

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

Tez Yöneticisi  
Doç. Dr. Hakan ERBAŞ

**BİR ARGİNAZ ENZİM İNHİBİTÖRÜ OLAN  
nor-NOHA'NIN MEME KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Gürer KELEŞOĞLU**

EDİRNE-2012

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

Tez Yöneticisi  
Doç. Dr. Hakan ERBAŞ

**BİR ARGİNAZ ENZİM İNHİBİTÖRÜ OLAN  
nor-NOHA'NIN MEME KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Gürer KELEŞOĞLU**

**Tez No :**

EDİRNE-2012

## **TEŐEKKÜR**

Trakya Üniversitesi Tıp Fakóltesi  
Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tez çalıőmamda ve  
eğitimimde katkıları olan sayın hocam Doç. Dr.  
Hakan ERBAŞ'a, yüksek lisans eđitimim  
süresince yetişmemde emeği geçen hocalarım  
Prof. Dr. Erol ÇAKIR, Prof. Dr. Selma SÜER  
GÖKMEN, Doç. Dr. Sevgi ESKİOCAK'a, bu  
Çalıőmamda yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr.  
Nurettin AYDOĐDU'ya ve Biyokimya Anabilim  
Dalı'ndaki tüm çalışma arkadaşlarıma  
teőekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
MEME KANSERİ.....	3
MEME ANATOMİSİ.....	5
ARGİNAZ ENZİMİ.....	8
NİTRİK OKSİT.....	15
Nor-NOHA.....	19
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	21
BULGULAR.....	35
TARTIŞMA.....	43
SONUÇLAR.....	46
ÖZET.....	48
SUMMARY.....	50
KAYNAKLAR.....	52
RESİMLER LİSTESİ.....	60
ÖZGEÇMİŞ.....	62
EKLER.....	63

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>A1</b>	: Hepatik arginaz
<b>A2</b>	: Ekstrahepatik arginaz
<b>ADMA</b>	: Asimetrik dimetil arginin
<b>cGMP</b>	: Siklik guanidin monofosfat
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>eNOS</b>	: Endotelyal nitrik oksit
<b>FAD</b>	: Flavin adenin dinükleotid
<b>FMN</b>	: Flavin mononükleotid
<b>Homo-NOHA</b>	: N <sup>ω</sup> -Hidroksi-homo-L-Arginin
<b>ISPF</b>	: α-Isonitro-sopropiophenone
<b>iNOS</b>	: İndüklenebilir nitrik oksit
<b>L-NAME</b>	: Nitro-L-arginin metilester
<b>L-NMMA</b>	: N-G-monometil arginin
<b>L-NNA</b>	: N-G-nitro-L-arginin
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>NNDA</b>	: N-Naphthylethylene diamine
<b>nNOS</b>	: Nöronal nitrik oksit
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>NOHA</b>	: N <sup>ω</sup> -Hidroksi-L-Arginin
<b>Nor-NOHA</b>	: N <sup>ω</sup> -Hidroksi-nor-L-Arginin
<b>NOS</b>	: Nitrik oksit sentaz
<b>OAT</b>	: Ornitin aminotransferaz

**ODC** : Ornitin dekarboksilaz  
**RNA** : Ribonükleik asit  
**SAM** : S-Adenosylmethionine  
**TCA** : Trikloroasetikasit

## GİRİŞ VE AMAÇ

Arginaz (L-arjinin amidinohidrolaz; E.C.3.5.3.1), memelilerde bulunan L-Argininin üre ve ornitine hidrolizinden sorumlu bir metalloenzimdir. Aktivitesi için  $Mn^{2+}$  (manganez) gereksinimi vardır. Arginazın A1 (Hepatik) ve A2 (Ekstrahepatik) olmak üzere iki izoformu vardır. A1 karaciğerde baskındır ve sitozolik bir enzimdir. Daha çok üre sentezi ile ilgilidir. A2 ise ekstrahepatik dokularda yer alır ve mitokondride bulunur. Glutamat ve poliamin sentezinden sorumludur (1). Tüm memeli hücrelerinde bulunan poliaminler hücre büyümesi için gerekli moleküllerdir. Hücre proliferasyonunun arttığı fizyolojik ve patolojik durumlarda poliamin düzeylerinde arttığı gösterilmiştir. Arginaz ifadesi inflamasyon sırasında ve immün yanıt regülasyonunda meydana gelir (2).

Kanser kabaca hücrelerin kontrolsüz çoğalmasdır. Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser çeşididir (3). Tümörün tedaviye verdiği yanıtın değerlendirilmesi ve metastazların erken dönemde önlenmesi için bazı tümör belirteçleri kullanılır. Kanser türlerinde artan arginaz enzim aktivitesi, arginaz enziminin kanserde bir belirteç olarak kullanılma potansiyelini ortaya koymaktadır. Stratus ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada meme kanserinde preoperatif dönemde serum arginaz aktivitesinin sağlıklı kadınlara oranla 4 kat daha fazla olduğunu bulmuşlardır (4). Kanserli hastalarda yükselen arginaz aktivitesi ile hücre

üremesinde önemli olan poliaminler arasındaki ilişki; kanserojenik gelişimin artan poliamin sentezine bağlı olabileceği yargısını destekler niteliktedir.

Diğer yandan yine kanserle yakından ilişkisi bulunan nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz (NOS) vasıtası ile sentezlenmekte ve bu enzim arginaz enzimi ile aynı substrat yani arginini kullanmaktadır (5). NO, normal fizyolojik koşullarda dengenin sürdürülmesinde önemli bir etkidir (6). Nitrik oksitin önemli fonksiyonları arasında, vasküler tonusun sağlanması, trombosit aktivasyonunun önlenmesi ve endotele lökosit adezyonunun sınırlandırılması vardır (5). İndüklenebilir NOS (iNOS) ile üretilen yüksek konsantrasyonlardaki NO ise hasarı artırır. Bundan dolayı NO akut inflamatuvar olaylarda hem koruyucu hemde hasar verici bir molekül olarak etki gösterebilir (6). Patolojik koşullarda iNOS'a bağlı aşırı NO üretimi; lipid peroksidasyonuna, serbest radikal oluşumuna, DNA hasarına, mitokondrial elektron transport zinciri enzimlerine etki ederek mitokondrial solunumun durmasına ve dolayısıyla hücresel enerji kaybına, DNA replikasyonunu inhibe ederek hücre ölümüne yol açabilir (7). NO'in, kanser gelişiminde koruyucu rol oynadığı, kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ve anti-proliferatif özellik gösterdiği belirtilmektedir (8).

Nor-NOHA (N<sup>w</sup>-Hidroksi-nor-L-Arginin) yüksek affinite gösteren, güçlü ve geri dönüşümlü bir arginaz inhibitörüdür. Enzimin aktif bölgesindeki Mn<sup>2+</sup> dizilerine spesifik olarak bağlanır ve enzimi inhibe eder. Nitrik oksit sentazın substratı veya inhibitörü değildir (9).

Bu çalışmada deneysel olarak oluşturulan meme tümörlerinde arginaz enzim inhibitörü olan nor-NOHA'nın arginaz enzim aktivitesi, ornitin düzeyleri ve nitrik oksit düzeylerine etkileri araştırılacak, bir enzim inhibitörü olarak nor-NOHA'nın kanser tedavisinde potansiyel bir ajan olarak kullanılabilirliği sorgulanacaktır.

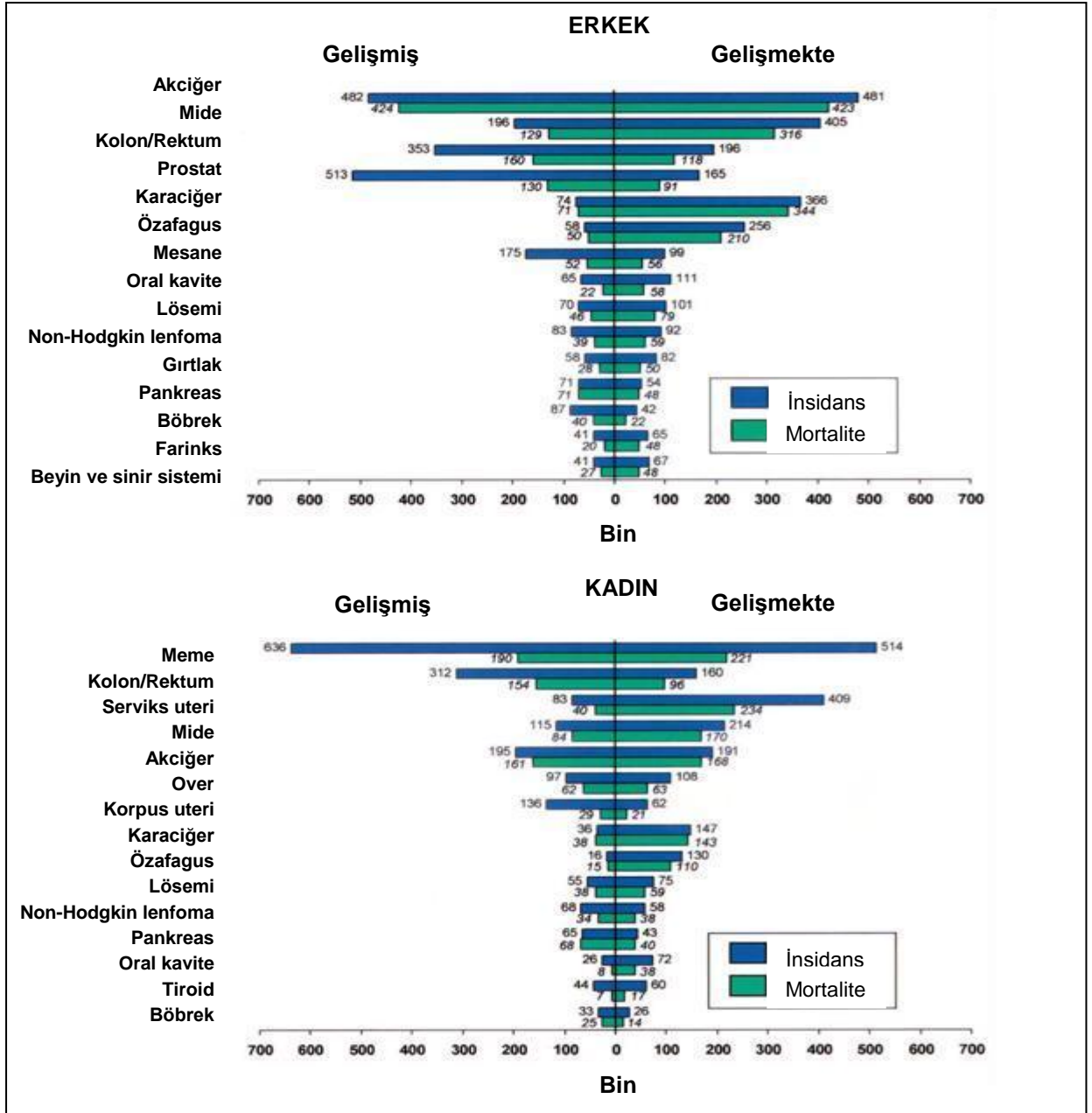


## GENEL BİLGİLER

### MEME KANSERİ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser çeşidi olarak birçok ülkede kadınlarda kanserden ölümlerin başlıca nedenidir. Dünyada meme kanseri görülme oranı giderek artmaktadır. Batı toplumlarında yaklaşık her 8 kadından biri hayatının bir döneminde bu hastalığa yakalanmaktadır (3). Meme kanserinin kadınlarda yaşam boyu görülme riski yaklaşık %12'dir. Günümüzde kadınlarda ortaya çıkan kanserlerin %32'si ve kansere bağlı ölümlerin %18'i meme kanserine bağlıdır (10).

2002 verilerine dayanarak; cinsiyete göre dünyada kanser görülme sıklığı ve ölüm oranlarına bakıldığında, erkeklerde en sık akciğer ve mide kanseri, kadınlarda ise meme ve kolorektal kanserler başta gelmektedir. Her iki cins için kanser görülme sıklığı ise sırasıyla akciğer, meme, kolorektal kanserler şeklindedir (Şekil 1) (11,12). Meme kanseri görülme sıklığı ülkeden ülkeye farklılık gösterir. Japonya hariç gelişmiş olan Kuzey ve Batı Avrupa ülkelerinde ve ABD'de görülme sıklığı yüksektir (13). Avrupa ülkelerinde ise görülme sıklığı kuzeyden güneye ve batıdan doğuya doğru gidildikçe azalmaktadır (14). Fakat meme kanseri insidansı düşük olan toplumlardaki meme kanseri artışı, meme kanseri insidansı yüksek olan toplumlardaki artışa oranla belirgin olarak yüksektir. Bu nedenle yıllar içinde batı ülkelerinde yaşayan kadınlarla, doğu ülkelerinde yaşayan kadınlar arasındaki meme kanseri görülme sıklığı farkının

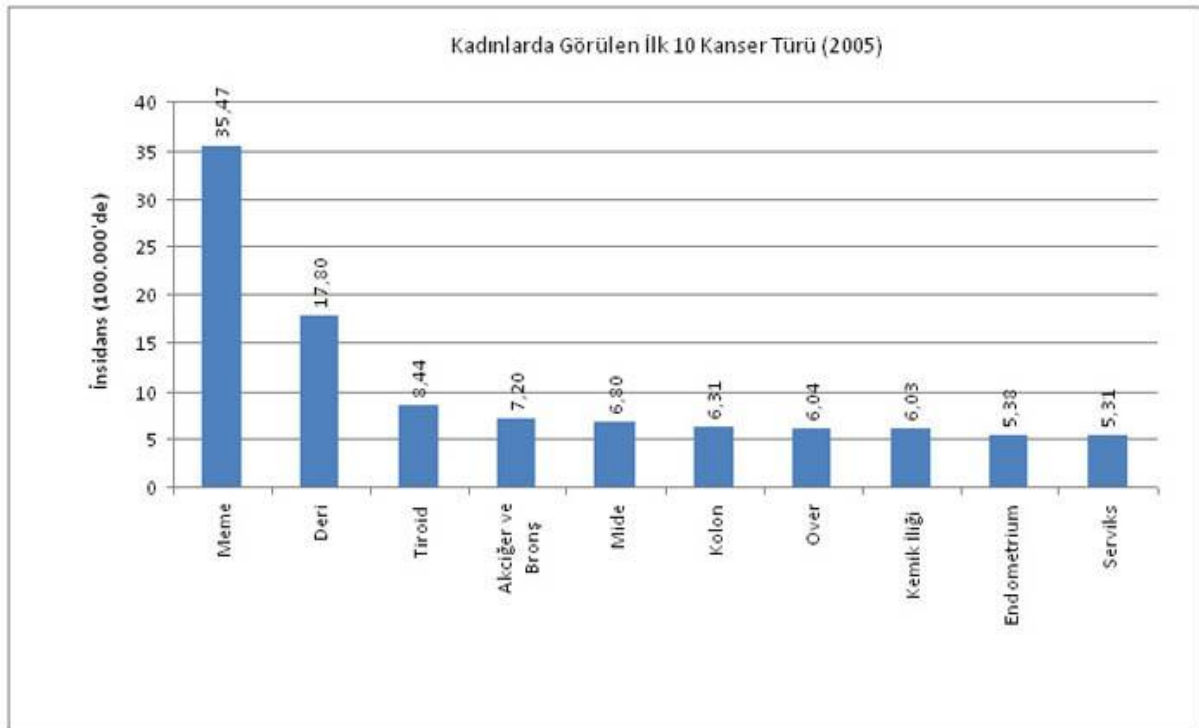


**Şekil 1. Dünyada gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki kanser vakalarının 2002 yılı İnsidans ve Mortalite değerleri (11).**

kapanması beklenmektedir (15). Meme kanseri yaşla da ilişkili olup 30 yaşından önce nadir olarak görülürken, bu yaşı takip eden reproduktif yıllarda hızlı bir artış göstermektedir. Menopoz dönemindeki hafif bir azalmayı takiben, menopoz sonrası yıllarda yavaş bir eğimle sürekli devam eden bir artış gösterir (11).

2010 yılı ABD istatistiklerine göre, ABD’de kadınlar arasında gözlenen en yaygın kanser türleri meme ve kolorektal kanserlerdir (16). Türkiye sağlık istatistiklerine bakıldığında ise yıllara göre ölüm nedenleri sıralandığında kanser ikinci sırada yer alır (17).

Ülkemizde kadınlar arasında gözlenen kanserler arasında meme kanseri birinci sırada yer alırken (Şekil 2) kanser ölümleri arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer alır (10,18).

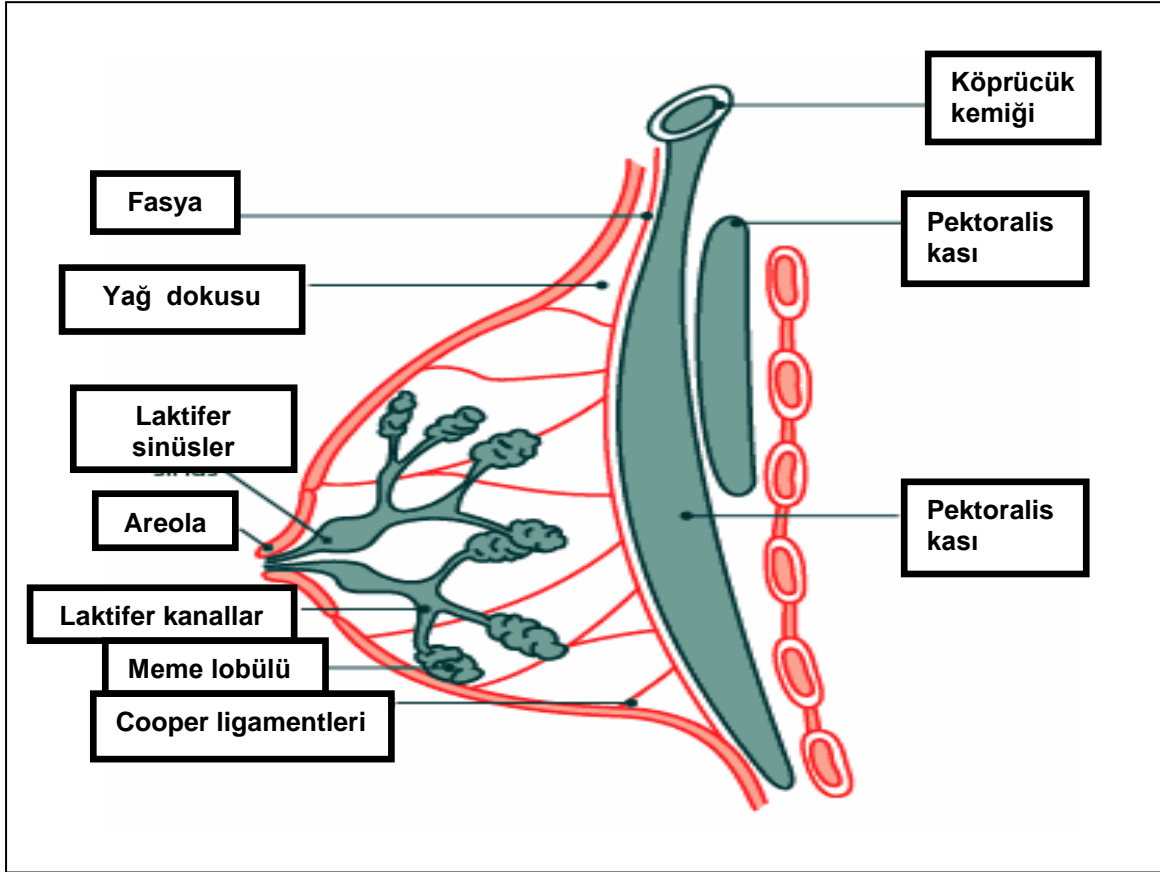


Şekil 2. Türkiye’de kadınlarda görülen ilk 10 kanser türü (2005) (18).

## MEME ANATOMİSİ

Memeler toraksın üzerinde ve sternumun iki yanında 2. ve 6. kostalar arasında yer alır. Her bir meme tabanı pektoralis major ve pektoralis minör kasları üzerine oturur. Meme bezinin önünde yüzeysel fasya, arkasında derin fasya bulunur. Meme derisinden derin fasyaya doğru uzanan ligamentlere “cooper ligamentleri” denir. Bu ligamentler memeyi yerine tespit ederler. Kanserinin gerek yayılma gerekse

ilk belirtilerini ortaya koymada önem taşırlar. Meme lobüller (süt bezleri) ve ductuslar (süt kanalları) olmak üzere iki kısımdan oluşur. Lobüller ve ductuslar arası boşluğu destek ve yağ dokusu doldurmaktadır (Şekil 3) (10).



**Şekil 3. Meme anatomisi (20).**

Meme malign tümörlerinin önemli bölümü adenokarsinomlardır. Günümüzde bunların memenin terminal duktal lobuler ünitesinden köken aldığı kabul edilmektedir. Skuamöz hücreli karsinom, phyllodes tümör, sarkom ve lenfoma gibi adenokarsinom dışı diğer malign tümörler ise %5'den az bir grubu oluşturmaktadır (10).

### **Meme kanserinin histolojik 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
- İnflamatuar karsinom olarak sınıflandırılmıştır (19).

### **Memenin Kan Dolaşımı**

#### **Arteryal dolaşım**

Memenin arteryal beslenmesini sağlayan internal torasik arterin perforan dalları, posterior interkostal arterlerin lateral dalları, aksiler arterin dalları olmak üzere 3 ana arter bulunmaktadır.

#### **Venöz dolaşım**

Memenin venöz drenajı, meme kanserinin metastazı açısından önemlidir. Venöz damarlar, arterlere ve lenfatik damarlara eşlik ederler.

#### **Memenin lenfatik drenajı**

Memenin lenfatik drenaj sisteminin izlediği primer yol aksiler lenf ganglionlarından geçer. Tüm memenin lenfatik akımının %3-25'inin internal

mammaryan, %75-97'sinin aksiler lenf ganglionlarına drene olduğu gösterilmiştir (21). Meme kanserlerinde aksiler lenf nodlarının değerlendirilmesi çok önemlidir.

Tümörlü hastada aksillasında tutulum yoksa 10 yıllık sağ kalım %75-80'dir. Meme kanserleri %5'den az bir oranda sadece aksiler metastazlar ile bulgu verebilir. (22). Meme dokusunun ana kitlesi genellikle üst yarıda ve daha çok dış kadranda yerleşmiştir. Bu nedenle Lee ve arkadaşları da malign lezyonların üst dış kadranda daha sık olarak görülmesini, üst dış kadranda daha fazla meme dokusu bulunmasıyla açıklamışlardır (23).

### **Risk Faktörleri**

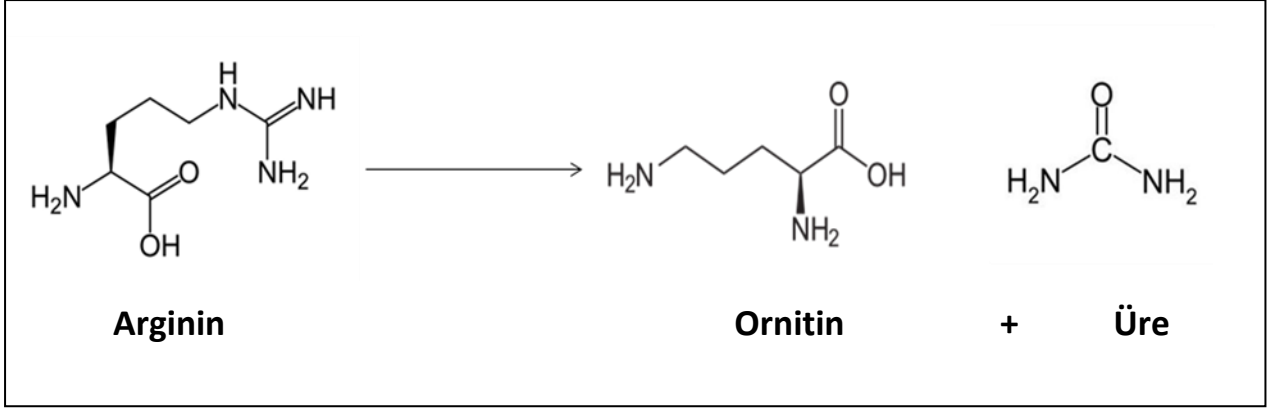
İnsanlarda meme kanserinin sebebi bilinmemektedir. Genetik, çevresel, hormonal, sosyobiyojik ve psikolojik etkenlerin oluşumunda rol aldığı kabul edilmekle birlikte, meme kanserli kadınların %70-80'i bu risk faktörlerine sahip değildir. Kromozomal mutasyonların insanda kanser ortaya çıkış ve gelişimi ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (Tablo 1) (24).

### **ARGİNAZ ENZİMİ**

Üre döngüsünün son enzimi olan Arginaz (L-arjinin amidinohidrolaz; E. C.3.5.3.1) azot metabolizmasının anahtar enzimidir (1). Ana substratı olan L-arjininin üre ve L-ornitine hidrolize olmasını katalizler (Şekil 4) (28). Arginazın A1 ve A2 olmak üzere iki izoformu vardır. Bunlardan A1 (hepatik arginaz) sitoplazmik kökenli ve ağırlıklı olarak karaciğerde bulunurken, A2 (ekstrahepatik arginaz) ise mitokondriler içinde yerleşim göstermektedir. A1 üre sentezi ve amonyağın zehirsizleştirilmesi ile sorumlu iken A2 ise ornitin, prolin, glutamat gibi biyosentetik fonksiyonlarla ilgilidir (29).

**Tablo 1. Meme kanseri oluşumunda önemli risk faktörleri (21,25-27).**

<b>Faktör</b>	<b>Risk</b>	<b>Açıklama</b>
<b>Yaş</b>	Arttırır	Meme kanseri genellikle postmenapoz dönemde görülmektedir. Yaş arttıkça risk artmaktadır, bundan dolayı yaş en önemli risk faktörüdür.
<b>Aile hikayesi</b> a) Birinci derece akrabalarda meme kanseri b) BRCA1 ve BRCA2 geni mutasyonları	Arttırır	a) Anne kız kardeş ve kızında meme kanseri olanlarda risk 2 kat artmaktadır. b) Her iki gende herediter meme kanserinin %60'undan, tüm meme kanserlerinin ise %5 ile %10'undan sorumludur.
<b>Endojen hormonal faktörler</b> a) Menarş yaşı b) Menapoz yaşı c) Doğum ve ilk doğum yaşı	Arttırır	a) Erken yaşta (11 yaşından önce) menarş b) Geç menopoz (54 yaşından sonra) meme kanseri riskini arttırır. c) İlk doğum yaşı 35'ten sonra olanlar ve hiç çocuk sahibi olmayanlar yüksek risk grubunda yer almaktadır.
<b>Eksojen hormonal faktörler</b> a) Oral kontraseptifler b) Östrojen replasman tedavisi	Tartışmalı	a) Uzun süreli ve erken yaşta oral kontraseptif kullanımı riski arttırmaktadır. b) Östrojen replasman tedavisi 5 yıl ve üzerinde kullanımda postmenapozal kadında meme kanseri riskini arttırır fakat meme kanserinin gelişimini uyarmakta, ama yoktan bir kanser oluşumuna sebebiyet vermemektedir.
<b>Obezite</b>	Tartışmalı	Postmenapozal kadınlarda riski 2 katı arttırmaktadır, buna karşın premenapozal kadınlarda İnsidans obezlerde düşük, zayıflarda fazladır.
<b>Diyet</b>	Arttırır	Yüksek yağlı diyet meme kanseri riskini arttırır.
<b>Alkol</b>	Arttırır	Günde ortalama 1 tane alkollü içki tüketen kadınlarda meme kanseri riski %7 oranında artmaktadır.
<b>Bening meme hastalığı</b>	Arttırır	Proliferatif epitelyal değişikliği mevcut kadınlarda 2 kat, atipik hiperplazi mevcut olanlarda 4 kat meme kanseri riski vardır.
<b>Geçirilmiş meme kanseri</b>	Arttırır	Meme kanseri oluşan bir kadında hayatı boyunca ikinci meme kanseri olma riski %25-30 civarındadır.
<b>Çevresel faktörler</b> a) Elektromanyetik alanlar b) İyonizan radyasyon	Arttırır	a) Mesleki olarak maruz kalma riski arttırır. b) Nükleer savaş veya tanı ve tedavi nedeniyle radyasyona maruz kalma riski arttırır.
<b>Sosyo-ekonomik grup</b>	Arttırır	Yüksek sosyo-ekonomik gruba sahip gruplardaki kadınlarda risk yüksektir.

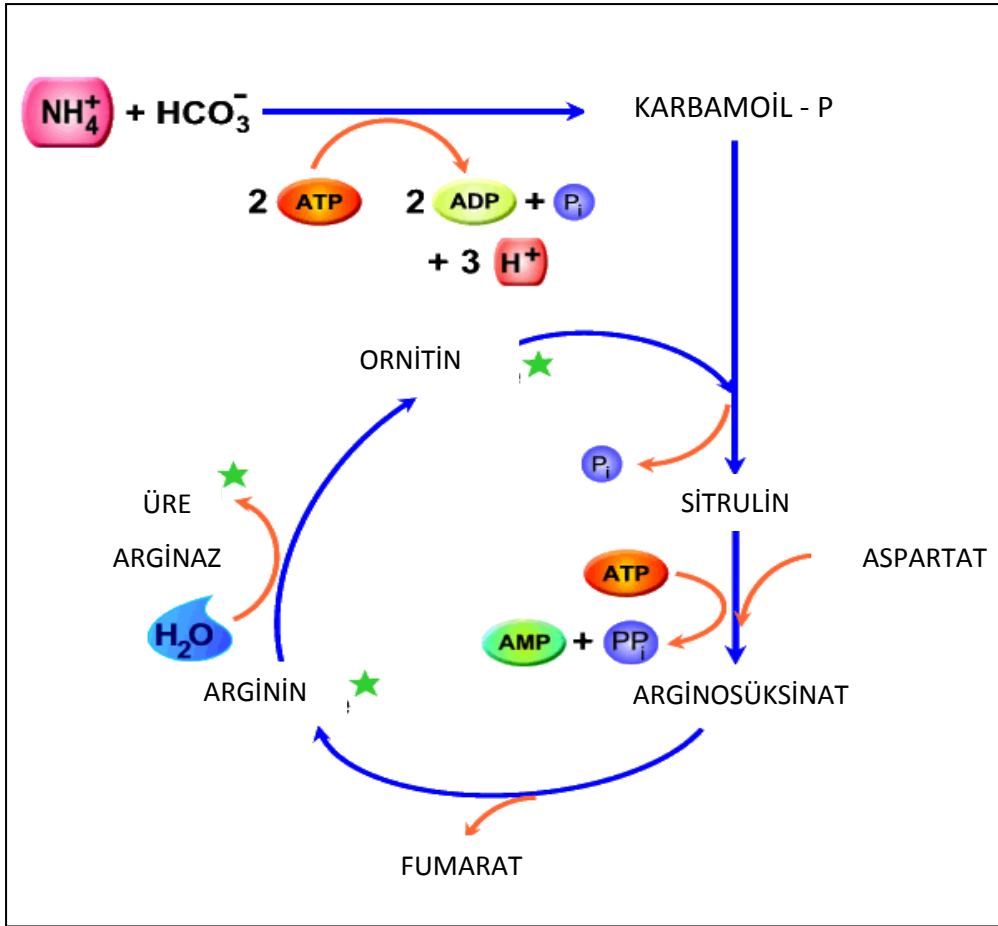


**Şekil 4. Argininden Ornitin ve Üre oluşumu (38).**

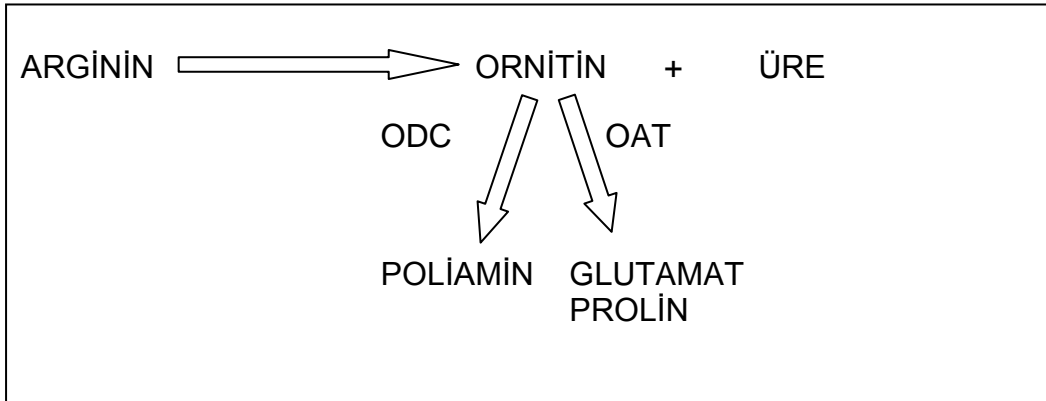
Karaciğer, arginaz aktivitesinin en yüksek olduğu dokudur. Ekstraheptik dokulardaki aktivitesi, karaciğere oranla belirgin olarak düşüktür. Bu dokuların başında eritrositler, lökositler, trombositler, plazma, böbrek, iskelet ve kalp kası, beyin, bağırsak, pankreas, akciğer, tükürük bezleri, meme bezi ve testisler gelmektedir (30). Arginaz enzimi güçlü bir immün sistem inhibitörü olup lenfosit proliferasyonunda inhibitör etkiye sahiptir. Kanser hücrelerinin sitoplazması içinde normal hücrelere göre çok fazla miktarda bulunmaktadır (31).

Arginazın katalizlediği tepkimenin üre ve ornitin olmak üzere iki ürünü vardır (1). Üre insanlarda non protein azot katabolizmasının temel azotlu metabolik ürünüdür. Üre biyosentezi, amino azotundan elde edilen amonyaktan oluşur ve üre siklusunun hepatic enzimleri tarafından yürütülür. Amonyakın toksik etkisi karaciğerde Krebs-Henseliet üre döngüsü ile ortadan kaldırılır (Şekil 5). Ürenin %90'dan fazlası böbreklerden atılırken geri kalan kısmı gastrointestinal traktüs ve ciltten atılır (32). Ornitin ise ornitin dekarboksilaz (ODC) tarafından poliaminleri oluşturmak ve ornitin amiotransferaz (OAT) enzimi ile glutamat ve proline dönüştürülmek üzere kullanılır (Şekil 6) (33). Prolin, kollajen ve kazein gibi önemli proteinlerin yapısına katılırken, glutamat ise enerji metabolizması, aminoasitlerin birbirine çevrilmesinde önemli rol oynayan bir ara metabolittir (34).





Şekil 5. Üre Döngüsü (61).



Şekil 6. Ornitinden Poliamin , Glutamat ve Prolin sentezi. ODC: Ornitin dekarboksilaz; OAT: Ornitin aminotransferaz.

## **Arginaz Enziminin Kinetik Özellikleri**

Arginazın, tam aktivite gösterebilmesi, alt birimlerine ayrılmaması ve kuaterner yapısının şekillenmesi için her alt birimin bir mol manganez ( $Mn^{+2}$ ) içermesi gerekmektedir (35). 1 mol arginaz enzime 4 mol  $Mn^{+2}$  bağlanarak enzime tetramer yapı kazandırır (36). Arginaz enziminin tam aktivite gösterebilmesi için kofaktör olarak  $Mn^{+2}$  iyonlarına ihtiyaç vardır. Bu da enzimin tetramerik yapıda olmasından kaynaklanmaktadır.  $Mn^{+2}$  iyonları, arginaz enzime bağlanarak enzimi dayanıklı hale getirmektedir (37,38). Arginaz çok stabildir ve uzun süreler boyunca düşük sıcaklıkta saklandığında aktivitesini yitirmemektedir (39).

$Fe^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  gibi metal iyonlarının da arginaz enzimi aktive ettiği veya stabilitesini sağladığı gösterilmiştir (40).  $Hg^{+2}$ ,  $Ag^{+2}$  gibi ağır metaller ise enzimin aktivitesini azaltmaktadır (41).

Arginazın optimum pH'ı alkalidir. Enzim maksimum hızını pH 9.0-9.5 arasında göstermektedir (42). pH 7'nin altında ise enzim aktivitesi kaybolmaktadır (43). Arginazın katalizörlüğü ile oluşan ornitin, arginazı inhibe ederken ürenin inhibisyon etkisi bulunmamaktadır. Ornitin dışında; lösin, izölösin, lizin, prolin, sistein, valin, tirozin gibi L-amino asitlerin de arginaz üzerine inhibitör etkisi vardır. Bunlardan ornitin ve lizin yarışmalı; valin, izölösin, lösin ve sistein yarışmasız inhibisyon gösterir (44).

## **Arginaz Enziminin Klinik Önemi ve Kanslerle Olan İlişkisi**

Arginaz üre döngüsünün son basamağını katalizler ve bu nedenle de esas olarak karaciğerde bulunur (45). Arginaz salınımı esas olarak kritik hastalıklar sırasında inflamatuvar süreçte ve hücrelerde immün cevap regülasyonunda meydana gelir. Arginaz ayrıca nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesini de indükler (46) ve NOS ile beraber yara iyileşmesi, immün cevap, tümör biyolojisi ve yangının düzenlenmesinde rol oynamaktadır (47). Serum arginaz aktivitesi sağlıklı kişilerde düşüktür (39). Arginaz aktivitesinin sedef hastalığı gibi bazı cilt hastalıklarında ve hiperkeratinizasyonda arttığı belirtilmiştir (48). Ayrıca karaciğerin malign ve benign

hastalıklarında, akut hepatitte, memenin benign hastalıklarında serum arginaz aktivitesi artmaktadır (4). Hepatobilier kanaldaki malign tümörlü hastalarda serum arginaz aktivitesinin artması, arginazdan zengin karaciğer hücrelerinden enzim salındığını göstermektedir. Bu durum akut hepatitte de serum arginaz aktivitesinin yükselmesine yol açmaktadır (49). Plazma ve eritrosit arginaz aktivitesinin hematolojik hastalığı olan çocuklarda yüksek olduğu, plazma ve eritrosit arginaz aktivitesi ölçümünün hemolitik işleyişin ortaya konmasında ve tanıda iyi bir belirteç olabileceği belirtilmiştir (50). Başka bir çalışmada, plazma arginaz aktivitesinin orak hücre anemisi hastalıklarında önemli ölçüde artış gösterdiği bulunmuştur (51).

Arginazın kanserle olan yakın ilişkisi, birçok araştırmacı tarafından çeşitli şekillerde ortaya konmuştur. Meme kanserinde preoperatif dönemde serum arginaz düzeyinin sağlıklı kadınlardan 4 kat yüksek olduğu bulunmuştur (4). Primer kolorektal kanserli ve karaciğere metastazı olan hastalarla yapılan bir çalışmada, sağlıklılara göre serum arginaz aktivitesinin yüksek olduğu ve ayrıca primer kolorektal kanserli hastaların tanısında bu enzimin faydalı bir belirteç olabileceği gösterilmiştir (45). Peptik ülser ve gastrik kanserli hastalarda serum arginaz aktivitesi incelenmiş ve serum arginaz aktivitesinin gastrik kanserli hastalarda peptik ülserli hastalardan ve sağlıklı kişilerden önemli oranda yüksek olduğu saptanmıştır. Aynı araştırmacılar gastrik kanserin evresi ile serum arginaz aktivitesi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Gastrik kanserin evresi ilerledikçe serum arginaz aktivitesinin yükseldiğini bulmuşlardır. Serum arginaz aktivitesindeki artışın kanserin boyutu ile ilgili olduğu düşünülmektedirler (52). Benzer şekilde gastrik kanserli hastaların dokularında arginaz aktivitesinin normal gastrik mukozal dokulara oranla önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur (53). Başka bir çalışmada da, küçük hücreli veya küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde ornitin ve arginaz enzim aktivite düzeyleri yüksek bulunmuş ve arginaz enziminin kanserde bir belirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (54).

Yapılan birçok çalışmada çeşitli kanser türlerinde serum ve doku arginaz enzim düzeyleri incelenmiş, arginaz enzim aktivitesinin kanserle ilişkili olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Hatta bazı araştırmacılar kanserli hastaları belirlemede arginaz enzim aktivitesinin önemli bir belirteç olarak kullanılabileceğini vurgulamışlardır (4,52-54).

## **Poliaminler**

Poliaminler, hücrelerin büyüme ve gelişmesi için önemli biyomoleküllerdir (2). Argininden sentezlenen ve çok sayıda amino grubu içeren putresin, spermin ve spermidin hücre büyümesi için gerekli olan transkripsiyon, translasyon ve protein sentezinin başlamasını kolaylaştıran poliaminlerdir. Poliaminler başlıca hücre bütünlüğünün stabilizasyonu, DNA ve RNA sentezinin uyarılması, DNA'nın stabilizasyonu, hücre döngüsünün düzenlenmesi, protein kinaz inhibisyonu gibi önemli etkilerden sorumludur (54).

Putresin iki yoldan oluşur: Birinci yolda; arginin, arginaz ile ornitin ve üreye çevrilir. 5 karbon ve 2 amino gruplu bir aminoasit olan ornitin, protein yapısına katılmaz. Ornitin, ornitin dekarboksilaz tarafından dekarboksile olarak 4 karbon ve 2 amino grubu taşıyan putresine dönüşür (55). İkinci yolda; arginin, arginin dekarboksilaz ile dekarboksilasyona uğrayarak agmatin oluşur. Agmatin, bir imino-hidrolaz ile N-karbamoil putresine, bu da N-karbamoil-putresin amido-hidrolaz ile putresine çevrilir (56).

Poliamin sentezine katkısı olan diğer bir aminoasit metiyonindir. SAM'dan, adometdekarboksilaz ile adenzimetiltiyopropilamin oluşur. Bunun propilamino grubu putresine aktarılarak, 7 karbon ve 3 amino gruplu spermidin, ikinci bir propilamino grubu spermidine eklenerek 10 karbon ve 4 amino gruplu spermin elde edilir (Şekil 7) (55). Arginaz aktivitesinin yükselmesinin poliamin biyosentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan ODC aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (57).

ODC, poliaminler tarafından pozitif ve negatif feedbackle regüle edilir. Yüksek poliamin konsantrasyonlarında ODC aktivitesi azalırken, düşük poliamin konsantrasyonların da ise ODC aktivitesi artmaktadır (58). Hücre poliferasyonunun arttığı fizyolojik ve patolojik durumlarda poliamin düzeylerinin de arttığı gösterilmiştir. Poliamin düzeylerinin, artmış kanser hücreleri poliferasyonunda, inflamatuvar durumlarda, infeksiyon ve travma durumlarında, otoimmün hastalıklarda yükseldiği gösterilmiştir (59). Ayrıca, poliamin üretiminin hücre hasarı tamir fazının şiddeti ile paralel olduğu bildirilmiştir (60). Poliaminler hücre büyümesi için hayati öneme sahip

olmakla beraber artan arginaz aktivitesine bağlı olarak ornitin düzeyinin yükselmesi kanserin ortaya çıkması ile ilgili olabilir (28).

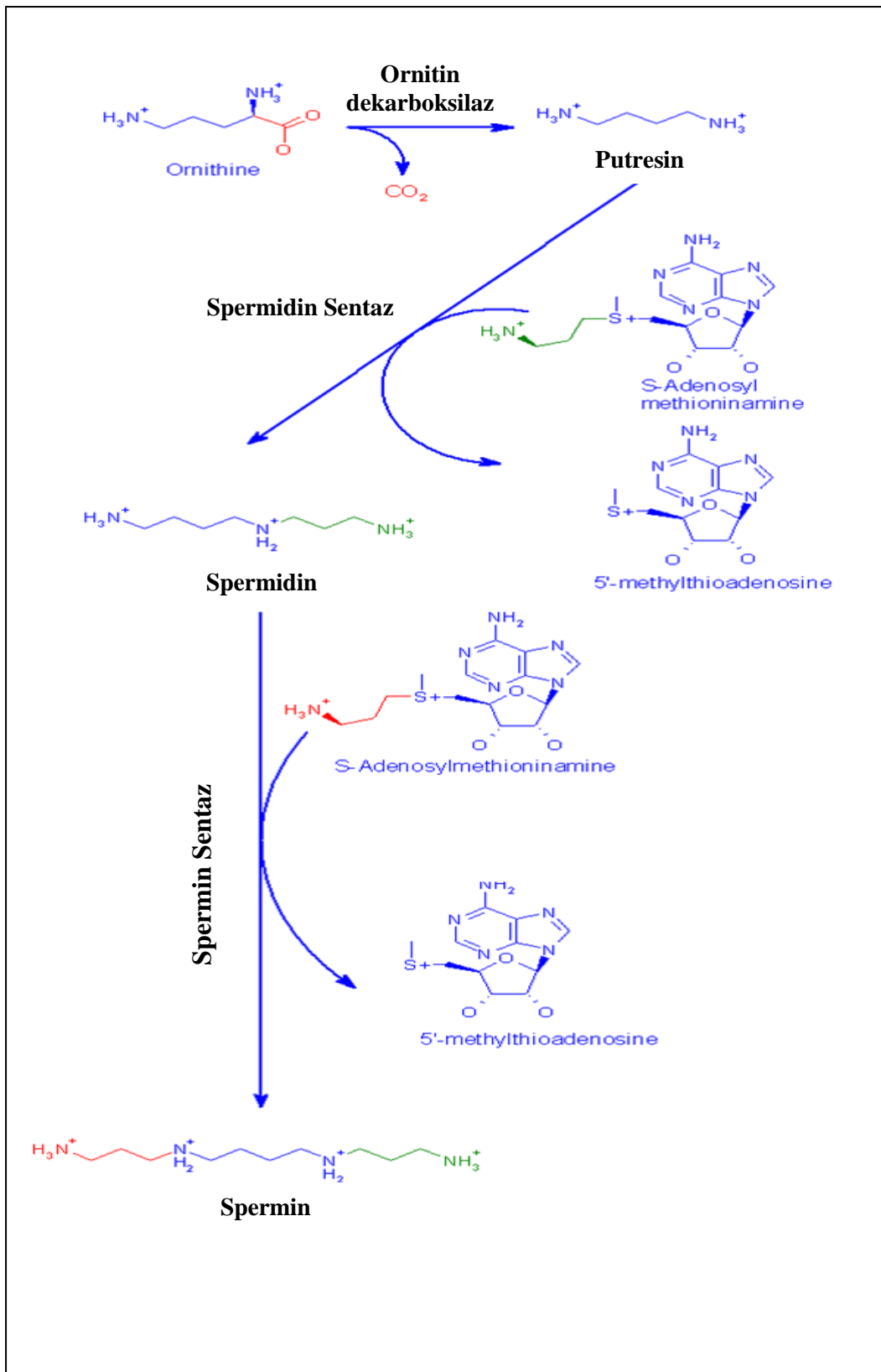
Poliaminler esas olarak kırmızı kan hücrelerinde (RBCs) taşınmaktadır (62). Hücre içi poliamin metabolizmasının ve dolaşımdaki poliamin miktarının malign olaylarda arttığı, özellikle de eritrosit poliamin miktarının klinikte hücre proliferasyonunun bir indeksi olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (63). Poliaminler, karaciğer peroksizomlarında bulunan poliamin oksidaz enzimi ile önce sperminin spermidine ve ardından spermidinin de putresine okside olması ile katabolize olur (Şekil 8) (41).

## **NİTRİK OKSİT**

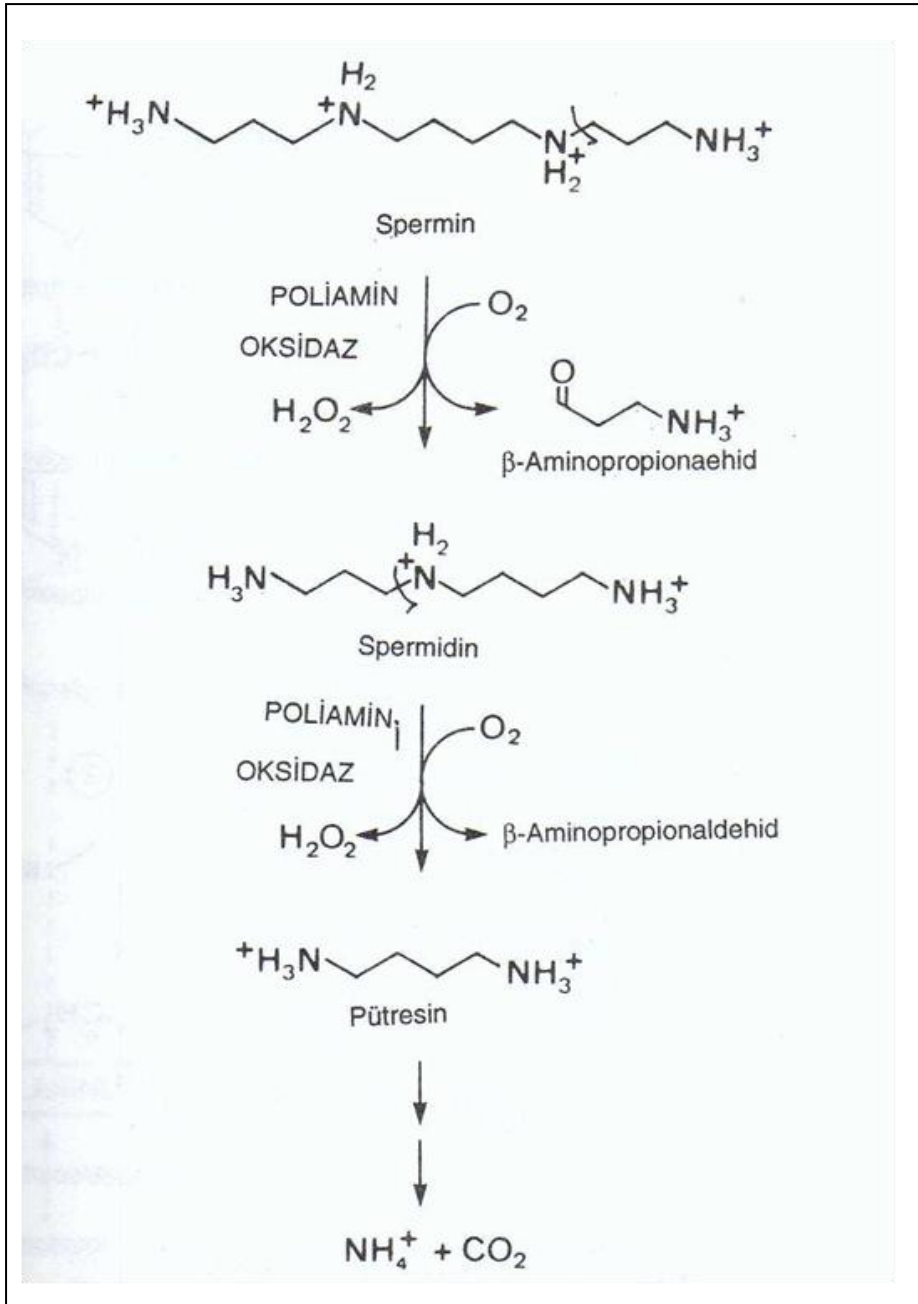
Nitrik oksit (NO), yarılanma ömrü kısa olan ve tüm memeli hücrelerinde bulunan önemli bir haberci moleküldür. L-argininden nitrik oksit sentazın (NOS) etkisi ile sentezlenir. Bu tepkimede moleküler O<sub>2</sub>, NADPH, FAD, FMN, tetrahidrobiopteridin, Ca<sup>+2</sup>, hem kompleksi ve tiyol gibi çeşitli kofaktörlere ihtiyaç vardır (5,55,64). Bu kofaktörler, L-argininin 5 elektron-oksidasyonunu başarak, NO ve sitruline çevirirler (Şekil 9). NOS'ın üç izoformu bulunmaktadır:

1. Tip 1 nöronal NOS (nNOS)
2. Tip 2 indüklenebilir NOS (iNOS)
3. Tip 3 endotelial NOS (eNOS)

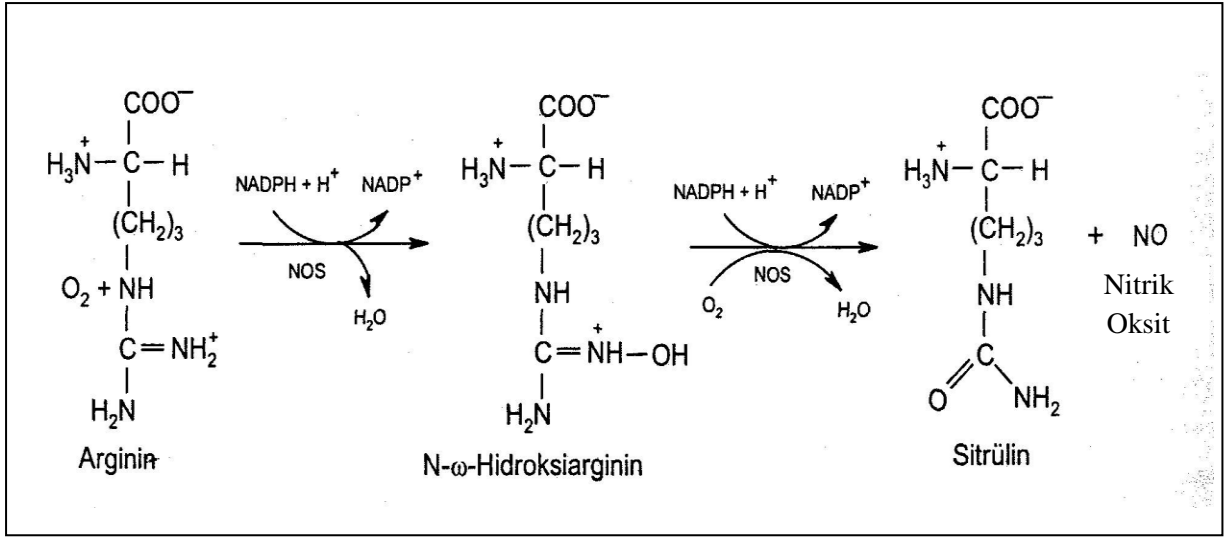
nNOS, ilk olarak santral ve periferik sinir hücrelerinde bulunmuştur. eNOS, endotel hücreleri için spesifiktir. nNOS ve eNOS, Ca<sup>+2</sup> bağımlı olup sürekli ve az miktarda NO sentezlerler. Fizyolojik olayların meydana gelmesinde ve hücreler arası haberleşmede önemli rol oynarlar. Ca<sup>+2</sup> bağımlı olmayan iNOS; makrofaj, miyosit, düz kas hücreleri ve hepatositlerde; belirli sitokinlerin ve lipopolisakkarit içeren mikrobiyal ürünlerin uyarısıyla NO üretimini katalizler. iNOS immünolojik savaşta ve nöronal hasar sonrasında etkili olmaktadır. NOS tarafından NO' nun bazal salınımı süregelen vazodilatatör etki oluşturur.



Şekil 7. Poliamin Sentezi (94).



Şekil 8. Poliamin Katabolizması (41).



**Şekil 9. Argininden NO ve sitrülün oluşumu (69).**

Makrofajlarda iNOS tarafından sentezlenen NO, bunların tümör hücreleri üzerine olan sitotoksik aktivitelerine katkıda bulunur. Makrofajların antitümoral aktivitesi NO üretimlerine bağlıdır (6,7,65,66).

Çoğunu arginin analoglarının oluşturduğu, kompetitif inhibisyon ile etkili olan, deneysel araştırmalarda çok sık kullanılan çeşitli NOS inhibitörleri vardır. Bunlar, asimetrik dimetil arginin (ADMA), N-G- monometil arginin (L-NMMA), N-G- nitro-L- arginin (L-NNA), N-G- nitro-L- arginin metilester (L-NAME) dir (67,68).

NO, molekül ağırlığı 30 dalton olup yarı ömrü 3-5 saniye olan, -151 °C kaynama noktasına sahip, hem yağda hem suda çözünebilme özelliği sayesinde membranlardan kolayca geçen ve bu sayede çok önemli biyolojik roller üstlenen gaz tabiatında bir maddedir, hızla nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) ve nitrata (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) okside olur. NO oksidasyonu (inaktivasyonu), süperoksit (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) anyonu gibi diğer serbest radikaller aracılığıyla da olur (66).

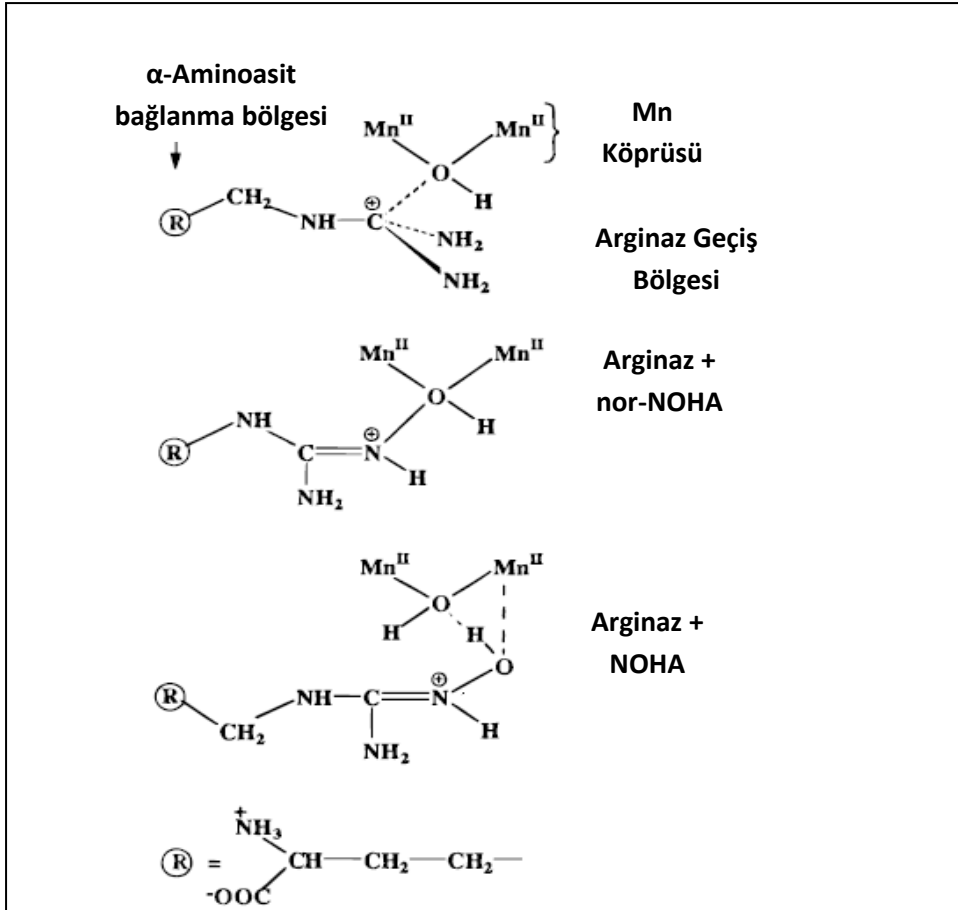
NO birçok etkisini guanilat siklazı aktive ederek cGMP yoluyla gerçekleştirir (67,69). Başlıca etkileri arasında düz kas relaksasyonu, trombosit agregasyon ve adezyonunun inhibisyonu, lökosit adezyon ve migrasyonunun azalması, antiaterojenik etki, nörotransmitter etki, sitotoksik etki, ereksiyon yapıcı etki sayılabilir (65,67,70).



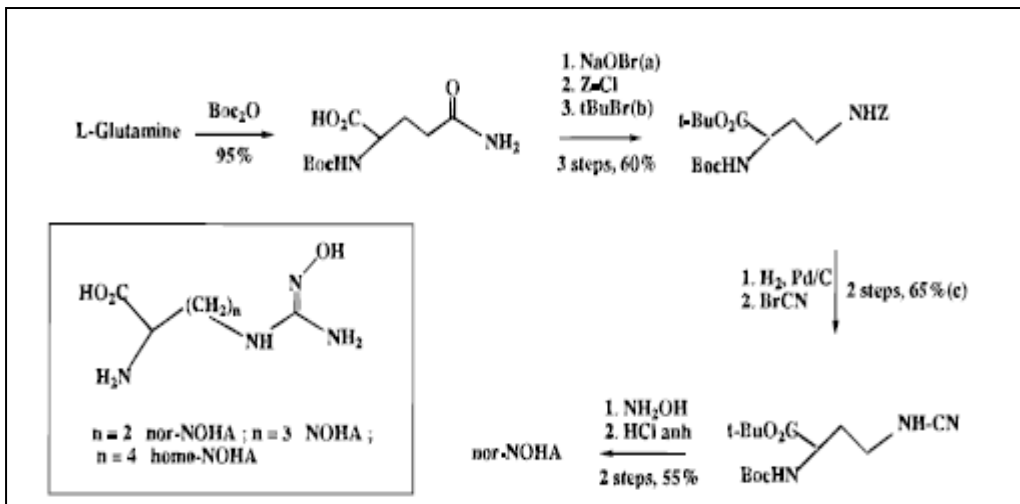
## Nor-NOHA

Memeli Arginazı, katalitik aktivite için bir  $Mn^{2+}$ - $Mn^{2+}$  köprüsüne ihtiyaç duyar ve L-Argininin üre ve ornitine hidrolizini katalizler (71). Son çalışmalar, rat karaciğer arginazının kristal yapısını göstermiştir. 2 Mn iyonu, proteinin aspartat kalıntısının yan zincirinin iki karboksilat kalıntısı ve bir su molekülü ile köprü kurar. L-Arginin bu Mn köprüsünün yakınlarına bağlanır. L-Argininin guanidinium karbonu Mn köprülerinin hidroksil iyonuna nükleofilik atak yaparak bağlanır (Şekil 10) (72). L-Argininden farklı moleküllerin Mn köprüsüne bağlanabilirliği birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir. İlk tanımlanan molekül borat olmuştur (73). Bu inhibitörler genellikle enzimin aktif bölgesine bağlanır. Arginaz için uzun bir süre en iyi inhibitör L-Valin olarak tanımlanmıştır ve  $K_i$  değeri (milimolar düzeyde) en düşüktür (74).

NOHA ( $N^{\omega}$ -Hidroksi-L-Arginin); L-Argininden NO sentezi sırasında oluşan bir ara üründür. Aynı zamanda arginazın kuvvetli bir inhibitörüdür ( $K_i = 20-50 \mu m$ ). Nor-NOHA'nın ( $N^{\omega}$ -Hidroksi-nor-L-Arginin ) homoloğu olan homo-NOHA ( $N^{\omega}$ -Hidroksi-homo-L-Arginin) ile inhibitör etkileri karşılaştırılmış ve nor-NOHA'nın en iyi inhibitör olduğu bulunmuştur ( $K_i = 0.5 \mu m$ ). Nor-NOHA rat karaciğer arginazı için homo-NOHA ve NOHA'dan daha kuvvetli bir inhibitör olarak gösterilmiştir. Nor-NOHA aynı zamanda fare makrofajları içinde NOHA'dan daha kuvvetli bir inhibitördür. Nor-NOHA ve NOHA arginaz için kompetitif ve geri dönüşümlü inhibitörlerdir. NOHA'nın arginaz tarafından tanınması için aminoasidi bağlayan zincir uzunluğu çok önemlidir. Örneğin ek bir  $CH_2$  grubu (homo-NOHA) bu tanınmada dramatik bir azalmaya yol açarken (yaklaşık 75 kat), bir  $CH_2$  çıkarılması (nor-NOHA) ise belirgin bir artışa neden olur (yaklaşık 20 kat) (Şekil 11). Özellikle nor-NOHA'nın arginaz için yüksek affinitesi enzimin aktif bölgesindeki Mn köprüsü ile spesifik etkileşiminden kaynaklanır (9).



Şekil 10. Arginazın geçiş halinin şematik görünümü, nor-NOHA ve NOHA ile etkileşimi (9).



Şekil 11. Nor-NOHA'nın sentezi ve NOHA ile homo-NOHA'nın formül yapısı (9).

## **GEREÇ VE YÖNTEMLER**

Bu çalışma; yerel etik kurul onayı (Ek-1) alınarak Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirildi.

### **GEREÇLER**

#### **Çalışma Grupları**

Çalışmada ortalama ağırlıkları 25-30 gram arasında değişen (ortalama 27 gram), 7-8 haftalık 50 adet erkek Balb/c cinsi fare kullanıldı. Çalışmada kullanılan fareler Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarından temin edildi. Denekler rastgele seçilerek, 10'ar fareden oluşan beş grup oluşturuldu. Tüm fareler deneyin sonuna kadar ayrı kafeslerde, %50-60 nem oranı, 22±1 °C ısıda, 12 saat gece 12 saat gündüz ışık periyodu olan ortamda tutuldular. Beş gruba da standart fare yemi günlük olarak verildi. Hayvanlar 8 haftalık olduğunda meme kanseri oluşturulacak olan 3. 4. ve 5. gruplara 200 µl ehrlich asit tümör hücresi subkutan sol bacağına enjekte edildi. 9. günün sonunda tümör çapının 1 cm olduğu tespit edildi. İkinci grupta 15. günde, üçüncü grupta 18. ve 23. günde, dördüncü grupta 23. günde, beşinci grupta ise 21. ve 23. günde ölen hayvanlar gruptan çıkarıldı.

1.Grup (n=10): Sağlıklı kontrol grubu olarak belirlendi.

2.Grup (n=10): Sağlıklı tedavi grubu olarak belirlendi. Bu gruba 10. günden itibaren 13 gün boyunca intraperitoneal nor-NOHA (10 mg/kg) hergün bir defa olacak şekilde enjekte edildi. Tedavinin 3. günü ölen hayvan gruptan çıkarıldı.

3.Grup (n=10): Meme kanseri kontrol grubu olarak belirlendi. Bu gruba 13 gün boyunca her gün bir defa olacak şekilde 0.2 ml intraperitoneal serum fizyolojik enjekte edildi. Tedavinin 6. ve 11. günü ölen iki hayvan gruptan çıkarıldı.

4.Grup (n=10): Tedavi grubu 1 olarak belirlendi ve deney süresince 13 gün boyunca intraperitoneal nor-NOHA (10 mg/kg) her gün bir defa olacak şekilde enjekte edildi. Tedavinin 11. günü ölen hayvan gruptan çıkarıldı.

5.Grup (n=10): Tedavi grubu 2 olarak belirlendi ve deney süresince 13 gün boyunca intraperitoneal nor-NOHA (20 mg/kg) her gün bir defa olacak şekilde enjekte edildi. Tedavinin 9. ve 11. günü ölen iki hayvan gruptan çıkarıldı.

Deney beş çalışma grubundaki farelerden anestezi altında intrakardiyak kan alınması ve tümör dokusu çıkarılması işlemi ile sonlandırıldı. Sakrifikasyon öncesi; rompun (10 mg/kg) ve ketamin (60 mg/kg) intraperitoneal olarak anestezi amaçlı verildi. Ardından meme tümör dokuları çıkarıldı ve %0.9'luk soğuk serum fizyolojik ile yıkandı. Alınan kan örnekleri 4000 rpm'de ve 10 dak. santrifüj edildikten sonra ayrılan serum ve doku örnekleri - 80 °C'de deneyin yapılacağı güne kadar saklandı.

### **Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Asetik asit (CH <sub>3</sub> COOH)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Bakır sülfat (CuSO <sub>4</sub> )	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Benzoik asit (C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> )	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Demir klorür (FeCl <sub>3</sub> )	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Diasetilmonoksim (C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> )	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Fosforik asit (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Hidroklorik asit (HCl)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Mangan klorür (MnCl <sub>2</sub> )	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Ninhidrin (C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> )	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
L-Ornitin hidroklorür (C <sub>5</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)

Potasyum klorür (KCl)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
L-Sitrulin (C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> )	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Sodyum karbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Sodyum bikarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Sodyumhidroksit (NaOH)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Trikloroasetik asit (CCl <sub>3</sub> COOH)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Tiyosemikarbazid (CH <sub>5</sub> N <sub>3</sub> S)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Tiyoüre (H <sub>2</sub> NCONH <sub>2</sub> )	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Üre (H <sub>2</sub> NCONH <sub>2</sub> )	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
L-arginin (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Sülfirik asit (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze - Almanya)
Folin	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze - Almanya)
Albümin	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze - Almanya)
Na-K tartarat (NaK(COO) <sub>2</sub> (CHOH) <sub>2</sub> )	(Panreac Montplet&Estaban, Madrid ıspanya)
Triton-X-100	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Tris (NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> )	(Carlo Erba Reagenti - Milano)
α-Isonitro-sopropiophenone (C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> )	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze - Almanya)

### **Alet ve Malzemeler**

Etüv	: Memmert 400	(GmbH+Co KG, Schwabach-Almanya)
Homojenizatör	: Polytron PT 2100	(Kinematica AG, Littau-Luzern)
Manyetik karıştırıcı	: Ikamag RH	(Janke&Kunkel GmbH&CO, Almanya)
Soğutmalı santrifüj	: Universal 30 RF	(Hettich Zentifuge, Tuttlingen-Almanya)
Spektrofotometre	: UV-160A	(Shimadzu Corporation, Japonya)
Su banyosu	: Elektromag GFL-1083	(Gesellschaft für Labortechnik, Alm.)
Elektronik tartı	: Sartorius	(Sartorius AG, Göttingen-Almanya)
pH metre	: pH level 1	(Inolab WTW, Weilheim-Almanya)
Cam malzemeler	: Deney tüpleri, balon joje, mezür, beher v.b	

### **Doku Örneklerinin Homojenize Edilmesi**

Tüm gruplardan elde edilen meme tümör dokularının homojenizasyonunda Tris tamponu (0.05 M) kullanıldı. Derin dondurucudan çıkarılan dokular Polytron PT

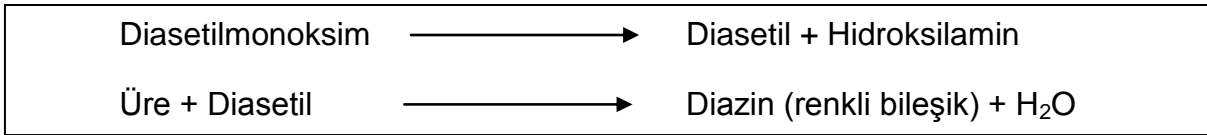
2100 model oto homojenizatör kullanılarak, ağırlılarının 10 katı kadar soğuk Tris-HCl tamponu (0.05 M, pH:8.05) ile homojenize edildi. Doku homojenizatları, 4 °C'de 11.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi.

## YÖNTEMLER

### Meme Dokusu Arginaz Aktivitesinin TDMU Yöntemi ile Ölçümü

Arginaz aktivitesi; substrat olan argininin örnekteki arginaz ile hidrolizi sonucunda oluşan üre miktarının TDMU yöntemi (75) ile spektrofotometrik olarak saptanması ile belirlenmiştir.

Üre için kullanılan birçok kimyasal metod gibi, TDMU yöntemi de Feron reaksiyonunu temel alır (Şekil 12). Diasetilmonoksim, üre ile doğrudan reaksiyona girmez. İlk önce asit ortamda ısı etkisi ile hidroksilamin ve diasetile hidrolize olur. Diasetil, asit çözeltide üre ile kondanse olur ve H<sub>2</sub>O ve renkli bir bileşik olan diazin meydana gelir. Bu rengi stabilize etmek için tiyosemikarbazid ve Fe<sup>+2</sup> iyonları kullanılır.



**Şekil 12. Feron Reaksiyonu (95).**

Örnekteki üre düzeyinin 0.3 µmol/mL 'den fazla olduğu konsantrasyonların Beer-Lambert kanununa uymaması bu metodun dezavantajıdır. Ancak bu olumsuzluk, yüksek absorbans değeri veren örneklerin sulandırıldıktan sonra ölçülmesi ile önlenir.

### Gerekli Ayıraçlar

Asit karışımı: 3.24 g FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O bir miktar distile su ile bir balon jodede çözündürülüp, üzerine %85'lik H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>'ten 66.7 ml eklenir. Daha sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Oda ısısında saklanır.

Hazırlanan çözültiden 1 ml alınır, üzerine 999 ml %20'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'ten ilave edilir. Bu oluşum deney aşamasında asit karışımı olarak kullanılır. Oda ısısında saklanır.

Renk ayıracı (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 (101.1 g/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 CO<sub>3</sub>/HCO<sub>3</sub>):

a) 1.06 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> bir miktar distile su ile balon jodede çözüldürülür ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözültisi elde edilir.

b) 0.84 g NaHCO<sub>3</sub> bir miktar distile su ile balon jodede çözüldürülür ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> çözültisi elde edilir.

Karbonat tamponu hazırlanması için; 100 ml 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözültisi üzerine, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> ilave edilerek pH 9.7'ye ayarlanır. Hazırlanan tampon çözülti 4 °C ısıda saklanır.

Arginin çözültisi (50 mM): 0.87 g L-arginin balon jodede bir miktar distile suda çözüldürülür. 0.1 M HCl ile pH 9.7'ye ayarlanır. Distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan çözülti 4 °C ısıda saklanır.

MnCl<sub>2</sub> çözültisi (9 mM): 1.456 g MnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O bir miktar distile su ile balon jodede çözüldürülür ve 1000 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan çözülti 4 °C ısıda saklanır.

Üre standardı (0.5 µmol üre/ml): 3 mg üre, 100 ml 0.016 M benzoik asit çözültisi içinde çözüldürülür. Deney sırasında kullanılan standart konsantrasyonu 0.2 µmol üre/ml olarak belirlendiğinden, stok çözülti sulandırılarak kullanılacak olan konsantrasyon elde edilir. Üre standart çözültisi 4 °C ısıda saklanır.

## 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  $MnCl_2$  çözeltisi ile 1/50 oranında sulandırıldı. Örnek 55 °C'lik su banyosunda 20 dakika preinkübasyona bırakıldı.

Bu aşamada deney ve sıfır zaman tüplerine, 0.4 ml 50 mM'lık arginin çözeltisi ve 0.4 ml 100 mM'lık karbonat tamponundan konuldu. Kör tüpüne 1 ml distile su, standart tüpüne ise 1 ml üre standardı (0.2  $\mu$ mol/ml) konuldu. Ardından da enzimatik reaksiyonu engellemek amacı ile 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'ye gelen 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 tüm tüplerin ağızları kapatıldı ve tüpler 10 dakika kaynar su banyosunda bırakılarak renk oluşumu sağlandı. Deney sonunda tüpler musluk suyu altında soğutulularak, numunelerin absorbansları 520 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüldü.



## Doku arginaz enzim aktivitesinin hesaplanması

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

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

50: Süpernatantın  $\text{MnCl}_2$  sulandırılma katsayısı

5: Süpernatantın inkübasyon ortamındaki sulanma katsayısı

4: İnkübasyon süresinin 1 saatte tamamlanma katsayısı

0.2  $\mu\text{mol üre/ml'nin absorbansı}$ : 0.685 olarak okunmuştur.

$$\text{Faktör} = (0.2 \mu\text{mol üre/ml}) \times 50 \times 5 \times 4 / 0.685$$

Faktör = 291.97 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 (291.97) ile çarpılmıştır. Tümör dokusu için;  $\mu\text{mol üre/ml/saat}$  olarak enzim aktiviteleri bulundu ve ünite olarak tanımlandı.

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

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 ( $\mu\text{mol üre/mg protein/saat}$ ); olarak belirtilmiştir.

## **Meme Dokusu Ornitin Düzeyinin Chinard Yöntemi İle Ölçümü**

Chinard yöntemi (76) prensibi; Ornitin ninhidrin ile oluşturduğu mor renkli kompleksin kolorimetrik olarak ölçümüne dayanır.

### **Gerekli Ayıraçlar**

Trikloro asetik asit (TCA) çözeltisi (%10): 10 g TCA tartılır, bir miktar distile suda çözündürülür ve 100 ml'ye tamamlanır.

Ninhidrin ayıracı: 2.5 g ninhidrin, 40 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (6 N) ve 60 ml glasiyel asetik asit içinde çözündürülür.

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

Stok ornitin solüsyonu (0.3 µmol/ml): 0.0506 g L-ornitin tartılır. Bir miktar distile suda çözündürülür ve litreye tamamlanır. Böylece 0.3 µmol/ml'lik ornitin konsantrasyonu elde edilir. Deneyde kullanılan standart konsantrasyonu 0.18 µmol/ml olduğundan, stok ornitin çözeltisi dilüe edilerek bu konsantrasyon elde edilir.

### **Deneysel İşlemler**

Çalışılacak doku homojenizatı %10'luk TCA ile 1/1 oranında sulandırılarak 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 µmol/ml'lik ornitin standartı konuldu. Sonra tüplere sırasıyla 2.5 ml glasiyel asetik asit ve 0.25 ml ninhidrin ayıracı eklendi. Bütün tüpler vortekslenerek karıştırıldıktan sonra 30 dakika kaynar su banyosunda tutuldu. Su banyosundan çıkarılan tüpler hızla soğutulularak, 515 nm'de tüplerdeki numunelerin absorbanları spektrofotometre yardımı ile ölçüldü.

## Ornitin Düzeyinin Hesaplanması

Ornitin değerinin hesaplanması için şu formülü kullanılmıştır.

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

2: TCA ile sukandırılma katsayısı

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

0.848: Standart ornitinin absorbans değeri

Ornitin ( $\mu\text{mol/ml}$ ) = Deney numuneleri absorbansı  $\times$  0.424 olarak formüle edildi. Elde edilen ornitinin değerleri protein miktarına bölünerek ( $\mu\text{mol/mg}$  protein) standardize edildi.

## Meme Dokusu Protein Düzeyinin Lowry Yöntemi ile Ölçülmesi

Doku protein düzeyleri Lowry yöntemi ile tayin edildi (77). Bu yöntem alkali bakır tartarat ayırıcının peptid bağları ile kompleks yapması prensibine dayanmaktadır. Her yedi ya da sekiz aminoasit artığı bir bakır atomunu bağlar. Fenol Ayırıcı; bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mavi-mor renk oluşur. Oluşan renk konsantrasyonu 660 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

## Gerekli Ayıraçlar

Fenol ayırıcı: 2 N folin ayırıcından 2.5 ml alınarak, üzerine 42.5 ml distile su ilave edilir. Bu ayıraç her kullanım için taze hazırlanmalıdır.

Alkali bakır ayıracı: 10 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 250 mg Na-K Tartarat, 50 mg CuSO<sub>4</sub>; ayrı ayrı tartılarak, bir miktar 0.5 N NaOH çözeltisi içinde balon jodede çözünür ve 0.5 N NaOH çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlanır.

Albumin standardı (%5 mg): 5 mg albümin tartılarak bir miktar distile suda çözündürülür ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Deneyde kullanılacak olan standart %2 mg olarak belirlendiğinden, stok protein standardı dilüe edilerek 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 mg'lık 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 karıştırıldı. 30 dakika 37 °C'lik su banyosunda bekletildikten sonra; tüplerin köre karşı absorbansları 660 nm dalga boyunda spektrofotometre ile okundu.

### **Protein düzeyinin hesaplanması**

Deneyde ölçülen absorbanslar daha sonra aşağıdaki formülde yerine konarak protein düzeyleri hesaplandı.

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

50: Süpernatantın serum fizyolojik ile sulandırılma katsayısı

2: Süpernatantın 1 ml'ye tamamlanma katsayısı

2: Protein standartının konsantrasyonu

0.220: Standart proteinin absorbansı

$$\text{Protein miktarı (\% mg protein)} = \frac{\text{Deney absorbansı} \times 50 \times 2 \times 2}{0.220}$$

Protein miktarı (% mg protein) = Deney Absorbansı x 909.1 olarak formüle edilmiştir. Elde edilen % mg protein, 100 ml'deki protein değeridir. Sonuç 100'e bölünerek protein miktarı mg/ml olarak hesaplandı.

### **Serum Arginaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi**

Serum arginaz aktivitesi; substrat olan argininin örnekteki arginazla hidrolizi sonucunda oluşan üre miktarının spektrofotometrik olarak saptanmasıyla belirlenmiştir (78). Yöntemde bazı revizyonlar yapılmıştır (96).

#### **Gerekli ayıraçlar**

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

Asit karışımı: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (%96), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%85), H<sub>2</sub>O 1:3:7 oranlarında alınarak asit karışımı hazırlanır.

ISPF ( $\alpha$ -Isonitro-sopropiophenone) (%9): 0.9 g ISPF tartılır ve %100'lük etanol içerisinde çözündürülerek 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.

MnCl<sub>2</sub> çözeltisi (10 mM): 1.6187 g MnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O bir miktar distile su ile balon jodede çözündürülür ve distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 4 °C ısıda saklanır.

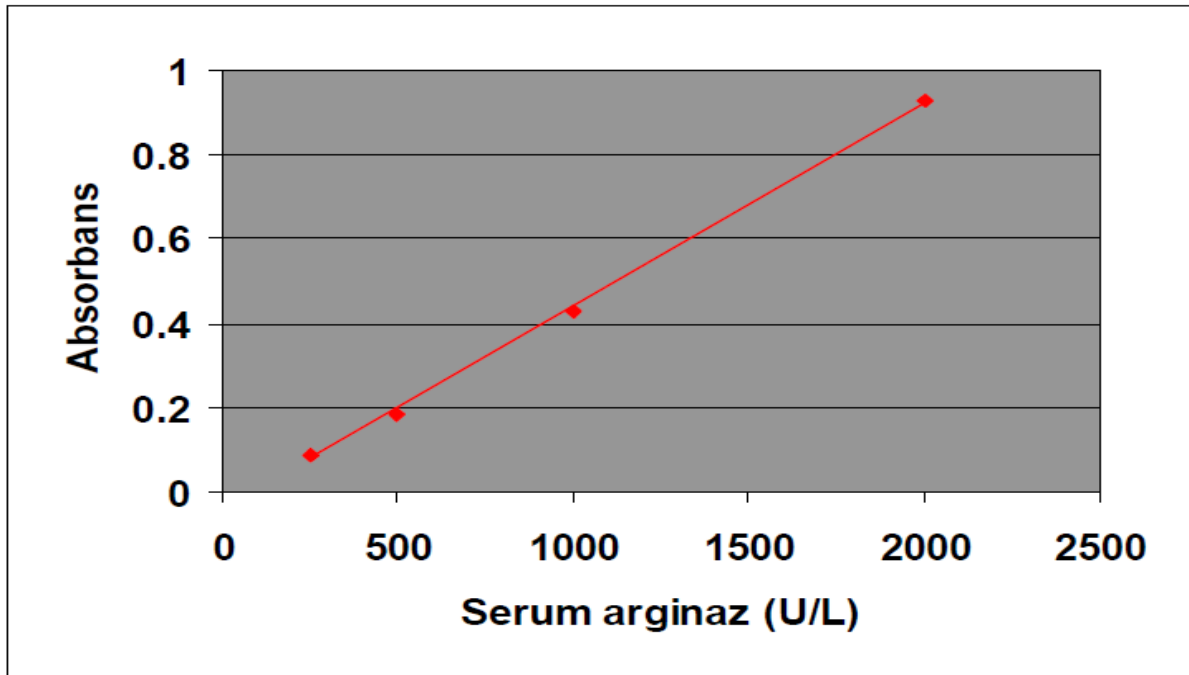
Tris-HCl çözeltisi (25 mM): 3.0285 g tris tartılır bir miktar distile su ile balon jodede çözülür ve 1000 ml'ye tamamlanır. 2 M'lık HCl çözeltisi ile pH 7.5'e ayarlanır.

### **Deneysel işlemler**

Numaralandırılmış deney, kör ve standart tüpleri hazırlandı. Deney tüplerine 100 µl örnek üzerine 100 µl triton-X-100 konuldu ve 30 dak. Oda ısısında çalkalamaya bırakıldı. Daha sonra bu tüplerden 100 µl alınarak üzerine 100 µl tris çözeltisi ilave edildi ve bu tüplerden 100 µl çekilerek üzerine 10 µl  $MnCl_2$  çözeltisi ilavesi edildi. 10 dak 56 °C'de preinkübasyona bırakıldı. Üzerine 100 µl arginin çözeltisi ilave edildikten sonra 37 °C'de 1 saat boyunca inkübe edildi. Daha sonra üzerine 900 µl asit karışımı ve 40 µl ISPF çözeltisi ilave edilerek, 30 dakika kaynar su banyosuna bırakıldı. Tüplerdeki numunelerin 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 13).



Şekil 13. Üre standart çalışması regresyon grafiği (96).

## **NO Tayini**

NO tayini: Cortas ve Wakid yöntemi (79) kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü.

### **Gerekli ayıraçlar**

Kadmiyum granülleri: 0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içinde saklandığı sürece 9 ay stabildir.

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

Sülfanilamid: 5 g sülfanilamid, 3 M sıcak HCl içinde çözüldü ve daha sonra soğumaya bırakıldı. Bu çözelti 1 yıl oda sıcaklığında saklanabilir.

N-Naphthylethylene diamine (NNDA): 50 g NNDA 250 ml distile su içinde çözüldürüldü. Bu çözelti 2 ay 0-8 °C'de saklanabilir.

Çinko sülfat (ZnSO<sub>4</sub>) (75 mmol): 10.8 mg tartıldı ve distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

Bakır sülfat (CuSO<sub>4</sub>) (5 mmol): 250 mg tartıldı ve distile su ile 200 ml'ye tamamlandı.

Sodyum hidroksit (NaOH) (55 mmol): 1.1 g tartıldı ve distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

Standartlar: NaNO<sub>2</sub> standardı, sodyum tetra borat çözeltisi (10 mmol) içinde hazırlandı (69 mg NaNO<sub>2</sub> ve 380 mg borat (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O) 100 ml içinde çözüldürüldü).

KNO<sub>3</sub> standardı: 102 mg potasyum nitrat tartıldı, 100 ml sodyum tetra borat (10 mmol) içinde çözüldürüldü.

### **Deneysel işlemler**

Deproteinizasyon: Test tüpüne 0.5 ml distile su, 2 ml ZnSO<sub>4</sub>, 2.5 mL NaOH ilave edilip 10 dakika oda ısısında beklettikten sonra 4000 rpm' de 20 dakika santrifüj edildi.

Kadmiyum granüllerinin aktivasyonu: Granüller 3 defa distile su ile yıkandı. 1-2 dakika CuSO<sub>4</sub> içinde çalkalanarak bekletilip, 3 defa da Glisin- NaOH çözeltisi ile yıkayıp 10 dakika içinde kullanılmak üzere kurutma kağıdı ile kurutuldu.

Sonucun hesaplanması:  $KNO_3$ 'un 10 milimolarlık çözeltisinden 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 200 milimolarlık seri dilüsyonlar hazırlandı ve numunelere uygulanan tüm işlemler standartlara da uygulandı. 1ml glisin-NaOH çözeltisi tüm tüplere konuldu. Deproteinize numunelerden ve standartlardan 1 ml 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 NNDA çözeltisi ilave edildi. Karıştırıldı ve 45 dk. beklendikten sonra 545 nm'de numunelerin konsantrasyonları tayin edildi.

Direkt nitrit ölçümü:  $NaNO_2$  standartlarını 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 200 milimolarlık seri dilüsyonlar 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 dk. sonra 545 nm'de numunelerin konsantrasyonları tayin edildi.

#### **Nitrat aktivitesinin hesaplanması**

Bulunan nitrat değerlerinden nitrit değerleri çıkarıldıktan sonra sulandırma faktörü olan 20 ile çarpıp yine nitrat standardından elde edilen faktör ile çarptıktan sonra çıkan sonuç milimol/litre olarak hesaplandı.

#### **İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME**

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

Tümör kontrol ve tedavi grubu arasındaki arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve NO 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 ve NO düzeyleri ölçülürken, serum örneklerinde ise arginaz enzim aktiviteleri ve NO düzeyleri ölçüldü. Gruplar arası ikili karşılaştırmalar non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Serum örneklerinde arginaz enzim aktiviteleri ve NO düzeylerinin ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 2'de, doku örneklerinde arginaz enzim aktiviteleri, ornitin ve NO düzeylerinin ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 4'de gösterilmiştir.

**Tablo 2. Grupların serum NO düzeyleri ve arginaz enzim aktiviteleri**

<b>Grup</b>	<b>Serum NO Düzeyi (mmol/L) ORT±SD</b>	<b>Serum Arginaz Aktivitesi (U/L) ORT±SD</b>
1. grup (n=10)	7.56±0.65	30.0±7.01
2. grup (n=9)	8.10±0.70	26.2±2.29
3. grup (n=8)	8.21±0.76	57.4±13.5
4. grup (n=9)	8.30±1.89	41.8±10.4
5. grup (n=8)	10.3±1.13	44.3±7.62

Serum arginaz enzim aktivitelerinin tümör grubunda sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış gösterdiği saptanmıştır ( $p<0.001$ ). Tedavi gruplarında ise nor-NOHA tedavisinin serum arginaz aktivitesini tümör grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürdüğü gözlenmiştir ( $p=0.015$ ).

Serum NO düzeylerinde, tümör grubunda sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ). 4. grupta ise tümör grubuna göre bir artış gözlenmiş fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ( $p>0.05$ ). 5. grupta ise nor-NOHA tedavisinin tümör grubuna göre NO düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırdığı bulunmuştur ( $p=0.003$ ) (Tablo 3).

**Tablo 3. Gruplar arası istatistikler karşılaştırmalar**

Gruplar	Serum Arginaz Aktivitesi		Serum NO Düzeyi	
	p	z	p	z
Grup 1 ve 3	<0.001	-3.465	0.083	-1.734
Grup 3 ve 4	0.015	-2.406	0.606	-0.577
Grup 3 ve 5	0.015	-2.415	0.003	-2.840

**Tablo 4. Grupların doku ornitin, NO düzeyleri ve arginaz enzim aktiviteleri**

Grup	Doku Arginaz Aktivitesi (U/mg protein) ORT±SD	Doku Ornitin Düzeyi ( $\mu\text{mol/mg protein}$ ) ORT±SD	Doku NO Düzeyi ( $\mu\text{mol/mg protein}$ ) ORT±SD
3.grup (n=8)	62.8±23.4	0.073±0.052	52.4±14.2
4. grup (n=9)	43.5±18.4	0.059±0.040	53.0±9.67
5. grup (n=8)	35.8±13.9	0.048±0.019	48.4±17.2

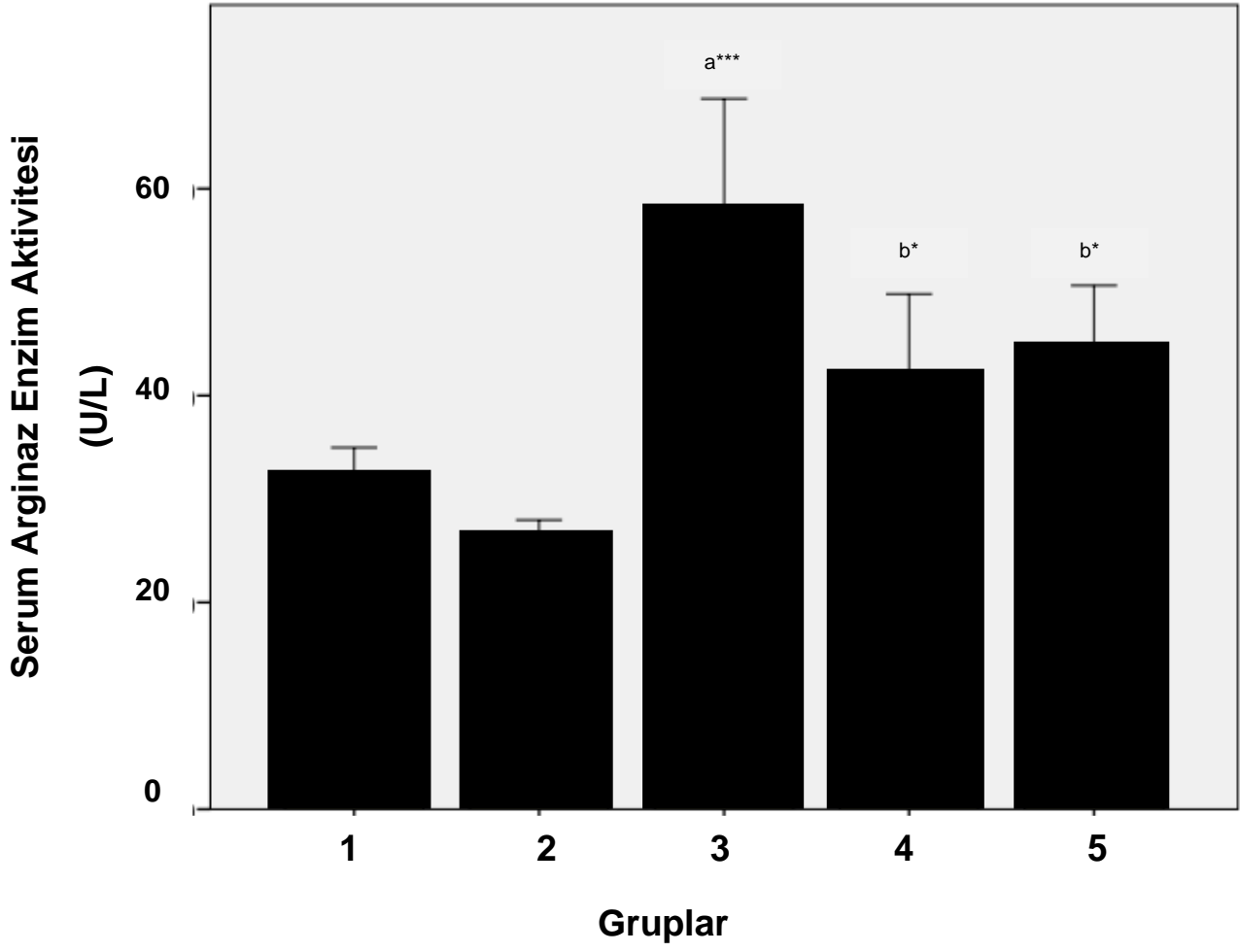
Doku örneklerine bakıldığında, tümör grubunda artmış olan arginaz enzim aktivitesinin nor-NOHA tedavisi ile 5. grupta istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı gözlenmiştir ( $p=0.01$ ). 4. grupta ise azalan enzim aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

Doku ornitin düzeylerinde ise tümör grubunda yükselen ornitin düzeyi nor-NOHA tedavisi ile azalmış fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

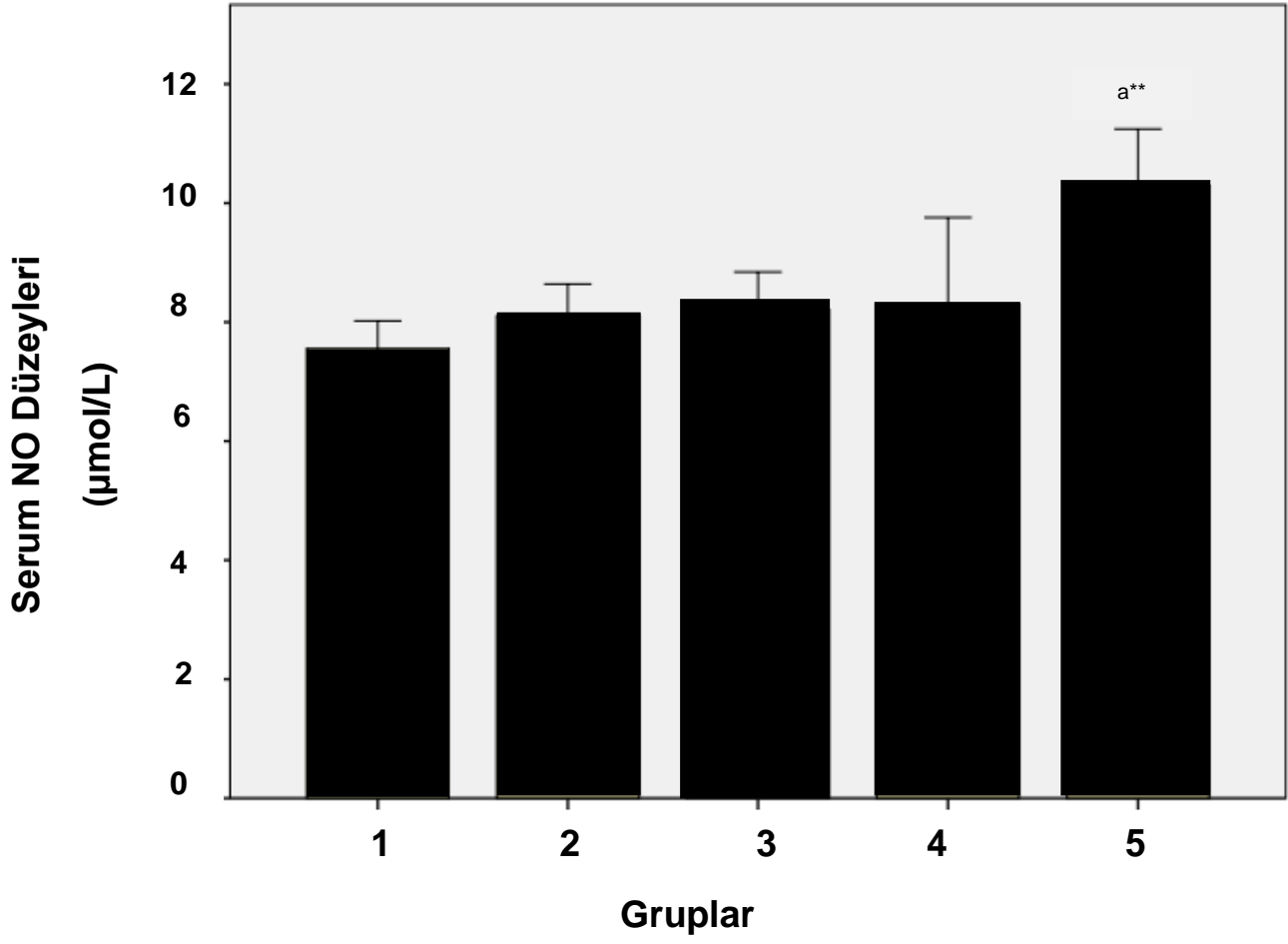
Doku NO düzeyleri ele alındığında; tedavi ve tümör grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ) (Tablo 5).

**Tablo 5. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar**

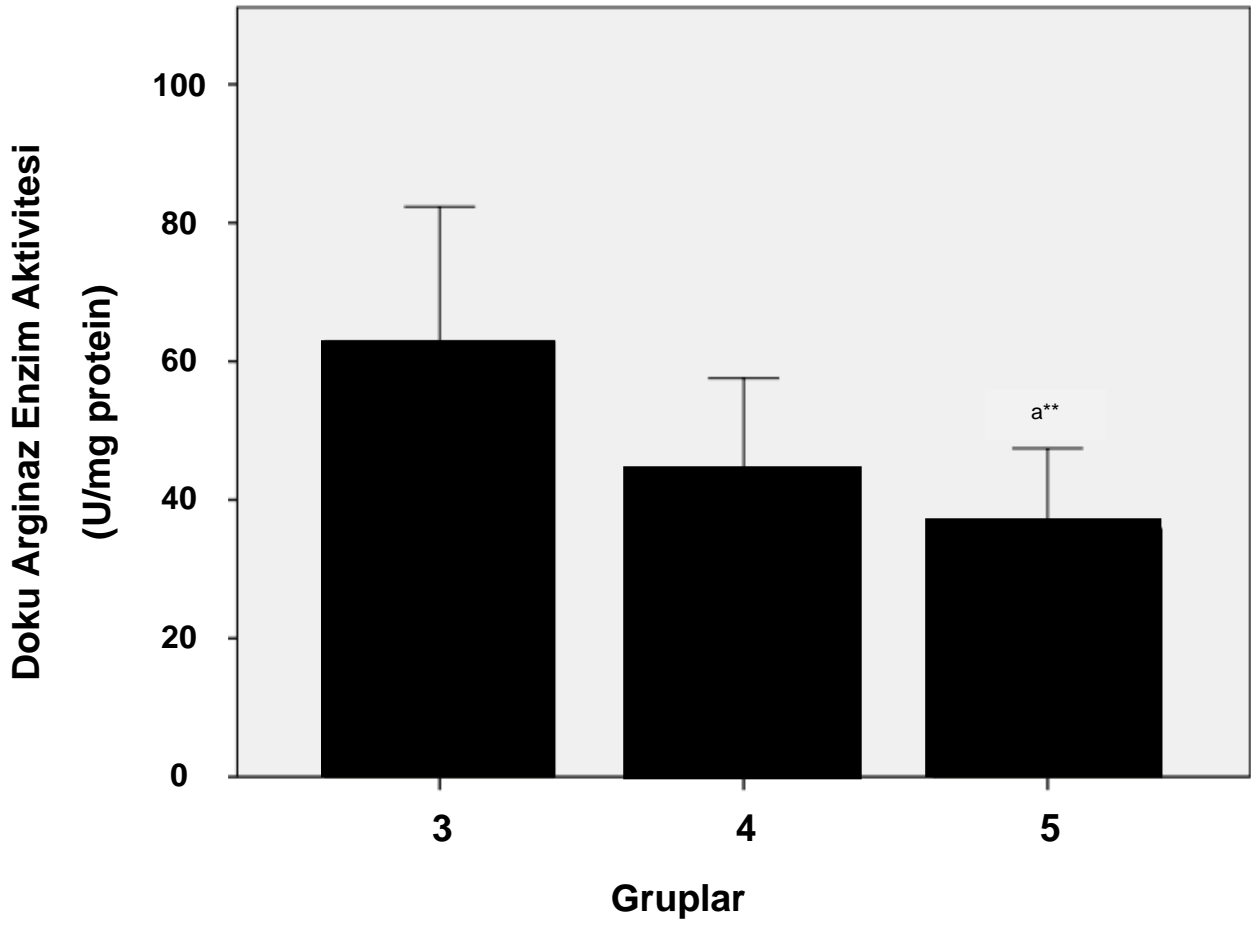
Gruplar	Doku Arginaz Aktivitesi		Doku Ornitin Düzeyi		Doku NO Düzeyi	
	p	z	p	z	p	z
Grup 3 ve 4	0.167	-1.443	0.541	-0.674	0.963	-0.096
Grup 3 ve 5	0.010	-2.521	0.645	-0.526	0.645	-0.525



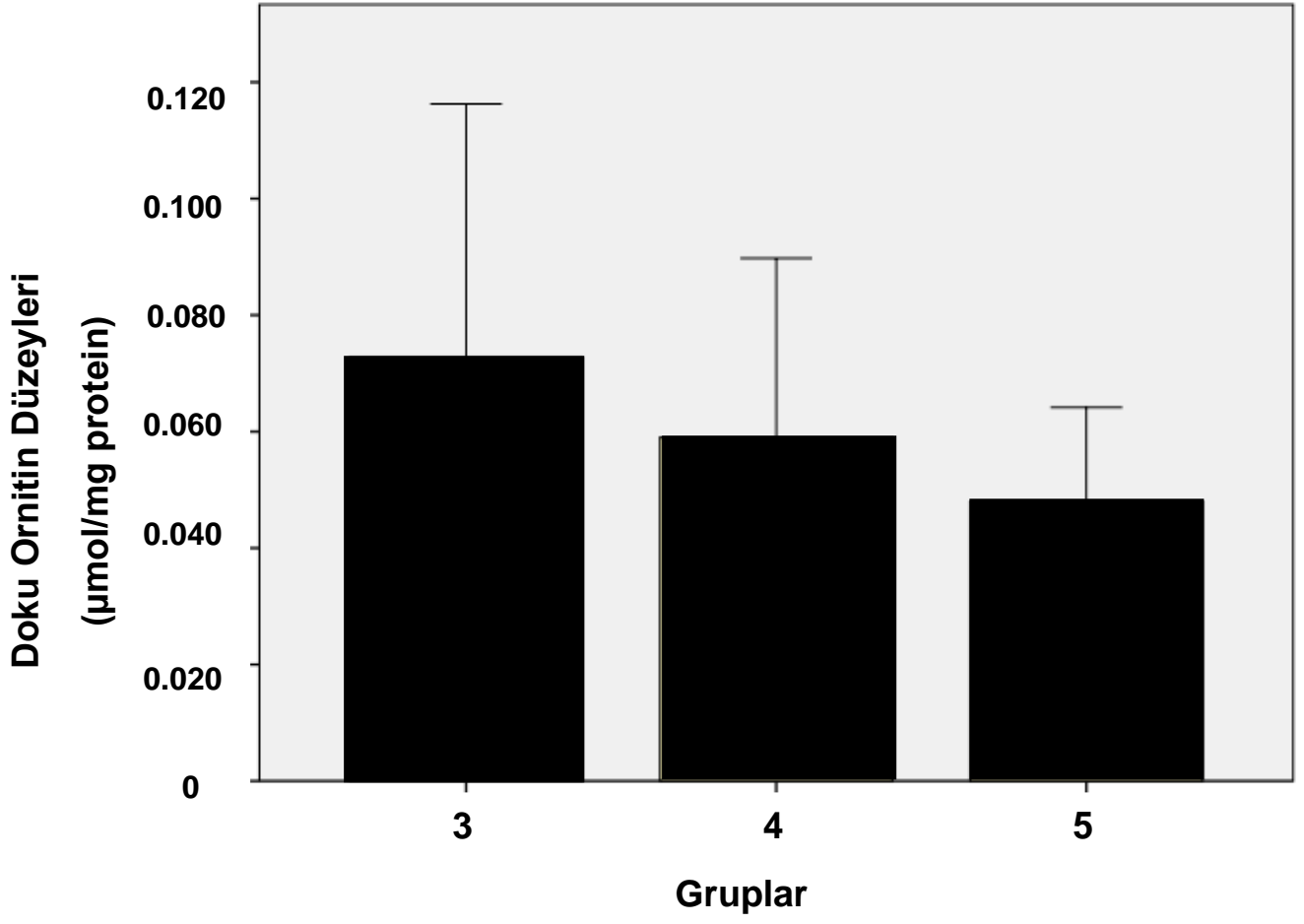
Şekil 14. Serum Arginaz Enzim Aktiviteleri: a: Grup 1 ile, b: Grup 3 ile,  
\*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ .



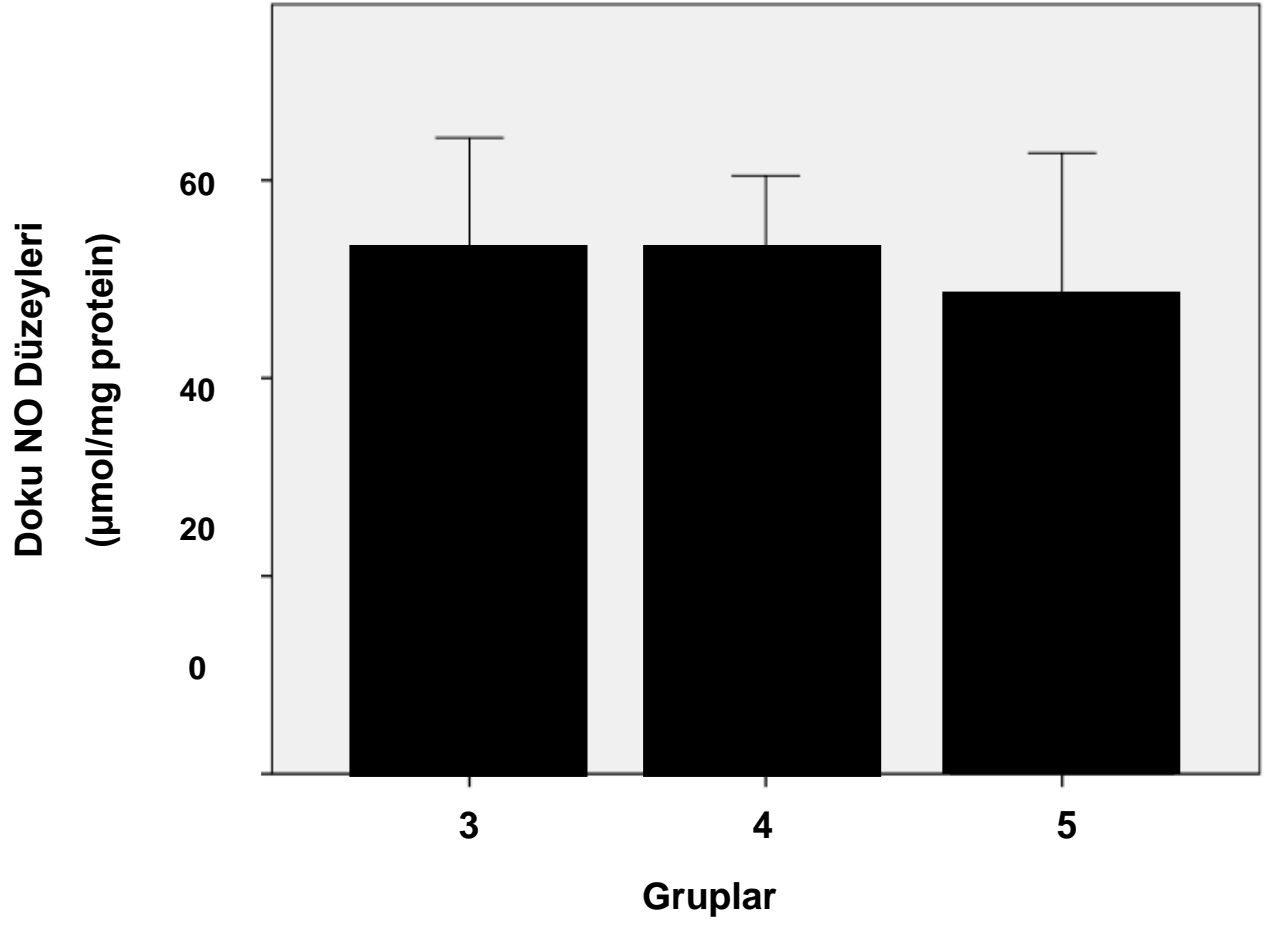
Şekil 15. Serum NO Düzeyleri: a: Grup 3 ile, \*\*p<0.01.



Şekil 16. Doku Arginaz Enzim Aktiviteleri: a: Grup 3 ile, \*\*p=0.01.



Şekil 17. Doku Ornitin Düzeyleri



Şekil 18. Doku NO Düzeyleri



## TARTIŞMA

Arginaz; üre sentezinden sorumlu L-arginini substrat olarak kullanan bir enzimdir (1). L-arginin; NO, sitrüllin, agmatin, kreatin ve protein sentezi içinde substrat olarak kullanılır. Fakat L-arginin metabolizmasında baskın olan yolağın, arginazın üre sentezinde anahtar enzim olarak kullanılan reaksiyon olduğu belirtilmiştir (80). Arginaz enzim aktivitesi varlığı, meme bezi, barsak, beyin, böbrek ve akciğer gibi ekstrahepatik organlarda da bulunmuştur (81). Ekstrahepatik arginazın hücre üremesi ve doku tamiri gibi düzenleyici mekanizmalarda rol oynadığı öne sürülmüştür (82).

Arginazın kanserle olan ilişkisi de birçok çalışmada belirtilmiştir. Yapılan bu çalışmalar; kalın barsak, kolorektal, prostat, mide ve akciğer kanseri gibi çeşitli kanser vakalarında serum ve doku arginaz aktivitesinin arttığını göstermiş, bu bilgiler ışığında arginazın kanser vakalarında belirleyici bir enzim olabileceği öne sürülmüştür (31,52,54,83). Meme kanserli hastalarda yapılan çalışmalarda da serum arginaz aktivitesi, sağlıklı kadınların serum arginaz aktivitesinden yüksek bulunmuştur (28,84).

Ornitin, poliaminler denilen grubun öncül maddesidir. Poliaminlerin (spermin, spermidin ve pütresin), hücrelerde nükleotit ve protein sentezini uyararak hücre proliferasyonunda önemli rol oynadıkları, hücre büyümesi ve farklılaşması için gerekli oldukları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (41,58). Poliaminlerin aynı zamanda

kanser gelişimi ile yakından ilişkisi bulunmuştur (85). Poliamin düzeylerinin meme kanserinde arttığı, tümör poliamin konsantrasyonları ile tümörün yeniden nüksetmesi arasında pozitif bir ilişki olduğu, meme kanserinde poliamin düzeylerinin biyolojik bir belirteç olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir (84).

Meme tümör dokusunda poliamin sentezinin artış nedeni bilinmemektedir. Yüksek östrojen içeriğinin poliamin sentezini indükleyerek meme kanser gelişimine yol açabileceği öne sürülmüştür (29).

Arginaz enzimiyle aynı substratı kullanan NOS, L-arginini NO ve sitriline parçalayan enzimdir (80). Kanserde arttığı bilinen arginaz enzimi ve NOS, arginin için birbirleriyle yarışır (86). Arginazın L-arginin için Km'i 2-20 mM, bu değer NOS için ise 1-20  $\mu$ M'dür (87). Fakat arginaz enziminin fizyolojik pH'da Vmax değeri NOS enzimininkinden 1000 kat fazla olduğundan (88) bu iki enzimin, L-argininin düşük konsantrasyonlarında bile onu rahatlıkla kullanılabileceğini göstermektedir (29).

İlginç bir biyomolekül olan NO'nin birçok biyolojik etkisi bulunmuştur (8). NO'nin tümör oluşumu mekanizması üzerine etkisi tam olarak bilinmemekle birlikte, birçok fizyolojik mekanizmada NO ve NO metabolitlerinin (nitrat, nitrit, S-nitrotiyoller, nitrozaminler ve peroksinitrit), NO'nin sitotoksik ve genotoksik etkilerini ortaya çıkarmada önemli olduğu ortaya konmuştur. Bu etkiler mitokondrial solunumun inhibe edilmesi, DNA ve protein hasarı sonucu gen mutasyonu, protein fonksiyonunun kaybı, nekroz ve hücre ölümü şeklindedir (89). NO'nin kanser gelişimi yönünde negatif etkisinin olduğu gösterilmiştir. Hem birçok fizyolojik mekanizmanın gerçekleşmesi için gerekli olan, hem de aşırı miktarda üretimi durumunda radikalik etki gösteren NO; organizmada çift yönlü etki oluşturmaktadır (86). NO'nin immünojenik reaksiyonda da fonksiyonu olduğu düşünülmektedir. Artmış NO'nin, vazodilatasyon, trombosit agregasyonunun engellenmesi ve dokuların oksijenlenmesi yönünde yararlı etkileri olduğu bulunmuştur (90). Aynı zamanda NO ve NO metabolitlerinin tümör dokularında hücre büyümesi ve metastazı inhibe ettiği (89), NO'nin yüksek konsantrasyonlarında tümör gelişimini inhibe edebileceği (91) ve tümör hücrelerinde bu yolla apoptozisin indüklenebileceği belirtilmiştir (92). NO'nin kanser tedavisinde immünoterapi ve kemoterapide etkili olabileceği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (8).

Meme kanserli hastalarda, tümör dokusu ve serum arginaz aktiviteleri ile ornitin düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu ve bunun sonucunda artan poliamin

sentezinin kanser gelişimi yönündeki mekanizmayı tetikleyebileceği yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (4,54,93). Bizim çalışmamızda da tümör grubunda artmış arginaz aktivitesi bu teoriyi desteklemektedir.

Nor-NOHA (N<sup>w</sup>-Hidroksi-nor-L-Arginine) yüksek affinite gösteren, güçlü ve geri dönüşümlü bir arginaz inhibitörüdür. Enzimin aktif bölgesindeki Mn<sup>2+</sup> dizilerine spesifik olarak bağlanır ve enzimi inhibe eder. NOS'un substratı veya inhibitörü değildir (9).

Meme kanserli hayvanlara uyguladığımız nor-NOHA tedavisinin serum arginaz enzim aktivitesini anlamlı bir şekilde azalttığını gözlemlerken, aynı şekilde NO düzeylerinde tümör grubuna göre iki kat fazla madde verilen grupta anlamlı şekilde bir artma gözlemlendi. Nor-NOHA'nın serum arginaz enzim aktivitesini düşürürken NO düzeyini arttırması, kanserin gelişiminin engellenmesi yönünde olumlu bir etki olarak değerlendirilebilir. Doku örneklerinde ise yine uyguladığımız nor-NOHA tedavisinin arginaz enzim aktivitelerini anlamlı şekilde düşürdüğünü gözlemledik. Arginaz enzim aktivitesi ile beraber düşmesi beklenen ornitin düzeylerinde azalma meydana gelmiş fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Doku NO düzeylerinde ise anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Arginaz enzim inhibisyonu sonucunda azalan ornitin ve bunun sonucu olarak azalacak poliamin düzeyleri, ayrıca kanserde olumlu etkileri belirtilmiş olan artmış NO düzeyleri, kuvvetli bir arginaz inhibitörü olan nor-NOHA'nın antikarsinojenik bir ajan olarak kullanılabilme potansiyeli olduğuna işaret edebilir.

Sonuç olarak, arginaz enzim inhibitörü olan nor-NOHA'nın, meme kanserli hastalarda yükselen arginaz enzim aktivitesini inhibe ederek yolağı NOS üzerinden NO oluşumuna kaydırması, bu sayede karsinojenik rolü belirtilen poliaminlerin öncü maddesi olan ornitin sentezini azaltması ve kanserde koruyucu etkileri çalışmalarla gösterilmiş olan NO üretimini arttırması, nor-NOHA'nın antikarsinojenik etkisini gösterebilmesindeki mekanizmalardan biri olabilir. Kanser tedavisinde umut verici bir ajan olan nor-NOHA'nın bu alandaki etkileri daha ileri çalışmalar ve yeni parametreler ile desteklenmelidir.

## SONUÇLAR

Yapılan çalışmalarda; kalın barsak, kolorektal, prostat, mide ve küçük hücreli akciğer kanseri gibi çeşitli kanser vakalarında arginaz enzim düzeyinin arttığı belirtilmiştir. Nor-NOHA yüksek affinite gösteren güçlü ve geri dönüşümlü bir arginaz inhibitörüdür.

Bu çalışmada; meme kanseri geliştirilmiş farelerde arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve NO düzeyleri üzerinde nor-NOHA'nın etkileri araştırılmıştır. Yaptığımız bu deneysel çalışma sonucunda;

- 1) Serum arginaz enzim aktivitesi, tümör gruplarında sağlıklı kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.
- 2) Serum NO düzeyinde iki kat doz verilen tedavi grubunda, tümör grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir.
- 3) Serum arginaz enzim aktivitesinin tedavi sonrası istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı saptandı.
- 4) Tümör doku örneklerinde nor-NOHA tedavisi sonucunda arginaz enzim aktivitesinde düşüş meydana gelmiş, bu düşüşün iki kat doz tedavi verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir.
- 5) Nor-NOHA tedavisi sonucunda azalan arginaz aktivitesi doğrultusunda, ornitin düzeylerinde de azalma meydana gelmiş fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
- 6) Nor-NOHA tedavisinin doku NO düzeylerine etkisi olmamıştır.

- 7) Nor-NOHA'nın meme kanserinde serum arginaz enzim aktivitesini inhibe ederek poliamin sentezini baskılaması ve kanserde koruyucu rolü bilinen NO düzeyini arttırarak kansere karşı koymada koruyucu rol oynayabileceği düşünülebilir.
- 8) Nor-NOHA'nın meme kanserine karşı potansiyel bir koruyucu ajan olarak kullanılmasının arginaz/poliaminler/NO mekanizması açısından olumlu bazı etkileri olabilir. Fakat bu olumlu etkilerinin daha net bir şekilde ortaya konulması gerekmektedir. Bu da ancak nor-NOHA'nın diğer kanser parametreleri ve mekanizmaları üzerindeki etkilerinin ileri çalışmalarla incelenmesi ile mümkün olabilecektir.

## ÖZET

Meme kanseri, dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümör olup kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır.

Üre döngüsünün anahtar enzimi olan arginaz, nitrik oksit sentaz ile aynı substratı kullanarak L-argininden üre ve ornitin oluşturmaktadır. Kanserli hastalarda arginaz enzim aktivitesinin arttığı ve arginazın kanserde biyolojik bir belirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. Bu çalışmada meme kanseri oluşturulmuş farelerde serum arginaz enzim aktivitesi ve nitrik oksit düzeylerine, dokuda ise arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve nitrik oksit düzeylerine, bir arginaz enzim inhibitörü N<sup>ω</sup>-Hidroksi-nor-L-Arginin'in etkileri araştırılmıştır.

Çalışmada 50 tane erkek Balb/c cinsi fare kullanıldı. Farelerin sol ayak iç bölgesine 0.2 ml ehrlich asit tümör hücresi enjekte edildi. Fareler sağlıklı kontrol, sağlıklı tedavi, tümör kontrol, tedavi 1 ve tedavi 2 grupları olmak üzere 5 gruba ayrıldı ve kontrol grupları hariç diğer gruplara 10 mg/kg ve ikinci tedavi grubuna 20 mg/kg N<sup>ω</sup>-Hidroksi-nor-L-Arginin 13 gün boyunca intraperitoneal olarak verildi.

Tümörlü hayvanların serumunda artmış bulunan arginaz enzim aktivitesinin N<sup>ω</sup>-Hidroksi-nor-L-Arginin tedavisi ile birlikte istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi (p<0.05). Serum nitrik oksit düzeylerinin, N<sup>ω</sup>-Hidroksi-nor-L-Arginin tedavisi ile yükseldiği saptandı. Doku arginaz enzim, tedavi grubunda tümör grubuna

göre anlamlı olarak düşük bulunurken ( $p=0.01$ ), doku ornitin düzeylerinin tedavi grubunda tümör gruplarına göre azalma gözlemlendi fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Sonuç olarak,  $N^{\omega}$ -Hidroksi-nor-L-Arginin'in arginaz enzim aktivitesini inhibe ederek yolağı nitrik oksit sentaz üzerinden nitrik oksit oluşumuna kaydırıldığı, bu sayede poliaminlerin öncü maddesi olan ornitin sentezini azalttığı ve nitrik oksit üretimini teşvik ederek kansere karşı koruyucu bir rol oynayabileceği ifade edilebilir. Kansere tedavisinde umut verici bir ajan olan  $N^{\omega}$ -Hidroksi-nor-L-Arginin'in bu alandaki etkileri daha ileri çalışmalar ve yeni parametreler ile desteklenmelidir.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, arginaz, ornitin, nitrik oksit,  $N^{\omega}$ -Hidroksi-nor-L-Arginin.

**EFFECTS OF nor-NOHA ON ARGINASE ENZYME ACTIVITY,  
ORNITHINE AND NITRIC OXIDE LEVELS IN THE EXPERIMENTAL  
BREAST CANCER**

**Gürer KELEŞOĞLU**

**SUMMARY**

Breast cancer forms almost 30% of all the cancer types which makes it the most frequent tumor type found in women around the world.

As a key enzyme of the urea cycle, it leads to the formation of urea and ornithine from L-arginine by using the same substrate with nitric oxide synthase. In the patients with cancer, arginase has been found to be higher and was reported to be a useful biological marker. The aim of this study was to investigate the possible effects of N<sup>ω</sup>-Hydroxy-nor-L-Arginine which as an arginase inhibitor, on arginase enzyme activity, ornithine and nitric oxide levels in the experimental model of breast cancer in mice.



In the study, 50 male Balb/c mice were used 0.2 ml Erhlich acid tumor cell was injected into the subcutan part of their left foot.

Mice were divided into five groups as healthy control group, healthy treatment, tumour control, treatment 1 and 2 groups. 10 mg/kg and 20 mg/kg dose N<sup>ω</sup>-Hydroxy-nor-L-Arginine were given intraperitoneal.

Increased serum arginase activity was statistically significantly decreased with N<sup>ω</sup>-Hydroxy-nor-L-Arginine treatment. On the other hand, serum nitric oxide levels were increased with N<sup>ω</sup>-Hydroxy-nor-L-Arginine treatment. In the tumour tissue, arginase activity were significantly decreased with N<sup>ω</sup>-Hydroxy-nor-L-Arginine treatment, but a decrease in the ornithine levels were statistically insignificant.

As a conclusion, we may suggest that N<sup>ω</sup>-Hydroxy-nor-L-Arginine may have some protective effect on breast cancer development as inhibits arginase enzyme activity and ornithine levels, precursor of polyamines, and therefore inducing nitric oxide production via nitric oxide synthase. As a promising anticancer agent, the net effects of N<sup>ω</sup>-Hydroxy-nor-L-Arginine in this mechanism should be supported by more advanced studies and new parameters.

Key words: Breast cancer, arginase, ornithine, nitric oxide, N<sup>ω</sup>-Hydroxy-nor-L-Arginine.

## 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. Pegg AE, McCann PP. Polyamine metabolism and function. Am J Physiol 1982;243(5):212-21.
3. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011;61(2):69-90.
4. Stratus B, Cepelak I, Festa G. Arginase, a new marker of mammary carcinoma. Clin Chim Acta 1992;210(1-2):5-12.
5. Mutlu C, Koyutürk M, Karpuz V. Preeklampitik ve normal plasentada endotelial nitrik oksit sentetaz immünreaktivitesinin incelenmesi. Cerrahpaşa J Med 2005;36:109-15.
6. Kuyumcu A, Düzgün PA, Özmen MM, Besler TH. Travma ve enfeksiyonda nitrik oksidin rolü. Ulus Travma Derg 2004;10(3):149-59.
7. Kuşçuoğlu U. Deneysel omurilik yaralanmasında agmatin'in doza bağımlı nöroprotektif etkilerinin incelenmesi (tez). İstanbul: T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Noroşirurji Kliniği; 2004.
8. Bonavida B, Khineche S, Huerta-Yepe S, Garban H. Therapeutic potential of nitric oxide in cancer. Drug Resist Updat 2006;9 (3):157-73.

9. Custot J, Moali C, Brollo M, Boucher JL, Delaforge M, Mansuy D et al. The New Amino Acid N<sup>ω</sup>-Hydroxy-nor-L-Arginine: A High Affinity Inhibitor of Arginase Well Adapted to Bind to Its Manganese Cluster. J Am Chem Soc 1997;119:4086-87.
10. Karayurt Ö. Meme Kanseri.  
[http://www.saglik.gov.tr/extras/birimler/ksdb/meme\\_kanseri.pdf](http://www.saglik.gov.tr/extras/birimler/ksdb/meme_kanseri.pdf)
11. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics 2002. CA Cancer J Clin 2005;55:74-108.
12. Özet A. Türkiye ve dünyada kanser epidemiyolojisi 2000.  
[http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/onkoloji/kanser\\_epidemiyolojisi.htm](http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/onkoloji/kanser_epidemiyolojisi.htm)
13. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. Lancet Oncol 2001;2(9):533-43.
14. Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R, Viale G. Breast cancer. Lancet 2005;365(9472):1727-41.
15. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. CA Cancer J Clin 2000;50(1):7-33.
16. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin 2010;60(5):277-300.
17. Hamzaoğlu O, Özcan U. Türkiye sağlık istatistikleri 2006. Ankara: Türk Tabipleri Birliği Yayınları 2005.
18. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı. 2005 yılı Türkiye Kanseri İstatistikleri.  
<http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-7179/kanser-istatistikleri.html>
19. İlvan Ş. Meme Karsinomu Patolojisi. İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Meme Kanseri Sempozyum Dizisi No: 54;2006:65-71.
20. Meme anatomisi.  
<http://ekosut.com/memeanatomi.htm>
21. Aydın A, Topuz E. Meme kanseri tanı tedavi takip. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2007.
22. Aksilla Mammografisi. <http://www.geocities.ws/radyodiagnostik/tezuc.htm>.
23. Lee H.S. Why is carcinoma of the breast more frequent in the upper outer quadrant? A case series based on needle core biopsy diagnoses. The Breast 2005;14(2):151-52.

24. Tannock IF, Hill RP (eds). The basic science of Oncology. 2<sup>nd</sup> ed. New York: McGraw - Hill, 1992.
25. Bray F, Mc Carron P, Parkin M. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Res* 2004;6:229-39.
26. Erel T. Meme kanseri ve hormon replasman tedavisi, Ovulasyon induksiyon ajanları ve oral kontraseptiflerin etkileri. *Meme Kanseri Sempozyum Dizisi No: 54;2006:43-48.*
27. Nkondjock A, Robidoux A, Paredes Y, Narod SA, Ghadirian P. Diet, lifestyle and BRCA-related breast cancer risk among French-Canadians. *Breast Cancer Research and Treatment* 2006;98:285-94.
28. Porembaska Z, Luboinski G, Chrzanowska A, Mielczarek M, Magnuska J, Baranczyk-Kuzma A. Arginase in patients with breast cancer. *Clin Chim Acta* 2003;328:105-11.
29. Singh R, Pervin S, Karimi A, Cederbaum S, Chaudhuri G. Arginase activity in human breast cancer cell lines: N<sup>ω</sup>-Hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells. *Cancer Research* 2000;60:3305-12.
30. Meram İ, Ahi S, Tarakçıoğlu M. Kanserde serum arginaz aktivitesi. *Van Tıp Derg* 2000;7(1):20-23.
31. Leu SY, Wang SR. Clinical significance of arginase in colorectal cancer. *Cancer* 1992;70(4):733-6.
32. Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood (Çeviri: D. Aslan). *Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler Protein Olmayan Azot Metabolitleri*. Ankara: Palme Yayıncılık; 2005:414-7.
33. Barış N, Turgan N, Ersöz B. Argininin tıpsal biyokimyadaki önemi. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2004;2(2):83-90.
34. Kandemir FM, Özdemir N. L- Lizin ve L- Ornitinin sığır böbrek doku arginaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi. *Fırat Üniv Sağ Bil Derg* 2008;22(1):1-4.
35. Benzer F, Ateşşahin A, Karahan İ. Yüksek dozda gentamisin verilen ratlarda karaciğer ve böbrek arginazı üzerine manganez klorürün etkileri. *Fırat Üniv Sağ Bil Derg* 2006;20(3):239-43.
36. Brock AA, Chapman SA, Ulman EA, Wu G. Dietary manganese deficiency decreases rat hepatic arginase activity. *J Nutr* 1994;124(6):913.

37. Kandemir FM, Özdemir N. Koyun dalak doku arginazının bazı kinetik özellikleri. Fırat Üniv Sağ Bil Derg 2009;15(4):553-9.
38. Özdemir N, Özçelik M. Manda karaciğer ve böbrek doku arginazının fotoinaktivasyonu ve kinetik özellikleri. Türk J Vet Anim Sci 2001;25:995-1000.
39. Porembaska Z, Skwarek A, Mielczarek M, Baraczyk-Kuzma A. Serum arginase activity in postsurgical monitoring of patients with colorectal carcinoma. Cancer 2002;94:2930-4.
40. Kaysen GA, Strecker HJ. Purification and properties of arginase of rat kidney. Biochem J 1973;133:779-88.
41. Rodvell VW. Proteinlerin ve aminoasitlerin metabolizması (çeviri: N. Dikmen). Harper'ın Biyokimyası'nda. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri;2004. s.307-59.
42. Ash DE. Arginine metabolism: enzymology, nutrition, and clinical significance structure and function of arginases. J Nutr 2004;134:2760-4.
43. Schimke RT. Adaptive characteristics of urea cycle enzymes in the rat. The Journal of Biological Chemistry 1962;237(2):459-68.
44. İlhan N, Gülen Ş. Tiroid arginaz enzim aktivitesinin farklı metal iyonları varlığında ısıya karşı stabilitesi. Biyokimya Derg 1993;18:59-67.
45. Erisir M, Ercel E, Yılmaz S, Ozan S. Evaluation of optimal conditions for arginase activity in streptozotocin induced diabetic rats. Vet Met - Czech 2005;50:69-76.
46. Bansal V, Ochoa JB. Arginine availability, arginase, and the immune response. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care 2003;6:223-8.
47. Efron DT, Barbul A. Arginine and nutrition in renal disease. J Ren Nutr 1999;9(3):142-4.
48. Lauharanta J, Käpyaho K. Arginase activity and polyamine biosynthesis in psoriasis. Acta Derm Venereol 1983;63(4):277-82.
49. Anderson WAD, Scott TM. Gelişme bozuklukları. Aykan TB, Tüzüner N, Sav A, İnce G (Editörler). Kısa patoloji'de. İstanbul: Nobel Tıp Yayınevi;1986. s.284.
50. Bjelakovic G, Milenovic D, Zivic R, Nikolic J, Kostic G, Bjelkovic B. Arginase activity in plasma and erythrocytes in children with hematologic diseases. Srp Arh Celok Lek 1998;126(5-6):153-6.

51. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension and mortality in sickle cell disease. *JAMA* 2005;294(1):81-90.
52. Wu CW, Chi CW, Lin EC, Lui WY, Peng FK, Wang SR. Serum arginase level in patients with gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 1994;18(1):84-9.
53. Wu CW, Wang SR, Chang TJ, Lin EC, Chang KL, Huang MH et al. Content of glucocorticoid receptor and arginase in gastric cancer and normal gastric mucosal tissues. *Cancer* 1989;64(12):2552-6.
54. Gökmen SS, Yörük Y, Yorulmaz F, Çakır E, Gülen Ş. Arginase and ornithine as markers in human non-small cell lung carcinoma. *Cancer Biochem Biophys* 1999;17:125-31.
55. Onat T, Emerk K, Sözmen EY. İnsan biyokimyası. Ankara: Palme yayıncılık, 2002:100-17.
56. Morris SM. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *British Journal of Pharmacology* 2009;157:922-30.
57. Kurtuluş H, Eskiocak S, Tütüncüler F, Başaran ÜM, Gülen Ş. Deneysel sistemik hipoksi geliştirilmiş yenidoğan ratlarda N-asetilsistein uygulamasının etkileri. *Türk Biyokimya Derg* 2003;28(2);40-4.
58. Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J* 2003;376:1-14.
59. Yatin M. Polyamines in living organisms. *Journal of Cell and Molecular Biology* 2002;1:57-67.
60. Que LG, Kantrow SP, Jenkinson CP, Piantadosi CA, Huang YCT. Induction of arginase isoforms in the lung during hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1998;275:96-102.
61. Altınışik M. Üre döngüsü. [www.mustafaaltinisik.org.uk/8](http://www.mustafaaltinisik.org.uk/8).
62. Linsalata M, Leo S, Guerra V, Di Leo A. Erythrocyte polyamines and prognosis in colorectal cancer patients. *Anticancer Res* 2000;20(3B):2113-7.
63. Moulinoux JP, Quemener V, Khan NA. Biological significance of circulating polyamines in oncology. *Cell Mol Biol* 1991;37(8):773-83.
64. Gürdol F, Ademoğlu E (Editörler). *Biyokimya Azotlu Biyomoleküllerin Metabolizması*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2006:438-9.

65. Tapiero H, Mathe G, Couvreur GP, Tew KD. Free amino acids in human health and pathologies. *Biomed Pharmacother* 2002;56:439-45.
66. Shareef S, Sawada A, Neufeld AH. Isoforms of nitric oxide synthase in the optic nerves of rat eyes with chronic moderately elevated intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(12):2884-91.
67. Preli RB, Klein KP, Herrington DM. Vascular effects of dietary L-arginine supplementation. *Review Atherosclerosis* 2002;162:1-15.
68. Lobenhoffer JM, Bode-Böger SM. Simultaneous detection of arginine, asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine and citrulline in human plasma and urine applying liquid chromatography-mass spectrometry with very straightforward sample preparation. *Journal of Chromatography B* 2003;798:231-9.
69. Lancaster JR. JR in *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. Ignarro LJ (Ed). San Diego: Academic press, 2000:209-24.
70. Chen J, Wollman Y, Chernichovsky T, Iaina A, Sofer M, Matzkin H. Effect of oral administration of high-dose nitric oxide donor L-arginine in men with organic erectile dysfunction: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *BJU International* 1999;83:269-73.
71. Reczkowski RS, Ash DE. EPR evidence for binuclear Mn(2) centers in rat liver arginase. *J Am Chem Soc* 1992;114:10992-4.
72. Kanyo ZF, Scolnick LR, Ash DE, Christianson DW. Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature* 1996;383(6600):554-7.
73. Khangulov SV, Pessiki PJ, Barynin VV, Ash DE, Dismukes GC. Determination of the metal ion separation and energies of the three lowest electronic states of dimanganese (II,II) complexes and enzymes: catalase and liver arginase. *Biochemistry* 1995;34(6):2015-25.
74. Chan WW. Combination plots as graphical tools in the study of enzyme inhibition. *Biochem J* 1995;311(3):981-5.
75. Gayer JW, Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Analy Biochem* 1986;39:412-7.
76. Chinard FP. Photometric estimation of proline and ornithine. *J Biol Chem* 1952;199:91-5.

77. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
78. 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.
79. Cortas NK, Wakid NW. Determination inorganic nitrate in serum and urine by kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990;36:1440-3.
80. Wu G, Morris SM. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998;336:1-17.
81. Gotoh T, Araki M, Mori M. Chromosomal localization of the human arginase II gene and tissue distribution of its mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;233:487-91.
82. Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, Moss DW, Holmes LS, Baylis SA et al. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4392-6.
83. Loser C, Folsch UR, Paprotny C, Creutzfeldt W. Polyamine concentrations in pancreatic tissue, serum, and urine of patients with pancreatic cancer. *Pancreas* 1990;5(2):119-27.
84. Kingsnorth AN, Wallace HM, Bundred NJ, Dixon JM. Elevation of monoacetylated polyamines in human breast cancer. *Br J Surg* 1984;71(5):352-6.
85. Gugliucci A. Polyamines as clinical laboratory tools. *Clin Chem Acta* 2004;344:23-35.
86. Cheeseman KH. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Molec Aspects Med* 1993;14:191-7.
87. Grody WW, Dizikes GJ, Cederbaum SD. Human arginase isozymes. *Isozymes Curr Top Biol Med Res* 1987;13:181-214.
88. Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Ann Rev Physiol* 1995;57:707-36.
89. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2006;6:521-34.
90. Çekmen MB, Turgut M, Türköz Y, Aygün D, Gözükar EM. Nitrik oksit ve nitrik oksit sentazın fizyolojik ve patolojik özellikleri. *Türkiye Klinikleri J Pediatr* 2001;10:226-35.



91. Hofseth LJ, Hussain SP, Wogan GN, Harris CC. Nitric oxide in cancer and chemoprevention. *Free Radic Biol Med* 2003;34:955-68.
92. 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;54:2462-7.
93. 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;31:1414-9.
94. King MW. Polyamine Biosynthesis. 2007.  
[www.med.unibs.it/~marchesi/polyamine\\_synth.gif](http://www.med.unibs.it/~marchesi/polyamine_synth.gif).
95. İnce AT, Övünç O. Cyclooxygenase-2 ve Karsinogenez. *Güncel Gastroenteroloji* 2005;9(1):70-7.
96. Kürkçü E. Deneysel olarak oluşturulmuş meme tümörlerinde curcumin'in arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve nitrik oksit düzeylerine etkisi (tez). Edirne: T.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı; 2008.

## RESİMLER LİSTESİ

<b>ŞEKİLLER</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Şekil 1.</b> Dünyada gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki kanser vakalarının 2002 yılı insidans ve mortalite değerleri	4
<b>Şekil 2.</b> Türkiye’de kadınlarda görülen ilk 10 kanser türü	5
<b>Şekil 3.</b> Meme anatomisi	6
<b>Şekil 4.</b> Argininden ornitin ve üre oluşumu	10
<b>Şekil 5.</b> Üre döngüsü	11
<b>Şekil 6.</b> Ornitinden poliamin, prolin ve glutamat sentezi	11
<b>Şekil 7.</b> Poliamin sentezi	16
<b>Şekil 8.</b> Poliamin katabolizması	17
<b>Şekil 9.</b> Argininden NO ve sitrüllin oluşumu	18
<b>Şekil 10.</b> Arginazın geçiş halinin şematik görünümü, nor-NOHA ve NOHA ile etkileşimi	20
<b>Şekil 11.</b> Nor-NOHA’nın sentezi ve NOHA ile homo-NOHA’nın formül yapısı	20
<b>Şekil 12.</b> Feron reaksiyonu	24
<b>Şekil 13.</b> Üre standart çalışması regresyon grafiği	32
<b>Şekil 14.</b> Serum arginaz enzim aktiviteleri	38
<b>Şekil 15.</b> Serum NO düzeyleri	39
<b>Şekil 16.</b> Doku arginaz enzim aktiviteleri	40

<b>Şekil 17.</b> Doku ornitin düzeyleri	41
<b>Şekil 18.</b> Doku NO düzeyleri	42

<b>TABLULAR</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1.</b> Meme kanseri oluşumunda önemli risk faktörleri	9
<b>Tablo 2.</b> Grupların serum NO düzeyleri ve arginaz enzim aktiviteleri	35
<b>Tablo 3.</b> Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar	36
<b>Tablo 4.</b> Grupların doku arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve NO düzeyleri	36
<b>Tablo 5.</b> Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar	37

## ÖZGEÇMİŞ

26 Mayıs 1986 tarihinde Adana'da doğdum. İlkokulu Adana Özel Gönen Okullarında, ortaokulu Adana Petrol Ofisi İlköğretim okulunda, liseyi Adana Abdülkadir Paksoy Lisesinde okudum. 2004 yılında Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandım. 2008 yılında 78,2 ortalama ile mezun oldum. 2007 yılı yaz döneminde Gaziantep 25 Aralık Devlet Hastanesinde acil servis ve biyokimya laboratuvarında staj yaptım. 2008 yılında Trakya Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım. 2010-2011 yılları arasında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde Laboratuvar Teknisyeni olarak çalıştım. Halen yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.

## **EKLER**

**Ek 1.** Etik Kurul Raporu