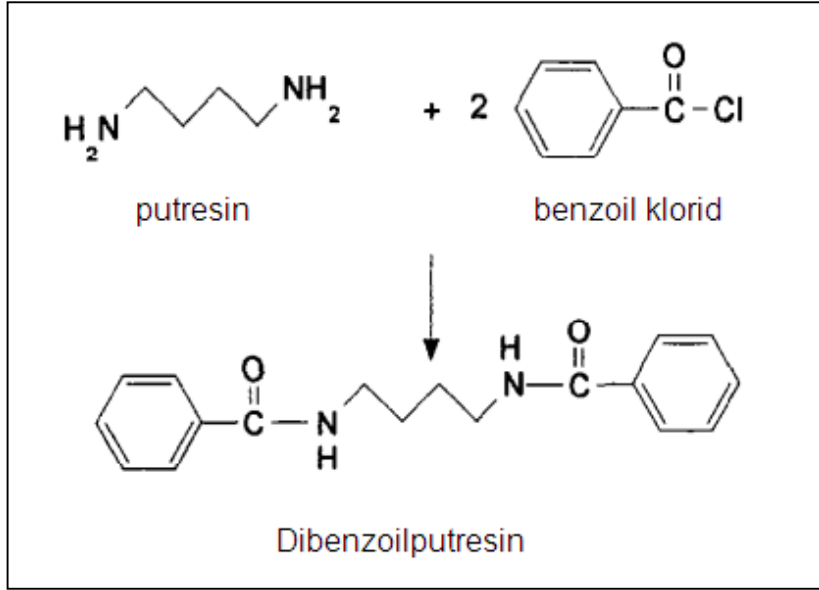
Benzoil klorid solüsyonu: Benzoil klorid 1:1 oranında metanol ile karıştırılır. Bu solüsyon her kullanım için taze olarak hazırlanmalıdır.

1 M perklorik asit: 6.037 ml perklorik asit, distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

4 mM 1,7-diaminoheptan: 52.1 mg 1,7-diaminoheptan tartılır ve 1 M perklorik asit ile 100 ml'ye tamamlanır.

Solvent A: %100 distile su içermektedir

Solvent B: %100 metanol içermektedir.



Şekil 18. Benzoil kloridin putresine bağlanma reaksiyonu.

Doku Ve Serum Örneklerinin HPLC İçin Hazırlanması

Deney tüplerine 0.1 ml serum üzerine 0.4 ml 1 M perklorik asit (40 µM IS/ml) eklendi, vorteks yardımı ile iyice karıştırıldıktan sonra 15 dakika süreyle 23,000×g 4°C'de santrifüj edilerek, ultrafiltrat elde edildi.

Poliamin düzeyi ölçümünden hemen önce derin dondurucudan çıkarılan meme tümör dokularının homojenizasyonunda perklorik asit kullanıldı. Dokular homojenizatör kullanılarak ağırlıklarının 10 katı kadar 1 M perklorik asit (40 µM IS/ml) ile homojenize edildi. 15 dakika süreyle 23,000×g ve 4°C'de santrifüj edilerek, ultrafiltrat elde edildi.

Doku ve serum örnekleri aynı işlemlerden geçirildi. Deney tüplerine alınan 1 ml doku homojenatları üzerine 1 ml 2 M NaOH ve 10 µl benzoil klorid solüsyonu eklendi, vortekslenerek iyice karışmaları sağlandı (Serum örneklerinde 1 ml doku homojenatı yerine serum ultrafiltratından 0.4 ml aktarıldı). 20 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, deney tüplerine 2 ml kloroform eklendi. 6 dakika boyunca vorteks ile karıştırıldıktan sonra 5 dakika süreyle, 2000×g'de santrifüj edildi. Santrifüj edilen tüplerde iki faz olduğu görüldü ve üst faz uzaklaştırılarak deneye alttaki organik faz ile devam edildi. Deney tüplerine 2 ml 0.1 M NaOH eklenerek, 10 dakika boyunca vorteks ile karıştırıldı ve bu aşama iki kez tekrarlandı. Bu aşama sonunda tüplerde

yine iki faz oluştuğu görüldü ve alt organik faz nitrojen ile uçuruldu. Deney tüplerine 0.5 ml %60'lık metanol eklenerek vortekslendi. Serum örneklerinde %60'lık metanol 0.5 ml yerine 0.2 ml olarak değiştirilmiştir. Örnekler viallere por çapı 0.2 µm olan filtrelerden geçirilerek aktarıldı ve HPLC kompartımanına yerleştirildi.

Kromotografik ayırışmanın yapılmasında HPLC cihazı kullanıldı. Analizler ultraviyole detektör kullanılarak, 229 nm dalga boyunda yapıldı. Waters spherisorb C₁₈ kolonu kullanıldı. Solventlerin akış hızı 0.8 ml/dk, sistem basıncı 2600-2800 psi ve injeksiyon volümü 20 µl olarak uygulandı. Derivatize edilen poliaminler aşağıdaki mobil faz gradienti kullanılarak ayırıştırıldı (Tablo 2).

Tablo 2. Mobil faz gradient tablosu

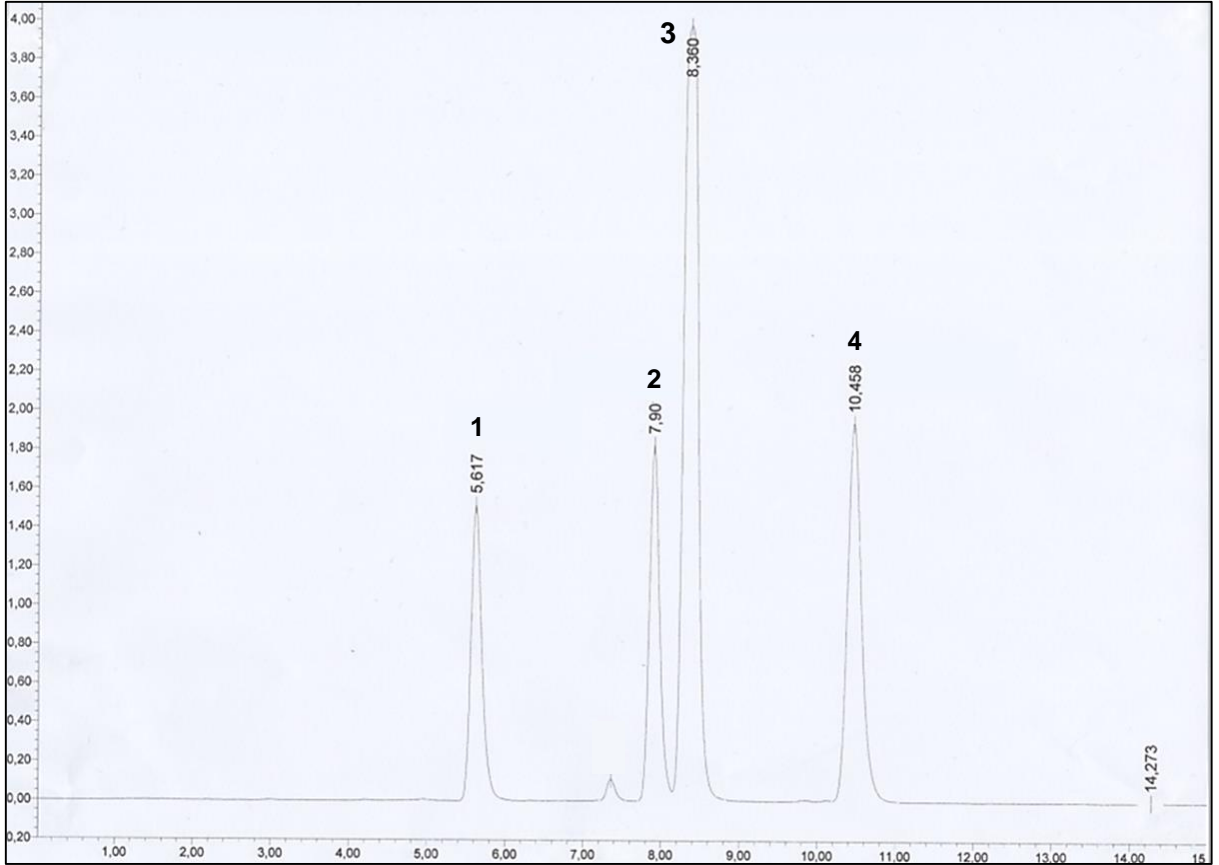
Zaman (dk)	Akış hızı (ml/dk)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	0.8	39	61
4.01	0.8	33	67
14.01	0.8	39	61
15	0.8	39	61

Poliamin Düzeylerinin Hesaplanması

Serum ve doku poliamin miktarları, numunelerden elde edilen HPLC kromotogramındaki pik alanlarının poliamin standart pik alanları ile karşılaştırılması sonucu hesaplandı. Doku düzeyleri proteine oranlanarak ifade edildi (Tablo 3) (şekil 19).

Tablo 3. Waters spherisorb C₁₈ kolonundan standart ve rnelere ait poliamin çıkış zamanları

Poliamin	HPLC Kromatogramında ıkış Zamanı (dk)
Putresin	5,61
İnternal standart (IS)	7,90
Spermidin	8,36
Spermin	10,45



Şekil 19. Poliamin kalibrasyon standartlarını gösteren HPLC kromatogramı:

1. Putresin (5,61) 2. IS (7,90) 3. Spermidin (8,36) 4. Spermin (10,45).

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Çalışmamızda sağlanan verilerin istatistiksel analizi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'na kayıtlı STATISCA 7.0 (Lisans no:31N6YUCV38) istatistik programı kullanılarak yapıldı.

Tümör kontrol ve tedavi grubu arasındaki arginaz enzim aktivitesi, ornitin, nitrik oksit ve poliamin düzeyleri arasındaki farklılıklar Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Elde edilen "*p*" değerleri 0.05'den küçük olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda tümör ve tedavi gruplarındaki farelerin tümör dokusunda; arginaz enzim aktiviteleri, ornitin, nitrik oksit ve poliamin düzeyleri, serum örneklerinde ise arginaz enzim aktiviteleri ve poliamin düzeyleri ölçüldü. Serum örneklerinde arginaz enzim aktivitesi ve poliamin düzeylerinin, doku örneklerinde ise arginaz enzim aktivitesi, ornitin, nitrik oksit ve poliamin düzeylerinin ortalama ve ortalamanın standart hatası (SD) Tablo 4, 5 ve 6'da gösterilmiştir.

Tablo 4. Serum arginaz enzim aktiviteleri ve poliamin düzeyleri

Grup	Serum Arginaz Aktivitesi (U/L) ORT±SD	Serum Putresin Düzeyi (µM/ml) ORT±SD	Serum Spermidin Düzeyi (µM/ml) ORT±SD	Serum Spermin Düzeyi (µM/ml) ORT±SD
Grup 1 (n=9)	2.22±0.06	3.40±0.98	3.33±1.46	29,56±8.72
Grup 2 (n=9)	2.85±0.76	3.97±2.14	3.01±1.44	28.43±9.33
Grup 3 (n=10)	3.57±0.54	7.06±4.45	4.80±1.50	43.74±14.71
Grup 4 (n=9)	2.40±0.53	3.72±1.66	2.38±0.73	27.58±1.63
Grup 5 (n=10)	3.16±0.74	5.50±1.98	2.64±1.22	33.58±6.32

Tablo 5. Doku ornitin, NO düzeyleri ve arginaz enzim aktiviteleri

Grup	Doku Arginaz Aktivitesi (U/mg prot.) ORT±SD	Doku Ornitin Düzeyi (µM/mg prot.) ORT±SD	Doku NO Düzeyi (µM/mg prot.) ORT±SD
Grup 3 (n=10)	24.65±8.30	0.020±0.006	320.67±203.69
Grup 4 (n=9)	35.86±17.81	0.021±0.002	255.24±106.14
Grup 5 (n=10)	39.81±11.28	0.025±0.004	241.38±82.43

Tablo 6. Doku poliamin düzeyleri

Grup	Doku Putresin Düzeyi (µM/mg prot.) ORT±SD	Doku Spermidin Düzeyi (µM/mg prot.) ORT±SD	Doku Spermin Düzeyi (µM/mg prot.) ORT±SD
Grup 3 (n=10)	31.76±9.62	164.80±49.07	135.98±42.24
Grup 4 (n=9)	24.99±8.86	184.65±51.63	127.31±41.82
Grup 5 (n=10)	38.96±13.26	265.10±54.19	174.69±58.10

Serum arginaz aktivitelerinin tümör grubunda sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği gözlemlendi ($p<0.001$). Luteolin tedavisinin (grup 4), serum arginaz aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürdüğü saptandı ($p<0.001$).

Serum putresin düzeylerinin tümör grubunda sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği gözlemlendi ($p=0.017$). Tümör grubunda artan

putresin düzeylerinin, düşük doz tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı saptandı ($p<0.05$).

Tablo 7. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar

Gruplar	Serum Arginaz Aktivitesi		Serum Putresin Düzeyi		Serum Spermidin Düzeyi		Serum Spermin Düzeyi	
	p	z	p	z	p	z	p	Z
Grup 1 ve 3	<0.001	-3.391	0.017	-2.368	0.022	-2.286	0.028	-2.205
Grup 3 ve 4	<0.001	-3.267	0.043	-2.041	<0.001	-3.472	0.035	-2.123
Grup 3 ve 5	0.218	-1.285	0.739	-0.378	0.007	-2.646	0.123	-1.587
Grup 4 ve 5	0.035	-2.126	0.053	-1.960	0.780	-0.286	0.028	-2.205

Serum spermidin düzeylerinin tümör grubunda sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği saptandı ($p=0.022$). Tedavi gruplarında ise luteolin tedavisinin serum spermidin düzeylerini, tümör grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürdüğü bulundu ($p<0.008$).

Serum spermin düzeylerinin tümör grubunda sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği saptandı ($p<0.028$). Tümör grubunda artan spermin düzeylerinin, düşük doz tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ($p=0.035$).

Tümör arginaz aktivitelere bakıldığında, yüksek doz tedavi grubunda meydana gelen yükselme istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0.002$). Yüksek doz tedavi grubunun ornitin değerlerinde meydana gelen artışın da aynı şekilde istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p<0.005$). Aynı zamanda iki tedavi grubu arasında ornitin düzeyleri arasında anlamlı bir fark varken arginaz aktivitelere anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Tablo 8. Doku arginaz enzim aktiviteleri, ornitin ve NO düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

Gruplar	Doku Arginaz Aktivitesi		Doku Ornitin Düzeyi		Doku NO Düzeyi	
	p	z	p	z	p	z
Grup 3 ve 4	0.243	-1.225	0.400	-0.899	0.661	-0.490
Grup 3 ve 5	0.002	-2.948	0.043	-2.043	0.631	-0.529
Grup 4 ve 5	0.497	-0.735	0.035	-2.126	0.968	-0.082

Tablo 9. Doku poliamin düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

Gruplar	Doku Putresin Düzeyi		Doku Spermidin Düzeyi		Doku Spermin Düzeyi	
	p	z	p	z	p	z
Grup 3 ve 4	0.113	-1.633	0.315	-1.061	0.842	-0.245
Grup 3 ve 5	0.247	-1.209	<0.001	-3.250	0.123	-1.587
Grup 4 ve 5	0.022	-2.286	0.004	-2.776	0.053	-1.960

Tümör grubunda artan nitrik oksit değerleri her iki tedavi grubunda da düşüş göstermesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tümör grubunda artan putresin düzeyleri, düşük doz tedavi grubunda düşüş göstermesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tümör spermidin düzeylerine bakıldığında, yüksek doz tedavi grubunda meydana gelen artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$). İki tedavi grubu arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi.

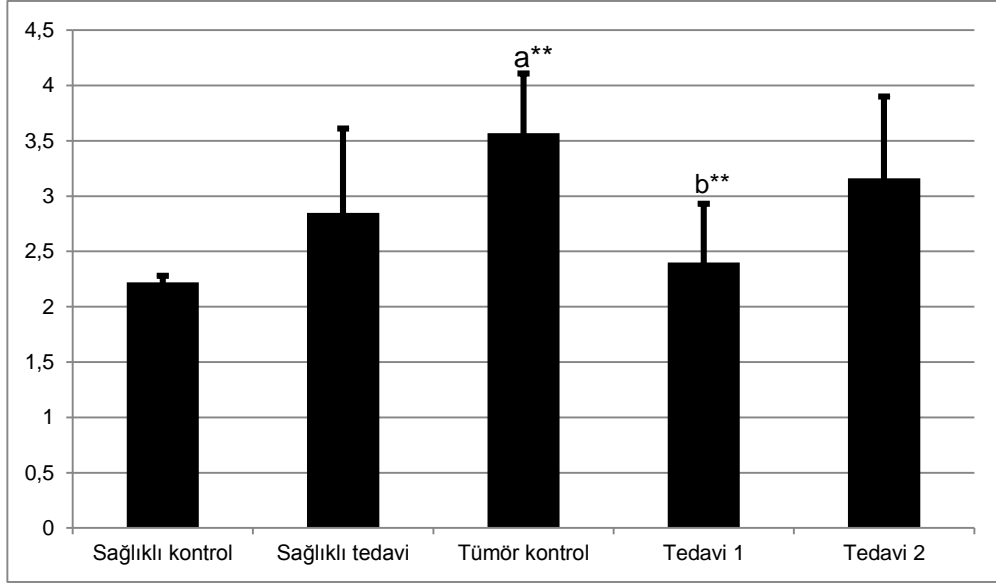
Tümör grubunda artmış olan doku spermin düzeyleri tedavi grubunda belirgin bir düşüş göstermesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 10. Deneklerin her birinin serum arginaz enzim aktivitesi ve poliamin düzeyleri

Grup	Serum Arginaz Aktivitesi (U/L)	Serum Putresin Düzeyi ($\mu\text{M/ml}$)	Serum Spermidin Düzeyi ($\mu\text{M/ml}$)	Serum Spermin Düzeyi ($\mu\text{M/ml}$)
Grup 1				
1	3.33	3.23	2.09	19.54
2	2.16	2.28	2.80	36.16
3	1.66	3.96	5.85	45.10
4	2.00	5.31	3.35	33.44
5	2.65	2.49	2.88	23.36
6	2.76	2.94	2.15	24.99
7	2.16	2.53	2.55	20.67
8	1.40	4.12	2.53	25.78
9	1.82	3.70	5.80	37.02
Grup 2				
1	3.37	0.83	2.67	28.07
2	2.83	8.33	4.47	31.85
3	3.10	3.78	5.86	49.35
4	3.37	2.41	3.97	26.26
5	3.48	2.30	1.95	17.98
6	3.75	3.95	1.95	28.32
7	1.97	4.44	1.66	24.71
8	1.55	5.49	2.02	31.44
9	2.27	4.24	2.58	17.91
Grup 3				
1	3.59	7.10	5.62	36.87
2	4.28	4.72	4.13	29.51
3	2.84	2.59	2.94	25.74
4	2.80	3.14	4.53	41.30
5	3.78	11.16	8.14	57.75
6	3.33	16.47	6.17	66.21
7	3.67	5.55	3.95	48.91
8	4.43	10.98	3.90	45.87
9	3.18	3.77	4.82	24.82
10	3.75	5.10	3.83	60.45
Grup 4				
1	1.51	5.72	3.01	25.80
2	1.93	2.54	2.94	26.63
3	2.23	2.69	2.84	26.75
4	2.39	3.37	2.70	28.57
5	2.99	2.21	2.49	27.83
6	2.23	1.92	1.45	25.91
7	2.35	3.74	1.59	26.82
8	2.69	4.60	1.30	29.48
9	3.29	6.73	3.11	30.50
Grup 5				
1	3.14	4.32	4.61	42.95
2	1.97	5.85	3.97	41.18
3	3.90	4.78	1.25	34.07
4	4.09	4.51	1.72	26.42
5	2.31	3.53	2.28	31.58
6	4.01	2.62	2.54	31.44
7	3.56	6.51	4.03	41.08
8	3.29	5.88	3.09	33.20
9	2.69	8.05	1.48	24.73
10	2.61	9.03	1.45	29.19

Tablo 11. Deneklerin her birinin doku ornitin, NO ve poliamin düzeyleri ve arginaz enzim aktivitesi

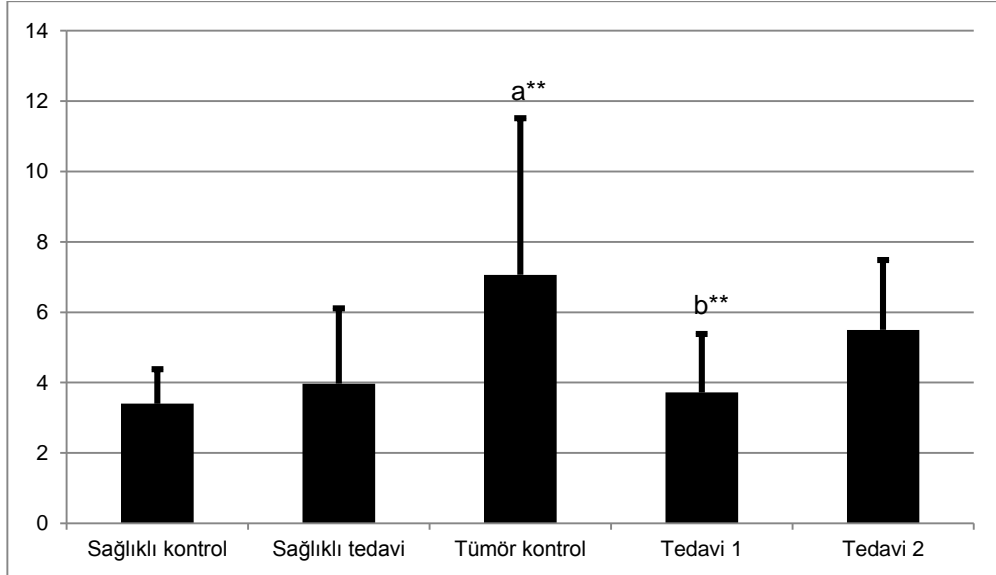
Grup	Doku Arginaz Aktivitesi (U/mg prot.)	Doku Ornitin Düzeyi (µM/mg prot.)	Doku NO Düzeyi (µM/mg prot.)	Doku Putresin Düzeyi (µM/mg prot.)	Doku Spermidin Düzeyi (µM/mg prot.)	Doku Spermin Düzeyi (µM/mg prot.)
Grup 3						
1	25.12	0.027	601.77	18.94	114.88	103.89
2	24.61	0.0222	772.4	41.27	237.43	167.93
3	22.23	0.0193	171.64	32.07	192.32	140.3
4	18.25	0.016	286.35	20.66	132.5	103.68
5	23.04	0.0222	227.37	27.59	168.86	120.4
6	15.93	0.0155	255.96	19.03	101.45	81.55
7	43.99	0.0334	201.9	41.99	122.6	124.53
8	28.52	0.0139	221.67	34.49	169.8	120.55
9	15.47	0.0197	147.05	41.34	244.01	170.62
10	29.38	0.0174	320.62	40.28	164.21	226.39
Grup 4						
1	35.18	0.0238	254.35	18.66	142.43	94.83
2	58.83	0.0188	175.55	24.96	179.42	131.13
3	25.45	0.0231	132.88	37.76	222.14	145.77
4	15.36	0.022	174.63	18.84	119.92	108.36
5	17.52	0.022	162.05	30.65	197.58	131.3
6	21.09	0.02	378.84	19.49	132.77	108.7
7	34.60	0.0175	238.43	35.94	289.45	206.6
8	57.03	0.0224	418.68	27.71	193.88	159.27
9	57.70	0.02	361.83	10.92	184.29	59.83
Grup 5						
1	23.71	0.0163	276.73	38.87	265.51	75.85
2	49.97	0.0241	419.11	29.68	259.29	150.37
3	62.39	0.0213	241.22	45.29	252.38	157.68
4	31.09	0.0244	241.22	60.91	342.98	221.24
5	39.81	0.0337	210.88	48.44	338.94	276.68
6	41.59	0.0284	267	27.73	297.31	225.25
7	29.73	0.0284	209.57	21.23	197.86	146.36
8	33.49	0.028	152.35	55.46	293.99	211.06
9	47.03	0.0216	114.16	35.87	211.56	130.22
10	39.35	0.0273	281.61	26.15	191.2	152.17



a: Sağlıklı kontrol grubu ile, b: Tümör kontrol grubu ile,

** : $p < 0.001$

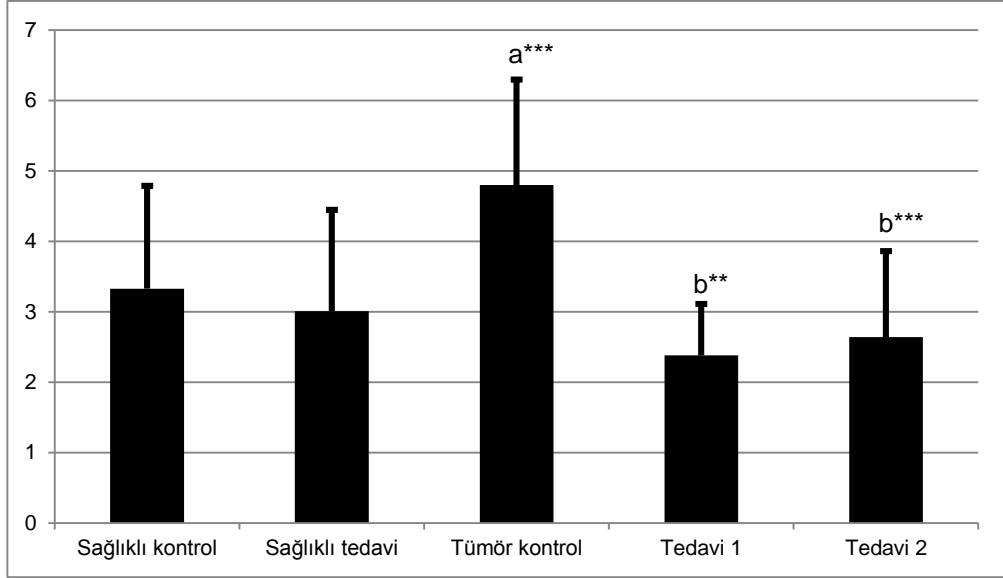
Şekil 20. Serum arginaz enzim aktiviteleri (U/L)



a: Sağlıklı kontrol grubu ile, b: Tümör kontrol grubu ile,

** : $p < 0.05$

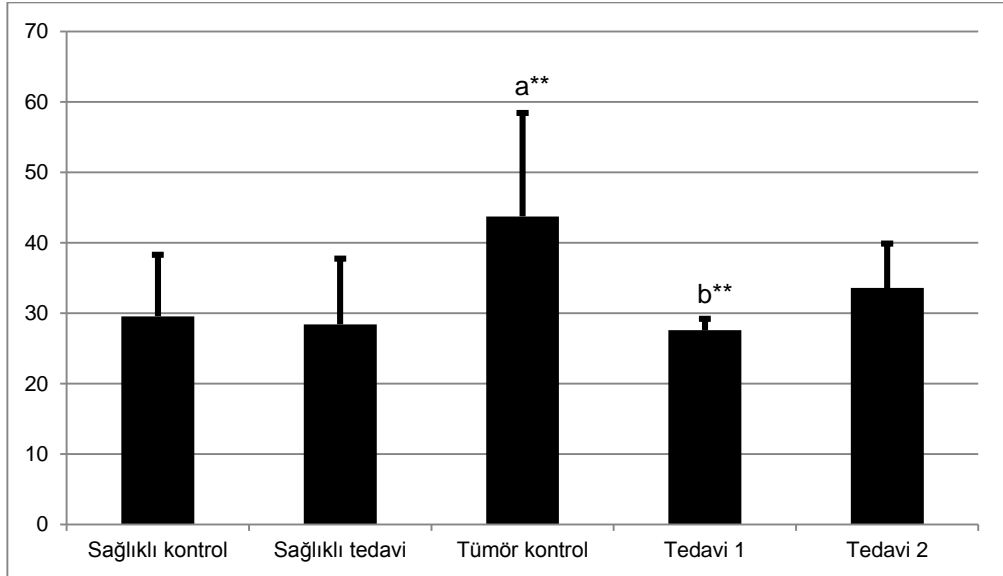
Şekil 21. Serum putresin düzeyleri (µM/ml)



a: Sağlıklı kontrol grubu ile, b: tümör kontrol grubu ile,

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

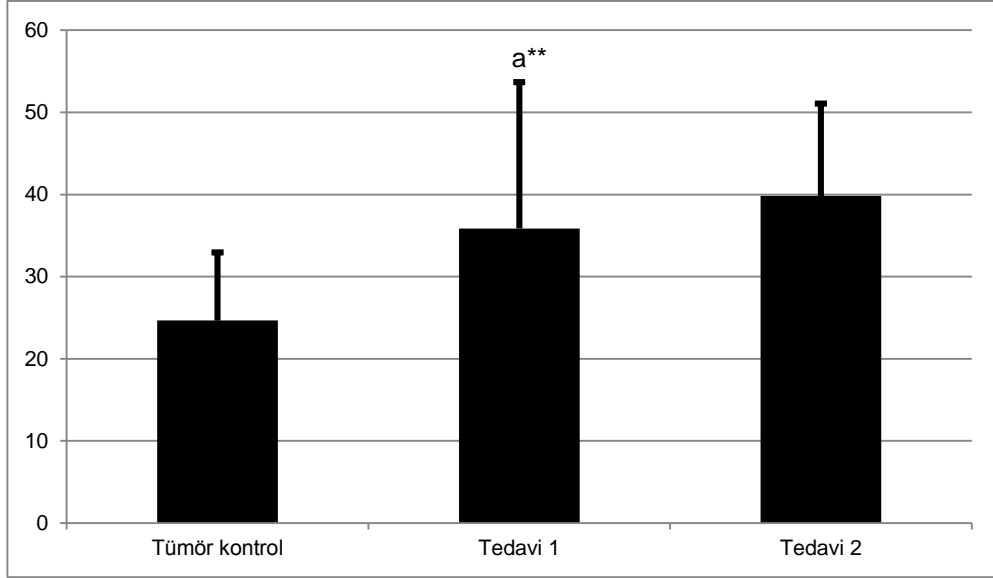
Şekil 22. Serum spermidin düzeyleri (µM/ml)



a: Sağlıklı kontrol grubu ile, b: tümör kontrol grubu ile,

** : $p < 0.05$

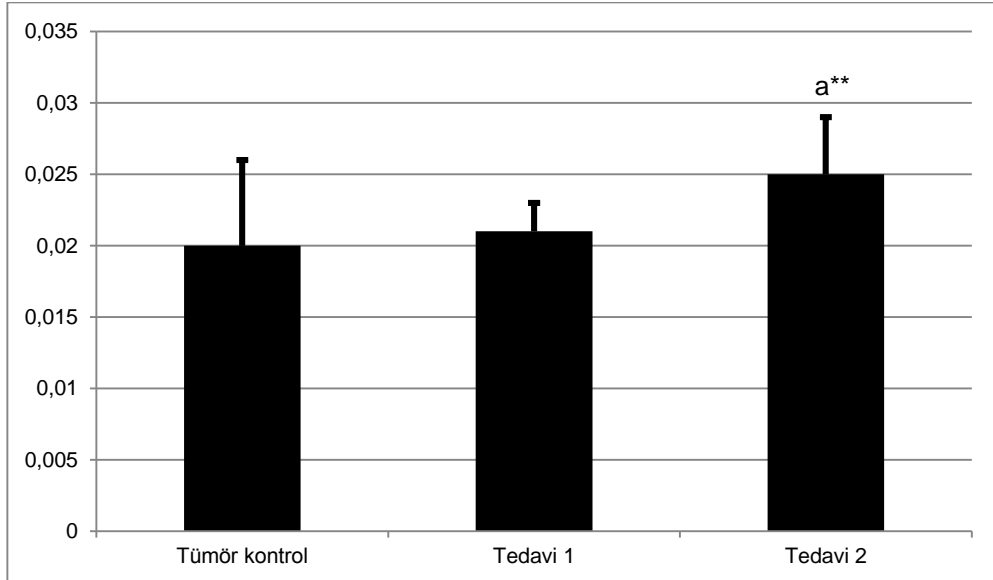
Şekil 23. Serum spermin düzeyleri (µM/ml)



a: tümör kontrol grubu ile,

** $p < 0.005$, tümör kontrol grubuna göre karşılaştırma

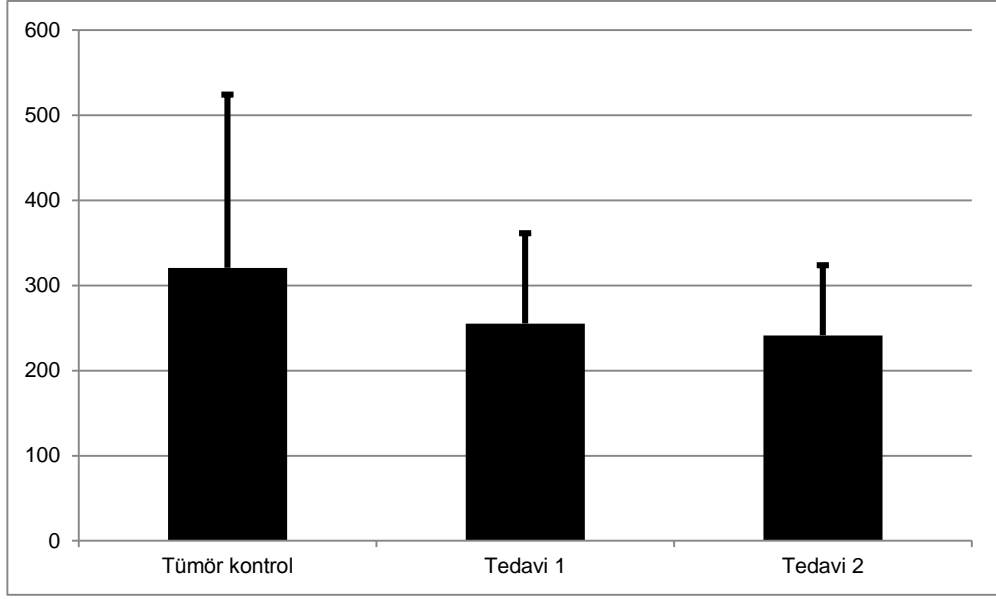
Şekil 24. Doku arginaz enzim aktivitesi (U/mg protein)



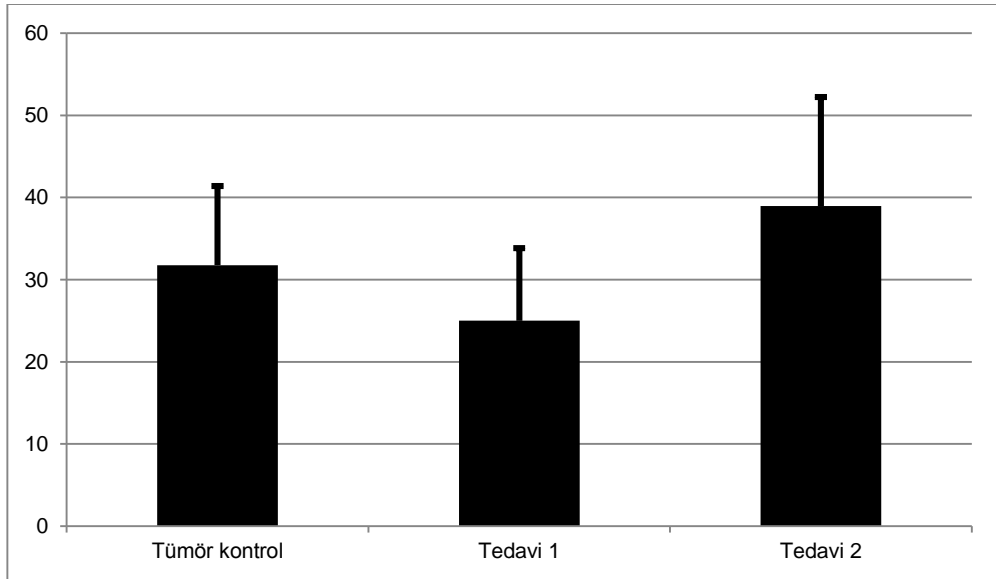
a: tümör kontrol grubu ile,

** $p < 0.005$

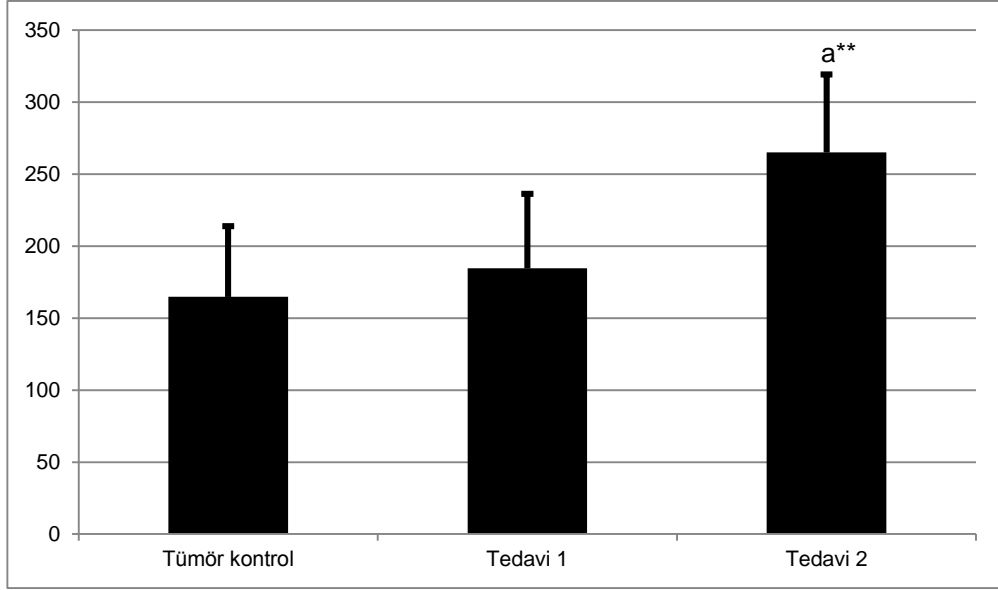
Şekil 25. Doku ornitin düzeyleri (µM/mg protein)



Şekil 26. Doku nitrik oksit düzeyleri (µM/mg protein)



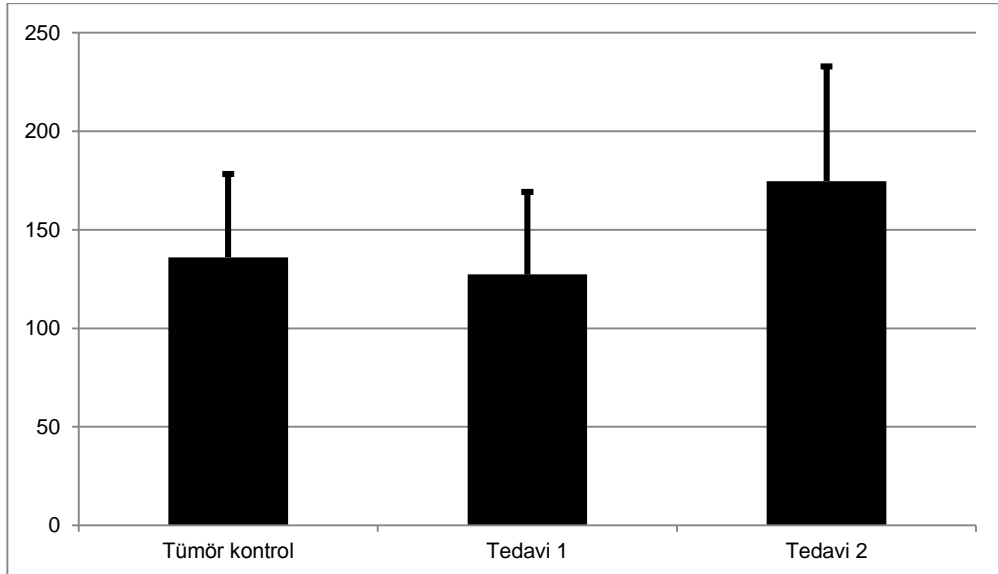
Şekil 27. Doku putresin düzeyleri (µM/mg protein)



a: tümör kontrol grubu ile,

** : $p < 0.001$

Şekil 28. Doku spermidin düzeyleri (µM/mg protein)



Şekil 29. Doku spermin düzeyleri (µM/mg protein)

TARTIŞMA

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, invazif nitelik kazanması ve metastaz yapması ile kendini gösteren ve halen gelişmiş ülkelerin ölüm istatistiklerinde kalp ve damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alan öldürücü bir hastalıktır (18,19).

Meme kanseri kadınlarda kanserin en sık görülen tipidir (12). Memeyi oluşturan süt bezleri ve üretilen sütü taşıyan kanalları döşeyen hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmaları sonucunda meme kanseri gelişir (28). Tümörün tedaviye verdiği yanıtın değerlendirilmesi ve metastazların erken dönemde önlenmesi için bazı tümör belirteçleri kullanılır.

Arginaz üre siklusunun temel enzimlerinden biridir. Arginazın en çok bulunduğu yerler memeli karaciğer hücreleri ve her ne kadar üre siklusuna sahip olmasada meme bezleridir. Plazma arginaz ve NO seviyeleri birçok kanserde olduğu gibi meme kanserlerinde de patolojik bir tanımlayıcı (marker) olarak belirlenmiştir (150,151). Meme kanserli hastalarda yapılan çalışmalarda serum arginaz enzim aktivitesi, sağlıklı kadınların serum arginaz aktivitesinden yüksek bulunmuştur (4,152). Leu ve ark. kolorektal kanserli hastalarda serum arginaz aktivite düzeyini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda kolorektal kanserli dokuların normal mukozal dokulara göre 2 kat fazla arginaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Wu ve ark. gastrik kanserli hastalarda plazma arginaz aktivitesini kontrollere oranla yüksek saptamışlardır (153). Yaptığımız çalışmada Erhlich asit tümör implantlı hayvanların

serumlarındaki artmış arginaz ölçümleri bu çalışmaları desteklemektedir. Sağlıklı hayvanların serum arginaz değerleri ile karşılaştırıldığında meme kanseri taşıyan hayvanların serumundaki arginaz miktarı %60 daha fazladır ($p < 0.001$).

Arginaz enzimiyle ortak substratı kullanan NOS, L-arginini NO ve sitrülline parçalayan enzimdir (40). Kanserde arttığı bilinen arginaz enzimi ve NOS, arginini kullanmak için birbirleriyle yarışmaktadırlar (154). Arginaz enziminin L-arginin için Km değeri 2-20 mM iken, bu değer NOS için ise 1-20 μ M'dür (155). Fakat arginaz enziminin fizyolojik pH'da Vmax değeri, NOS enziminden 1000 kat daha fazla olduğundan bu iki enzimin, L-argininin düşük konsantrasyonlarında bile, onu rahatlıkla kullanabileceğini ortaya koymaktadır (5).

NO'nun, kanser gelişiminde koruyucu rol oynadığı, kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ve antiproliferatif özellik gösterdiği belirtilmektedir (115,116). Diğer yandan NO ve NO metabolitlerinin tümörlü dokularda hücre büyümesi ve metastazı inhibe ettiği, NO'nun yüksek konsantrasyonlarında tümör gelişiminin inhibe edebileceği ve tümör hücrelerinin bu yolla apoptozunun indüklenebileceği belirtilmiştir (156-158). Aynı zamanda, NO'nun kimyasal duyarlılığı ve immün duyarlılığı olan bir ajan olarak kullanılabilmesini, kanser tedavisinde immünoterapi veya kemoterapide sinerjik etki göstererek etkin olabileceğini belirten çalışmalar bulunmaktadır (103,115,116). Luteolinin NF- κ B'yi inhibe ederek NO sekresyonunu arttırdığını destekleyen çalışmalar mevcuttur (139,159). Deneylerimizde yaptığımız ölçümler Erlich asit meme tümör modelinde luteolin tedavisinin tümör doku NO düzeyleri üzerinde etkisiz olduğunu göstermiştir.

Arginazın hücre proliferasyonuna yönelik etkilerinin araçlarından biri de arginaz aktivasyonu ile oluşan ornitinin öncüsü olduğu putresin, spermidin ve spermin gibi poliaminlerdir. Arginazca oluşturulan ornitin ya poliamin sentezinde ya da prolin üzerinden kollajen sentezinde kullanılır. Serumda yapılan poliamin ölçümlerimiz artan bu arginazın aktivitesinin kanser dokusunun poliamin sentezi yapması için kullandığına işaret etmektedir. Tümörlü hayvanların serumunda ölçülen poliaminlerin total düzeyi sağlıklı hayvanların ölçümleri ile karşılaştırıldığında %53 oranında fazla olduğu belirlenmiştir (ölçülen her bir poliamin için $p < 0.05$).

Kanser hastalarının kan ve idrar analizlerinde poliamin derişiminin artması, kanserli dokularda poliamin sentezinden sorumlu enzimlerin aktivitesiyle poliamin sentezinin arttığının göstergesidir. Kanser hücreleri tarafından sentezlenen poliaminler, kan dolaşımına ve böbreklere geçerler ve idrar yoluyla atılırlar (160). Bu nedenle kan ve idrarda bulunan poliamin metabolitlerinin, kanser için erken tanı yöntemi olarak kullanılabilceğı ileri sürülmüştür (161). Poliaminler hücre büyümesi için gerekli olduğundan poliamin sentezindeki artış tümör proliferasyonun bir yansıması olabilmektedir. Bu nedenle, poliamin sentezinin baskılanması kanser hücre büyümesini geciktirebilir. Hayvanlar üzerinde yapılan denemelerde, ODC inhibitörü olan DL- α -difluoro-metilornitin (DMFO) kullanılan farelerde tümör büyümesini baskıladığı ve yaşam süresini uzattığı tespit edilmiştir (162). Jeong ve ark. meme kanseri çalışmasında serum poliamin düzeylerinin kanserli hastalarda sağlıklılarla kıyaslandığında yüksek olduğunu saptamışlardır (163). Bu bilgiler doğrultusunda, poliamin sentezinin inhibe edilmesi, poliamin kaynağının azaltılması veya yok edilmesi ve poliamin taşıyıcıları yoluyla poliamin alımının inhibe edilmesi kanser tedavisinde ümit verici sonuçlar ortaya çıkarmıştır (164,165).

İmmün hücrelerde artan poliamin alınımlı anti-tümör aktivasyonlar için gerekli olan sitokin üretiminde azalmaya ve CD11 ve CD56 gibi anti-tümör immünitesinde rol oynayan adhezyon moleküllerinin ifadelerinde azalmaya neden olur. Artmış bir poliamin düzeyine sahip bir çevrede bulunan immün hücreler lenfokin aktivasyonlu öldürme aktivitesi gibi anti-tümör immün fonksiyonlarını kaybederler. Yakın süreçte yapılan incelemelerin sonuçları artmış poliaminli ortamın immün hücrelerin anti-tümör fonksiyonlarını baskılayarak kanser hücrelerinin yeni dokuları istila ederek metastaz oluşturmalarını indüklediğini göstermiştir (166). Bu da bizim deneylerimizde de gözlemlendiğı gibi artan arginaz aktivasyonunun yönlendirdiğı poliamin sentezindeki artışın bir ifadesi olarak yükselmiş olan plazma poliamin düzeylerinin immün baskılama yolu ile tümör dokusunun immün sistemin hedefinden çıkarak daha rahat çoğalma konusunda pozitif konak ortamı hazırladığını göstermektedir.

Kullandığımız Balb/c farelerdeki Erlich'in asit meme tümör modeli agresif, kısa çoğalma süresine sahip ve hızlı metastatik yeteneğı ile bilinmektedir. Yaptığımız ölçümler bu agresif doğanın nasıl gelişebilmiş olabileceğini ortaya koymuştur. İleride eklenecek immün sisteme ait verilerinde katılması bu *in vivo* tümör modelinin daha iyi

değerlendirilmesini sağlayacaktır. Yapılan literatür incelenmesinde luteolin ve poliaminlerle ilgili bir çalışma bulunmamaktadır, fakat luteolinin *Leishmania* kültürlerinde arginaz enzim aktivitesinin inhibisyon fonksiyonunu gösterdiği Manjolin ve ark. ca 2013 yılında yayınlanmıştır (167).

Erhlich asit meme tümörü taşıyan farelerin luteolin uygulaması ile tedavi edilmesi azalmış serum arginaz ve poliamin düzeyleri ile sonuçlanmıştır. Luteolin tedavisi serum arginaz düzeylerinde %20'lik bir baskılama meydana getirmiştir. Serum arginaz düzeylerindeki azalmanın bir ifadesi olarak ölçtüğümüz serum poliamin düzeyleri de anlamlı bir düşüş göstererek arginazın inhibisyonu ile sentetik yolunda baskılandığına işaret etmiştir. Özellikle spermidin [(sağlıklı grup 3.33 ± 1.46 ; tümör taşıyan grup 4.80 ± 1.50 ; luteolin-tedavili grup 2.52 ± 1.00); (tedavi grubu ile tümör taşıyan grup $p=0.000$)] ve spermin [(sağlıklı grup $29,56 \pm 8.72$; tümör taşıyan grup 43.74 ± 14.71 ; luteolin-tedavili grup 30.74 ± 5.5); (tedavi grubu ile tümör taşıyan grup $p=0.008$)] düzeyleri sağlıklı hayvanların serumlarındaki ölçülen seviyelere düşmüştür.

Caco-2 insan epiteliyal kolorektal karsinoma hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar, luteolinin epiteliyal kolesterol transportörleri üzerinde baskılayıcı etkiye sahip olduğunu göstermiştir (168). CHO over hücreleri üzerinde yapılan incelemeler ise luteolinin monoamin transportörlerini aktive ettiğini ortaya koymuştur (169). Monokarboksilat transportörleri veya MCT'ler laktat ve pirüvat gibi tek karboksil taşıyan gurupların biyolojik membranlardan taşınımını sağlayan plazma membran transportörlerindendirler. Özellikle hipoksik koşullara sahip olan malign tümörlerdeki artmış glikoliz gösteren hücrelerin biriken laktattan kurtulması için önemlidirler (170). Luteolini de içeren bazı flavanoidlerin hem *in vitro* hem de *in vivo* MCT fonksiyonunu inhibe ettikleri belirtilmiştir (171). Kullanılan ilaç direnci kanser tedavisi gören hastalarda en önemli klinik problemlerden biridir. Genellikle MDR olarak kısaltılan birçok ilaca direnç, ABC transportörlerinin artmış ifadeleri ile ilişkilidir. Bu tür transportör proteinler hücre membranında konsantrasyon gradiyentinin ters yönünde aktif olarak ilaçların, ilaç metabolitlerinin ve ksenobiotiklerin hücre dışına pompalanmasından sorumludurlar Meme kanseri direnç proteini olarak bilinen BCRP (breast cancer resistance protein) bu transportör ailesinin üyelerindendir ve luteolin doğal bir BCRP inhibitörüdür (172).

Hücrede sentezlenen poliaminlerin dışarıya çıkışı ve hücreye dışarıdan girişi plazma membranındaki poliamin transportörleri ile sağlanmaktadır. Şu ana kadar poliamin transportörleri üzerinde luteolinin fonksiyonunu araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmamızda biz de poliamin transportörlerini incelememiş olsakta, deneylerimiz Erhlich asit meme tümör hücrelerinde luteolinin poliamin transportörlerini bloklama ihtimalini desteklemiştir. Çünkü tedavi olan gruplarda tümör doku poliaminleri artmış fakat serum poliamin düzeyleri ise azalmıştır. Bu da poliamin hücre dışına çıkışının bloklanması ile açıklanabilir.

Luteolinin poliamin sentezini engellemesini belirten bir veri elde edilmemiştir. Muhtemelen bu da kullanılan meme kanser modelinde luteolinin sahip olduğu östrojen agonistik aktivitesinden kaynaklanabilir (173). Yapılan birçok çalışma hedef dokularda östrojen ve poliamin düzeyleri arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu göstermiştir (174). Linsalata ve ark. da kanser hücrelerinde poliamin düzeyleri ve östrojen reseptörleri arasında ilişki bulmuşlardır (175). Erhlich'in asit meme tümörleri östrojen reseptör pozitif meme karsinoma hücrelerinden oluşur (176). Deneylerimizde kullandığımız dişi Balb/c farelerinin tümör dokularında gözlemlediğimiz artmış poliamin sentetik yol ve poliamin düzeyleri, östrojen yolağına bağımlı olarak tümör dokusunda artmış olan poliamin sentezini işaret etmektedir.

Çalışmamızda literatür bilgisi ile doğru orantılı olarak, tümör grubunda poliamin seviyeleri sağlıklı gruba kıyasla anlamlı bir şekilde yükselmiş, luteolin tedavisi ile artan poliamin düzeylerinin anlamlı bir şekilde azaldığı saptanmıştır ($p < 0.05$). Kanser gruplarında arginaz enzim aktivitesinin artmasıyla arginin, ornitine ve sonrasında poliaminlere metabolize olur. Deneylerimiz sırasında hedeflerimiz içinde olmadığı için takip etmediğimiz tümör hacimlerindeki değişikliklerin kontrole göre tedavi edilen gruplarda daha az büyümesi, kullanılan Erhlich'in asit tümör modelinde luteolinin diğer birçok kanser modelinde de gözlemlendiği üzere poliamin yolağı dışında hücrenin yaşamda kalım ve apoptik yolak üyeleri üzerinden etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

Flavonoidler birçok bitki tarafından üretilen difenilpropan yapısı içeren maddelerdir. Flavonoidlerin birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisinde etkili olduğunu gösteren prelinik ve klinik çalışmalar mevcuttur. Antioksidan özellikleri B–halkalı katekol grubu ve C4'ün okso grubuyla etkileşen C2 ve C3 çift bağ içeriklerindeki yapılardan kaynaklanmaktadır. Bunlardan birincisi serbest radikallere

hidrojen/elektron donörü olarak, ikincisi ise metal iyonlara yani geçiş metallerine bir bağlanma noktası olarak işlev görür. Flavonoidlerin antioksidan etkilerinin araştırıldığı Martino ve ark. yaptığı çalışmada antioksidan aktiviteleri rutin, morin, catechol, quercetin ve luteolin sıralamasıyla paralel olarak artmaktadır (121).

Kanserler, genellikle hücre bölünmesinin kontrolsüz olduğu durumlarda ortaya çıkar. Diğer flavonoidlerde olduğu gibi luteolin de, hemen hemen tüm kanser tiplerinde hücre çoğalmasını inhibe etme yeteneğindedir (127-129). Flavonoidlerin bu işlevlerini ya G1/S ya da G2/S kontrol noktasında hücre bölünmesini durdurarak yerine getirdikleri bulunmuştur (130,131). Bu durdurulma, CDK inhibitörleri p27/kip1 ve p21/waf1'nin up-regülasyonu ya da CDK2 aktivitesinde direk inhibisyon ile gerçekleştirilir. Luteolin mide, prostat ve melanom hücrelerde G1 fazında iken hücre bölünmesini durdurma yeteneğindedir. Luteolinin bu etkisi p53 aracılı p21/waf1'in ekspresyonuyla olur (132-134). Bu bilgiler ışığında değerlendirildiğinde luteolin; antioksidan, pro-oksidan, antiinflamatuvar, antikanserojen, antianjiyogenez ve antimetastatik aktivitelere sahip bir flavonoidtir.

Sonuç olarak, hayvanlardan tedavi süresi sonunda alınan tümör dokularında yaptığımız ölçümlerde de serum ölçümlerimizde de gözlemlediğimiz paterni beklerken deney sonuçlarımız sürpriz bir tartışmayı ortaya koymuştur. Tedavi edilen ve edilmeyen tümürlü hayvanların tümör dokularında ölçülen NO değerlerinde bir farklılık yoktur. Bu luteolinin tümör dokusu düzeyinde NO sentetik yolağı üzerinde etkisiz olduğunu göstermekle hücrel argininin ikinci yolak olan arginaz üzerinden poliamin sentezine yönlenebileceğini, dolayısı ile bu yolağın daha aktif hale geçeceğine işaret etmiştir. Takibinde yaptığımız tümör doku arginaz ve poliamin düzeylerinin ölçümü bu tahminimizi doğrulamıştır. Tümör dokusunun hem arginaz içeriği hem de total poliamin düzeyleri luteolin tedavisi alan hayvanlarda daha yüksek bulunmuştur. Luteolin tedavisi sonucunda tümör doku arginaz miktarı %53 artmıştır (p=0.012). Aynı şekilde ölçülen her bir poliamin düzeylerinde de artış görülmekle beraber özellikle poliamin yolağının merkez üyesi spermidin düzeyleri luteolin ile tedavi edilen hayvanların tümörlerinde %38 arttığı saptanmıştır (p=0.009). Her ne kadar ilk bakışta serum ve doku ölçümleri arasında uyumsuzluk var gibi gözükmekte ise de yaptığımız incelemeler luteolinin plazma membran transportörleri üzerinde de fonksiyonel olabileceğini ve bu konunun gözlemlerimizin temelini oluşturabileceğini

ortaya koymaktadır. Kanser tedavisinde umut verici bir ajan olan luteolinin bu alandaki etkileri daha ileri araştırmalar ve yeni parametreler ile desteklenmelidir.

SONUÇLAR

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvar'ında gerçekleştirilmiştir. Luteolin'in deneysel olarak meme kanseri geliştirilmiş farelerde arginaz enzim aktivitesi, nitrik oksit, ornitin ve poliamin düzeyleri üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanan bu çalışma sonucunda;

1) Serum arginaz aktivitesi meme kanserinde anlamlı bir şekilde yükselirken, luteolin tedavisi ile anlamlı olarak azaldığı saptandı.

2) Serum putresin düzeylerinin tümör grubunda anlamlı olarak yükseldiği, düşük doz luteolin tedavisi ile anlamlı olarak düştüğü saptandı.

3) Serum spermidin düzeylerinin tümör grubunda anlamlı bir şekilde yükseldiği, tedavi gruplarında ise anlamlı olarak azaldığı saptandı.

4) Serum spermin düzeylerinin tümör grubunda anlamlı olarak yükseldiği, luteolin tedavisi ile anlamlı olarak düştüğü saptandı.

5) Tümör doku arginaz enzim aktivitesinin tedavi grubunda anlamlı bir şekilde yükseldiği saptandı.

6) Luteolin tedavisi sonucunda artan arginaz enzim aktivitesi doğrultusunda, ornitin düzeylerinde de bir artış gözlemlendi.

7) Doku NO düzeyleri tümör ve tedavi gruplarında farklılık göstermediği saptandı.

8) Doku putresin düzeylerinin tümör grubuna kıyasla tedavi gruplarında anlamlı düzeyde fark göstermediği saptandı.

9) Tümör grubunda doku spermin düzeylerinin, tedavi ile yükseldiği gözlemlendi.

10) Tümör grubunda doku spermidin düzeylerinin, tedavi grubunda anlamlı düzeyde yükseldiği gözlemlendi.

11) Serum ve doku örneklerinde arginaz ve poliamin düzeylerinin çalışmamızda ölçtüğümüz değerlerinin birbirlerine uyumsuz değişimi, luteolinin Erlich asit meme tümör modelinde plazma membran poliamin taşıyıcıları üzerine bloke edici etki gösterdiğini vurgulamıştır.

ÖZET

Bu çalışmanın amacı *in vivo* Ehrlich asit meme tümör modelinde, serum ve doku örneklerinde luteolinin arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve poliamin (putresin, spermidin, spermin) düzeyleri üzerine etkilerini incelemektir. Dişi balb/c fareler, sağlıklı kontrol, sağlıklı tedavi, tümör kontrol, tümör tedavi 1 ve tümör tedavi 2 olmak üzere gruplara ayrıldı. Farelerin sol bacak iç bölgesine subkutan olarak 0.2 mL Ehrlich asit tümör hücresi enjekte edildi. Luteolin 5 mg/kg/gün ve 10 mg/kg/gün dozlarında 12 gün boyunca sağlıklı tedavi, tümör tedavi 1 ve tümör tedavi 2 gruplarına intraperitoneal olarak verildi.

Luteolin hidrosile flavinoid yapısında, güçlü antioksidan, antiinflamatuvar, antikanserojen aktivitelere sahip bir flavonoiddir. Luteolin, çeşitli kanser hücrelerinin hücre sağ kalım yollarını baskılayarak ve apoptoz yollarını uyararak, tümör hücrelerinin ölümüne neden olmakla birlikte sitotoksik tedaviye duyarlı hale gelmelerini de sağlamaktadır. Daha önce yapılan birçok çalışmayı destekleyerek, sağlıklı hayvanlara tümör implantasyonumuz istatistiksel olarak artmış serum arginaz ve poliamin düzeyleri ile sonuçlanarak, bu artmış üretimin sorumlusunun tümör hücreleri olduğunu gösterdi. ($p<0.05$). Luteolin tedavisi ise serumdaki arginaz ve poliamin yükselişini ortadan kaldırdı ($p<0.05$).

Tümör implantlı hayvanların serumlarındaki yükselen arginaz ve poliamin düzeyleri luteolin tedavisi ile azalırken, dokulardaki ölçümlerimiz bu parametrelerin

tedavi ile arttığını göstermiştir. Sonuçlarımız dokuda artan bu arginaz ve poliamin düzeylerinin luteolinin kullanılan tümör modeli üzerindeki agonist östrojenik etkisinden olabileceğini ve tümörlü dokuda artarken serumda azalan parametrelerde tümörlü dokudan poliamin effluksunun luteolinin plazma membran poliamin transportörleri üzerinde oluşturduğu baskılayıcı etkiden meydana gelebileceğini vurgulamıştır.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, arginaz, ornitin, poliamin, luteolin.

INVESTIGATION OF THE POSSIBLE ROLE OF LUTEOLIN IN BREAST CANCER

SUMMARY

The aim of this study is to investigate the effects of luteolin treatment on enzymatic activity of arginase, ornithine and polyamine levels (putrescine, spermidine spermine) in serum and cancer tissues in *in vivo* Ehrlich ascites breast cancer model. Balb/c female mice were divided randomly into following groups: healthy control, healthy treatment, cancer control, treatment 1 and treatment 2. 0.2 mL Ehrlich ascites tumor cells was inoculated subcutaneously to medial part of left hind leg. Healthy treatment and treatment 1 groups, and the treatment group 2 were given 5 mg/kg and 10 mg/kg dose of luteolin, intraperitoneally, for a 12 days period, respectively.

Luteolin has a hydroxylated flavonoid structure and shows potent antioxidant, anti-inflammatory, and anticarcinogenic properties. Luteolin not only leads to cell death in various tumors by suppressing cell survival pathways and stimulating apoptotic pathways, but also sensitize them to cytotoxic therapy. Supporting various previous studies, tumor implantation to healthy mice resulted in statistically significant elevation of serum arginase and polyamine levels ($p < 0.05$) indicating the tumor cells as the main source of this production. Furthermore, luteolin treatment abolished this increase in serum arginase and polyamine levels ($p < 0.05$).

Tissue measurements of arginase and polyamine levels indicated that luteolin treatment resulted with an increase in these parameters of tumor tissue while the serum levels of them showed a significant decrease. Our results revealed that increased tissue arginase and polyamine levels might be related with estrogenic agonistic effect of luteolin on utilized tumor model in this experiment; and decreased serum levels of these parameters while there is a significant increase of them in tissue levels might be a result of a suppression of polyamine efflux from the tumor tissue by inhibitory effect of luteolin on plasma membrane polyamine transporters.

Key words: Breast cancer, arginase, ornithine, polyamine, luteolin.

KAYNAKLAR

1. Erbaş H, Erten O, Dağlar A, İrfanoğlu ME. Meme kist sıvısı arginaz aktivitesi, ornitin ve üre düzeyleri. *Türk Biyokimya Derg* 2006;31(3):129-34.
2. Jemal A, Ward E, Thun MJ. Recent trends in breast cancer incidence rates by age and tumor characteristics among U.S. women. *Breast Cancer Res.* 2007;9(3):R28.
3. Stratus B, Cepelak I, Festa G. Arginase, a new marker of mammary carcinoma. *Clin Chim Acta* 1992;210(1-2):5-12.
4. Porembska Z, Luboinski G, Chrazanowska A, Mielczarek M, Magnuska J, Baranczyk-Kuzma A. Arginase in patients with breast cancer. *Clin Chim Acta* 2003;328(1-2):105-11.
5. Singh R, Pervin S, Karimi A, Cederbaum S, Chaudhuri G. Arginase activity in human breast cancer celllines: N(omega)-hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells. *Cancer Res.* 2000;60(12):3305-12.
6. Schipper RG, Penning LC, Verhofstad AA. Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors? *Semin Cancer Biol.* 2000;10(1):55-68.
7. Erbas H, Aydogdu N, Usta U, Erten O. Protective role of carnitine in breast cancer via decreasing arginase activity and increasing nitric oxide. *Cell Biology International* 2007;31:1414-1419.
8. Kuyumcu A, Düzgün PA, Özmen MM, Besler TH. Travma ve enfeksiyonlarda nitrik oksit rolü. *Ulus Travma Derg* 2004;10(3):149-59.
9. Mutlu C, Koyutürk M, Karpuz V. Preeklamtik ve normal plasentada Endotelial nitrik oksit sentetaz immün reaktivitesinin incelenmesi. *Cerrahpaşa J Med* 2005;36:109-15.

10. Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 2000;55:481–504.
11. Lin Y, Shi R, Wang X, Shen HM. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2008;8(7):634-46.
12. Sema B, Nedret K, Zuhaf Y, Bilkay B, Osman K. The relationship between HLA-G levels and oxidative stress parameters in patients with breast cancer. *Turk J Med Sci* 2013;43:870-877.
13. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71-96.
14. Robertson JFR, Come SE, Jones SE, et al. Endocrine treatment options for advanced breast cancer - the role of fulvestrant. *Eur J Cancer* 2005;41:346-56.
15. Ferlay P, Autier M, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Bolye P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007;18:581–92.
16. Ahmedin J, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 2007;57:43–66.
17. Uluslararası kanser araştırma ajansı 2013. Erişim tarihi: 20.03.2015
http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx
18. Türker FA, Kayaalp SO, Kanser kemoterapisinin esasları ve anti neoplastik ilaçlar. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, Ankara: Feryal Matbaacılık, 2002;380-415.
19. Gaté L1, Tew KD. Glutathione S-transferases as emerging therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* 2001;5(4):477-489.
20. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol* 2003;21(17):3357-65.
21. Alican F. Genel cerrahi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2007;940-1
22. Değerli Ü. Genel cerrahi. İstanbul: Nobel Kitabevi, 1988;393-1.
23. Daniel B. Breast imaging, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2007;7.
24. Keith L. Clinically oriented anatomy. 3rd ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1992;45-46.
25. Rosen PP. Rosen's breast pathology. 3rd ed. New York: Raven Pres 1992;893-902.
26. Meme anatomisi. Erişim tarihi: 21.05.2015
<http://www.ichmemecerrahisi.com/meme-anatomisi.asp>
27. Snell RS. Clinical anatomy for medical students. Boston: Little Brown and Company, 1992;427
28. Meme Kanseri. <http://www.memekanseri.org/meme-kanseri-nedir/4576607613>
Erişim tarihi: 21.05.2015

29. Aydıner A, Topuz E. Meme kanseri. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2006;8-3.
30. Meme kanseri tipleri. Erişim tarihi: 21.05.2015
<http://www.memekanseri.com.tr/hastalarimizicin/onemli-bilgiler/108-meme-kanserinin-siniflandirilmesi.html>
31. Memenin patolojik olarak sınıflaması. Erişim Tarihi: 21.05.2015
http://e-sitopatoloji.com/asp_sayfalar/index.asp?sayfa=101&KCS=61
32. Göksoy E. Genel cerrahi ders kitabı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, 2010;372-7
33. Jenkinson, CP, Grody, WW, Cederbaum SD. Comparative properties of arginases. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol* 1996;114:107–132.
34. Pegg AE. Polyamine metabolism and function. *Am. J. Physiol* 1982;243:C212–C221.
35. R, Pervin S, Karimi A, Cederbaum S, Chaudhuri G. Arginase activity in human breast cancer cell lines: N^ω-Hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells. *Cancer Research* 2000;60:3305–3312.
36. Spector EB, Rice SCH, Cederbaum SD. Immunologic studies of arginase in tissues of normal human adult and arginase-deficients patients. *Pediatr. Res.* 1983;17:941-944.
37. Moreno-Vivian C, Soler G, Castillo F, Arginine catabolism in the phototrophic bacterium *Rhodobactercapsulatus* E1F1. *Eur. J. Biochem* 1992;204:531-537.
38. Kandemir FM. Koyun dalak doku arginazının bazı kinetik özellikleri (tez). Elazığ: Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2009.
39. Wiesinger H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog Neurobiol* 2001;64:365–391.
40. Wu G, Morris Jr SM. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998;336:1–17.
41. Zhang J, Snyder SH. Nitric oxide in the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:213–233.
42. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (Çeviri: N. Dikmen, T. Özgünen). *Harper biyokimya*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri;2004. s.358-328
43. Rao NM. *Medical biochemistry*. 2nd ed. New Delhi: New age international Publishers; 2006:295-2.
44. Ash, DE. Structure and function of arginases, *JNutr* 2004;134(10):2760-2764.
45. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Herper's illustrated biochemistry*. 26nd ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2003;246.
46. Schimke RT. Adaptive characteristics of urea cycle enzymes in the rat. *Biol Chem* 1962;237:459-68.

47. Cama E, Colleluori DM, Emig, FA, Shin H, Kim SW, Kim NN et al. Human arginase II: crystal structure and physiological role in male and female sexual arousal. *Biochemistry* 2003;42 (28):8445-51.
48. Cama E, Emig FA, Ash DE, Christianson DW. Structural and functional importance of first-shell metal ligands in the binuclear manganese cluster of arginase I. *Biochemistry* 2003;42(25):7748-58.
49. Jing Y, Fleete MS, Collie ND, Zhang H, Liu P. Regional variations and age-related changes in arginine metabolism in the rat brain stem and spinal cord. *Neuroscience* 2013;252:98-108.
50. Bansal V, Ochoa JB, 2003, Arginine availability, arginase, and the immune response. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003;6(2):223-8.
51. Erisir M, Ercel E, Yılmaz S, Ozan S. Evaluation of optimal conditions for arginase activity in streptozotocin induced diabetic rats. *Vet Med Czech* 2005;50(2):69–76.
52. Vercelli D. Arginase: marker, effector, or candidate gene for asthma, *J Clin Invest.* 2003;111(12):1815-7.
53. Poremska Z, Skwarek A, Mielczarek M, Baranczyk-Kuzma A. Serum arginase activity in postsurgical monitoring of patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 2002;94(II):2930-4.
54. Lauharanta J, Kapyaho K. Arginase activity and polyamine biosynthesis in psoriasis. *Acta Derm Venereol* 1983;63(4):277-82.
55. Romero MJ, Platt DH, Tawfik HE, Labazi M, El-Remessy AB, Bartoli M, et al. Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity. *Circ Res.* 2008;102(1):95-102.
56. Wu CW, Chi CW, Lin EC, Lui WY, P'eng FK, Wang SR. Serum arginase level in patients with gastric cancer. *J. Clin. Gastroenterol* 1994;18(1);84-9.
57. Wu CW, Chi CW, Lin EC, Lui WY, P'eng FK, Wang SR. Regulation of arginase production by glucocorticoid in three human gastric cancer cell lines. *Life Sciences* 1989;51;1355-1361.
58. Gökmen SS, Yörük Y, Çakır E, Yorulmaz F, Gülen Ş. Arginase and ornithine, as markers in human non-small cell lung carcinoma. *Cancer Biochemistry Biophysics* 1999;17:125-131.
59. Poremska Z, Zabek J, Grabon W, Rahden-Staron I, Baranczyk-Kuzma A. Arginase isoforms in human colorectal cancer. *Clinica Chimica Acta* 2001;305:157-165.
60. Kocna P, Fric P, Zavoral M, Pelech T. Arginase activity determination a marker of large bowel mucosa proliferation. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1996;34:619-623.
61. Ashamiss F, Wierzbicki Z, Chrzanowska, A, Scibior D, Pacholczyk M, Kosieradzki M, et al. Clinical significance of arginase after liver transplantation. *Ann Transplant* 2004;9(3):58-60.

62. Klasen S, Hammermann R, Fuhrmann M, Lindemann D, Beck KF, Pfeilschifter J, Racké K. Glucocorticoids inhibit lipopolysaccharide-induced up-regulation of arginase in rat alveolar macrophages. *Br J Pharmacol* 2001;132(6):1349-57.
63. Morris SM Jr, Gao T, Cooper TK, Kepka-Lenhart D, Awad AS. Arginase-2 mediates diabetic renal injury. *Diabetes* 2011;60(11):3015-22.
64. Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34(9):906-11.
65. Horowitz S, Binion DG, Nelson VM, Kanaa Y, Javadi P, Lazarova Z, et al. Increased arginase activity and endothelial dysfunction in human inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292(5):1323-36.
66. Sondaç Ü. Orak hücre hastalığında eritrosit arginaz aktivitesi ve karbamilasyonun etkisi (tez). Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı; 1991.
67. Elgün S, Kumbasar H. Increased serum arginase activity in depressed patients. *Prog. Neuro-Physchopharmacol. & Biol. Psychiat.* 2000;24:227-232.
68. Spector EB, Rice SCH, Cederbaum SD. Immunologic studies of arginase in tissues of normal human adult and arginase-deficient patients. *Pediatric Research* 1983;17(12):941-944.
69. Spector EB, Rice SCH, Moedjono S, Bernard B, Cederbaum SD. Biochemical properties of arginase in human adult and fetal tissues. *Biochemical Medicine* 1982;28:165-175.
70. Moinard C, Cynober L, de Bandt JP. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin Nutr* 2005;24(2):184-9.
71. Pegg AE, Casero RA Jr. Polyamines: methods and protocols. New York: Humana Press 2011;4-1.
72. Evans PT, Malmberg RL. Do polyamines have roles in plant development. *Ann. Rev. Plant Physiol* 1989;40:235-269.
73. Crespo-Sempere A, Estiarte N, Marin S, Sanchis V, Ramos AJ. Targeting *Fusarium graminearum* control via polyamine enzyme inhibitors and polyamine analogs. *Food Microbiology* 2015;49:95-103.
74. Tabor CW, Tabor H. Polyamines. *Ann Rev Biochem* 1984;53:749-790.
75. Withrow C, Ashraf S, O'Leary T, Johnson LR, Fitzgerald ME, Johnson DA. Effect of polyamine depletion on cone photoreceptors of the developing rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(9):3081-90.
76. Bansal V, Ochoa JB. Arginine availability, arginase, and the immune response. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003;6(2):223-8.
77. Berkowitz DE, White R, Li D, Minhas KM, Cernetich A, Kim S, et al. Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. *Circulation* 2003;108(16):2000-6.

78. Galston AW. Polyamines as modulators of plant development. *Bioscience* 1983;33:382-388.
79. Chang CI, Liao JC, Kuo L. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *AmJ Physiol* 1998; 274:342-8.
80. Moulinoux JP, Quemener V, Khan NA. Biological significance of circulating polyamines in oncology. *Cell Mol Biol* 1991; 37(8):773-783.
81. Takayama T, Shiozaki H, Shibamoto S, Oka H, Kimura Y, Tamura S, et al. β -Catenin Expression in Human Cancers. *American journal of Pathology* 1996;(1):148.
82. Tabor CW, Tabor H. Methionine adenosyltransferase (S-adenosylmethionine synthase) and S-adenosylmethionine decarboxylase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol. Biol* 1984;56:359-377.
83. Sawhney RK, Tiburcio AF, Altabella T, Galston A. Polyamines in plants: An overview. *Journal of Cell and Molecular Biology* 2003;2:1-12.
84. Diler AS. Erken post iskemik dönemlerde "kan beyin bariyeri" permeabilite değişimleri ve poliaminlerin geçişi (tez). İstanbul: İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 1998.
85. Demir AM, Vural Ö. Poliaminler: fizyolojik önemi ve hastalıklar ile ilişkisi. *Trakya Üniv Tıp Fak Derg* 1995;12(1,2,3):287-294.
86. Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J.* 2003;376:1-14.
87. Konarska L, Tomaszewski L, Rolczyk U. Studies on L-arginase in developing rat small intestine, brain and kidney. I. Ontogenic Evolution of Arginase Isoenzymes, *Biochem. Med. And Met. Biol* 1986;35:156-169.
88. Bachrach U, Wang YC, Tabib A. Polyamines: new cues in cellular signal transduction. *News Physiol Sci.* 2001;16:106-9.
89. Gugliucci A. Polyamines as clinical laboratory tools. *Clin Chim Acta* 2004;344(1-2): 23-35.
90. Leu SY, Wang SR. Clinical significance of arginase in colorectal cancer. *Cancer*, 1992;70(5):733-736.
91. Palavan-Ünsal N. Hızlı büyüme ve kanserde poliaminler. *Doğa-Tr J of Med Sci* 1990;14:1-19.
92. Soda K. The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2011;30:95.
93. Indamar NA, Redkar SL, Mittra I, Damle SR. Clinical significance of serum spermine in breast cancer. *Tumor* 1988;74:171-176.
94. Löser C, Fölsch UR, Papronty C, Creutzfeldt W. Polyamine concentrations in pancreatic tissue, serum, and urine of patients with pancreatic cancer. *Pancreas* 1990;5(2):119-127.

95. Löser C, Fölsch UR, Papronty C, Creutzfeldt W. Polyamines in colorectal cancer. *Cancer* 1990;65:958-966.
96. Horn Y, Beal SL, Walach N, Lubich WP; Spigel L, Marton LJ. Relationship of urinary polyamines to tumor activity and tumor volume in patients. *Cancer Research* 1984;44:4675-4678.
97. Kubota S, Yoshimoto M, Yamasaki Z, Imahori K, Takaku F, Okada M, et al. Urinary polyamines as a tumor marker. *Cancer Detect Prevent* 1985;8:189-192.
98. Umeki S, Umeki Y, Okumoto T, Matsumori T. Urinary polyamines in malignancies. *Medical Laboratory Sciences* 1988;45:250-254.
99. Moncada S, Higgs A. The L-arginine pathway. *N Eng J Med*, 2002;12:329.
100. Lancaster JR. JR in *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. Ignarro LJ (Ed). San Diego: Academic press, 2000:209-24.
101. Xie Q-W, Nathan C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation, *J Leukocyte Biol* 1994;56:576-582.
102. Çekmen MB, Turgut M, Türköz Y, Aygün AD, Gözükara EM. Nitrik Oksit (NO) ve Nitrik Oksit Sentazın (NOS) Fizyolojik Ve Patolojik Özellikleri. *T Klin J Pediatr* 2001;10:226-236.
103. Lancaster JR. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8137-8141.
104. Xia Y, Zweier JL. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:6954-6958.
105. Dawson TM, Dawson VL. Review: Nitric Oxide: Actions and Pathological Roles, *Neuroscientist* 1995;1:17-18.
106. Kelm M, Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res*. 1990;66(6):1561-75.
107. Black MD, Selk DE, Hitchcock JM, Wettstein JG, Sorensen SM. On the effect of neonatal nitric oxide synthase inhibition rats: a potential neurodevelopmental model of schizophrenia. *Neuropharmacology* 1999;38:1299-1306.
108. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994;120:227-37.
109. Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann Neurol* 1992;32:297-311.
110. Stadler J, Billiar TR, Curan RD. Effect of exogenous and endogenous nitric oxide on mitochondrial respiration of rat hepatocyte. *Am J Physiol* 1991;260:C910-6.
111. Dimmeler S, Brune B. Characterization of a nitric oxide catalysed ADP ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 1992;210:305-310.
112. Taylor-Robinson AW, Severn A, Phillips RS. Kinetics of nitric oxide production during infection and required as a cofactor. *J Biol Chem* 1989;264:19654-58.

113. Zhang J, Synder SH. Nitric oxide stimulates auto-ADP-Ribosylation of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci.* 1992;89:9382-9385.
114. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43(2):109-142.
115. Kuşçuoğlu U. Deneysel omurilik yaralanmasında agmatinin doza bağımlı nöroprotektif etkilerinin incelenmesi (tez). İstanbul: T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroşirurji Kliniği;2004.
116. Bonavida B, Khineche S, Huerta-Yepez S, Garbán H. Therapeutic potential of nitric oxide in cancer. *Drug Resist Updat.* 2006;9(3):157-173. Epub 2006 Jul 5.
117. Neuhouser ML. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutr. Cancer* 2004;50:1–7.
118. Mian KH, Mohamed S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *J. Agric. Food Chem* 49:3106–3112.
119. Mencherini T, Picerno P, Scesa C, Aquino R. Triterpene, antioxidant, and antimicrobial compounds from *Melissa officinalis*. *J Nat Prod.* 2007 Dec;70(12):1889-94. Epub 2007;16.
120. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga, G. Structure anti-oxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.* 1996;20,933-56.
121. Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florencio MH, Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Rad. Res.* 2002;36:1199-208.
122. Miguel LN. Distribution and biological activities of luteolin. *Med Chemistry* 2009;9(1);31-59.
123. Hu C, Kitts DD. Luteolin and Luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells. *Mol. Cell Biochem.* 2004;265:107-113.
124. Choi BM, Lim DW, Lee JA, Gao SS, Kwon DY, Kim BR. Luteolin suppresses Cisplatin-induced apoptosis in auditory cells: possible mediation through induction of heme oxygenase-1 expression. *J. Med. Food.* 2008;11:230-6.
125. Peng B, Yan W. Solubility of Luteolin in Ethanol+Water Mixed Solvents at Different Temperatures. *J. Chem. Eng. Data* 2010;55:583-585.
126. Wruck CJ1, Claussen M, Fuhrmann G, Römer L, Schulz A, Pufe T et al. Luteolin protects rat PC12 and C6 cells against MPP+ induced toxicity via an ERK dependent Keap1-Nrf2-ARE pathway. *J Neural Transm Suppl.* 2007;(72):57-67.
127. Ise R, Han D, Takahashi Y, Terasaka S, Inoue A, Tanji M, et al. Expression profiling of the estrogen responsive genes in response to phytoestrogens using a customized DNA microarray. *FEBS Lett* 2005;579:1732–1740.

128. Fotsis T, Pepper MS, Aktas E, Breit S, Rasku S, Adlercreutz H, et al. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res* 1997;57:2916–2921.
129. Knowles LM, Zigrossi DA, Tauber RA, Hightower C, Milner JA. Flavonoids suppress androgen-independent human prostate tumor proliferation. *Nutr. Cancer* 2000;38:116–120.
130. Zi X, Feyes DK, Agarwal R. Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB 468: induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and associated cyclins. *Clin. Cancer Res* 1998;4:1055–1064.
131. Lindenmeyer F, Li H, Menashi S, Soria C, Lu H. Apigenin acts on the tumor cell invasion process and regulates protease production. *Nutr. Cancer* 2001;39:139–147.
132. Matsukawa Y, Marui N, Sakai T, Satomi Y, Yoshida M, Matsumoto K, Nishino H, Aoike A. Genistein arrests cell cycle progression at G2-M. *Cancer Res* 1993;53:1328–1331.
133. Casagrande F, Darbon JM. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem. Pharmacol* 2001;61:1205–1215.
134. Lim do Y, Jeong Y, Tyner AL, Park JH. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in HT-29 human colon cancer cells by the dietary compound luteolin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292:G66–75.
135. Kim JS, Jobin C. The flavonoid luteolin prevents lipopolysaccharide-induced NF- κ B signalling and gene expression by blocking I κ B kinase activity in intestinal epithelial cells and bone-marrow derived dendritic cells. *Immunology*. 2005;115(3):375-87.
136. Hwang JT, Park OJ, Lee YK, Sung MJ, Hur HJ, Kim MS, et al. Anti-tumor effect of luteolin is accompanied by AMP-activated protein kinase and nuclear factor- κ B modulation in HepG2 hepatocarcinoma cells. *Int J Mol Med*. 2011;(1):25-31.
137. Perkins S, Verschoyle RD, Hil IK, Parveen I, Threadgill MD, Sharma RA, et al. Chemopreventive efficacy and pharmacokinetics of curcumin in the min/+ mouse, a model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(6):535-40.
138. Eroglu C, Soyuer I, Soyuer S, Yildiz OG, Orhan O, Gündoğ M, ve ark. Eş zamanlı kemoradyoterapi ile tedavi edilen evre III küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde NF- κ B' nin prognostik önemi. *Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi* 2005;15(3):138-43.
139. Eo SH, Cho H, Kim SJ. Resveratrol Inhibits Nitric Oxide-Induced Apoptosis via the NF-Kappa B Pathway in Rabbit Articular Chondrocytes. *Biomol Ther (Seoul)*. 2013 Sep 30;21(5):364-70.

140. Zhu LH, Bi W, Qi RB, Wang HD, Lu DX. Luteolin inhibits microglial inflammation and improves neuron survival against inflammation. *Int J Neurosci*. 2011;121(6):329-36.
141. Wang GG, Lu XH, Ding M, Tang WT, Li W, Zhao X, et al. Protective effects of luteolin preconditioning on rat liver under ischemia/reperfusion. *Sheng Li Xue Bao*. 2011;63(2):177-83.
142. Lin Y, Shi R, Wang X, Shen HM. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008;8(7):634-46.
143. Gayer JW, Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Analy Biochem* 1986;39:412-7.
144. İnce AT, Övünç O. Cyclooxygenase-2 ve karsinogenez. *Güncel Gastroenteroloji* 2005;9(1):70-7.
145. Chinard FP. Photometric estimation of proline and ornithine. *J Biol Chem* 1952;199:91-5.
146. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
147. Munder M, Eichmann K, Moran JM, Centeno F, Soler G, Modolell M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *The Journal of Immunology* 1999;163:3771-7.
148. Cortas NK, Wakid NW. Determination inorganic nitrate in serum and urine by kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990;36:1440-3.
149. Taibi G, Schiavo MR, Gueli MC, Rindina PC, Muratore R, Nicotra CM. Rapid and simultaneous high-performance liquid chromatography assay of polyamines and monoacetylpolyamines in biological specimens. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2000;745(2):431-7.
150. Geyikli I, Ceylan NO, Camcı C. Arginase activity and nitric oxide levels may be considered as tumor markers in breast cancer. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2012;2(10):031-034.
151. Kaplan I, Aydın Y, Bilen Y, Genç F, Keleş MS, Eroğlu A. The evaluation of plasma arginine, arginase, and nitric oxide levels in patients with esophageal cancer. *Turk J Med Sci* 2012;42(3):403-409.
152. Kingsnorth AN, Wallace HM, Bundred NJ, Dixon JM. Elevation of monoacetylated polyamines in human breast cancer. *Br J Surg* 1984;71(5):352-6.
153. Cheeseman KH. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Molec Aspects Med* 1993;14:191-197.
154. Wu C, Wang S, Chang T, et al: Content of glucocorticoid receptor and arginase in gastric cancer and normal gastric mucosal tissues. *Cancer* 64 (12):2552-56, 1986.
155. Grody WW, Dizikes GJ, Cederbaum SD. Human arginase isozymes. *Isozymes Curr Top Biol Med Res* 1987;13:181-214.

156. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2006;6:521-534.
157. Hofseth LJ, Hussain SP, Wogan GN, Harris CC. Nitric oxide in cancer and chemoprevention. *Free Radic Biol Med* 2003;34:955-968.
158. Cui S, Reichner JS, Mateo RB, Albina JE. Activated murine macrophages induce apoptosis in tumour cells through nitric oxide-dependent or-independent mechanisms. *Cancer Res* 1994;54:2462-2467.
159. Lei M1, Wang JG, Xiao DM, Fan M, Wang DP, Xiong JY, et al. Resveratrol inhibits interleukin 1 β -mediated inducible nitric oxide synthase expression in articular chondrocytes by activating SIRT1 and thereby suppressing nuclear factor- κ B activity. *Eur J Pharmacol*. 2012 Jan 15;674(2-3):73-9.
160. Moulinoux JP, Quemener V, Khan NA, Delcros JG, Havouis R. Spermidine uptake by erythrocytes from normal and Lewis lung carcinoma (3LL) grafted mice: I. In vitro study. *Anticancer Res*. 1989;9:1057-1062.
161. Park MH, Igarashi K. Polyamines and their metabolites as diagnostic markers of human diseases. *Biomol Ther*. 2013;21(1):1-9.
162. Klein S, Miret JJ, Algranati ID, Lustig ES. Effect of alphasdifluoromethylornithine in lung metastases before and after surgery of primary adenocarcinoma tumors in mice. *Biol Cell*. 1985;53:33-36.
163. Byun JA, Lee SH, Jung BH, Choi MH, Moon MH, Chung BC. Analysis of polyamines as carbamoyl derivatives in urine and serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 2008;22(1):73-80.
164. Aziz SM, Gillespie MN, Crooks PA, Tofiq SF, Tsuboi CP, Olson JW, Gosland MP. The potential of a novel polyamine transport inhibitor in cancer chemotherapy. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;278:185-192.
165. Chen Y, Weeks RS, Burns MR, Boorman DW, Klein-Szanto A, O'Brien TG. Combination therapy with 2-difluoromethylornithine and a polyamine transport inhibitor against murine squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2006;118:2344-2349.
166. Soda K. The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;11(30):95.
167. Reis MB, Maquiaveli Cdo C, Santos-Filho OA, da Silva ER. Dietary flavonoids fisetin, luteolin and their derived compounds inhibit arginase, a central enzyme in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Manjolin LC1, Food Chem*. 2013;141(3):2253-62.
168. Nekohashi M, Ogawa M, Ogihara T, Nakazawa K, Kato H, Misaka T, et al. Luteolin and quercetin affect the cholesterol absorption mediated by epithelial cholesterol transporter niemann-pick c1-like 1 in caco-2 cells and rats. *PLoS One*. 2014;9(5).

169. Zhao G1, Qin GW, Wang J, Chu WJ, Guo LH. Functional activation of monoamine transporters by luteolin and apigenin isolated from the fruit of *Perilla frutescens* Neurochem Int. 2010;56(1):168-76.
170. Monokarboksilat transportörleri Erişim tarihi: 10.10.15
https://en.wikipedia.org/wiki/Monocarboxylate_transporter
171. Wang Q, Morris ME. Flavonoids modulate monocarboxylate transporter-1-mediated transport of gamma-hydroxybutyrate in vitro and in vivo. Drug Metab Dispos. 2007;35(2):201-8.
172. Yarla NS, Ganapaty S. Bioactive Flavonoids as ABC Transporters Inhibitors for Reversion of Multidrug Resistance in Cancer. J Marine Sci Res Dev. 2013;4:123
173. Nordeen SK, Bona BJ, Jones DN, Lambert JR, Jackson TA. Endocrine disrupting activities of the flavonoid nutraceuticals luteolin and quercetin. Horm Cancer. 2013;4(5):293-300.
174. Zappia V, Pegg AE. Progress in polyamine research: novel biochemical, pharmacological, and clinical aspects : [proceedings of the International Symposium on Polyamines in Biochemical and Clinical Research, held June 13-17, 1988, in Sorrento, Naples, Italy] New York; London: Plenum Press, c.1988;250
175. Linsalata M, Messa C, Russo F, Cavallini A, Di Leo A. Scand J Estrogen receptors and polyamine levels in human gastric carcinoma. Gastroenterol. 1994;29(1):67-70.
176. Ozcan Arican G, Ozalpan A. Evaluation of the effect of paclitaxel, epirubicin and tamoxifen by cell kinetics parameters in estrogen-receptor-positive ehrlich ascites tumor (eat) cells growing in vitro. Acta Biol Hung. 2007;58(1):49-59.

RESİMLEMELER LİSTESİ

ŞEKİLLER	Sayfa No
Şekil 1. 2012 yılı dünya çapında kanser tiplerinin cinsiyete göre insidans ve ölüm oranları	4
Şekil 2. 2012 yılı Türkiye’de kanser tiplerinin cinsiyete göre insidans ve ölüm oranları	5
Şekil 3. Meme anatomisi.....	6
Şekil 4. Meme kanseri tipleri.....	7
Şekil 5. L-argininden L- ornitin ve üre oluşumu.....	12
Şekil 6. Üre döngüsü	14
Şekil 7. L-argininden poliamin, GABA ve NO sentezi	15
Şekil 8. Poliaminlerin kimyasal yapıları.....	17
Şekil 9. Ornitinden poliaminlerin sentezi	18
Şekil 10. Poliamin biyosentezi ve metabolizması.....	20
Şekil 11. L-argininden nitrik oksitin sentezlenmesi.....	22
Şekil 12. eNOS’un uyarılması ve düz kas hücrelerine etkisi	23
Şekil 13. Makrofaj kaynaklı NO’nun parazit ve tümör hücre üzerine etkisi.....	24
Şekil 14. Luteolinin moleküler yapısı.....	25
Şekil 15. Luteolinin etki mekanizması	27
Şekil 16. Feron reaksiyonu	32
Şekil 17. Üre standart çalışması regresyon grafiği.....	41
Şekil 18. Benzoil kloridin putresine bağlanma reaksiyonu	43
Şekil 19. Poliamin kalibrasyon standartlarını gösteren HPLC kromatogramı	45

Şekil 20. Serum arginaz enzim aktiviteleri	52
Şekil 21. Serum putresin düzeyleri	52
Şekil 22. Serum spermidin düzeyleri.....	53
Şekil 23. Serum spermin düzeyleri	53
Şekil 24. Doku arginaz enzim aktivitesi	54
Şekil 25. Doku ornitin düzeyleri	54
Şekil 26. Doku nitrik oksit düzeyleri	55
Şekil 27. Doku putresin düzeyleri	55
Şekil 28. Doku spermidin düzeyleri	56
Şekil 29. Doku spermin düzeyleri	56

TABLolar

Sayfa No

Tablo 1. 2009 yılında Türkiye’de ölüm nedenlerinin cinsiyete göre dağılımı	5
Tablo 2. Mobil faz gradient tablosu	44
Tablo 3. Waters spherisorb C18 kolonundan standart ve örneklerle ait poliamin çıkış zamanları.....	44
Tablo 4. Serum arginaz enzim aktiviteleri ve poliamin düzeyleri.....	46
Tablo 5. Doku ornitin, NO düzeyleri ve arginaz enzim aktiviteleri	47
Tablo 6. Doku poliamin düzeyleri.....	47
Tablo 7. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar	48
Tablo 8. Doku arginaz enzim aktiviteleri, ornitin ve NO düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması	49
Tablo 9. Doku poliamin düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması	49
Tablo 10. Deneklerin her birinin serum arginaz enzim aktivitesi ve poliamin Düzeyleri	50
Tablo 11. Deneklerin her birinin doku ornitin, NO ve poliamin düzeyleri ve arginaz enzim aktivitesi.....	51

ÖZGEÇMİŞ

3 Nisan 1989 tarihinde İstanbul'da doğdum. İlköğrenimimi İstanbul Topçular İlköğretim Okulu'nda, ortaöğrenimimi İstanbul Eyüp Lisesi'nde, üniversite öğrenimimi 2012 yılında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladım. 2012 yılı Eylül ayında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. 2012-2013 yılları arasında Trakya Üniversitesi Hastanesi Merkez Labaratuvarı'nda öğrenci statüsünde çalıştım.

EKLER

Ek 1. Etik kurul raporu

Ek 2. Orjinallik raporu

Ek 1



T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan DeneYleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

EDİRNE

Oturum Sayısı: 2014/01

Karar Tarihi: 10.01.2014


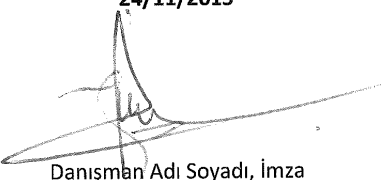
KARAR NO: 2014.01.01

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Hakan ERBAŞ'ın yaptığı, Nihayet KANDEMİR'in Yüksek Lisans tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2014/01 protokol nolu "Luteolin'in Meme Kanserinde Olası İyileştirici Rolünün Araştırılması" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Doç. Dr. Enis ULUÇAM Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Vet. Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Tefvik AKTOZ Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd. Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input checked="" type="checkbox"/> yok	<input checked="" type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Osman GÜLTEKİN Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	

Ek 2

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI
ORJİNALLİK RAPORU

Öğrencinin Adı Soyadı: Nihayet KANDEMİR										
Numarası: 1128304103										
Anabilim Dalı: Tıbbi Biyokimya										
Programı: <input checked="" type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input type="checkbox"/> Doktora										
Tez başlığı/Konusu: Luteolin'in Meme Kanserinde Olası İyileştirici Rolünün Araştırılması										
Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne										
<p>Yukarıda açık adı bulunan tezimin "Kapak Sayfası, Giriş ve Amaç, Genel Bilgiler, Bulgular, Tartışma, Sonuçlar, Özet ve Summary" bölümlerinden oluşan toplam 54 sayfalık kısmına ilişkin 24/11/2015 Tarihinde tez danışmanım tarafından <i>Authenticate</i> adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanmış olan orijinallik raporuna göre tezimin benzerlik oranı % 16 olarak belirlenmiştir.</p> <p><u>Uygulanan filtrelemeler:</u></p> <table><tr><td>1-Kabul ve Onay Sayfası hariç</td><td>6-Kaynaklar hariç</td></tr><tr><td>2-Teşekkür hariç</td><td>7-Şekiller Listesi hariç</td></tr><tr><td>3-İçindekiler hariç</td><td>8-Özgeçmiş hariç</td></tr><tr><td>4-Simge ve Kısaltmalar hariç</td><td>9-Ekler hariç</td></tr><tr><td>5-Gereç ve Yöntemler Hariç</td><td></td></tr></table> <p>Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez çalışması Orijinallik Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen maksimum benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini, aksinin ispat edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğruluğunu beyan ederim. 24/11/2015</p>	1-Kabul ve Onay Sayfası hariç	6-Kaynaklar hariç	2-Teşekkür hariç	7-Şekiller Listesi hariç	3-İçindekiler hariç	8-Özgeçmiş hariç	4-Simge ve Kısaltmalar hariç	9-Ekler hariç	5-Gereç ve Yöntemler Hariç	
1-Kabul ve Onay Sayfası hariç	6-Kaynaklar hariç									
2-Teşekkür hariç	7-Şekiller Listesi hariç									
3-İçindekiler hariç	8-Özgeçmiş hariç									
4-Simge ve Kısaltmalar hariç	9-Ekler hariç									
5-Gereç ve Yöntemler Hariç										
 Öğrencinin Adı Soyadı, İmza Nihayet KANDEMİR										
Ek:Orijinallik Raporu (1 Sayfa)										
UYGUNDUR 24/11/2015  Danışman Adı Soyadı, İmza Doç. Dr. İlker DIBIRDIK										