

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

Tez Yöneticisi  
Yrd. Doç. Dr. Hakan ERBAŞ

**MEME KANSERİ OLUŞTURULMUŞ FARELERDE  
N-ASETİLSİSTEİNİN ARGİNAZ ENZİM AKTİVİTESİ,  
ORNİTİN VE ÜRE DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Sevil DEMİRKİRAN ERKUT**

EDİRNE-2006

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

Tez Yöneticisi  
Yrd. Doç. Dr. Hakan ERBAŞ

**MEME KANSERİ OLUŞTURULMUŞ FARELERDE  
N-ASETİLSİSTEİNİN ARGİNAZ ENZİM AKTİVİTESİ,  
ORNİTİN VE ÜRE DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Sevil DEMİRKİRAN ERKUT**

**Tez No : 2005-115**

EDİRNE-2006


T.C.  
**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü**


**ONAY**

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Yrd.Doç.Dr. Hakan ERBAŞ danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Sevil DEMİRKIRAN ERKUT tarafından tez başlığı “Meme kanseri oluşturulmuş farelerde N-asetilsisteinin arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve üre düzeyleri üzerine etkisi” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 03/10/2006 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “**Yüksek Lisans Tezi**” olarak kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Erol ÇAKIR

JÜRİ BAŞKANI

  
Yrd.Doç.Dr. Hakan ERBAŞ  
ÜYE

  
Yrd.Doç.Dr. Nurettin AYDOĞDU  
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İsmet DÖKMECİ  
Enstitü Müdürü

## **TEŐEKKÜR**

Trakya Üniversitesi Tıp Fakóltesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tez çalıőmamda ve eğitimimde büyük katkıları olan sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Hakan ERBAŞ'a, yüksek lisans eğitimim süresince yetiőmemde emeği geçen hocalarım Prof. Dr. Erol ÇAKIR, Prof. Dr. Őendođan GÜLEN, Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN, Yrd. Doç. Dr. Sevgi ESKİOCAK'a bu çalışmada benden yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Ufuk USTA, Araő. Gör. Dr. Oya ERTEN'e ve Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı çalıőanlarına teőekkürlerimi sunarım.

Sevil DEMİRKIRAN ERKUT

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>A-I</b>	: Arginaz tip 1
<b>A-II</b>	: Arginaz tip 2
<b>ADP</b>	: Adenozin difosfat
<b>AMP</b>	: Adenozin monofosfat
<b>ASL</b>	: Argininosüksinat liyaz
<b>ASS</b>	: Argininosüksinat sentaz
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>GSH</b>	: Glutatyon
<b>NAC</b>	: N-asetil-L-sistein
<b>NAD+</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotid (okside)
<b>NADH</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotid (redükte)
<b>NADP+</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside)
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte)
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	: Amonyum iyonu
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>NOS</b>	: Nitrik oksit sentaz
<b>OAT</b>	: Ornitin amino transferaz
<b>ODC</b>	: Ornitin dekarboksilaz
<b>OTC</b>	: Ornitin transkarbamoilaz
<b>SAM</b>	: S- adenozil metiyonin
<b>SF</b>	: Serum fizyolojik
<b>SH</b>	: Sülfhidril

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
MEME KANSERİ	3
ARGİNAZ ENZİMİ	7
ÜRE SENTEZİ	10
NAC (N-ASETİL-L-SİSTEİN)	17
GEREÇ VE YÖNTEMLER	19
GEREÇLER	19
YÖNTEMLER	22
İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	29
BULGULAR	30
TARTIŞMA	36
SONUÇLAR	40
TÜRKÇE ÖZET	41
İNGİLİZCE ÖZET	43
KAYNAKLAR	45
RESİMLER LİSTESİ	52
ÖZGEÇMİŞ	54
EKLER	55

## GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri günümüzde önemli bir sorun olmaya devam etmektedir (1). Günümüzde ortaya çıkan kanserlerin %32'si ve kansere bağlı ölümlerin %18'i meme kanserine bağlıdır (2,3,4).

Meme kanseri, en çok lobül ile terminal duktus birleşme yerindeki epitelden köken alan bir adenokanserdir. Bugünkü bilgilere göre meme kanseri (invaziv duktal kanser) gelişmeden önce duktus epiteli, atipik duktal hiperplazi, duktal karsinoma *in situ* gibi evrelerden geçer ve sonunda meme kanseri gelişir (5).

Kanserle savaşta etiyolojik faktörler, kanser öncesi lezyonlar, kanser prekürsörlerini bilmenin yanında, önemli bir başka faktör de teşhisinin erken, doğru ve kolay konabilmesidir (6). Metastazların erken dönemde belirlenmesi, yapılacak tedavinin planlanması ve başarısı açısından aynı derecede önemlidir (7). Erken dönemde metastaz bulunan hastaların çoğunluğunun asemptomatik olması ve görüntüleme yöntemlerinin bu dönemde yalancı negatif sonuçlar verebilmesi, bazı biyokimyasal belirleyicilerin bu konudaki önemini gündeme getirmektedir (7,8). Çeşitli kanser hastalarında yapılan araştırmalar, kanserin bu hastaların karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmalarında bir takım bozukluklara neden olduğunu göstermiştir (9).

Üre döngüsünün bir enzimi olan arginaz, argininin üre ve ornitine hidrolizini katalizler. Karaciğer dışı arginazın, poliamin sağlanmasında rol oynadığı ileri sürülmüştür (10). Poliaminler kanser hücreleri gibi hızla bölünen ve çoğalan hücreler tarafından fazla miktarlarda sentezlenen organik katyonlardır. Arginaz aktivitesinin bazı kanser tiplerinde değiştiği gösterilmiştir (10).

N-asetilsistein (NAC)' in serbest radikaller tarafından oluşturulan doku hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu ve bu etkisini glutatyon (GSH) düzeyini arttırarak, direkt "scavenger" olarak etki göstererek veya stabil nitrozil türevi oluşturarak gerçekleştirdiği bildirilmektedir (11,12).

Son yıllarda kanserde biyokimyasal parametrelere ait araştırmaların giderek artması dikkat çekmektedir. Arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve poliaminlerin kanserli dokularla ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla saptanmış ve bu maddelerin akciğer, prostat, kolon, mide ve meme kanserli hastalarda arttığı gösterilmiştir.

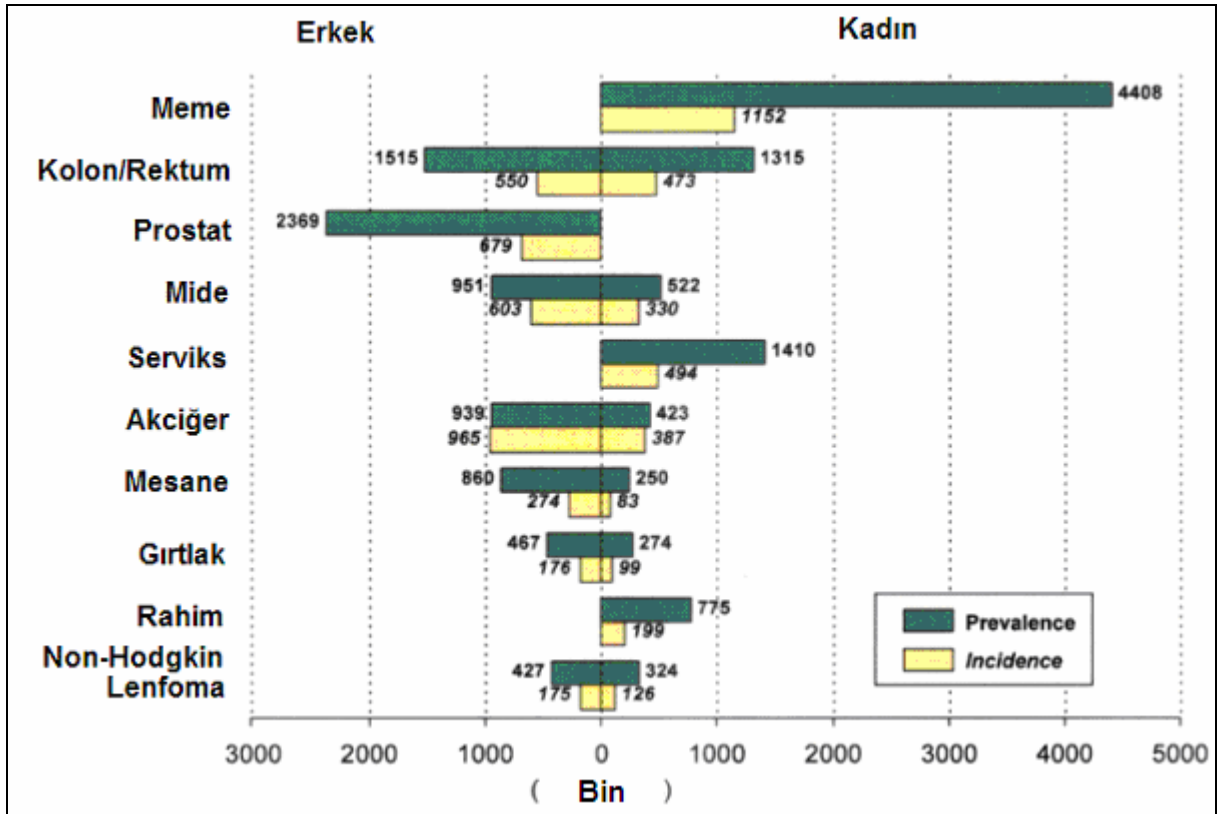
Bu çalışmanın amacı; antikarsinojenik özelliği çeşitli çalışmalarda gösterilmiş olan NAC'ın meme kanseri üzerindeki etkilerini araştırmak, bu bağlamda kanserli dokularda arttığı bilinen arginaz enzim aktivitesi , ornitin ve üre düzeyleri üzerine olan etkilerini incelemektir.



## GENEL BİLGİLER

### MEME KANSERİ

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen tümör olup, kadınlarda görülen tüm kanser türlerinin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır (Şekil 1) (13). Meme kanseri kadınlarda en çok görülen kanser olup, aynı zamanda birçok ülkede kanserden ölümlerin başlıca nedenidir.



Şekil 1. Kanserlerin 2002 yılı insidans ve prevalans değerleri (13).

Son yüzyılda kanser insidansı ve mortalitesinde belirgin artış gözlenmektedir. Kanser ve komplikasyonlarından ölüm kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sıraya yerleşmiştir (14). 2000 yılı insidans ve mortalite değerleri, 1990 yılı insidans ve mortalite değerleri ile karşılaştırıldığında %22 oranında arttığı görülmektedir (15-17). Meme kanserinin dünya çapında mortalitesinin insidansa oranı %36'dır. Yaşayan 3.9 milyon kanser hastası kadın ile meme kanseri dünyada prevalansı en yüksek kanser tipidir (16).

İnsidansı en yüksek olan üç kanser tipi ve oranları şöyledir: %12,3 akciğer kanseri, %10,4 meme kanseri, %9,4 kolon rektum kanseri (16). Türkiye'de; 1990-1995 yılları arasında ölüm sebepleri sıralamasında ikinci sırayı kanser almıştır. Gerçek kanser mortalitesi daha yüksek olmasına rağmen, 1995 yılı verilerine göre Türkiye'de kanser mortalitesi yüzbinde 67.7 olarak saptanmıştır (18).

Türkiye'de Sağlık Bakanlığının 1999 ve 2001 yılı verilerine göre, kadınlarda meme kanseri insidansı; yüzbinde 7.32'den yüzbinde 12.87'ye yükselmiştir (Tablo 1 ve 2). Bu oran kadınlarda kanser olguları içinde meme kanserinin %24.1'den %25.42'oranına yükseldiğini göstermektedir (19).

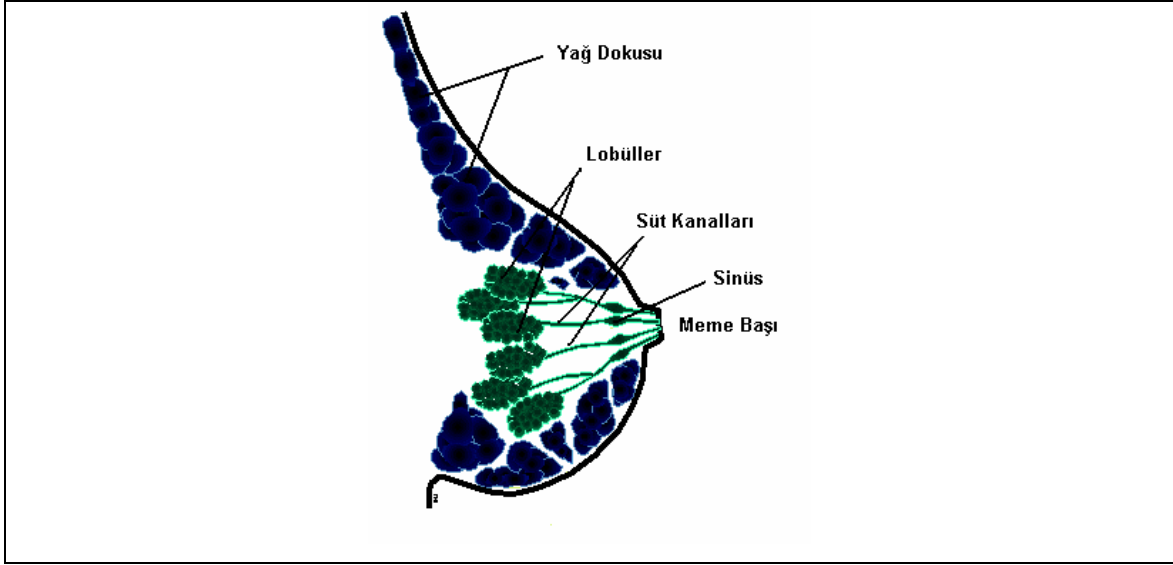
**Tablo 1. 1999 yılı Türkiye'de kadınlarda en çok görülen kanser vakaları (19).**

<b>Kanser Tipi</b>	<b>Yılı</b>	<b>Vaka Sayısı</b>	<b>Yüzde</b>	<b>İnsidans Hızı Yüz Binde</b>
Meme	1999	2390	24.10	7.32
Over serviks	1999	866	8.73	2.65
Mide	1999	693	6.99	2.12
Cilt	1999	684	6.90	2.10
Akciğer	1999	404	4.07	1.21
Diğer	1999	4882	49.21	14.96
Toplam	1999	9919	100.00	30.39

**Tablo 2. 2001 yılı Türkiye’de kadınlarda en çok görülen kanser vakaları (19).**

Kanser Tipi	Yılı	Vaka Sayısı	Yüzde	İnsidans Hızı Yüz Binde
Meme	2001	4307	25.42	12.87
Over serviks	2001	1414	8.34	4.53
Mide	2001	903	5.32	2.70
Cilt	2001	963	5.68	2.88
Akciğer	2001	811	4.78	2.42
Diğer	2001	8552	50.46	27.44
Toplam	2001	16950	100.50	50.66

Meme parankimi 15-20 kadar radikal olarak konumlaşmış segmentten oluşur. Her segment meme başına birleşen bir duktus ile drene olur. Bu segment veya lobların her biri 20-40 kadar lobulden oluşur (Şekil 2). Her bir lobulde ise 10 ila 100 alveol vardır (20). Meme dokusu en fazla üst dış kadranda bulunur. Aksiller bölgeyi de kapsayan üst dış kadranda geniş ölçüde meme dokusu bulunması bu bölümde tümörlerin daha fazla oluşmasına neden olur (21).



**Şekil 2. Meme anatomisi (21).**

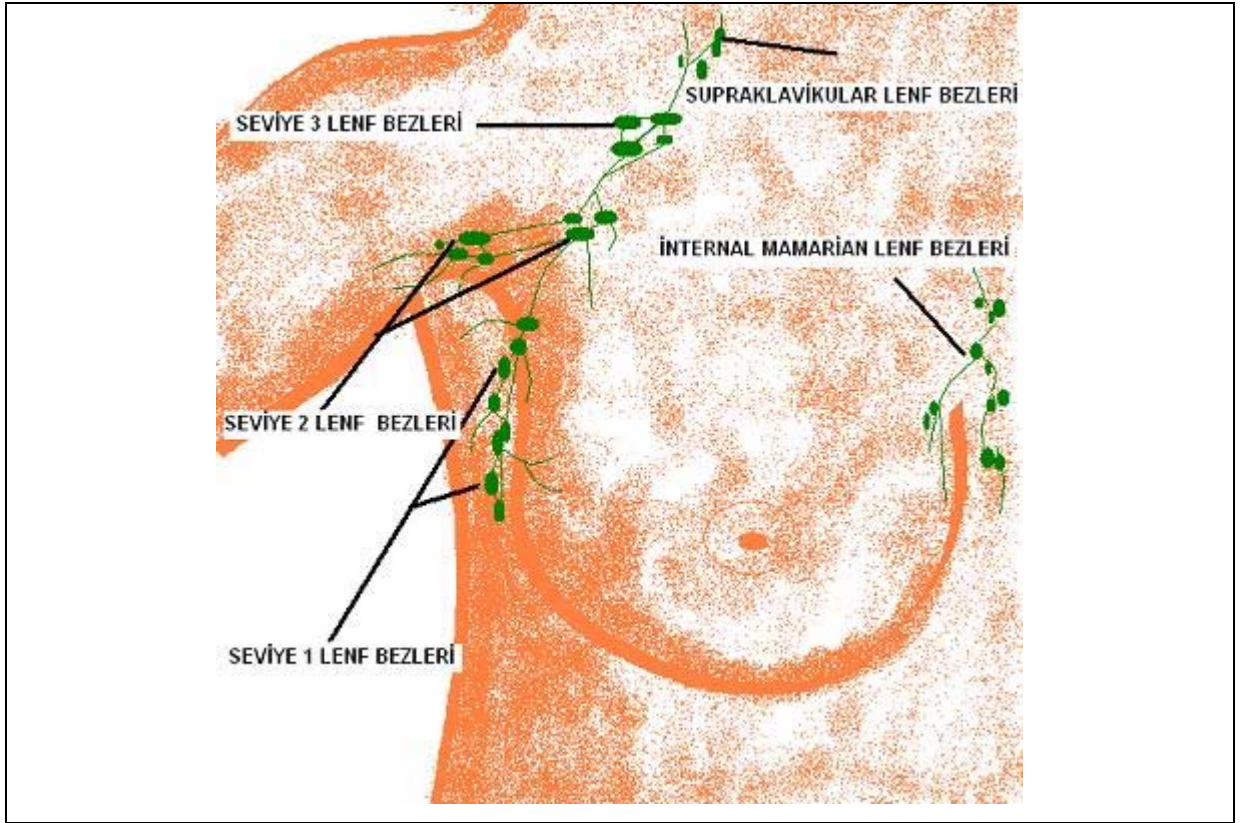
Meme kanserinin etiyolojisi tam olarak anlaşılamamasına rağmen bazı faktörler ile ilişkisi olduğu bilinmektedir. Bu risk faktörleri (Tablo 3), kanserden koruyucu programın geliştirilmesinde önemlidir. Meme kanserinin oluşmasında rol oynayan risk faktörleri aşağıdaki gibi sıralanabilir (23-27).

**Tablo 3. Meme Kanseri Gelişimindeki Risk Faktörleri (23-27).**

Faktör		Risk	Açıklama
Cinsiyet	Kadın olmak	Artırır	Tüm meme kanserlerinin %99'u kadınlarda %1'i erkeklerde görülür
Yaş	50 yaş ve üzeri	Artırır	Yaş ilerledikçe risk artar Yeni vakaların %77'si, meme kanserinden ölümlerin %84'ü 50 yaş ve üzeri oluşur.
Maling /Bening Meme Kanseri	Öyküsü olması	Artırır	Bir memede kanser varlığı ortalama popülasyona göre diğer memede kanser riskini 2-6 kez artırır
Aile öyküsü	Anne ve / veya Kız kardeşte meme kanseri, BRCA-1, BRCA-2, P53 genlerinde mutasyon,	Artırır	Anne veya kız kardeşten herhangi birinde meme kanseri riski %2-3 artırırken, her ikisinde kanser olması riski %8 artırır. Meme kanserlerinin sadece %10-15'i herediter kökenli iken, bunların %50-60'ı BRCA-1 genindeki mutasyondan %10-30 'u ise BRCA-2 genlerinin DNA tamirinde ve kopyalanmasında önemli rolleri vardır.
İrk			Beyaz kadınlarda meme kanseri gelişme riski daha yüksek olmasına rağmen Afrika kökenli Amerikalı kadınların bu hastalıktan ölme riski daha yüksektir.
Menstrüal öykü	12 yaştan önce menarj 55 yaş sonrası menapoz	Artırır	Menarş ve menapoz arasındaki intervalin uzaması meme kanseri riskini yükseltir.
Doğum	Doğum yapmayan, ilk çocuğunu 30 yaşından sonra doğuranlar	Artırır	Doğum yapmamış kadınlar meme kanseri açısından yüksek riskli gruba girer
Emzirme		Tartışmalı	Meme kanseri riskini azaltmada emzirmemenin etkisini inceleyen çalışmalarda sonuçlar tartışmalıdır.
Östrojen alımı	Oral kontraseptifler ve hormone replasman tedavisi	Tartışmalı	Erken veya uzun süreli oral kontraseptif kullanımı ve uzun süreli (10-15 yıl üzeri) östrojen replasman tedavisinin riski artırdığı saptanmıştır. Östrojen ve progesteron kombine kullanılan preparatların meme kanseri riskini etkilemediği saptanmıştır.
Alkol		Artırır	Günde 2 bardaktan fazla alkol alınması riski artırmaktadır. Diğer olası bir neden de alkolün meme dokusundaki hücre permabilitesinde değişikliğe yol açması olduğuna inanılmaktadır.
Yağlı diyet		Tartışmalı	Özellikle aşırı yağlı diyetin meme kanserini artırdığı düşünülmektedir.
Obezite		Tartışmalı	Meme kanseri riskini artırdığı bildirilmesine rağmen hala tartışılmaktadır. Östrojen adipos dokuda birikmekte bu da endojen östrojen üretimini artırmakta ve meme dokusunun daha fazla östrojene maruz kalmasına neden olmaktadır
Radyasyon		Artırır	Özellikle 30 yaş altında ve puberteden önce radyasyona maruz kalmak riski artırır

Meme kanserinin birçok türü bulunmaktadır. En sık olarak süt kanallarından (duktus) kaynaklanan duktal kanser görülür. Daha az sıklıkla süt üreten keseciklerinden lobüler kanser gelişebilir. Diğer meme kanseri türleri ise oldukça nadir görülmektedir (28).

Kalıtsal meme kanserlerinin pek çoğu BRCA-1 ve BRCA-2 genlerinden birini etkileyen bir mutasyona bağlıdır. Nadir durumlarda p53 geninin kalıtsal mutasyonu Li-Fraumeni sendromu kapsamında meme kanserine yol açabilir (29).



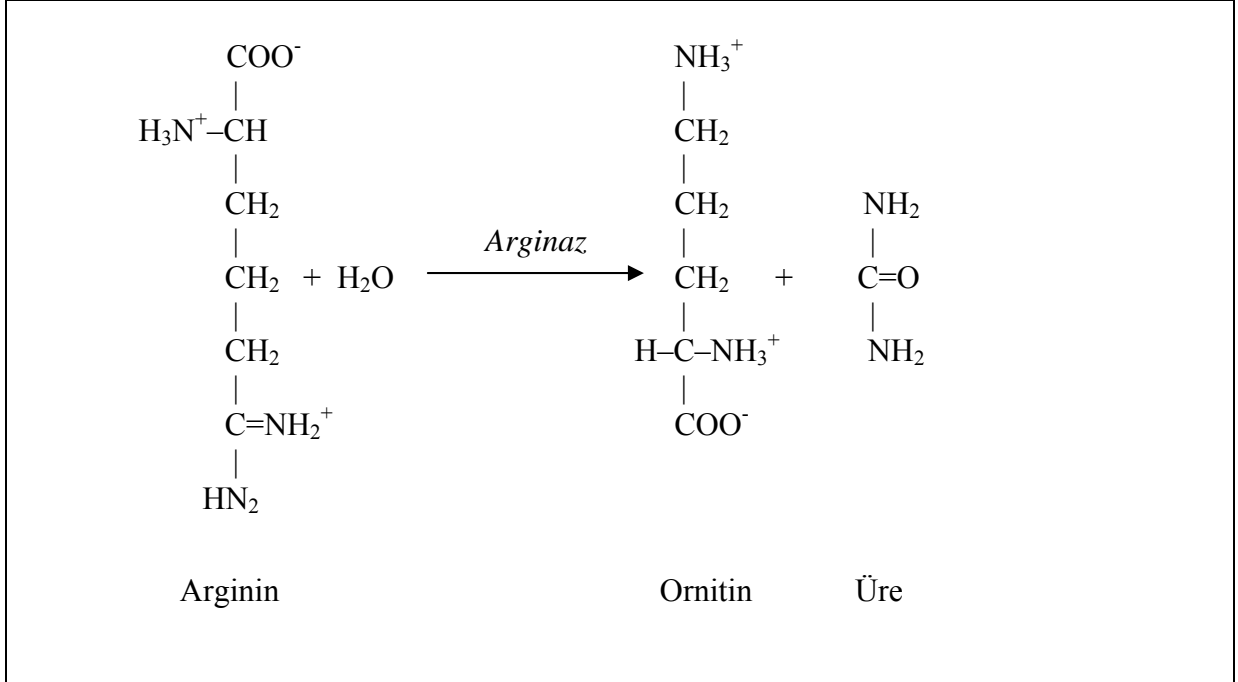
**Şekil 3. Memenin lenfatik drenajı (22).**

Lenf memeden koltuk altına yol alırken, ilk önce seviye-1 bezlere döküldükten sonra diğer seviyedeki bezlere ulaşır (Şekil 3). Meme kanseri hücreleri lenf sıvısı içerisinde ilerleyerek lenf bezlerinde kümelenirler (21).

### **ARGİNAZ ENZİMİ**

Üre siklusunun son enzimi olan arginaz (L-Arginin amidino hidrolaz; EC 3.5.3.1); L-arginini, üre ve ornitine hidrolize eder. Memeli karaciğerinde amonyağın zehirsizleştiril-

mesinden sorumludur (30-32). Güçlü bir immün sistem inhibitörü olup lenfosit proliferasyonundada inhibitör etkiye sahiptir (33).



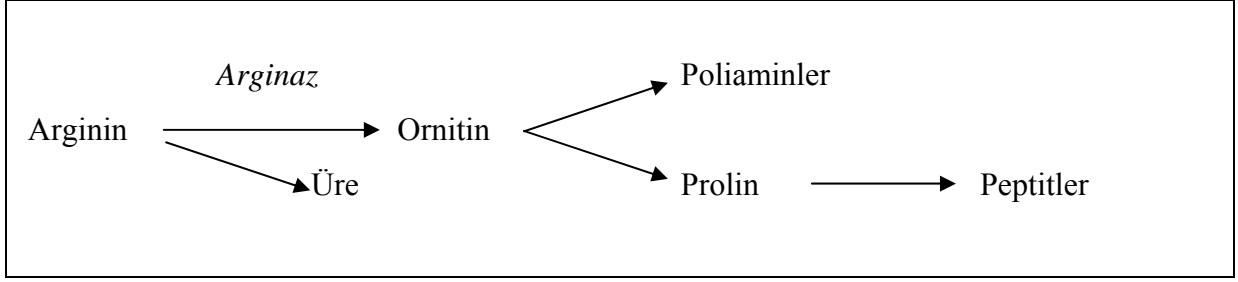
**Şekil 4. Argininden üre ve ornitin oluşumu (34).**

Arginaz enzimi karaciğer dışında; eritrosit, lökosit, trombosit, beyin, bağırsak, böbrek, pankreas, akciğer, meme bezi, testis, tükürük bezi, plsentta, deri, iskelet ve kalp kası gibi dokularda da bulunmaktadır (30-32).

Eritrosit arginaz aktivitesinin, serumun arginaz aktivitesinden yaklaşık 200 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. Tükürük arginaz aktivitesi ise eritrosit aktivitesinin 1/6'sı kadardır (35). Çeşitli kanser türlerinin kan plazmalarında eritrosit arginaz aktiviteleri ve üre düzeyleri ölçülmüş, L-argininin eritrosit membranlarından geçerek arginaz ile hidrolize olduğu ve oluşan ürenin de süpernatant ürelerini arttırdığı deneysel olarak gösterilmiştir (36).

Eritrositler üre döngüsü ile üre sentez edememelerine rağmen; insan, koyun ve sığır eritrositlerinde aktif bir arginazın varlığı tespit edilmiş, ancak keçi ve tavuk eritrositlerinde bu enzime rastlanmamıştır (37,38).

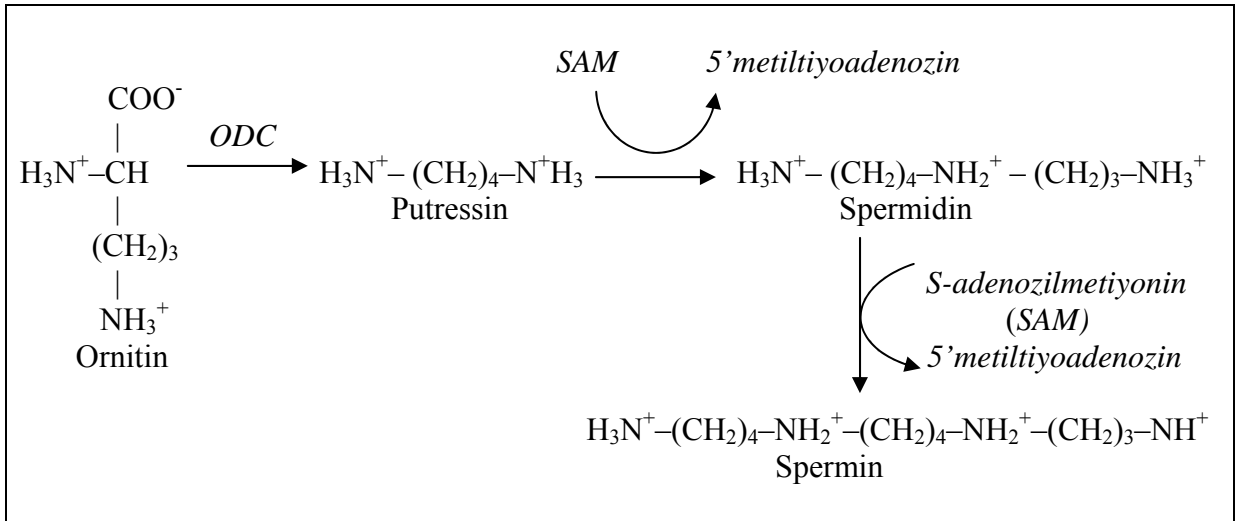
Arginaz enziminin katalizlediği reaksiyonun iki ürünü; üre ve ornitindir (Şekil 4)(30). Üre böbrek yolu ile atılırken, ornitin de prolin ve poliamin sentezinde rol oynar (Şekil 5). Ornitin dekarboksilaz (ODC) aracılığı ile poliaminlerin, ornitin aminotransferaz (OAT) aracılığı ile de prolin ve glutamatın sentezini sağlar (39,40).



**Şekil 5. Arginaz enziminin katalizlediği reaksiyon ve ürünleri (39,40).**

### Poliaminler

Hücrelerin büyüme ve gelişmesi için önemli biyomoleküller olan poliaminler (putressin, spermin ve spermidin) tüm memeli hücrelerinde bulunurlar (41). Putressin, spermin ve spermidin; hücre büyümesi için gerekli olan transkripsiyon, translasyon ve protein sentezinin başlamasını kolaylaştıran alifatik poliaminlerdir (42). Poliaminler bakteri ve memeli hücre kültürleri için büyüme faktörleridir. Farmakolojik dozlarda hipotermik ve hipotansif etkilidirler (34).

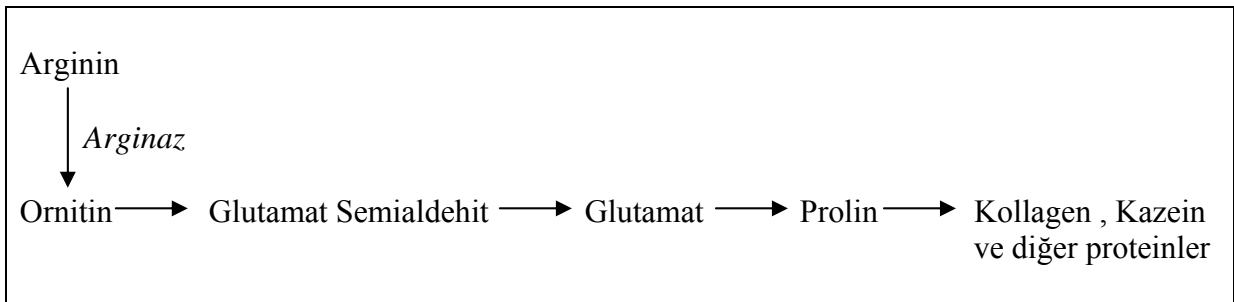


**Şekil 6. Poliaminlerin sentezi (34).**

Poliamin sentezinin ilk basamağında ODC enzimi, ornitinden putressin oluşumunu katalizler. Bu enzim; arginaz enzim aktivitesinin yükselmesi ile doğru orantılı olarak aktive olmaktadır. Poliamin biyosentezinde hız kısıtlayıcı enzimdir (34,43,44). Putressin, daha sonra spermidin sentaz ile spermidini, spermidin de spermin sentaz ile spermini oluşturur (Şekil 6). Poliaminler hücre bütünlüğünün, hücre içi organel ve membranlarının stabilizasyonundan sorumludurlar. Çok sayıda pozitif yük taşıdıkları için, polianyonik özellikte olan DNA ve RNA'larla kolayca birleşerek, DNA ve RNA'nın biyosentezinin uyarılması, DNA

stabilizasyonu ve bakteriyofajlarda DNA paketlenmesi gibi temel olaylarda başlıca rolü oynarlar (34).

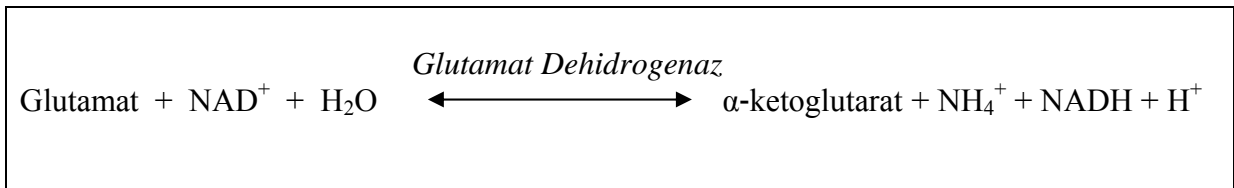
Hücre içi poliamin metabolizmasının ve dolaşımdaki poliamin miktarının malign olaylarda arttığı, özellikle de eritrosit poliamin miktarının hücre proliferasyonunun bir indeksi olarak kullanılabileceği ve eritrosit poliamin düzeylerinin tümörün gelişimi ile doğrudan ilişkili olduğu bildirilmiştir (44). Poliaminler için en ideal taşıyıcının eritrositler olduğu ve geniş bir poliamin depolama kapasitelerinin bulunduğu belirtilmiştir (45). Poliamin ve protein sentezinin ilk basamağı arginaz enzimi tarafından katalizlenen argininin ornitine dönüşümüdür (Şekil 7).



Şekil 7. Protein Sentezi (34).

### ÜRE SENTEZİ

Üre biyosentezi, karaciğerde meydana gelen üre döngüsü ile amonyağın detoksifikasyonu ile gerçekleşir (46). İlk basamak amino grubunun ayrılmasıdır. Ayrılan amino gruplarını  $\alpha$ -ketoglutarat toplar ve glutamat meydana gelir. Oluşan glutamat, glutamat dehidrogenaz enzimi ile tekrar  $\alpha$ -ketoglutarata dönüşür (Şekil 8). Amino asitler transaminasyona uğrayarak  $\alpha$ -keto asite dönüşürler ve L-glutamat meydana gelir. Geriye kalan  $\alpha$ -keto asitin karbon iskeleti asetil-CoA' ya veya sitrik asit döngüsünün ara metabolitlerine dönüşerek yıkıma uğrar. L-glutamat ise L-glutamat dehidrogenaz ile  $\alpha$ -ketoglutarat ve amonyum iyonuna ( $\text{NH}_4^+$ ) dönüşür. Toksik etkileri kanıtlanmış olan amonyum iyonu, karaciğere transfer edilerek detoksifiye edilir. Bir dizi reaksiyon sonrasında üreye dönüştürülür (34).

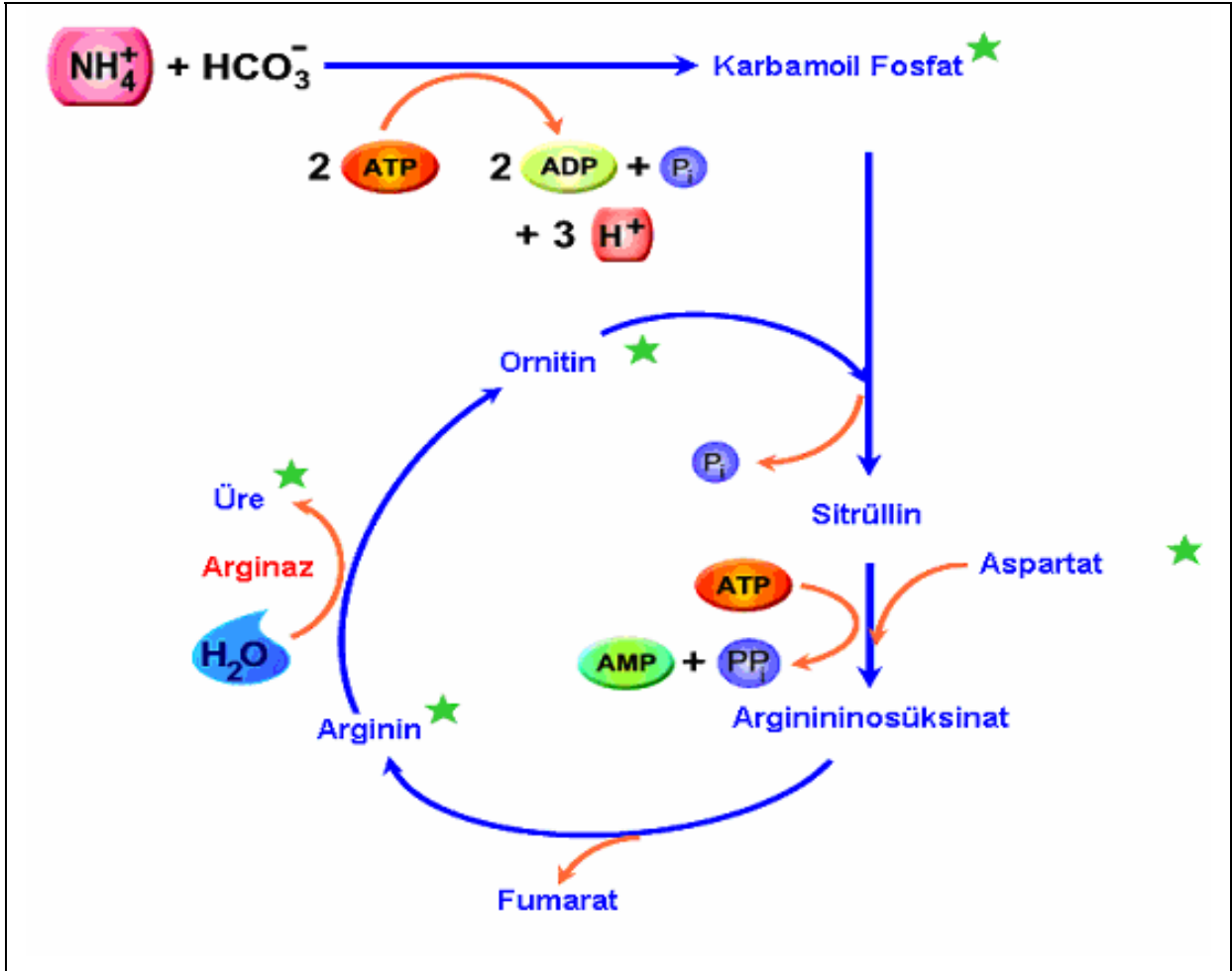


Şekil 8. Glutamattan amonyağın serbestleşmesi (34).



Periferde meydana gelen amonyak, glutamin sentetaz enzimi varlığında glutamatla birleşerek glutamini meydana getirir. Glutamin karaciğere gelerek, glutaminaz enziminin varlığında tekrar glutamat ve amonyum iyonuna ayrılır. Meydana gelen amonyak Krebs-Henseleit üre döngüsüne girerek karaciğerde üreye dönüşür ve üre idrarla atılır (Şekil 9) (34).

Üre suda kolayca çözünen ve amonyağa göre toksik olmayan bir maddedir. Üreotelik bir canlı olan insanda üre sentezi karaciğerde üre döngüsü ile meydana gelmektedir. Bu döngünün varlığı, Krebs-Henseleit tarafından 1932 yılında ortaya konmuştur (46,47).



Şekil 9. Üre döngüsü (48).

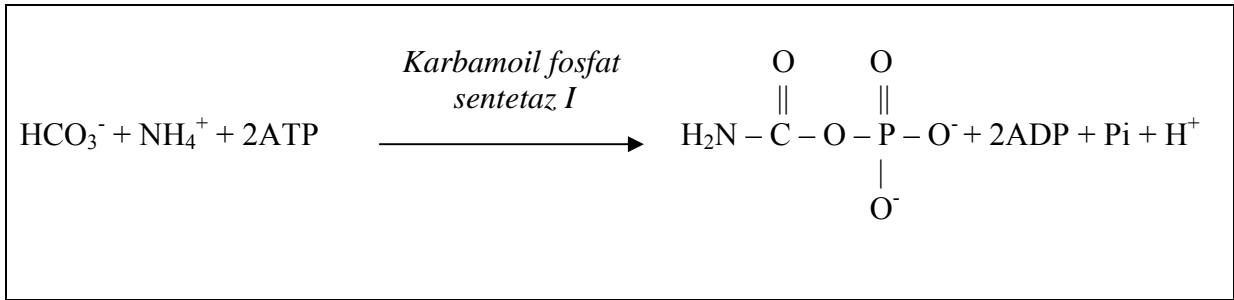
Amonyanın non-toksik şekilde karaciğere taşınmasında alanin önem taşır. Dokularda oluşan amonyak, glutamat dehidrogenaz enzimi varlığında glutamat amino asidinin amino ( $-\text{NH}_2$ ) grubu haline dönüşür. İskelet kasında glikoliz sonucu ortaya çıkan piruvata, glutamatın amino grubu alanin transaminaz enzimi varlığıyla verilir ve alanin meydana gelir. Karaciğere taşınan alanin aminoasidinin amino grubu, alanin transaminaz enzimi varlığında yeniden  $\alpha$ -

ketoglutarata aktarılır, piruvat ve glutamat oluşur. Glutamat dehidrogenaz enziminin etkisiyle glutamat deaminasyona uğrayarak  $\alpha$ -ketoglutarat ve amonyağı oluşturur. Meydana gelen amonyak üre haline dönüştürülerek vücuttan atılırken, piruvat da glikoneogenez ile glikoza çevrilir. Bu çevrime; glikoz-alanin döngüsü adı verilmektedir (43).

Bağırsak bakterileri de diyet içinde bulunan proteinlerden ve gastrointestinal kanala salgılanan üreden amonyak oluşturmaktadır. Bu amonyak portal sistem aracılığı ile karaciğere gelir ve detoksifiye edilir.

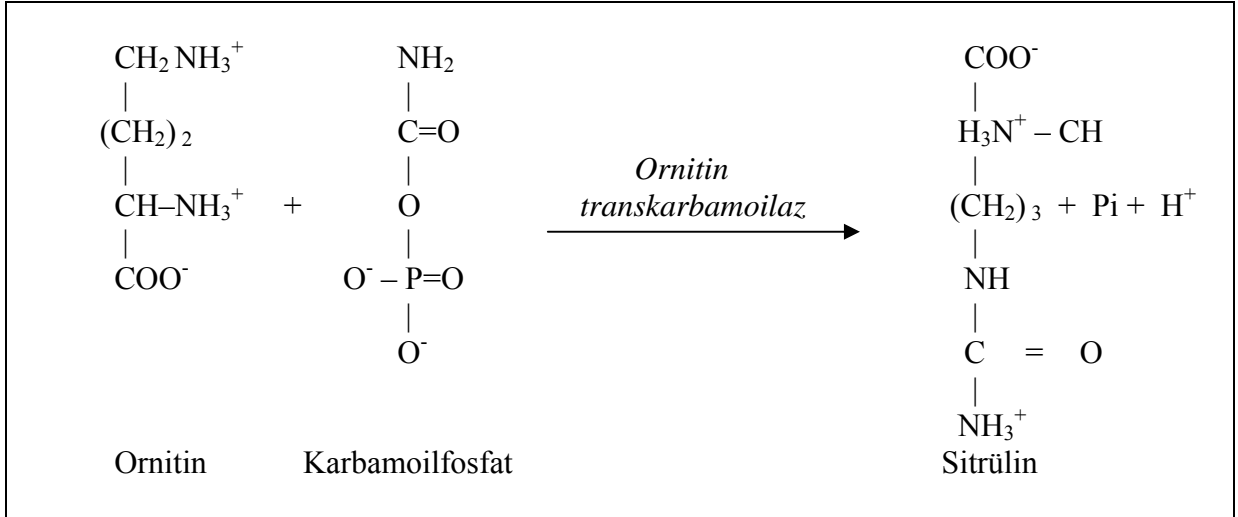
Amonyanın beyinde ortadan kaldırılması ile ilgili başlıca mekanizma glutamin oluşumu olsa da, bu yol karaciğer için üre sentezidir. Kan amonyak düzeyi yükseldiğinde, beyine kan yoluyla sağlanan glutamat desteği glutamin sentezi için yeterli olmayabilir. Bu nedenle beyinde  $\alpha$ -ketoglutarattan glutamat sentezlenmesi zorunludur (34).

Karaciğer hücrelerinin mitokondrilerinde bulunan glutamat dehidrogenaz enzimi varlığında glutamattan oksidatif deaminasyon sonucu oluşan serbest amonyum grubu üre sentezine giren ilk amino grubudur. Meydana gelen amonyum iyonu ( $\text{NH}_4^+$ ), karbamoil fosfat sentetaz I enzimi varlığında mitokondride bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) iyonları ile yüksek enerjili bir bileşik olan karbamoil fosfatı oluşturur (Şekil 10). Üre döngüsünün hız kısıtlayıcı enzimi, karbamoil fosfat sentetaz I enzimidir.



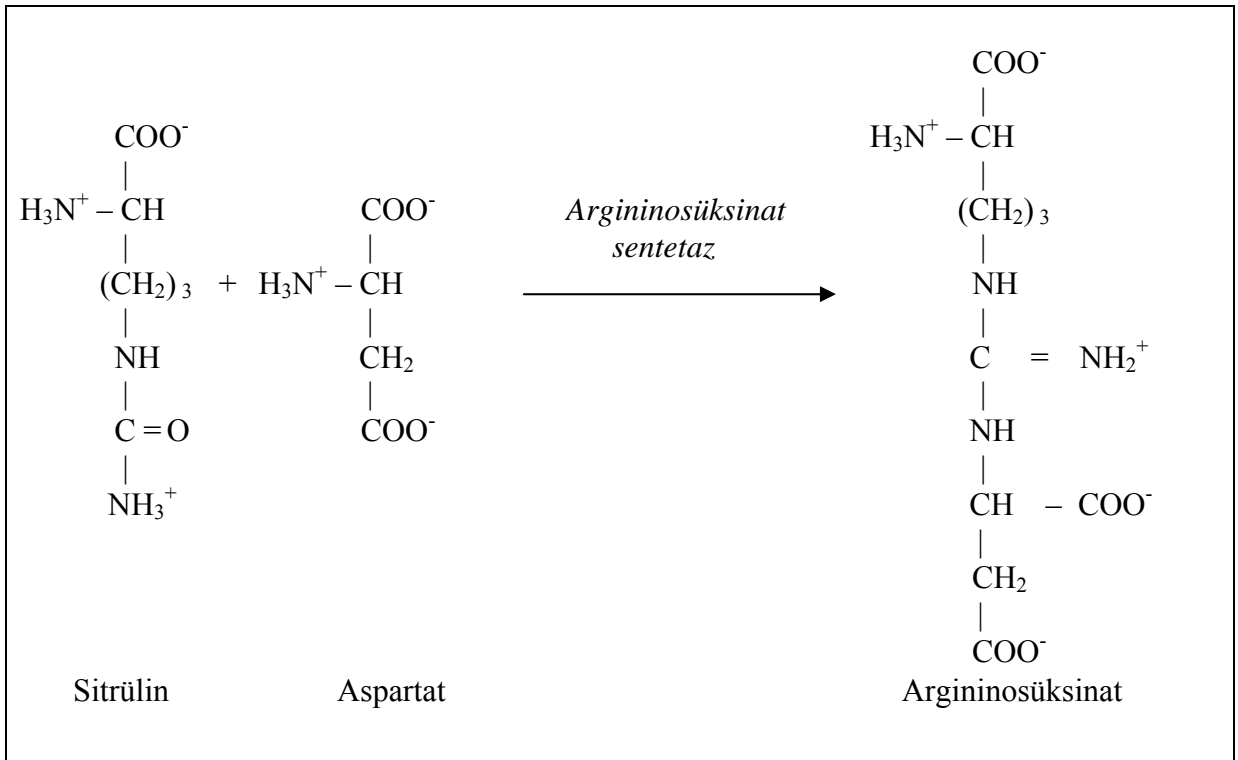
**Şekil 10. Karbamoil fosfat oluşumu (34).**

Karbamoil fosfat bir sonraki basamakta, karbamoil grubunu ornitine verir ve sitrülünü oluşturur (Şekil 11). Bu sırada ortofosfat grubu meydana gelir. Bu reaksiyonu ornitin transkarbamoilaz (OTC; C.2.1.3.3) enzimi, kofaktör  $\text{Mg}^{++}$  iyonu varlığında katalizler.



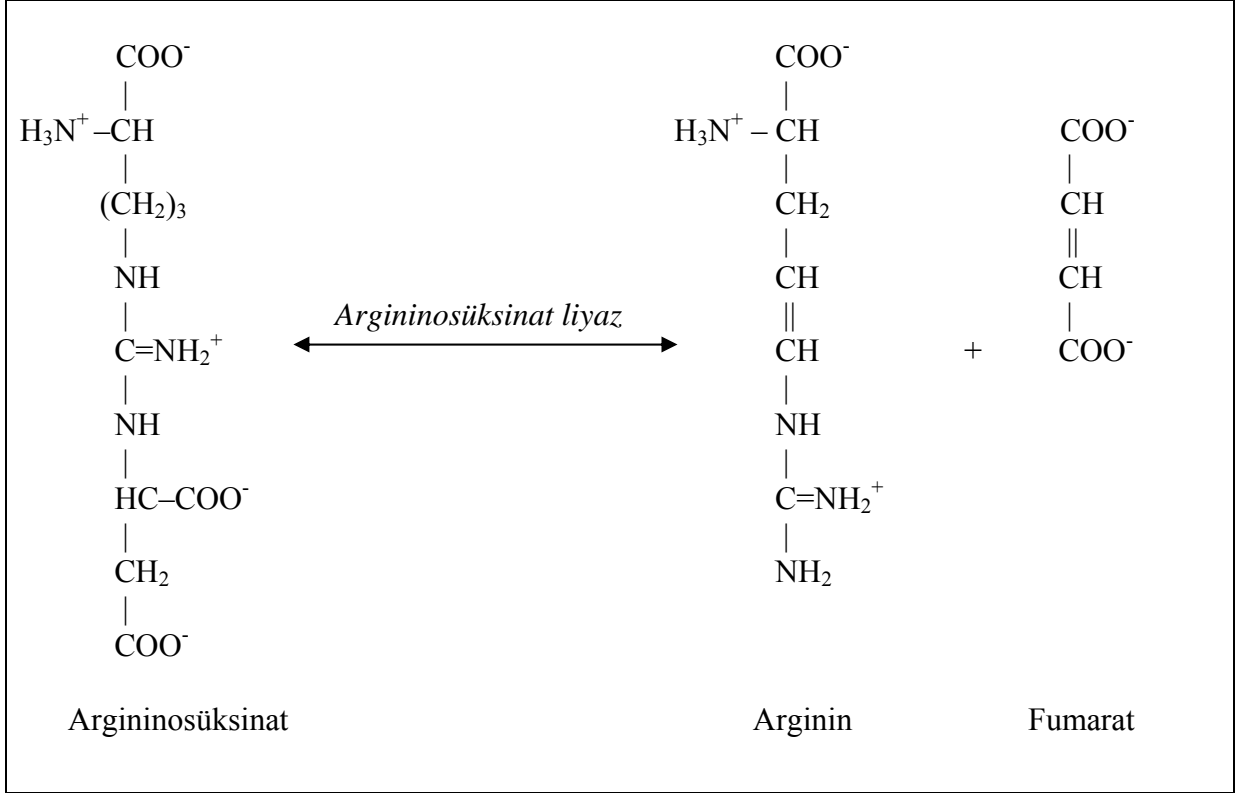
**Şekil 11. Ornitinden sitrülin oluşumu (34).**

Mitokondri iç zarı taşıyıcılığı ile sitrülin sitoplazmaya geçer.  $\alpha$ -ketoglutaratın diğer amino asitlerden amino grubunu transaminasyon reaksiyonu ile alması sonucu oluşan L-glutamatın ikinci amino grubu kondensasyon oluşturarak sitrüline geçer. ATP gerektiren reaksiyonda; argininosüksinat sentaz (ASS;EC.4.3.2.1) enzimi ve  $\text{Mg}^{++}$  iyonu görev alır (Şekil 12).



**Şekil 12. Argininosüksinat oluşumu (34).**

Argininosüksinat, bir sonraki basamakta çift yönlü bir reaksiyonla arginin ve fumaratı meydana getirir (Şekil 13).



**Şekil 13. Arginin ve fumarat oluşumu (34).**

Fumarat; sitrik asit döngüsüne girerek, malatı oluşturur. Üre döngüsünün son reaksiyonunda arginaz, arginini üre ve ornitine hidrolize eder. Oluşan ornitin, tekrar mitokondriye girer ve üre döngüsü tamamlanmış olur (34).

Ornitin üre döngüsünden başka; hücre gelişimi ve proliferasyonunda rol oynayan poliaminlerin ve kollajen yapısında yer alan prolin amino asitinin sentezinde öncül madde olarak görev yapmaktadır. Ornitin, protein yapısında bulunmayan bir amino asittir (30,39,49,50).

Üre döngüsünün son basamağını katalizleyen arginaz enzimi, başlıca karaciğerde olmak üzere, üre döngüsünün gerçekleşmediği birçok doku ve organda da bulunmaktadır. Ancak bu dokulardaki aktivitesi, karaciğere göre daha düşüktür (51).

### **Arginaz Enziminin Kinetik Özellikleri**

Arginaz enzimi tetramerik bir yapıya sahiptir. Bu yapının oluşması, enzimin ısıya dayanıklılığının artması ve inaktive olmasını önleyebilmek için  $Mn^{++}$  iyonlarına ihtiyaç vardır.  $Mn^{++}$  iyonları arginaz enziminin maksimum aktivite göstermesini sağlamaktadır (40,52,53). Arginazın doğal substratı olan arginini hidrolize edebilmesi için, optimal pH'sının 9.4-9.8 arasında olması gerekmektedir (32,54). Enzim aktivitesi pH 7.4'te %10-30 oranında azalırken, pH 7'nin altında ise ortadan kalkmaktadır (55,56).

Preinkübasyon uygulanmış insan tükürüğünde ortalama aktivite, preinkübasyon uygulanmamış tükürük aktivitesine göre yaklaşık olarak 3 kez daha yüksektir. Maksimum enzim aktivasyonu için  $Mn^{++}$  iyonları yanında; preinkübasyon ısısının da  $55^{\circ}C$  de olması gereklidir. Bu durumda enzim aktivitesi %110 civarında gerçekleşmektedir (32,35,56).

Yapılan çalışmalarda tükürük bezleri ve karaciğer arginazının  $Mn^{++}$  iyonları ile aktivasyona uğradıkları, ancak eritrosit arginazında bu oranda bir aktivasyonun gözlenmediği ortaya konmuştur (56).  $Mn^{++}$  iyonları ile aktivasyonun; karaciğer arginaz aktivitesinde 4-5 kat, eritrosit arginaz aktivitesinde 2-6 kat arttığı bildirilmiştir (57).

Arginaz aktivitesini,  $Mn^{++}$  iyonlarından başka,  $Co^{++}$ ,  $Cd^{++}$ ,  $Ni^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$  iyonları da artırmaktadır.  $Hg^{++}$ ,  $Ag^{++}$  gibi ağır metal iyonları ise enzimin aktivitesini azaltmaktadır (34). Arginaz enzimi katalizörlüğünde meydana gelen reaksiyonun ürünlerinden ornitin, arginazı inhibe ederken; diğer ürün olan üre ise inhibe etmemektedir. Ornitin dışında; lösin, izölösin, lizin, prolin, sistein, valin, tirozin gibi L-amino asitlerin de arginaz üzerine inhibitör etkisi vardır. Ornitin ve lizin yarışmalı; valin, izölösin, lösin ve sistein ise yarışmasız inhibisyona neden olur (52).

Arginaz enziminin iki izoenzimi olduğu tespit edilmiştir. Bunlar arginaz tip 1 (A-I) ve arginaz tip 2 (A-II)'dir (58). A-I izoenzimi sitozolik form olup, karaciğerde baskın olan tiptir ve ürogenizde primer rol alır. A-II izoenzimi ise eritrositlerde ve ekstrahepatik dokularda bulunur. Poliamin sentezinde rol oynar. Toplam arginaz aktivitesinin %98'inden A-I izoenzimi sorumludur (59).

### **Klinik Olarak Arginaz Enzimi**

Arginaz enzimi üre döngüsünün anahtar enzimidir ve ana kaynağı karaciğerdir. Üre döngüsünün gerçekleşmediği birçok doku ve organda da bulunmaktadır. Serum arginaz düzeyleri, sağlıklı kişilerde oldukça düşüktür (60). Akut hepatit, karaciğer metastazları, siroz, safra kanallarının malign tümörleri gibi hücre harabiyetine sebep olan benign ve malign karaciğer hastalıklarında serum arginaz aktivitesi artar (61).

Eritrosit arginaz aktivitesinin pernisiyöz anemi, talesemi major, megaloblastik anemi, orak hücreli anemi gibi hematolojik hastalıklarda arttığı gösterilmiştir (62).

Kalıtsal olarak arginaz enzimi eksikliğine nadir olarak rastlanmaktadır. Eksikliğinde hiperamonyemi atakları, sistein ve lizin kaynaklı aminoasidüri gözlenir. Üre döngüsünün bozulmasına ve sonuç olarak hiperargininemiye yol açar. Hiperargininematik hastalarda enzim aktivitesi yoktur. Plazma arginin düzeyinde 5-10 kat artış olması ve eritrosit arginaz aktivitesindeki azalma, hastalığın tanısında önem taşır. Amniyon sıvısında arginaz aktivitesi doğru olarak ölçülemediğinden hastalığın prenatal tanısı zordur (39,59). Kalıtsal arginaz enzimi eksikliğinde, karaciğer, eritrosit, lökosit ve tükürükte arginaz enzim eksikliği gözlenirken, böbrek arginaz aktivitesinde belirgin bir artış saptanmıştır (39,59,63,64).

Hormonların, arginaz enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmak üzere yapılan çalışmalarda, glukokortikoidlerin protein katabolizmasına yol açarak üre döngüsü enzimlerini ve arginazı artırdığı, kortikosteroidlerin karaciğer arginazını aktive ettiği, ancak böbrek arginazı üzerine bir etkisi olmadığı saptanmıştır (65,66).

Arginazın kanserle olan yakın ilişkisi, birçok araştırmacı tarafından çeşitli kanser türlerinde ortaya konmuştur. Stratus ve ark. (61), meme kanserinde preoperatif dönemde serum arginaz düzeyinin sağlıklı kadınlardan 4 kat yüksek olduğunu bulmuşlardır. Leu ve ark. (33), kolorektal kanserli hastalarda serum arginaz düzeyini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda kolorektal kanserli dokuların normal mukozal dokulara göre 2 kat fazla arginaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Wu ve ark. (67), gastrik kanserli hastalarda plazma arginaz aktivitesini normale oranla yüksek saptamışlardır. 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.

Bu uygulamalar gösterilerek arginazın kanser hastaları için belirleyici bir enzim olabileceği ileri sürülmektedir (33,61).

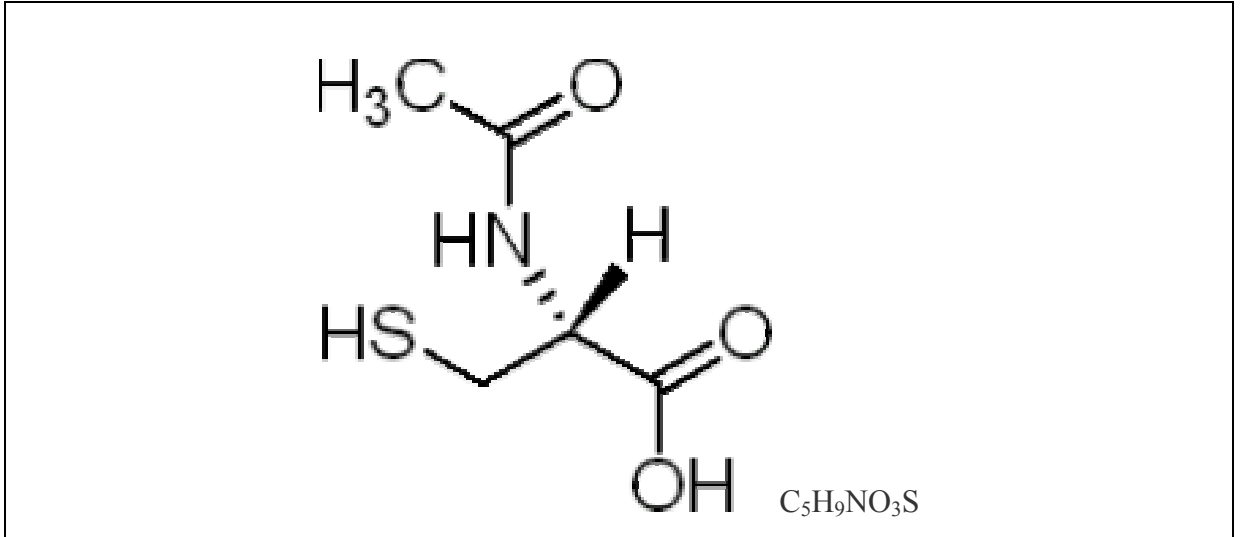
### NAC ( N-asetil-L-sistein)

NAC, aminoasit L-sistein'in asetile edilmiş bir varyantıdır ve sülfhidril (-SH) gruplarının mükemmel bir kaynağıdır. Vücutta glutasyon (GSH) sentezini simüle edebilecek metabolitlere çevrilir. Böylece detoksifikasyonu başlatır ve doğrudan serbest radikal scavenger olarak davranır (68).

N-asetilsistein hücre membranını geçip hücre içinde sisteine dönerek GSH üretimini artırır (17). GSH'ın fizyolojik öncüsü olan sisteinin, kimyasal mutajenler ve radyasyona karşı koruyucu özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak sistein; hem hızlı metabolizması hem de toksik oluşu nedeniyle insanlara uygulanması doğru bulunmamaktadır (69).

NAC, yapısal olarak potansiyel bir antioksidan ve antienflamatuar özelliktedir (70). Redoks, sensitif değişim faktörlerini hızla aktive ederken; inflamasyon, immün ve akut faz yanıtını içeren genleri aktive eder (70,71).

Ayrıca; L-sistein ve redükte glutasyon öncüsü olan NAC'ın, hidrojen peroksit, hipokloröz asit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen molekülleri ile direkt etkileşerek onların zararlı etkilerini engellediği bildirilmektedir (72,73,74). Bu nedenle de son yıllarda birçok antitoksik özelliği bilinen NAC'ın, aynı zamanda antimutajenik ve antikarsinojenik özelliklere sahipliğini sorgulamak yönünde araştırmalar artmaktadır.



Şekil 14. NAC'ın yapısal formülü (103).

Yapılan çalışmalardan bazılarında; NAC'ın preprogelinaz (MMP-2)'ın, aktif formu progelinaza dönüşmesini ve enzim aktivitesini inhibe ederek epitel hücrelerinin karsinogenez, invazyon ve metastazını önlediği gösterilmiştir. Ayrıca NAC, endotel hücrelerinde apoptozu tetiklemeden, tümör gelişimi için önemli bir mekanizma olan anjiyogenezi önler (75,76).

NAC, *in vitro* olarak tümör hücre invazyonunu, *in vivo* olarak da metastaz oluşumunu, salgılanan matriks metalloproteinaz aktivitesini inhibe ederek engelleyebilmektedir. Yine metalloproteinaz inhibisyonu yoluyla anjiyogenezi de önleyebilmektedir. Böylelikle yayılımı damarlanmaya bağlı olan kanser hücrelerinin büyümesini ve diğer dokulara metastazını engeller (77). Hücre döngüsünü interfere ederek de yayılma ve metastaz önleyici etkiler gösterir (75). Ayrıca NAC'ın endotelial disfonksiyon, pulmoner fibroz, inflamasyon, invazyon, kıkırdak erozyonu ve asetaminofen detoksifikasyonu azaltıcı terapötik etkileri vardır(77). Transplant reddini azaltıcı yönde yararlı olabilmektedir (75).

Daha önceki çalışmalarla, kanser vakalarında doku arginaz düzeyinin arttığı belirtilmiştir(33,61,67). Bu çalışmada, meme kanseri geliştirilmiş dokulardaki arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve üre düzeylerine, antikarsinojenik etkisi çeşitli çalışmalarda gösterilmiş olan NAC tedavisinin etkileri araştırılacaktır.



## **GEREÇ ve YÖNTEMLER**

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

### **GEREÇLER**

#### **Çalışma Grupları**

Çalışmada ortalama ağırlıkları 25-30 gram arasında değişen (yaklaşık 28 gram), 8-10 haftalık, 20 tane erkek Balb/c cinsi fare kullanılmıştır. Bu fareler Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarından temin edildi.

Denekler rastgele seçilerek, 10 fareden oluşan iki grup oluşturuldu. Tüm fareler deneyin sonuna kadar ayrı kafeslerde, %50-60 nem oranı,  $22\pm 1$  °C ısıda, 12 saat gece-12 saat gündüz ışık periyodu olan ortamda tutuldular. İki gruba da standart fare yemi günlük olarak verildi. NAC tedavi grubunda 11. günde ölen fare çalışma dışı bırakılmıştır.

8-10 haftalıkken alınan farelerin sol ayak iç bölgesine 0.2 ml Ehrlich asit tümör hücreleri enjekte edildi. 9. günde tümör çapı 1 cm olduğunda fareler iki gruba ayrıldı.

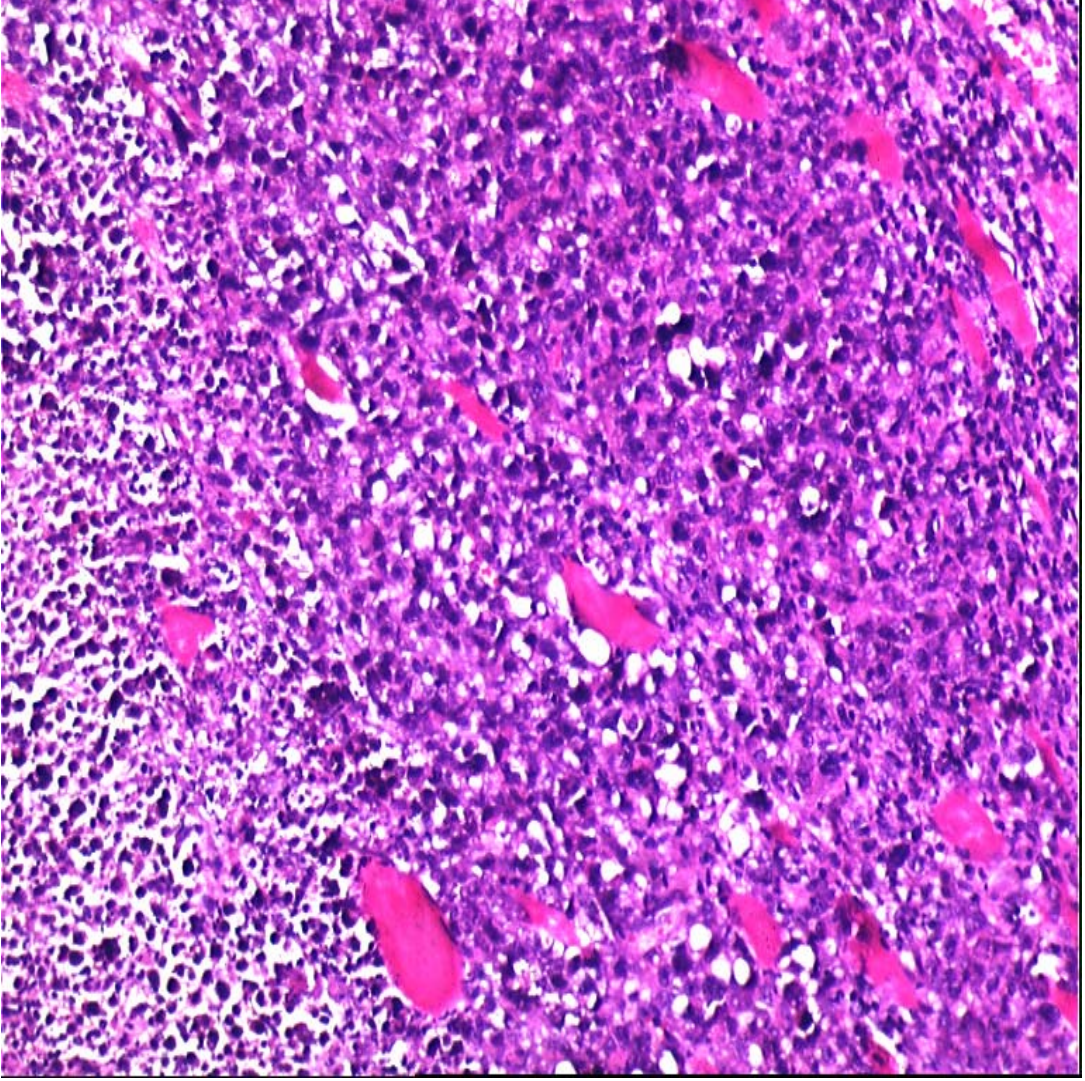
1. Grup (n=10): Tümör kontrol grubu olarak kabul edildi. Bu gruba 15 gün boyunca hergün aynı saatte bir defa olacak şekilde 0.2 ml intraperitoneal serum fizyolojik enjekte edildi.

2. Grup (n=9): Tedavi grubu olarak kabul edildi. 15 gün boyunca hergün aynı saatte bir defa olacak şekilde 200 mg/kg intraperitoneal NAC enjekte edildi.

Deney iki grup fare için de anestezi altında doku çıkarılması işlemi ile sonlandırıldı. Sakrifikasyon öncesi; ksilazin (10 mg/kg), ketamin (80 mg/kg) IM olarak anestezi amaçlı verildi. Ardından meme tümör dokuları çıkarıldı. Bir grup doku örneği %10'luk formaldehit

içerisine konarak tümör gelişiminin incelenmesi için patoloji laboratuvarına gönderildi. Bir kısmı da %0.9'luk SF ile yıkanıp -80 °C'de deneyin yapılacağı güne kadar saklandı.

Grup 1 ve 2'de makroskopik olarak görünen meme kanseri, histo-patolojik yönden de incelendi ve belirgin meme kanseri hücreleri gözlemlendi (Şekil 15).



**Şekil 15. Meme kanseri dokusunun (Grup 1) histopatolojik görünümü. Kanser dokusu belirgin olarak izlenmektedir (x10).**

#### **Doku Örneklerinin Homojenize Edilmesi**

Arginaz aktivitesi ölçümünden hemen önce derin dondurucudan çıkarılan meme tümör dokularının homojenizasyonunda Tris Tamponu kullanıldı. Dokular DIAX 900 model oto homojenizatör kullanılarak ağırlıklarının 10 katı soğuk 0.05 M Tris/HCl tamponu (pH: 8.05) ile homojenize edildi. Doku homojenizatları 11.000 rpm ve 4°C'de 20 dakika süre ile (Hettich Universal-30 RF) santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi.

## Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetik asit ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )	(Merck KgaA, Darmstadt- Almanya)
Bakır sülfat ( $\text{CuSO}_4$ )	(Merck KgaA, Darmstadt- Almanya)
Benzoik asit ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$ )	(Merck KgaA, Darmstadt- Almanya)
Demir klorür ( $\text{FeCl}_3$ )	(Merck KgaA, Darmstadt- Almanya)
Diasetilmonoksim ( $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_2$ )	(Merck KgaA, Darmstadt- Almanya)
Fosforik asit ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )	(Merck KgaA, Darmstadt- Almanya)
Hidroklorik asit (HCl)	(Merck KgaA, Darmstadt- Almanya)
Mangan klorür ( $\text{MnCl}_2$ )	(Merck KgaA, Darmstadt- Almanya)
Ninhidrin ( $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$ )	(Merck KgaA, Darmstadt- Almanya)
L-Ornitin hidroklorür ( $\text{C}_5\text{H}_13\text{ClN}_2\text{O}_2$ )	(Merck KgaA, Darmstadt- Almanya)
Potasyum klorür (KCl)	(Merck KgaA, Darmstadt- Almanya)
L-Sitrülin ( $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$ )	(Merck KgaA, Darmstadt- Almanya)
Sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	(Merck KgaA, Darmstadt- Almanya)
Sodyum bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	(Merck KgaA, Darmstadt- Almanya)
Sodyumhidroksit (NaOH)	(Merck KgaA, Darmstadt- Almanya)
Triklorasetik asit ( $\text{CCl}_3\text{COOH}$ )	(Merck KgaA, Darmstadt- Almanya)
Tiyosemikarbazid ( $\text{CH}_5\text{N}_3\text{S}$ )	(Merck KgaA, Darmstadt- Almanya)
Tiyoüre ( $\text{H}_2\text{NCONH}_2$ )	(Merck KgaA, Darmstadt- Almanya)
Üre ( $\text{H}_2\text{NCONH}_2$ )	(Merck KgaA, Darmstadt- Almanya)
L-arginin ( $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$ )	(Merck KgaA, Darmstadt- Almanya)
Sülfirik asit ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze- Almanya)
Folin	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze- Almanya)
Albumin	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze- Almanya)
Na-K Tartarat ( $\text{NaK}(\text{COO})_2(\text{CHOH})_2$ )	(Panreac Montplet&Estaban, Madrid-İspanya)

## Alet ve Malzemeler

Etüv	: Memmert 400	(GmbH + Co KG, Schwabach-Almanya)
Homojenizatör	: DIAX 900	(Heidolph-Almanya)
Manyetik karıştırıcı	: Ikamag RH	(Janke&Kunkel GmbH&CO, Almanya)
Soğutmalı santrifüj	: Universal 30 RF	(Hettich Zentifuge, Tuttlingen-Almanya)
Spektrofotometre	: UV-160A	(Shimadzu Corporation, Japonya)

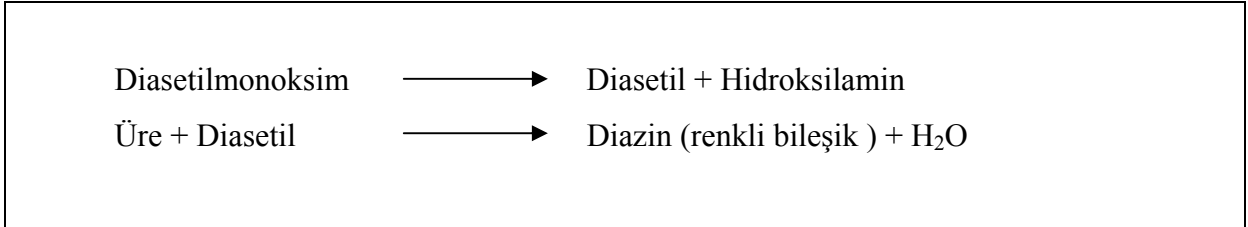
Su banyosu	: Elektromag GFL-1083	(Gesellschaft für Labortechnik, Alm.)
Vorteks	: Elektro-mag M-16	(Türkiye)
Elektronik tartı	: Sartorius	(Sartorius AG, Götting-Almanya)
pH metre	: pH level 1	(Inolab WTW, Weilheim-Almanya)
Cam malzemeler	: Deney tüpleri, balon jojeler, beherler v.b.	
Otomatik pipetler	: Finnpiquette	

## YÖNTEMLER

### Meme Dokusu Arginaz Aktivitesinin TDMU Yöntemi ile Ölçümü

Arginaz aktivitesi; substrat olan argininin örnekteki arginazla hidrolizi sonucunda oluşan üre miktarının TDMU yöntemi (78) ile spektrofotometrik olarak saptanması ile belirlenmiştir.

Üre için kullanılan birçok kimyasal metod gibi TDMU yöntemi de Feron reaksiyonunu temel alır (Şekil 16). Diasetilmonoksim, üre ile direkt olarak 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>++</sup> iyonları kullanılır.



### Şekil 16. Feron reaksiyonu (78).

Örnekteki üre düzeyinin 0.3 µmol/ml'den fazla olması sebebi ile Beer-Lambert kanununa uymaması bu metodun dezavantajıdır. Ancak, bu olumsuzluk yüksek absorbans değeri veren örneklerin sulandırıldıktan sonra ölçülmesi ile önlenabilir.

### Gerekli Ayıraçlar

Asit Karışımı: 0.12 M FeCl<sub>3</sub> (%56.7 lik H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> içinde) ve 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 39.1 ml eklenir. Daha sonra distile suyla 100 ml'ye tamamlanır. Oda ısısında saklanır.

Hazırlanan çözülden 1 ml alınıp üzerine 999 ml %20'lik (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'ten ilave edilir. 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 (91.14g/mol ) ve 0.0617 M DAM (101.1 g/mol ) içermektedir. 6.238 g diasetilmonoksim ile 0.328 g tiyosemikarbazid karıştırılarak bir miktar distile suda çözüldükten sonra yine distile su ile litreye tamamlanır. Oda ısısında ve 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> 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> elde edilir.

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

50 mM arginin çözeltisi: 0.87 g L-arginin balon jodede bir miktar distile suda çözüldürülür. 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 MnCl<sub>2</sub> çözeltisi: 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 çözelti 4°C ısıda saklanır.

Üre standardı (0,5 µmol üre/ml): 3 mg üre, 100 ml 0.016 M benzoik asit içinde çözüldürülür. Deney sırasında kullanılan standart konsantrasyonu 0.2 µmol üre/ml olarak belirlenmiştir. Bu nedenle stok çözelti sulandırılarak kullanılacak olan konsantrasyon elde edilir. Üre standart çözeltisi 4°C ısıda saklanmalıdır.

### **DeneySEL işlemler**

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<sub>2</sub> ile 1/10 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 µmol/ml) konuldu. Ardından da enzimatik reaksiyonu engellemek amacı ile sıfır zaman, standart ve kör tüplerine 3'er ml asit karışımı konuldu.

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

Daha sonra 37°C'ye gelen enzim kaynağından, deney ve sıfır zaman tüplerine 0.2 ml konularak, 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, absorbansları 520 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüldü.

### **Arginaz Aktivitesinin Hesaplanması**

Tüm deney tüplerinin absorbansından, kendi sıfır zaman absorbansı çıkarılarak net absorbans elde edildi. Böylece enzim kaynağındaki endojen ürenin absorbansı hesabın dışında bırakıldı. Standartın absorbansı, standarttaki üre miktarı ve sulandırma katsayılarından ortak bir faktör bulundu. Faktör hesaplaması şu şekilde yapıldı;

$$\text{Faktör} = \frac{(0.2 \mu\text{mol üre / ml}) \times 10 \times 5 \times 4}{0.2 \mu\text{mol üre / ml'nin absorbansı}}$$

10: Süpernatantın MnCl<sub>2</sub> sulandırma katsayısı

5: Süpernatantın inkübasyon ortamındaki sulandırma katsayısı

4: İnkübasyon süresinin 1 saate tamamlanma katsayısı

0.2 µmol üre/ml'nin absorbansı: 0.637 olarak okunmuştur.

Faktör = 62.79 olarak hesaplandı.

Meme dokusu için enzim aktivitesi; ünite olarak tanımlanmıştır. Bir ünite enzim aktivitesi, 1 saatte 37°C'de substrat olarak kullanılan L-arginin'den 1 µmol üre oluşturan enzim aktivitesinin mg protein cinsinden ifadesidir. Enzim aktivitesinin hesaplanmasında net örnek absorbansları faktör (62.79) ile çarpılmıştır. Meme dokusu için; µmol 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 (µmol üre/mg protein/saat); olarak belirtilmiştir.

### **Meme Dokusu Üre Düzeyinin TDMU Yöntemi ile Ölçülmesi**

Meme doku üre düzeylerinin belirlenmesi için; 20 kat dilüe edilmiş süpernatantlardan 1'er ml deney tüplerine konuldu. Standart tüpüne üre standartından 1 ml kondu (0.1 µmol/ml). Kör tüpüne ise 1 ml distile su konduktan sonra deney tüplerine 3 ml asit karışımı konularak 37°C'de 15 dakika sallantılı su banyosunda bekletildi. Bu işlemin hemen ardından bütün tüplere 2 ml renk ayırıcı ilave edildi ve kaynar su banyosunda 10 dakika tutuldu. Musluk suyu altında soğutulduktan sonra 520 nm dalga boyunda spektrofotometrede köre karşı absorbansları okundu.

$$\text{Üre düzeyi } (\mu\text{mol üre/ml}) = \text{Deney absorbansı} \times \frac{(0.2 \mu\text{mol üre/ml}) \times 20}{0.2 \mu\text{mol üre/ml}'\text{nin absorbansı}}$$

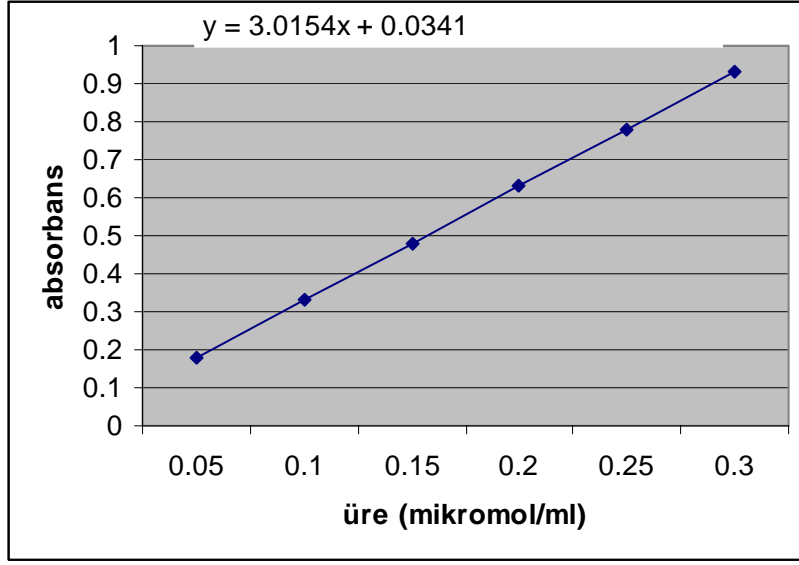
20: Homojenatın 0.05 M Tris/HCl ( pH 8.05) tamponu ile sulandırma katsayısı

0.2 µmol üre/ml'nin absorbansı: 0.637 olarak okunmuştur.

$$\text{Üre düzeyi } (\mu\text{mol üre/ml}) = \text{Deney absorbansı} \times \frac{(0.2 \mu\text{mol üre/ml}) \times 20}{0.637}$$

Üre düzeyi (µmol üre/ml) = Deney absorbansı x 6.28 olarak formüle edilmiştir.

Üre standart çalışması regresyon grafiği Şekil 17'de gösterilmiştir.



**Şekil 17. Üre standart çalışması regresyon grafiği.**

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

Chinard Yöntemi (79) prensibi: Bu yöntem ornitin ninhidrin ile oluşturduğu mor renkli kompleksin kolorimetrik olarak ölçümüne dayanmaktadır.

#### **Gerekli Ayıraçlar**

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

Ninhidrin ayıracı: 2.5 gr ninhidrin; 40 ml 6N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ve 60 ml glasiyel asetik asitin içinde çözündürülür.

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

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

Çalışılacak doku homojenatı %10'luk TCA ile 1/1 oranında muamele edildikten sonra 3000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi 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 solüsyonu konuldu. Tüplere sırayla 2.5 ml glasiyel asetik asit ve 0.25 ml ninhidrin ayırıcı konuldu. Tüm tüpler vortekslenerek karıştırıldıktan sonra 30 dakika kaynar su banyosunda tutuldu. Su banyosundan çıkarılan tüpler hızla soğutularak 515 nm'de absorbanları spektrofotometrede ölçüldü.

### Ornitin Düzeyinin Hesaplanması

Ornitin değerinin hesaplanması için şu formül kullanılmıştır.

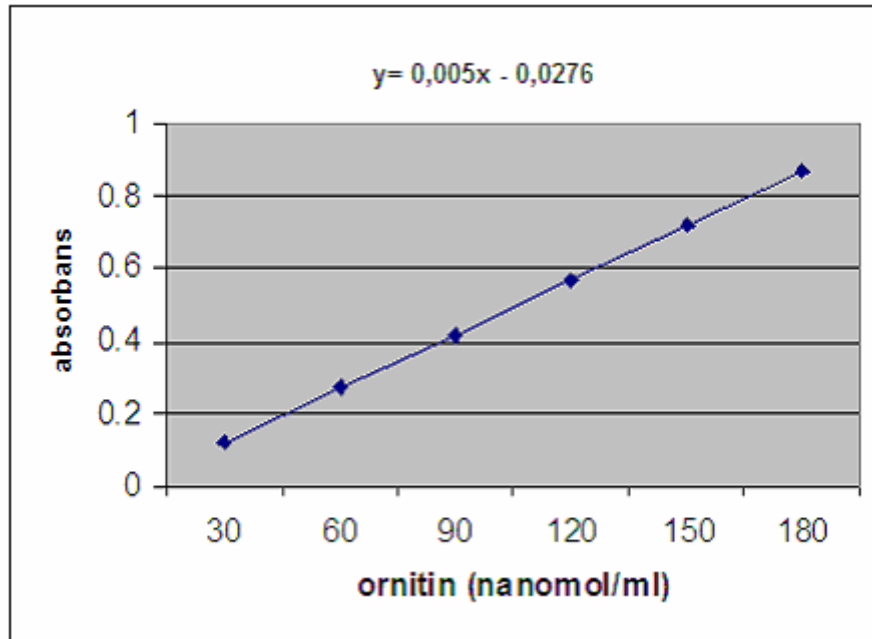
$$\text{Ornitin } (\mu\text{mol/ml}) = \frac{\text{Deney absorbanı} \times 2 \times (0.182 \mu\text{mol ornitin/ml})}{\text{Standart ornitin absorbanı değeri}}$$

2: Homojenatın TCA ile sulandırılma katsayısı

0.18 µmol/ml: Standart ornitin konsantrasyonu

0.872: Standart ornitin absorbanı değeri

Ornitin (µmol/ml)= Deney absorbanı x 0.413 olarak formüle edildi. Elde edilen ornitin değerleri protein miktarına bölünerek (µmol/mg protein) olarak standardize edildi. Ornitin standart çalışması regresyon grafiği Şekil 18'da gösterilmiştir.



Şekil 18. Ornitin standart çalışması regresyon grafiği.

## **Meme Dokusu Protein Düzeyinin Lowry Yöntemi ile Ölçülmesi**

Doku protein düzeyleri Lowry yöntemi ile saptandı (80). Bu yöntem alkali bakır tartarat ayırıcının peptid bağları ile kompleks yapması prensibine dayanmaktadır. Her 7 yada 8 amino asit artığı 1 bakır atomunu bağlar. Fenol ayıracı; bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mavi-mor renk oluşur. Bu renk 660 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

### **Gerekli Ayıraçlar**

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

Alkali bakır ayıracı: 10 gr Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.25 g Na-K Tartarat, 0.05 g CuSO<sub>4</sub>; ayrı ayrı tartılarak 0.5 N NaOH içinde balon jode çözümler ve çözelti 0.5 N NaOH ile 100 ml'ye tamamlanır. Bu çözelti 4°C'de 1 ay saklanabilir.

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

### **İşlemler**

Doku süpernatantları 1/10 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 1/10 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 vortekslendi. 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 düzeyi hesaplandı.

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

10: Süpernatantın serum fizyolojik ile sulandırılma katsayısı

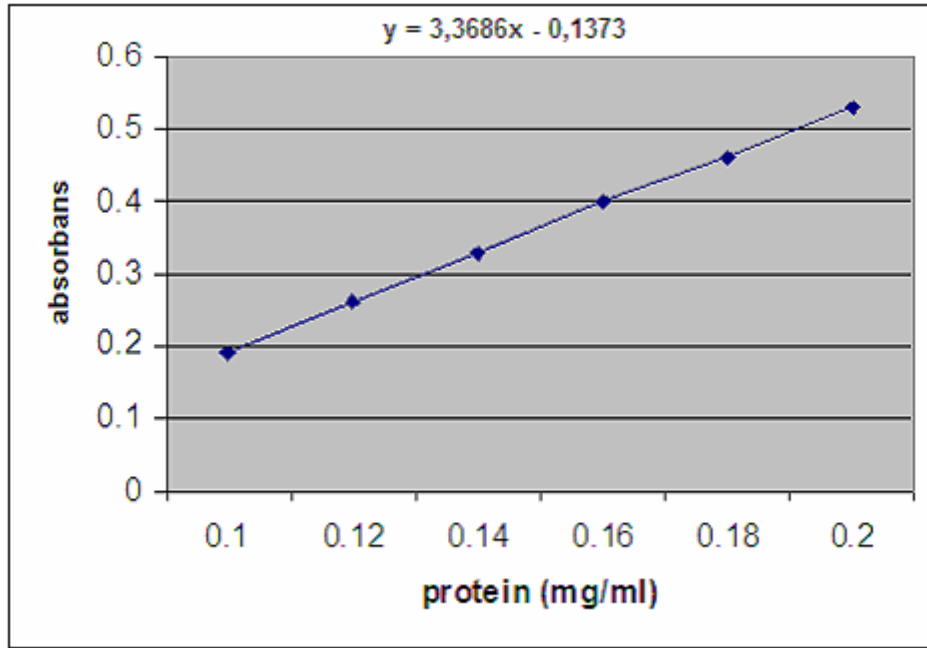
2 : Süpernatantın 1 ml'ye tamamlanma katsayısı

2: Protein standartının konsantrasyonu

0.536: Standart proteinin absorbanısı

Protein miktarı (% mg protein) = Deney Absorbansı x 74.62 olarak formüle edilmiştir. Elde edilen % mg protein, 100 ml'deki protein değeridir. Sonuç 100'e bölünerek protein miktarı mg/ml olarak hesaplandı.

Protein standart çalışması regresyon grafiği Şekil 19'de gösterilmiştir.



Şekil 19. Protein standart çalışması regresyon grafiği.

## İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Çalışmamızda sağlanan verilerin istatistiksel analizi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilgi İşlem Merkezi'nin kullandığı MINITAB (Release 1332 paket programı- Lisans No: WCP 1331.00197) kullanılarak yapıldı.

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

## BULGULAR

Çalışmamızda tümör ve tedavi gruplarındaki farelerin meme dokusundaki arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve üre düzeyleri araştırıldı. Her iki grubun da arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve üre düzeylerinin ortalamaları ve standart sapmaları (SD) belirlendi (Şekil 20-23) (Tablo 7).

Meme dokusu arginaz enzim aktiviteleri; tümör grubunda ortalama  $1218.07 \pm 703.91$  U/mg protein, tedavi grubunda ise ortalama  $400.14 \pm 97.91$  U/mg protein olarak bulundu (Tablo 4). Arginaz enzim aktivitesinin; tedavi grubunda, tümör grubuna göre anlamlı olarak düştüğü gözlemlendi ( $p < 0.05$ ).

**Tablo 4. Meme dokularındaki ortalama arginaz enzim aktivitesi.**

Grup	Arginaz aktivitesi (U/mg protein) Ort±SD
Tümör (n=10)	$1218.07 \pm 703.91$
Tedavi (Tümör+NAC) (n=9)	$400.14 \pm 97.91^*$

\* : Sonuçlar ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edildi.  $p < 0.05$ .

Tümör grubu ortalama ornitin düzeyi  $0.15 \pm 0.02$   $\mu\text{mol/mg}$  protein iken, tedavi grubu ortalama ornitin düzeyi  $0.11 \pm 0.03$   $\mu\text{mol/mg}$  protein bulundu (Tablo 5). Tedavi grubu ornitin düzeyinin, tümör grubu ornitin düzeyine göre anlamlı olarak düştüğü gözlemlendi ( $p < 0.01$ ).

**Tablo 5. Meme dokularındaki ortalama ornitin düzeyleri.**

Grup	Ornitin ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein) Ort $\pm$ SD
Tümör(n=10)	0.15 $\pm$ 0.02
Tedavi (tümör+NAC) (n=9)	0.11 $\pm$ 0.03*

\* : Sonuçlar ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edildi.  $p<0.01$ .

Arginaz enziminin L-arginini parçalaması ile meydana gelen diğer ürün olan ürenin gruplarımızdaki ortalama düzeyine bakıldığında; tümör grubunun ortalama üre düzeyi  $4.40\pm 0.74$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein, tedavi grubu ortalama üre düzeyi ise  $3.58\pm 0.40$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein olarak ölçüldü (Tablo 6). Tedavi grubu üre düzeyinin, tümör grubu üre düzeyine göre anlamlı olarak düştüğü gözlemlendi ( $p<0.05$ ).

**Tablo 6. Meme dokularındaki ortalama üre düzeyleri.**

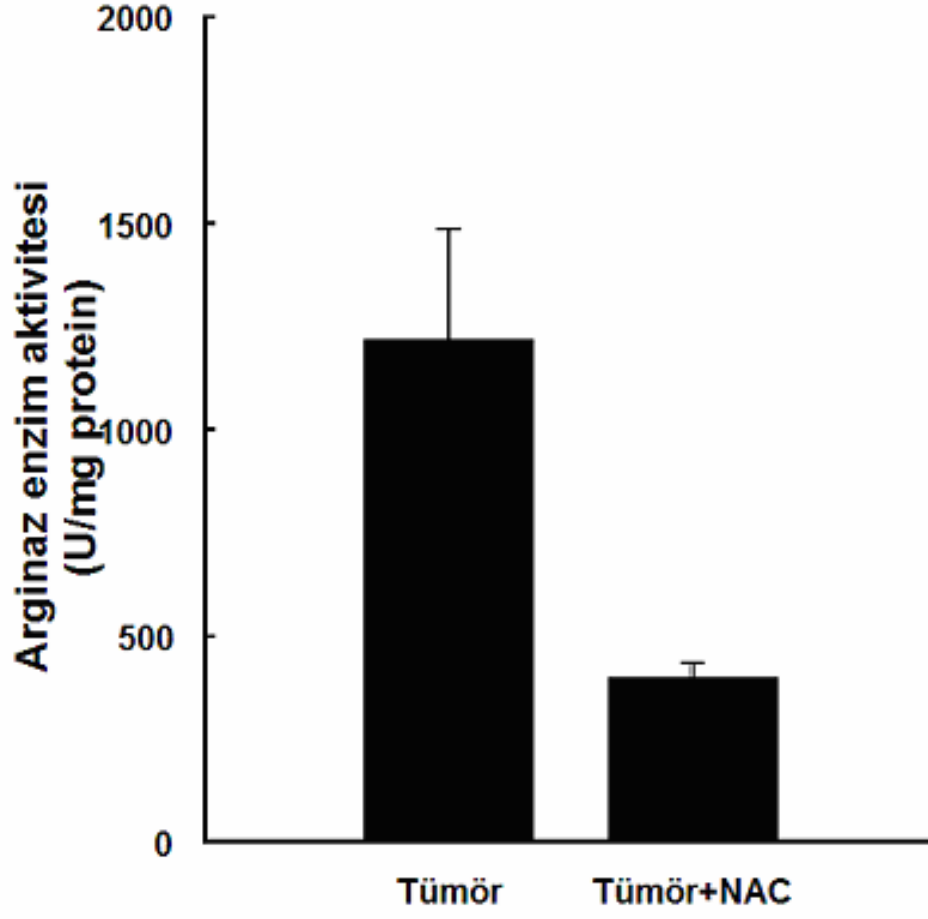
Grup	Üre ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein) Ort $\pm$ SD
Tümör(n=10)	4.40 $\pm$ 0.74
Tedavi (tümör+NAC) (n=9)	3.58 $\pm$ 0.40*

\* : Sonuçlar ortalama  $\pm$  SD olarak ifade edildi.  $p<0.05$ .

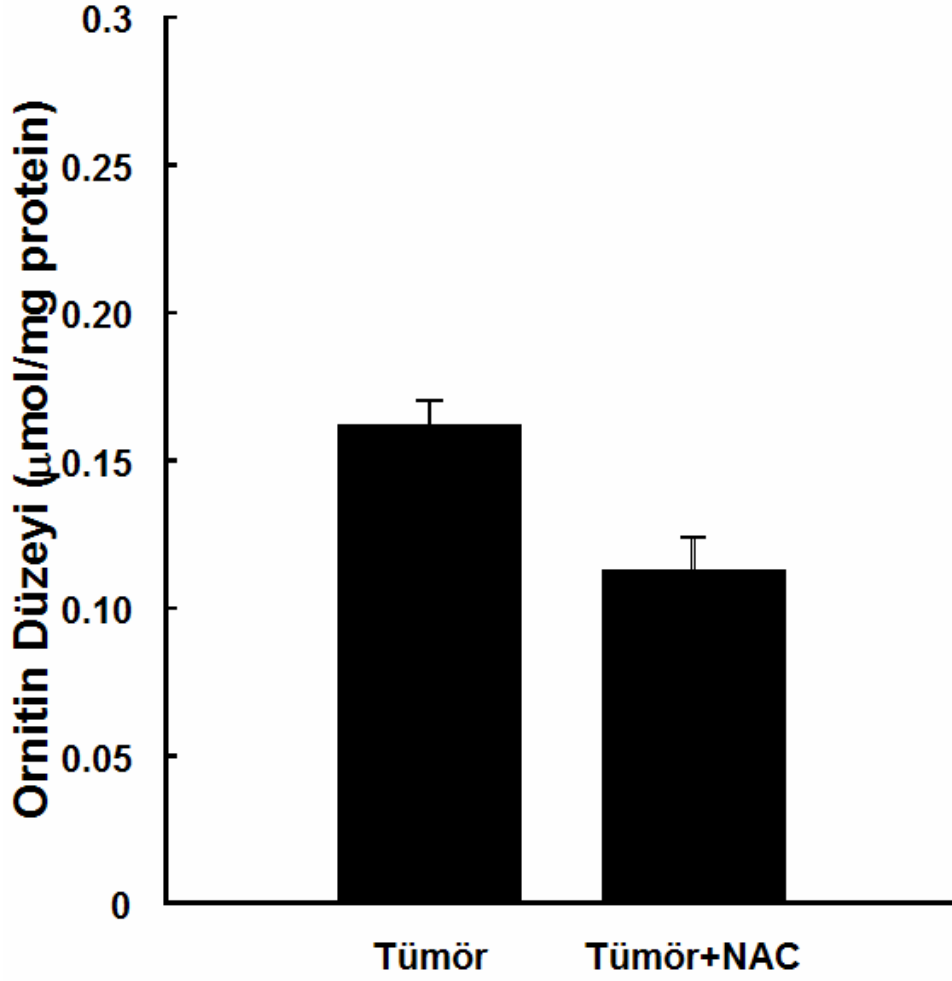
Tümör grubu ortalama protein düzeyi  $0.356\pm 0.08$  mg/ml iken tedavi grubu ortalama protein düzeyi  $0.388\pm 0.05$  mg/ml olarak ölçüldü (Tablo 7). Tedavi ve tümör grubu protein düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p> 0.05$ ).

**Tablo 7. Meme dokularındaki ortalama protein düzeyleri.**

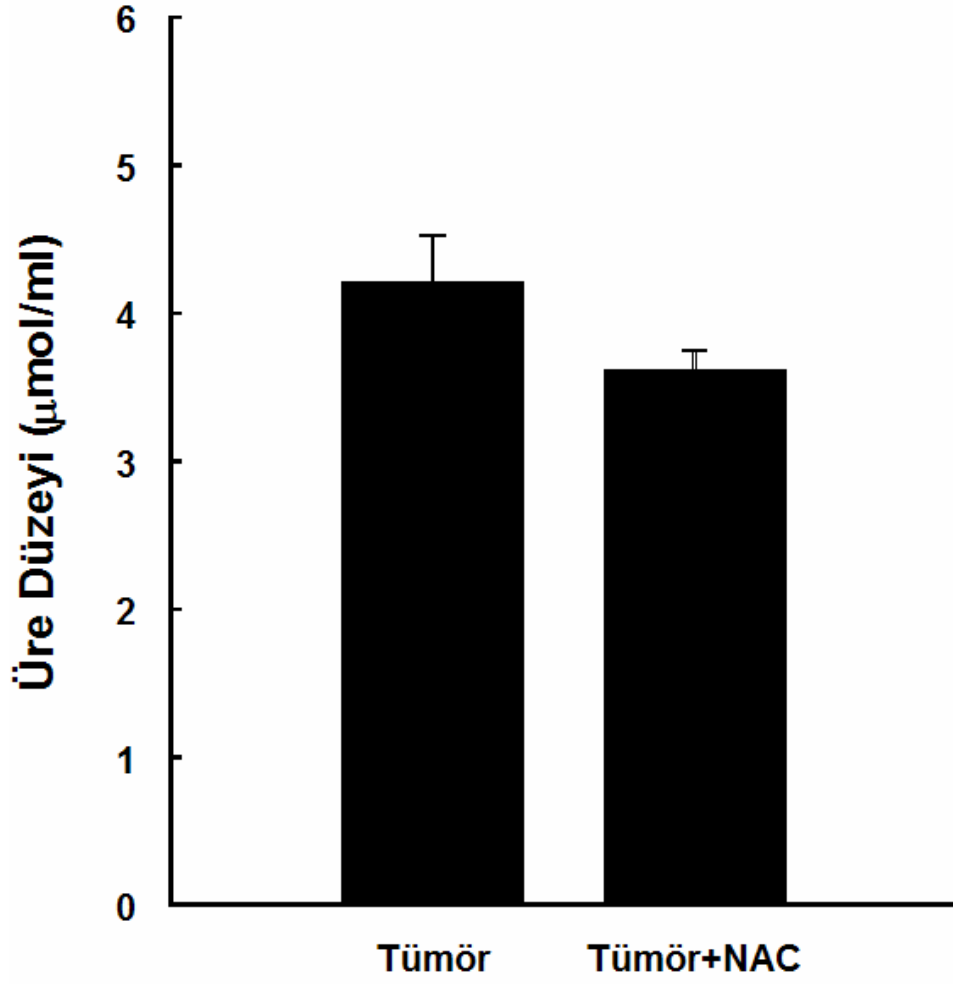
Grup	protein (mg/ml) Ort $\pm$ SD
Tümör	0.356 $\pm$ 0.08
Tedavi (tümör+NAC)	0.388 $\pm$ 0.05



Şekil 20. Meme dokusu arginaz enzim aktiviteleri.

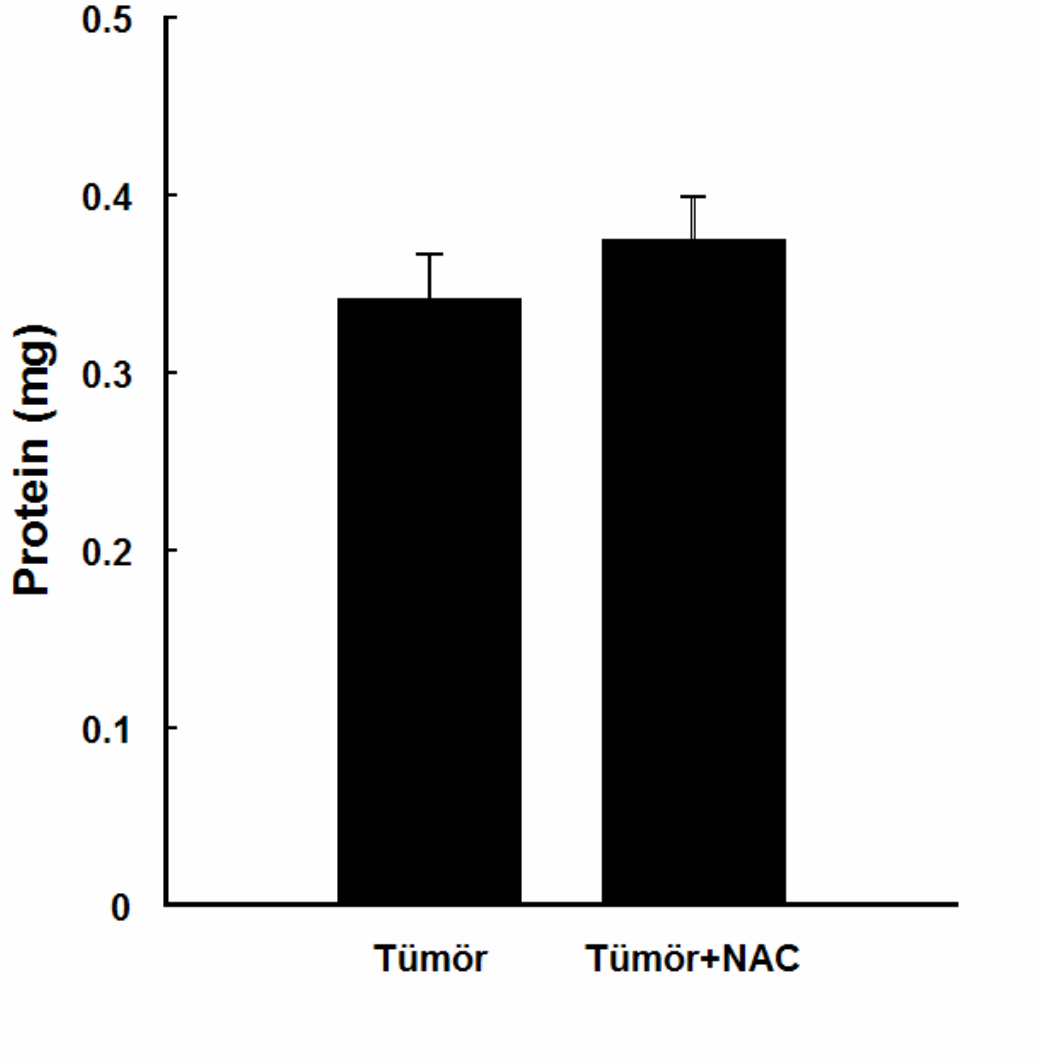


Şekil 21. Meme dokusu ornitin düzeyleri.



Şekil 22. Meme dokusu üre düzeyleri.





Şekil 23. Meme dokusu protein düzeyleri.

## TARTIŞMA

Arginaz enzimi; üre ve ornitini oluştururken substrat olarak L-arginini kullanmaktadır. L-arginin; üre, ornitin, NO ve sitrülün, agmatin, kreatin ve protein sentezi için substrat olarak 5 farklı yolda kullanılmaktadır. Üre sentezinin anahtar enzimi arginazdır. L-arginin metabolizmasında baskın olan yoldur. Arginaz, L-arginini NO ve sitrülüne parçalayan NOS (nitrik oksit sentaz) enziminin 1000 katı aktivite göstererek metabolizmaya yön veren reaksiyonu oluşturur (81).

Üre döngüsünün son enzimi olan arginaz enziminin iki izoenzimi tesbit edilmiştir. A-I izoenzimi sitozolik formu olup karaciğerde baskın tiptir ve üre sentezinde primer rol oynar. A-II izoenzimi ise mitokondrial formudur; eritrositlerde ve karaciğer dışı dokularda bulunur. Beyinde A-I tipi yaygın olarak üretilmesine rağmen baskın olan tip A-II tipidir (30,58,82).

Arginaz enziminin NO, poliamin, agmatin, prolin ve glutamat sentezinde rol oynaması son yıllardaki arginaz konulu çalışmaları artırmıştır. Arginaz enziminin üzerinde durulan diğer bir özelliği ise NOS ile aynı substratı kullanmasıdır. Her iki enzim de arginini tüketmek için birbirleriyle yarışmaktadırlar. NOS enzimi, L-arginini substrat olarak kullanarak NO ve sitrülüne parçalar. Bu yolla oluşan NO'nun kanser gelişimi yönünde negatif etkisinin olduğu bildirilmiştir. Hem birçok fizyolojik fonksiyonun gerçekleşmesi için gerekli olan, hem de aşırı üretimi durumunda radikalik etki gösteren NO; organizmada çift yönlü etki göstermektedir. Normal düzeyde NO, antioksidan işlev görürken; aşırı artması güçlü lipid peroksidanı olan peroksinitlere dönüşümü artırır (83).

Arginaz enzim aktivitesinin artması, NOS enzimini baskılayarak üretimi ornitin lehine çevirebilir. Bu durum poliamin sentezini artırırken, NO üretiminin azalmasına neden olacaktır. Sonuç olarak ise NO düzeyinin azalması, karsinojenik süreci hızlandırabilecektir.

Aynı substratı kullanan arginaz enzimi ise üre ve ornitin oluşumunu sağlar (84). Oluşan ornitin de poliamin, prolin ve glutamat sentezi için elzemdir. Poliaminlerin hızlı büyüyen hücre ve dokularda yüksek konsantrasyonlarda buldukları, hücre büyümesi ve farklılaşması için gerekli oldukları gösterilmiştir (85). Poliaminlerin bir analogu olan agmatinin daha önceleri bakteri, bitki ve omurgasızlarda bulunduğu bildirilmiş, ancak son yıllarda memelilerde de bulunduğu gösterilmiştir (86). Agmatinin, argininden arginin dekarboksilaz varlığında sentezlendiği ve tümör hücrelerinde büyümeyi önleyici bir ajan olarak varlık gösterdiği vurgulanmıştır (87). Agmatinin hücre çoğalmasını engelleyici bir ajan olması ve substrat olarak arginini kullanması, bu maddenin üretiminin de artan arginaz enzim aktivitesi ile birlikte azalacağını akla getirmektedir. Bu durum yine tümör gelişimi yönünde etkiye neden olabilir (88).

Büyüme ile ilgili genlerden olan c-fos ve c-myc protoonkojenleri hücre üreme sürecinde aktive edilirler. Mitojenik stimilasyonun ardından c-fos protoonkojeninin transkripsiyonu ve poliamin sentezinde eş zamanlı bir artış gözlenmiştir. Malignant dönüşüm poliamin sentezinde de benzer bir artış meydana getirmektedir. Poliaminlerin c-fos ve c-myc transkripsiyonunu arttırdığı gösterilmiştir (89). Büyüme süreci için gerekli olan poliaminlerin aynı zamanda karsinogenezle de ilişkili olduğu belirtilmektedir (90). Hücre içi poliamin metabolizmasının ve dolaşımdaki poliamin miktarının malign olaylarda arttığı, özellikle de eritrosit poliamin miktarının hücre proliferasyonunun bir indeksi olarak kullanılabileceği ve eritrosit poliamin düzeylerinin tümörün gelişimi ile doğrudan ilişkili olduğu bildirilmiştir (44). Poliamin konsantrasyonlarının meme kanserinde de arttığı, tümör poliamin konsantrasyonları ile tümörün yeniden nüks etmesi arasında pozitif bir korelasyon olduğu bulunmuştur (91).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kalın barsak, prostat, mide ve küçük hücreli akciğer kanseri gibi çeşitli kanser vakalarında serum ve doku arginaz düzeyinin arttığı belirtilmekte ve arginazın kanser vakaları için belirleyici bir enzim olabileceği ileri sürülmektedir (92).

Wu ve arkadaşları (93), peptik ülser ve gastrik kanserli hastalarda serum arginaz aktivite düzeyini incelemişler ve serum arginaz aktivite düzeyini gastrik kanserli hastalarda peptik ülserli hastalardan ve sağlıklı kişilerden önemli oranda yüksek bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar gastrik kanserin evresi ile serum arginaz aktivite düzeyi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Erken evre gastrik kanserli hastalarda ortalama serum arginaz aktivite düzeyi kontrol grubundan önemli derecede yüksek bulunmakla beraber, ileri evre gastrik kanserde erken evre gastrik kanser ve kontrol grubundan daha yüksek düzeyde bulunmuştur.

Araştırmacılar; serum arginaz aktivitesindeki artışın kanserin boyutu ile ilgili olduğunu düşünmektedirler (93).

Ayrıca, arginazın mide kanserinde dalağa ait katil hücre aktivitesini inhibe ettiği ve böylece kanser hücrelerinin yayılmasında pozitif bir rol oynadığı bildirilmiştir (94).

Çalışmamızda meme kanseri geliştirdiğimiz dokulara tedavi amaçlı uyguladığımız NAC'ın antikarsinojenik özelliğine yönelik çalışmalar, son yıllarda artış göstermiştir. Bu çalışmalara göre; NAC, insan mesane kanserinde MMP-9 üretimini ve aktivitesini düşürerek tümör invazyonunu engellemiştir (96). Hidrostatik basınç ile birlikte NAC'ın tümör hücrelerinin metastasını ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (97). NAC, malign melanoma hücrelerinin NF- $\kappa$ B'nin sürekli aktif olmasına bağlı hayatta kalımını engeller. Ayrıca NAC'ın c-fos/ c-jun, VEGF ekspresyonunu sınırlandırma, STAT ve siklin inhibitörlerini içeren birçok yolla transkripsiyonel aktiviteleri değiştirdiği gösterilmiştir (98). İlerlemiş kanserli hastaların periferik kandaki mononükleer hücrelerinde NAC, CD25 ve CD95 ekspresyonunu artırarak hücrelerin normal fonksiyonlarını göstermelerini sağlar (99).

NAC, kanserde temel terapötik hedef olan p53 (bir tümör baskılayıcı gen) RNA translasyonu arttırır. NAC'ın, diğer bir yararı da; siklin-bağımlı kinaz inhibitörlerini indüklemesi ve hücre döngüsünü G1 fazında tutmasıdır. Bu özellikler glutatyon artışından bağımsızdır (100,101).

NAC ve askorbik asit kombinasyonunun, NAC'ın tek başına kullanılmasına oranla farede urethane-indükleyici akciğer tümör hacminde daha etkili olduğu görülmüştür. Bronşial epitelin sigara içimine bağlı apoptozu NAC tarafından inhibe edilmektedir (102). Ayrıca NAC endotel hücrelerinde tümör gelişimi için önemli bir mekanizma olan anjiyogenezi önler (76).

NAC'ın kemoönleyici etkilerinin, deneysel tümörgenezi bloke ettiği çalışmalar da gösterilmiştir (98).

Meme kanserli hastaların tümör dokusu arginaz enzim aktiviteleri ve ornitin düzeylerinde sağlıklı dokulardakine göre önemli bir artış olduğu ve bu artışın poliamin biyosentezini hızlandırması nedeni ile kanser gelişiminde önemli bir rol oynayabileceği gösterilmiştir (9,61,95).

Elde ettiğimiz sonuçlara göre; meme dokuları üre düzeylerini karşılaştırdığımızda gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. Tedavi grubu üre düzeylerinin, tümör grubu üre düzeylerine göre düştüğü gözlenmiştir. Bunun nedeni olarak da azalan arginaz enzim aktivitesini gösterebiliriz.

Yaptığımız çalışmada; meme kanseri oluşturulmuş tümör grubu ve NAC tedavi grubu arginaz enzim aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir. Tedavide uygulanan NAC sonrasında gözlenen arginaz enzim aktivitesinin, meme kanserli gruba göre düştüğü bulunmuştur. Ornitin düzeyleri de anlamlı olarak farklılık göstermektedir. Tümör grubunun ornitin düzeyine göre, NAC tedavi grubu ornitin düzeylerinde anlamlı bir düşme gözlenmiştir.

Poliaminlerin analogu olan agmatinin hücre çoğalmasını engelleyici bir ajan olması ve substrat olarak arginini kullanması nedeni ile; bu maddenin üretiminin de azalan arginaz enzim aktivitesi ve ornitin miktarı ile birlikte artacağını düşünebiliriz. Bu durum yine tümör gelişiminde negatif yönde etkiye neden olabilir (87).

NAC tedavi grubundaki arginaz enzim aktivitesinin, tümör grubuna göre düşmesi; kısmen protein katabolizmasında azalmaya ve kısmen de NO sentezinde bir artışa yönelme olarak yorumlanabilir.

Ayrıca düşük arginaz enzim aktivitesi nedeni ile ana yolak; yarışma halinde olduğu NOS'a geçebilecektir. Bu durumda, daha fazla miktarda NO sentezlenmesi ve yine benzer mekanizma ile daha çok agmatin üretimi söz konusu olabilecektir. Bu mekanizmalar sonucunda; dengenin meme kanseri inhibisyonu yönüne kayması söz konusu olabilecektir.

Bu bulgulardan yola çıkarak; çeşitli kanser türlerinde arttığı belirtilen arginaz enzim aktivitesinin, kanser teşhisinde bir belirteç olarak kullanılmasının daha da önem kazandığını söylemek mümkündür. NAC'ın, kanser ile yakından ilişkili olan arginaz enzim aktivitesi, yine kanser mekanizmasında potansiyel rolü çeşitli çalışmalarda gösterilmiş olan ornitin düzeyleri üzerindeki azaltıcı etkisi, meme kanserine karşı koruyucu bir ajan olarak kullanılabileceği görüşünü akla getirmektedir. Diğer yandan, NAC'ın meme kanseri gelişimini durdurucu ve/veya tedavi edici etkilerinin ileri çalışmalarda irdelenmesi yararlı olacaktır.

## SONUÇLAR

Yapılan çalışmalarda; mide, prostat, akciğer, deri ve meme kanserinde, kronik lenfositik lösemi de arginaz enzim aktivitesinin artış gösterdiği bildirilmiştir. NAC'ın da çeşitli mekanizmaları doğrultusunda, karsinogenez, invazyon ve metastazı önlediğine yönelik çok sayıda çalışma yürütülmektedir.

Bu çalışmada; meme kanseri geliştirilmiş dokularda arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve üre düzeyleri üzerinde N-asetilsistein'in etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda şunları söyleyebiliriz:

- 1- Meme kanserinde artan arginaz enzim aktivitesi NAC tedavisi ile azaltılabilir.
- 2- NAC tedavisi sonucunda azalan arginaz aktivitesi doğrultusunda; ornitin ve üre düzeyleri de anlamlı olarak azalır.
- 3- NAC kullanımı sonucunda arginaz enzim aktivitesinin azalması ile L-arginini substrat olarak kullanan diğer yarışmalı enzim NOS yönünde reaksiyon ilerleyebilir. Sonuç olarak artan NO üretimi de karsinojenik süreci yavaşlatabilir.
- 4- L-argininden oluşan ornitin, akut inflamasyona yanıt olarak ve hücre proliferasyonunu sağlamak üzere poliaminlere dönüşür. Poliamin metabolizmasının malign olaylarda, artan hücre yapımı ile doğru orantılı olarak attığı bilinmektedir. NAC tedavisi sonucunda; arginaz enzim aktivitesinin azalması ile azalan ornitin düzeyi, poliamin artışını azaltabilir ve agmatin sentezini artırabilir.
- 5- Total olarak NAC meme kanseri gelişimini durdurucu yönde potansiyel bir ajan olarak kullanılabilir. Fakat, NAC'ın bu etkisinin yanında diğer kanser parametreleri üzerindeki etkilerinin de ileri çalışmalarda irdelenmesi gereklidir.

# **MEME KANSERİ OLUŞTURULMUŞ FARELERDE N-ASETİLSİSTEİNİN ARGİNAZ ENZİM AKTİVİTESİ, ORNİTİN VE ÜRE DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Sevil DEMİRKIRAN ERKUT**

## **ÖZET**

Meme kanseri gün geçtikçe ciddiye kazanılan bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünyada kadınlar arasında en sık görülen tümör olup, kadınlarda görülen kanser türlerinin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır.

Arginaz enzimi üre döngüsünün son enzimidir. Nitrik oksit sentaz ile aynı substratı kullanarak L-argininden üre ve ornitin oluşumunu sağlamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda kanser hastalarında serum ve doku arginaz enzim düzeyinin arttığı belirtilmekte ve arginazın kanser hastaları için belirleyici bir enzim olabileceği ileri sürülmektedir.

L-sistein ve redükte glutatyon öncüsü olan N-asetilsistein'in antitoksik özelliği iyi bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda da antimutajenik ve antikorsinojenik özellikleri sorgulanmaktadır.

Bu çalışmada, meme kanseri geliştirilmiş dokulardaki arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve üre düzeylerine, antikarsinojenik etkisi çeşitli çalışmalarda gösterilmiş olan N-asetilsistein tedavisinin etkileri araştırılmıştır.

Ortalama ağırlığı 25-30 gram ağırlığında değişen, 8-10 haftalık, 20 tane erkek Balb/C cinsi fare kullanılmıştır. Farelerin sol ayak iç bölgesine 0.2 ml Erhlich asit tümör hücresi

enjekte edildi. 9. günde tümör çapı 1 cm olduğunda tümör ve tedavi grubu olmak üzere iki gruba ayrıldılar. 15 gün boyunca tümör grubuna 0.2 ml. serum fizyolojik, tedavi grubuna ise 200 mg/kg N-asetilsistein intraperitoneal olarak verildi.

Çalışmanın sonucunda; meme dokusu arginaz enzim aktivitesi ( $p<0.05$ ), ornitin ( $p<0.01$ ) ve üre ( $p<0.05$ ) düzeyleri tedavi (tümör+N-asetilsistein) grubunda ( $n=9$ ), tümör grubuna göre ( $n=10$ ) anlamlı olarak düşük bulundu.

Çeşitli kanser tiplerinde artan arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve üre miktarlarının, N-asetilsistein tedavisi ile düşmesi, N-asetilsistein'in meme kanseri gelişiminin durdurulmasında koruyucu ve/veya tedavi edici bir ajan olarak kullanılabileceğini göstermektedir. N-asetilsistein'in bu etkilerinin ileri çalışmalarla irdelenmesi yararlı olacaktır.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, arginaz, ornitin, üre, N-asetilsistein.



# **THE EFFECTS OF N-ACETYLCYSTEINE ON ARGINASE ENZYME ACTIVITY, ORNITHINE AND UREA LEVELS IN THE EXPERIMENTAL BREAST CANCER**

**Sevil DEMİRKIRAN ERKUT**

## **SUMMARY**

Breast cancer is a problem which is becoming more serious day by day. It is the most frequent tumor found in women around the world and it forms almost 30 % of all the cancer types found in women.

Arginase is the last 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. The recent studies have shown that serum and tissue arginase enzyme activity have increased in cancer patients. It was also reported in the same studies that arginase may be a significant enzyme for cancer patients.

The antitoxic quality of N-acetylcysteine, which is the precursor of L-cysteine and reduced glutathione, is well-known. In the recent studies, the antimutagenic and anticarcinogenic effects of N- acetylcysteine have been widely investigated.

The aim of this study was to investigate the possible effects of N-acetylcysteine which shown as an anticarcinogenic substance, on arginase enzyme activity, ornithine and urea levels in the experimental model of breast cancer in mice.

In the study, 20 male Balb/c mice were used. They were 8-10 months old and 25-30

grams on average. 0.2 ml Erhlich acid tumor cell was injected into the subcutan part of their left feet. On the 9th day, when the diameter of the tumor was 1 cm, the mice were grouped into two as tumor and treatment groups. For 15 days, 0.2 ml isotonic sodium chloride were applied to the mice in the tumor group and 200 mg/kg N-acetylcysteine were applied to the ones in the treatment group as intraperitoneal.

The result of the study revealed that the breast tissue arginase enzyme activity ( $p<0.05$ ), ornithine ( $p<0.01$ ) and urea ( $p<0.05$ ) levels in the treatment group ( $n=9$ ) were significantly lower than the tumor group ( $n=10$ ).

It can be suggested that while decreasing the arginase enzyme activity, ornithine and urea levels which found to be increased in various cancer types, N-acetylcysteine may have a protective and/or therapeutic role on the breast cancer development. Those effects of N-acetylcysteine on cancer progress need more investigation.

**Key Words:** Breast cancer, arginase, ornithine, urea, N-acetylcysteine.

## KAYNAKLAR

1. Aydıntuğ S. Meme kanserinde erken tanı. www.ttb.org.tr .
2. Harris J, Moorow M, Norton L. Malignant Tumors of the Breast Cancer Principles Practice of Oncology, Philadelphia 1997; s:1557.
3. Koçak S. Kimler Meme Kanseri Olur? Klinik Bilimler ve Doktor, Ocak, 2000; 6(1): 68-72.
4. Tuncer S. Jinekolojik Kanselerde Tarama, Hacettepe Tıp Der.isi, 2000; 31(2):113-120.
5. Lemone P, Burke KM. Medical Surgical Nursing-Critical Thinking in Client Care, California 1996; 2039-2057.
6. Hossfeld DK, Sherman CD, Klinik Onkoloji, Uluslararası Kanserele Savaş Birliği-5, Ed.Kars A, Sarıalioğlu F, Fırat D, Ankara, Başbakanlık Basım Evi, 1992; s:236.
7. Göksel H. Meme Hastalıkları, Temel Cerrahi (Derleyen: Sayek İ), Güneş Kitabevi, Ankara.1996: 859-895.
8. Simmons RM, Rubin E, Pisch J. Breast Cancer, Cancer Surgery (Eds: Harvey JC, Beattle EJ), W.B. Saunders Company, NY USA.1996: 525-561.
9. Heber D, Byerley LO, Chlebowski RT. Metabolic abnormalities in the cancer patient. Cancer 1985; 5: 225-9.
10. Poremnska Z, Luboinski G, Chrzanowska A, Mielczarek M, Magnuska J, Baranczyk-Kuzma A. Arginase in patients with breast cancer. Clin Chim Acta 2003; 328: 105-111.
11. Conesa LE, Valero F, Nadal JC, et al. N-acetyl-L-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure. Am J Physiol 2001; 281: R730-R737.

12. Sehirli AO, Sener G, Satrioglu H, Ayanoglu-Dulger G. Protective effect of N-acetylcysteine on renal ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Nephrol* 2003; 16(1): 75-80.
13. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, et al. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 2000; 50: 7-33.
14. Statland BE, Winkel P. Neoplasia. *Methods In Clinical Chemistry* (Eds: Pesca AJ, Kaplan LA), Mosby Year Book Company. St Louis Missouri USA. 1987: 983-994.
15. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet* 2001; 2(9): 533-43.
16. Pisani P, Parkin DM, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from twenty-five major cancers in 1990: implications for prevention, and projections of future burden. *Int J Cancer* 1990; 83: 18-29.
17. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimares of the worldwide incidence of twenty-five major cancer in 1990. *Int J Cancer* 1991; 80: 827-41.
18. Fırat D. Cancer Mortality in Turkey and in the world 1980-1981. Turkish Association For Cancer Research and Control. Ankara. 1983.
19. Kadınlarda en çok görülen kanser vakaları. [http:// www.saglık.gov.tr / kanserle savaş dairesi başkanlığı](http://www.saglık.gov.tr/kanserle-savas-dairesi-baskanligi).
20. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49(3): 481-93.
21. Meme anatomisi. [http:// www.geocities.com /meme kanseri](http://www.geocities.com/meme-kanseri) .
22. Lenfatik sistem. [www.geocities.com / meme kanseri](http://www.geocities.com/meme-kanseri) .
23. Black JM, Jacops EM. *Clinical Management for Continuo of Care*, Five Edition, W.B. Saunder Company, Phidelphia 1997.
24. Ignatavicius DD, Wormen MN, Mishler MA. *Medical Surgical Nursing, A Nursing Process Aproach*; Second Edition, W.B. Saunder Company, Phidelphia, 1995.
25. Smeltzer SC, Bare BG. *Medical Surgial Nursing*, Eight Edition, Lippincott, 1996.
26. Doizer KJ, Mahon SM. *Cancer Prevention, Detection and Control*, A Nursing Society Pittsburg, PA, 2002:389-444.
27. Gross RE, *Breast Cancer: Risk Factors, Screening and Prevention*. *Seminars in Oncology Nursing* 2000; 16(3):176-184.
28. Ward BA, Reiss M. *Breast Diseases* (Ed.Noble J ). *Primary Care Medicine*. Third Edition. Mosby, St. Louis. 2001; pp 364-7.
29. Tobin MJ. *Breast cancer* (Ed. Taylor RB). *Family Medicine Principles and Practice*. Fifth Edition. Springer Verlag, New York. 1998, 934-8.

30. Nakamura H, Saheki T, Nakagawa S. Differential Cellular Localization of Enzymes of L-Arginin Metabolism in the rat. *Brain Res* 1990; 530:108-112.
31. Jorda A, Cabo J, Grisolia S. Changes in the Levels of Urea Cycle Enzymes and in Metabolites There on in diabetes. *Enzyme* 1981; 26:240-44.
32. Spector EB, Rice SCH, Moedjono S, Bernard B, Cederbaum SD. Biochemical properties of arginase in human adult and fetal tissues. *Biochem Med* 1982;28:165-75.
33. Leu SY, Wang SR. Clinical significance of arginase in colorectal cancer. *Cancer* 1992; 70 (4):733-736.
34. Rodvell VW (Çeviri: N.Dikmen ). Proteinlerin ve aminoasitlerin metabolizması. Harper' in Biyokimyası. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004; 307-59.
35. Konarska L, Tomaszewski L. Studies on L-Arginase in Developing Rat Small Intestine, Brain and Kidney I. Ontogenic Evaluation of arginase isoenzymes. *Biochem Med and Met Biol* 1986; 35:156-69.
36. Pederson SB, Flyvbjerg A, Gronbaek H, Richelsen B. Increased ornithine decarboxylase activity in kidneys undergoing hipertrophy in experimental diabetes. *Mol Cell Endoc* 1992; 86:67-72.
37. Ozan S, Gürsu F, Bayraktutan U, Gülen Ş. Farklı türlerin eritrositlerindeki Arginaz aktivitesi ile üre düzeyleri arasındaki ilişki. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi. 1. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi; Sivas:1990.
38. Ikemoto M, Tabata M, Murachi T, Totani M. Purification and properties of human erythrocyte arginase. *Ann Clin Biochem* 1989; 26(6):547-553.
39. Jackson MJ, Beaudet AL, O' Brien WE. Mammalian urea cycle enzymes. *Ann Rev Genet* 1986; 20:431-64.
40. İlhan N. İnsan tiroid arginazının kinetik özellikleri (tez). Elazığ. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi; 1992.
41. Pegg AE, Mc Cann PP. Polyamine metabolism and function. *Am J Physiol* 1982; 243(12):212-221.
42. Morgon DM. Polyamines-Essays *Biochem* 1987; 53:749-90.
43. Chang CI, Liao JC, Kuo L. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am J Physiol* 1998; 274:342-8.
44. Moulinoux JP, Quemener V, Khan NA. Biological significance of circulating polyamines in oncology. *Cell Mol Biol* 1991; 37(8):773-783.
45. Campbell RA. Polyamines and uremia. *Adv Exp Med Biol* 1987; 223:47-54.
46. Balisteri WF, Rej R. Liver function . Eds: Burtis A, Ashwood ER. *Tietz textbook of*

- clinical chemistry. 2 nd ed. Philadelphia. W.B.Saunders Company , 1994; 1449-1509.
47. Holmes FL. Hans Kresbs and Discovery of the ornithine Cycle. Federation Proceeding 1980; 3 (2):216-25.
  48. Altınışik M. Üre döngüsü. [www. mustafaaltinisik.org.uk](http://www.mustafaaltinisik.org.uk) / 8.
  49. Remesar X, Arola L, Palou A, Alemany M. Arginase Activity During Pregnancy and Lactation. *Horm Met Res* 1984; 16:468-70.
  50. Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodvell VW. Proteinlerin ve Aminoasit azotunun katabolizması. Harper'ın Biyokimyası. A Lange Medikal Book. Çeviren: Menteş G, Ersöz B. İzmir: Barış Kitabevi 1993; 382-94.
  51. Church DC, Fontenot JP. Nitrogen Metabolism and Requirements. Eds: Church DC. Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants, 2nd ed. Oregon: Corvallis, 1971; 25-55.
  52. İlhan N, Gülen Ş. Tiroid arginaz enzim aktivitesinin farklı metal iyonları varlığında ısıya karşı stabilitesi. *Biyokimya Dergisi* 1993; 18:59-67.
  53. Mora A, del ara Rangel M, Fuentens JM, Soler G, Centeno F. Implications of the S-shaped domain in the quaternary structure of human arginase. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1476(2):181-90.
  54. Nikumb SK, Santhanam K, Rama K, Rao MV. Hepatic and Serum Arginase and Ornithine Transcarbamylase Activities of Rats Maintained on Diets of Different Protein Quality. *Ann Nut Metab* 1987; 31:387-94.
  55. Kuhn NJ, Talbot J, Ward S. pH-Sensitive control of arginase by Mn(II) ions at submicromolar concentrations. *Arch Biochem Biophys* 1991; 286:217-21.
  56. Ozan S, Gülen Ş. Sığır tükürüğünde arginaz enzimi ve özelliklerinin tükürük bezleri, eritrosit ve karaciğer arginazları ile karşılaştırılması. *Doğa Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi* 1989; 13:154-63.
  57. Colombo J, Konarska L. Arginase. Eds: Bergmeyer HV. *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed. Weinheim: Verlag Chemie GmbH, 1984; 285-94.
  58. Cederbaum SD, Yu H, Grody W W, Kern RM, Yoo P, Iyer RK. Arginase I and II : Do their functions overlap? *Mol Genet Metab* 2004; 81:38-44.
  59. Bansal V, Ochoa JB. Arginase availability, arginase and the immune response. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004; 6:223-8.
  60. Akiho H, Iwai A, Katoh- Suodh M, Tsukamoto S, Koshiya K, Yamaguchi T. Postischaemic treatment with orotic acid prevents neuronal injury in gerbil brain ischaemia. *Neuroreport* 1997; 8(3):607.

61. Straus B, Cepelak I, Festa G. Arginase, a new marker of mammary carcinoma. *Clin Chim Acta* 1992; 210:5-12.
62. Ozan S, Gürsu MF, Gülen Ş. Deneysel kurşun zehirlenmesinin köpeklerde transaminaz ve arginaz düzeylerine etkisi. Karakaş ES (Editör). 11.Gevher Nesibe Tıp Günleri' nde. 1993 Nisan 19-22, Kayseri, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Matbaası 1993; 79-86.
63. Konarsa L, Tomaszewski L. A simple quantitative micromethod of arginase assay in blood sports dried on filter paper. *Clin Chim Acta* 1986; 154: 7-18.
64. Scheuerle AE, Mc Vie R, Beudet AL, Shapira SK. Arginase deficiency presenting as cerebral palsy. *Pediatrics* 1993; 91:995-6.
65. Rodriguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, Ortiz B, Zea AH, Delgado A, et al. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell response. *Cancer Res* 2004; 64:5839-9.
66. Kumar AN, Kalyankar GD. Effect of steroid hormones on age dependent changes in rat arginase isoenzymes. *Exp Gerontol* 1984; 19:191-198.
67. Anderson WAD, Scott TM. Gelişme bozuklukları. Kısa patoloji, 3. baskı .Aykan TB, Tüzüner N, Sav A, İnce G. Nobel Tıp Yayınevi, İstanbul 1986: 284.
68. Kelly GS, Clinical Applications of N-acetylcysteine. *Alt Med Rev* 1998; 3(2):114-127.
69. S.De Flora, G.A.Rossi, A.De Flora. Metabolic, Dismutagenic and Anticarcinogenic Effects of N-acetylcysteine. *Respiration*, 1986; 50 Suppl. 1:43-9.
70. Cotgreave IA, N-Acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications, *Adv. Pharmacol* 1997; 38:205-27.
71. Demols A, Van Laethem JL, Quertinmont E, Legros F, Louis H, Le Moine Q. N-Acetylcysteine decreases severity of acute pancreatitis in mice *Pancreas* 2000; 20: 161-9.
72. Bergamini S, Rota C, Canali R, Stafferi M, Daneri F, Bini A, et al. N-acetylcysteine inhibits in vivo nitric oxide production by inducible nitric oxide synthase. *Nitric oxide*. 2001; 5(4):349-60.
73. Kelly GS. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev* 1998; 3(2):114-27.
74. Aruoma O, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 1989; 6(6):593-7.
75. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60:6-20.

76. Cai T, Fassina G, Morini M, Aluigi MG, Masiello L, Fontanini G, et al. N-acetylcysteine inhibits endothelial cell invasion and angiogenesis. *Lab Invest* 1999;79: 1151-1159.
77. Adriana A, Monica M, Francesco DA, Nicoletta F, Francesco C, Giuseppe A, Douglas MN, Carlos P, Silvio DF. Inhibition of Angiogenesis-driven Kaposi's sarcoma tumor growth in nude mice by oral N-Acetylcysteine. *Cancer Res* 2001; 61:8171-8178.
78. Gayer JW, Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Analy Biochem* 1986; 39:412-7.
79. Chinard FP. Photometric estimation of proline and ornithine. *J Biol Chem* 1952; 199: 91-5.
80. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-75.
81. Wu G, Morris SM. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond *Biochem J* 1998; 336:1-17.
82. Kern RM, Cederbaum CD, Grody WW. Cloning and characterization of the mouse and rat type II arginase genes. *Mol Genet Metab* 1998; 53:1-12.
83. Cheeseman KH. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Molec Aspects Med* 1993; 14:191-197.
84. Boucher JL, Moali C, Tevu JP. Nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55(8-9):1015-1028.
85. Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J* 2003; 376:1-14.
86. Raasch W, Regunathan S, Li G, Reis DJ. Agmatine, the bacterial amine, is widely distributed in mammalian tissue. *Life Sci* 1995; 56:2310-30.
87. Wang JF, Su RB, Wu N, Xu B, Lu XQ, Liu Y, Li J. Inhibitory effect of agmatine on proliferation of tumour cells by modulation of polyamine metabolism. *Acta Phar Sinica* 2005; 26:616-22.
88. Erbas H, Erten O, Daglar A, Irfanoglu ME. Arginase activity, ornithine and urea levels in breast cyst fluid. *Turk J Biochem* 2006; 31(3):108-95.(Baskıda).
89. Bachrach U, Wang YC, Tabib A. Polyamines: new cues in cellular signal transduction. *News Physiol Sci* 2001; 16:106-9.
90. Gugliucci A. Polyamines as clinical laboratory tools. *Clin Chem Acta* 2004; 344(1-2): 23-35.



91. Kingsnorth AN, Wallace HM, Bundred NJ, Dixon JM. Polyamines in breast cancer. *Br J Surg* 1984; 71(5):352-6.
92. Suer Gokmen S, Yoruk Y, Cakır E, Yorulmaz F, Gulen S. Arginase and ornithine, as markers in human non-small cell lung carcinoma. *Cancer Biochem Biophys* 1999; 17:125-31.
93. Wu C, Chi CW, Lin EC et al. Serum arginase level in patients with gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 1994; 18 (1):84-9.
94. Wu CW, Chi CW, Ho CK, Chien SL, Lui WYP. Effect of arginase on splenic killer cell activity in patients with gastric cancer. *Dig Dis Sci* 1994; 39:1107-112.
95. Gökmen S, Yörük Y, Yorulmaz F, Gülen Ş. Arginase and ornithine as markers in human non-small cell lung carcinoma. *Cancer Biochem Biophys* 1999; 17:125-131.
96. Kawaski S, Kageyama Y, Fujii Y, Kihara K, Oshima H. Inhibitory effect of N-acetylcysteine on invasion and MMP-9 production of T24 human bladder cancer cells. *Anticancer Res* 2001; 21:213-219.
97. Goldman Y, Peled A, Shinitzyk M. Effective elimination of lung metastases induced by tumor cells treated with hydro-static pressure and N-acetyl-L-cysteine. *Cancer Res* 2000; 60:350-358.
98. Anshu A, Ursula MN, Ulrike K, Shu-Ching S, Kevin PC. N-acetylcysteine promotes angiostatin production and vascular collapse in an orthotopic model of breast cancer. *Am J Path* 2004; 164:1683-1687.
99. Mantovani G, Maccio A, Melis G, Mura L, Massa E, Mudu MC. Restoration of functional defects in peripheral blood mononuclear cells isolated from cancer patients by thiol antioxidants alpha-lipoic acid and N-acetylcysteine *Int J Cancer* 2000;86:842-847
100. Liu M, Wikonkal NM, Brash DE. Induction of cyclin-dependent kinase inhibitors and G(1) prolongation by the chemopreventive agent N-acetylcysteine. *Carcinogenesis* 1999; 20:1869-1872.
101. Kusano C, Takao S, Noma H, Yoh H, Akiu T, Okumura H, et al. N-acetylcysteine inhibits cell cycle progression in pancreatic carcinoma cells. *Hum Cell* 2000;13:213-220.
102. D'Agostini F, Balansky RM, Izzotti A, Lubet RA, Kelloff GJ, De Flora S. Modulation of apoptosis by cigarette smoke and cancer chemopreventive agents in the respiratory tract of rats. *Carcinogenesis* 2001; 22:375-380.
103. Sigma katalogu. A7250.

## RESİMLEMELER LİSTESİ

ŞEKİLLER	Sayfa No
Şekil 1. Kanserlerin 2002 yılı insidans ve prevalans değerleri	3
Şekil 2. Meme anatomisi	5
Şekil 3. Memenin lenfatik drenajı	7
Şekil 4. Argininden üre ve ornitin oluşumu	8
Şekil 5. Arginaz enziminin katalizlediği reaksiyon ve ürünleri	9
Şekil 6. Poliaminlerin sentezi	9
Şekil 7. Protein sentezi	10
Şekil 8. Glutamattan amonyanın serbestleşmesi	10
Şekil 9. Üre döngüsü	11
Şekil 10. Karbomil fosfao oluşumu	12
Şekil 11. Ornitinden sitrülün oluşumu	13
Şekil 12. Arginosüksinat oluşumu	13
Şekil 13. Arginin ve fumarat oluşumu	14
Şekil 14. NAC'ın yapısal formülü	17
Şekil 15. Meme kanseri dokusunun histopatolojik görünümü.	20
Şekil 16. Feron reaksiyonu	22
Şekil 17. Üre standart çalışması regresyon grafiği	26
Şekil 18. Ornitin standart çalışması regresyon grafiği	27
Şekil 19. Protein standart çalışması regresyon grafiği	29
Şekil 20. Meme dokusu arginaz enzim aktiviteleri	32

<b>Şekil 21.</b> Meme dokusu ornitin düzeyleri	33
<b>Şekil 22.</b> Meme dokusu üre düzeyleri	34
<b>Şekil 23.</b> Meme dokusu protein düzeyleri	35

## **TABLolar**

<b>Tablo 1.</b> 1999 yılı Türkiye’de kadınlarda en çok görülen kanser vakaları	4
<b>Tablo 2.</b> 2001 yılı Türkiye’de kadınlarda en çok görülen kanser vakaları	5
<b>Tablo 3.</b> Meme kanseri gelişimindeki risk faktörleri	6
<b>Tablo 4.</b> Meme dokularındaki ortalama arginaz aktivitesi	30
<b>Tablo 5.</b> Meme dokularındaki ortalama ornitin düzeyleri	31
<b>Tablo 6.</b> Meme dokularındaki ortalama üre düzeyleri	31
<b>Tablo 7.</b> Meme dokularındaki ortalama protein düzeyleri	31

## ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında tarihinde Edirne’de doğdum. İlk öğrenimimi Gazi İlkokulu’nda, orta öğrenimimi Mimar Sinan Ortaokulu’nda, lise öğrenimimi İlhami Ertem Lisesi’nde ve üniversite öğrenimimi Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü’nde tamamladım.

1996 yılında Rize’de kimya öğretmeni olarak memuriyet hayatıma başladım. 1998 yılında Trakya Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı’na kimyager olarak atandım. 2001 yılında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimime başladım.

2005 yılından beri ODTÜ Sağlık ve Rehberlik Merkezi’nde kimyager olarak görev yapmaktayım.

Yüksek lisans eğitimim süresinde katıldığım çalışma:

Erbaş H, Demirkıran S, Gülen Ş. Edirne ve Çevresinde Yaşayan Bireylerde Referans Aralıklarının Belirlenmesi: Plazma Lipid profili. Şişli Etil Hastanesi Tıp Bülteni. 2005; 39(1):24-31.

## EKLER

### Ek 1. Etik kuruk raporu




T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKULTESİ  
ETİK KURUL KARARLARI

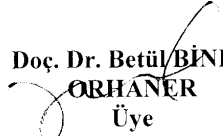
Oturum Sayısı : 14

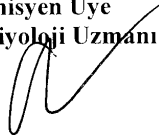
Karar Tarihi : 22.10.05

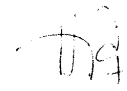
5- Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu 27.10.2005 tarihinde “Meme Kanseri Oluşturulmuş Farelerde N-Asetilsisteinin Arginaz Enzim Aktivitesi, Ornitin ve Üre Düzeyleri Üzerine Etkisi” adlı TÜTFEK 2005/115 protokol no’lu yüksek lisans öğrencisi Sevil Erkut DEMİRKIRAN’ın tez çalışmasını incelemek üzere toplandı. Toplantıya Yrd.Doç.Dr.Hakan ERBAŞ’ın izinli olması nedeniyle katılmadı ve diğer üyelerin katılımıyla çalışmanın incelenmesine geçildi.

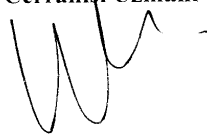
Yapılan inceleme sonunda çalışmanın Fakültemiz Biyokimya Anabilim Dalında yapılacağı, Yrd.Doç.Dr. Hakan ERBAŞ’ın yürütücüsü olduğu araştırma protokolünün amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve TÜBAP tarafından desteklenmesi koşuluyla yapılabileceğine mevcudun oybirliği ile karar verildi.

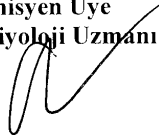
  
Doç.Dr. Dikmen DÖKMECI  
BAŞKAN  
Farmakolog

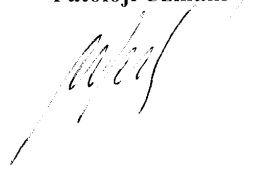
  
Doç. Dr. Betül BİNER  
ORHANER  
Üye  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları  
Uzmanı

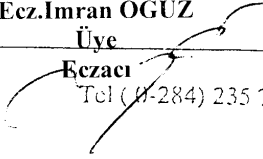
  
Doç. Dr. Dilek MEMİŞ  
Klinisyen Üye  
Anesteziyoloji Uzmanı

  
Doç.Dr. Betül UĞUR ALTUN  
Klinisyen Üye  
İç Hastalıkları Uzmanı

  
Yrd.Doç.Dr. Ümit Nusret  
BAŞARAN  
Klinisyen Üye  
Çocuk Cerrahisi Uzmanı

  
Yrd.Doç.Dr. Hakan ERBAŞ  
Üye  
Biokimya Uzmanı  
İzinli

  
Yrd. Doç. Dr. Ufuk USTA  
Üye  
Patoloji Uzmanı

  
Ecz. İmran OĞUZ  
Üye

Eczacı

Posta Adresi :  
Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı  
Güllapoğlu Yerleşkesi  
22030 EDİRNE

Tel : (0-284) 235 76 41 (9 Hat) Fax : (0-284)2357652