156872

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

Tez Yöneticisi
Yrd.Doç.Dr. Hakan ERBAŞ

MEME KİST SIVISI AMİNO ASİT PROFİLİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Aynur DAĞLAR

EDİRNE-2004

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

Tez Yöneticisi
Yrd.Doç.Dr. Hakan ERBAŞ

MEME KİST SIVISI AMİNO ASİT PROFİLİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Aynur DAĞLAR

Tez No: 93

EDİRNE-2004

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Yüksek Lisans Programı

Çevçevesinde yürüyülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınav Tarihi: 13/07/2004

Prof. Dr. Şendoğan GÜLEN

JÜRİ BAŞKANI

Prof. Dr. M. Emin İRFANOĞLU

ÜYE

Yrd.Doç.Dr. Hakan ERBAŞ

ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof.Dr. Müberra UYGUN

Enstitü Müdürü

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tez çalışmamda ve eğitimimde büyük katkıları olan sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Hakan ERBAŞ'a, yüksek lisans eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen hocalarım Prof. Dr. Şendoğan GÜLEN, Prof. Dr. Erol ÇAKIR, Doç. Dr. Selma SÜER GÖKMEN ve Yrd. Doç. Dr. Sevgi ESKİOCAK'a, numune toplamamızdaki katkılarından dolayı Genel Cerrahi ve Patoloji Anabilim Dalı çalışanlarına, yardımlarından dolayı Merkez Laboratuvarı çalışanlarına sonsuz teşekkürler.

Aynur DAĞLAR

SİMGE ve KISALTMALAR

AML	: Akut Miyeloid Lösemi
BCAA	: Dallı Zincirli Amino Asit (Branched Chain Amino Acid)
DHEA-SO_4	: Dehidroepiandrosteron-Sülfat
EAA	: Esansiyel Amino Asit
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)
GRP	: Gastrin Salıverici Peptid (Gastrin Releasing Peptide)
HCC	: Hepatosellüler Karsinom
HCl	: Hidroklorik asit
HPLC	: Yüksek Performans Likit Kromotografisi (High Performance Liquid Chromotography)
IS	: İnternal Standart
K	: Potasyum
NEAA	: Esansiyel Olmayan Amino Asit (Non-Essential Amino Acid)
PITC	: Fenilizotiyosiyanat
PTC	: Feniltiyokarbamil
TEA	: Trietilamin
TDLU	: Tubuler Duktal Lobüler Birimler (Tubular Ductal Lobular Units)
TGF-α	: Transforme Edici Büyüme Faktörü-α (Transforming Growth Factor-α)
TGF-β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü-β (Transforming Growth Factor-β)
UV	: Ultra Viyole

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
Dünyada ve Türkiye'de Meme Kanseri	3
Kistik Meme Hastalığı	6
Amino Asitler	11
Kanser ve Amino Asitler	12
GEREÇ VE YÖNTEMLER	15
Materyal	15
Örneklerin Analize Hazırlanması	15
Yöntemler	15
İstatistiksel Analiz	22
BULGULAR	23
TARTIŞMA	41
SONUÇLAR	46
TÜRKÇE ÖZET	48
İNGİLİZCE ÖZET	50
KAYNAKLAR	52
RESİMLEMELER LİSTESİ	59
ÖZGEÇMİŞ	61

GİRİŞ VE AMAÇ

Kistik meme hastalıkları günümüzde her 20 kadından birini etkileyen yapısıyla kadın memesinin en yaygın benign oluşumudur. Epitel yapısı göz önüne alındığında 2 tip meme kisti olduğu görülmüştür. Bunlar; apokrin epitele sahip ve Na/K oranı 3'ten küçük olanlar ve düz (flattened) epitel yapısıyla karakterize ve Na/K oranı 3'ten büyük olanlardır (1). Yapılan araştırmalar, genel olarak meme kistine sahip olan hastaların, yaşamlarının sonraki periyotlarında meme kanserine yakalanma oranlarının 2-4,4 kat daha fazla olduğunu göstermiştir. Yine bu çalışmalar sonucu özellikle apokrin epitele (Na/K<3) sahip olan ve meme dokusunda birden fazla (multiple) kist bulunduran hastalarda bu riskin daha da yükseldiği saptanmıştır (2,3).

Çeşitli kanser hastalarında yapılan çalışmalar kanserin bu hastaların karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmalarında bir takım bozukluklara neden olduğunu göstermiştir (4). Malign tümörlü hastalar; genellikle artmış protein turnoveri, artmış hepatik protein sentezi, azalmış kas protein sentezi ve artmış protein yıkımı ile karakterizedir (5). Progresif kanser gelişimi olan hastalarda anoreksiya, kilo kaybı ve doku yıkımı gerçekleşmekte (6,7) ve bu genel metabolizma bozukluğu ve kaşeksi ile sonuçlanmaktadır (8,9).

Kanser hastalarının amino asit profilleri incelendiğinde ise genel olarak bu hastaların dolaşım amino asit profillerinin değiştiği çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir (10-18).

Meme kanseri hastalarında ornitin, glutamik asit ve triptofan amino asitlerinin plazma düzeylerinin önemli düzeyde yüksek olduğu gösterilmiştir (11). Yine meme, gastrointestinal sistem, baş ve boyun kanserli hastalarda özellikle 7 amino asidin plazma düzeylerinin (glutamin, treonin, histidin, sistein, alanin ve ornitin) bilinen tanı ile ilişkili olduğu görülmüş ve amino asitlerin kendi karakteristik plazma serbest amino asit profillerini oluşturma

olasılığının bu hastalıkların teşhis ve orijinlerinin açıklanmasında önemli roller üstlenebileceğini düşündürmüştür (10,18). Kanser dokusu metabolizmasındaki bu değişiklikler, onkolojide kanseröz prosesin yoğunluğunu ve yayılımını gösteren markerlardan biri olarak yorumlanmaktadır ve bu markerların hasta terapisinin takibinde de kullanılabileceği düşünülmektedir (19).

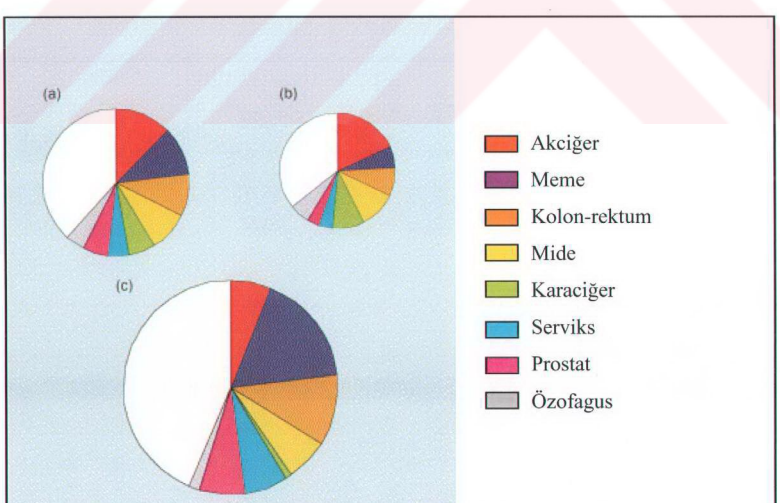
Bu çalışmanın amacı, meme kanseri gelişimi yönünden yüksek ve düşük risk grubunu oluşturan meme kistlerinden elde edilen kist sıvılarında önemli amino asitleri ve bunların bazı türevlerinin (aspartik asit, glutamik asit, hidroksiprolin, serin, asparagin, glisin, taurin, histidin, sitrüllin, treonin, alanin, arginin, prolin, histidin, tirozin, valin, metiyonin, sistin, izolösin, lösin, fenilalanin, triptofan, ornitin ve lizin) düzeylerini saptamak ve kistik meme hastalığından meme kanseri gelişimi yönündeki olası mekanizmaları araştırmaktır.

Bu çalışma ile meme kist sıvılarında; ilk defa amino asit düzeyleri saptanacak ve böylece meme kanseri gelişimi yönünden yüksek ve düşük risk grupları arasında amino asit düzeyleri yönünden herhangi bir farklılık olup olmadığı ortaya konulacaktır.

GENEL BİLGİLER

DÜNYADA VE TÜRKİYE'DE MEME KANSERİ

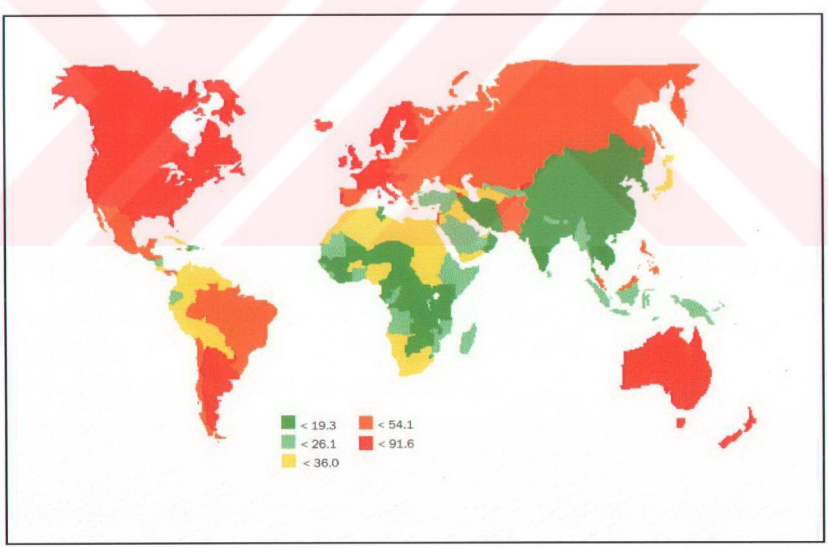
2000 yılında, varolan insidans ve mortalite verilerine dayanarak, dünyada 10.1 milyon yeni kanser vakası, 6.2 milyon ölü vaka ve 22 milyon yaşayan kanser hastası olduğu tahmin edilmektedir (20). Bu sonuçlar 1990 yılı insidans ve mortalite oranlarıyla karşılaştırıldığında yaklaşık %22'lik bir artış olduğunu göstermiştir (21,22). İnsidansı en yüksek olan kanserler sırasıyla %12.3 ile akciğer, %10.4 ile meme ve %9.4 ile kolon-rektum kanserleridir (20).



Şekil 1. 2000 yılı dünya kanser verileri (a-insidans, b-mortalite, c-prevalans) (20).

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümör olup, kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Dünya çapında mortalitesinin insidansa oranı %36'dır. Yaşayan 3.9 milyon kanser hastası kadın ile meme kanseri dünyada prevalansı en yüksek kanser tipidir (20).

Meme kanseri görülme sıklığı dünyada ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. İnsidans Japonya hariç sosyo-ekonomik olarak iyi gelişmiş olan Kuzey ve Batı Avrupa ülkelerinde, Amerika Birleşik Devletleri'nde yüksektir. Hawai, Kaliforniya, Kanada yılda yüzbinde 80-90 görülme sıklığı ile ilk sıralarda yer alırken, aynı değer Japonya'da sadece yüzbinde 12-15 arasındadır (20,23). Avrupa ülkelerinde ise görülme sıklığı kuzey ülkelerinden güneye ve batı ülkelerinden doğuya doğru gittikçe azalmaktadır (24). Buna karşın yıllık meme kanseri görülme sıklığında, düşük riskli toplumlarda yüksek riskli toplumlara göre daha belirgin bir artış olması yıllar içinde batı ülkelerinde yaşayan kadınlarla, doğu ülkelerinde yaşayan kadınlar arasındaki meme kanseri görülme sıklığı farkının kapanacağını göstermektedir (24,25).



Şekil 2. Dünya yaşa göre standardize edilmiş meme kanseri insidans oranları (her 100,000 birey için) (20).

İnsanlarda meme kanserinin nedeni bilinmemektedir. Genetik, çevresel, hormonal, sosyobiyolojik ve psikolojik etkenlerin oluşumunda rol aldığı kabul edilmekle birlikte, meme kanserli kadınların %70-80'i bu risk faktörlerine sahip değildir.

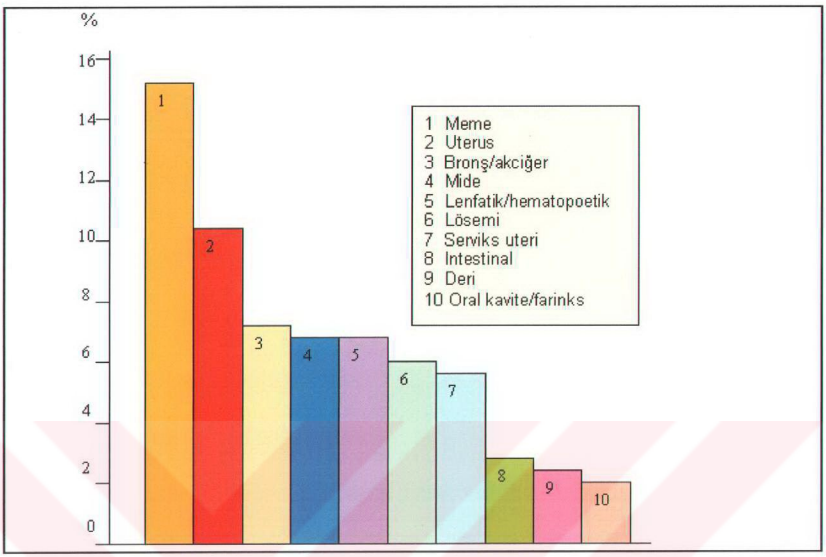
Bazı durumların meme kanserinin insidansını artırdığı bilinmektedir. Bunlar (26):

- Yaşın artması,
- Daha önce bir memede kanser saptanmış olması,
- Ailede meme kanseri hikayesi olması (özellikle annede ve kızkardeşinde olmuş ise, iki taraflı ise, menopozdan önce oluşmuş ise),
- İyonizan radyasyona maruz kalmak (özellikle 35 yaşın altında ise),
- Erken menarş, geç menopoz,
- Tek çocuklu olmak, ilk gebeliğin 30 yaşından sonra olması,
- Daha önce kolon, tiroid, endometriyum veya over kanseri hastalığı tanısı olması,
- Biyopside duktal veya lobüler atipik hiperplazi hikayesi olması (meme kanseri gelişme riski beş kat artmaktadır).

Meme kanseri riskini arttırdığı kesin olarak kanıtlanmamış diğer faktörler ise şunlardır (26):

- Östrojen replasman tedavisi,
- Obezite,
- Yüksek yağlı diyet,
- Alkol tüketimi.

Ülkemizde mevcut kayıt sisteminin yeterli olmaması nedeniyle kanser insidansı hakkında kesin bilgi yoktur. Sağlık Bakanlığı kanser kayıt merkezine bildirilen kanser oranı yüzbinde 35-40 civarındadır (27). Ancak bu oranın gerçekte yüzbinde 150-200 civarında olduğu ve bu oran dikkate alındığında ülkemizde yılda yüzbin civarında yeni kanser olgusunun ortaya çıktığı tahmin edilmektedir (28). Gelişmiş ülkelerde olduğu gibi Türkiye'de de 1990-1995 yılları arasında en sık ikinci ölüm sebebi kanser olmuştur. Gerçek kanser mortalitesi daha yüksek olmasına rağmen 1995 verilerine göre Türkiye'de kanser mortalitesi yüzbinde 67,7 bulunmuştur (29,30).



Şekil 3. Türkiye'de kadınlarda en sık görülen kanser lokalizasyonları (1994 hastane kayıtlarına göre) (28).

Sağlık Bakanlığının 1999 yılı verilerine göre kadınlarda meme kanseri insidansı yüzbinde 7,32'dir ve bu oran kadınlardaki kanser olgularının %24,1'ni oluşturmaktadır (31). Kadınlarda meme kanserinden kaynaklanan ölümler, 1980'lerden 1995 yılına kadar olan dönemde giderek artmış ve akciğer kanserinden sonra ikinci sıraya yükselmiştir (27).

KİSTİK MEME HASTALIKLARI

Batı Dünyasında yetişkin kadınların yaklaşık %7-10'unda bir veya daha fazla palpe edilebilen kist gelişimi, kistik meme hastalığının insan memesinin en yaygın hastalığı olmasına yol açmıştır (32).

Diğer pek çok meme lezyonu gibi kistler de ilk olarak 1829'da İngiliz cerrah Astley Cooper tarafından tarif edilmiştir. Kistik hastalığın ilk etraflı klinik tarifi elli yıldan uzun bir süre sonra Reclus ve Brissaud tarafından tanımlanmıştır (33). Kist oluşumuna bağlı olarak memede palpe edilebilir bir kitle oluşumu kistik hastalık ya da kistik değişim olarak adlandırılır (34).

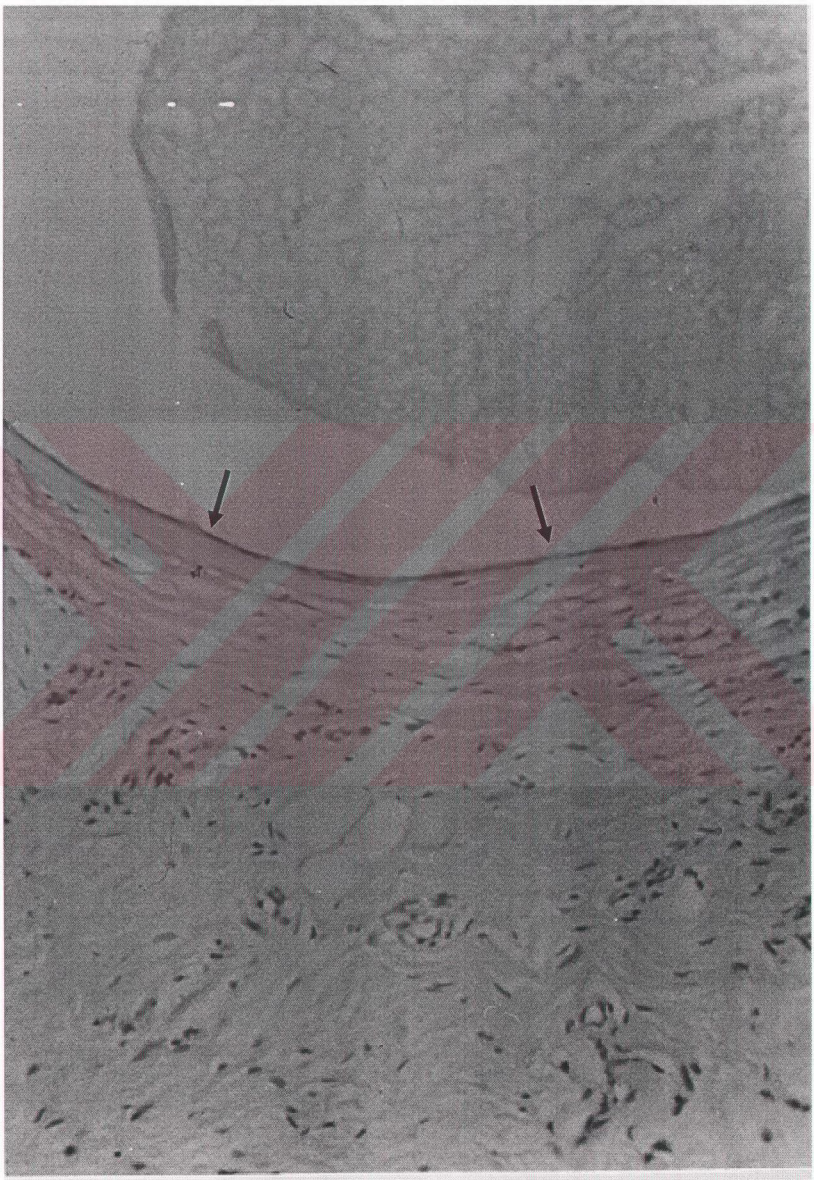
Tablo 1. Kistik meme hastalığından meme kanseri gelişim riski.

Çalışmanın yazarı	Yılı	Hasta sayısı	Meme kanseri için relatif risk
Harrington & Lesnick (35)	1980	917	3,5
Jones & Bradbeer (36)	1980	322	2,5
Hutchinson ve ark. (37)	1980	946	2,3
Roberts ve ark. (38)	1984	428	3,6
Haagensen (39)	1986	2493	2,7
Ciatto ve ark. (40)	1990	3809	1,8
Bundred ve ark. (41)	1991	644	4,4
Leis (42)	1993	2213	2,4
Bruzzi ve ark. (43)	1997	417	4,2
Dixon ve ark. (33)	1999	1374	2,8

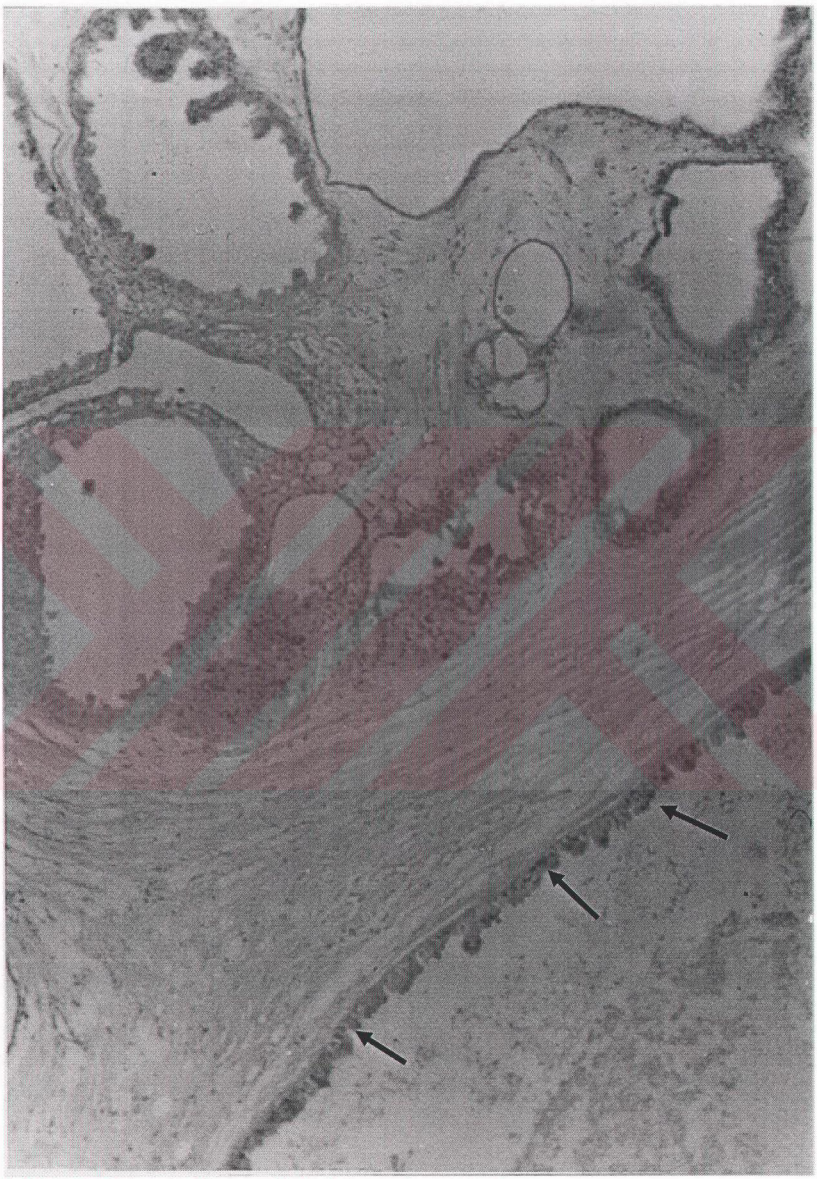
Meme kistleri premalign lezyonlar olarak düşünülmemesine rağmen, meme kanseri için yüksek risk markerları oldukları düşünülür (32). Çeşitli çalışmalar palpe edilebilen meme kistlerine sahip kadınların meme kanseri gelişimi açısından genel kadın populasyonuna göre 2-4,4 kat daha fazla riske sahip olduğunu göstermiştir (33, 35-43).

Etrafını çevreleyen epitellerine göre apokrin metaplastik epitelle çevrili ve düz epitelle çevrili olmak üzere iki tip meme kisti vardır (1,32). Apokrin epitel, Periodik asit Shiff (PAS) diastaz pozitif granüllerce zengin sitoplazma, luminal apikal çıkıntılar ve belirgin nukleusları olan asidofilik hücrelerle karakterizedir (Şekil 5). Düz epitel PAS diastaz pozitif granül içermeyen az stoplazmalı, bazofilik hücrelerle karakterizedir (Şekil 4). Meme kist epitelinin elektron mikroskobik çalışmaları apokrin hücrelerin mitokondri ve apikal sekretuvar granüllerce zengin, düz epitelin ise fakir olduğunu göstermiştir. Apokrin sekresyon intrasellüler granüllerin içeriğiyle olur ve merokrin olarak isimlendirilir.

Apokrin metaplastik epitelle çevrili meme kistlerinin intrakistik Na/K oranı genellikle 3'ten küçükken, düz epitelle çevrili meme kist sıvılarının intrakistik Na/K oranı genellikle 3'ten büyüktür (1). Apokrin epitelle çevrili meme kistlerine sahip kadınların diğer tipe sahip kadınlara göre daha yüksek kanser gelişimi riskine sahip olabileceği ileri sürülmüştür (32,44,45). Klinik olarak palpe edilebilen apokrin meme kistlerinde şiddetli epitelyal hiperplazi, nükleer atipi ve papiller apokrin değişiklikler gibi artmış meme kanser gelişim



Şekil 4. Düz epitelli meme kistlerinin genel görünümü.



Şekil 5. Apokrin epitelli meme kistlerinin genel görünümü.

riskiyle ilişkili histolojik değişikliklere yaygın olarak rastlanmaktadır (44). Multiple meme kistleri genellikle apokrin tiptedir (46). Multiple meme kistlerine sahip kadınlar (3,5 kat), tek meme kistine sahip kadınlara göre (2,1 kat) daha yüksek meme kanser gelişim riskine sahip olduğu bulunmuştur (39).

Kistik meme hastalığı memenin tubuler duktal lobuler birimlerinden (TDLU) orijinlenen çapı 3 mm'den büyük, içi sıvı dolu yapıların varlığıyla karakterize, hormonal olarak indüklenen bir hastalıktır (32,47). Kistler çapları 1 cm'ye ulaşınca palpe edilebilir ve klinik olarak saptanabilir. Bütün büyük kistler çapları 3 mm'den küçük olan mikrokistlerden köken alır. Mikrokistler kadın memesinde yaygın olarak bulunmakta ve normal bir bulgu oldukları düşünülmektedir. Meme kanserinde yüksek riskle ilişkili olmayan mikrokistlerin hepsi apokrin metaplastik epitelle çevrilidir. Bu kistlerin bazılarının sonradan neden büyük kistleri oluşturmak üzere büyüdüğü ve yine bir kısmının neden apokrinden düz epitele dönüştüğü bilinmemektedir.

Palpe edilebilen meme kistleri özellikle 40-50 yaş arasında olmak üzere premenopozal yıllarda yaygın ve postmenopozal dönemde hormon replasman tedavisi görenler dışındaki kadınlarda nadirdir (32). Büyük kistler premenopozal yıllardaki aşırı östrojenik stimulusa bağlı olabilir. Aşırı östrojen stimulusunun meme kanser gelişiminde de rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Kistik meme hastalığı yüksek meme kanser riskiyle ilişkili olmasına rağmen malign tümörün meme kistinden orijinlenmesi gerekli değildir. Palpe edilebilen meme kistleri olan kadınların yüksek meme kanseri gelişim riskine sahip olma nedenlerinin açıklanabilmesi için araştırmacılar, meme kist sıvılarının içeriğini analiz etmişlerdir.

Meme kist sıvısı endokrinolojik olarak incelendiğinde yüksek konsantrasyonlarda seks hormon ve mitojenik polipeptid içeriğine sahip olduğu görülmüştür. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Gastrin Salıverici Peptid (GRP), Transforme Edici Büyüme Faktörü alfa (TGF-α) ve beta (TGF-β) ailesi gibi bir çok mitojenik büyüme faktörleri ve östradiolün intrakistik düzeyleri Na/K<3 olan grupta yüksek bulunmuştur (48-50). Östradiol (51) ve mitojenik polipeptidlerin (52) meme kanser gelişimindeki proliferasyonu artırıcı rolleri bilinmektedir.

Apokrin epitel intrakistik androjenlerin varlığıyla da ilişkilidir (53). Apokrin meme kistlerinde yüksek konsantrasyonlarda testesteron ve dihidrotestesteron varlığı saptanmıştır (53,54). Yüksek konsantrasyonlarda aktif androjen bulunmasının nedeninin bu kistlerin etrafını saran apokrin epitelde meydana gelen başlıca dehidroepiandrosteron-sülfat (DHEA-SO_4) gibi prekürsörlerin metabolik dönüşümüne bağlı olabileceği öne sürülmüştür (54).

AMİNO ASİTLER

Amino asitler proteinlerin başlıca yapı taşlarını oluşturur. Doğada yaklaşık 300 amino asit olmasına karşın, bakterilerden insana kadar tüm canlı türleri 20 amino asidin ve ara sıra değişiklik gösteren türlerinden yapılmış proteinlerden oluşmaktadır. Proteinler içindeki tüm amino asitler α-amino asitlerdir ve L-konfigürasyonunda bulunurlar (55-56).

α-Amino asitler α-karbon atomuna bağlı bir amino grubu ($-NH_2$), bir karboksil grubu (-COOH), bir hidrojen atomu (H) ve bir yan zincirden (R grubu) oluşurlar.

Amino asitler R gruplarının çözünürlük özelliklerine, yani iyonizasyon ve polaritelerine göre beş ana sınıfa ayrılmaktadırlar.

1- Polar olmayan alifatik R gruplu amino asitler: Glisin, alanin, valin, lösin, izolösin bu grupta yer alır. Bu amino asitlerin içerdikleri alifatik yan zincirler hidrofobiktir. Valin, lösin ve izolösin dallı zincirli amino asitlerdir (56). Herhangi bir sınıfa sokulması güç olan prolin ve onun modifiye şekli olan hidroksiprolin de bu gruba dahil edilebilir. Alifatik karakterde yan zinciri ve sekonder bir amino grubu vardır (imino asit) (55).

2- R grupları aromatik olan amino asitler: Fenilalanin, tirozin ve triptofan bu grupta yer alır. Diğer amino asitler ışığı absorbe etmezken, bu gruptaki amino asitler dalga boyu ultraviyoleye yakın bir bölgede (250-290 nm) ışığı absorbe ederler.

3- Polar yüksüz R gruplu amino asitler: Serin, treonin, sistein, glutamin, metiyonin ve asparagin ve sisteinin disülfit köprüleriyle bağlanması sonucu oluşan sistin bu grupta yer alır. Su ile hidrojen bağları yapabilen fonksiyonel grupları bulunan amino asitlerdir. Bu fonksiyonel gruplar serin ve treoninde hidroksil grubu (-OH), sistein ve metiyoninde sülfhidril grubu (-SH), glutamin ve asparaginde ise amid gruplarıdır.

4- Negatif yüklü (asidik) R gruplu amino asitler: Aspartik asit ve glutamik asit asidik karakterli amino asitlerdir. Fizyolojik pH değerinde negatif yüklüdürler. Yapılarındaki ikinci karboksil grubu (-COOH) bu özelliklerini kazandırmaktadır.

5- Pozitif yüklü (bazik) R gruplu amino asitler: Lizin, arginin ve histidin bu grupta yer alır. Bazik hidrofilik yan zincirler taşırlar. Özellikle lizin ve argininin yüksek bazik özelliği vardır.

Standart olmayan amino asitler: Protein yapısında yer alan 20 amino asitin işlevlerini artırmak için polipeptid zinciri sentezinden sonra değişikliğe uğramasıyla (modifikasyon) oluşurlar. Hidroksilizin, hidroksiprolin, N-metillizin, fosfoserin, fosfotreonin, fosfoserin, sistin bunlardan önemli olanlardan bazılarıdır.

Standart olmayan amino asitlerden ayırdetmek için protein yapısındaki amino asitlere standart, primer veya doğal amino asitler denilmektedir.

Amino asit metabolizmasına kısaca değinirsek; organizmada bulunan dinamik amino asit havuzuna amino asitlerin katılımı üç yolla sağlanmaktadır. Bunlar besinlerle protein alınımı, endojen proteinlerin hidrolizi ve endojen amino asit sentezi ile olur. Gelişmiş canlılarda 20 amino asidin sentezinin ancak bir kısmı de novo sentez ile olmaktadır. Bunlara endojen (esansiyel olmayan) amino asitler denir. Organizmada sentez edilemeyen besinlerle alınan proteinlerden sağlanan amino asitlere eksojen (esansiyel) amino asitler denilmektedir. Valin, lösin, izolösin, treonin, metiyonin, fenilalanin, lizin ve triptofan esansiyel amino asitlerdir (56).

Piruvat ve sitrik asit döngüsünün ara maddeleri glikoneogenez ile glukoza dönüşebildikleri için bunları oluşturan amino asitlere glikoplastik veya glikojenik amino asitler denilmektedir. Bu amino asitler prolin, histidin, metiyonin, arginin, aspartik asit, asparagin, glutamik asit, glutamin, sistein, treonin, serin, alanin, valin ve glisindir.

Asetil KoA ve asetoasetat üzerinden yağa dönüşebilen amino asitler ketoplastik veya ketojenik amino asitler olarak adlandırılır. Bu amino asitler lösin ve lizindir.

İzolösin, fenilalanin, triptofan ve tirozin hem ketojenik hem de glikojenik karakterli amino asitlerdir (55,56).

KANSER VE AMİNO ASİTLER

Tümör gelişimi hayvanlarda ve insanlarda konakçı metabolizmasında büyük değişiklerle ilişkilidir (5,57). Tümörler kendini konakçı metabolizmanın kaynaklarıyla besleyen parazitler olarak düşünülebilir. Bu durum konakçıyı kaşeksiye götüren ciddi kilo kaybıyla sonuçlanır (58). Kanser kaşeksisinin temeli konakçının protein kütlesinde ciddi kayıplar olmasıdır. İskelet kas kütlesindeki azalmalar yaklaşık %75'i bulabilir (59).

Malign tümör varlığında genellikle negatif azot dengesi (60), artmış glukoneogenez (61,62), azalmış kas protein sentezi (63,64), artmış kas protein yıkımı (64) gibi metabolik değişiklikler gerçekleşmektedir. Sonuç olarak protein turnoveri tümör gelişimi sırasında oldukça artar (65-67).

Plazma amino asitlerinin düzeyleri vücuttaki amino asitlerin akışını etkileyen tüm faktörlerin net etkisini göstermektedir (68). Tümör varlığında meydana gelen değişikliklerin bu hastaların plazmalarındaki amino asitler tarafından yansıtılıyor olabileceği düşünülmektedir (69). Bu amaçla, plazma amino asit profilinin kanserle ilişkili protein

metabolizmasının değişimi için bir marker olarak rolü olabileceğine dair çeşitli araştırmalar yapılmıştır (5,10,13,17).

Norton ve arkadaşlarının çeşitli kanser hastalarının plazmalarında yaptıkları çalışmalarda; minimal düzeyde veya hiç kilo kaybı olmayan sarkoma, osteosarkoma ve lenfoma hastalarında prolin seviyelerini; lenfoma ve metastatik sarkoma hastalarında ise histidin ve arginin düzeylerini kontrollere göre düşük bulunmuştur. En fazla kilo kaybına neden olan özofagal karsinomalı hastalarda total amino asit düzeylerinde düşme görülmüştür (13).

Lee ve arkadaşları erken dönem kolorektal kanser hastalarında başlıca tirozin, alanin, metiyonin, fenilalanin ve treonin olmak üzere, glisin ve arginin dışındaki esansiyel ve non-esansiyel amino asitlerin plazma düzeylerinde azalma olduğunu bildirmiştir. Hepatosellüler karsinomalı (HCC) ve sirozu olan geç dönem kolorektal kanser hastalarında esansiyel ve non-esansiyel amino asitlerin çoğunun plazma düzeylerinde daha belirgin azalma olduğunu bildirmişlerdir (70).

Proenza ve arkadaşları akciğer kanserli hastalarda, esansiyel amino asit düzeylerini araştırdıklarında, valin ve total olarak esansiyel amino asitlerin kan düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı düzeyde düşük olduğunu, esansiyel olmayan amino asitlerden ise kanserli hastalarda yalnızca prolinin düzeyinde anlamlı düşme olduğunu, total esansiyel olmayan amino asit düzeylerinde herhangi bir fark olmadığını bulmuşlardır. Kanserli hastalarla sağlıklı kontrollerin plazma amino asit düzeyleri karşılaştırıldığında ise esansiyel ve esansiyel olmayan amino asit dağılımlarında bir fark bulunmadığını; ancak kanser hastalarında ornitin düzeylerinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Meme kanseri olan hastalar sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında hastaların plazmalarında valin ve glutamat miktarının düşük, asparagin miktarının ise yüksek olması dışında bir fark göstermediğini saptamışlardır. Akciğer kanserli hastaların plazmalarında ise glutamin, asparagin ve hidroksiprolin yüksek; aspartat düşük bulunmuştur (71).

Watanabe ve arkadaşları ise tümör dokusu amino asit içeriğinin özellikle HCC'lı hastalarda tümörlü olmayan dokuya göre daha yüksek olduğu bulmuştur. HCC'da metiyonin, tirozin ve fenilalanin düzeyleri sirozlu ve normal karaciğer dokularına göre daha yüksek bulunmuştur (17).

Akciğer kanserli hastaların plazma glukoneogenik amino asitlerinden, treonin, serin ve glisin miktarlarında belirgin azalma; serbest triptofan ve glutamik asit düzeylerinde belirgin yükselme olduğunu bulunmuştur (11).

Akut miyeloid lösemi (AML) hastalarının plazmalarında yapılan çalışmalarda glutamik asit, glisin, ornitin ve serbest triptofan düzeylerinin yüksek; taurin, serin ve metiyonin düzeylerinin ise düşük olduğu rapor edilmiştir. Dallı zincirli ve aromatik amino asitlerle total triptofan düzeylerinde kontrollere göre anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur (72).

Pankreas kanseri hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda, farklı pankreatik kanser hücrelerinin (Panc-1, PC-1, HPAF ve A-431 hücreleri), amino asit profilinde benzer değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Bu değişiklikler orijinal amino asitlerde artma, azalma veya normal hücre kültüründe bulunmayan amino asitlerin var olması şeklindedir. Kültür ortamlarının tümünde glutamin ve sisteinde azalma varken alanin miktarı artmıştır (73).

Meme kanseri hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada ise valin ve glutamik asidin düşük; asparaginin yüksek olduğu bulunmuştur. Bu hastaların plazmalarında glutamin, asparagin ve hidroksiprolinin yüksek; aspartatın düşük olduğu bildirilmiştir (71). Cascino ve arkadaşları tarafından yürütülen ve yine amino asit profilini araştıran başka bir çalışmada, meme kanseri hastalarının plazmalarında ornitin, glutamik asit ve triptofanın önemli düzeyde yükselmiş olduğunu bulunmuştur (11).

Meme, gastrointestinel sistem ve baş ve boyun kanseri hastalarının amino asit amino asit profilini analiz eden diğer bir çalışma; yedi amino asidin (glutamin, treonin, histidin, sistein, alanin ve ornitin) plazma konsantrasyonlarının sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu üç malign hastalıkta dolaşımdaki amino asit düzeylerinin, malign organ bölgesinin teşhisi ile ilişkili olduğu görülmüştür (10). Bu çalışmalar sonucunda bazı kanserlerin kendi karakteristik plazma amino asit profillerini oluşturma olasılığı bu hastalıkların teşhis ve orijinlerinin açıklanmasında amino asitlerin önemli roller üstlenebileceğini düşündürmüştür (10,18).

Daha önce açıklandığı üzere, günümüz kadınının önemli bir problemi olan ve bulunduğu bireylerin yaşamlarının sonraki dönemlerinde meme kanseri gelişimi yönünde belirgin bir risk faktörü olarak belirlenmiş kistik meme hastalıklarının amino asit profilini ortaya koyan bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

MATERYAL

Bu çalışma Ekim 2002-Şubat 2004 tarihleri arasında, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda Kistik Meme Hastalığı tanısı almış 17 kadın hasta üzerinde yapılmıştır.

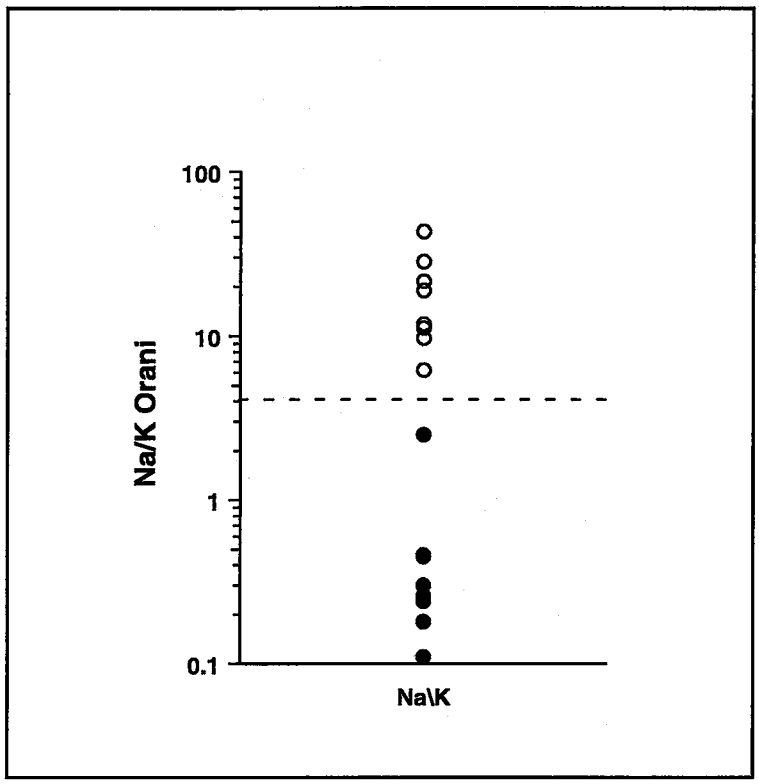
ÖRNEKLERİN ANALİZE HAZIRLANMASI

Hastalardan ince iğne aspirasyon metoduna göre aspire edilen meme kist sıvıları, 2000 g'de, 30 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra süpernatant kısımları ayrıldı ve çalışılıncaya kadar -20°C'de, saklandı.

YÖNTEMLER

Meme Kist Sıvısı Elektrolit Tayini

Meme kist sıvıları Beckman Coulter Synchron LX20 otoanalizör cihazı MC ünitesinde iyon selektif yöntem ile sodyum (Na) ve potasyum (K) miktar tayini yapıldı. Na/K oranı hesaplanarak 3'ten küçük ve büyük olmak üzere iki gruba ayrıldı.



Şekil 6. Meme kist sıvısı Na/K oranları.

Meme Kist Sıvısı Amino Asit Tayini

Meme kist sıvılarındaki amino asit düzeyleri Yüksek Basınç Likit Kromotografisi (HPLC) kullanılarak tayin edildi.

Amino asit tayininde Waters tarafından geliştirilen Pico TAG metodu kullanıldı. Pico TAG metodu örneğin kolon öncesi derivatizasyonu ve reverse faz HPLC basamaklarından meydana gelmektedir. Kolon öncesi basamakta serbest amino asitler feniltiyokarbamil (PTC) grubu içeren amino asitler elde etmek için fenilizotiyosiyanat (PITC) ile derivatize edilmektedir. Böylece, bu amino asit derivativleri, HPLC'de pikomol gibi düşük düzeylerde analiz edilmeye hazır hale gelmektedir (Şekil 7).

Pico TAG Reaktifleri:

Sodyum asetat trihidrat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seinheim, Germany)

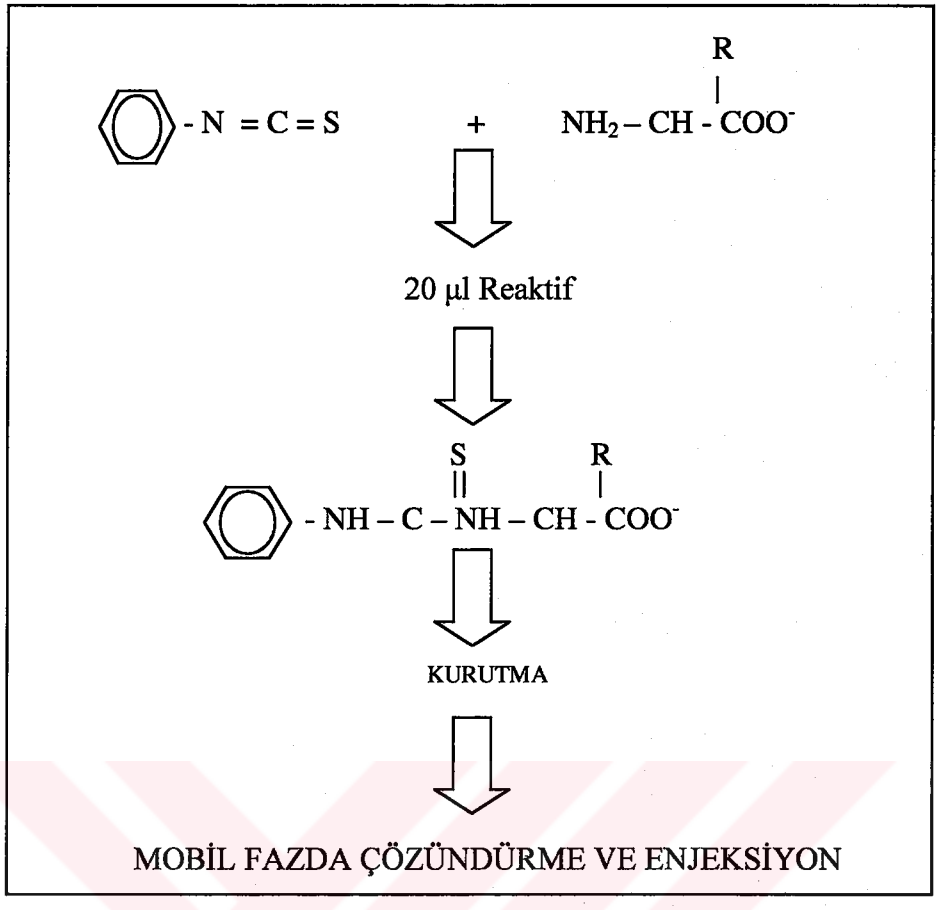
Trietilamin (TEA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seinheim, Germany)

Hidroklorik asit (HCl; Merck&Co., Inc., Darmstadt, Germany)

Glasiyel asetik asit (Merck&Co., Inc., Darmstadt, Germany)

Asetonitril (Merck&Co., Inc., Darmstadt, Germany)

Distile su (Milli-Q, USA)



Şekil 7. PTC Amino asitlerin elde edilmesi.

Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4; Merck&Co., Inc., Darmstadt, Germany)

Fosforik asit (Merck&Co., Inc., Darmstadt, Germany)

Metanol (Merck&Co., Inc., Darmstadt, Germany)

Fenilizotiyosiyanat (PITC; Pierce Biotechnology Inc., Rockford, USA)

Metiyonin sülfon (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seinheim, Germany)

Amino asit standart solüsyonu A (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seinheim, Germany)

L-Alanin, L-Asparagin, L-Aspartik Asit, L-Sitrüllin, L-Sistin, L-Glutamik Asit, Glisin, Hidroksi-L-prolin, L-İzolösin, L-Lösin, L-Metiyonin, L-Fenilalanin, L-Prolin, L-Serin, Taurin, L-Treonin, L-Tirozin, L-Valin.

Amino asit standart solüsyonu B (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seinheim, Germany)

L-Arginin, L-Histidin, L-Lizin, L-Ornitin, L-Triptofan.

Eluent A:

19 g sodyum asetat trihidrat tartıldı. 500 ml distile suda çözüldü. 0,5 ml TEA eklendi. pH'sı 6,4'e gelene kadar glasiyel asetik asit ile titre edildi. Hazırlanan çözelti por çapı 0,2 µm olan membranfiltre (Schleicher&Schuell ME, Dessel, Germany) ile filtre edildi. Çözeltinin 60 ml'si atıldı ve yerine 60 ml asetonitril eklendi.

Eluent B:

600 ml asetonitril ve 400 ml distile su karıştırıldı. Membranfiltre ile filtre edildi.

Numune dilüenti:

0,71 g disodyum hidrojen fosfat tartıldı. 500 ml distile su eklendi. %10'luk fosforik asit ile pH'sı 7,4 olana kadar titre edildi. 50 ml asetonitril eklendi ve hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Redrying solüsyonu:

Hacim olarak 2:2:1 oranlarında sırasıyla; metanol: 1M sodyum asetat: TEA'in karıştırılmasıyla çalışmaya başlamadan önce taze olarak hazırlandı.

Derivatizasyon solüsyonu:

Hacim olarak 7:1:1:1 oranlarında metanol: distile su: PITC: TEA'in karıştılmasıyla çalışmaya başlamadan önce taze olarak hazırlandı.

İnternal Standart (IS):

0,89 ml HCl distile su ile 100 ml'ye tamamlandı (0,1 M HCl). 0,0072 g metiyonin sülfon tartıldı ve hazırlanan HCl çözeltisinde çözdürüldü. Elde edilen 0,4 mM metiyonin sülfon çözeltisi internal standart olarak kullanıldı.

Meme kist sıvısı numunelerinin HPLC için hazırlanması ve çalışılması:

Çalışmaya başlamadan önce meme kist sıvısı numuneleri -20°C'den çıkarılarak oda ısısında çözdürüldü. Por çapı 0,45 µm olan ultrafiltreli ependorf (Pico Tag ultrafiltration device) içine aktarılan numune 30 dakika süreyle, dik açılı santrifüjde, 1000 g'de çevrilmek suretiyle proteinlerinden arındırıldı ve ultrafiltrat elde edildi. 12,5 µl numune ultrafiltratına 12,5 µl internal standart (IS) eklenerek vorteksle iyice karıştırıldı ve ardından vakum altında kurutuldu. Kurutulan numune üzerine 10 µl redrying solüsyonu eklenerek vortekslendi ve

tekrar vakum altında kurutuldu. Numunenin üzerine 20 µl derivatizasyon solüsyonu eklendi. Oda ısısında 20 dakika bekletilmek suretiyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrası numuneler tekrar vakum altında kurutuldu. Derivatize edilen numuneler 100 µl Pico tag numune dilüenti ile dilüe edildi ve HPLC'de analiz için hazır duruma geldi.

Standart olarak asidik, bazik ve nötral amino asitleri içeren standart A ve B solüsyonlarının 1:1 karışımları kullanıldı.

Kromatografik ayrıştırmanın yapılmasında Waters marka HPLC kullanıldı (Waters 2690 Alliance, Seperations Module). Analizler Waters 2487 UV detektör kullanılarak, 254 nm dalga boyunda yapıldı. Waters marka Pico Tag serbest amino asit kolonu (Waters, Ireland) kullanıldı ve kolon ısısı 46°C'de ayarlandı. Numune kabini ısısı +4°C, solventlerin akış hızı 1 ml/dk ve sistem basıncı 1600-1700 psi ve injeksiyon volümü 10 µl olarak uygulandı. Derivatize edilen amino asitler aşağıdaki mobil faz gradient programı kullanılarak ayrıştırıldı.

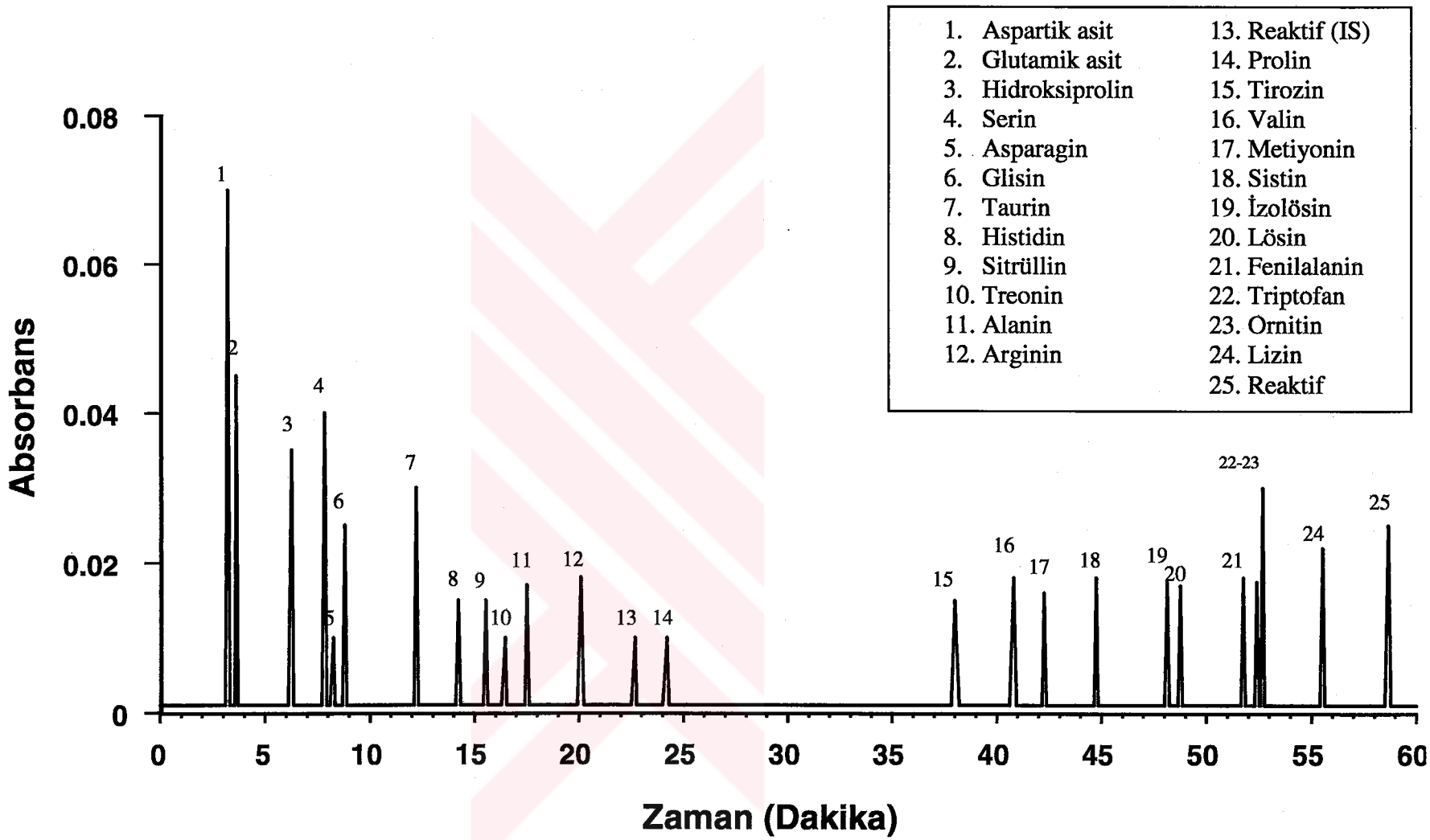
Meme kist sıvısı amino asit miktarları, numunelerden elde edilen HPLC kromatogramındaki pik alanlarının standart pik alanları ile karşılaştırılması sonucu hesaplandı.

Tablo 2. Mobil faz gradient tablosu.

Zaman (dk)	Akış hızı (ml/dk)	%A	%B
0	1,0	100	0
13,5	1,0	97	3
24,0	1,0	94	6
30,0	1,0	91	9
50,0	1,0	66	34
62,0	1,0	66	34
62,5	1,0	0	100
66,5	1,0	0	100
67,0	1,0	100	0

Tablo 3. Waters Pico Tag Amino asit kolonundan standart ve örneklere ait amino asitlerin çıkış zamanları.

Amino Asit	**HPLC Kromotogramında Çıkış Zamanı (dk)**
Aspartik Asit	3,20
Glutamik Asit	3,62
Hidroksiprolin	6,25
Serin	7,83
Asparagin	8,26
Glisin	8,80
Taurin	12,21
Histidin	14,23
Sitrüllin	15,53
Treonin	16,16
Alanin	17,52
Arginin	20,10
Reaktif (IS)	22,67
Prolin	24,20
Tirozin	37,98
Valin	40,80
Metiyonin	42,27
Sistin	44,76
İzolösin	48,14
Lösin	48,75
Fenilalanin	51,75
Triptofan	52,39
Ornitin	52,67
Lizin	55,53
Reaktif	58,66



Şekil 8. Amino asit kalibrasyon standardlarını gösteren HPLC kromatogramı (200 µmol/L).

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Her iki grup meme kist sıvısı içindeki amino asit ve türevleri istatistiksel olarak karşılaştırıldı. İstatistiksel analizler için WCP1331.00197 lisans numaralı Minitab Inc. Release 13.32 paket programı kullanıldı. İki grup arasındaki olası farklılıklar non-parametrik olarak Mann-Whitney U testi kullanılarak analiz edildi. Elde edilen p değerleri 0,05'e eşit veya küçük ($p \leq 0,05$) olduğunda istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında Kistik Meme Hastalığı tanısı almış 17 kadın hasta dahil edildi. Hastaların yaşları 23 ile 54 arasında değişmekteydi.

Na/K oranlarına göre meme kist sıvıları 2 gruba ayrıldı. Na/K<3 olan yüksek meme kanser risk grubu olarak kabul edilen grubun Na/K oranı değerleri ortalama; 0,5, Na/K>3 olan ve düşük meme kanseri risk grubu olarak kabul edilen grubun Na/K oranı ortalaması 18,9 olarak bulundu.

Meme kist sıvılarında aspartik asit, glutamik asit, hidroksiprolin, serin, asparagin, glisin, taurin, histidin, sitrüllin, treonin, alanin, arginin, prolin, tirozin, valin, metiyonin, sistin, izolösin, lösin, fenilalanin, triptofan, ornitin, lizin olmak üzere 23 amino asit veya metaboliti çalışıldı. Her iki grup hastalara ait Na/K ve amino asit değerleri Tablo 4 ve 5'de gösterilmiştir. Yüksek ve düşük meme kanser risk gruplarına ait birer adet HPLC kromatogramı Şekil 9 ve 10'da gösterilmiştir.

Hasta grupları amino asit değerlerinin ortalama ve standart sapmaları, Mann Whitney U Testi z ve p değerleri Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 4. Na/K <3 grubu meme kist sıvıları amino asit düzeyleri (µmol/L).

OLGU	T.K.	H.A.	E.K.	M.Ç.	Ö.A.	F.Ş.	K.A.	G.K.	N.E.
Na/K	0,3	0,26	0,11	2,5	0,08	0,45	0,46	0,18	0,24
Aspartik asit	145,8	191,1	108,5	78	188,4	386,2	214,1	148,5	538
Glutamik asit	11965	7867	8403	3198	6018	12203	11981	6844	11075
Hidroksiprolin	45,6	40,7	99,4	14,5	27,7	34,9	62,3	42,3	29,3
Serin	262,4	445,9	543,1	392,2	205,2	979,2	416,2	207,8	1084
Asparagin	*	108,6	110,2	85,1	52	*	137,4	85,4	*
Glisin	2103	1455	2327	1309	755,5	2828	2885	1086	3802
Taurin	74,2	403	80,1	63,8	34,7	131,5	62,9	93,2	343
Histidin	50,5	19,7	95,4	95,3	*	301,7	171,4	17,7	260,6
Sitrüllin	12,5	136,3	35,5	27,8	*	50	15,6	*	8
Treonin	123,9	200,4	152,5	279,5	325,8	630,9	181,2	170,1	991,1
Alanin	643,5	863,1	562	370,6	227,8	1159	733,5	283,2	1182,
Arginin	194	156,1	249,8	338,1	338,3	397	328,7	222,7	365,5
Prolin	*	12,1	22,3	*	*	31,1	*	*	59
Tirozin	256,8	231,2	242,3	181,6	56,4	513,2	408,8	60,3	525,2
Valin	209,4	149,2	224,2	343	136,8	776,7	510	116,9	1097
Metiyonin	30	18,8	56,8	28,8	22,9	100,9	80,3	27,9	124,4
Sistin	265,6	214,3	101	149,5	205,8	207,6	339,2	237,2	122,4
İzolösin	84,8	84,3	150,5	111,1	73,5	315	219,7	62,5	594
Lösin	237	129,6	288,6	155,3	148,6	734,3	519,1	141,3	814,4
Fenilalanin	108,2	81,4	171,4	92,6	59,2	389,8	303,1	67,8	334,8
Triptofan	38,3	22,7	107,3	31,6	22,2	116,3	120	18,2	96,5
Ornitin	23,1	32,1	44,3	46,4	48,5	89,7	86,8	25,9	70,2
Lizin	20,5	29,5	38,4	64,7	22,4	34,9	86,5	22,5	106,5

*Deteksiyon limitinin altında bulunan değerleri ifade etmektedir.

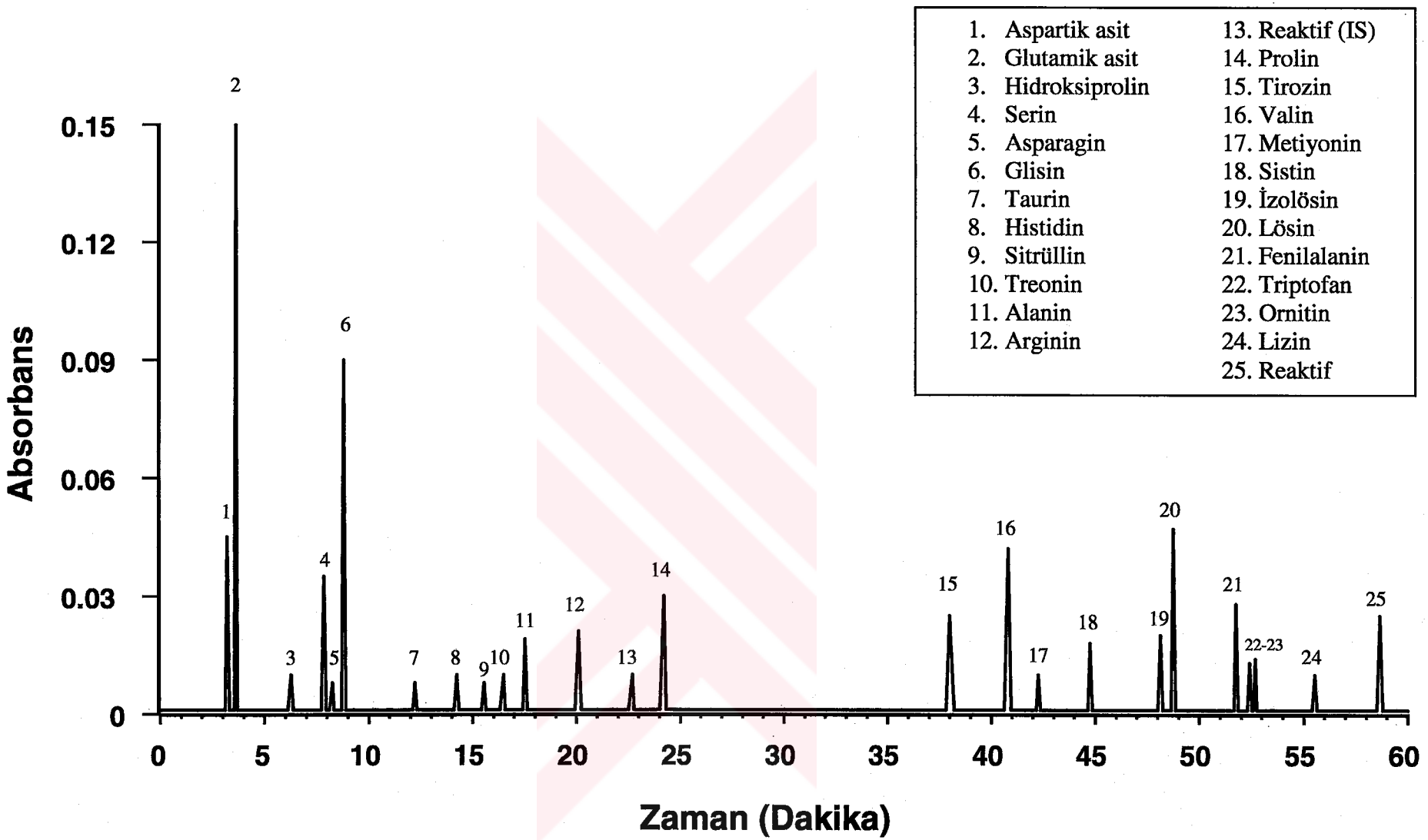
Tablo 5. Na/K >3 grubu meme kist sıvıları amino asit düzeyleri (µmol/L).

OLGU	S.P.	E.K.	N.Y.	N.G.	K11	İ.A.	N.M.	H.E.
Na/K	11,2	6,2	43,3	18,9	28,3	11,8	21,5	9,7
Aspartik asit	68,6	87,1	26,1	52,5	45,4	59,1	38,5	45,5
Glutamik asit	1656,8	1510,7	165,4	1972,2	662,1	342,3	672,1	999,3
Hidroksiprolin	25,8	11,1	17,8	13,7	8,5	*	18,2	21,8
Serin	231,2	250,4	72,8	253	189,3	188,7	213,2	231
Asparagin	94	*	107,7	159,9	*	*	*	172,2
Glisin	410,6	205,3	146,2	744,7	403,7	142,1	507,6	337,5
Taurin	105,9	33,9	31,2	94,6	58,4	24,7	89,6	88,9
Histidin	68,2	*	31,8	74,7	28,6	*	110,7	71,4
Sitrüllin	48,8	*	16	32,9	91,5	*	46,7	19,2
Treonin	146,5	40,4	27,7	156	127,2	201,9	184,1	590,8
Alanin	255,6	65,4	114,9	502,9	372,8	98,1	360	264,7
Arginin	199,6	397,6	146,9	290,1	380,2	225,7	354	236,5
Prolin	*	*	*	*	*	*	*	*
Tirozin	270,9	34,2	87	160,7	53,2	104	88,8	53,8
Valin	222,5	53,1	79,9	194,8	140,4	55,8	264,6	168,9
Metiyonin	20,2	5,1	15,8	23,8	16,5	11,1	25,8	20,6
Sistin	230,5	212,5	192,4	265,1	212,4	254,9	211,3	119,7
İzolösin	93,3	33,1	42,5	55,1	41,7	31,5	69,9	51,7
Lösin	155,3	50,4	54,3	116,6	85,5	51,1	122,5	95,3
Fenilalanin	85,6	46,4	40,3	55	36	16,2	80,4	53,3
Triptofan	25,6	11,1	8,4	7,8	2	4,9	15,9	7,3
Ornitin	14,7	46,8	23,2	66,4	35,7	31,3	87,6	39,3
Lizin	130	19,8	56,3	159,3	130,6	31,6	194,6	88,2

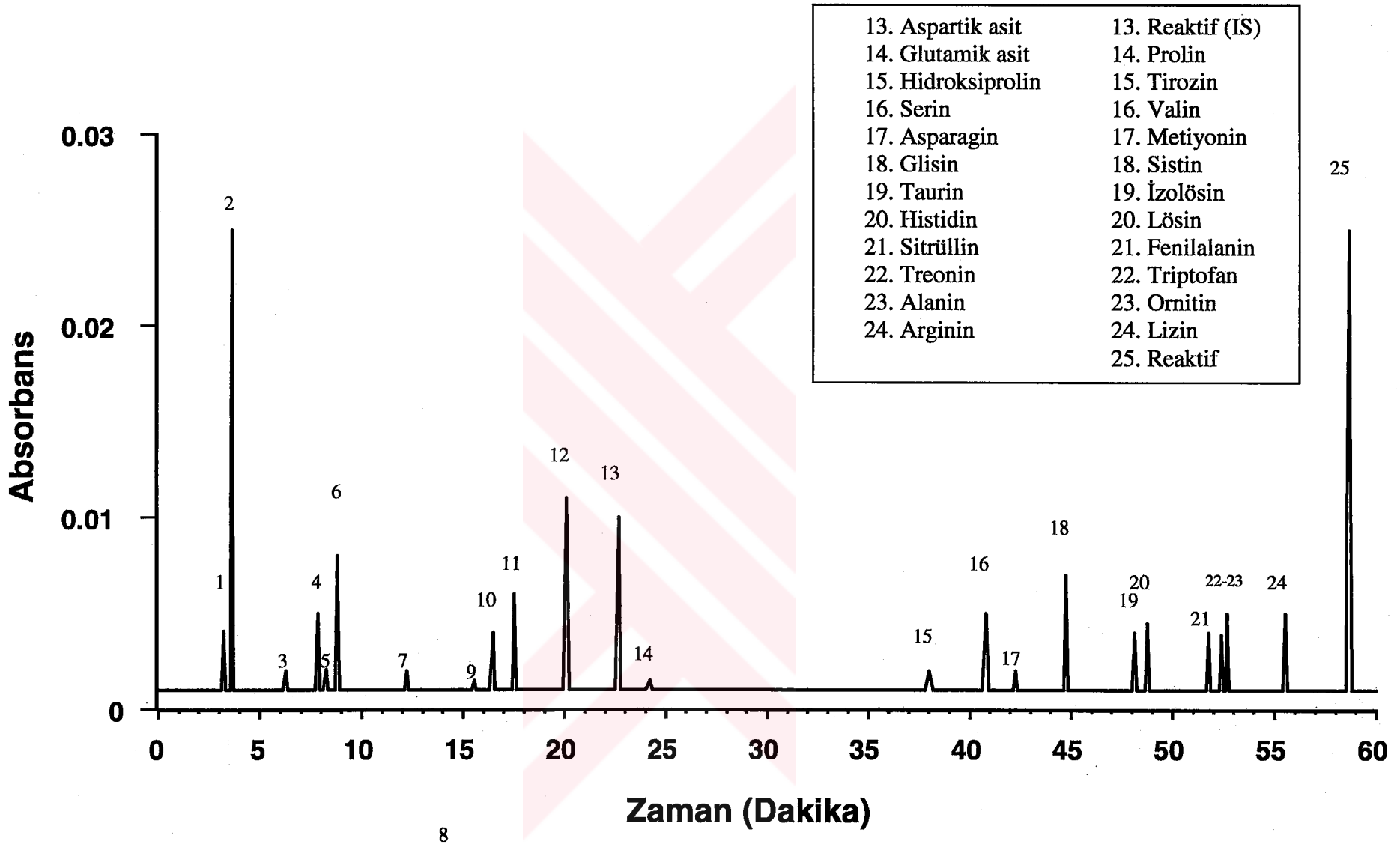
*Deteksiyon limitinin altında bulunan değerleri ifade etmektedir.

Tablo 6. Meme kist sıvıları Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında amino asitlerin ortalama, standart sapma, p ve z değerleri.

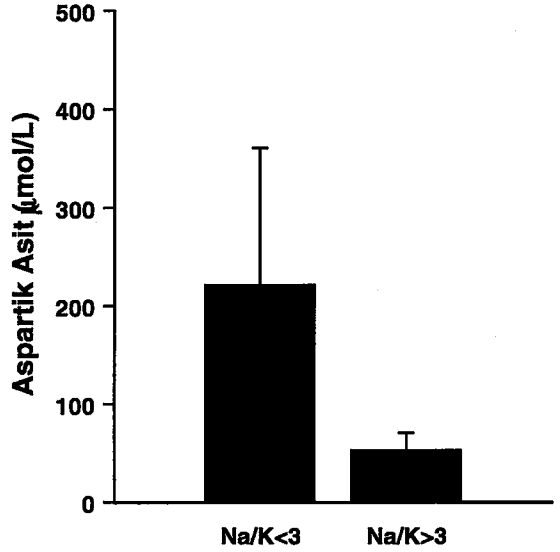
	Na/K<3; m±SD; n=9	**Na/K>3; m±SD; n=8**	**z**	**p**
Aspartat	240,1±137,1	52,9±18,9	-3,464	<0,001
Glutamat	9544,7±2372,8	1116,5±560,2	-3,464	<0,001
Hidroksiprolin	44,1±24,6	16,7±5,6	-2,983	<0,01
Serin	504±320,6	222,4±24,5	-2,309	<0,05
Asparagin	96,5±29,1	133,5±38,4	-1,279	>0,05
Glisin	2061,1±997,6	362,2±204,2	-3,464	<0,001
Taurin	142,9±133,9	65,9±32,7	-1,251	>0,05
Histidin	126,5±108	64,2±30,5	-0,775	>0,05
Sitrüllin	24,9±14,6	42,5±27,6	-0,199	>0,05
Treonin	339,5±288,9	126,3±62,6	-2,117	<0,05
Alanin	669,4±351,7	218,8±117,1	-2,791	<0,01
Arginin	287,8±84,1	278,8±91,4	0	1
Prolin	31,1±20,1	4±0	-3,233	<0,001
Tirozin	275,1±174,3	83,1±39	-2,502	<0,05
Valin	395,9±339,5	147,5±79,3	-1,828	>0,05
Metiyonin	54,5±38,7	17,4±6,8	-2,887	<0,01
Sistin	204,7±73,8	212,4±44,6	-0,289	>0,05
İzolösin	137,7±82,5	52,4±20,7	-2,983	<0,01
Lösin	352±269	91,4±38,6	-3,129	<0,01
Fenilalanin	178,7±128,9	51,7±22,8	-2,983	<0,01
Triptofan	63,7±44,8	11,6±6,6	-3,175	<0,001
Ornitin	51,9±25	43,1±23,8	-0,770	>0,05
Lizin	39,9±22,1	126,5±41,6	-3,272	<0,001
Total amino asit	640±1890 n = 214	151±252 n = 182	-4,469	<0,001



Şekil 9. Meme kist sıvısına ait HPLC kromatogramı (Na/K <3).

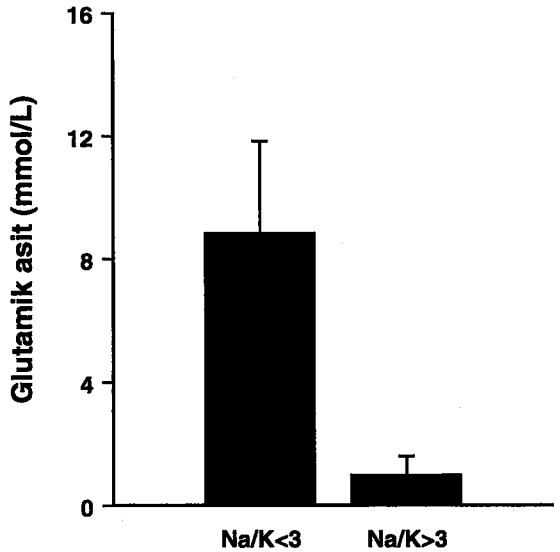


Şekil 10. Meme kist sıvısına ait HPLC kromatogramı (Na/K >3).

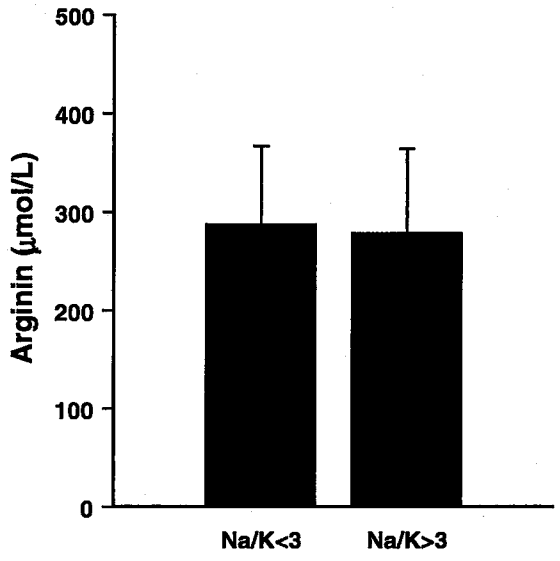


Şekil 11. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında aspartik asit konsantrasyonları (p<0,001).

Na/K<3 grubunda, asidik amino asitler olan aspartat ve glutamat düzeyleri Na/K>3 grubuna göre anlamlı (p<0,001) olarak yüksek bulundu.

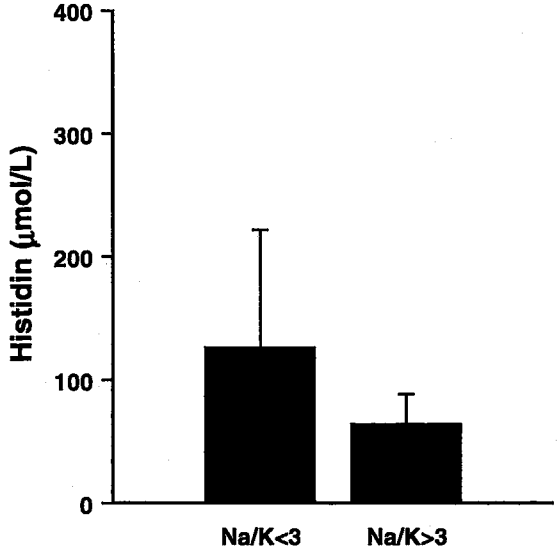


Şekil 12. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında glutamik asit konsantrasyonları (p<0,001).

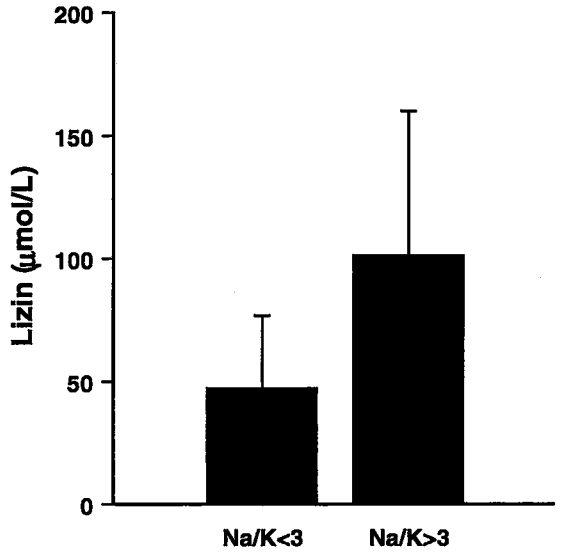


Şekil 13. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında arginin konsantrasyonları (p>0,05).

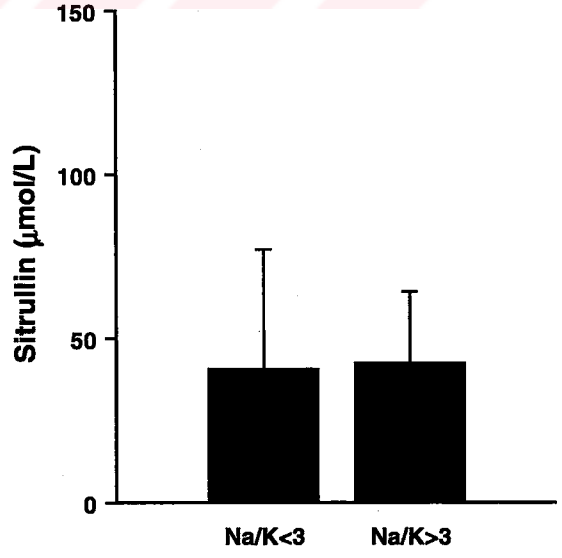
Bazik amino asitlerden arginin, histidin ve sitrüllin düzeylerinde, Na/K<3 ve Na/K>3 grupları arasında anlamlı düzeyde fark (p>0,05) bulunmadı. Lizin düzeyleri ise Na/K<3 grubunda diğer gruba göre anlamlı olarak (p<0,001) yüksek bulundu.



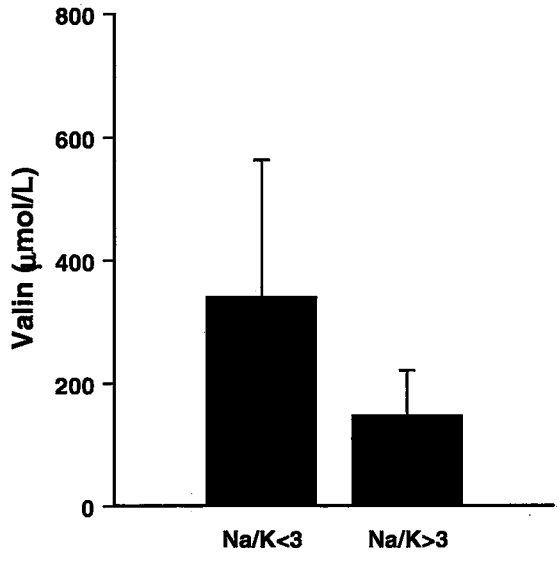
Şekil 14. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında histidin konsantrasyonları (p>0,05).



Şekil 15. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında lizin konsantrasyonları (p<0,001).

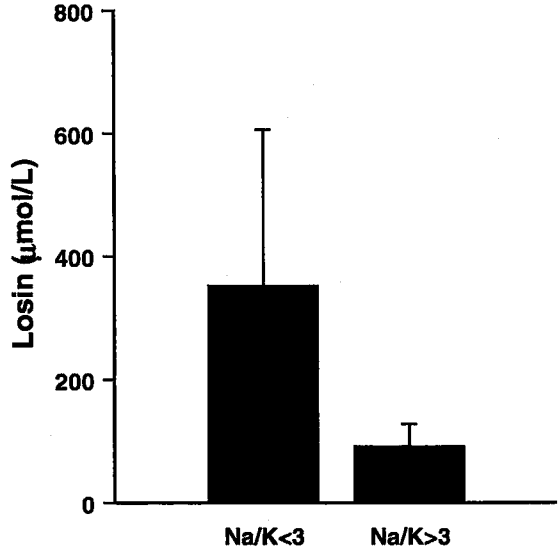


Şekil 16. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında sitrüllin konsantrasyonları (p>0,05).

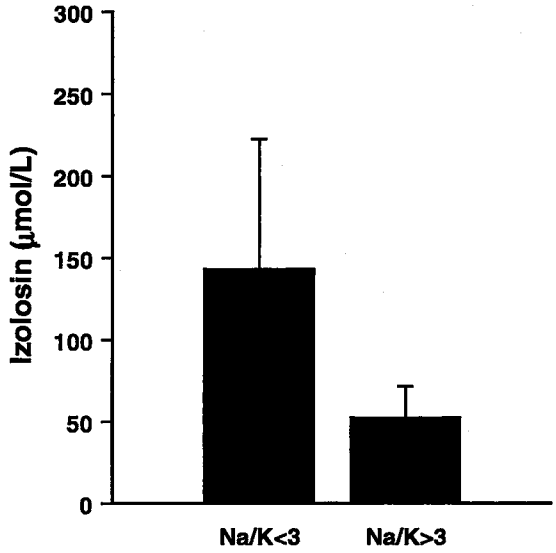


Şekil 17. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında valin konsantrasyonları (p>0,05).

Dallı zincirli amino asit düzeylerine bakıldığında, valinde yüksek ve düşük meme kanser grupları arasında anlamlı fark (p>0,05) bulunmaz iken; lösin ve izolösin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı (p<0,01) bir fark bulundu.

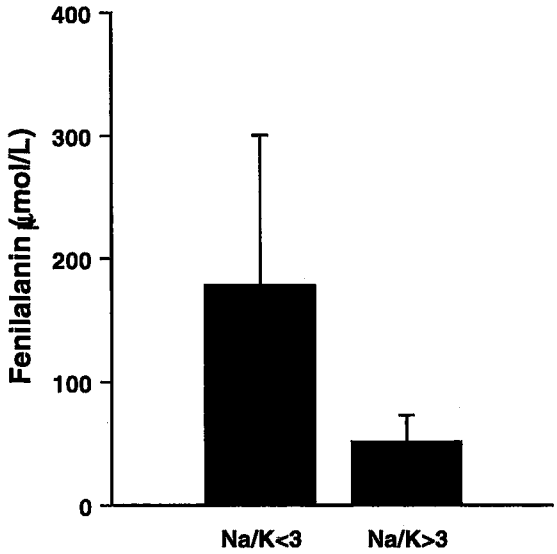


Şekil 18. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında lösin konsantrasyonları (p<0,01).

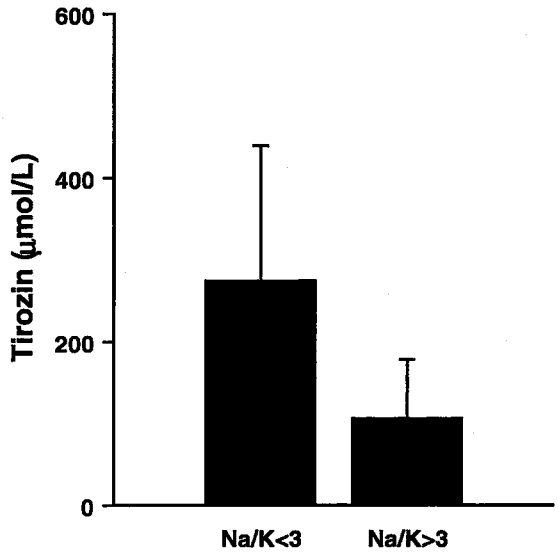


Şekil 19. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında izolösin konsantrasyonları (p<0,01).

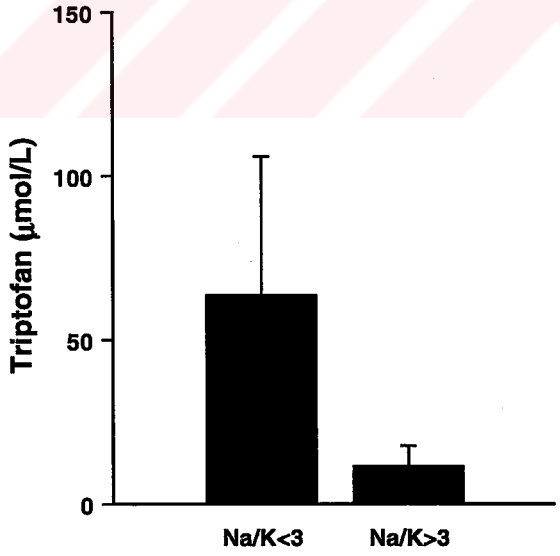
Meme kanseri oluşumu açısından yüksek risk grubunda, düşük risk grubuna göre, aromatik yan gruplu amino asitlerden tirozin (p<0,05), fenilalanin (p<0,01) ve triptofan (p<0,001) düzeyleri anlamlı düzeyde yüksek bulundu.



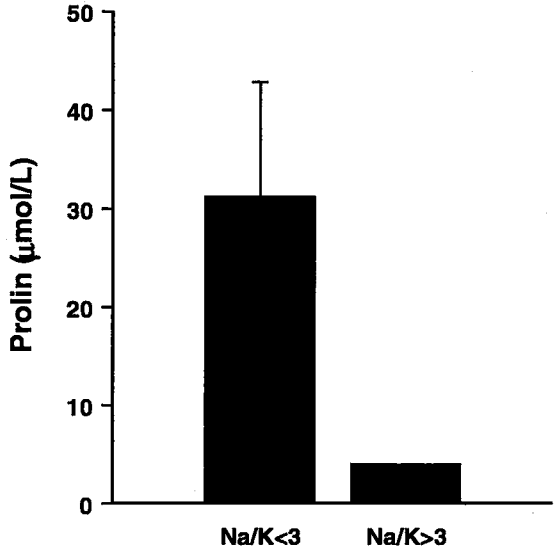
Şekil 20. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında fenilalanin konsantrasyonları (p<0,01).



Şekil 21. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında tirozin konsantrasyonları (p<0,05).

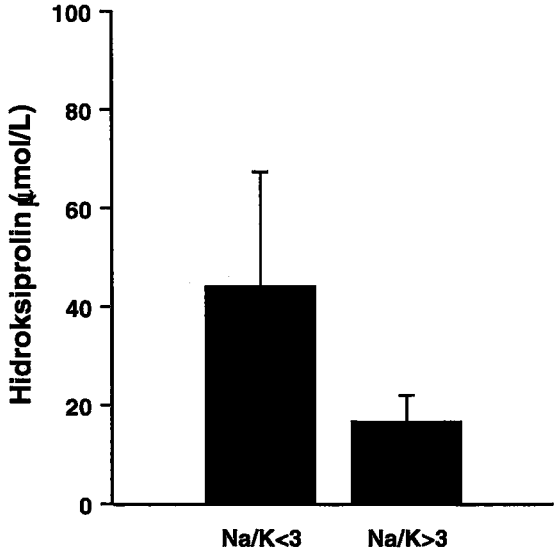


Şekil 22. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında triptofan konsantrasyonları (p<0,001).

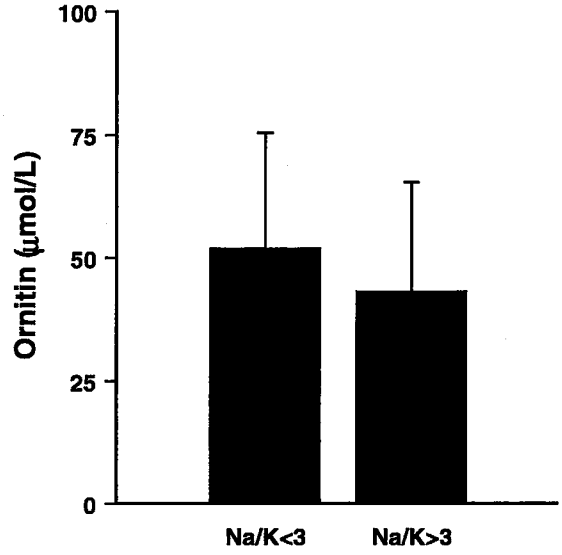


Şekil 23. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında prolin konsantrasyonları (p<0,001).

Prolin (p<0,001) ve hidroksiprolin (p<0,01) düzeyleri meme kanseri yönünden yüksek risk taşıyan grupta, düşük risk grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu.



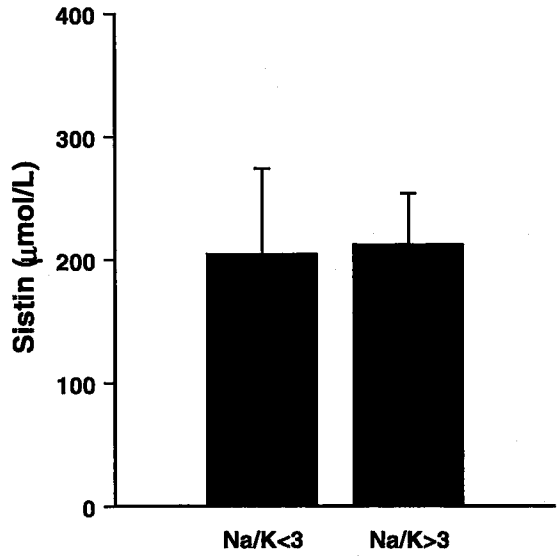
Şekil 24. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında hidroksiprolin konsantrasyonları (p<0,01).



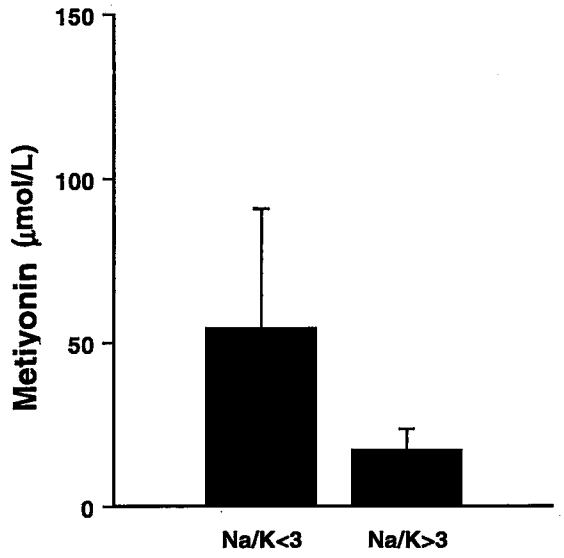
Şekil 25. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında ornitin konsantrasyonları (p<0,05).

Ornitin düzeyleri bakımından Na/K<3 grubunda Na/K>3 grubuna göre anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05).

Kükürt içeren amino asitlerden sistin (p>0,05) bakımından iki grup arasında anlamlı fark bulunmazken, meme kanseri yönünden yüksek risk taşıyan grupta metiyonin konsantrasyonları düşük risk grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p<0,01).

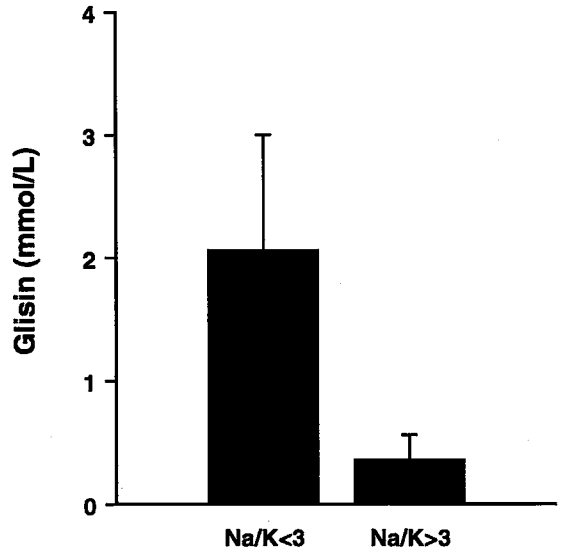


Şekil 26. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında sistin konsantrasyonları (p>0,05).

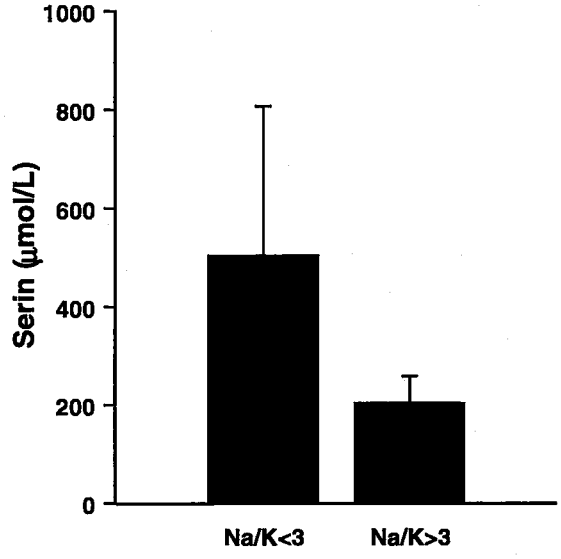


Şekil 27. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında metiyonin konsantrasyonları (p<0,01).

Glisin düzeyleri meme kanseri yönünden yüksek risk grubunda, düşük risk grubuna göre anlamlı (p<0,001) olarak yüksek bulundu.

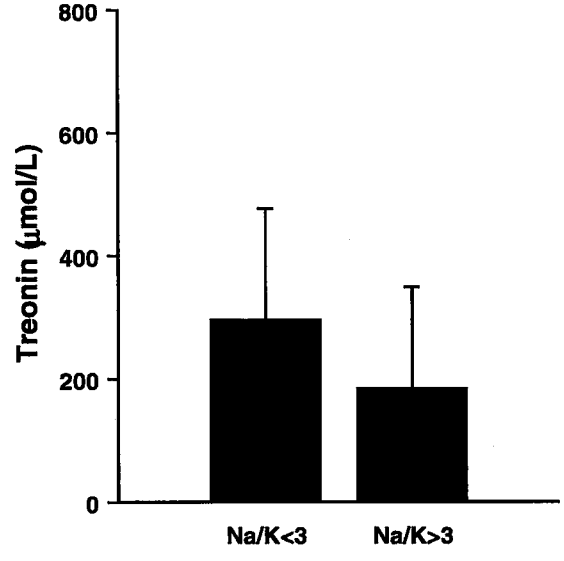


Şekil 28. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında glisin konsantrasyonları (p<0,001).

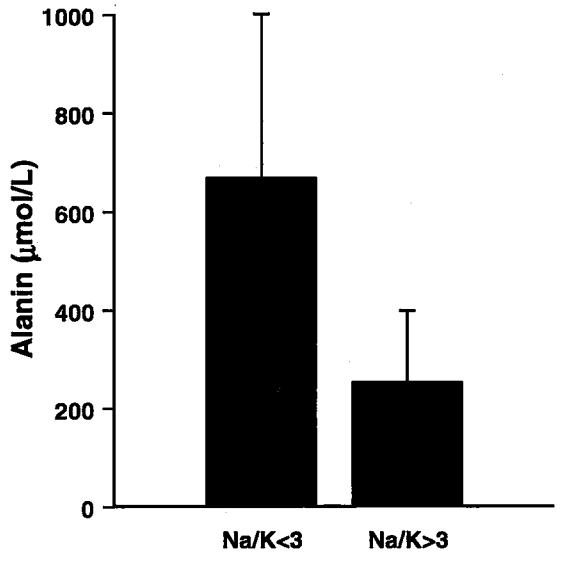


Şekil 29. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında serin konsantrasyonları (p<0,05).

Serin (p<0,05), treonin (p<0,05) ve alanin (p<0,01) düzeyleri Na/K<3 grubunda Na/K>3 grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu.

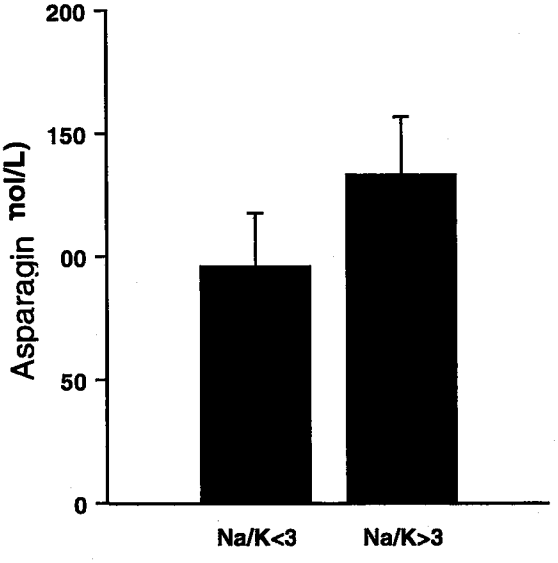


Şekil 30. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında treonin konsantrasyonları (p<0,05).

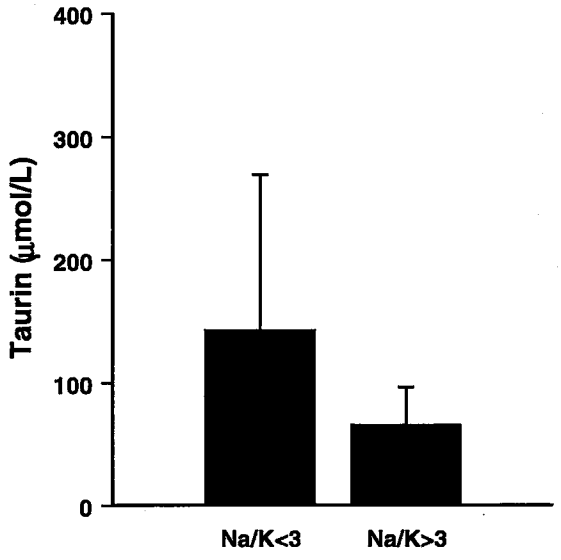


Şekil 31. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında alanin konsantrasyonları (p<0,01).

Asparagin ve taurin düzeylerinde meme kanseri gelişimi yönünden yüksek risk grubunda düşük risk grubuna göre anlamlı bir fark bulunmadı (p>0,05).

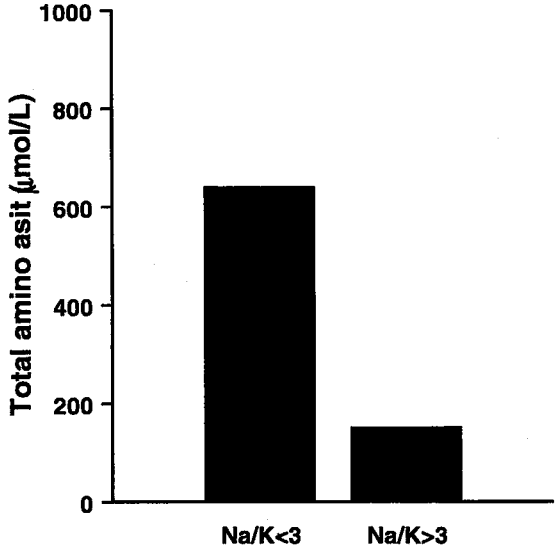


Şekil 32. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında asparagin konsantrasyonları (p>0,05).



Şekil 33. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında taurin konsantrasyonları (p>0,05).

Meme kist sıvıları total amino asit düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında, meme kanseri gelişimi yönünden yüksek olan grupta total amino asit düzeylerinin düşük risk grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu bulundu (p<0,001).



Şekil 34. Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında total amino asit düzeyleri (p<0,001).

TARTIŞMA

Dolaşımdaki amino asit profilleri malign tümörlülerde değişmektedir. Bu değişim amino asit miktarlarında artma veya azalma şeklinde olabilmektedir(10-17). Laboratuvar hayvanlarında tümörün çıkarılmasıyla 24 saat içinde dolaşımdaki amino asit profilleri normal seviyelerine dönmektedir (16). Bu bulgular malign hücrelerin ekstrasellüler amino asit profilleri üzerinde direkt etkiye sahip olabileceğini göstermektedir (74).

Tümör hücreleri kendilerini kopyalayabilmek için tümör tipine ve gelişim evresine bağlı olarak glukozu, lipitleri veya amino asitleri kullanırlar (75). Tümörler büyüyebilmek için esansiyel amino asitlere (EAA); purin ve pirimidin sentezi için glutamin, glisin ve aspartik asit gibi amino asitlere ve membran lipit komponentlerinin sentezi için serine ihtiyaç duyarlar. Dolayısıyla seçici amino asit ihtiyaçları vardır. Bu da dokularda protein turnoveri için aşamalı bir kas kaybına ve başlıca EAA olmak üzere amino asitlerden konakçının az faydalanılabilmesine neden olur (71).

Tümör gelişimi yüksek miktarda enerji gerektirmektedir. Glikoliz özellikle az diferansiye hücrelerde başlıca enerji kaynağı olarak düşünülmektedir. Bunun nedeni tümör dokusunda laktik asit konsantrasyonunu arttıran, pH'yı düşüren glikoliz enzimlerinin artmış olmasıdır (76).

Çeşitli çalışmalar malign neoplazmların çevrelerindeki normal dokuda veya kaslarda protein yıkımını arttırabileceğini ve amino asitlerin bir kısmını glikoneogenezde kullanmak üzere absorbe edebileceğini göstermiştir (62,69). Tümör dokusunda glikoneogenez enzimlerinin aktivitesinin arttığı görülmüştür (62). Bu çalışmada da glikojenik amino asitlerden prolin, hidroksiprolin, metiyonin, aspartik asit, glutamik asit, treonin, serin, alanin ve glisin gibi bir çoğunun meme kanseri gelişimi yönünden yüksek risk grubunu oluşturan

meme kist sıvılarında düşük risk grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olarak bulunması, bu amino asitlerin glikoneogenezde kullanılarak tümör doku enerji metabolizmasına katılabileceğini akla getirmektedir. Bu amino asitlerden özellikle prolin düşük risk grubunda saptama limitinin altında bulunurken yüksek risk grubunda rahatlıkla ölçülebilmiştir.

Amino asitlerin kanser tipine göre dağılımları farklılıklar gösterse de çeşitli çalışmalar kilo kaybı olan kolon kanseri vakalarında serum amino asit düzeyinin, özellikle EAA'lerin azaldığını; aspartik asit, glutamin, glisin, taurin, ornitin gibi esansiyel olmayan amino asitlerin (NEAA) ise yükseldiğini göstermiştir. Kolon kanseri hastalarında Zheng ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalarda pek çok EAA'in (lösin, izolösin, fenilalanin, treonin, lizin) ve bazı NEAA'lerin (tirozin, prolin, glutamin) serum düzeylerinin kanserli dokuda normal dokuya göre anlamlı olarak yüksek olduğu; metiyonin, valin gibi bazı EAA'lerin ve bazı NEAA'lerin ise az miktarda arttığı bildirilmiştir (75). Diğer yandan, akut lösemi hastalarında da glutamin, alanin, histidin, prolin, treonin ve metiyoninin plazma düzeyleri yüksek bulunmuştur (76). Bizim çalışmamızda da bu kanser vakalarına paralel olarak lösin, izolösin, treonin, metiyonin, fenilalanin ve triptofan gibi bir çok EAA ve tirozin, alanin, glutamik asit, glisin, serin ve prolin gibi NEAA'ler meme kanseri gelişimi yönünden yüksek risk grubunu oluşturan meme kist sıvılarında diğer gruba oranla daha yüksek bulunmuştur.

Metiyonin, DNA sentezi ve tek karbon metabolizmasında önemli bir rolü olduğu vurgulanan esansiyel bir amino asittir. Bazı kanser hücresi hücre kültürleri metiyonine bağımlı büyüme gösterir (77); buna karşın pek çok transforme olmayan hücre ise metiyoninden bağımsızdır (78). Çalışmamızda meme kanseri gelişimi yönünden yüksek risk grubu meme kist sıvılarındaki metiyonin düzeylerinin düşük risk grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğunu bulduk. Metiyonin amino asit düzeylerinin yüksek risk grubu meme kist sıvılarında artmış olması kistik meme hastalığından meme kanserine geçişte bu amino asidin önemli bir rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Protein sentezinde, fosfolipit sentezinde, glikoneogenezde, purin ve timidilat pirimidin nükleotid oluşumunda önemli rolü olan serin metabolizması, neoplastik dokularda değişmektedir. Bu değişim tümoral durumlarda artan nükleotid biyosentezine uyum sağlamakta ve neoplastik hücrenin sürekli devam eden replikasyonunu desteklemektedir (75). Bu çalışmada meme kanseri gelişimi yönünden yüksek risk grubu meme kist sıvılarında serin konsantrasyonu düşük risk grubuna göre anlamlı olarak yüksek bululdu. Meme kanseri gelişimi riski yüksek olan meme kist sıvılarında serin düzeylerinin artmış olması kanser

oluşumu prosesinde bu amino asit konsantrasyonunun artarak hücre proliferasyonunu bu şekilde desteklesinin mümkün olabileceğini düşündürmektedir.

Taurin, serin ve metiyonin amino asitlerinin metabolizması sonucu oluşan bir amino asittir (55). Plazma taurin düzeylerinin akciğer, karaciğer ve kolon kanseri hastalarında yükseldiği; meme kanseri hastalarında ise sağlıklı kontrollerden farklı olmadığı bulunmuştur (18). Bu çalışmada serin ve metiyonin düzeylerinde anlamlı farklar bulunmasına rağmen taurin düzeyleri bakımından iki grup meme kist sıvısı arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Fakat, meme kanseri gelişimi yönünden yüksek risk grubundaki taurin düzeyleri diğer gruba göre bir miktar daha yüksekti. Kanser gelişimi yönünden yüksek risk grubunu oluşturan meme kist hücrelerinde serin ve metiyonin düzeyleri yükselirken, taurin konsantrasyonlarının aynı paralellikte olmaması belkide serin ve metiyonini malignant süreçte taurine oranla daha öne çıkarıyor olabilir.

Yapılan çalışmalarda glutamik asit düzeylerinin birçok kanser tipinde arttığı gösterilmiştir. Castro-Bella pankreas kanserli hastalarda yüksek glutamat seviyesinin bir gösterge olarak kullanılabileceği fikrini ileri sürmüştür (79). Jinekolojik bölge kanserli hastalarda (80), akut ve kronik lösemililerde (14) aspartik asit seviyesinde değişim olmaksızın glutamik asit seviyesinin arttığı görülmüştür. Özellikle ilerlemiş evre ve metastazı olan jinekolojik bölge kanserli hastalarda glutamat seviyesi daha da yüksek bulunmuştur (80). Wilson ve arkadaşları servikal kanserli hastalarda (80); Zang ise akciğer, karaciğer, kolon ve meme kanserli hastalarda hem aspartik asit hem glutamik asit düzeylerini yüksek bulmuşlardır (18). Biz de bu çalışmamızda meme kanseri gelişimi yönünden yüksek risk grubunu oluşturan meme kist sıvılarında asidik amino asitlerden olan glutamik ve aspartik asit düzeylerini düşük risk grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulduk. Asidik amino asitlerdeki bu artış daha önce çeşitli kanser vakalarında yapılmış olan pek çok amino asit analizi çalışmasıyla uyumlu olmakla birlikte nedenini tam olarak açıklamamıştır. Bu amino asitlerlerin özellikle yüksek risk grubunu oluşturan meme kist sıvılarındaki artmış düzeyleride yoruma açıktır.

Arginin arginaz enzimiyle üre ve ornitine metabolize edilmektedir. Ornitin ve metiyonin amino asitlerinden ise poliaminler olan spermin, spermidin ve pütressinler sentez edilir. Poliaminler hücrelerde nükleotit ve protein sentezini uyararak (81) hücre proliferasyonunda önemli rol oynarlar. Meme tümör dokusunda poliamin sentezinin artış nedeni bilinmemekle birlikte yüksek miktardaki östrojen içeriğinin poliamin sentezini indükleyerek meme kanser hücrelerinin büyümesini modüle ettiği düşünülmektedir (82). Küçük hücreli akciğer kanserinde plazma glutamik asit, glutamin, aspartik asit, asparagin ve arginin düzeyleri yüksek; ornitin, sitrüllin ve metiyonin düzeyleri düşük bulunmuştur. Bu

bulgular artmış protein katabolizması ve açığa çıkan amino asitlerin üre siklüsüne girmesi sonucu poliamin sentezini stimüle etmesi şeklinde yorumlanmıştır (83). Meme kist sıvılarında da, özellikle kanser gelişimi yönünden yüksek risk taşıyan grupta arginin ve ornitin konsantrasyonlarının diğer gruba oranla daha yüksek olarak bulunması beklenen bir bulgu olsada, bu çalışmada bu amino asit ve türevi iki grup arasında anlamlı bir fark göstermemiştir. Bu durum yine meme kist sıvısı amino asit metabolizmasının bilinmeyenlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır.

Asparagin çeşitli tümörlerin gelişiminde önemli olan bir amino asittir ve antitümör tedavisinde asparaginaz kullanılmıştır (75). Meme kanseri hastalarının plazma amino asit düzeylerini i inceleyen bir çalışmada asparagin konsantrasyonları yüksek bulunmuştur (71). Ancak bu çalışmada asparagin bakımından, iki grup meme kist sıvısı arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Dallı zincirli amino asitler (BCAA) kasta glutamin ve alanin sentezi için azot kaynağıdır. BCAA'nın artmış oksidasyonu sepsis, kanser, travma, ciddi yanıklarla ilişkili bulunmuştur (84) ve kolon, bronşiyal, pankreatik kanser ve malign lenfomalılarda serum BCAA düzeyleri artmıştır (85). Biz çalışmamızda dallı zincirli amino asitlerden valin bakımından iki grup arasında anlamlı bir fark bulamadık. Buna karşın lösin ve izolösin düzeylerini meme kanseri gelişimi yönünden yüksek risk grubu meme kist sıvılarında diğer gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Dolayısı ile dallı zincirli amino asitlerden lösin ve izolösin belki de kistik meme hastalıklarından kanser gelişimi patogenezinde valine göre daha ön plana çıkıyor olabilir.

Daha önce meme kanseri üzerinde yapılan çalışmalarda bir bağ doku proteini olan kollajen yapısında bulunan hidroksiprolinin plazma düzeyleri yüksek bulunmuştur (71). Bizim çalışmamızda da hidroksiprolin yüksek meme kanseri gelişimi riski olan grupta, riski düşük olan gruba göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Hidroksiprolin düzeyinindeki bu artış bu kistleri saran apokrin epitel yapısıyla ilişkili olabilir. Yine bu durum meme kanseri gelişimi yönünde yüksek risk grubunu oluşturan bu kistlerin daha progresif bir yapıda, çevre dokularda bağ doku yıkımına neden olabileceği şeklinde de yorumlanabilir.

Total amino asit, EAA, BCAA, aromatik amino asit, glikojenik amino asit düzeyleri ve glikojenik amino asit/total plazma amino asit oranları meme kanserlilerde normallere göre yüksek bulunmuştur (10). Biz de bu çalışmada, meme kanser riski bakımından yüksek riski olan grubu düşük risk grubu ile karşılaştırdığımızda, meme kanserlilerle sağlıklı bireylerin plazma amino asit düzeylerine benzer bir amino asit profilleri olduğunu gördük.

Total amino asit düzeylerinin yüksek meme kanseri gelişim riski bulunan grupta diğer gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunması kistik meme hastalığından meme kanserine geçişte protein yıkımında ciddi artışlar olduğunu düşündürmektedir.

Proenza ve arkadaşları kanserde kan kompartmanındaki amino asit konsantrasyonu değişikliklerinin kanserin şiddeti, yayılımı (evresi) ile, geliştiği organa göre daha çok etkilendiğini rapor etmişlerdir (71). Bazı kanserlerin kendi karakteristik plazma serbest amino asit profillerini oluşturma olasılığı bu hastalıkların teşhis ve orijinlerinin açıklanmasında amino asitlerin önemli rolleri olabileceğini düşündürmektedir (10). Kanser dokusu ve metabolizmasındaki bu değişiklikler onkolojide kanseröz prosesin yoğunluğunu ve yayılımını gösteren markerlardan biri olarak yorumlanmaktadır (19). Aynı teori çerçevesinde meme kist sıvılarının amino asit karakteristikleri onların malignant süreçte nasıl bir yön alacağının bir ifadesi olabilir ve bu yönde ayrıntılı çalışmaların yapılması bu mekanizmanın daha iyi anlaşılmasında yararlı olacaktır.

Çeşitli kanser tipleriyle yakın ilişkisi olan amino asitlerin özellikle meme kanseri gelişimi yönünden yüksek risk grubunu oluşturan apokrin kist grubunda diğerine göre daha yüksek bulunması, bu amino asitlerin kistik meme hastalıklarından meme kanseri gelişimi yönünde önemli bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir.

SONUÇLAR

Kistik meme hastalığı bulunan kadınların meme kist sıvısı amino asit düzeylerine bakılarak kistik meme hastalıklarındaki amino asit profilini incelendi. Buna göre;

Na ve K elektrolit düzeylerine bakılarak meme kist sıvıları Na/K<3 (meme kanseri gelişimi yönünden yüksek risk grubu) ve Na/K>3 (meme kanseri gelişimi yönünden düşük risk grubu) olmak üzere iki gruba ayrıldı.

EAA'in tümü ve NEAA'lerin çoğunun düzeylerini meme kanseri gelişimi yönünden yüksek risk grubu meme kist sıvılarında düşük risk grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

Glikojenik amino asitlerin çoğu ile ketojenik amino asitlerin ve hem ketojenik hem glikojenik amino asitlerin tümü yüksek meme kanseri gelişimi riskine sahip meme kist sıvılarında düşük risk grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

Total amino asit düzeyleri yüksek meme kanseri gelişimi riskine sahip meme kist sıvılarında düşük risk grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

Asidik amino asitler olan glutamik asit ve aspartik asit seviyeleri Na/K<3 olan grupta diğer gruba göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

Bazik amino asitlerden arginin, histidin ve sitrüllin bakımından iki grup arasında anlamlı fark bulunmazken; lizin düzeyleri Na/K<3 grubunda Na/K>3 grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu .

Dallı zincirli amino asitlerden valin bakımından iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmazken; lösin ve izolösin Na/K<3 grubunda diğer gruba göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

Aromatik yan zincirli amino asitlerden tirozin; fenilalanin ve triptofan düzeyleri anlamlı olarak, Na/K<3 olan grupta diğer gruba göre yüksek bulundu.

İmino asitlere bakıldığında hidroksiprolin ve Na/K>3 grubu meme kist sıvılarında deteksiyon limitine göre çok düşük düzeyde bulunan prolin amino asitleri Na/K<3 grubunda anlamlı olarak yüksek bulundu.

Kükürt içeren amino asitlerden sistin düzeyleri bakımından iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Metiyonin ise Na/K<3 olan grupta Na/K>3 grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu.

Serin ve treonin düzeyleri Na/K<3 olan grupta diğerine göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Asparagin, taurin ve ornitin düzeyleri bakımından iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Malignant proseste görev alan bu amino asitlerin, meme kist sıvılarındaki varlıkları ve kanser gelişimi yönünden yüksek risk grubunu oluşturan meme kistlerinde, düşük risk grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmaları, bu amino asitlerin kistik meme hastalığından meme kanseri gelişimi mekanizmasında potansiyel rol alabileceğini ortaya koymaktadır. Meme kist sıvıları, özellikle meme kanseri gelişimi yönünden yüksek risk grubunu oluşturan apokrin epitel yapısı ve Na/K<3 oranı ile karakterize olanların yüksek düzey mitojenik faktör ve östrojenik içerikleri ve bunların malignant prosesteki olası görevleri henüz tam olarak açığa çıkarılamamıştır. Daha önceki bu bulgulara ek olarak bu çalışmada gösterilen yüksek risk grubu kistlerdeki yüksek amino asit düzeylerinin bu mekanizma içerisinde nasıl bir görev üstlendiği tam olarak bilinmemektedir.

Amino asitlerin bu mekanizmadaki olası rollerinin daha ileri çalışmalarla irdelenmesinin, kistlerden başlayan ve kanser gelişimi ile sonuçlanan mekanizmanın daha iyi anlaşılmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

ÖZET

Kistik meme hastalıkları günümüzde her 20 kadından birini etkileyen ve bu yapısıyla kadın memesinin en yaygın benign oluşumudur. Epitel yapısı göz önüne alındığında apokrin epitelli (Na/K<3) ve düz epitelli (Na/K>3) olmak üzere 2 tip meme kisti vardır. Yapılan çalışmalar meme kistine sahip kadınların yaşamlarının sonraki periyotlarında meme kanserine yakalanma oranlarının 2-4,4 kat daha fazla olduğunu göstermiştir. Yine bu çalışmalar sonucu özellikle apokrin epitele sahip olan ve meme dokusunda birden fazla (multiple) kist bulunduran hastalarda bu riskin daha da yükseldiğini göstermiştir.

Malignant bir oluşuma sahip hastalar genellikle anormal periferal amino asit profiline sahiptir. Bunun yanında, amino asit profilindeki bu değişimler kanserin yerleştiği organ tipinin teşhisiyle de yakından ilişkili bulunmuştur. Bu gözlemler ışığında malignant hücrelerin ekstrasellüler amino asit profiline direkt etki yaptığı söylenebilir. Bu çalışmada, meme kanseri gelişimi yönünden yüksek ve düşük meme kist sıvılarındaki amino asit konsantrasyonlarının bulunması ve kistik meme hastalıklarından meme kanseri gelişimi yönündeki olası mekanizmaların araştırılması amaçlanmıştır.

Kistik meme hastalığı tanısı almış, yaşları 23 ile 54 arasında değişen kadınlardan aspire edilen meme kist sıvılarında çalışma gerçekleştirilmiştir. Kist sıvısı amino asit düzeyleri HPLC tekniği ile Waters Pico Tag Amino Asit Sistemi kullanılarak saptandı. Aspartik asit ($p<0,001$), glutamik asit ($p<0,001$), hidroksiprolin ($p<0,01$), serin ($p<0,05$), glisin ($p<0,001$), treonin ($p<0,05$), alanin ($p<0,01$), prolin ($p<0,001$), tirozin ($p<0,05$), metiyonin ($p<0,01$), izolösin ($p<0,01$), lösin ($p<0,01$), fenilalanin ($p<0,01$), triptofan ($p<0,001$) düzeyleri meme kanseri gelişimi yönünden yüksek risk grubunda ($n=9$), düşük risk grubuna ($n=8$) göre anlamlı olarak yüksek; lizin ($p<0,001$) düzeyleri ise düşük bulundu.

Çeşitli kanser tipleriyle yakın ilişkisi olan amino asitlerin özellikle meme kanseri gelişimi yönünden yüksek risk grubunu oluşturan apokrin kist tipinde diğerine göre daha yüksek bulunması, bu amino asitlerin kistik meme hastalıklarından meme kanseri gelişimi yönünde önemli bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Meme kist sıvısı, amino asit profili, HPLC, kanser.

BREAST CYST FLUID AMINO ACID PROFILE

SUMMARY

Gross cystic breast disease of breast which influences 1 in every 20 women, is the most common benign breast disease. Based on their epithelial lining, there are two types of breast cyst; lined by apocrine epithelium (Na/K<3) or flattened epithelium (Na/K>3). Several studies have shown that women with palpable breast cysts may have 2-4,4 times higher risk of developing breast cancer. Studies were also indicated that women with apocrine cyst associated with a higher risk of breast cancer and this risk even increased with the number of cysts (multiple) in the same breast.

Patients with malignant disease usually show abnormal amino acid profiles in the peripheral circulation. Furthermore, changes in amino acid profile diagnostically correlate with organ sites of malignancy. These observations indicate that malignant cells may have a direct influence on extracellular amino acid profiles. In this study, we aimed to investigate the levels of amino acids in both high and low risk cyst groups and possible mechanism involved in the development of breast cancer from cystic disease of breast.

In this study, the breast cyst fluid aspired from women with gross cystic breast disease were studied. Breast cyst fluid amino acid levels were determined with an HPLC technique using Waters Pico Tag Amino Acid System. Aspartic acid (p<0,001), glutamic acid (p<0,001), hydroksyproline (p<0,01), serine (p<0,05), glycine (p<0,001), threonine (p<0,05), alanine (p<0,01), proline (p<0,001), tyrosine (p<0,05), methionine (p<0,01), isoleucine (p<0,01), leucine (p<0,01), phenylalanine (p<0,01), tryptophan (p<0,001) levels were

significantly higher and lysine levels were lower in the apocrine epithelial cyst group (n=9) when they were compared to the flattened epithelial cyst group (n=8).

Finding of higher levels of amino acid concentrations, associated with several cancer types, in apocrine cyst which were also shown to have higher risk of developing breast cancer may indicate their possible important role(s) in the mechanism of developing breast cancer from cystic disease of breast.

Key words: Breast cyst fluid, amino acid profile, HPLC, cancer.

KAYNAKLAR

1. Dixon JM, Miller WR, Scott WN and Forrest APM. The morphological basis of human breast cyst populations. Br J Surg 1983; 70: 604-6.
2. Dixon JM, Lumbsden AB, Miller WR. The relationship of cyst type to risk factors for breast cancer in patients with breast cystic disease. Eur J Cancer Clin Oncol 1985; 21: 1047-50.
3. Ciatto S, Biggeri A, Del Turko MR, Bartoli D, Lossa A. Risk of breast cancer subsequent to proven gross cystic breast disease. Eur J Cancer 1990; 26: 555-7.
4. Heber D, Byerley LO, Chlebowski RT. Metabolic abnormalities in the cancer patient. Cancer 1985; 5: 225-9.
5. Fanelli FR, Cangiano C, Muscaritoli M, Conversano L, Torelli GF, Cascino A. Induced-induced changes in host metabolism.. a possible marker of neoplastic disease. Nutrition 1995; 11: 595-600.
6. Brennan MF. Total parenteral nutrition in the management of the cancer patient. Ann Rev Med 1981; 32: 233-43.
7. Lundholm K, Edstrom S, Ekman L, Karlberg I, Schersten T. Metabolism in peripheral tissues in cancer patients. Cancer Tret Rep 1981; 65 (suppl 5): 79-83.
8. Brennan MF. Total parenteral nutrition in the cancer patient. N Eng J Med 1981; 305: 375-83.
9. Arbeit JM, Lees DE, Corsey R, Brennan MF. Resting energy expenditure in controls and cancer patients with localized and diffuse disease. Ann J Surg 1984; 199: 292-8.
10. Kuboto A, Meguid MM, Hitch DC. Amino acid profiles correlate diagnostically with organ site in three kinds of malignant tumours. Cancer 1992; 69: 2343-8.

11. Cascino A, Muscaritoli M, Cangiano C, Conversano L, Laviano A, Ariemma S, Meguid MM, Fanelli FR. Plasma amino acid imbalance in patients with lung and breast cancer. Anticancer Res 1995; 15: 507-10.
12. Ching N, Grossi C, Jham G, Angers J, Zurawinsky H, Ching CY, Nealon TF. Plasma amino acid and serum unesterified fatty acid deficits and the effect of nutritional support in chemotherapy treatment. Surgery 1984; 95: 730-7.
13. Norton JA, Gorschboth CM, Wesley RA, Burt ME, Brennan MF. Fasting plasma amino acid levels in cancer patients. Cancer 1985; 56: 1181-6, 1985.
14. Kelley JJ, Waisman HA. Quantitative plasma amino acid values in leukemic blood. Blood 1957; 12: 635-43.
15. Landel AM, Lo CC, Meguid MM, Rivera D. Effect of methylcholanthrene-induced sarcoma and its removal on rat plasma and intracellular free amino acid content. Surg Res Comm 1987; 1: 273-87.
16. Chance WT, Cao L, Fischer JE. Induced-induced alterations in brain neurotransmitter and plasma ammonia concentrations are normalized twenty four hours after tumour resection. Life Sci 1981; 48: 425-32.
17. Watanabe A, Higashi T, Sakata T, Nagashima H. Serum amino acid levels in patients with hepatocellular carcinoma. Cancer 1984; 54: 1875-82.
18. Zhang PC, Pang CP. Plasma amino acid patterns in cancer [letter]. Clin Chem 1992; 38: 1198-9.
19. Nefyodov LI, Uglyanica KN, Smirnov VY, Doroshenko YM, Fomin KA, Nowicky JW, Brzosko WJ. Amino acids and their derivatives in tumour tissue from patients with breast cancer treated with ukrain. Part VI. Drugs Exp Clin Res 1996; 22 (3-5): 159-61.
20. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. Lancet 2001; 2(9): 533-43.
21. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of twenty-five major cancers in 1990. Int J Cancer 1991; 80: 827-41.
22. Pisani P, Parkin DM, Bray FI, 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.
23. Muir C, Waterhouse J, Mack T et al (Eds). Cancer incidence in five continents. Vol 5 IACR Scientific Publication No 88. Lyon International Agency for Cancer Research, 1987: p.790-5.

24. Veronesi U, Goldhirsch A, Yarnold J. Breast Cancer. In Peckham M, Pinedo H, Veronesi U (Eds): Oxford Textbook of Oncology, Oxford, University Press, 1995: p. 1243-89.
25. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, et al. Cancer statistics, 2000. CA Cancer J Clin 2000; 50: 7-33.
26. Topuz E, Aydıner A, Karadeniz AN (Editörler). Klinik Onkoloji. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları, 06; 2000: p.70-81.
27. Fırat D, Çelik İ. Cancer statistics in Turkey and in the World 1993-1995. Turkish Association For Cancer Research and Control. Ankara: 1998: p.55.
28. Özet A. Türkiye'de ve Dünyada Kanser Epidemiyolojisi. http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/onkoloji/kanser_epidemiyolojisi.htm.
29. Fırat D. Cancer Mortality in Turkey and in the world 1980-1981. Turkish Association For Cancer Research and Control. Ankara: 1983.
30. Fırat D, Hayran M. Cancer Statistics in Turkey and in the World 1990-1992. Turkish Association For The Cancer Research and Control. Ankara: İz Matbaacılık, 1995: p.26.
31. Kadınlarda en çok görülen on kanser türü; 1999. http://www.saglik.gov.tr/extras/istatistikler/apk2001/092.htm.
32. Haagensen CD, Bodian C, Haagensen DE, Jr. Breast carcinoma risk and detection. Philadelphia, Saunders 1981; p: 55-80.
33. Dixon JM, Mcdonald C, Elton RA, Miller WR. Risk of breast cancer in women with palpable breast cysts: a prospective study. Lancet 1999; 353(9166): 1742-5.
34. Topuz E. Meme Hastalarında Sitoloji ve Patoloji. Meme Kanseri'nde., İstanbul: İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları 3; 1997: p.180-8.
35. Harrington E, Lesnick G. The association between gross cysts of the breast and breast cancer. Breast 1980; 7: 13-7.
36. Jones BM, Bradbeer JV. The presentation and progress of macroscopic breast cysts. Br J Surg 1980; 67: 669-76.
37. Hutchinson WB, Thomas DB, Hamlin WB, Roth GJ, Peterson AV, Williams B. Risk of breast cancer in women with benign breast disease. J Natl Cancer Inst 1984; 65: 13-20.
38. Roberts MM, Jones V, Elton RA, Fort RW, Williams W, Gravelle IH. Risk of breast cancer in women with history of benign disease of breast. Br Med J 1984; 288: 275-8.
39. Haagensen CD. Diseases of the breast . 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders, 1986.

40. Ciatto S, Biggeri A, Del Turco MR, Bartoli D, Iossa A. Risk of breast cancer subsequent to proven gross cystic disease. Eur J Cancer 1990; 26: 255-7.
41. Bundred NJ, West RR, Dowd JO, Mansel RE, Hughes LE. Is there an increased risk in women who had a breast aspirated ? Br J Cancer 1991; 64: 953-5.
42. Leis HP Jr. Gross breast cyst: significance of apocrine type, identification by cyst fluid analysis, and management. Breast Diseases 1993; 6: 185-94.
43. Bruzzi P, Dogliotti L, Naldoni C, Bucchi L, Costantini M, Cicognani A, Torta M, Buzzi GF, Angeli A. Cohort study of association of risk of breast cancer with cyst type in women with gross cystic disease of the breast. BMJ 1997; 314: 925-8.
44. Dixon JM, Scott WN, Miller WR. Natural history of cystic disease; the importance of cyst type. Br J Surg 1985; 72: 190-2.
45. Angeli A, Dogliotti L, Naldoni C, Orlandi F, Puligheddu B, Caraci P, Bucchi L, Torta M, Bruzzi P. Steroid biochemistry and categorisation of breast cyst fluid; relation to breast cancer risk. J Steroid Biochem Molec Biol 1994; 49: 333-9.
46. Dixon JM, Lumsden AB, Miller WR. The relationship of cyst type to risk factors for breast cancer in patients with breast cystic disease. Eur J Cancer Clin Onkol 1985; 21: 1047-50.
47. Haagensen CD. The relationship of gross cystic disease of the breast and carcinoma. Ann Surg 1977; 185: 375-6.
48. Lai LC,Ghatei MA, Takahashi K, Patel KV, Schrey MP, Ghilchik MW, Bloom SR. Mitogenic peptides in breast cyst fluid: relationship with intracystic electrolyte ratios. Int J Cancer 1990; 46: 1014-6.
49. Orlandi F, Caraci P, Puligheddu B, Torta M, Dogliotti L, Del Monte I, Angeli A. Relationship to cation-related cyst subpopulations. Ann NY Acad Sci 1990; 586: 79-82.
50. Raju V, Bradlow HL, Levitz M. Estriol-3-sulphate in human breast cyst fluid; concentrations, possible origin, and physiologic implications. Ann NY Acad Sci 1990; 586: 83-7.
51. Lai LC, Siraj AK, Erbas H, Lennard TWJ. Transforming growth factor alpha, beta 1 and beta 2 in breast cyst fluid. Anticancer Res 1994; 14: 2805-10.
52. James VHT, Reed MJ. Steroid hormones and human cancer. In: Iacobelli S, King RJB, Linder HR, Lippman ME (Eds.). hormones and Cancer. New York: Raven Press; 1980: 471-87.

53. Goustin AS, Leof EB, Shipley GD, Moses HL. Growth factors and cancer. Cancer Res 1986; 46: 1015-29.
54. Belanger A, Caron S, Labrie F, Naldoni C, Dogliotti L, Angeli A. Levels of eighteen non-conjugated steroids in human breast cysts fluid: relationship with cyst type. Eur J Cancer 1990; 26: 277-81.
55. Secreto G, Recchione C, Ballerini P, Callegari L, Fariselli G, Attili A, Moglia D. Cations and active androgens in breast cyst fluid. Ann NY Acad Sci 1990; 586: 88-92.
56. Stryer L. Protein, Structure and Function. Stryer L, editor. Biochemistry. 4. ed. New York: WH Freeman and Company, 1995: 18-23.
57. Onat T. Amino Asitler, Peptid ve proteinler. Onat T, Emerk K, Sözmen EY, editörler. İnsan Biyokimyası'nda. Ankara: Palme Yayıncılık, 2002: 602-5.
58. Fanelli FR, Cangiano C, Muscaritoli M, et al. Tumor-induced changes in host metabolism: a possible marker of neoplastic disease. Nutrition 1995; 11(suppl): 595.
59. Costa G. Cachexia, the metabolic component of neoplastic diseases. Cancer Res 1977; 37: 2336-47.
60. .Brennan MF, Burt ME. Nitrogen metabolism in cancer patients. Cancer Treat Rep 1981; 65: 67-78.
61. Gold J. Cancer cachexia and gluconeogenesis. Ann NY Acad Sci 1974; 230: 103-10.
62. Waterhouse C, Jeanpetre N, Keilson J. Gluconeogenesis from alanine in patients with progressive malignant disease. Cancer Res 1979; 39: 1968-72.
63. Lundholm K, Edstrom S, Ekman L. A comparative study of the influence of malignant tumor on host metabolism in mice and man. Cancer 1978; 42: 453-63.
64. Norton JA, Shamberger R, Stein TP, Milne GWA, Brennan MF. The influence of tumor-bearing on protein metabolism in the rat. J Surg Res 1981; 30: 456-62.
65. Carmichael MJ, Clague MB, Keir MH, Johnston IA. Whole body protein turnover, synthesis and breakdown in patients with colorectal carcinoma. Br J Surg 1980; 67: 736.
66. Eden E, Ekman L, Bennegard K, Lindmark L, Lundholm K. wholebody tyrosine flux in relation to energy expenditure in weight-losing cancer patients. Metabolism 1984; 33: 1020.
67. Jeevanandam M, Horowitz GD, Lowry SF, Brennan MF. Cancer cachexia and protein metabolism. Lancet 1984; 1: 1423.
68. Abumrad NN, Miller B. The physiologic and nutritional significance of plasma-free amino acid levels. JPEN 1983; 7: 163-70.

69. Kern KA, Norton JA. Cancer Cachexia. JPEN 1988; 12: 286-98.
70. Lee JC, Chen MJ, Chang CH, Tiai YF, Lin PW, Lai HS, Wang ST. Plasma amino acid levels in patients with colorectal cancers and liver cirrhosis with hepatocellular carcinoma. Hepato-Gastroenterology 2003; 50: 1269-73.
71. Proenza AM, Oliver J, Palou A, Roca P. Breast and lung cancer are associated with a decrease in blood cell amino acid content. J Nutr Bioc 2003; 14:133-8.
72. Muscaritoli M, Conversano L, Petti MC, Cascino A, Mecarocci S, Annicchiarico MA, Rossi Fanelli F. Plasma amino acid concentrations in patients with acute myelogenous leukemia. Nutrition 1999; 15: 195-9.
73. Wang F, Permert J. Specific amino acid profile in culture media conditioned by human pancreatic cancer cell lines. Pancreatology 2002; 2: 402-6.
74. Bruera E. Anorexia, cachexia and nutrition. Br Med J 1997; 315: 1219-22.
75. Wang LB, Shen JG, Zhang SZ, Ding KF, Zheng S. Amino acid uptake in arterio-venous serum of normal and cancerous colon tissues. World J Gastroenterol 2004; 10(9): 1297-1300.
76. Rudman D, Vogler VR, Howard CH, Gerron GG. Observations on the plasma amino acids of patients with acute leukemia. Cancer Res 1971; 31: 1159-1165.
77. Hoffman RM. Methionine dependence in cancer cells-a review. In Vitro 1982; 18(5): 421-8.
78. Hoffman RM. Altered methionine metabolism and transmethylation in cancer. Anticancer Res 1985; 5(1): 1-30.
79. Castro-Bella F, Ramos F, Vivanco F, Marina-Fiol C. High serum glutamic acid levels in patients with carcinoma of the pancreas. Digestion 1976; 14: 360-3.
80. Zenz M, Hilfrich J, Neuhaus R. Gynecologic cancer and amino acid metabolism. Nutrition and Metabolism in Cancer. In: Kluthe R, Löhr GW (Eds.). Stuttgart: Thieme Verlag; 1981: 90-4.
81. Granner DK (Çeviri Dikmen N, Özgünen T): Amino Asitlerin Özgül Ürünlerine Çevrimi. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW editors. Harper'ın Biyokimyası'nda. 24. baskı. İstanbul: Barış Kitabevi, 1996: 347-359.
82. Singh R, Pervin S, Karimi A, Cederbaum S, Chaudhuri G. Arginase activity in human breast cancer cell lines: N^{ω}-Hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells. Cancer Res 2000; 60: 3305-12.
83. Russell DM, Shike M, Andersen GH. Amino acid metabolism in small cell lung cancer. J Parenter Enteral Nutr 1981; 6: 592.

84. Hole M. Relation between glutamine, branched chain amino acids and protein metabolism. Nutrition 2002; 18(2): 130-3.

85. Glarche EF, Lewis AM, Waterhouse C. Peripheral amino acid levels in patients with cancer. Cancer 1978; 42: 2909-13.

RESİMLEMELER LİSTESİ

ŞEKİLLER **Sayfa No**

Şekil 1. 2000 yılı dünya çapında kanser verileri 3

Şekil 2. Ülkelerde yaşa göre standardize edilmiş meme kanseri insidans oranları. 4

Şekil 3. Türkiye'de kadınlarda en sık görülen kanser lokalizasyonları (1994 hastane kayıtlarına göre) 6

Şekil 4. Düz epitelli meme kistlerinin genel görünümü 8

Şekil 5. Apokrin epitelli meme kistlerinin genel görünümü 9

Şekil 6. Meme kist sıvısı Na/K oranları 16

Şekil 7. PTC Amino asitlerin elde edilmesi 17

Şekil 8. Amino asit kalibrasyon standardlarını gösteren HPLC kromatogramı (200 µmol/L). 21

Şekil 9. Meme kist sıvısına ait HPLC kromatogramı (Na/K <3) 27

Şekil 10. Meme kist sıvısına ait HPLC kromotogramı (Na/K>3) 28

Şekil 11. Meme kist sıvısı gruplarında aspartik asit konsantrasyonları 29

Şekil 12. Meme kist sıvısı gruplarında glutamik asit konsantrasyonları 29

Şekil 13. Meme kist sıvısı gruplarında arginin konsantrasyonları 30

Şekil 14. Meme kist sıvısı gruplarında histidin konsantrasyonları 30

Şekil 15. Meme kist sıvısı gruplarında lizin konsantrasyonları 31

Şekil 16. Meme kist sıvısı gruplarında sitrüllin konsantrasyonları 31

Şekil 17. Meme kist sıvısı gruplarında valin konsantrasyonları 32

Şekil 18. Meme kist sıvısı gruplarında lösin konsantrasyonları 32

Şekil 19. Meme kist sıvısı gruplarında izolösin konsantrasyonları 33
Şekil 20. Meme kist sıvısı gruplarında fenilalanin konsantrasyonları 33
Şekil 21. Meme kist sıvısı gruplarında tirozin konsantrasyonları 34
Şekil 22. Meme kist sıvısı gruplarında triptofan konsantrasyonları 34
Şekil 23. Meme kist sıvısı gruplarında prolin konsantrasyonları 35
Şekil 24. Meme kist sıvısı gruplarında hidroksiprolin konsantrasyonları 35
Şekil 25. Meme kist sıvısı gruplarında ornitin konsantrasyonları 36
Şekil 26. Meme kist sıvısı gruplarında sistin konsantrasyonları 36
Şekil 27. Meme kist sıvısı gruplarında metiyonin konsantrasyonları 37
Şekil 28. Meme kist sıvısı gruplarında glisin konsantrasyonları 37
Şekil 29. Meme kist sıvısı gruplarında serin konsantrasyonları 38
Şekil 30. Meme kist sıvısı gruplarında treonin konsantrasyonları 38
Şekil 31. Meme kist sıvısı gruplarında alanin konsantrasyonları 39
Şekil 32. Meme kist sıvısı gruplarında asparagin konsantrasyonları 39
Şekil 33. Meme kist sıvısı gruplarında taurin konsantrasyonları 40
Şekil 34. Meme kist sıvısı gruplarında total amino asit düzeyleri 40

TABLOLAR

Tablo 1. Kistik meme hastalığından meme kanseri gelişim riski 7
Tablo 2. Mobil faz gradient tablosu 19
Tablo 3. HPLC kromotogramında amino asitlerin çıkış zamanları 20
Tablo 4. Na/K <3 grubu meme kist sıvıları amino asit düzeyleri (µmol/L) 24
Tablo 5. Na/K <3 grubu meme kist sıvıları amino asit düzeyleri (µmol/L) 25
Tablo 6. Meme kist sıvıları Na/K<3 ve Na/K>3 gruplarında amino asitlerin ortalama, standart sapma, p ve z değerleri 26

ÖZGEÇMİŞ

17.12.1978 tarihinde Edirne'de doğdum. İlk öğrenimimi Kurtuluş İlkokulu'nda, orta ve lise öğrenimimi Edirne Anadolu Lisesi'nde, üniversite öğrenimimi İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü'nde tamamladım. 2001 yılında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım.

Yüksek lisans eğitimim süresince katıldığım çalışmalar:

Ekim 2003'te Kuşadası'nda 13th Balkan Biochemical & Biophysical Days'te sunulan:

"Arginase and Ornithine Levels in Breast Cyst Fluid",

"The Effects of Melatonin on Liver during Ischemia-Reperfusion Injury of the Kidney",

"Liver Protection by Vitamin C during Ischemia-Reperfusion Injury of the Kidney".

Mayıs 2004'te Trabzon'da 18th Ulusal Biyokimya Kongresinde sunulan:

"Meme kist sıvısı aspartik asit, glisin, glutamik asit, metiyonin ve triptofan düzeyleri".

Yüksek lisans eğitimim süresince katılmış olduğum kongreler:

1-4 Ekim 2003'te Kapadokya'da Klinik Biyokimya Günleri, Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği 1. Ulusal Kongresi

12-15 Ekim 2003'te Kuşadası'nda 13th Balkan Biochemical & Biophysical Days.