T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Hakan ERBAŞ

DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULMUŞ MEME TÜMÖRLERİNDE PLAZMA VE DOKU AMİNO ASİT DÜZEYLERİNE N-ASETİLSİSTEİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Oya ERTEN

EDİRNE-2006

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde ve tez çalışmalarımda değerli katkıları olan danışmanım Yrd.Doç.Dr. Hakan ERBAŞ başta olmak üzere Prof.Dr. Erol ÇAKIR'a, Prof.Dr. Selma SÜER GÖKMEN'e, Yrd. Doç.Dr.Sevgi ESKİOCAK'a, bu çalışmada benden yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Ufuk USTA, Yük. Lis. Öğr. Ezgi KÜRKÇÜ ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ……. 1

GENEL BİLGİLER……. 3

MEME KANSERİ…….. 3

AMİNO ASİTLER…….. 7

KANSER VE PROTEİN METABOLİZMASI…… 12

KANSER VE AMİNO ASİTLER…….. 13

N-ASETİLSİSTEİN……... 17

KANSER VE N-ASETİLSİSTEİN……... 19

GEREÇ VE YÖNTEMLER……... 21

BULGULAR…… 30

TARTIŞMA……. 42

SONUÇLAR…… 48

ÖZET……. 50

SUMMARY…….. 52

KAYNAKLAR…… 54

EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

DNA : Deoksiribonükleik asit

GSH : Glutatyon (indirgenmiş)

HCC : Hepato cellular carcinoma (hepato selüler karsinom)

HIV : Human immunodeficiency virus

HPLC : High performance liquid chromotography (yüksek performans likit kromotografisi)

IS : İnternal standart

NAC : N-acetylcysteine (N-asetilsistein)

NO : Nitrik oksit

NOS : Nitrik oksit sentaz

PITC : Phenyl isothiocyanate (fenil izotiyosiyanat)

PTC : Phenyl thiocarbamide (fenil tiyokarbamid)

TEA : Trietilamin

VEGF : Vascular endothelial growth factor (vasküler endotelyal büyüme faktörü)

GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri dünyada ve Türkiye'de kadınlar arasında en sık görülen tümör olup kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır (1). Aynı zamanda meme kanseri, kadınların kanser ölüm nedenleri arasında dünya ve Türkiye bazında ilk sırada bulunmaktadır. Günümüzde tüm kanserlerin %32'si, kansere bağlı ölümlerin ise % 18'i meme kanserine bağlıdır (2-4).

Meme kanseri bu özelliği ile çok önemli bir sağlık problemi olma özelliğini halen sürdürmektedir (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).

Plazma amino asitlerinin düzeyleri, vücuttaki amino asitlerin akışını etkileyen tüm faktörlerin net etkisini göstermektedir (10). Plazma amino asit profilinin kanserle ilişkili protein metabolizmasının değişimi için bir marker olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (11-14). Anormal plazma serbest amino asit düzeyi saptanan bireylerde kanser gelişme olasılığının dikkate alınması gerektiği vurgulanmıştır (15). Moleküler düzeydeki yeni çalışmalar amino asit ve kanser arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (16-18). Yakın

gelecekte anormal plazma serbest amino asit profili olan hastalarda kanserin genetik teşhisinin mümkün olabileceği düşünülmektedir (17).

Bazı kanserlerin kendi karakteristik plazma serbest amino asit profillerini oluşturma olasılığı bu hastalıkların teşhis ve orijinlerinin açıklanmasında amino asitlerin önemli roller üstlenebileceğini düşündürmektedir (12,19). Kanser metabolizmasındaki bu değişiklikler onkolojide kanser sürecinin yoğunluğunu ve yayılımını gösteren belirteçlerden biri olarak yorumlanmaktadır ve bu belirteçlerin hasta tedavisinin takibinde de kullanılabileceği öne sürülmektedir (20).

N-asetilsistein (NAC) iyi bilinen bir antioksidan olmasının yanısıra, antikarsinojenik özelliği çeşitli çalışmalarda gösterilmiş bir ajandır. Çeşitli kanser olgularında koruyucu özelliğe sahip olduğu vurgulanmıştır. Meme kanserinde NAC tedavisinin tümör dokusunda nekroz yüzdesini azalttığı, tümör volümünü küçülttüğü, metastazları azalttığı, tümör hücrelerinde apoptozisi artırdığı, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) inhibisyonu yaparak tümör yayılımını azalttığı gösterilmiştir (21,22). Fakat NAC'ın meme kanserinde amino asit düzeyleri üzerine olan etkisi konusunda herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışmada, meme kanseri oluşturulan farelerin plazma ve doku amino asit (alanin, arjinin, asparajin, aspartat, β-alanin, fenilalanin, glisin, glutamat, hidroksiprolin, histidin, izolösin, lizin, lösin, metiyonin, ornitin, prolin, serin, sistein, sitrulin, taurin, tirozin, treonin, triptofan ve valin) düzeyleri ve NAC'ın bu amino asitler üzerine etkisi incelenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

MEME KANSERİ

Kanser, günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biridir. Gelişmiş ülkelerde olduğu gibi Türkiye'de de bütün yaş gruplarına göre kardiovasküler hastalıklardan sonra en sık ikinci ölüm sebebi kanser olmuştur (Tablo 1) (23-25).

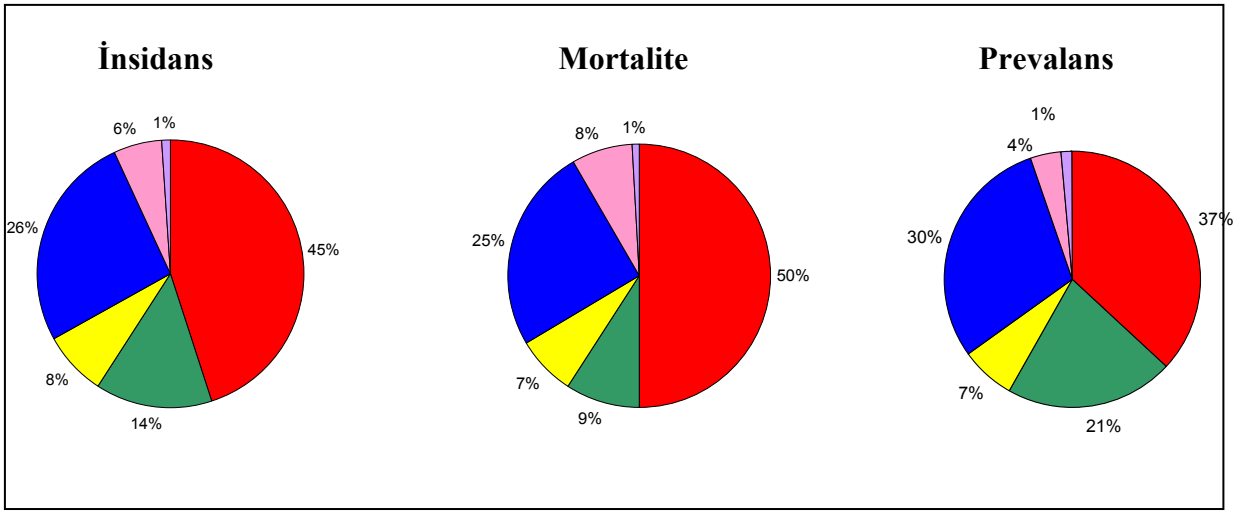
Tablo 1. Türkiye'de 1995 yılında bütün yaş gruplarında en sık ölüm sebepleri (25)

Ölüm sebebi	%
Kardiovasküler hastalıklar	36
Kanser	11
Serebrovasküler hastalıklar	7
İnfeksiyon hastalıklar	7
Kalaazar	4
Diğer sebepler	35

2002 yılında, varolan insidans ve mortalite verilerine dayanarak, dünyada 10,9 milyon yeni vaka, 6,7 milyon ölü vaka ve 24,6 milyon yaşayan kanser hastası olduğu tahmin edilmektedir. Dünyada en yaygın teşhis edilen kanserler sırasıyla ile akciğer (1,35 milyon), meme (1,15 milyon) ve kolon-rektum (1 milyon) kanserleridir (1).

Meme kanseri görülme sıklığı dünyada ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir (Şekil 1). İnsidansı, Japonya hariç sosyoekonomik olarak iyi gelişmiş olan Kuzey ve Batı Avrupa ülkelerinde, Amerika Birleşik Devletleri'nde yüksektir. Californiya, Kanada yılda yüz binde 80–90 görülme sıklığı ile ilk sıralarda yer alırken, aynı değer Japonya'da sadece yüz binde

12–15 arasındadır (26,27). Avrupa ülkelerinde ise görülme sıklığı kuzey ülkelerinden güneye ve batı ülkelerinden doğuya doğru azalmaktadır (28). Buna karşın meme kanseri görülme sıklığı düşük toplumlarda, yüksek toplumlara göre daha belirgin bir artış göstermesi, yıllar içinde batı ülkelerinde yaşayan kadınlarla, doğu ülkelerinde yaşayan kadınlar arasındaki meme kanseri görülme sıklığı farkının kapanacağını göstermektedir (28,29).



Şekil 1. 2002 yılı dünya çapında kanser verileri (1): Kırmızı: Asya; Sarı: Latin Amerika; Pembe: Afrika; Yeşil: Güney Amerika; Mavi: Avrupa; Mor: Okyanusya'yı temsil etmektedir.

2002 yılı verilerine dayanarak, cinsiyete göre dünyada kanser görülme sıklığına bakıldığında, erkeklerde en sık akciğer ve mide, kadınlarda ise meme ve kolorektal kanserlerin başta geldiği görülmektedir. Her iki cins için kanser görülme sıklığı sırasıyla akciğer, meme ve kolorektal kanserleri şeklindedir. 2002 yılı verileri, 1995 yılı verileriyle karşılaştırıldığında her iki cinste kanser görülme sıklığında 3. sırada yer alan meme kanserinin, mide kanserleriyle yer değiştirerek 2. sıraya yükseldiği gözlenmiştir (Tablo 2) (1,25).

Tablo 2. 1995 yılı verilerine göre dünyada kanser görülme sıklığı (25)

Sıra	Erkek	Kadın	Her İki Cins
1	Akciğer	Meme	Akciğer
2	Mide	Kolorektal	Mide
3	Kolorektal	Serviks uteri	Meme
4	Prostat	Mide	Kolorektal
5	Karaciğer	Akciğer	Karaciğer
6	Ağız/Farinks	Over	Prostat
7	Özefagus	Korpus uteri	Serviks uter

Kanserden ölüm sebepleri arasında dünyada en yaygın olanları sırası ile; akciğer (1,18 milyon), mide (700,000) ve karaciğer (598,000) kanserleridir. Meme kanseri göreceli olarak olumlu prognoza sahip olduğundan, ölüm sebebi olarak sıralamada daha alt sırada (5. sırada) yer almaktadır (1). Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser çeşidi olup, kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Dünya çapında mortalitesinin insidansa oranı %35'dir. Yaşayan 4,4 milyon kanser hastası ile meme kanseri dünyada prevalansı en yüksek kanser tipidir (1,26).

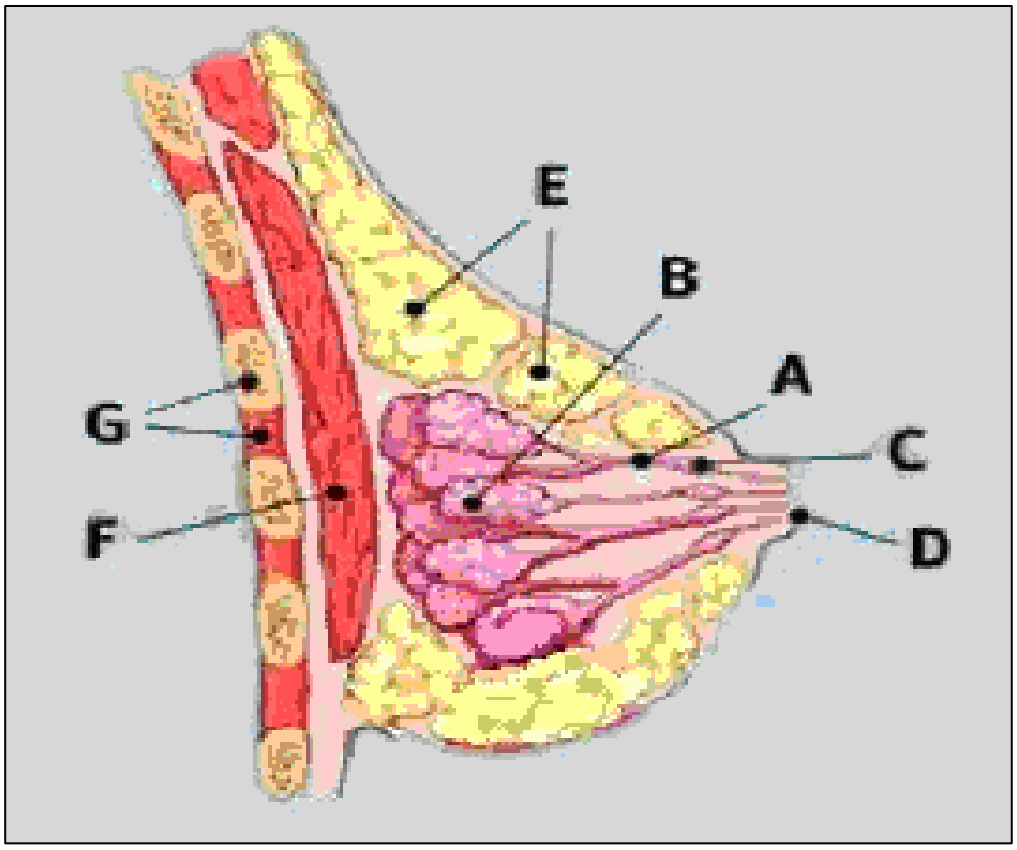
Ülkemizde mevcut kayıt sisteminin yeterli olmaması nedeniyle kanser insidansı hakkında yeterli bilgi yoktur. Sağlık Bakanlığı kanser kayıt merkezine bildirilen kanser oranı yüz binde 35-40 civarındadır (30). Ancak bu oranın gerçekte yüz binde 150–200 civarında olduğu ve bu oran dikkate alındığında ülkemizde yılda yüz bin civarında yeni kanser olgusunun ortaya çıktığı tahmin edilmektedir (25). Türkiye'de Sağlık Bakanlığının 2001 yılı verilerine göre, kadınlarda en sık görülen kanser % 25.42'lik oranıyla meme kanseridir (Tablo 3) (31).

Tablo 3. 2001 yılı Türkiye'de kadınlarda en çok görülen kanser vakaları (31)

Kanser tipi	Vaka sayısı	Yüzde	İnsidans hızı yüz binde
Meme	4307	25.42	12.87
Over serviks	1414	8.34	4.53
Mide	903	5.32	2.70
Cilt	963	5.68	2.88
Akciğer	811	4.78	2.42
Diğer	8552	50.46	27.44
Toplam	16950	100.50	50.66

Memenin Anatomik Yapısı

Meme, sayısı yaklaşık 20 kadar olan ve lob diye adlandırılan bölümden oluşmuştur. Her lob kendi içinde daha küçük bölümler olan lobüllere ayrılır (Şekil 2). Lobüller süt üretimini yapan yapılardır. Her bir lobülün süt salgısının akmasını sağlayan bir süt kanalı (duktus) vardır. Her lobülün süt kanalları birleşerek meme başına kadar uzanan ana süt kanalını oluşturur. Süt kanallarının ve lobüllerin çevresi yağ dokusu ile sarılıdır (32,33).

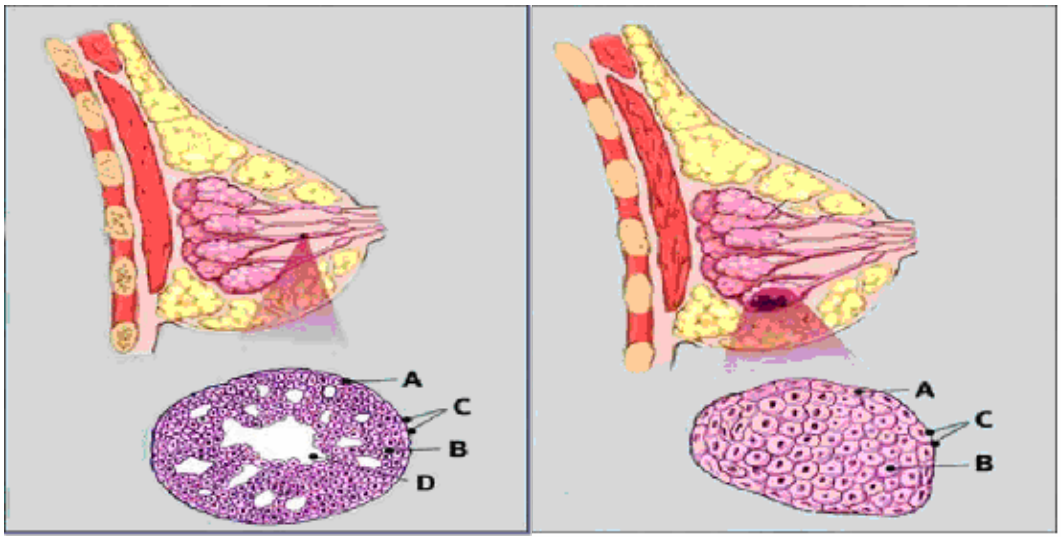


Şekil 2. Memenin anatomik yapısı (33): A:Duktuslar; B: Lobüller; C: Laktifer sinüs; D: Meme başı; E: Yağ dokusu; F: Pektoral kas; G: Kostalar.

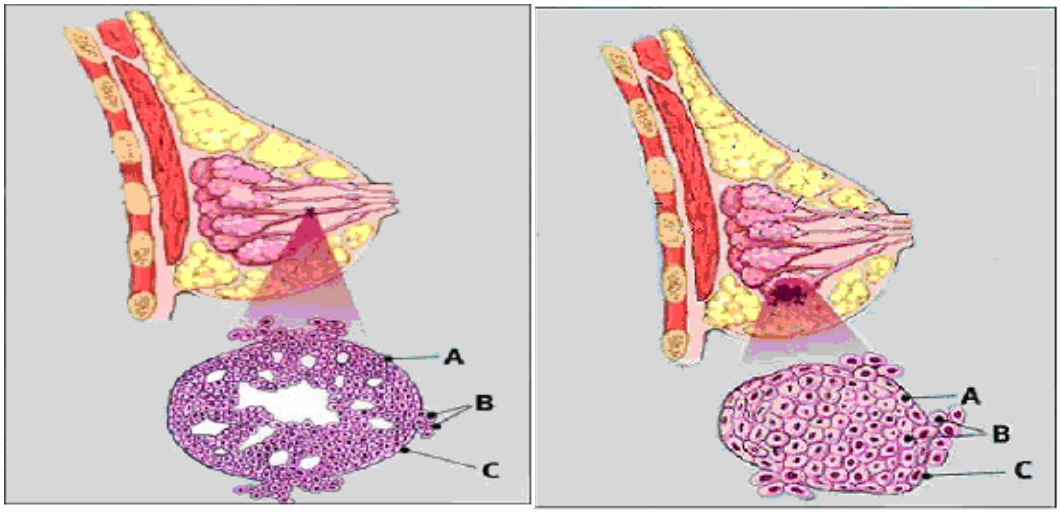
Meme dokusu içinde normal kan damarlarının yanı sıra lenf damarları da vardır. Lenf damarları, vücudun belirli bölgelerinde gruplar halinde bulunan mercimek şeklindeki lenf düğümlerine ulaşırlar. Meme içindeki lenf damarları, memenin orta ve alt kenarı, koltuk altı ve köprücük kemiği boyunca dizilmiş lenf düğümü gruplarına ulaşırlar. Memedeki lenf akımının yaklaşık %75'i koltuk altındaki lenf düğümü gruplarına doğru olur (34).

Meme kanseri iki ana tipe ayrılmaktadır: Duktal karsinom (infiltratif duktal karsinom ve non-infiltratif duktal karsinom) ve lobüler karsinom (infiltratif lobüler karsinom ve non-infiltratif lobüler karsinom) (Şekil 3) (35). Memede en sık olarak süt kanallarından kaynaklanan duktal kanser görülür. Daha az sıklıkla süt üreten keseciklerinden kaynaklanan lobular kanser gelişebilir. Diğer meme kanseri türleri ise olukça nadir görülmektedir (36).

Memenin tarifi yapılırken 5 farklı alandan bahsedebiliriz: Üst dış kadran, üst iç kadran, alt dış kadran, alt iç kadran, merkez alan. Meme dokusu en fazla üst dış kadranda bulunur bu nedenle kanserler de en sık burada görülür (34,37).



Non-invaziv duktal kanser **Non-invaziv lobuler kanser**



İnvaziv duktal kanser **İnvaziv lobuler kanser**

Şekil 3. Meme kanseri tipleri (33): A: Normal duktus hücreleri; B: Kanser hücreleri; C: Bazal membran; D: Lümen.

İnsanlarda meme kanserinin nedeni bilinmemektedir. Genetik, çevresel, hormonal ve psikolojik etkenlerin oluşumunda rol aldığı kabul edilmekle birlikte, meme kanserli kadınların %70-80'i bu risk faktörlerine sahip değildir. Meme kanserinin oluşmasında rol oynayan kesin ve olası risk faktörleri aşağıdaki gibi sıralanabilir (Tablo 4) (38-44).

AMİNO ASİTLER

Proteinler, tüm hücrelerde en çok bulunan biyolojik makro moleküllerdir. Amino asitler, proteinlerin başlıca yapı taşlarını oluşturur. Tüm proteinler 20 amino asidin karakteristik doğrusal diziler halinde, peptit bağı ile kovalent olarak bağlanmasıyla oluşur.

Tablo 4. Meme kanseri gelişimindeki kesin ve olası risk faktörleri (38-44)

Faktör	**Rölatif risk**	**Yüksek risk grubu**
Yaş	**>10**	50 yaş ve üzeri
Cins		Meme kanserlerinin %99'u kadınlarda
Coğrafi lokalizasyon	**5**	Gelişmiş ülkelerde
Menarş yaşı	**3**	12 yaşından önce menarş
Menapoz yaşı	**2**	55 yaşından sonra menapoz
Birinci çocuk doğurma yaşı	**3**	Birinci çocuğunu 30 yaşından sonra doğurma
Aile hikayesi	**3=2**	Anne ve/veya kız kardeşte meme kanseri, BRCA-1, BRCA-2 ve P53 genlerinde mutasyon
Önceden varolan bening hastalık	**2-6**	Atipik hiperplazi
Diğer memede kanser	**>4**	
Sosyo ekonomik grup	**2**	I. ve II. gruplar
Diyet	**1.5**	Yüksek doymuş yağ alımı
Vücut ağırlığı: Premenopozal Postmenopozal	 **0.7** **2**	 Vücut kitle indeksi >35 Vücut kitle indeksi >35
Alkol tüketimi	**1.3**	Aşırı alınması
Radyasyona maruziyet	**3**	Özellikle 30 yaş altında ve puberteden önce
Egzojen alım: Oral kontraseptif Hormon replasman tedavisi	 **1.24** **1.35**	 Erken veya uzun süreli oral kontraseptif kullanımı 10 yıldan fazla kullanım

Bu amino asitlerin yan zincirlerinin belirleyici kimyasal özelliklerinden dolayı, bu 20 öncül molekül protein yapısının yazıldığı dilin alfabesi olarak sayılabilir. Proteinlerin yapısındaki tüm amino asitler, α amino asitlerdir ve glisin hariç, L- konfigürasyonunda bulunurlar. 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 (45).

Amino asitler R gruplarının özelliklerine göre, özellikle polariteleri veya biyolojik pH'da (yaklaşık pH 7.0) suyla tepkimeye girme eğilimlerine göre 5 ana grupta sınıflandırılırlar (Şekil 4) (45-47).

Polar Olmayan, Alifatik R Gruplu Amino Asitler

Bu amino asit sınıfındaki R grupları polar olmayan hidrofobik amino asitlerdir. Proteinlerde alanin, valin, lösin ve izolösinin yan grupları bir araya gelip kümeleşerek, hidrofobik etkileşimlerle protein yapısını sabitler. Glisin en basit yapıya sabittir. Resmen polar olmamasına karşın, çok küçük yan zinciri hidrofobik etkileşimlere gerçek anlamda katılmaz. Sülfür içeren iki amino asitten biri olan metiyonin ise yan zincirinde polar olmayan tiyoeter grubu içerir.

Aromatik R Gruplu Amino Asitler

Aromatik yan zincirli fenilalanin, tirozin ve triptofan göreceli polar olmayanlardır (hidrofobik). Hepsi hidrofobik etkileşimlere katılabilir. Trozinin hidroksil (-OH) grubu, hidrojen bağı yapabilir ve bu bazı enzimler için önemli bir işlevsel gruptur. Tirozin hidroksil grubundan, triptofan da indol halkasındaki azottan dolayı, fenilalanine göre daha polardır. Diğer amino asitler ışığı absorbe etmezken, bu gruptaki amino asitler dalga boyu ultraviyoleye yakın bir bölgede (250-290 nm) ışığı absorbe ederler. Bu özellik proteinlerin tanımlanmasında yardımcı bir faktördür.

Polar, Yüksüz R Gruplu Amino Asitler

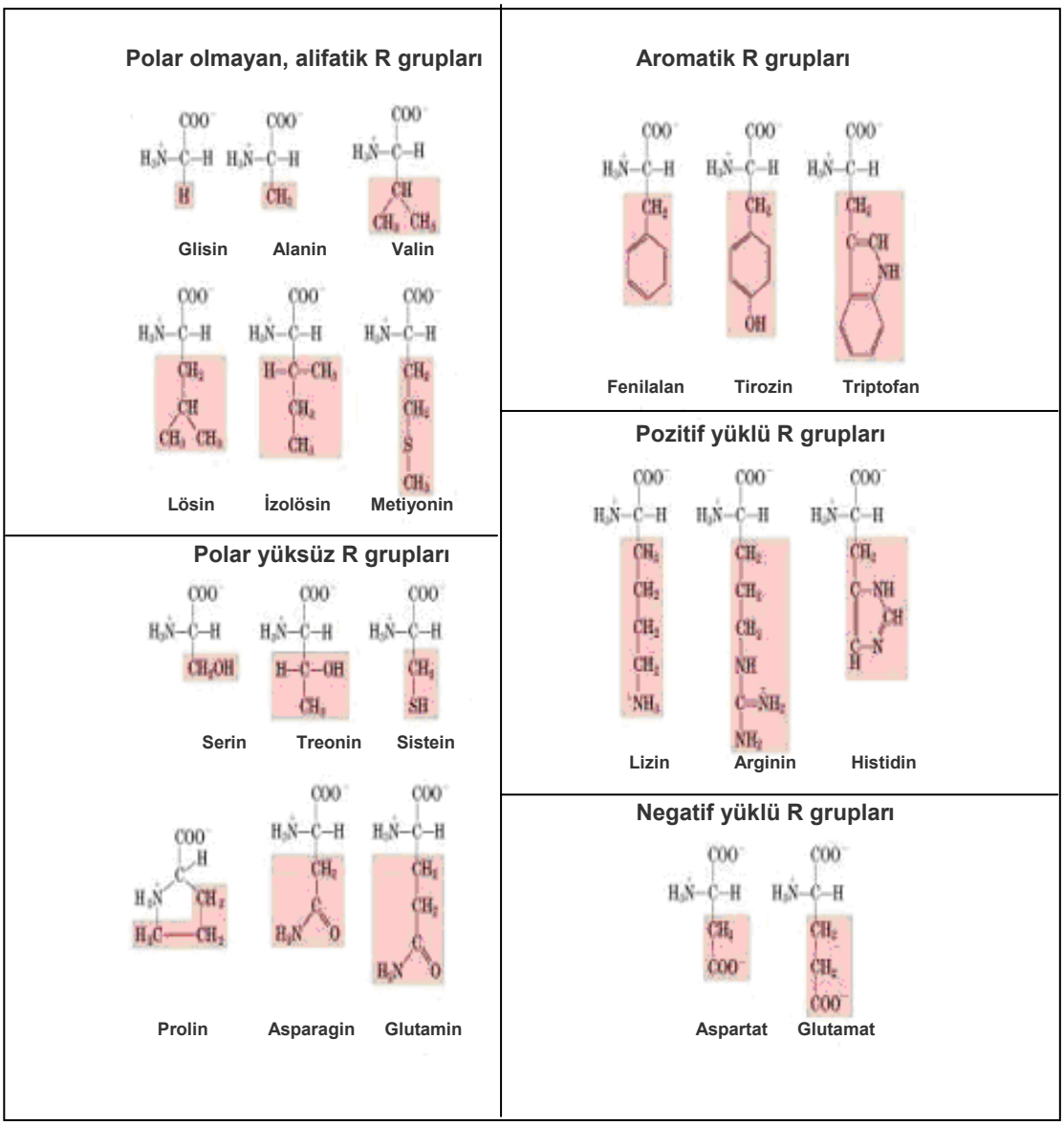
Bu grup amino asitler, polar olmayan amino asitlere göre suda daha çözünebilir ve daha az hidrofobiktir, çünkü içerdikleri işlevsel gruplar suyla hidrojen bağı yapar. Bu grup, serin, treonin, sistein,prolin, asparajin ve glutamin amino asitlerini kapsar. Serin ve treonin hidroksil gruplarıyla, sistein sülfhidril (-SH) grubuyla, glutamin ve asparagin ise amid gruplarıyla ılımlı polariteye katkıda bulunurlar. Asparagin ve glutamin aspartat ve glutamatın amidleridir. Asparagin ve glutamin bazlarla kolayca hidrolizlenip bu amino asitlere dönebilir. Sistein ise kolaylıkla, kovalent bağlı dimerik bir amino asit olan sistine oksitlenir. Sistin iki sistein molekülünün veya kalıntısının disülfit bağıyla bağlanmış halidir.

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.

Negatif Yüklü (Asidik) R Grupları

İkinci karboksil (-COOH) grubuna sahip aspartat ve glutamat pH 7.0’ de net negatif yüke sahip R grubu içeren iki amino asittir.



Şekil 4. Amino asitlerin R gruplarının özelliklerine göre sınıflandırılması (47)

Protein sentezinden sonra değişikliğe uğramış (modifiye) proteinlerdeki amino asitler ve protein yapısına katılmayan ama canlı organizmalarda bulunan bir çok amino asitten ayırt etmek için, protein yapısındaki amino asitler standart (primer veya doğal) amino asitler şeklinde adlandırılmaktadır (Tablo 5) (46,48).

Organizmada bulunan dinamik amino asit havuzuna, amino asitlerin katılımı üç yolla sağlanmaktadır. Bu katılım; besinlerle protein alınımı, vücut proteinlerinin yıkımı 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 de eksojen (esansiyel) amino asitler denilmektedir (45).

Esansiyel amino asitler: Vücutta sentezlenemezler, dışarıdan alınmaları zorunludur. Valin, lösin, izolösin, treonin, metiyonin, fenilalanin, triptofan, lizin ve gelişmekte olan canlılarda arjinin ile histidin esansiyel amino asitlerdir.

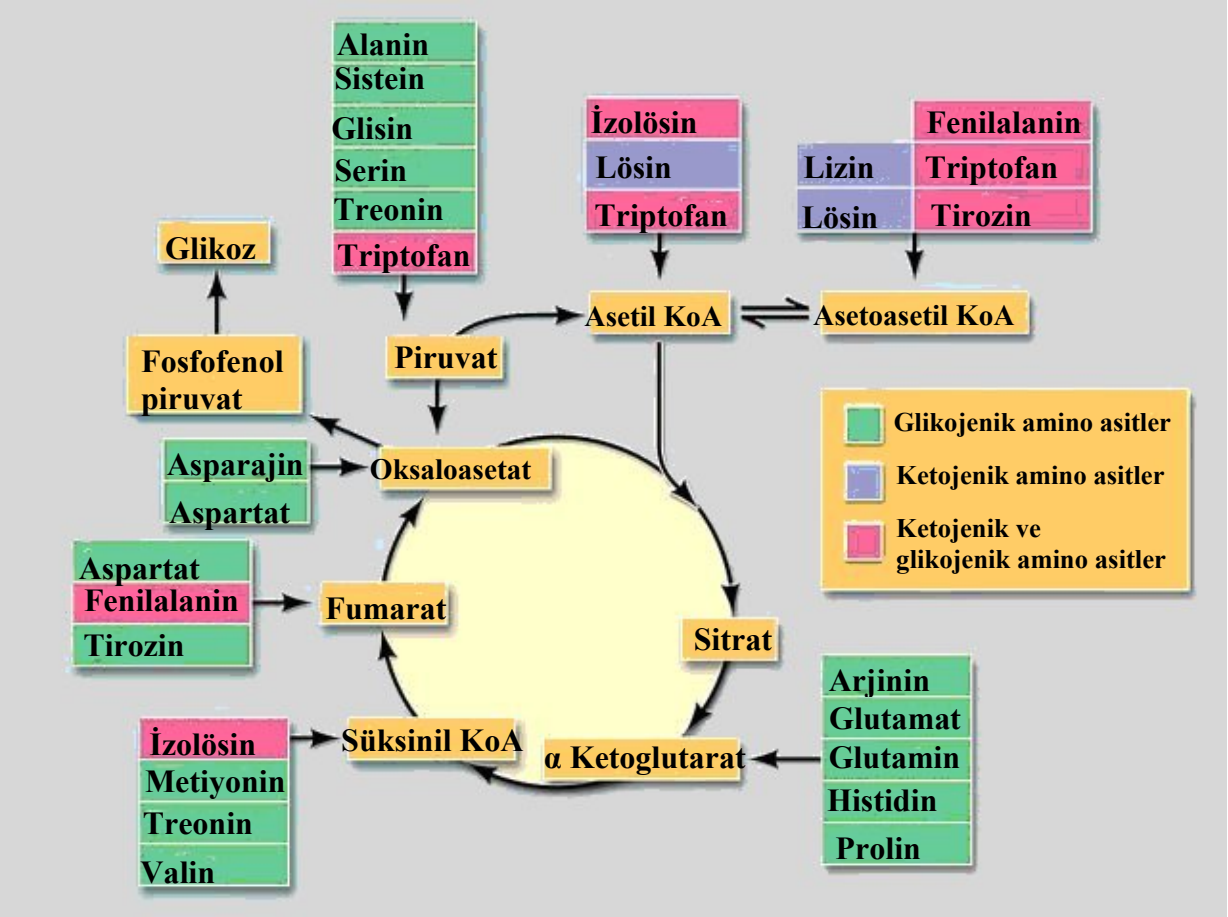
Tablo 5. Standart amino asitler (48)

Amino asit	Kısaltma		Amino asit	Kısaltma	
Glisin	Gly	G	Treonin	Thr	T
Alanin	Ala	A	Sistein	Cys	C
Valin	Val	V	Metiyonin	Met	M
Lösin	Leu	L	Asparajin	Asn	N
İzolösin	Ile	I	Glutamin	Gln	Q
Prolin	Pro	P	Aspartat	Asp	D
Fenilalanin	Phe	F	Glutamat	Glu	E
Tirozin	Tyr	Y	Lizin	Lys	K
Triptofan	Trp	W	Arjinin	Arg	R
Serin	Ser	S	Histidin	His	H

Esansiyel olmayan amino asitler: Vücutta glikoliz ve sitrat döngüsündeki ara ürünlerden sentezlenebilirler. Glisin, alanin, serin, sistein, prolin, tirozin, glutamat, glutamin, aspartat, asparajin ve erişkinlerde arjinin ile histidin esansiyel olmayan amino asitlerdir (26).

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, aspartat, tirozin, asparagin, glutamat, 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, tirozin hem ketojenik hem de glikojenik karakterli amino asitlerdir (Şekil 5) (45,46,49).

Proteinler, 20 standart amino aside ilaveten, polipeptitlerde yer alan ve standart amino asit kalıntılarının modifikasyonuyla oluşan standart dışı kalıntılar da içerebilir. Standart dışı amino asitlerden; 4-hidroksiprolin prolinin, 5- hidroksilizin ise lizinin türevidir. 4-hidroksiprolin bitki hücre duvarı proteinlerinde ve her ikisi de bağ dokunun fibröz proteini olan kollajende bulunurlar. 6-N-metilizin kas dokusunun kontraktil proteini olan miyozinin yapısal bir elemanıdır. Bir diğer önemli standart dışı amino asit γ- karboksiglutamattır ve pıhtılaşma proteinlerinde protrombinde ve biyolojik işlevi Ca^{+2} bağlamak olan diğer bazı proteinlerde bulunur. Selenosistein özel bir yapıdır. Bu nadir görülen amino asit kalıntısı, protein sentezi sonrası modifikasyonla değil, sentez sırasında oluşur. Sisteinin sülfürü yerine selenyum içerir. Aslında serinden türetilir ve bilinen çok az sayıda protein selenosistein içerir (45).



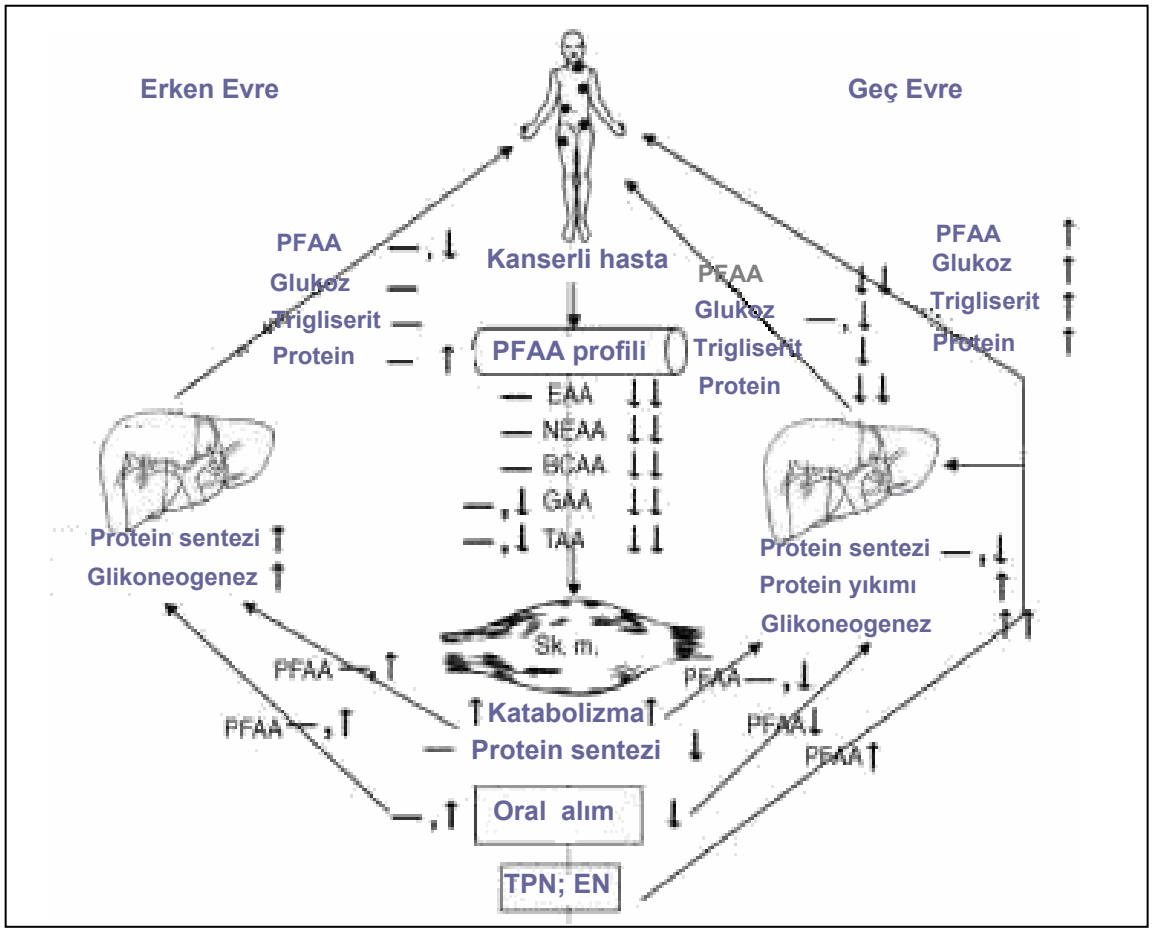
Şekil 5. Amino asitlerin diğer katabolik yollarla ilişkisi (49)

KANSER VE PROTEİN METABOLİZMASI

Kanser hastalarının metabolizmalarında ciddi değişiklikler görülmektedir. Protein metabolizmasında meydana gelen değişiklikler amino asit profilini etkilemektedir. Kanserli hastalarda plazma serbest amino asit düzeyinin sıklıkla düştüğü gözlenmiştir (50). Bu durumun, tümörün varlığının bir sonucu olarak artmış amino asit kullanımı ve malnütrisyonla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Kanserli hastalarda protein metabolik yakıtın ana deposudur ve tümör büyümesi süresince ciddi olarak tüketilmektedir (50,51).

Kanserli hastaların protein metabolizmasında oluşan değişiklikler şöyle sıralanabilir: Ana bozukluk, azalmış alıma karşılık büyüyen tümörün, konakçının iskelet kas sistemini kaynak olarak kullanmasıdır. Konakçının protein yıkımı artar, sentezi azalır, iskelet sistemi erir. Vücut protein devri artar. Karaciğer protein sentez hızı artar. Kas protein yıkım hızı artar (Şekil 6). Tümördeki büyüme, konakçı organizmasındaki nitrojen kaybıyla paraleldir. Tümör bir nitrojen alıcısıdır. Protein metabolizmasındaki değişikliklerin ciddiyeti, konak kaşektik cevabının büyüklüğüne bağımlıdır (52). Kaşektik cevabın büyüklüğü de, kanserin tipine ve

evresine bağımlı olarak değişmektedir. Klinik belirtiler iskelet kası atrofisi, miyopati, visseral organ atrofisini içermektedir. Kaşektik kanser hastalarında protein yıkım oranı artar ve bu hastalar açlık sırasında metabolik uyumu gösteremezler. İskelet kası katabolizması olan kanser hastaları, iskelet kası proteinlerini korumayı başaramazlar ve bol miktarda nitrojeni üre şeklinde kaybederler. İskelet kasında protein bozulması, idrarda 3-metilhistidin atılımını artırır. Kas yıkımından üretilen alanin ve glutamin daha sonra hepatik glukoneogenez de kullanılmakta bu durum kanser hastaları için ağır yük oluşturmaktadır (50,53).



Şekil 6. Kanserli hastada meydana gelen metabolizma değişiklikleri (50); TPN: Total parenteral nütrisyon; EN: Enteral nütrisyon; PFAA: Plazma free (serbest) amino asit düzeyi; BCAA: Branched (dallı zincirli) amino asitler; EAA: Esansiyel amino asitler; NEAA: Non-esansiyel amino asitler; GAA: Glukojenik amino asitler; TAA: Total amino asit.

KANSER VE AMİNO ASİTLER

Farklı kanser tipli hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda kanser hastalarının plazma serbest amino asit profillerinde önemli değişiklikler saptanmıştır. Tablo 6'da 13 farklı çalışmada, kanserli hastaların amino asit düzeyleri özetlenmiştir. Bu çalışmalarda kanser hastalarının plazma serbest amino asit profillerinde anormallikler olduğu gözlenmiştir (50).

Tümör gelişimi hayvanlarda ve insanlarda konakçı metabolizmasında büyük değişiklerle ilişkilidir (11). Tümörler kendini konakçı metabolizmanın kaynaklarıyla besleyen parazitler olarak düşünülebilir. Bu durum konakçıyı kaşeksiye götüren ciddi kilo kaybıyla sonuçlanır (51-53). Kaşeksinin ana özelliği kilo kaybıdır. Azalmış yiyecek alımı, artmış enerji tüketimi ve farklı metabolik anormalliklerin sonucu olarak görülmektedir. Kanser kaşeksisinde, konakçının protein kütlesinde ciddi kayıplar olmaktadır. Kas kütlesindeki azalmalar toplam vücut ağırlığının yaklaşık %75'ini bulabilmektedir (54,55).

Ciddi kaşeksinin varlığı tümör büyüklüğüyle orantılıdır. Kilo kaybı, akciğer kanseri ve üst gastrointestinal kanserlerde daha sık, meme kanseri ve alt gastrointestinal kanserlerde daha nadir görülmektedir (55,56). Malign tümör varlığında genellikle negatif azot dengesi (57,58), artmış glukoneogenez (59-62), azalmış kas protein sentezi (63,64), artmış kas protein yıkımı (64) gibi metabolik değişiklikler gerçekleşmektedir. Sonuç olarak protein döngüsü tümör gelişimi sırasında artar (65-67).

Plazma amino asitlerinin düzeyleri, vücuttaki amino asitlerin akışını etkileyen tüm faktörlerin net etkisini göstermektedir (68,69). Tümör varlığında meydana gelen değişikliklerin, bu hastaların plazmalarındaki amino asitler tarafından yansıtılıyor olabileceği düşünülmektedir (70,71). Dolayısı ile plazma amino asit profilinin, kanser protein metabolizmasının değişimi için bir marker olarak rolü olabileceğine dair çeşitli araştırmalar yapılmıştır (11,12,72-74).

Norton ve ark.'nın (13) çeşitli kanser hastaları plazmalarında yaptıkları amino asit analizi çalışmalarında; minimal düzeyde veya hiç kilo kaybı olmayan sarkoma, osteosarkoma ve lenfoma hastalarında prolin düzeyleri; lenfoma ve metastatik sarkoma hastalarında ise histidin ve arginin düzeyleri kontrollere göre düşük bulundu. En fazla kilo kaybına neden olan özefagial karsinomalı hastalarda, total amino asit düzeylerinde düşme gözlenmiştir.

Watanabe ve ark. (14) ise, tümör dokusu amino asit içeriğinin özellikle HCC'li hastalarda tümörlü olmayan dokuya göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. HCC'de metiyonin, tirozin ve fenilalanin düzeyleri, sirozlu ve normal karaciğer dokularına göre daha yüksek bulunmuştur.

Lee ve ark. (73) 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, hepatosellüler karsinomalı (HCC) ve sirozu olan geç dönem kolorektal kanser hastalarında esansiyel ve non-esansiyel amino asitlerin çoğunun plazma düzeylerinde daha belirgin bir azalma olduğunu bildirmişlerdir.

Tablo 6. Malign tümörlü hastalarda plazma serbest amino asit düzeyleri (50)

Ilk isim	Yıl	Hastalık grupları	*n*	Azalanlar	Artanlar	Yorumlar
Clarke	1978	Kilo kaybettiren Ca	11	Ala, Gly, Thr		Kilo kaybı >20%
		Kilo kaybettirmeyen Ca	7	-	Ala, Ile, Lvs	
Ching	1984	Ca (kemoterapi)	15	Ala, Gly, Leu, Met, Pro, Ser, Thr		
		Baş/boyun Ca	13	Gly, Thr	-	
Bennegard	1984	Kilo kaybettiren Ca	18	Ala, Cit, Glu/Gln, His, Pro,	Phe	Kilo kaybı >7%
Watanabe	1984	HCC (siroz)	14	Ala, Arg, Gln, Leu, Lys, Ser, Tau, Val	Tyr	DZAA/AAA ↓, TAA↓
Norton	1985	Özefagus Ca	6	Ala, Arg, Asp/Asn, Glu/Gln, Cly, His; Lys, Phe, Pro; Ser	-	Kilo kaybı 22
		Lemfoma	11	Arg, His, Pro	-	Kilo kaybı 4%
		Metastatik Sa	21	Arg, His	-	Kilo kaybı 10%
		Osteosarkoma	8	Pro	-	
		Yumuşak doku Sa	9	Pro	-	
Naini	1988	Özefagus Ca	11	Trp	-	
		Akciğer Ca	8	Ala, Arg, Trp	-	
Yamanaka	1990	Mide Ca	63	Arg, Asn, Cys, His, Leu, Lys, Thr, Trp, Val		DZAA ↓, TAA ↓
Kubota	1992	Meme Ca	22	Cys, Gln	Ala, Arg, Thr	AAA↑, DZAA↑, EAA↑, GAA↑, TAA↑
		Gastrointestinal Ca	15 (e)	Gln, His	-	AAA↑, DZAA↓, GAA↑
			9(k)	-	Ala	GAA↑
		Baş/boyun Ca	6(e)	His	-	
			9(k)	-	Orn	
Cascino	1995	Meme Ca	33	_	Glu, Orn,	
		Akciğer Ca	41	Gly, Ser, Thr	Glu, Trp	GAA↓
Georgiannos	1995	Kolorektal Ca, meme Ca				
		Kilo kaybı olanlarda	17	Ala, Arg, Asp, Ile, Leu, Val	-	
		Kilo kaybı olmayanlarda	8	His	Glu, Thr	
Pearlstone	1995	Özefagus Ca	18	Ala, Arg, His, Lys, Pro, Thr, Tyr	-	NEAA↓, TAA↓
Lee	2003	Kolorektal Ca	32	Ala, Met, Phe,	-	AAA↓, DZAA↓, EAA↓, TAA↓
		HCC (siroz)	10	Ala, Cys, His	-	AAA↓, DZAA↓, EAA↓,
Proenza	2003	Meme Ca	16	Asp	Asn, Gln, Pro	Hidroksiprolin
		Akciğer Ca	14	-	Orn	Kanda Pro↓ , Val ↓, EAA↓, NEAA↓

AAA: Aromatik amino acid; A-V: Arterio-venöz; DZAA: Dallı zincirli amino asit; Ca: Kanser; EAA: esansiyel amino asit; GAA: Glukojenik amino asit; HCC: Hepatoselüler kanser; *n: Vaka sayısı*; e: Erkek; k: Kadın; NEAA: Non-esansiyel amino asit; Sa: Sarkoma; TAA: Total amino asit; Gly: Glisin; Ala: Alanin; Val: Valin; Leu: Lösin; Pro: Prolin; Tyr: Tirozin; Trp: Triptofan; Ser: Serin; Thr: Treonin; Cys: Sistein; Met: Metiyonin; Asn: Asparajin; Gln: Glutamin; Asp: Aspartat; Lys: Lizin; Arg: Arjinin; His: Histidin.

Cascino ve ark. (75) akciğer kanserli hastaların plazma glukojenik amino asitlerinde, treonin, serin ve glisin miktarlarında belirgin azalma, serbest triptofan ve glutamat düzeylerinde ise belirgin bir artma olduğunu bildirmişlerdir.

Muscaritoli ve ark. (76) akut miyeloid lösemili hastaların plazmalarında glutamat, glisin, ornitin ve serbest triptofan düzeylerinin yüksek, taurin, serin ve metiyonin düzeylerinin düşük olduğunu, dallı zincirli ve aromatik amino asitlerle total triptofan düzeylerinde kontrollere göre fark olmadığını bildirmişlerdir.

Wang ve Permert (77) pankreas kanseri hücre kültürlerinde yaptıkları çalışmalarda, farklı insan pankreatik kanser hücrelerinin, amino asit profilinde benzer değişikliklere neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu değişiklikler standart amino asitlerde artma, azalma veya normal hücre kültüründe bulunmayan amino asitlerin var olması şeklindedir. Kültür ortamlarının tümünde glutamin ve sistein miktarında azalma varken, alanin miktarı artmıştır.

Clarke ve ark. (78) anoreksi ve kilo kaybı olan ve kilosunu kararlı şekilde koruyan kanserli hastalarda plazma serbest amino asit düzeylerini incelemişler ve anoreksi ve kilo kaybı olan kanserli hastalarda ciddi derecede glisin, alanin, treonin düzeylerinin düştüğünü, kilosunu kararlı şekilde koruyan kanserli hastalarda ise izolösin, lizin ve alanin düzeylerinin önemli miktarda arttığını göstermişlerdir.

Ching ve ark. (79) baş-boyun kanserli hastaların ve kemoterapi alan kanser hastalarının plazma serbest amino asit düzeylerini incelemişlerdir. Baş-boyun kanserli hastalarda glisin ve treonin amino asitlerinin önemli derecede düştüğü gözlenirken, kemoterapi alan kanser hastalarında 8 amino asidin (lösin, metiyonin, treonin, valin, alanin, glisin, prolin, serin) önemli düzeyde düştüğünü gözlemişlerdir.

Bennegard ve ark. (80) %7'den fazla kilo kaybı olan 18 kanserli hastayı inceleyen araştırmalarında alanin, sitrüllin, glutamat/glutamin, histidin, prolin, serin, treonin düzeylerinde önemli oranda düşme, fenilalanin düzeyinde ise anlamlı bir artma saptamışlardır.

Naini ve ark. (81) özefagial ve akciğer kanserli hastaların plazma proteinlerini ve plazma serbest amino asit düzeylerini incelemişler ve özefagial kanserli hastalarda plazma protein ve plazma serbest amino asit düzeyinin düştüğünü, fakat akciğer kanserli hastalarda düşme olmadığını göstermişlerdir.

Yamanaka ve ark. (82) mide kanseri olan hastalar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, arginin, aspartat, sistin, histidin, lösin, lizin, treonin, triptofan, valin, dallı zincirli amino asit, total amino asit düzeylerinin önemli ölçüde düştüğünü göstermişlerdir.

Georgiannos ve ark. (83) gastrointestinal kanserli 25 hastanın (17 kilo kaybı olan ve 8 kilo kaybı olmayan) plazma serbest amino asit düzeylerini incelemişler ve kilo kaybı olanlarda olmayanlara göre alanin, arjinin, aspartat, izolösin, lösin ve valin düzeylerini önemli derecede düşük bulmuşlardır. Kilo kaybı olmayan kanserli hastalarda histidin düzeyi düşük, glutamat ve treonin düzeyi yüksek bulunmuştur.

Pearlstone ve ark. (84) kilo kaybı olan 18 özefagial kanserli hastayı incelemişler ve alanin, arjinin, aspartat/asparajin, sitrülin, glutamin, histidin, lizin, prolin, treonin, trozin, nonesansiyel amino asit ve total amino asit düzeylerinin önemli ölçüde düştüğünü göstermişlerdir.

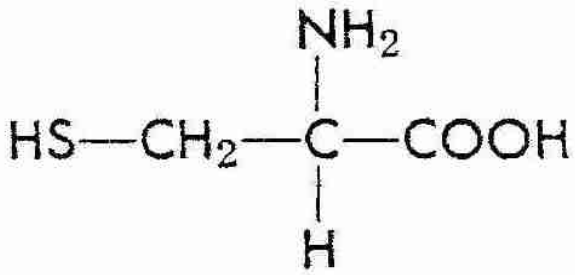
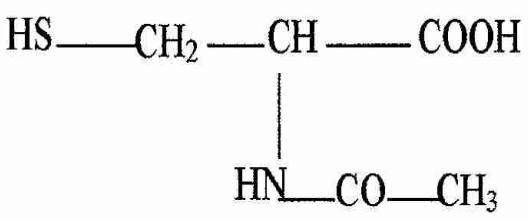
Meme kanseri ile ilgili de çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Meme, gastrointestinel sistem ve baş-boyun kanseri olan hastaların amino asit düzeylerini analiz eden diğer bir çalışmada, meme kanseri olan hastalarda alanin, arjinin, treonin düzeyleri yüksek, sistein ve glisin düzeyleri düşük bulunmuştur. Bu üç malign hastalıkta dolaşımdaki amino asit düzeylerinin, malign organ bölgesinin teşhisi ile ilişkili olduğu görülmüştür (12). 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 (12,19).

Cascino ve ark. (75) tarafından yapılan başka bir çalışmada, meme kanseri hastalarının plazmalarında ornitin, glutamat ve triptofanın önemli düzeyde yükselmiş olduğu bulunmuştur.

Proenza ve ark. (85) akciğer kanserli hastalarda, esansiyel amino asit düzeylerini araştırdıklarında, valin ve total esansiyel amino asitlerin plazma düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı düzeyde düşük olduğunu, kanserli hastalarda esansiyel olmayan amino asitlerden ise 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. Yine bu çalışma, meme kanseri olan hastalar sağlıklı bireylerle karşılaştırılmış, hastaların plazmalarında valin ve glutamat miktarının düşük, asparajin miktarının ise yüksek olması dışında bir fark bulunmamıştır.

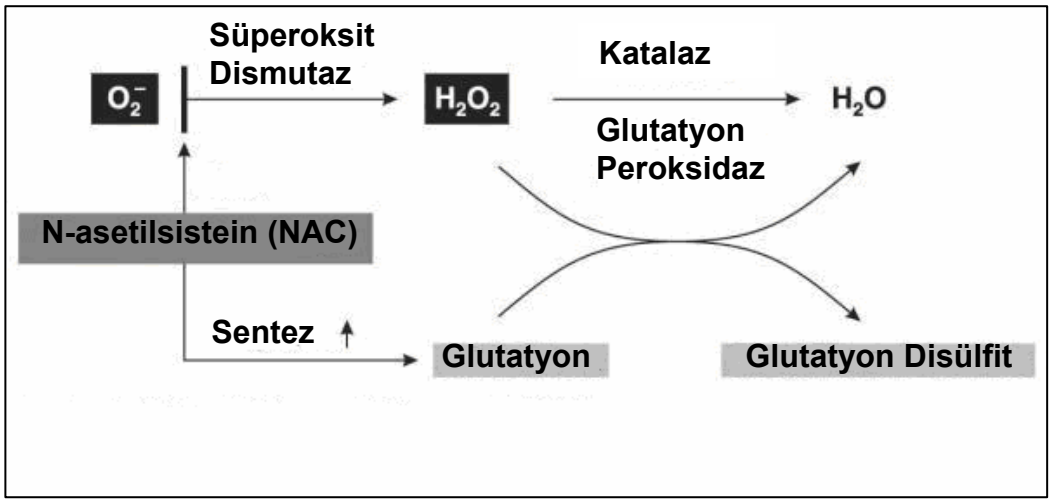
N-ASETİLSİSTEİN

N-asetilsistein, L-Sistein'in asetile edilmiş bir varyantıdır ve sülfhidril (-SH) gruplarının mükemmel bir kaynağıdır (Şekil 7) (86). Tiyol içeren bir antioksidandır (22).

Sistein	N-Asetilsistein (NAC)
	

Şekil 7. Sistein ve N-asetilsisteinin yapısal formülü (86)

Vücutta redükte glutatyon (GSH) sentezini stimüle edebilecek metabolitlere çevrilir. Böylece detoksifikasyonu başlatır ve doğrudan serbest radikal scavenger olarak davranır (22). İlk olarak mukolitik bir ajan olarak kullanılmıştır. NAC hücre membranını geçip hücre içinde sisteine dönerek GSH üretimini arttırır (Şekil 8) (87,88).



Şekil 8. N-asetilsisteinin glutatyon üzerine etkisi (87)

Redükte glutatyonun fizyolojik öncüsü olan sisteinin, kimyasal mutajenler ve radyasyona karşı koruyucu özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak, hem hızlı metabolizması hem de zehirli oluşundan dolayı insanlara uygulanması doğru bulunmamaktadır (89).

N-asetilsistein, mükemmel bir -SH grubu kaynağıdır. -SH grubu intrasellüler sistein ve GSH öncülüdür. NAC; hücre içine sistin girişini artırarak ve glutatyon sentetaz'ı stimüle ederek GSH sentezini artırır. GSH; sistein, glutamat ve glisinden oluşan bir tripeptittir. GSH oksidan streslerden, DNA hasarı verecek ajanlardan ve karsinojenlerden (hem endojen hem de eksojen) ortaya çıkan etkilerden vücudu korumaktadır. GSH; protein sentezi ve yıkımı, hücre

içine amino asit transportu, proteinlerdeki -SH gruplarının korunması, tiol disülfit (SH-SS) etkileşimi, hidroperoksitlerin oksidasyonu, enzimlerin aktivitesi, ksenobiyotiklerin (bazı karsinojenler gibi) konjugasyonu ve idrarla atılımını sağlamaktadır (90). Bununla birlikte büyük GSH molekülü hücre içine geçemez. NAC; redoks durumunu ve GSH deplesyonunu değiştirdiği için birçok hastalıkta kullanım izni almıştır. Bunlardan bazıları; asetaminofen toksisitesi, epilepsi, ağır metal zehirlenmeleri, HIV infeksiyonu ve sjögren sendromudur (22).

KANSER VE N-ASETİLSİSTEİN

N-asetilsisteinin antigenotoksik ve antikarsinojenik özellikleri birçok deneysel modelde test edilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, NAC'ın karsinojenik sürecin farklı basamaklarının düzenlenmesini sağlamada etkili olduğunu göstermiştir. Fakat NAC için asıl vurgulanan, antioksidanların bir prototipi, apoptozis modülatörü ve sinyal iletimi regülatörü olduğudur (21).

Meme kanseri üzerinde yapılan bir çalışmada NAC tedavisinin tümör volümünü küçülttüğü, aksiller lenf nodu metastazını ve akciğer metastazını azalttığı, tümör hücrelerinde apoptozisi artırdığı, VEGF inhibisyonu yaparak tümör yayılımını azalttığı gösterilmiştir (21). Ayrıca NAC'ın c-fos/ c-jun ekspresyonunu sınırlandırma, STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) ve siklin inhibitörlerini içeren birçok yolla transkripsiyonel aktiviteleri değiştirdiği gösterilmiştir (91).

N-asetilsisteinin bir P53 tümör süpressör gen proteinidir ve onkogenezli hücre transformasyonunu baskılar. Antioksidanların uyardığı apoptozis, p53 genini gerektirir. NAC, intrasellüler tiyol düzeyini artırır ve P53 proteinini artırarak apoptozisi başlatır. NAC'ın tümör hücrelerinde apoptozisi başlatırken normal hücreleri etkilemediği gösterilmiştir (92,93). Ailesel meme kanseri olan kişilerde p53 gen mutasyonu görülmüştür (94).

N-asetilsisteinin kolorektal kanser tedavisinde kullanılan 5-flourourasilin etkisini artırdığı da bulunmuştur (95). Selenyumdan zengin amino asitlerle birlikte NAC verilmiş ve bunun insan hepatoma hücrelerinde tümör büyümesine inhibitör etki oluşturduğu görülmüştür (96). Deneysel kaposi sarkom modellerinde NAC'ın bir antitümörojenik ajan olduğu ve tümör metastazını VEGF ekspresyonunu azaltarak inhibe ettiği gösterilmiştir (21). 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 engellediği ileri sürülmüştür (97). NAC'ın tümör hücrelerinde DNA sentezinin inhibisyonunu sağladığı, insan

mesane kanserinde preprogelinaz (MMP-2)'ın, aktif formu progelinaza dönüşmesini ve enzim aktivitesini inhibe ederek epitel hücrelerinin karsinogenez, invasyon ve metastazını önlediği gösterilmiştir (98). NAC, malign melanoma hücrelerinin NF-$_k$B (Nuclear Factor-$_k$B)'nin sürekli aktif olmasına bağlı hayatta kalımını engellemektedir. İlerlemiş kanserli hastaların periferik kandaki mononüklear hücrelerinde NAC, CD25 ve CD95 ekspresyonunu artırarak hürelerin normal fonksiyonlarını göstermelerini sağladığı saptanmıştır (21).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma; lokal etik kurul onayı alındıktan (Ek 1) sonra Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Deneklerin Özellikleri ve Çalışma Gruplarına Ayrılması

Çalışmada toplam 30 adet, 8–10 haftalık (25–30 g), erkek Balb/c albino fare kullanılmıştır. Bu fareler Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarından temin edildi. Denekler rastgele seçilerek, 10'ar fareden oluşan üç grup oluşturuldu. Tüm fareler deneyin sonuna kadar ayrı kafeslerde, %50-60 nem oranı, 22±1 °C ısıda, 12 saat gece-12 saat gündüz ışık periyodu olan ortamda tutuldu. Üç gruba da standart fare yemi günlük olarak verildi. NAC tedavi grubunda 11. günde ölen fare çalışma dışı bırakılmıştı.

Meme kanseri oluşturulacak olan grup 2 ve 3'deki farelerin sol ayak iç bölgesine 0.2 ml Erhlich asit tümör hücresi enjekte edildi. 9. günde tümör çapı yaklaşık olarak 1cm olduğunda gruplara NAC veya serum fizyolojik intraperitoneal olarak verilmeye başlandı.

1. Grup (n=10): 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=10): Meme kanseri 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.

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

Deney hayvanlarından intrakardiyak kan alındı ve kanser dokusu çıkarıldı. Sakrifikasyon öncesi; ksilazin (10 mg/kg), ketamin (60 mg/kg) IM olarak anestezi amaçlı verildi. Alınan kanların plazmaları ayrıldı ve -80 °C'de deneyin yapılacağı güne kadar

saklandı. Daha sonra meme tümör dokuları çıkarıldı ve % 0.9'luk soğuk serum fizyolojik ile yıkanıp -80 °C'de deneyin yapılacağı güne kadar saklandı.

Patolojik değerlendirme için tümör dokusu alınıp % 10'luk formole konulup Patoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarına ulaştırıldı. Bir gecelik % 10'luk formaldehit fiksasyonu ve 16 saatlik alkol takibi sonrası parafin bloklama ve bloklardan elde edilen 5µ kalınlığında kesitler hazırlanıp hematoksilen-eozin ile boyandı.

Plazma ve Doku Amino Asit Tayini

Plazma ve doku örneklerinde amino asit düzeyleri yüksek basınç likit kromotografisi (HPLC) kullanılarak tayin edildi.

Amino asit tayininde Waters (Waters, Co., USA) tarafından geliştirilen Pico TAG metodu kullanıldı. Pico TAG metodu, örneğin kolon öncesi derivatizasyonu ve "reverse" faz HPLC basamaklarından oluşmaktadır. 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.

Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Amino asit standart solusyonu	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seinheim, Almanya)
Asetonitril	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
Bakır sülfat	(Merck KgaA, Darmstadt-Almanya)
Disodyum hidrojen fosfat	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
Distile su	(Milli-Q, USA)
Fenilizotiyosiyanat	(PITC; Pierce Biotechnology Inc., Rockford, USA)
Folin ayıracı	(Merck KgaA, Darmstadt-Almanya)
Fosforik asit	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
Glasiyel asetik asit	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
Hidroklorik asit	(HCl; Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
Metanol	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
Metiyonin sülfon	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seinheim, Almanya)
N-asetil sistein (Asist)	(Hüsnü Arsan ilaçları)
Perklorik asit	(PCA; Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
Potasyum fosfat monobazik	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
Potasyum hidroksit	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)

Sodyum asetat trihidrat	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seinheim, Almanya)
Sodyum fosfat dibazik	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
Sodyum karbonat	(Merck KgaA, Darmstadt-Almanya)
Sodyum-potasyum tartarat	(Pancreac Madrid-İspanya)
Trietilamin	(TEA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seinheim, Almanya)

Alet ve Malzemeler

Cam malzemeler	: Deney tüpleri, balon jojeler, beherler v.b.	
Distile su cihazı	: Nüve	(Almanya)
Elektronik tartı	: Sartorius	(Sartorius AG, Götting-Almanya)
Etüv	: Memmert 400	(GmbH + Co KG, Schwabach-Almanya)
Guard kolon	: Waters 3.9x20 mm	(Milford)
Homojenizatör	: DIAX 900	(Heidolp-Almanya)
HPLC cihazı	: Waters 2690 Alliance, Seperations Module	(Milford)
Manyetik karıştırıcı	: Ikamag RH	(Janke&Kunkel GmbH&CO, Almanya)
Otomatik pipetler	: Finnpipette, Eppendorf	
pH metre	: pH level 1	(Inolab WTW, Weilheim-Almanya)
Pico Tag serbest amino asit C_{18} kolonu	: Waters, 3.9x300 mm	(Milford)
Soğutmalı santrifüj	: Universal 30 RF	(Hettich Zentifuge, Tuttlingen-Almanya)
Su banyosu	: GFL 1083	(Almanya)
Ultrafiltreli ependorf (Pico Tag ultrafiltration device): Waters		(Milford)
UV detektör	: Waters 2487 dual λ absorbance detector	(Milford)
Vorteks	: Elektro-mag M-16	(Türkiye)

Amino asit standart solüsyonu: Alanin, arjinin, asparajin, aspartat, β-alanin, fenilalanin, glisin, glutamat, hidroksiprolin, histidin, izolösin, lizinden, lösin, metiyonin, ornitin, prolin, serin, sistein, sitrulin, taurin, tirozin, treonin, triptofan, valinden oluşmaktadır.

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: 1 M sodyum asetat: TEA'nın 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.

Plazma Örneklerinin HPLC İçin Hazırlanması ve Çalışılması

Çalışmaya başlamadan önce plazma örnekleri -80°C'den çıkarılarak oda ısısında çözdürüldü. Por çapı 0.45 µm olan ultrafiltreli ependorf içine aktarılan numune 30 dakika süreyle, dik açılı santrifüjde, 1000g'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 kurutuldu. Kurutulan numune üzerine 10 µl redrying solüsyonu eklenerek vortekslendi ve kurutuldu. Üzerine 20 µl derivatizasyon solüsyonu eklendi. Oda ısısında 20 dakika bekletilmek suretiyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrası numuneler tekrar kurutuldu. Derivatize edilen numuneler 100 µl Pico tag numune dilüenti ile dilüe edildi ve HPLC'de analiz için hazır duruma getirildi.

Doku Örneklerinin Homojenizasyonu, HPLC İçin Hazırlanması ve Çalışılması

Amino asit düzeyi ölçümünden hemen önce derin dondurucudan çıkarılan meme tümör dokularının homojenizasyonunda fosfat tamponu kullanıldı. Dokular otomatik homojenizatör kullanılarak ağırlıklarının 5 katı soğuk 0.1 M fosfat tamponu (pH:7) ile homojenize edildi. Doku homojenizatları üzerine %7 perklorik asit (3 ml/g doku) eklendi ve vortekslenip 4°C'de 1 saat bekletildi. Daha sonra 4000g'de (4°C) santrifüj edildi. Süpernatant alınarak 3 M potasyum hidroksit ile pH'sı 8.5-9.5'a getirildikten sonra por çapı 0,45 µm olan ultrafiltreli ependorf içine aktarıldı. 30 dakika süreyle, dik açılı santrifüjde, 1000g'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 kurutuldu. Kurutulan numune üzerine 10 µl "redrying" solüsyonu eklenerek vortekslendi ve tekrar kurutuldu. Üzerine 20 µl derivatizasyon solüsyonu eklendi. Oda ısısında 20 dakika

bekletilmek suretiyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrası numuneler tekrar 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 amino asit standart solüsyonu kullanıldı.

Kromatografik ayrıştırmanın yapılmasında HPLC cihazı kullanıldı. Analizler UV detektör kullanılarak, 254 nm dalga boyunda yapıldı. Guard HPLC kolonu takılan, Pico Tag serbest amino asit C_{18} kolonu kullanıldı ve kolon ısısı 46°C'ye ayarlandı. Numune kabini ısısı +4°C, solventlerin akış hızı 1 ml/dk, sistem basıncı 1600-1700 psi ve injeksiyon volümü 10 µl olarak uygulandı. Derivatize edilen amino asitler aşağıdaki mobil faz gradient programı kullanılarak ayrıştırıldı (Tablo 7).

Tablo 7. 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

A, B: Eluentlerin HPLC çin uygulanan % oranları.

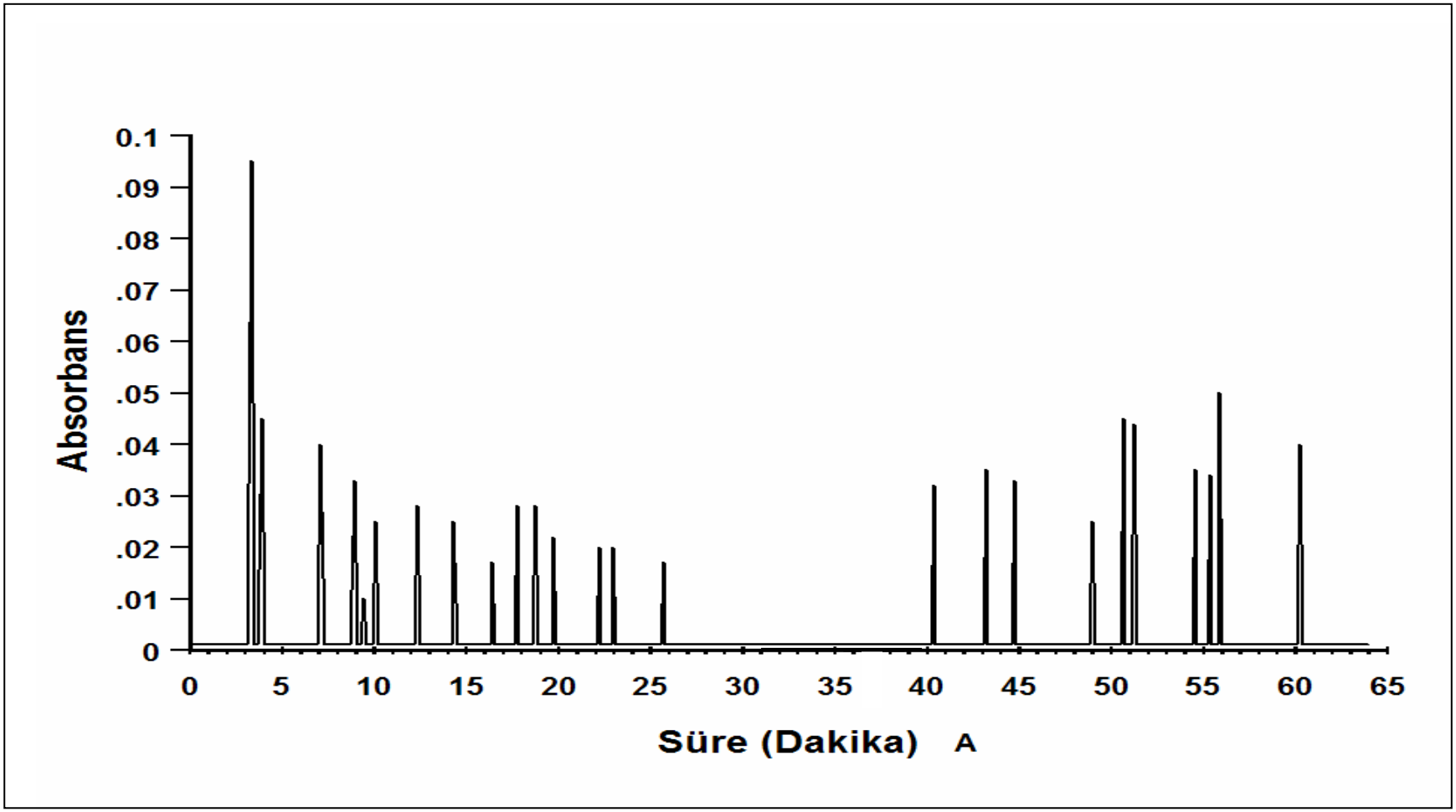
Plazma amino asit miktarları, numunelerden elde edilen HPLC kromatogramındaki pik alanlarının amino asit standart pik alanları ile karşılaştırılması sonucu hesaplandı ve µmol/L olarak ifade edildi (Tablo 8) (Şekil 9).

Doku amino asit miktarları, numunelerden elde edilen HPLC kromatogramındaki pik alanlarının amino asit standart pik alanları ile karşılaştırılması sonucu hesaplandı ve dokuda total protein miktarı ile oranlanarak µmol/mg protein olarak ifade edildi.

Tablo 8. Waters Pico Tag Amino asit kolonundan standart ve örneklere ait aminoasitlerin çıkış zamanları

Amino Asit	HPLC Kromotogramında Çıkış Zamanı (dk)
Aspartik Asit	3.35
Glutamik Asit	3.91
Hidroksiprolin	7.07
Serin	8.95
Aspargin	9.44
Glisin	10.08
β-alanin	12.33
Taurin	14.33
Histidin	16.43
Sitrüllin	17.78
Treonin	18.79
Alanin	19.73
Arginin	22.22
Internal Standart (IS)	23
Prolin	25.71
Tirozin	40.35
Valin	43.21
Metiyonin	44.74
Sistein	48.98
Lösin	50.65
İzolösin	51.29
Fenilalanin	54.54
Triptofan	55.39
Ornitin	55.90
Lizin	60.26

HPLC: High performance liquid chromotography (yüksek performans likit kromotografisi)



Şekil 9. Amino asit kalibrasyon standartlarını gösteren HPLC kromatogramı (200 µmol/L): Standart ve örneklere ait aminoasitleri çıkış zamanları Tablo 8'de gösterilmiştir.

Total Protein Tayini

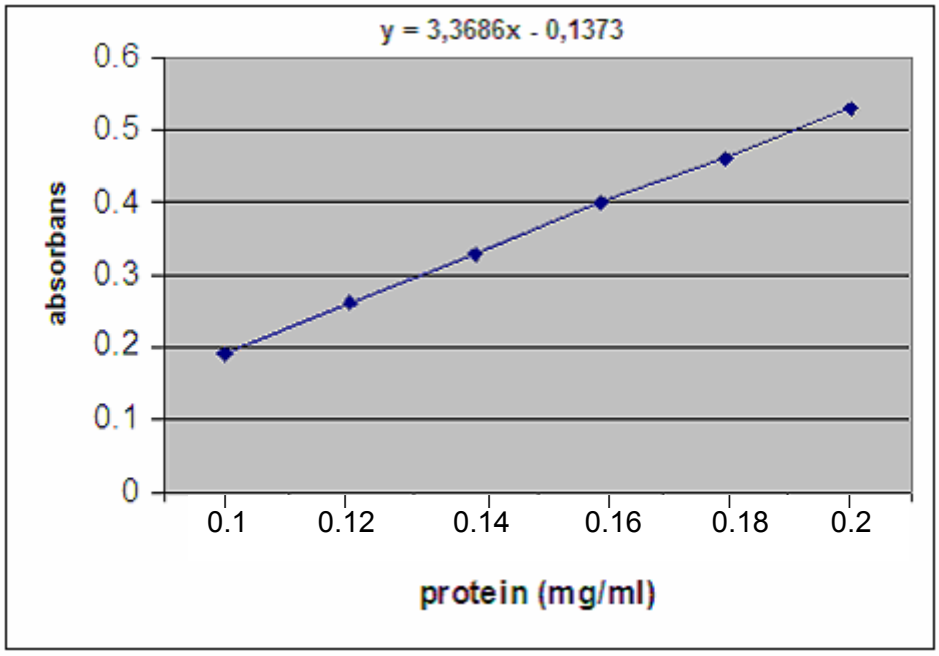
Prensip: Doku protein düzeyleri Lowry yöntemi ile saptandı (99). Alkali ortamda bakır iyonları peptid bağları ile kompleks oluşturur. Bakır-peptid kompleksleriyle Folin ayıracı reaksiyona girerek mavi-mor renk oluşur.

Alkalen bakır ayıracı: 10 gr Na_2CO_3, 0,25 gr Na-K tartarat, 0.05 gr $CuSO_4$, bir miktar 0.5 N NaOH içinde çözüldü ve çözelti 0.5 N NaOH ile 100 ml'ye tamamlandı.

Folin ayıracı: 2 N Folin ayıracı 1/18 oranında sulandırıldı ve deney öncesi taze hazırlandı.

Deney: Doku süpernatantları 1/10 oranında serum fizyolojik ile sulandırıldı. 20 µl homojenat üzerine 180 µl serum fizyolojik ve 200 µl alkalen bakır eklendi. İyice vortekslenip 10 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 800 µl sulandırılmış folin ayıracı eklendi. Örnekler 30 dakika sonra 660 nm dalga boyunda reaktif körüne karşı spektrofotometrede ölçüldü.

%5 mg'lık human albumin standart olarak kullanılarak, yoğunluk-absorbans grafiği çizildi (Şekil 10). Regresyon analizi ile saptanan formül kullanılarak örneklerdeki protein yoğunlukları hesaplandı.



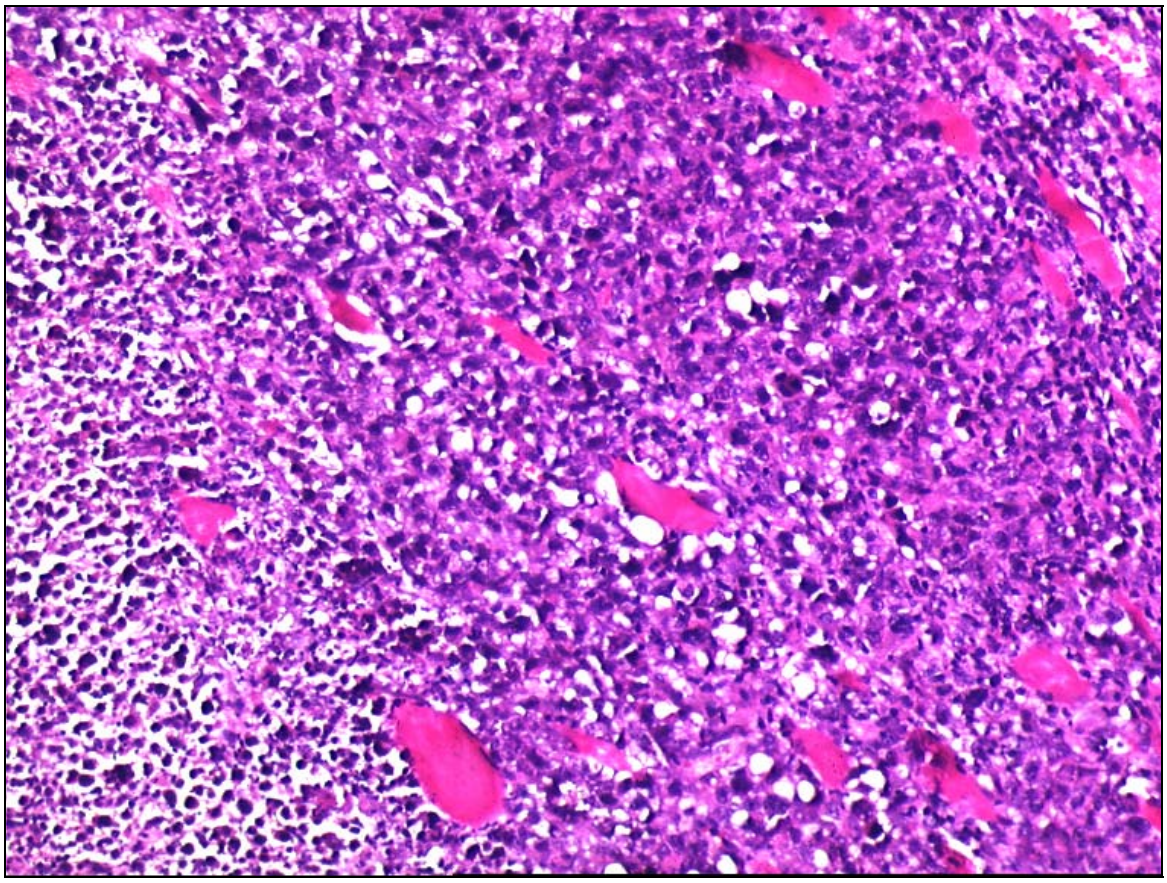
Şekil 10. Protein standart çalışması regresyon grafiği.

İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel analizler için WCP1331.00197 lisans numaralı Minitab Inc. Release 13.32 paket programı kullanıldı. Gruplar arasındaki olası farklılıklar non-parametrik olarak Mann-Whitney U testi kullanılarak analiz edildi. Elde edilen p değerleri 0.05'ten küçük olduğunda istatiksel olarak anlamlı kabul edildi. Her bir deney grubu için spesifik amino asit düzeyi ortalama±standart sapma (ort±SS) olarak ifade edildi.

BULGULAR

Grup 2 ve 3'de 19 farenin 19'unda da makroskobik olarak 0.5-1 cm çaplı kısmi nekrotik nitelikte tümöral odaklar içeren doku, histopatolojik yönden de incelendi ve az diferansiye invaziv duktal kanser gözlendi (Şekil 11).



Şekil 11. Meme kanseri dokusunun (Grup 2) histopatolojik görünümü (Hematoksilen-Eozin, x10).

Plazma ve tümör doku alanin, arjinin, asparajin, aspartat, β-alanin, fenilalanin, glisin, glutamat, hidroksiprolin, histidin, izolösin, lizin, lösin, metiyonin, ornitin, prolin, serin, sistein, sitrulin, taurin, tirozin, treonin, triptofan ve valin düzeyleri olmak üzere toplam 24 amino asit ve metaboliti analiz edildi. Her bir deney grubu için amino asit düzeyleri Tablo 9, 10'da gösterildi. Deneklerin her birinin plazma serbest amino asit düzeyleri Tablo 11-12'de gösterildi.

Tablo 9. Grupların plazma serbest amino asit düzeyleri (μmol/L)

	Grup 1; ort±SS; n=10	**Grup 2; ort±SS; n=10**	**Grup 3; ort±SS; n=9**
Alanin	226.27±37.80	306.39±80.53^{a**}	217.32±26.79^{b**}
Arginin	68.91±19.93	4.76±0.90^{a***}	9.39±10.26
Asparajin	93.85±12.91	132.64±24.78^{a***}	134.34±30.84
Aspartat	6.43±2.84	7.67±2.44	9.73±2.14
β-Alanin	337.58±32.97	454.71±64.51^{a***}	409.92±62.73
Fenilalanin	63.35±14.24	70.68±10.36	75.85±23.92
Glisin	120.73±19.57	124.67±28.93	135.77±34.14
Glutamat	38.02±20.33	32.26±8.29	34.99±9.07
H.prolin	11.96±1.35	18.58±5.55^{a***}	15.84±3.69
Histidin	28.41± 7.00	41.72±5.81^{a***}	38.87±7.23
İzolösin	84.03±14.88	132.88±27.91^{a***}	131.92±47.78
Lizin	168.13±19.55	246.18±40.86^{a***}	276.25±44.69
Lösin	106.83±41.34	169.02±42.41^{a*}	193.61±54.52
Metiyonin	38.67±7.15	41.07±11.51	39.13±7.43
Ornitin	64.43±11.10	111.25±20.65^{a***}	101.17±30.94
Prolin	55.99± 10.66	68.53±13.41^{a*}	74.7±25.48
Serin	71.07±16.49	92.70±17.30^{a**}	93.87±23.95
Sistein	179.55±49.44	254.61±28.54^{a***}	304.69±33.78^{b**}
Sitrulin	41.80±7.03	30.10±8.27^{a***}	41.72±8.47 b*
Taurin	202.01±59.52	306.04±126.86	376.43±48.47
Tirozin	45.01±8.84	40.71±10.51	40.37±11.04
Treonin	192.46±56.47	101.34±17.39^{a***}	112.9±24.25
Triptofan	15.72±3.86	23.21±6.59^{a**}	12.01±3.75^{b***}
Valin	117.29±21.86	153.83±31.18^{a*}	145.15±52.81

Gruplar arasındaki farklılıklar Mann-Whitney U testi kullanılarak analiz edildi.
a: Grup 1 ile, b: Grup 2 ile. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Tablo 10. Grupların doku amino asit düzeyleri (μmol/g protein)

	Grup 2; ort±SS; n=10	Grup 3; ort±SS;n=9
Alanin	41.63±19.17	16.34±5.11**
Asparajin	27.44±14.10	13.57±6.06*
Aspartat	7.18±3.76	3.29±1.51**
β-Alanin	1.89±0.48	1.17±0.39**
Fenilalanin	8.78±3.38	7.04±1.70
Glisin	32.44±13.88	20.21±8.95
Glutamat	37.36±18.83	15.85±5.76**
Hidroksiprolin	2.29±0.73	0.81±0.18***
Histidin	3.44±0.99	1.85±0.38***
İzolösin	10.38±3.33	6.01±2.77**
Lizin	18.18±5.72	10.47±3.86***
Lösin	23.53±8.52	14.40±2.38*
Metiyonin	3.34±1.12	1.65±0.78**
Ornitin	9.69±3.08	5.59±1.66**
Prolin	15.77±6.32	7.51±2.49**
Serin	14.02±4.66	7.54±4.01*
Sistein	48.71±14.85	39.33±6.93
Taurin	38.18±29.29	28.83±11.16
Tirozin	5.04±1.92	2.68±1.30**
Treonin	14.47±8.84	10.03±1.80
Triptofan	1.33±0.56	1.00±0.32
Valin	9.49±2.79	5.49±1.83***

Gruplar arasındaki farklılıklar Mann-Whitney U testi kullanılarak analiz edildi. *p<0.05, **p<0.01,***p<0.001.

Kanser oluşturulan grupta kontrol grubuna oranla plazma alanin, prolin, serin, sistein, triptofan, valin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulundu ($p<0.01$) (Şekil 12-14).

Kanser oluşturulan grupta kontrol grubuna oranla plazma asparajin, β alanin, hidroksiprolin, histidin, izolösin, lizin ve ornitin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulundu ($p<0.001$) (Şekil 12-13).

Kanser oluşturulan grupta kontrol grubuna oranla plazma lösin düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulundu ($p<0.05$) (Şekil 13).

Kanser oluşturulan grupta kontrol grubuna oranla plazma arjinin, sitrülin, treonin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulundu (sırasıyla; $p<0.001$, $p<0.01$, $p<0.001$).(Şekil 12, 14)

NAC verilen grupta plazma triptofan ve alanin düzeyleri NAC verilmeyen kanserli gruba göre daha düşük bulundu (sırasıyla; $p<0.01$, $p<0.001$).(Şekil 12, 14).

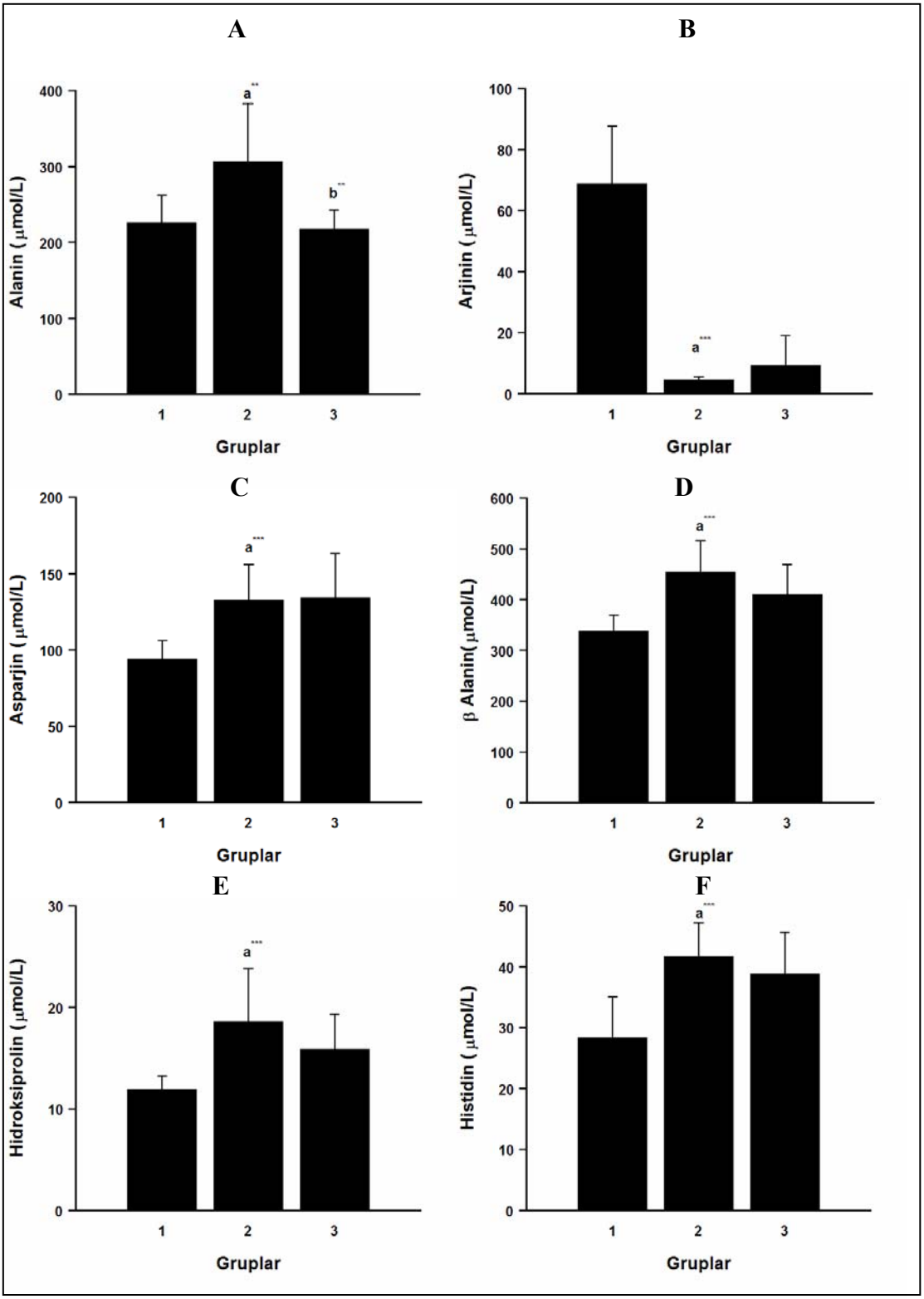
NAC verilen grupta plazma sistein ve sitrülin düzeyleri NAC verilmeyen kanserli gruba göre daha yüksek bulundu (sırasıyla; $p<0.01$, $p<0.05$) (Şekil 14).

NAC verilen grupta doku alanin, aspartat, β alanin, glutamat, izolösin, lizin, ornitin, prolin ve tirozin düzeyleri NAC verilmeyen kanserli gruba göre daha düşük bulundu ($p<0.01$) (Şekil 15, 16) .

NAC verilen grupta doku asparajin, lösin, metiyonin düzeyleri NAC verilmeyen kanserli gruba göre daha düşük bulundu ($p<0.05$) (Şekil 15, 16).

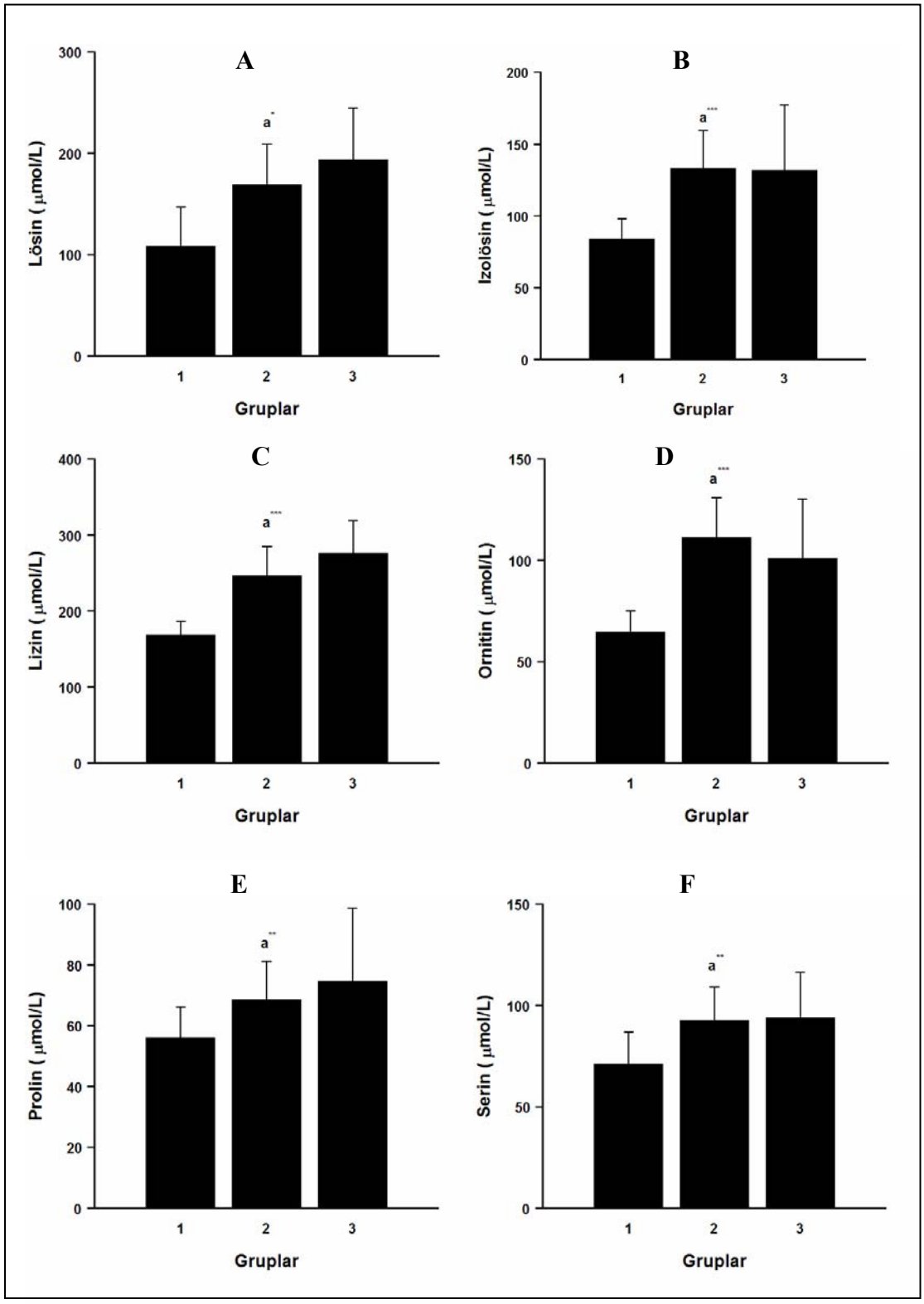
NAC verilen grupta doku hidroksiprolin, histidin ve valin düzeyleri NAC verilmeyen kanserli gruba göre daha düşük bulundu ($p<0.001$) (Şekil 15, 16) .

Tümör dokusunda arjinin ve sitrülin düzeyleri saptanamadı .

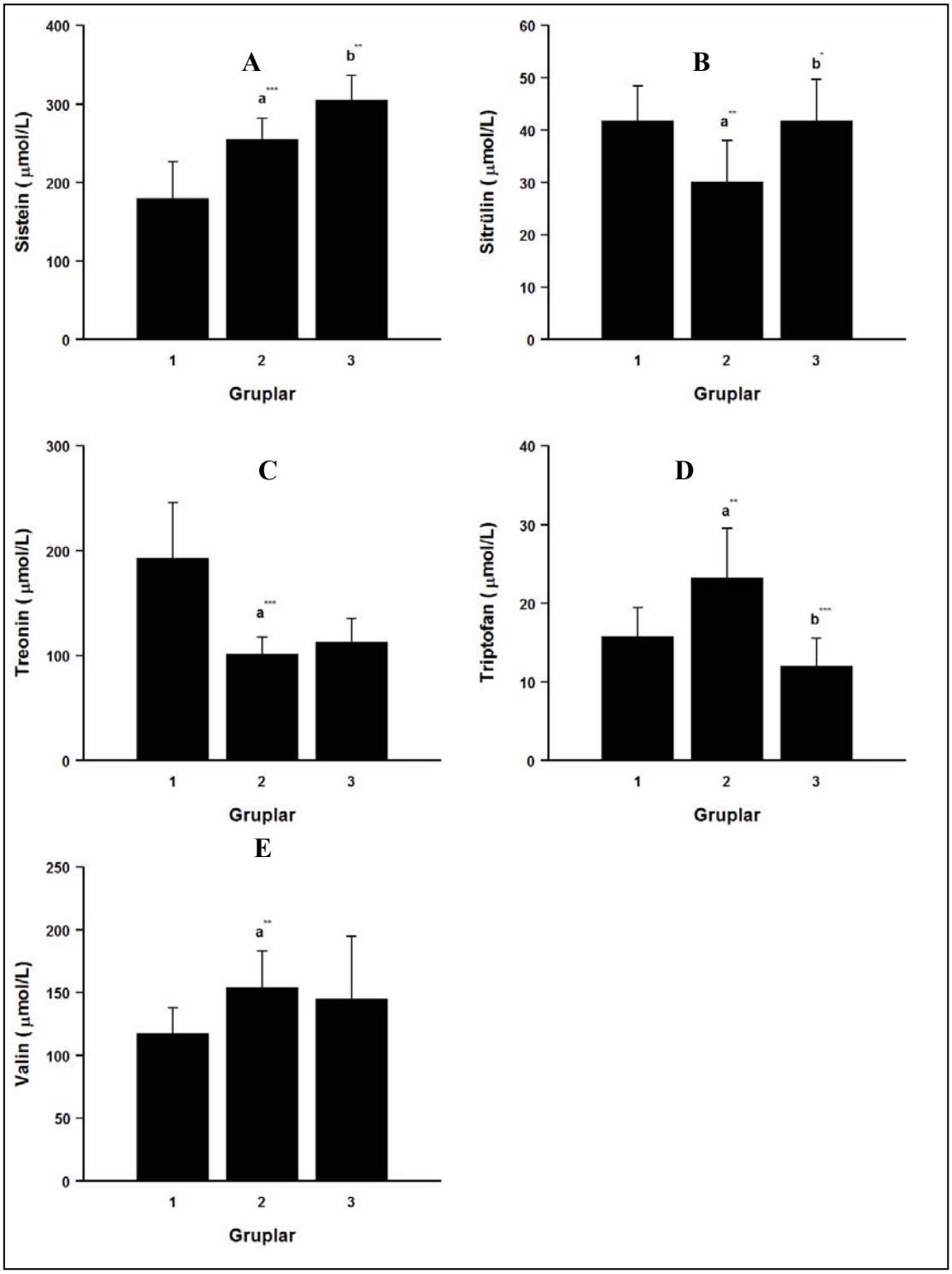


Şekil 12. Amino asitlerin plazma konsantrasyonları: **A**- Alanin, **B**- Arjinin, **C**- Asparajin, **D**- β-alanin, **E**- Hidroksiprolin, **F**- Histidin, a: Grup 1 ile, b: Grup 2 ile, **p<0.01, ***p<0.001.

.

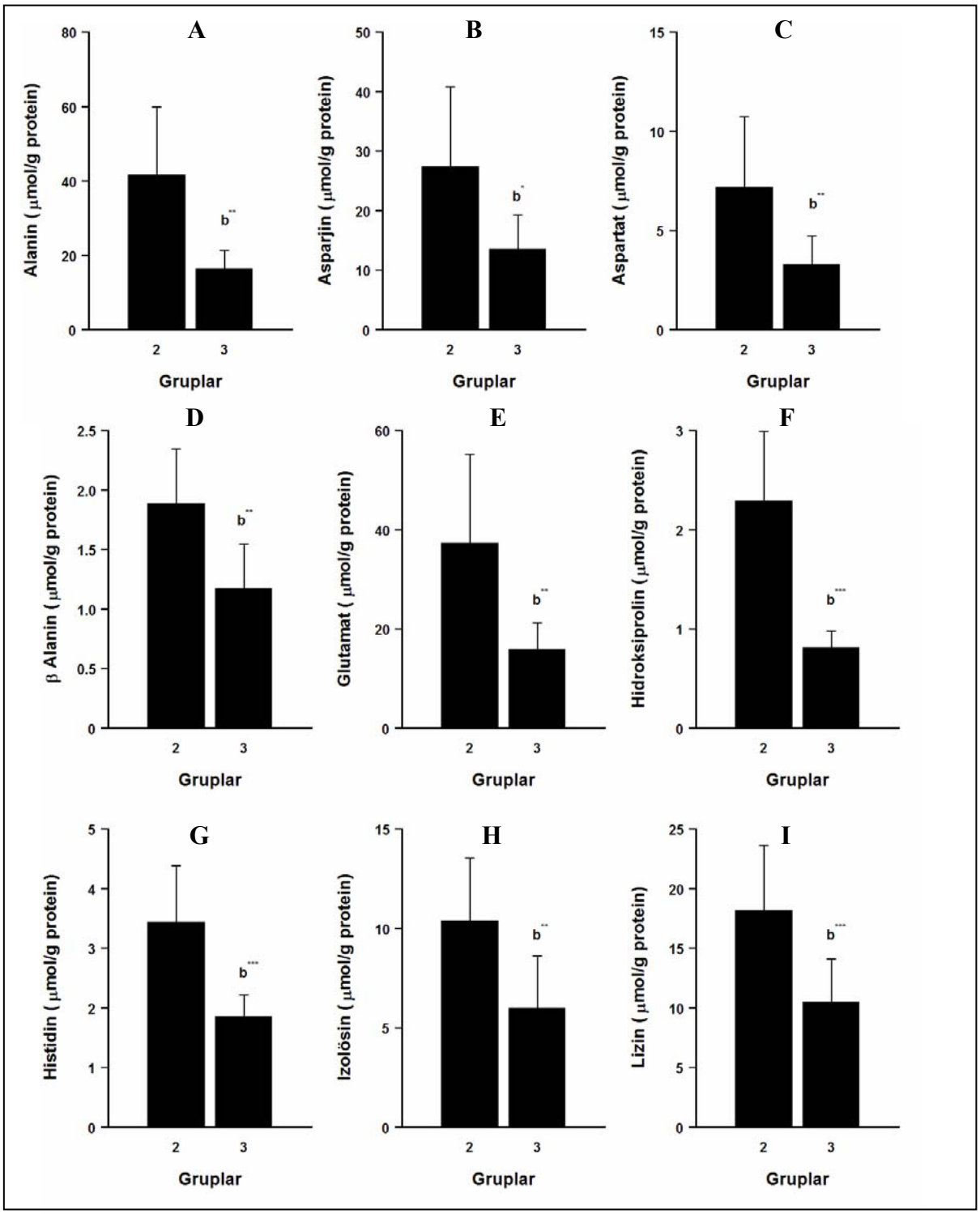


Şekil 13. Amino asitlerin plazma konsantrasyonları: **A**- İzolösin, **B**-Lizin, **C**-Lösin, **D**-Ornitin, **E**-Prolin, **F**- Serin, , a: Grup 1 ile, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.



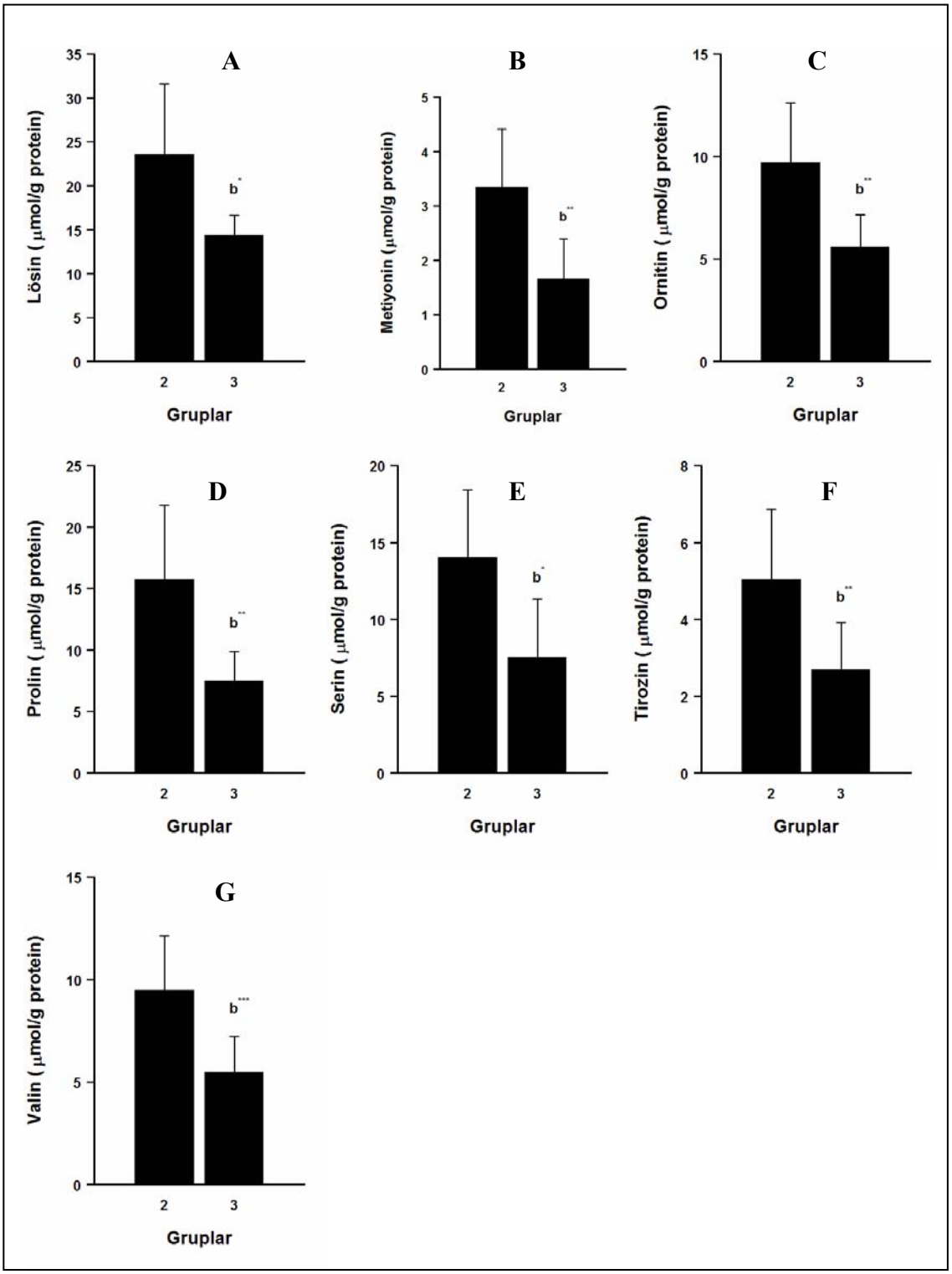
Şekil 14. Amino asitlerin plazma konsantrasyonları: **A**- Sistein, **B**- Sitrülin,**C**-Treonin, **D**-Triptofan, **E**-Valin, a: Grup 1 ile, b: Grup 2 ile, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

.



Şekil 15. Amino asitlerin doku konsantrasyonları: **A**- Alanin, **B**- Asparajin, **C**- Aspartat, **D**- β-alanin, **E**- Glutamat, **F**- Hidroksiprolin, **G**- Histidin, **H**- İzolösin, **I**- Lizin, b: Grup 2 ile, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

.



Şekil 16. Amino asitlerin doku konsantrasyonları: **A**- Lösin, **B**- Metiyonin, **C**- Ornitin, **D**- Prolin, **E**-Serin, **F**- Tirozin, **G**- Valin, b: Grup 2 ile, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Tablo 11. Deneklerin her birinin plazma serbest amino asit düzeyleri (µmol/L)

		Alanin	Arg	Asn	Asp	β alanin	Fhe	Glisin	Glu	Hpro	His	Ile	Lizin
GRUP 1	1	268.83	95.90	93.80	7.44	337.5	54.40	120.50	75.40	13.10	13.40	119.04	197.60
	2	226.27	68.90	93.90	6.43	337.66	64.63	120.90	19.50	11.96	28.41	84.03	194.40
	3	245.5	47.30	97.52	3.20	290.41	66.22	115.04	34.84	13.60	29.01	80.40	165.92
	4	225.41	91.34	91.81	2.90	334.60	72.90	112.33	25.50	11.70	29.80	89.04	166.10
	5	257.90	85.24	99.90	2.82	352.83	71.33	117.20	26.44	12.42	27.30	78.10	156.11
	6	231.30	77.92	109.74	5.90	353.90	69.30	145.12	27.40	12.90	36.50	91.60	169.70
	7	251.30	53.93	105.13	10.84	343.00	70.60	125.90	75.10	12.31	29.62	66.30	149.80
	8	236.60	68.92	81.70	10.20	359.40	81.60	146.40	39.10	10.40	38.00	81.63	133.00
	9	153.10	32.82	64.30	7.04	276.20	31.60	76.00	26.40	9.00	21.40	84.03	168.13
	10	166.52	66.83	100.72	7.61	390.33	51.00	127.90	30.54	12.24	30.70	66.20	180.60
GRUP 2	1	282.40	4.76	126.00	6.20	421.60	81.51	142.12	25.90	13.44	41.52	124.20	223.30
	2	343.10	6.82	120.80	7.76	425.41	74.60	141.74	32.24	14.44	44.90	106.30	205.60
	3	278.70	3.75	125.33	4.94	389.60	63.50	119.80	22.60	19.64	47.90	117.60	253.11
	4	304.40	5.10	126.10	7.30	381.90	66.14	105.03	33.94	10.70	37.54	123.33	233.20
	5	264.93	4.42	133.00	8.41	469.90	77.52	95.42	36.00	13.60	44.00	146.43	281.64
	6	361.14	4.79	129.80	9.20	456.23	72.02	120.14	46.30	19.20	45.40	132.60	278.40
	7	306.30	4.77	132.60	6.61	589.50	70.61	124.50	33.70	27.40	41.80	132.88	246.10
	8	487.72	5.01	184.71	12.10	535.60	78.20	124.70	41.20	24.11	41.60	174.34	175.20
	9	183.64	4.76	89.53	4.00	454.71	45.80	84.80	18.50	18.50	27.31	90.91	246.26
	10	251.50	3.42	158.50	10.3	422.70	76.90	188.42	32.20	24.73	45.20	180.23	319.03
GRUP 3	1	217.30	20.40	187.40	8.81	546.60	105.74	135.70	35.20	17.60	38.87	158.70	313.50
	2	211.70	3.21	152.70	7.60	402.80	116.40	152.30	42.10	14.5 0	50.60	162.71	310.10
	3	223.60	30.09	97.10	8.18	411.7	65.40	127.60	30.60	20.10	32.70	71.80	218.53
	4	237.00	3.12	148.90	13.50	301.8	94.62	146.00	26.00	9.20	38.90	142.82	248.90
	5	257.50	4.11	148.50	13.10	415.5	69.60	179.70	52.20	21.2 0	44.20	76.33	328.50
	6	216.50	2.01	84.44	8.02	409.92	47.42	109.50	27.60	16.12	24.61	80.34	221.30
	7	157.62	3.44	121.40	9.70	381.13	68.30	64.70	24.44	12.2 0	42.24	114.22	298.72
	8	210.00	16.03	134.40	8.94	400	59.90	170.60	41.80	15.9	38.80	188.20	312.70
	9	224.70	2.10	134.20	9.76	419.84	55.35	135.84	34.99	15.7	38.94	192.20	234.00

Arg: Arjinin; **Asn**: Asparajin; **Asp**: Aspartat; **Fhe**: Fenilalanin; **Glu**: Glutamat; **Hpro**: Hidroksiprolin; **His**: Histidin; **Ile**: İzolösin.

Tablo 11 (devam). Deneklerin her birinin plazma serbest amino asit düzeylerinin (µmol/L)

		Lösin	Met	Orn	Prolin	Serin	Sistein	Sitr	Taurin	Tyr	Thr	Trp	Valin
GRUP 1	1	63.80	51.20	69.00	56.20	31.41	105.71	41.70	202.00	66.00	192.50	21.54	143.13
	2	66.80	38.67	83.13	55.80	71.07	179.55	41.90	183.80	37.50	263.10	15.72	94.47
	3	93.71	40.50	81.72	67.74	64.54	270.10	44.90	202.02	50.73	192.40	22.51	113.10
	4	120.10	39.40	49.90	64.20	76.41	210.20	48.40	183.10	43.21	205.83	15.90	142.94
	5	162.10	40.64	52.91	65.14	84.10	216.80	49.10	134.70	46.10	243.63	12.50	144.50
	6	142.82	46.70	58.24	67.40	88.70	157.33	37.40	193.30	48.20	165.50	15.13	80.04
	7	106.86	37.11	63.70	53.00	77.10	182.90	41.10	315.00	40.20	264.02	12.40	120.62
	8	175.90	34.40	64.40	48.84	68.90	204.20	40.10	290.40	44.70	182.90	17.60	120.70
	9	63.30	25.50	64.46	34.33	62.80	114.04	25.22	125.30	37.40	91.60	12.74	101.10
	10	82.82	32.60	56.90	47.30	85.70	154.70	48.20	190.50	36.10	123.10	11.20	112.30
GRUP 2	1	139.00	35.81	85.71	65.42	88.30	301.20	27.63	245.80	40.76	91.00	28.90	137.32
	2	142.74	35.60	90.70	75.40	72.23	282.33	37.70	306.00	38.10	89.90	35.89	126.40
	3	172.62	59.30	109.60	70.70	89.31	282.53	34.50	192.90	30.30	104.00	14.04	142.00
	4	214.40	35.50	92.20	66.00	86.04	244.32	23.30	187.70	28.30	110.12	16.20	148.50
	5	219.90	34.90	106.30	59.30	87.20	237.20	22.80	328.00	35.50	103.90	17.42	120.30
	6	222.22	37.22	114.40	68.54	102.20	259.12	27.33	358.50	32.70	113.14	22.30	152.20
	7	168.56	51.83	110.79	68.50	92.70	220.70	33.10	256.80	57.84	101.30	26.50	139.80
	8	188.50	58.64	148.00	93.53	121.84	209.50	27.10	561.10	58.90	136.20	20.60	224.30
	9	106.71	24.23	111.70	40.80	68.80	254.05	20.00	164.10	40.71	70.00	23.33	158.28
	10	115.70	37.74	143.11	77.10	118.40	255.17	47.60	459.50	44.00	93.80	27.10	189.20
GRUP3	1	144.51	44.83	127.40	125.10	112.70	342.60	44.41	469.70	46.10	109.60	17.70	187.50
	2	199.70	42.50	101.10	84.10	89.90	325.50	46.20	430.11	55.70	101.80	11.13	213.40
	3	227.70	38.40	79.93	65.30	79.14	280.24	42.70	376.01	36.06	114.40	11.00	98.70
	4	263.32	30.04	131.12	57.69	140.80	333.60	40.31	372.13	29.50	114.50	11.88	184.81
	5	268.30	35.30	120.9	81.32	102.53	326.32	32.70	376.00	33.50	75.00	14.60	111.10
	6	193.48	34.40	101.24	55.20	56.72	232.58	37.60	343.00	34.62	112.80	7.34	99.10
	7	109.10	32.90	75.60	51.70	75.32	292.03	27.53	314.80	30.00	168.50	11.61	127.50
	8	142.70	54.60	132.20	100.80	93.85	304.56	48.10	328.70	38.05	106.50	16.40	207.40
	9	193.73	39.20	41.00	51.10	93.89	304.69	56.00	377.50	59.80	113.00	6.47	76.85

Met: Metiyonin; **Orn**: Ornitin; **Sitr**: Sitrülin; **Tyr**: Tirozin; **Thr**: Treonin; **Trp**: Triptofan.

Tablo 12. Deneklerin her birinin doku amino asit düzeyleri (µmol/g protein)

		Alanin	Asn	Asp	β alanin	Fhe	Glisin	Glu	Hpro	His	Ile	Lizin	Lösin	Met	Orn	Prolin	Serin	Sistein	Taurin	Tyr	Thr	Trp	Valin
GRUP 2	**1**	32.30	20.83	5.44	2.31	4.70	24.83	28.28	1.83	2.64	8.05	14.20	13.63	2.60	7.51	12.16	10.88	35.66	2.34	3.78	6.09	0.60	7.40
	2	42.75	37.16	10.56	1.35	12.16	40.96	61.87	1.89	4.05	14.41	19.71	27.07	4.63	13.05	20.14	17.66	80.73	91.22	6.46	14.89	2.08	12.67
	3	39.33	21.32	6.73	1.56	7.54	27.84	34.74	3.33	2.49	8.12	14.48	19.61	2.61	8.17	16.40	9.80	43.63	51.26	3.74	12.18	1.38	7.93
	4	45.65	29.41	4.39	1.84	10.07	36.85	42.73	1.50	3.59	10.82	20.83	24.83	3.31	11.22	17.52	16.92	49.70	52.27	5.09	17.99	1.39	9.98
	5	68.92	41.52	10.87	2.58	14.33	49.52	47.10	2.02	5.00	15.17	31.73	34.89	5.16	15.14	25.05	21.08	65.76	62.10	7.86	23.34	2.33	13.90
	6	9.74	6.09	1.77	1.13	4.52	7.35	7.86	1.61	2.33	7.09	12.51	17.39	2.29	6.61	4.01	9.58	33.20	9.53	1.44	4.94	0.55	6.52
	7	42.25	16.10	4.04	1.74	8.55	24.83	14.95	1.76	2.23	6.55	16.38	25.47	2.32	6.22	14.88	8.70	47.43	17.40	3.68	14.61	1.14	7.06
	8	71.01	54.43	13.91	1.92	8.96	49.20	64.79	2.42	4.22	13.79	19.83	36.67	4.53	12.60	23.05	19.63	49.02	52.28	6.84	30.55	1.57	12.12
	9	18.16	17.75	5.18	2.55	11.92	19.20	24.51	3.13	4.52	7.39	12.47	10.16	2.16	7.55	8.96	10.26	33.50	40.38	6.47	18.68	1.02	6.36
	10	46.27	29.86	8.98	1.92	5.15	43.83	46.80	3.43	3.39	12.47	19.69	25.63	3.89	8.89	15.62	15.73	48.55	3.14	5.06	1.44	1.27	11.03
GRUP3	**1**	14.39	13.27	3.28	0.88	5.29	13.10	17.54	0.63	1.43	5.08	9.27	12.81	1.43	4.37	6.39	5.95	30.16	21.73	2.31	9.24	0.71	4.57
	2	16.50	20.87	6.68	1.14	10.13	38.12	21.61	0.79	1.81	9.28	19.55	18.05	2.68	7.67	7.63	11.20	40.69	41.77	4.73	10.07	1.44	5.54
	3	26.37	24.77	3.58	1.84	8.14	27.38	17.78	0.84	1.90	11.74	11.23	13.41	3.17	6.13	11.86	14.11	41.21	31.89	4.86	13.52	1.27	9.39
	4	8.06	6.47	1.53	1.05	4.81	8.98	6.91	0.73	1.68	3.50	6.59	11.79	0.82	5.24	3.72	3.05	38.98	12.66	1.24	7.19	0.91	3.73
	5	15.68	9.90	2.54	0.98	5.57	15.21	11.45	0.92	1.69	3.94	7.99	12.37	1.15	3.17	8.00	3.55	41.19	19.49	1.79	9.67	0.69	3.88
	6	18.66	10.34	2.53	0.64	7.79	18.69	25.67	0.61	1.71	4.55	7.93	15.90	1.26	7.53	9.60	5.63	33.77	46.73	2.03	10.40	1.03	7.03
	7	16.00	9.54	2.91	1.77	6.49	13.86	12.74	0.73	2.04	4.20	8.69	17.66	1.26	3.74	5.62	5.29	48.33	35.78	1.81	11.75	0.67	4.13
	8	11.88	9.93	2.20	1.26	8.26	25.03	11.61	1.21	2.77	5.13	10.44	15.25	1.25	5.22	5.53	6.65	49.31	21.66	2.24	9.89	1.51	4.85
	9	19.57	17.06	4.43	0.99	6.96	21.52	17.36	0.86	1.62	6.69	12.55	12.36	1.90	7.27	9.26	12.45	30.39	27.84	3.16	8.61	0.81	6.29

Arg: Arjinin; **Asn**: Asparajin; **Asp**: Aspartat; **Fhe**: Fenilalanin; **Glu**: Glutamat; **Hpro**: Hidroksiprolin; **His**: Histidin; **Ile**: İzolösin, met**: Metiyonin;** Orn**: Ornitin;** Thr**: Treonin;** Trp**: Triptofan;** Sitr**: Sitrülin;** Tyr**: Tirozin**.

TARTIŞMA

Plazma amino asitlerinin düzeyleri vücuttaki amino asitlerin akışını etkileyen tüm faktörlerin net etkisini göstermektedir. Dolaşımdaki amino asit profilleri kanserli hastalarda değişmektedir. Bu değişim amino asit miktarlarında artma veya azalma şeklinde olabilmektedir (13,79). Laboratuvar hayvanlarında tümörün çıkarılmasıyla 24 saat içinde dolaşımdaki amino asit profilleri normal seviyelerine dönmektedir (100). Bu bulgular kanserli hücrelerin ekstraselüler amino asit profilleri üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir (101).

Kanserli hastalarda, protein metabolik yakıtın ana deposudur ve tümör büyümesi süresince önemli ölçüde tüketilmektedir. Tümörler büyüyebilmek için esansiyel amino asit, purin ve pirimidin sentezi için glutamin, glisin ve aspartat gibi amino asitlere ve membran lipit komponentlerinin sentezi için serine ihtiyaç duyarlar. Dolayısıyla seçici amino asit ihtiyaçları vardır. Bu da dokularda protein döngüsü için aşamalı bir kas kaybına ve başlıca esansiyel amino asit olmak üzere amino asitlerden konakçının az faydalanabilmesine neden olmaktadır (85).

Çeşitli çalışmalar malign neoplazmaların çevrelerindeki normal dokuda veya kaslarda protein yıkımını artırabileceğini göstermiştir (62,70). Tümör dokusunda glikoneogenez enzimlerinin aktivitesinin arttığı görülmüştür (62). Bu çalışmada, glukojenik amino asitlerden plazma prolin, histidin, sistein, valin, serin, alanin, asparajin düzeylerinin meme kanseri oluşturulan farelerde kontrol grubuna oranla anlamlı bir şekilde yüksek bulunması, bu amino asitlerin glikoneogenezde kullanılarak tümör dokusu enerji metabolizmasına katılabileceğini akla getirmektedir. NAC verildikten sonra plazmada sadece alanin amino asidinde istatistiksel

olarak anlamlı bir düşme görülmüştür. Tedaviden sonra tümör dokusunda glukojenik amino asitlerden aspartat, glutamat, serin, asparajin, histidin, tirozin, valin, prolin, metiyonin, alanin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşme görülmüştür. NAC, glukojenik amino asit düzeylerini azaltarak bu amino asitlerin tümör tarafından glikoneogenezde kullanımını sınırlamış olabilir. Bu durumda tümör büyümesi için gerekli enerji bu kaynaktan yeteri kadar sağlanamayacaktır.

Kolon kanseri olan hastalarda Wang ve ark. (102) yapmış olduğu çalışmada amino asit uptakeini ölçmüşler ve pek çok esansiyel amino asidin (lösin, izolösin, fenilalanin, treonin, lizin) ve bazı nonesansiyel amino asitlerin (tirozin, prolin, glutamin) serum düzeylerinin kanserli dokuda, normal dokuya göre anlamlı olarak yüksek olduğu, metiyonin, valin gibi bazı esansiyel amino asitlerin ve bazı nonesansiyel amino asitlerin ise az miktarda arttığı bildirilmiştir. Diğer yandan, akut lösemi hastalarında da glutamin, alanin, histidin, prolin, treonin ve metiyoninin plazma düzeyleri yüksek bulunmuştur (103). Bizim çalışmamızda da bu çalışmalara paralel olarak plazma; valin, lösin, izolösin, triptofan, lizin gibi esansiyel amino asitler ve alanin, serin, prolin, sistein, asparajin ve histidin gibi nonesansiyel amino asit konsantrasyonları meme kanseri oluşturulan grupta kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek bulunmuştur. NAC verildikten sonra ise plazma esansiyel amino asitlerden sadece triptofan düzeyinde, nonesansiyel amino asitlerden ise sadece alanin düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşme görülmüştür. Tedaviden sonra tümör dokusunda esansiyel amino asitlerden valin, izolösin, lizin, lösin, metiyonin düzeylerinde anlamlı düşüş gözlenmiştir. Nonesansiyel amino asitlerden alanin, serin, prolin, tirozin, glutamat, aspartat, asparajin, histidin düzeyinde de istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma saptanmıştır.

Protein ve fosfolipit sentezinde, glikoneogenezde, purin ve timidilat pirimidin nükleotit oluşumunda önemli rolü olan serin düzeyleri, neoplastik dokularda değişmektedir. Bu değişim tümoral durumlarda nükleotid biyosentezine uyum sağlamakta ve neoplastik hücrenin sürekli devam eden replikasyonunu desteklemektedir (102). Bu çalışmada, meme kanseri oluşturulan grupta kontrol grubuna oranla plazma serin konsantrasyonu anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Meme kanseri oluşturulan grupta serin konsantrasyonunun artmış olması, kanser oluşumu sürecinde bu amino asit miktarının artarak hücre proliferasyonunu desteklemesinin mümkün olabileceğini düşündürmektedir. NAC verildikten sonra ise plazma serin düzeyinde, istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Tedaviden sonra tümör dokusunda serin düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşme

gözlenmiştir. Bu değişim tümoral dokudaki nükleotid biyosentezini ve neoplastik hücrelerin replikasyonunu engellemekte NAC'ın etkili olabileceği tezini desteklemektedir.

Taurin, sistein amino asidinin metabolizması sonucu oluşan bir amino asittir (104,105). Plazma taurin düzeylerinin akciğer, karaciğer ve kolon kanserine sahip hastalarda yükseldiği; meme kanseri hastalarında ise sağlıklı kontrollerden farklı olmadığı bulunmuştur (19). Bu çalışmada, meme kanseri oluşturulan grupta kontrol grubuna oranla plazma sistein konsantrasyonu anlamlı oranda yüksek bulunmasına rağmen, taurin düzeyleri bakımından iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Fakat, meme kanseri oluşturulan grupta, kontrol grubuna oranla plazma taurin konsantrasyonu bir miktar daha yüksek olarak tespit edilmiştir. NAC ile tedavi edildikten sonra ise plazma taurin düzeyinde tümör grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamasına rağmen, sistein konsantrasyonu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur. Tedaviden sonra tümör dokusunda sistein ve taurin düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenmemiştir.

Yapılan çalışmalarda, glutamat düzeylerinin birçok kanser tipinde arttığı gösterilmiştir. Castro-Bella ve ark. (106) pankreas kanserli hastalarda yüksek glutamat seviyesinin bir gösterge olarak kullanılabileceği fikrini ileri sürmüştür. Jinekolojik bölge kanserli hastalarda (107), akut ve kronik lösemililerde (76) aspartat düzeyinde değişim olmaksızın glutamat düzeyinin arttığı gözlenmiştir. Özellikle ilerlemiş evre ve metastazı olan jinekolojik bölge kanserli hastalarda glutamat seviyesi daha da yüksek bulunmuştur (107). Zenz ve ark. (107) servikal kanserli hastalarda; Zang ve Pang (19) ise akciğer, karaciğer, kolon ve meme kanserli hastalarda hem aspartat hem glutamat düzeylerini yüksek bulmuşlardır. Ancak bizim çalışmamızda meme kanseri oluşturulan grupta, kontrol grubuna oranla plazma aspartat ve glutamat konsantrasyonlarında anlamlı bir fark bulunamamıştır. NAC verilmesi yine herhangi bir anlamlı fark oluşturmamıştır. Tedaviden sonra ise tümör dokusunda aspartat ve glutamat konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir düşme gözlenmiştir. Kanser dokusunda bu amino asit düzeylerinde meydana gelen azalma NAC'ın aspartat ve glutamatın tümör tarafından kullanımını azalttığını düşündürebilir.

Arginin, arginaz enzimiyle üre ve ornitine metabolize edilmektedir. Ornitin ve metiyonin amino asitlerinden ise poliaminler olan spermin, spermidin ve pütressinler sentez edilmektedir. Poliaminler, hücrelerde nükleotit ve protein sentezini uyararak hücre proliferasyonunda önemli rol oynarlar (108). Kanserde arttığı bilinen arginaz enzimi nitrik oksit (NO), poliamin, agmatin, prolin ve glutamat sentezi ile ilişkilidir. Arginaz enzimi nitrik oksit sentaz (NOS) ile aynı substratı kullanmaktadır. Her iki enzim de arginini tüketmek için birbirleriyle yarışmaktadırlar. NOS enzimi, L-arginini substrat olarak kullanarak NO ve

sitrüline 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 (109). Normal düzeyde NO, antioksidan işlev görürken; aşırı artması güçlü lipid peroksidanı olan peroksinitlere dönüşümü artırır. 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 (110). Nitekim arginaz enzim aktivitesinin kanserde arttığını gösteren çeşitli çalışmalar yapılmıştır (111). Meme tümör dokusunda poliamin sentezinin artış nedeni bilinmemekle birlikte yüksek miktardaki östrojen içeriğinin poliamin sentezini indükleyerek meme kanser hücrelerinin büyümesini artırdığı düşünülmektedir (112). Küçük hücreli akciğer kanserinde plazma glutamat, glutamin, aspartat, asparagin ve arginin düzeyleri yüksek; ornitin, sitrüllin ve metiyonin düzeyleri düşük bulunmuştur. Bu bulgular artmış protein katabolizması ve açığa çıkan amino asitlerin üre siklüsuna girmesi sonucu poliamin sentezini stimüle etmesi şeklinde yorumlanmıştır (113). Cascino ve ark (75). tarafından yapılan başka bir çalışmada, meme kanseri hastalarının plazmalarında ornitin, glutamat ve triptofanın önemli düzeyde yükselmiş olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada, meme kanseri oluşturulan grupta, kontrol grubuna oranla plazma arginin konsantrasyonu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulunurken, ornitin konsantrasyonu ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur. Kanserde artmış protein yıkımının olması, beraberinde ürogenezi artıracağından buna bağlı olarak ornitin konsantrasyonu yükselmiş olabilir ve yükselen ornitin düzeyi poliamin sentezi üzerinden kanser gelişim sürecini hızlandırabilir. NAC uygulamasından sonra ise plazma arginin düzeyinde artma, ornitin düzeyinde bir azalma görülmüş fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Tedavi sonrası tümör dokusunda ise ornitin düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür. NAC, bu etkisini tümör poliamin sentezi için ornitin kullanımını azaltarak yapıyor olabileceği gibi, asıl mekanizmanın kanserde artan arginaz enzim aktivitesini inhibe etmek olabileceği akla gelmektedir.

Asparagin çeşitli tümörlerin gelişiminde önemli olan bir amino asittir ve antitümör tedavisinde kullanılmıştır (102). Meme kanseri hastalarının plazma amino asit düzeylerini inceleyen bir çalışmada asparagin konsantrasyonları yüksek bulunmuştur (85). Bizde bu çalışmada, meme kanseri oluşturulan grupta kontrol grubuna oranla plazma asparagin konsantrasyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulduk. NAC ile tedavi edildikten sonra ise plazma asparagin düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark

görülmemiştir. Tedaviden sonra tümör dokusunda ise asparagin konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür. Bu durum NAC'ın, tümör dokusu tarafından asparagin kullanımını azaltmış olabileceği akla getirebilir.

Lösin, lizin ve valin dallı zincirli amino asitlerdir. dallı zincirli amino asit kasta glutamin ve alanin sentezi için azot kaynağıdır. dallı zincirli amino asitlerin artmış oksidasyonu sepsis, kanser, travma, ciddi yanıklarla ilişkili bulunmuştur (114) ve kolon, bronşial, pankreatik kanser ve malign lenfomalarda serum dallı zincirli amino asit düzeyleri artmıştır (115). Bizim çalışmamızda da bu kanser vakalarına paralel olarak meme kanseri oluşturulan grupta, kontrol grubuna oranla plazma lözin, izolösin ve valin konsantrasyonları istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur. NAC uygulamasından sonra ise plazma dallı zincirli amino asit düzeylerinde istatistiksel bir değişim ortaya çıkmamıştır. Tedaviden sonra tümör dokusunda ise valin, lösin ve izolösin konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma görülmüştür. Bu da bize yine NAC'ın tümör dokusu tarafından dallı zincirli amino asit kullanımını azaltmış olabileceğini düşündürmektedir.

Daha önce meme kanseri üzerinde yapılan çalışmalarda, bir bağ doku proteini olan ve kollajen yapısında bulunan hidroksiprolinin plazma düzeyi yüksek bulunmuştur (74). Bu çalışmada da meme kanseri oluşturulan grupta kontrol grubuna oranla plazma hidroksiprolin konsantrasyonunu anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur. Artan hidroksiprolin, tümör dokusu etrafında bağ doku yıkımına neden olarak tümörün yayılımına yardımcı olabilir. NAC verildikten sonra ise plazma hidroksiprolin düzeyinde tümör grubuna göre düşme görülmesine rağmen, bu düşüş anlamlı değildi. Tedavi sonrası tümör dokusu hidroksiprolin düzeyi anlamlı bir şekilde azalmıştır. Bu sonuç; NAC'ın çevre dokularda bağ doku yıkımını azaltarak tümör yayılımını azaltabileceği dolayısı ile tümöral yayılmaya karşı koruyucu bir ajan olarak kullanılabileceği fikrini doğurmaktadır.

Meme kanserini de içeren birkaç kanser tipinde sağlıklı kontrol vakalarına oranla plazma serbest triptofan düzeyi yüksek bulunmuştur. Meme tümörünün çıkartılmasından sonra triptofan düzeyinin düştüğü gösterilmiş ve triptofanın neoplastik hastalıkların izlenmesinde yeni bir marker olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır (15,116). Çalışmamızda da meme kanseri oluşturulan grupta kontrol grubuna oranla plazma triptofan konsantrasyonunu anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur. NAC ile tedavi edildikten sonra ise plazma triptofan düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmıştır. Meme kanserinin izlenmesinde plazma triptofan düzeyinin bir marker olarak kullanılabileceği fikrinden hareketle, tedavi sonrası triptofan düzeyinin anlamlı düşüşü NAC'ın kanser gelişim süreci

üzerinde olumlu bir etkiye sahip olabileceğini akla getirmektedir. Tedavi sonrası tümör dokusu triptofan düzeyi azalsa bile bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.

Genel olarak amino asit düzeylerinin meme kanseri oluşturulan grupta kontrol grubuna oranla yüksek bulunması, kanserli hastalarda protein yıkımındaki önemli artıştan ve tümörün artmış protein metabolizmasından kaynaklanıyor olabilir. Kanserli hastalarda artan metabolizma amino asit değişikliklerinide beraberinde getirmektedir ve değişen plazma serbest amino asit düzeyleri kanser sürecinin birer biyolojik belirteci olarak gösterilmiştir (49). Bazı kanserlerin kendi karakteristik plazma serbest amino asit profillerini oluşturma olasılığı bu hastalıkların teşhis ve orjinlerinin açıklanmasında amino asitlerin önemli rollerinin olabileceğini düşündürmektedir (12). Plazma serbest amino asit profili sadece organlar arası amino asit değişikliğini göstermez aynı zamanda tüm vücuttaki total amino asit akışını etkileyen faktörlerin net etkisini de gösterir. Total amino asit miktarında önemli yüzdeyi kan hücreleri oluşturur (74,117). Bu çalışmada kanser oluşturulmuş hayvanlarda saptanan yüksek plazma amino asit düzeyleri, amino asitlerin meme kanseri gelişimi sürecinde potansiyel bir rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, antikarsinojenik özelliği çeşitli çalışmalar ile gösterilmiş olan NAC'ın, meme kanseri oluşturulmuş farelerde artan serbest amino asit düzeylerini sağlıklı kontrol düzeylerine çekme noktasında olumlu etkiler yaptığı gözlenmiştir. Özellikle bir kanser belirteci olarak gösterilmiş olan plazma triptofan düzeyleri üzerindeki azaltıcı etkisi dikkate değer bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır. Fakat, NAC'ın genel olarak kansere karşı koruyucu ve/veya tedavi edici bir ajan olarak kullanılabileceğini bu bulgular ışığında ifade etmek mümkün değildir. Kanser tedavisinde umut verici bir ajan olarak NAC'ın bu alandaki etkileri ileri çalışmalar ve yeni parametreler ile desteklenmelidir.

SONUÇLAR

Meme kanseri oluşturulan farelerde plazma ve doku amino asit düzeyleri ve NAC tedavisinin bu amino asit düzeylerine etkilerini incelendi. Buna göre;

1) Plazmada esansiyel amino asitlerin ve nonesansiyel amino asitlerin çoğunun düzeyleri meme kanseri oluşturulan grupta kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulundu. NAC ile tedavi sonrası tümör dokusunda, esansiyel amino asitler ve nonesansiyel amino asitlerin çoğunun düzeylerinde anlamlı bir şekilde düşüş gözlendi.

2) Plazmada glukojenik amino asitlerden prolin, histidin, arjinin, asparajin, sistein, serin, alanin ve valin meme kanseri oluşturulan grupta kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulundu. NAC verildikten sonra tümör dokusunda glukojenik amino asitlerin çoğu anlamlı bir şekilde düşük bulundu.

3) Gruplar arasında plazmada asidik amino asitler olan aspartat ve glutamat düzeylerinde anlamlı bir fark bulunmazken, NAC verildikten sonra tümör dokusunda aspartat ve glutamat düzeyleri anlamlı bir şekilde düşük bulundu.

4) Bazik amino asitlerden plazma histidin ve lizin düzeyleri, meme kanseri oluşturulan grupta kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunurken, plazma arjinin düzeyi anlamlı bir şekilde düşük bulundu. NAC verildikten sonra tümör dokusunda histidin ve lizin düzeyi anlamlı bir şekilde düşük bulundu. Tümör dokusunda arjinin amino asit düzeyi saptanamadı.

5) Dallı zincirli amino asitlerden olan valin, lösin, izolösinin plazma düzeyleri, meme kanseri oluşturulan grupta kontrol grubuna oranla, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulundu. NAC verildikten sonra tümör dokusunda dallı zincirli amino asitlerin hepsi anlamlı bir şekilde düşük bulundu.

6) Aromatik amino asitlerden plazma triptofan düzeyi, meme kanseri oluşturulan grupta kontrol grubuna oranla, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulundu. NAC verildikten sonra ise plazma triptofan düzeyinde tümör grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma görüldü.

7) Plazma hidroksiprolin ve prolin düzeyleri meme kanseri oluşturulan grupta kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulundu. NAC verildikten sonra tümör dokusunda hidroksiprolin ve prolin düzeyleri anlamlı bir şekilde düşük bulundu.

8) Plazma sistein düzeyi, meme kanseri oluşturulan grupta kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulundu. Plazma metiyonin düzeyleri bakımından meme kanseri oluşturulan grupta kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. NAC verildikten sonra ise plazma sistein düzeyinde tümör grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükselme gözlendi. NAC verildikten sonra tümör dokusunda metiyonin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulundu.

9) Plazma alanin, β alanin, serin, ornitin, asparagin düzeyleri, kanser oluşturulan grupta kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunurken, plazma treonin ve sitrülin düzeyleri ise anlamlı bir şekilde düşük bulundu. NAC verildikten sonra plazma alanin düzeyinde düşüş gözlenirken, plazma sitrülin düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükselme saptandı. NAC verildikten sonra tümör dokusunda alanin, β alanin, serin, ornitin ve asparagin düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlendi. Tümör dokusunda sitrülin düzeyi saptanamadı.

10) Kanser oluşturulan grubun plazma amino asit düzeylerinin, kontrol grubuna oranla anlamlı bir şekilde yüksek bulunması, bu amino asitlerin meme kanseri gelişimi mekanizmasında potansiyel rol alabileceğini ortaya koymaktadır ve tedaviden sonra tümör dokusu amino asit düzeylerinde anlamlı azalma görülmesi dikkate değerdir.

Yorum: N-asetilsisteinin antikarsinojenik etkisi bir çok çalışmada gösterilmiştir. Fakat NAC'ın meme kanseri vakalarında değişen amino asit düzeyleri üzerine olan etkisi konusunda bir bilgi yoktur. Bu çalışmada NAC verildikten sonra plazma ve doku amino asit düzeyinde bazı parametrelerde normalleşme görülmüştür. Amino asit düzeyleri üzerine olan etkilerine bakıldığında belki bir ölçüde olumlu etkisi olduğunu söylemek mümkündür. Ancak NAC sonuç olarak "kansere karşı bir ilaç olarak kullanılır" diyemeyiz. NAC'ın diğer kansere özgü parametreler üzerine olan etkilerinin de ayrıntılı incelenmesi gerekir.

ÖZET

Meme kanseri dünyada ve Türkiye'de kadınlar arasında en sık görülen tümör olup, kadınlarda kanser ölüm nedenleri arasında ilk sırada bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar, plazma serbest amino asit düzeyleri ile kanserli hastaların protein metabolizmaları arasında güçlü bir ilişkinin varlığını ortaya koymuştur.

Bu çalışmada, meme kanseri oluşturulan farelerin plazma ve doku amino asit düzeyleri ve N-asetilsisteinin bu amino asitler üzerine etkisi incelendi.

Fareler kontrol, tümör ve tümör+N-asetilsistein grubu olmak üzere üç gruba ayrıldı (n=10). Tümör ve tümör+N-asetilsistein gurubundaki farelere tümör hücresi enjekte edildi ve tümör çapı 1 cm olduğunda tedaviye başlandı. 15 gün boyunca kontrol ve tümör gruplarına 0.2 ml. serum fizyolojik ve tümör+N-asetilsistein grubuna ise 200 mg/kg/gün N-asetilsistein intraperitoneal olarak verildi. Deney sonlandırıldıktan sonra tüm grupların plazmalarında ve tümör dokularında amino asit düzeyleri ölçüldü.

Kanser grubu plazma örneklerinde, 24 amino asidin 14'ü kontrol grubuna oranla anlamlı bir şekilde yüksek bulundu. N-asetilsistein ile tedavi sonrası plazma alanin ve triptofan düzeylerinde azalma gözlendi. Tümör dokusu amino asidlerinden 16'sında anlamlı bir düşüş saptandı.

Antikarsinojenik özelliği çeşitli çalışmalar ile gösterilmiş olan N-asetilsistein, meme kanseri oluşturulmuş farelerde artan serbest amino asit düzeylerinin normal sınırlara çekilmesi noktasında olumlu etkiler yapmıştır. Özellikle bir kanser belirteci olarak gösterilmiş olan plazma triptofan düzeyleri üzerindeki azaltıcı etkisi dikkate alındığında, N-asetilsisteinin meme kanserinde olumlu etkiler üstlendiğini belirtmek mümkündür. Fakat, N-asetilsisteinin genel olarak kansere karşı koruyucu ve/veya tedavi edici bir ajan olarak kullanılabilirliğinin

savunulması henüz bu bulgular ışığında mümkün görülmemektedir. Kanser tedavisinde umut verici bir ajan olarak N-asetilsisteinin bu alandaki etkileri ileri çalışmalar ve yeni parametreler ile desteklenmelidir.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, amino asit düzeyi, N-asetilsistein, yüksek performans likit kromotografisi.

THE EFFECTS OF N-ASETYL CYSTEINE ON PLASMA AND TISSUE AMINO ACID LEVELS IN THE EXPERIMENTAL BREAST CANCER

SUMMARY

Breast cancer which is the most common malignancy in the world and Turkey also comprises the main cause of cancer deaths for women. It has been shown that there is a strong relation between plasma free amino acid profile and the protein metabolism of patients with cancer.

In this study, we investigated the plasma and tissue amino acid levels in mice with breast cancer and the effects of N-acetyl cysteine on these amino acids.

The mice were divided into three groups as control, tumour and tumour+N-acetyl cysteine (n=10). Tumour cells were injected into the mice in tumour and N-acetyl cysteine groups and when the diameter of the tumour was 1 cm, the treatment was beginned. During 15-day period, 0.2 ml isotonic sodium chloride were applied to the control group and N-acetyl cysteine (200 mg/kg/day) were applied to the treatment groups, intraperitoneally. Plasma and tissue amino acid levels for all groups were determined following the sacrification of animals.

In the plasma samples of cancer group, 14 out of 24 amino acids were found to be higher than control group. There was a significant decrease in the levels of plasma tryptophan and alanine after treatment of N acetyl cysteine. There was also a significant decrease in 16 tumour tissue amino acids.

N-acetyl cysteine which had been shown to have anticarcinogenic effects in many studies had beneficial effects on normalising the free amino acid levels in mice with breast

cancer. It will be possible to suggest that N-acetyl cysteine has some beneficial effects on the breast cancer development as it decreased the plasma tryptophan level which was shown to be a cancer marker. However, we can not still suggest the potential use of N-acetyl cysteine as a preventative and/or treatment agent in the cancer area according to these findings. The net effects on N-acetyl cysteine as a promising agent on the cancer treatment should be supported by further investigations with new parameters.

Key Words: Breast cancer, amino acid level, N-acetyl cysteine, high performance liquid chromotography.

KAYNAKLAR

1. Parkin DM, Bray F, J. Ferlay, Pisani P. Global cancer statistics 2002. CA Cancer J Clin 2005;55:74-108.

2. Semiglazov VF, Sagaidak VN, Moiseyenko VM, EA Mikhailov. Study of the role of breast self-examination in the reduction of mortality from breast cancer: the Russian Federation/World Health Organization study. Eur J Cancer 1993;29(14):2039-46.

3. Koçak S. Kimler meme kanseri olur? Klinik Bilimler ve Doktor 2000;6:68-72.

4. Tuncer S. Jinekolojik kanserlerde tarama. Hacettepe Tıp Dergisi 2000;31:113-20.

5. Williams M, Williamson J. Combining argumentation and bayesian nets for breast cancer prognosis. Cancer Res 2005;18:1-23.

6. Bernstein JL, Langholz B, Haile RW, Bernstein L, Thomas DC, Stovall M, et al. Study design: Evaluating gene–environment interactions in the etiology of breast cancer the WECARE study. Breast Cancer Res 2004;6:199-214.

7. Hendrix MJC, Seftor EA, Kirschmann DA, Seftor REB**.** Molecular biology of breast metastasis: Molecular expression of vascular markers by aggressive breast cancer cells. Breast Cancer Res 2000;2:417-22.

8. Simmons RM, Rubin E, Pisch J. Breast cancer. In: Harvey JC, Beattle EJ (Eds.) Cancer surgery. W.B. Saunders Company: NY USA;1996. p.525-61.

9. Heber D, Byerley LO, Chlebowski RT. Metabolic abnormalities in the cancer patient. Cancer 1985;5:225-9.

10. Abumrad NN, Miller B. The physiologic and nutritional significance of plasma-free amino acid levels. JPEN 1983;7:163-70.

11. Fanelli FR, Cangiano C, Muscaritoli M, Conversano L, Torelli GF, Cascino A. Tumor-induced changes in host metabolism a possible marker of neoplastic disease. Nutrition 1995;11:595-600.

12. 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.

13. Norton JA, Gorschboth CM, Wesley RA, Burt ME, Brennan MF. Fasting plasma amino acid levels in cancer patients. Cancer 1985;56:1181-6.

14. Watanabe A, Higashi T, Sakata T, Nagashima H. Serum amino acid levels in patients with hepatocellular carcinoma. Cancer 1984;54:1875-82.

15. Laviano A, Cascino A, Muscaritoli M, Fanfarillo F, Fanelli RF. Tumor-induced changes in host metabolism: A possible role for free tryptophan as a marker of neoplastic disease. Adv Exp Med Biol 2003;527:363-6.

16. Ramirez JL, Sarries C, Castro PL, Roig B, Cristina Q, Escuin P, et al. Methylation patterns and K-ras mutations in tumor and paired serum of resected non-small-cell lung cancer patients. Cancer Lett 2003;193:207-16.

17. Rajendra R, Gounder MK, Saleem A, Schellens JHM, Ross DD, Bates SE, et al. Differential effects of the breast cancer resistance protein on the cellular accumulation and cytotoxicity of 9-aminocamptothecin and 9-nitrocamptothecin. Cancer Res 2003;63:3228-33.

18. Kawaguchi H, Ohno S, Araki K, Miyazahi M, Saeki H, Watanabe M, et al. p53 polymorphism in human papillomavirus-associated esophageal cancer. Cancer Res 2000;60:2753-5.

19. Zhang PC, Pang CP. Plasma amino acid patterns in cancer. Clin Chem 1992;38:1198-9.

20. Nefyodov LI, Uglyanica KN, Smirnov VY, Doroshenko YM, Fomin KA, Nowicky JW, et al. Amino acids and their derivatives in tumour tissue from patients with breast cancer treated with ukrain. Part VI. Drugs Exp Clin Res 1996;22:159-61.

21. Flora S, Izzotti A, Agostini FD, Balansky RM. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer; with special reference to smoking-related end-points. Carcinogenesis 2001;22:999-1013.

22. Kelly GS. Clinical applications of N-acetylcysteine. Alt Med Rev 1998;3(2):114-27.

23. Fırat D. Cancer mortality in Turkey and in the world 1980-1981. Ankara: Turkish Association For Cancer Research and Control, 1983.

24. 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.

25. Özet A. Türkiye ve dünyada kanser epidemiyolojisi. 2000. http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/onkoloji/kanser_epidemiyolojisi.htm.

26. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. Lancet 2001;2:533-43.

27. Muir C, Waterhouse J, Mack T. Cancer incidence in five continents. Lyon International Agency for Cancer Research 1987;88:790-5.

28. Veronesi U, Goldhirsch A, Yarnold J. Breast cancer. In: Peckham M, Pinedo H, Veronesi U (Eds.). Oxford textbook of oncology. Oxford: Oxford University Press;1995. p.1243-89.

29. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. CA Cancer J Clin 2000;50:7-33.

30. Fırat D, Çelik İ. Cancer statistics in Turkey and in the world 1993-1995. Turkish Association For Cancer Research and Control. Ankara: İz Matbaacılık; 1998: p.55.

31. Dede İ. Kendi kendine meme muayenesi eğitim programı. Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı. 2005. http: // www.saglık.gov.tr / kanserle savaş dairesi başkanlığı.

32. D. T. Ramsay DT, Kent JC, Hartmann R.A, Hartmann P.E. Anatomy of the lactating human breast redefined with ultrasound imaging. J Anat 2005;206:525-32.

33. Can G. Meme kanserinde yayılım korunma ve erken tanı. www.saglik.gov.tr/extras/birimler/ksdb/kkmme/MK_Bel_Yay_Kor_ET-2.ppt

34. Martin RCG, Chagpar A, Scoggins CR, Edwards MJ, Hagendoorn L, Stromberg AJ, et al. Clinicopathologic factors associated with false-negative sentinel lymph-nod biopsy in breast cancer. Ann Surg 2005;241:1005-15.

35. SB Vestey, C Sen, CJ Calder, CM Perks, M Pignatelli, ZE Winters. p14ARF expression in invasive breast cancers and ductal carcinoma in situ relationships to p53 and Hdm2. Breast Cancer Res 2004;6:571-85.

36. Gatalica Z, Bing Z. Syk tyrosine kinase expression during multistep mammary carcinogenesis. Croat Med J 2005;46(3):372-6.

37. Barça N, Aydın U, Ercan Ö, Araz L. Hematolojik kökenli meme kitleleri. Türk Tanısal ve Girişimsel Radyoloji Dergisi 2002;8:228-30.

38. Topuz E, Aydıner A, Karadeniz AN. Klinik onkoloji. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları 2000: s.70-81.

39. McPherson KS, Dixon CM. ABC of breast diseases. Breast cancer epidemiology, risk factors and genetics. BMJ 2000;321:624-8.

40. Tebit EV, Gohrke SV, Claude JC. CYP17 5'-UTR MspA1 polymorphism and the risk of premenopausal breast cancer in a German population based case–control study. Breast Cancer Res 2005;7:455-64.

41. Nkondjock A, Robidoux A, Paredes Y, Narod SA, Ghadirian P. Diet, lifestyle and BRCA-related breast cancer risk among French-Canadians. Breast Cancer Res Treat 2006;98(3):285-94.

42. Tsakountakis N, Sanidas E, Stathopoulos E, Kafousi M, Anogiannaki N, Georgoulias V, et al. Correlation of breast cancer risk factors with HER-2/neu protein overexpression according to menopausal and estrogen receptor status. BMC Women's Health 2005;5:1-9.

43. Chang JH, Gertig DM, Chen X, Dite GS, Jenkins MA, Milne RL, et al. CYP17 genetic polymorphism, breast cancer, and breast cancer risk factors: Australian Breast Cancer Family Study. Breast Cancer Res 2005;7:513-21.

44. Gross RE. Breast cancer: Risk factors, screening and prevention. Semin Oncol Nurs 2000;16(3):176-84.

45. Stryer L. Protein, structure and function. In: Stryer L (Ed.). Biochemistry. 4th ed. New York: WH Freeman and Company; 1995. p.18-23.

46. Burtis CA, Ashwood ER (Çeviri: D. Aslan). Klinik kimyada temel ilkeler. Ankara: Palme Yayıncılık;2005:301-4.

47. Nelson DL, Cox MM (Çeviri: N. Kılıç). Lehninger biyokimyanın ilkeleri. Ankara: Palme yayıncılık;2005:118-20.

48. Champe PC, Harvey RA (Çeviri: E. Gür). Lippincott's Illustrated reviews serisinden: Biyokimya. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri;1997:5.

49. Petkovic M. Chemistry pictures: Amino acids. 2005. http://www.eccentrix.com/members/chempics/Aminoacids.html

50. Lai HS, Lee JC, Lee PH, Wang ST, Chen WJ. Plasma free amino acid profile in cancer patients. Semin Cancer Biol 2005;15:267–76.

51. Argiles JM, Carrasco RM, Fuster G, Busquets S, Sariano FJL. Cancer cachexia: the molecular mechanisms. Int J Biochem Cell Biol 2003;35:405–9.

52. Monitto CL, Dong SM, Jen J, Sidransky D. Characterization of a human homologue of proteolysis-ınducing factor and ıt's role of cancer cachexia. Clin Cancer Res 2004;10:5862-9.

53. Baracos VE. Regulation of skeletal-muscle–protein turnover in cancer associated cachexia. Nutrition 2000;16:1015–8.

54. Costa G. Cachexia, the metabolic component of neoplastic diseases. Cancer Res 1977;37:2336-47.

55. Muscaritoli M, Bossola M, Aversa Z, Bellantone R, Fanelli FR. Prevention and treatment of cancer cachexia: New insights into an old problem. Eur J Cancer 2006;42:31-41.

56. Blaauw DE, Deutz NEP, Meyenfeldt MFV. Metabolic changes in cancer cachexia first of two parts. Clin Nutr 1997;16:169-76.

57. Brennan MF, Burt ME. Nitrogen metabolism in cancer patients. Cancer Treat Rep 1981;65:67-78.

58. Fearon KCH, Borland W, Preston T, Tisdale MJ, Shenkin A, Camlan KC. Cancer cachexia: Influence of systemic ketosis on substrate levels and nitrogen metabolism. Am J Clin Nutr 1988;47:42-8.

59. Halfwerk SL, Willem JO, Berg V, Sijens PE, Wilson JHP, Oudkerk M, et al. Altered hepatic gluconeogenesis during L-alanine infusion in weight-losing lung cancer patients as observed by phosphorus magnetic resonance spectroscopy and turnover measurements. Cancer Res 2000;60:618-23.

60. Younes RN, Noguchi Y. Pathophysiology of cancer cachexia. Rev Hosp Clín Fac Med Paulo 2000;55:181-93.

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;67:736-9.

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;33:1020-32.

67. Jeevanandam M, Horowitz GD, Lowry SF, Brennan MF. Cancer cachexia and protein metabolism. Lancet 1984;1:1423-6.

68. Abumrad NN, Miller B. The physiologic and nutritional significance of plasma-free amino acid levels. JPEN 1983;7:163-70.

69. Klassen P, Fürst P, Schulz C, Mazariegos M, Solomons NW. Plasma free amino acid concentrations in healthy Guatemalan adults and in patients with classic dengue. Am J Clin Nutr 2001;73:647-52.

70. Kern KA, Norton JA. Cancer Cachexia. JPEN 1988;12:286-98.

71. Fearon KCH, Moses AGW. Cancer cachexia. Int J Cardiol 2002;85:73–81.

72. Melchior D, Se B, Le Floc'h N. Chronic lung inflammation affects plasma amino acid concentrations in pigs. J Anim Sci 2004;82:1091–9.

73. Lee JC, Chen MJ, Chang CH, Tiai YF, Lin PW, Lai HS, et al. Plasma amino acid levels in patients with colorectal cancers and liver cirrhosis with hepatocellular carcinoma. Hepatogastroenterology 2003;50:1269-73.

74. Laviano A, Meguid MM. Nutritional issues in cancer management. Nutrition issues in cancer management. Nutrition 1996;12(5):358-71.

75. Cascino A, Muscaritoli M, Cangiano C, Conversano L, Laviano A, Ariemma S, et al. Plasma amino acid imbalance in patients with lung and breast cancer. Anticancer Res 1995;15:507-10.

76. Muscaritoli M, Conversano L, Petti MC, Cascino A, Mecarocci S, Annicchiarico MA, et al. Plasma amino acid concentrations in patients with acute myelogenous leukemia. Nutrition 1999;15:195-9.

77. Wang F, Permert J. Specific amino acid profile in culture media conditioned by human pancreatic cancer cell lines. Pancreatology 2002;2:402-6.

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

79. Ching N, Grossi C, Jham G, Angers J, Zurawinsky H, Ching CY, et al. Plasma amino acid and serum unesterified fatty acid deficits and the effect of nutritional support in chemotherapy treatment. Surgery 1984;95:730-8.

80. Bennegard K, Lindmark L, Eden E, Svaninger G, Lundholm K. Flux of amino acids across the leg in weight-losing cancer patients. Cancer Res 1984;44:386-93.

81. Naini AB, Dickerson JW, Brown MM. Preoperative and postoperative levels of plasma protein and amino acid in esophageal and lung cancer patients. Cancer 1988;62:355-60.

82. Yamanaka H, Kanemaki T, Tsuji M, Kise Y, Hatano T, Hioki K, et al. Branched-chain amino acid-supplemented nutritional support after gastrectomy for gastric cancer with special reference to plasma amino acid profiles. Nutrition 1990;6:241-5.

83. Georgiannos SN, Weston PM, Goode AW. Correlation between albuminuria and positively charged amino acids in gastrointestinal cancer. Int Surg 1995;80:49–52.

84. Pearlstone DB, Lee JI, Alexander RH, Chang TH, Brennan MF, Burt M. Effect of enteral and parenteral nutrition on amino acid levels in cancer patients. JPEN 1995;19:204–8.

85. 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.

86. Ahola T. Preventive Potential of N-Acetylcysteine in Oxidative Stress-Related Complications of Prematurity (Dissertation). Helsinki: Medical Faculty of the University of Helsinki; 2004.

87. Tossios P, Mehlhorn U. Freie radikale und antioxidantien in der herzchirurgie. Blickpunkt Der Mann 2004;2:36-9.

88. Gamaley I, Efremova T, Kirpichnikova K, Kever L, Komissarchik Y, Polozov Y. N-acetylcysteine-induced changes in susceptibility of transformed eukaryotic cells to bacterial invasion. Cell Biology International 2006;30:319-25.

89. Flora SD, Rossi GA, Flora.AD. Metabolic, dismutagenic and anticarcinogenic effects of N-acetylcysteine. Respiration 1986;50:43-9.

90. Granner DK (Çeviri: N. Dikmen, T. Özgünen). Harper'ın Biyokimyası. İstanbul: Barış Kitabevi;1993:811-4.

91. Agarwal A, Najar UM, Klueh U, Shih SC, Claffey KP. N-acetylcysteine promotes angiostatin production and vascular collapse in an orthotopic model of breast cancer. Am J Pathol 2004;164(5):1683-96.

92. Liu M, Wikonkal NM, Brash DE. Induction of cyclin-dependent kinase inhbitors and G_1 prolongation by the chemopreventive agent N-acetylcysteine. Carcinogenesis 1999;2:1869-72.

93. Kusano C, Takao S, Noma H, Yoh H, Akiu T, Okumura H, et al. N-acetycycteine inhibits cell cycle progression in pancreatic carcinoma cells. Hum Cell 2000;13:213-20.

94. Oesterreich S, Fuqua SAW. Tumor suppressor genes in brest cancer. Endocr-Relat Cancer 1999;6:405-19.

95. Bach SP, Williamson SE, Marshman E, Kumar S, O'Dwyer ST, Potten, CS, et al. The antioxidant N-acetylcysteine ıncreases 5-Fluorouracil activity against colorectal caner xenografts in nude mice. J Gastrointest Surg 2001;5:91-7.

96. Decong H, Qiong L, Hairong C, Hong W, Dingxian H, Huibi X. Effects of amino acids from selenium-rich silkworm pupas on human hepatoma cells. Life Sci 2005;77:2098–110.

97. Ablini A, Morini M, D'Agostini F, Ferrari N, Campelli F, Arena G, et al. Inhibition of angiogenesis-driven kaposi's sarcoma tumor growth in nude mice by oral N-acetylcysteine. Cancer Res 2001;61:8171-8.

98. Kurata S. Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stres. J Biol Chem 2000;275;23:413-6.

99. Lowry O.H, Rosenburgh R, Randall J. Protein measurement with the Folin reagent. J Biol Chem 1951;193:265-75.

100. Chance WT, Cao L, Fischer JE. Tumor-induced alterations in brain neurotransmitter and plasma ammonia concentrations are normalized twenty four hours after tumour resection. Life Sci 1991;48:425-32.

101. Tisdale MJ. Cancer anorexia and cachexia. Nutrition 2001;17:438–42.

102. 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;10:1297-300.

103. Rudman D, Vogler VR, Howard CH, Gerron GG. Observations on the plasma amino acids of patients with acute leukemia. Cancer Res 1971;31:1159-65.

104. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. Sulfur containing amino acids and human disease. Biomed Pharmacother 2004;58:47–55.

105. Birdsall TC. Therapeutic applications of taurine. Alt Med Rev 1998;3:128-36.

106. 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.

107. Zenz M, Hilfrich J, Neuhaus R. Gynecologic cancer and amino acid metabolism. In: Kluthe R, Löhr GW (Eds.). Nutrition and metabolism cancer. Stuttgart: Thieme Verlag; 1981. p.90-4.

108. Granner DK (Çeviri: N. Dikmen, T. Özgünen). Harper'ın Biyokimyası. İstanbul: Barış Kitabevi; 1996:347-59.

109. Cheeseman KH. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. Molec Aspects Med 1993;14:191-7.

110. 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):1015-28.

111. Porembska Z, Luboinski G, Chrzanowska A, Mielczarek M, Magnuska J, Baranczyk-Kuzma A. Arginase in patients with breast cancer. Clin Chim Acta 2003;328:105-11.

112. 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.

113. Russell DM, Shike M, Andersen GH. Amino acid metabolism in small cell lung cancer. J Parenter Enteral Nutr 1981;6:592.

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

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

116. Cascino A, Cangiano C, Ceci F, Franchi F, Mineo M, Mulieri M, et al. Increased plasma free tryptophan levels in human cancer: a tumour related effact? Anticancer Res 1991;11:1313-6.

117. Proenza AM, Crespı C, Roca P, Palou A. Gender related differences in the effect of aging on blood amino acid compartmentation. J Nutr Biochem 2001;12:431-40.

EKLER

EK I

T.C
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKULTESİ
ETİK KURUL KARARLARI

Oturum Sayısı : 14

Karar Tarihi : 27.10.05

6- Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu 27.10.2005 tarihinde **"Deneysel Olarak Oluşturulmuş Meme Tümörlerinde Plazma ve Doku Amino Asid Düzeylerine N-Asetilsistein Etkisinin İncelenmesi"** adlı TÜTFEK 2005/116 protokol no'lu Araş.Gör.Dr. Oya ERTEN'in tez çalışmasını incelemek üzere toplandı. Toplantıya Yrd.Doç.Dr.Hakan ERBAŞ izinli olması nedeniyle katılamadı 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 DÖKMECİ
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.DoçDr.Hakan ERBAŞ
Üye
Biokimya Uzmanı
İzinli

Yrd. Doç. Dr. Ufuk USTA
Üye
Patoloji Uzmanı

Ecz.İmran OĞUZ
Üye
Eczacı

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

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