T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Hakan ERBAŞ

DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULMUŞ MEME TÜMÖRLERİNDE KUERSETİN'İN POLİAMİN METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİ

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Furkan SERİN

EDİRNE – 2025

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince her konuda bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren değerli danışman hocam Tıbbi Biyokimya AD Başkanı Prof. Dr. Hakan ERBAŞ'a, Tıbbi Biyokimya AD öğretim üyeleri Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN'e, Prof. Dr. İlker DIBIRDIK'a, Doç. Dr. Eray ÖZGÜN'e ve Doç. Dr. Gülben SAYILAN ÖZGÜN'e, Histoloji ve Embriyoloji AD öğretim üyesi Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ'a, araştırma görevlisi arkadaşlarıma, Merkez Biyokimya Laboratuvarı personeline, Deney Hayvanları Birimi çalışanlarına, bu süreçte her zaman yanımda olan aileme ve sevgili eşim Dr. Pelin SARI SERİN'e teşekkür ederim.

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: TÜBAP-2023/100).

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ **1**

GENEL BİLGİLER **3**

MEME KANSERİ **3**

POLİAMİNLER **5**

KUERSETİN **9**

GEREÇ VE YÖNTEMLER **12**

BULGULAR **21**

TARTIŞMA **31**

SONUÇLAR **35**

ÖZET **37**

SUMMARY **39**

KAYNAKLAR **41**

EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

ALL : Akut lenfoblastik lösemi
AMD1 : Adenozilmetiyonin dekarboksilaz
AML : Akut miyeloid lösemi
BRCA1 : Breast cancer gene 1 (Meme kanseri geni 1)
BRCA2 : Breast cancer gene 2 (Meme kanseri geni 2)
dcSAM : Dekarboksile S-adenozilmetiyonin
DEHSPM : N1,N14-dietilhomospermin
DENSPM : N1,N11-dietilnorspermin
DFMO : α-difloromet ilornitin
DNA : Deoksiribonükleik asit
HPLC : High performance liquid chromatography (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi)
mRNA : Mesajcı ribonükleik asit
NF-κB : Nükleer faktör kappa B
ODC : Ornitin dekarboksilaz
PAOX : Poliamin oksidaz
RNA : Ribonükleik asit
SAM : S-adenozilmetiyonin
SMOX : Spermin oksidaz
SMS : Spermin sentaz
SRM : Spermidin sentaz
SSAT : Spermidin/spermin N1-asetiltransferaz

STAT-1 : Signal transducer and activator of transcription 1 (Sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü 1)

VEGFR-2 : Vascular endothelial growth factor receptor 2 (Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü 2)

GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, dünyada önde gelen ölüm nedenlerinden biridir ve ortalama yaşam süresinin uzamasını engelleyen sebepler arasında yer almaktadır (1). 2022 yılında dünya genelinde yaklaşık 20 milyon yeni kanser teşhisi konulmuştur. Aynı yılda kanser sonucu 9,7 milyon hasta hayatını kaybetmiştir (2).

Meme kanseri, dünya çapında en sık görülen kanserdir ve kanser sebepli ölümlerin önde gelen nedenidir (3). Yapılan çalışmalar her 8-10 kadından birinin yaşamının bir aşamasında meme kanserine yakalanacağını göstermiştir. Metastaz yapmamış erken dönem meme kanseri tedavi edilebilir bir hastalık olarak kabul edilmektedir (4). Erken evrede kanser teşhisinin uzun vadede ölüm oranlarını azaltabileceği düşünülmektedir (5).

Poliaminler neredeyse tüm canlı hücrelerde bulunan polikatyonik moleküllerdir (6). Putresin, spermidin ve spermin memeli hücrelerinde başlıca bulunan poliaminler olup hücre büyümesi ve bölünmesi için gereklidirler (7). Kanser dokusundaki anormal hiperproliferatif hücrelerin yüksek poliamin seviyelerine gereksinim duyduğu gösterilmiştir (8). Poliaminlerin kanser dokusunda biriktiği ve kanser hastalarının vücut sıvılarında normalden yüksek konsantrasyonda bulunduğu bilinmektedir (9).

Flavonoidler, çoğunlukla bitkilerde bulunan bir organik bileşik ailesidir (10). Kuersetin, soğan ve brokoli gibi çeşitli sebzelerde; elma, çilek ve üzüm gibi çeşitli meyvelerde ve çayda bulunan bir flavonoiddir (11). Yapılan çalışmalarda kuersetinin antiinflamatuar, antikanser, antialerjik ve antioksidan etkileri olduğu gösterilmiştir (12,13).

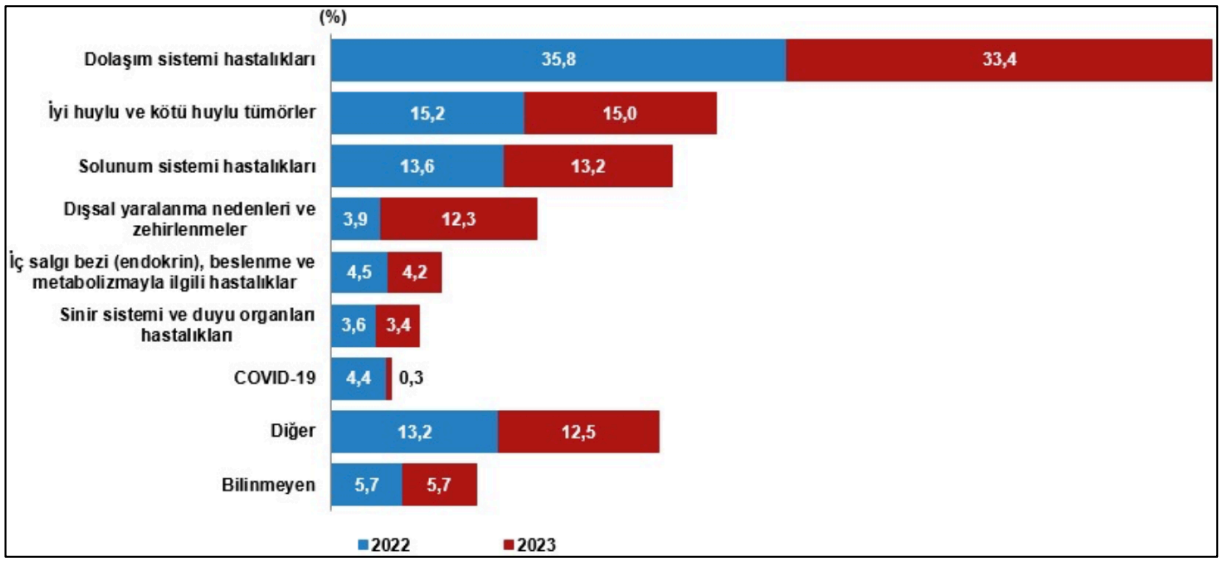
Bu çalışmada, daha önceki çalışmalarla pek çok olumlu etkisi gösterilmiş olan kuersetinin meme kanseri üzerindeki olası tedavi edici rolünün araştırılması planlanmıştır. İlk

kez bu çalışma ile kuersetinin, kanser ile ilişkili olduğu bilinen poliamin metabolizması üzerindeki etkisinin *in vivo* meme kanseri modeli üzerinde incelenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

MEME KANSERİ

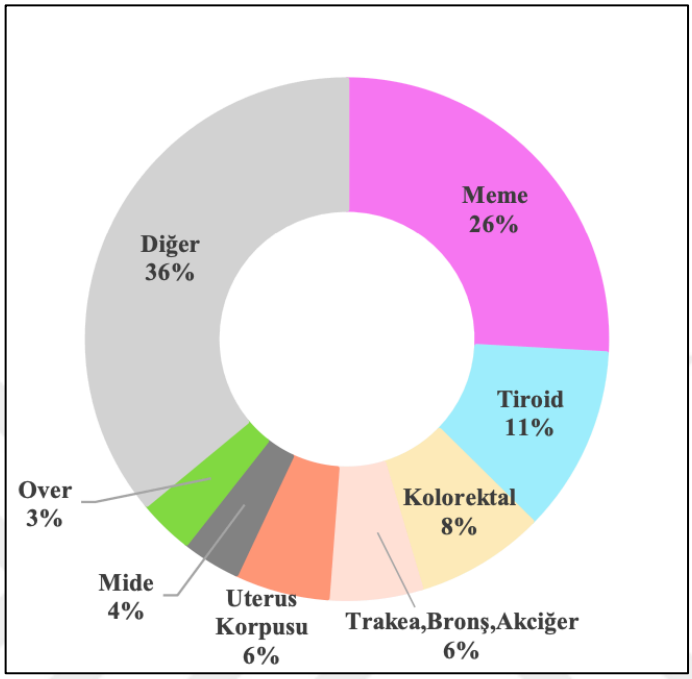
Kanser, vücutta bulunan hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğaldığı ve vücudun diğer bölgelerine yayılabildiği bir hastalıktır (14). Dünya genelinde ölümün önde gelen nedenlerinden biridir. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2019 yılı verilerine göre 183 ülkenin 112'sinde ölümün birinci veya ikinci önde gelen nedenidir. 23 ülkede ise üçüncü veya dördüncü sırada yer almaktadır (15). Türkiye'de 2023 yılı verilerine göre ölüm nedenleri arasında kanser yüzde 15 ile ikinci sırada yer almaktadır (Şekil 1) (16).



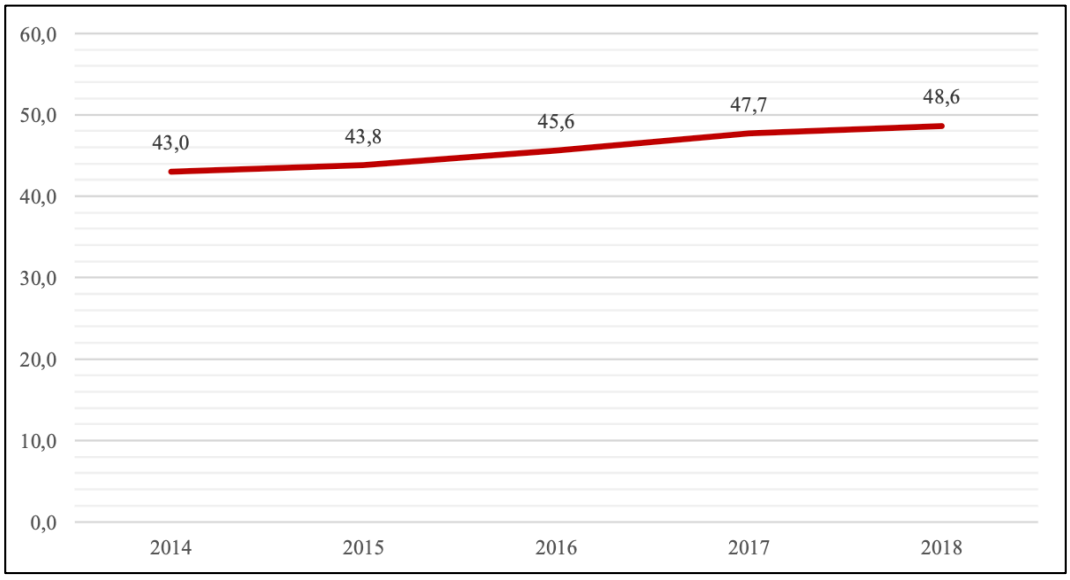
Şekil 1. Türkiye'de 2022 ve 2023 yıllarında nedenlere göre ölüm oranları (16)

Dünya çapında kadınlarda en sık görülen kanser türü meme kanseridir (17). Türkiye'de kadınlarda tanı konulan kanserlerin yüzde 26'sı meme kanseridir. Meme kanserinin ardından

sırasıyla tiroid ve kolorektal kanser gelmektedir (Şekil 2) (18). 2014 yılında kadınlarda yüz bin kişide 43 olan meme kanseri insidansı, 2018 yılına gelindiğinde yüz binde 48,6'ya yükselmiştir (Şekil 3) (18).



Şekil 2. Türkiye'de 2018 yılında kadınlarda en sık görülen kanser türlerinin dağılımı (18)



Şekil 3. Türkiye'de 2014-2018 yılları arasında kadınlarda meme kanseri insidansı (100.000 kişide) (18)

Risk Faktörleri

Yaşlanma: Meme kanseri insidansının artan yaş ile ilişkili olduğu bilinmektedir (19).

Genetik mutasyonlar: BRCA1 ve BRCA2 genlerinde meydana gelen mutasyonların meme kanseri gelişme riskini artırdığı gösterilmiştir. Meme kanserlerinin yaklaşık %5 ila %10'u kalıtsal genetik mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (20).

Menarş ve menopoz yaşı: Erken menarş ve geç menopozun, östrojen ve diğer hormonlara maruz kalınan süreyi uzatması sebebiyle meme kanseri riskini artırdığı tespit edilmiştir (19,20).

Meme kanseri öyküsü: Daha önce meme kanseri geçirmiş olan kadınlarda tekrar meme kanseri görülme riskinin arttığı gösterilmiştir (20).

Ailede meme kanseri öyküsü: Meme kanseri vakalarının yaklaşık dörtte birinin aile öyküsüyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Annesi veya kız kardeşinde meme kanseri öyküsü olan kadınlarda meme kanseri riskinin arttığı bilinmektedir (19).

Obezite: Menopoza girmiş kadınlarda obezitenin meme kanseri riskini artırdığı gösterilmiştir (20).

Hormon replasman tedavisi: Östrojen ve progesteronu birlikte içeren kombine hormon replasman tedavisi alınan her yıl için meme kanseri riskinin yaklaşık %8 oranında arttığı tespit edilmiştir (20).

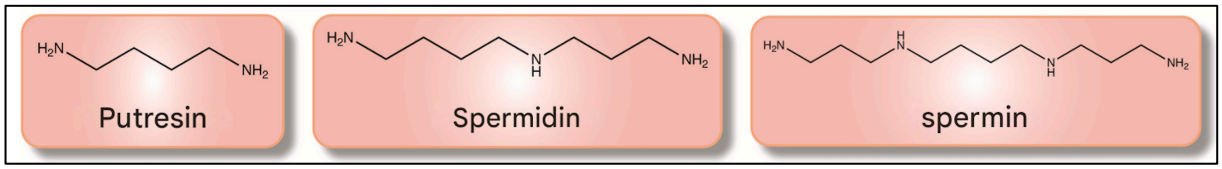
Üreme geçmişi: 30 yaşına kadar tam süreli gebelik geçirmemiş olmanın ve az sayıda doğum yapmış olmanın meme kanseri riskini artırdığı gösterilmiştir (19,20).

Yaşam tarzı: Diyetle çok fazla yağ tüketmenin ve aşırı alkol alımının meme kanseri riskini artırdığı bilinmektedir (19).

POLİAMİNLER

Poliaminler pek çok canlı organizmada bulunan organik polikatyonik bileşiklerdir. En az 2 amino grubuna sahip alifatik yapılı moleküllerdir (7). Ökaryotik hücrelerin

sitoplazmalarında milimolar seviyelerinde bulunurlar (21). Yapılarında bulunan amino grupları sayesinde fizyolojik pH aralığında pozitif yüklüdürler. Memeli hücrelerde bulunan başlıca poliaminler; putresin, spermidin ve spermindir (Şekil 4) (22). İnsanlarda poliamin kaynakları besinler, hücre içinde biyosentez ve bağırsakta mikrobiyal sentezdir (6). Poliaminlerin hücre içi seviyeleri; sentez, yıkım ve hücre membranından taşınma aracılığıyla kontrol edilmektedir (21).



Şekil 4. Poliaminlerin moleküler yapısı (23)

Poliaminler embriyonik gelişme, farklılaşma, hücresel büyüme ve çoğalma gibi önemli fonksiyonlar için gereklidirler (7). Pozitif yüklü amino gruplarının negatif yüklü deoksiribonükleik asit (DNA), ribonükleik asit (RNA), protein ve fosfolipitlerle etkileşime girmesi aracılığıyla çeşitli hücresel süreçler üzerinde etki gösterirler (24-26). Yapılan çalışmalar poliaminlerin; kromatin organizasyonu, deoksiribonükleik asit (DNA) replikasyonu, transkripsiyonu, translasyonu, iyon taşınması ve membran dinamiklerini düzenlediğini göstermiştir (6). Görev aldıkları hücresel fonksiyonların normal işleyişinin sağlanması için poliamin homeostazı sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir (27). Bu kontrol, poliamin metabolizmasında görevli olup hormonal uyarılara ve değişen poliamin düzeylerine yanıt veren çeşitli anahtar enzimler aracılığıyla sağlanmaktadır (28).

Hızlı büyüme geçiren dokularda poliaminler birikerek seviyeleri artar. Poliamin biyosentezindeki bozuklukların, Alzheimer hastalığı ve çeşitli kanser türlerinin gelişmesi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (27,29,30). Kanser hastalarının tümör hücre ve dokularında, idrarında ve serumunda poliamin seviyelerinin normalden yüksek olduğu gösterilmiştir (31-33). Artmış poliamin seviyelerinin tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını desteklediği bilinmektedir. Poliamin sentezinde görevli ornitin dekarboksilaz (ODC) ve adenozilmetiyonin dekarboksilaz (AMD1) enzim seviyelerinin pek çok kanser türünde artmış olduğu saptanmıştır (6). Kanser ve poliaminler arasındaki ilişkiden yola çıkarak, meme kanseri hastalarında poliaminlerin tanısal yaklaşımda kullanılabileceği gösterilmiştir (34). Yapılan çalışmalar poliamin metabolizmasının birçok onkojen için hedef olduğunu göstermiştir (35). Poliamin üretiminin mutasyonlarla veya farmakolojik olarak azalmasının, kanser hücrelerinde yaşlanma

ve apoptoza sebep olduğu tespit edilmiştir (8,36). Poliamin metabolizmasının kanser tedavisi için bir hedef olabileceği düşünülmektedir (7).

Poliamin Metabolizması

Poliamin biyosentezi hücrelerin sitoplazmasında gerçekleşir (7). Sentezde ilk olarak putresin sentezlenir. ODC enziminin katalizlediği reaksiyonda, üre döngüsünde yer alan bir aminoasit olan ornitin, dekarboksilasyona uğrayarak putresine dönüşür. Bu basamak, poliamin biyosentezindeki ilk hız kısıtlayıcı basamaktır (6). ODC seviyeleri hücrenin ihtiyacına göre çeşitli geri bildirim mekanizmaları aracılığıyla kontrol edilmektedir (37).

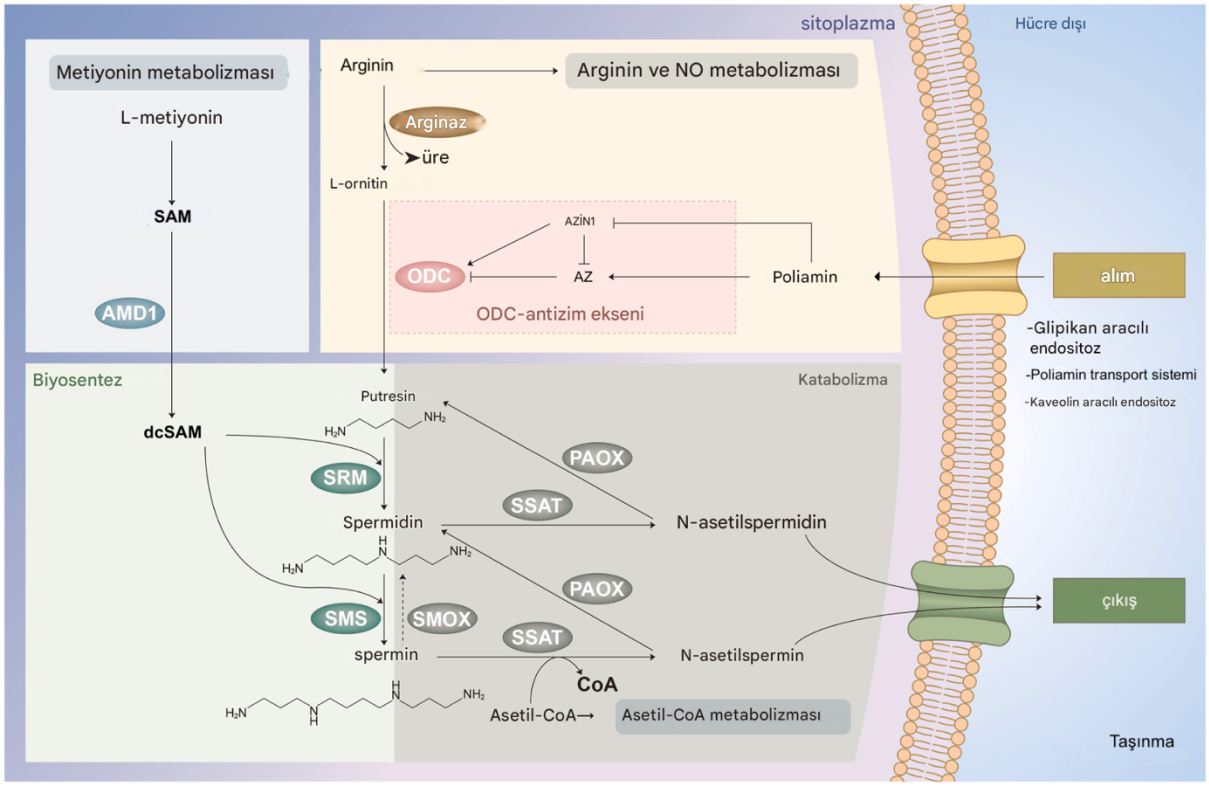
Putresinden sırasıyla spermidin ve spermin sentezlenir. Bu iki basamak bir aminopropil grubu eklenme reaksiyonudur. Bu reaksiyonlarda aminopropil grubunu vericisi dekarboksile S-adenozilmetiyonindir (dcSAM). Spermidin sentaz (SRM) enzimi, putresinden spermidini sentezler. Spermidinden spermini sentezleyen enzim ise spermin sentazdır (SMS) (38).

Poliamin sentezindeki ikinci hız kısıtlayıcı basamağın enzimi AMD1'dir. Bu enzim S-adenozilmetiyonini (SAM) dekarboksilleyerek, spermidin ve sperminin sentezlendiği basamaklarda aminopropil grubu vericisi olan dekarboksile S-adenozilmetiyonini (dcSAM) sentezler (6). AMD1 enzim seviyesi geri bildirim aracılığıyla hücredeki poliamin miktarına göre düzenlenmektedir (39).

Poliaminlerin katabolizmasında spermidin/spermin N1-asetiltransferaz (SSAT) isimli enzim görevlidir. Bu enzim spermidin ve spermine asetil grubu ekleyen reaksiyonu katalizler. Bu reaksiyonlar sonucunda sırasıyla N1-asetilspermidin ve N1-asetilspermin oluşur (35). Bu asetillenmiş poliamin türevleri hücre dışına taşınabilir. Aynı zamanda poliamin oksidaz (PAOX) isimli enzimin katalizlediği reaksiyonlarda, N1-asetilspermidin ve N1-asetilspermin oksitlenerek sırasıyla putresin ve spermidine dönüşür. Spermin oksidaz (SMOX) isimli enzim, spermini oksitleyerek spermidine dönüştürür (22). Poliamin metabolizmasının tüm basamaklarını özetleyen görsel aşağıda verilmiştir (Şekil 5).

Poliaminlerin Kanserle İlişkisi

Tümör hücreleri dahil hızlı büyüyen hücrelerde poliamin sentezinde görevli enzimlerin aktivitesi yüksek bulunmuştur (40). Yüksek poliamin seviyelerinin; nöroblastom, hepatoselüler karsinom, mide, prostat, akciğer, meme ve kolorektal kanserin ilerlemesiyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir (36,41-46).



Şekil 5. Poliamin metabolizması (7)

Pek çok kanserde Myc onkojeninin aşırı eksprese edildiği bilinmektedir (38). ODC enziminin, Myc onkojeninin transkripsiyonel hedefi olduğu gösterilmiştir (47). Artan Myc ekspresyonu sonucunda ODC enzimini kodlayan mesajcı ribonükleik asit (mRNA) sentezi artar. Bunun sonucunda ODC enzim miktarı artarak, poliamin sentezi hızlanır. Bu sayede, kanser hücresinin çoğalmak için ihtiyaç duyduğu poliamin artışı sağlanmış olur (38). Myc onkojeninin ODC aracılığıyla poliamin metabolizmasını etkilemesi; lösemi, akciğer kanseri, nöroblastom, meme kanseri ve pankreas kanserinde önemli rol oynamaktadır (48-53). Artmış ODC aktivitesinin meme kanseri hastalarında kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (54). Kolon kanser dokusunda ODC miktarının komşu sağlıklı dokuya kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır (55). AMD1 enziminin de Myc onkojeninin transkripsiyonel hedefi olduğu bilinmektedir (56). Prostat kanserinde AMD1 aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (57).

Bir başka onkojen olan Ras aktivasyonunun tümör hücrelerinde yüksek poliamin seviyeleriyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bu etkiyi hücre içine poliamin alımını artırarak ve poliamin katabolizmasında görevli spermidin/spermin N1-asetiltransferaz (SSAT) enzim aktivitesini azaltarak gösterdiği düşünülmektedir (58,59).

Tümör baskılayıcı p53 geninin tümör dokusunda spermidin/spermin N1-asetiltransferaz (SSAT) enzim aktivitesini artırarak, demire bağımlı bir hücre ölümü olan ferroptoz aracılığıyla

antitümör etki gösterdiği bulunmuştur (60). Bunun yanında p53 geninin ODC translasyonunu baskılayarak poliamin sentezini azalttığı da bilinmektedir (61).

Poliaminlerin, bağışıklık sistemini baskılayarak kanser hücrelerinin immün yanıttan kaçmasını sağladığı gösterilmiştir (62).

İdrar ve serumdaki poliamin ve metabolitlerinin; akciğer, karaciğer, over, kolon, prostat ve pankreas kanser tanısı için bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir (31,63-67). Lösemi hücrelerinde yüksek poliamin seviyelerinin kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (7). Akut lenfoblastik lösemide (ALL) hastalığın nüksü eritrositlerde artmış spermin seviyeleriyle tanımlanabilmektedir (68).

Poliaminlerin hücre çoğalması için gerekli olması sebebiyle pek çok kanserin, tedavi amacıyla poliamin metabolizmasının hedef alınmasına duyarlı olabileceği düşünülmektedir (38). ODC inhibitörü olan α-diflorometilornitinin (DFMO), Myc güdümlü B hücreli lenfoma modeli farelerde ve n-Myc güdümlü nöroblastom modeli farelerde tümör gelişimini bozduğu gösterilmiştir (56,69). Nöroblastom tedavisinde α-diflorometilornitin (DFMO) klinik faz 2 aşamasındadır (70). N1,N11-dietilnorspermin (DENSPM) ve N1,N14-dietilhomospermin (DEHSPM), yapısal olarak poliaminlere benzeyen ancak fonksiyonel olmayan poliamin analoglarıdır (7,38). Bu analoglar poliamin sentezini azaltma, yıkımını artırma ve hücre içine alımını engelleme aracılığıyla poliamin seviyelerini düşürerek etki göstermektedir (38). N1,N11-dietilnorspermin (DENSPM) pek çok insan kanser hücre hattına karşı antikanser aktivite göstermiş ve hepatoselüler karsinom, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, meme kanseri tedavisi için klinik faz çalışmalarında denenmiştir. N1,N14-dietilhomospermin (DEHSPM) ise lösemi, beyin tümörü, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, prostat kanseri ve melanom hücre hatları üzerinde antiproliferatif etki göstermiştir (7).

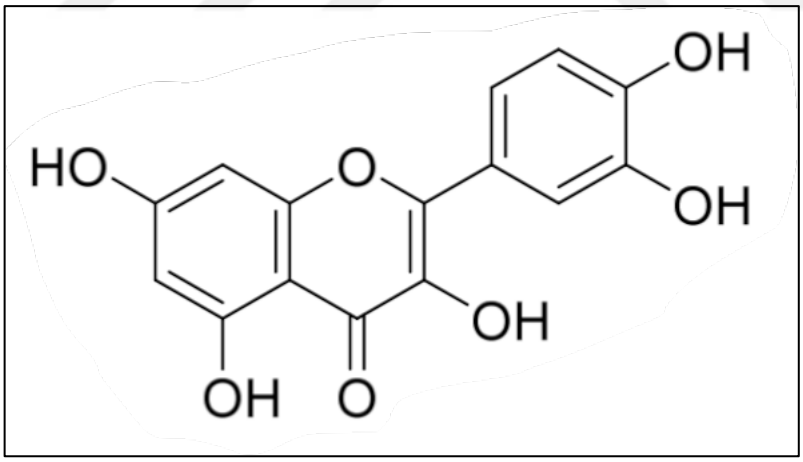
KUERSETİN

Günümüzde kanser tedavisinde cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi yöntemleri kullanılmaktadır (71). Kanser hücrelerinin kemoterapi ajanlarına karşı ilaç direnci oluşturması, adjuvan veya alternatif ilaçların geliştirilmesini gerekli kılmaktadır (72). İnsan diyetinde bulunan pek çok bileşenin meme kanseri ile ilişkili moleküler olayları ve sinyal yolaklarını inhibe ettiği tespit edilmiş ve bu sebeple kanser tedavisinde potansiyel bir alternatif strateji olabilecekleri düşünülmüştür (73).

Pek çok çalışma bitkisel bazlı diyetin, tümör başlangıcıyla ilişkili hastalıkları önlemede rolü olabileceğini göstermiştir (74). Flavonoidler, bitkilerde yaygın olarak bulunan polifenol yapısına sahip bir organik bileşik ailesidir (75). Nörolojik bozukluklar, diyabet, kanser ve

arteriyoskleroz gibi çeşitli hastalıklarda tedaviyi destekleyici olarak kullanılabilecekleri düşünülmektedir (76). Antikanser, antiinflamatuar, antioksidan, antiviral ve antialerjik etkileri olduğu gösterilmiştir (77). Kanser karşıtı etkilerini proliferasyon, apoptoz ve anjiyogenez yolaklarını düzenleyerek gösterdikleri düşünülmektedir (77).

Kuersetin (3,3′,4′,5,7-pentahidroksiflavon), flavonoid bileşik ailesinin flavonoller grubuna ait organik bir moleküldür (78). Moleküler yapısında piran halkasına bağlı iki adet benzen halkası bulunmaktadır (Şekil 6) (79). Soğan, maydanoz ve brokoli gibi sebzeler, elma çilek ve turunçgiller gibi meyvelerin yanı sıra baklagiller, yeşil çay ve kırmızı şarapta bulunduğu gösterilmiştir (72,77,80,81). Avrupa'da diyetle yaklaşık olarak günlük 25 mg tüketildiği tahmin edilmektedir (82). Antikanser, antiinflamatuar, antialerjik, antiviral ve kardiyoprotektif etkileri olduğu bilinmektedir (12,13,80). Antioksidan, antiproliferatif, hücre döngüsünü durdurucu, apoptoz indükleyici, onkojen ekspresyonunu azaltıcı, inflamasyon ve anjiyogenezi inhibe edici mekanizmalarla kanser karşıtı etki gösterdiği düşünülmektedir (72,77,83). Yapılan *in vitro* deneylerde kuersetinin prostat, karaciğer, meme, pankreas kanseri, melanom, osteosarkom, kolon ve mide kanserine karşı antitümör aktivite gösterdiği bulunmuştur (84-91).



Şekil 6. Kuersetinin moleküler yapısı (78)

Kuersetin, antioksidan etkisini serbest radikalleri temizleyerek ve lipit peroksidasyonunu inhibe ederek gösterir (92,93). Lösemi, meme kanseri ve over karsinomu hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalar kuersetinin hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğunu göstermektedir (94-96). Yapılan başka bir çalışmada meme kanseri hücresinde siklin D1, p21 ve Twist ekspresyonunu baskılayarak hücre döngüsünün G1 fazını etkilediği tespit edilmiştir (77). Kanser tedavi hedeflerinden biri apoptozun indüklenmesidir (96).

Kuersetin tedavisinin akut miyeloid lösemi (AML), melanom ve over kanseri hücre hatları üzerinde apoptozu indüklediği bilinmektedir (97-99). Apoptozu indükleyici etkisini kaspaz 3, 8 ve 9'u aktive ederek, proapoptotik Bax ve Bad protein ekspresyonunu artırarak ve antiapoptotik Bcl-2 protein ekspresyonunu azaltarak göstermektedir (72). Meme kanseri hücre hattında kuersetin tedavisinin p53 tümör supresör ekspresyonunu artırdığı tespit edilmiştir (77). Antiinflamatuar etkisini, "signal transducer and activator of transcription 1" (STAT-1) ve nükleer faktör kappa B (NF-κB) aktivasyonunu engelleyerek göstermektedir (100). Prostat ve meme kanserinde "vascular endothelial growth factor receptor 2" (VEGFR-2) aracılı anjiyogenezi baskılayarak tümör büyümesini yavaşlattığı düşünülmektedir (101,102). Meme kanseri ve kolon karsinomu taşıyan fare modellerinde tümör hacmini azalttığı gözlemlenmiştir (103). İn vivo yapılan bir çalışma kuersetin tedavisinin kolorektal kanserin akciğere metastazını azalttığını göstermiştir (104). Kemoterapiye dirençli triple negatif insan meme kanseri hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada siklofosfamide karşı duyarlılığı artırarak ilaç direncini azaltabileceği tespit edilmiştir (105). On iki çalışmanın dahil edildiği bir meta analizde, kuersetinin de dahil olduğu flavonol tüketimi yüksek olan kadınlarda düşük olanlara kıyasla meme kanseri riski %12 daha düşük bulunmuştur (106). Kolon kanseri hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada kuersetin uygulamasının hücredeki poliamin seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (107).

Bu çalışmada antikanser aktivite dahil olmak üzere pek çok olumlu etkisi önceki çalışmalar ile gösterilmiş bir flavonoid olan kuersetinin, meme kanseri üzerindeki olası tedavi edici rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, deneysel olarak meme kanseri oluşturulmuş farelerde kuersetin tedavisinin serum ve tümör dokusundaki poliamin düzeyleri ve tümör doku histopatolojisi üzerindeki etkilerinin incelenmesi planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu tez çalışması Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 28.09.2022 tarihinde TÜHADYEK-2022/31 protokol numarası ve 2022.09.03 karar numarası ile onay alınarak yapılmıştır (Ek 1). Biyokimyasal deney çalışmaları Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Tümör dokularının histopatolojik incelemesi Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TÜBAP-2023/100 proje numarası ile finansal olarak desteklenmiştir.

GEREÇLER

Deney Grupları

Çalışmada ortalama ağırlıkları 35±3 gram olan, 10-12 haftalık, 50 adet sağlıklı erişkin erkek Balb/c cinsi fare kullanıldı. Fareler Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edildi. Her grup için rastgele 10 adet fare seçilerek beş deney grubu oluşturuldu. Tüm fare grupları deney boyunca ayrı kafeslerde ve fizyolojik gereksinimlerine uygun olacak şekilde %50-60 nem oranında, 22±1°C sıcaklıkta, 12 saat aydınlık-12 saat karanlık periyoda sahip ortamda tutuldu. Deney boyunca su ve standart fare yemi günlük olarak verildi.

Fareler 12 haftalık olduğunda 3., 4. ve 5. gruptaki farelerin sol bacak içi bölgesine subkutan yolla 200 µL Ehrlich assit tümör hücresi enjekte edildi. Enjeksiyon sonrası 8. günde solid tümör çapının 1 cm olduğu tespit edilerek deneye başlandı. Toz formdaki kuersetin; %5 DMSO, %10 Tween-80, %85 serum fizyolojik içeren çözücüde çözüldü.

1. Grup (n=10): Sağlıklı Kontrol Grubu olarak kabul edildi. Bu gruba 14 gün boyunca her gün aynı saatte intraperitoneal yolla 200 µL çözücü enjekte edildi.

2. Grup (n=10): Sağlıklı Tedavi Grubu olarak kabul edildi. Bu gruba 14 gün boyunca her gün aynı saatte intraperitoneal yolla 200 µL çözücü içerisinde 10 mg/kg kuersetin enjekte edildi.

3. Grup (n=10): Tümör Kontrol Grubu olarak kabul edildi. Ehrlich assit tümör hücresi enjeksiyonu sonrası 8. günden itibaren 14 gün boyunca her gün aynı saatte intraperitoneal yolla 200 µL çözücü enjekte edildi.

4. Grup (n=10): Tedavi Grubu 1 olarak kabul edildi. Ehrlich assit tümör hücresi enjeksiyonu sonrası 8. günden itibaren 14 gün boyunca her gün aynı saatte intraperitoneal yolla 200 µL çözücü içerisinde 10 mg/kg kuersetin enjekte edildi.

5. Grup (n=10): Tedavi Grubu 2 olarak kabul edildi. Ehrlich assit tümör hücresi enjeksiyonu sonrası 8. günden itibaren 14 gün boyunca her gün aynı saatte intraperitoneal yolla 200 µL çözücü içerisinde 30 mg/kg kuersetin enjekte edildi.

14 günlük deneyin ardından 15. günde deney sonlandırılarak farelerden anestezi altında intrakardiyak kan alımı ve tümör dokusu çıkarılması işlemi yapıldı. Sakrifikasyon öncesi tüm fareler 5 mg/kg ketamin ve 60 mg/kg ksilazin ile anestezi altına alındı. Çıkarılan tümör dokuları önceden soğutulmuş buzlu serum fizyolojik ile yıkanıp ardından kurulandı. Alınan kan örnekleri biyokimya serum tüplerine alındıktan sonra 10 dakika boyunca 2500 g'de santrifüj edilerek serum elde edildi. Serum ve doku örnekleri -80°C sıcaklıkta biyokimyasal ölçümlerin yapılacağı güne kadar saklandı. Histopatolojik incelemede kullanılacak olan tümör dokuları formaldehitte tespit edilerek saklandı.

Kullanılan Kimyasal Maddeler

1,7-diaminoheptan ($NH_2(CH_2)_7NH_2$)	(Sigma-Aldrich, Almanya)
Albümin	(Sigma-Aldrich, ABD)
Bakır(II) sülfat ($CuSO_4$)	(Sigma-Aldrich, Birleşik Krallık)
Benzoil klorür (C_6H_5COCl)	(Sigma-Aldrich, Almanya)
Dimetilsülfoksit ($(CH_3)_2SO$)	(Carlo Erba, İtalya)
Folin-Ciocalteu'nun fenol reaktifi	(Merck, Almanya)
Hidroklorik asit (HCl)	(Sigma-Aldrich, Avusturya)
Kloroform ($CHCl_3$)	(Carlo Erba, Fransa)
Kuersetin ($C_{15}H_{10}O_7$)	(Sigma-Aldrich, Çin)
Metanol (CH_3OH)	(Merck, Almanya)

Perklorik asit ($HClO_4$)	(Merck, Almanya)
Potasyum sodyum tartarat tetrahidrat ($KNa(COO)_2(CHOH)_2.4H_2O$)	(Sigma-Aldrich, Japonya)
Putresin ($NH_2(CH_2)_4NH_2$)	(Sigma-Aldrich, Almanya)
Sodyum hidroksit (NaOH)	(İsolab, Almanya)
Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	(İsolab, Almanya)
Spermidin ($NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$)	(Sigma-Aldrich, İsviçre)
Spermin ($NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$)	(Sigma-Aldrich, İsviçre)
Tris(hidroksimetil)aminometan ($NH_2C(CH_2OH)_3$)	(Sigma-Aldrich, ABD)
TWEEN® 80 (Polietilen glikol sorbitan monooleat)	(Sigma-Aldrich, Almanya)

Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri

HPLC cihazı	(Waters 2690, ABD)
Kolon	(Waters Spherisorb ODS2 3 µm 4.6x150 mm, ABD)
Guard kolon	(Waters Symmetry C18 Sentry 5 µm 3.9x20 mm, ABD)
UV dedektör	(Waters 2487, ABD)
Homojenizatör	(Heidolph DIAX 900, Almanya)
Mikroplaka okuyucu spektrofotometre	(Biotek µQuant, ABD)
Soğutmalı Santrifüj	(Hettich Universal 30 RF, Almanya)
Soğutmalı Santrifüj	(Heraeus Biofuge Stratos, Almanya)
Otomatik pipetler	(Eppendorf Research, Almanya)
Elektronik hassas tartı	(Sartorius, Almanya)
pH metre	(İnolab pH Level 1, Almanya)
Su banyosu	(GFL 1083, Almanya)
Etüv	(Memmert 400, Almanya)
Manyetik karıştırıcı	(Daihan Scientific, Güney Kore)
Distile su cihazı	(Kros Rentro İmmu, Türkiye)
-80°C buzdolabı	(Heraeus, Almanya)
Vorteks	(Velp Scientifica, İtalya)

YÖNTEMLER

Tümör Dokusunda Protein Düzeyinin Lowry Metodu ile Ölçümü

Alınan tümör dokusundaki protein düzeyinin tayininde Lowry metodu kullanıldı (108). Bu metot protein yapısındaki peptit bağlarının alkali ortamda bakır ile kompleks oluşturması

prensibine dayanmaktadır. Protein yapısındaki her 7 ila 8 amino asit artığı 1 bakır iyonu ile kompleks oluşturur. Protein içeren ve bakır ayıracı ile muamele edilmiş örneğe fenol reaktifi eklendiğinde mavi-mor renk oluşumu gözlenir. Oluşan bu rengin absorbansı 660 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür.

Deneyde kullanılacak ayıraçların hazırlanışı:

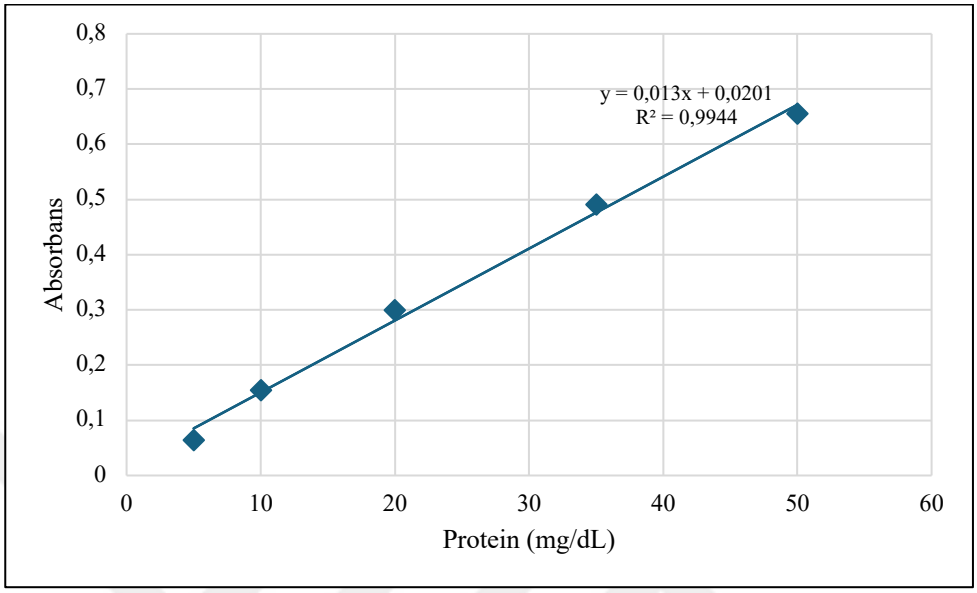
Alkali bakır ayıracı: Öncelikle 0,5 N konsantrasyonda NaOH çözeltisi hazırlanır. Ardından 10 g Na_2CO_3, 250 mg K-Na tartarat ve 50 mg $CuSO_4$ ayrı ayrı tartıldıktan sonra bir miktar 0,5 N NaOH çözeltisiyle çözülür. Oluşan çözelti balon jojeye aktarılıp 0,5 N NaOH ile 100 mL'ye tamamlanır. Hazırlanan bu çözelti buzdolabında +4°C'de 1 aya kadar saklanabilir.

Fenol ayıracı: 2 N konsantrasyonu olan folin reaktifinden 2,5 mL alınıp distile su ile 45 mL'ye tamamlanır. Bu ayıracın her kullanım öncesi taze olarak hazırlanması gerekmektedir.

Protein standart çözeltileri: 100 mg albümin tartılıp bir miktar distile suda çözülür. Ardından balon joje içerisinde distile su ile 100 mL'ye tamamlanır. 100 mg/dL konsantrasyonda stok albümin çözeltisi elde edilmiş olur. Bu stok çözeltiden istenilen oranlarda dilüsyon yapılarak standart grafiği oluşturmak için kullanılacak 5, 10, 20, 35 ve 50 mg/dL konsantrasyonlarında protein standart çözeltileri hazırlanır.

Deneyin yapılışı: Tümör dokuları -80°C'den çıkarılıp yaklaşık 15-20 dakika oda sıcaklığında bekletilerek çözülmeleri sağlandı. Ardından hassas teraziyle ağırlıkları ölçüldü. Miligram birimindeki ağırlıklarının 10 katına karşılık gelen µL birimi hacminde soğuk 0,05 M Tris/HCl tamponu (pH: 8,05) ile homojenize edildi. Doku homojenizatları 8000 g'de +4°C'de 20 dakika süreyle santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Süpernatantlar 1:49 oranında serum fizyolojikte sulandırılıp vorteks ile karıştırıldı. Kör, standart ve deney tüpleri hazırlanıp numaralandırıldı. Kör tüpüne 200 µL distile su, standart tüplerine her bir standarttan 200 µL ve deney tüplerine serum fizyolojikle sulandırılmış süpernatantlardan 200 µL konuldu. Ardından her bir tüpe 200 µL alkali bakır ayıracı eklenip vorteks ile karıştırıldı. Bu karışım 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra her bir tüpe 800 µL fenol ayıracı eklenip vorteks ile karıştırıldı. Ardından 30 dakika süreyle su banyosunda 37°C'de inkübe edildikten sonra tüplerin absorbansları 660 nm dalga boyunda köre karşı ölçüldü. Farklı konsantrasyonlardaki protein standartlarının absorbansları kullanılarak standart grafiği oluşturuldu (Şekil 7). Örneklerdeki

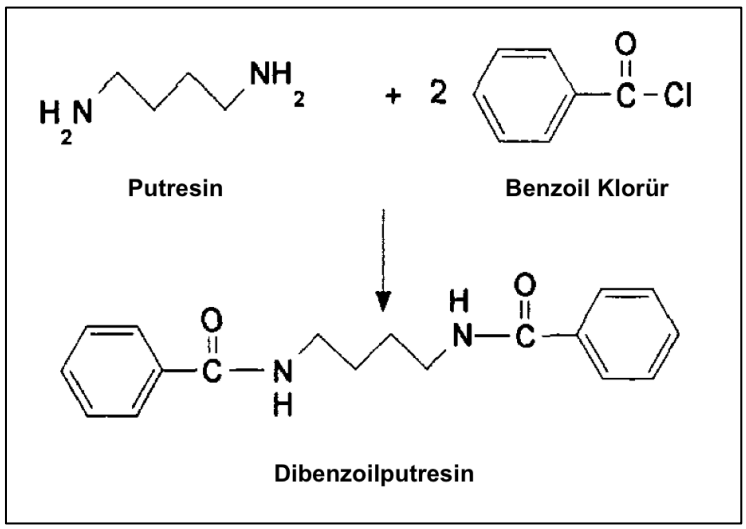
protein konsantrasyonu standart grafiğindeki formül ve sulandırma katsayısı dikkate alınarak hesaplandı.



Şekil 7. Protein standart grafiği

Poliamin Düzeylerinin "High Performance Liquid Chromatography" (HPLC) Yöntemi ile Ölçümü

Poliamin düzeyleri, HPLC yöntemi kullanılarak Taibi ve ark. (109) tarafından geliştirilen bir metotla ölçüldü. Bu metot alkali ortamda poliaminlerin yapısındaki amino gruplarına benzoil grubu bağlanarak derivatize edilmesi prensibine dayanmaktadır (Şekil 8).



Şekil 8. Benzoil grubunun putresine bağlanma reaksiyonu (110)

Deneyde kullanılacak ayıraçların hazırlanışı:

2 M NaOH: 20 g NaOH tartılıp bir miktar distile suda çözülür. Ardından balon jojeye aktarılıp distile su ile 250 mL'ye tamamlanır.

0,1 M NaOH: 2 g NaOH tartılıp bir miktar distile suda çözülür. Ardından balon jojeye aktarılıp distile su ile 500 mL'ye tamamlanır.

40 µM 1,7-diaminoheptan içeren 1 M perklorik asit: Balon jojeye bir miktar distile su eklendikten sonra 21,06 mL perklorik asit yavaşça eklenir. Bu çözelti distile suyla 250 mL'ye tamamlandığında 1 M perklorik asit hazırlanmış olur. Ardından 52,1 mg 1,7-diaminoheptan tartılıp 100 mL 1 M perklorik asit içinde çözülerek 4 mM stok çözelti hazırlanır. Bu stok çözelti 1 M perklorik asit çözeltisiyle 1:99 oranında seyreltilerek 40 µM 1,7-diaminoheptan içeren 1 M perklorik asit çözeltisi hazırlanmış olur.

Poliamin standart çözeltisi: Putresin, spermidin, sperminin ve 1,7-diaminoheptanın (internal standart) her birini 1 mM konsantrasyonda içeren standart çözeltisi hazırlanır. Bunun için 44,1 mg putresin, 72,6 mg spermidin, 101,2 mg spermin ve 65,1 mg 1,7-diaminoheptan tartılıp bir miktar distile suda çözülür. Bu çözelti balon jojeye aktarılıp distile suyla 500 mL'ye tamamlanır.

Solvent A: %100 distile su kullanılmıştır. Kullanım öncesi 0,2 µm gözenek çapına sahip membran filtreden geçirilerek gazdan arındırılmıştır.

Solvent B: HPLC saflık derecesine sahip %100 metanol kullanılmıştır

Serum ve doku örneklerinin "high performance liquid chromatography" (HPLC) için hazırlanması: Deney gününe kadar -80°C sıcaklıkta saklanan tümör dokuları oda sıcaklığına çıkarılıp yaklaşık 15-20 dakika bekletilerek çözülmeleri sağlandı. Ardından hassas teraziyle ağırlıkları tartıldı. Miligram birimindeki ağırlıklarının 5 katına karşılık gelen µL birimi hacminde soğuk 1 M perklorik asit (internal standart olarak 40 µM 1,7-diaminoheptan içeren) ile homojenize edildi. 15 dakika boyunca +4°C'de 20.000 g'de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi.

Deney gününe kadar -80°C sıcaklıkta saklanan serum örnekleri oda sıcaklığına çıkarılıp yaklaşık 15-20 dakika bekletilerek çözülmeleri sağlandı. Deney tüpüne aktarılan 150 µL serum

üzerine 200 µL 1 M perklorik asit (internal standart olarak 40 µM 1,7-diaminoheptan içeren) eklenip vorteks ile karıştırıldı. Ardından 15 dakika boyunca +4°C'de 20.000 g'de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi.

Deneyin yapılışı: Elde edilen doku süpernatantlarından 500 µL ve serum süpernatantlarından 250 µL alınıp deney tüplerine aktarıldı. Ardından üzerlerine sırasıyla 1 mL 2 M NaOH ve 5 µL benzoil klorür eklenip vorteksle karıştırıldı. 20 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra deney tüplerine 2 mL kloroform eklendi. 2 kere 1'er dakika süresince vorteksle karıştırıldıktan sonra 5 dakika boyunca 2000 g'de santrifüj edildi. Üstteki sulu faz atılarak alttaki organik faz ile deneye devam edildi. Deney tüplerine 2 mL 0,1 M NaOH eklendikten sonra 2 kere 5'er dakika süresince vorteksle karıştırıldı. Üstteki sulu faz yine atıldıktan sonra alttaki organik faz üzerine tekrardan 2 mL 0,1 M NaOH eklenip 2 kere 5'er dakika süresince vorteksle karıştırıldı. Ardından alttaki organik fazdan 1 mL alınıp azot akışı altında kuruyana kadar buharlaştırıldı. Kuruyan kalıntı üzerine 200 µL %60'lık metanol eklenip hafifçe vorteksle karıştırılarak çözüldü. Bu çözelti gözenek çapı 0,2 µm olan filtrelerden geçirilip viallere aktarılarak HPLC cihazına yüklendi.

Kromatografik ayrışma için HPLC cihazı ve Waters Spherisorb ODS2 C18 kolonu kullanıldı. Analizler 229 nm dalga boyunda ultraviyole dedektörle yapıldı. Solvent akış hızı 0,8 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 20 µL olacak şekilde ayarlandı. Ölçüm sırasında sistem basıncının 2200-2300 psi aralığında olduğu gözlemlendi. Derivatize edilmiş olan poliaminler solvent A ve solvent B'nin karışımı olan 15 dakikalık mobil faz gradiyenti kullanılarak ayrıştırıldı (Tablo 1). Kolon ve dedektör stabilizasyonunu sağlamak amacıyla örnek çalışmaları arasında 5 dakika süreyle mobil faz akışı verildi.

Tablo 1. Kullanılan mobil faz gradiyenti

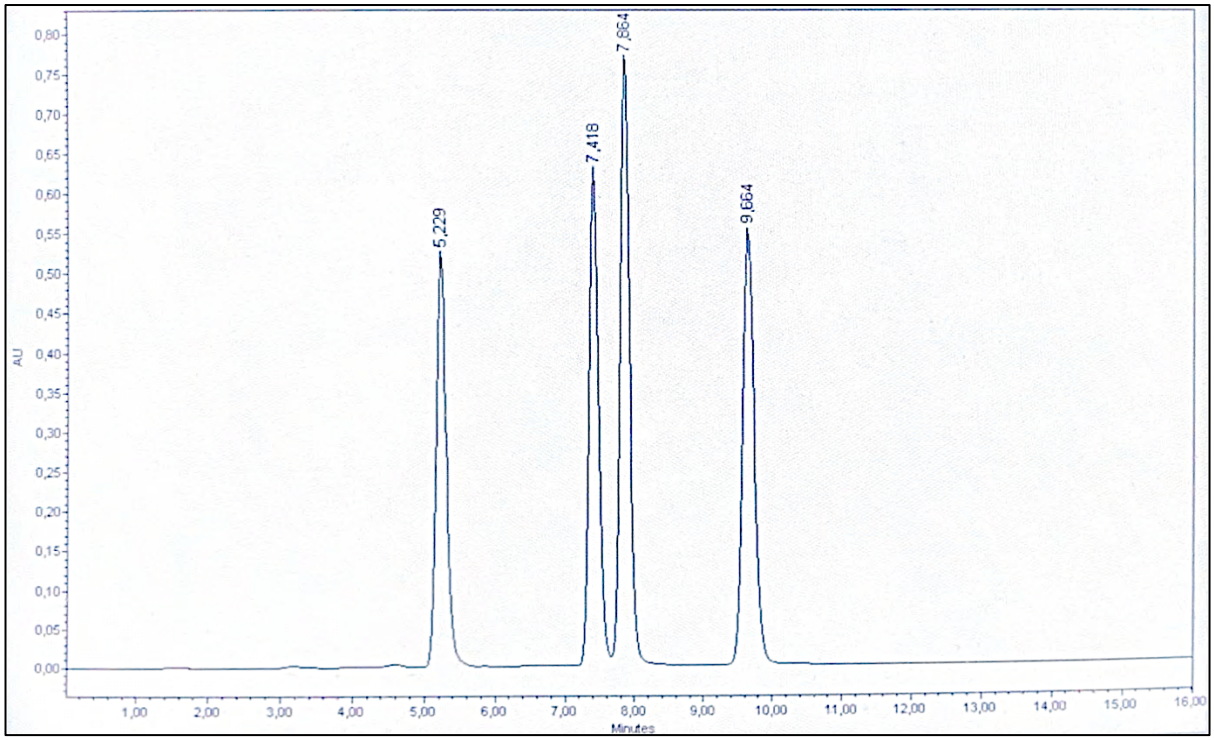
Zaman (dk)	Akış hızı (mL/dk)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0-3,00	0,8	39	61
3,01-14,00	0,8	33	67
14,01-15,00	0,8	39	61

Serum ve doku örneklerinin kromatogramında belirlenen pik alanları, poliamin standart çözeltisinin kromatogramında belirlenen piklerle karşılaştırılarak örneklerdeki her bir poliaminin konsantrasyonu hesaplandı (Tablo 2) (Şekil 9). Doku örneklerindeki poliamin düzeyleri, miligram protein miktarına oranlanarak ifade edildi.

Tablo 2. Poliamin standartlarının HPLC kalibrasyon kromatogramında çıkış zamanları

Poliamin	HPLC kromatogramında çıkış zamanı (dk)
Putresin	5,229
Spermidin	7,418
1,7-diaminoheptan (internal standart)	7,864
Spermin	9,664

HPLC: "High performance liquid chromatography"



Şekil 9. Poliamin standartlarının HPLC kalibrasyon kromatogramı
Putresin (5,229), Spermidin (7,418), İnternal Standart (7,864), Spermin (9,664)

Histopatolojik İnceleme

Deney sonunda sakrifiye edilen hayvanların tümör dokuları çıkarılarak %10'luk tamponlu formalin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) ile fikse edildi. Bu aşamanın ardından çeşme suyu altında yıkanan doku örnekleri derecesi yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96 ve %100) geçirildi. Daha sonra, şeffaflaştırma aşaması için dokular toluende (Merck, Darmstadt, Almanya) bekletildi ve parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom (Leica, Wetzlar, Almanya) aracılığıyla 5 mikrometre (µm) kalınlığında kesitler lam üzerine alınarak Hematoksilen ve Eozin ile boyandı. Boyama prosedürü için kesitler önce deparafinizasyon için tolüene maruz bırakıldı. Parafini giderilen kesitler sırasıyla azalan alkol serilerinden (%100, %96, %90 ve %70) geçirildi ve suya indirildi. Suya indirilen kesitler

nukleus boyaması için Mayer's Hematoksilen ile 10 dakika boyandı. Akan çeşme suyu altında morartma işlemi için tekrar 10 dakika bekletilen kesitler sitoplazma boyaması için 1 dakika Eozin ile boyandı. Dehidratasyon için yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96 ve %100) geçirilerek suyu alındı ve toluende 10 dakika bekletilerek entellan (Merck) damlatıldı, ardından lamel yardımı ile kapatıldı. Böylece elde edilen Hematoksilen ve Eozin boyalı preparatlar ışık mikroskobunda incelenerek (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) bulgular DP20 dijital kamera sistemi (Olympus) ile fotoğraflandırıldı.

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Çalışma sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizinde Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'na kayıtlı SPSS 20.0 (Lisans no: 10240642) istatistik programı kullanıldı. Deney sonuçları ortalama±standart sapma olarak verildi. Tüm deney gruplarının serum ve tümör dokularındaki putresin, spermidin ve spermin düzeyleri arasındaki farklılıklar Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi. Gruplar arasındaki farkın anlamlı bulunduğu test parametreleri için iki grup arasındaki farkın anlamlılığı Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Yapılan testler sonucu elde edilen "p" değeri 0,05'ten küçük olduğunda gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda farelerden alınan serum ve tümör dokusu örneklerinde putresin, spermidin ve spermin konsantrasyonları ölçüldü. Serum ve doku örneklerindeki putresin, spermidin ve spermin konsantrasyonlarının ortalama ve standart sapmaları (SD) sırasıyla Tablo 3 ve Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Grupların serum putresin, spermidin ve spermin konsantrasyonları

Grup	**Serum Putresin Konsantrasyonu** (µM) (ort±SD)	**Serum Spermidin Konsantrasyonu** (µM) (ort±SD)	**Serum Spermin Konsantrasyonu** (µM) (ort±SD)
1 (n=10)	1,23±0,50	3,90±1,38	1,64±0,27
2 (n=10)	1,24±0,50	2,51±1,43	2,00±1,31
3 (n=10)	2,31±0,83	6,06±2,85	3,14±0,88
4 (n=10)	1,43±0,41	3,41±1,22	1,61±0,84
5 (n=10)	1,12±0,54	3,80±2,18	2,08±0,58

Tablo 4. Grupların doku putresin, spermidin ve spermin konsantrasyonları

Grup	**Doku Putresin Konsantrasyonu** (nmol/mg protein) (ort±SD)	**Doku Spermidin Konsantrasyonu** (nmol/mg protein) (ort±SD)	**Doku Spermin Konsantrasyonu** (nmol/mg protein) (ort±SD)
3	1,41±0,57	11,52±4,70	5,61±2,30
4	0,59±0,27	6,05±3,38	3,09±1,59
5	0,53±0,23	4,89±2,36	2,32±1,19

Serum putresin konsantrasyonunun tümör kontrol grubunda sağlıklı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı saptandı (p=0,002). Kuersetin tedavisinin, tedavi 1 ve tedavi 2 gruplarında tümör kontrol grubuna kıyasla serum putresin konsantrasyonunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı tespit edildi (sırasıyla p=0,004 ve p=0,001). Yüksek doz kuersetin tedavisinin, düşük doz kuersetin tedavisine kıyasla serum putresin konsantrasyonunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla azalttığı gözlendi (p=0,043).

Serum spermidin konsantrasyonunun tümör kontrol grubunda sağlıklı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı saptandı (p=0,035). Kuersetin tedavisinin, tedavi 1 ve tedavi 2 gruplarında tümör kontrol grubuna kıyasla serum spermidin konsantrasyonunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı tespit edildi (sırasıyla p=0,007 ve p=0,043). Tedavi 1 ve tedavi 2 grupları kıyaslandığında serum spermidin konsantrasyonları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (p=0,853).

Serum spermin konsantrasyonunun tümör kontrol grubunda sağlıklı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı saptandı (p<0,001). Kuersetin tedavisinin, tedavi 1 ve tedavi 2 gruplarında tümör kontrol grubuna kıyasla serum spermin konsantrasyonunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı tespit edildi (sırasıyla p<0,001 ve p=0,019). Tedavi 1 ve tedavi 2 grupları kıyaslandığında serum spermin konsantrasyonları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (p=0,052) (Tablo 5).

Tablo 5. Serum putresin, spermidin ve spermin konsantrasyonlarının gruplar arası istatistiksel olarak karşılaştırılması

Grup	Serum Putresin Konsantrasyonu		Serum Spermidin Konsantrasyonu		Serum Spermin Konsantrasyonu	
	p	z	p	z	p	z
1 ve 3	0,002	-3,025	0,035	-2,117	<0,001	-3,780
3 ve 4	0,004	-2,797	0,007	-2,646	<0,001	-3,250
3 ve 5	0,001	-3,099	0,043	-2,041	0,019	-2,343
4 ve 5	0,043	-2,041	0,853	-0,227	0,052	-1,965

Kuersetin tedavisinin, tedavi 1 ve tedavi 2 gruplarında tümör kontrol grubuna kıyasla doku putresin konsantrasyonunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı tespit edildi (sırasıyla p=0,001 ve p<0,001). Tedavi 1 ve tedavi 2 grupları kıyaslandığında doku putresin konsantrasyonları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (p=0,796).

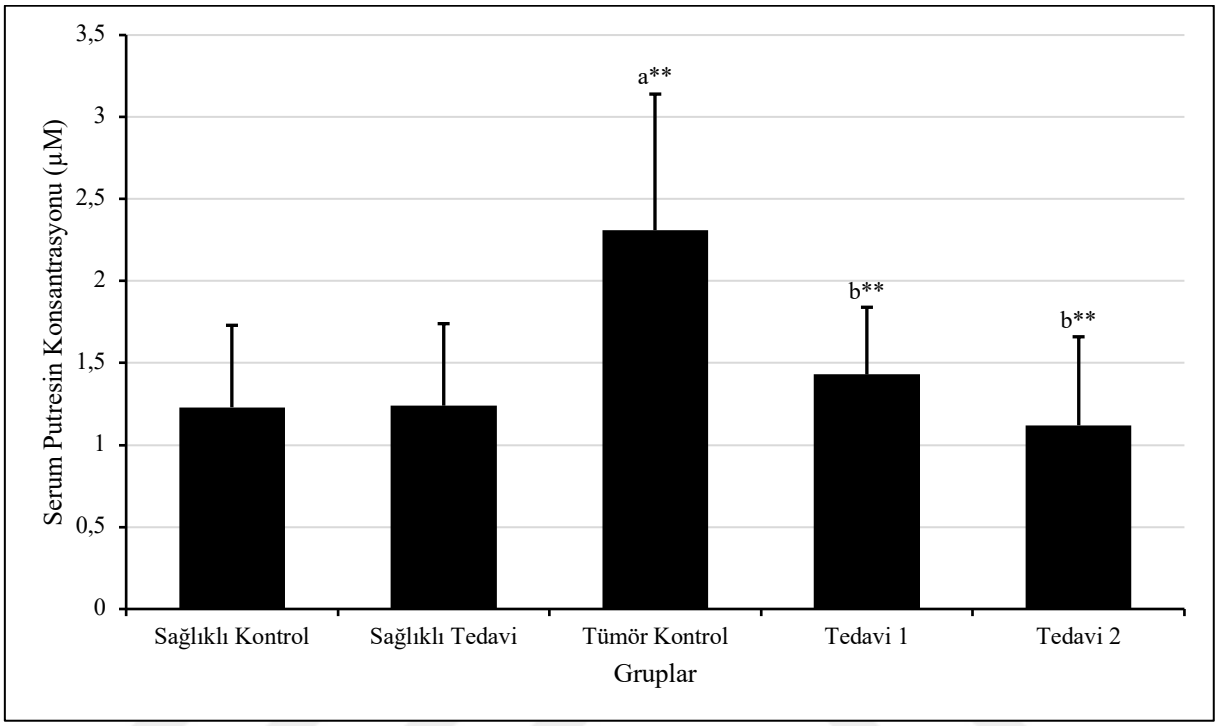
Kuersetin tedavisinin, tedavi 1 ve tedavi 2 gruplarında tümör kontrol grubuna kıyasla doku spermidin konsantrasyonunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı saptandı (sırasıyla p=0,011 ve p<0,001). Tedavi 1 ve tedavi 2 grupları kıyaslandığında doku spermidin konsantrasyonları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (p=0,579).

Kuersetin tedavisinin, tedavi 1 ve tedavi 2 gruplarında tümör kontrol grubuna kıyasla doku spermin konsantrasyonunu istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı gözlendi (sırasıyla p=0,015 ve p=0,001). Tedavi 1 ve tedavi 2 grupları kıyaslandığında doku spermin konsantrasyonları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (p=0,247) (Tablo 6).

Tablo 6. Doku putresin, spermidin ve spermin konsantrasyonlarının gruplar arası istatistiksel olarak karşılaştırılması

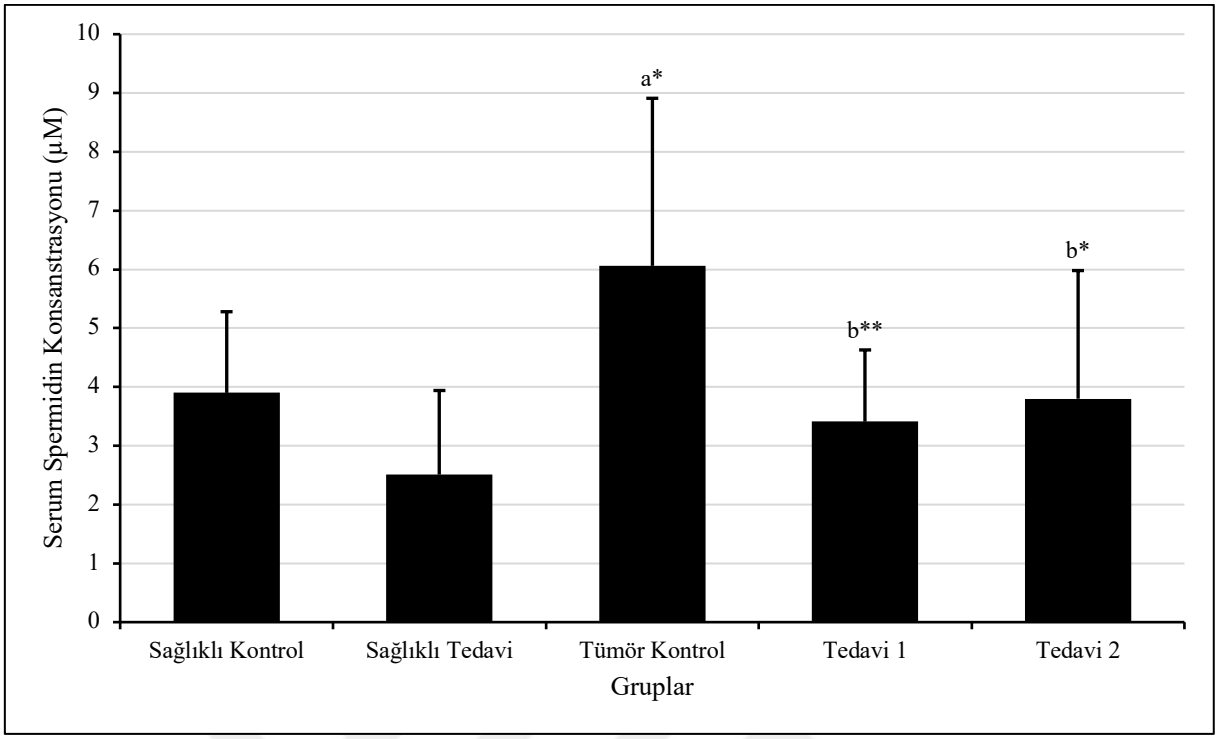
Grup	Doku Putresin Konsantrasyonu		Doku Spermidin Konsantrasyonu		Doku Spermin Konsantrasyonu	
	p	z	p	z	p	z
3 ve 4	0,001	-3,175	0,011	-2,495	0,015	-2,419
3 ve 5	<0,001	-3,477	<0,001	-3,326	0,001	-3,175
4 ve 5	0,796	-0,302	0,579	-0,605	0,247	-1,209

Her bir grubun serum ve tümör dokusu poliamin konsantrasyonları; ortalama, standart sapma ve gruplar arasındaki farkın anlamlılığını gösteren "p" değerleri ile birlikte Şekil 10, 11, 12, 13, 14 ve 15'te gösterilmiştir.



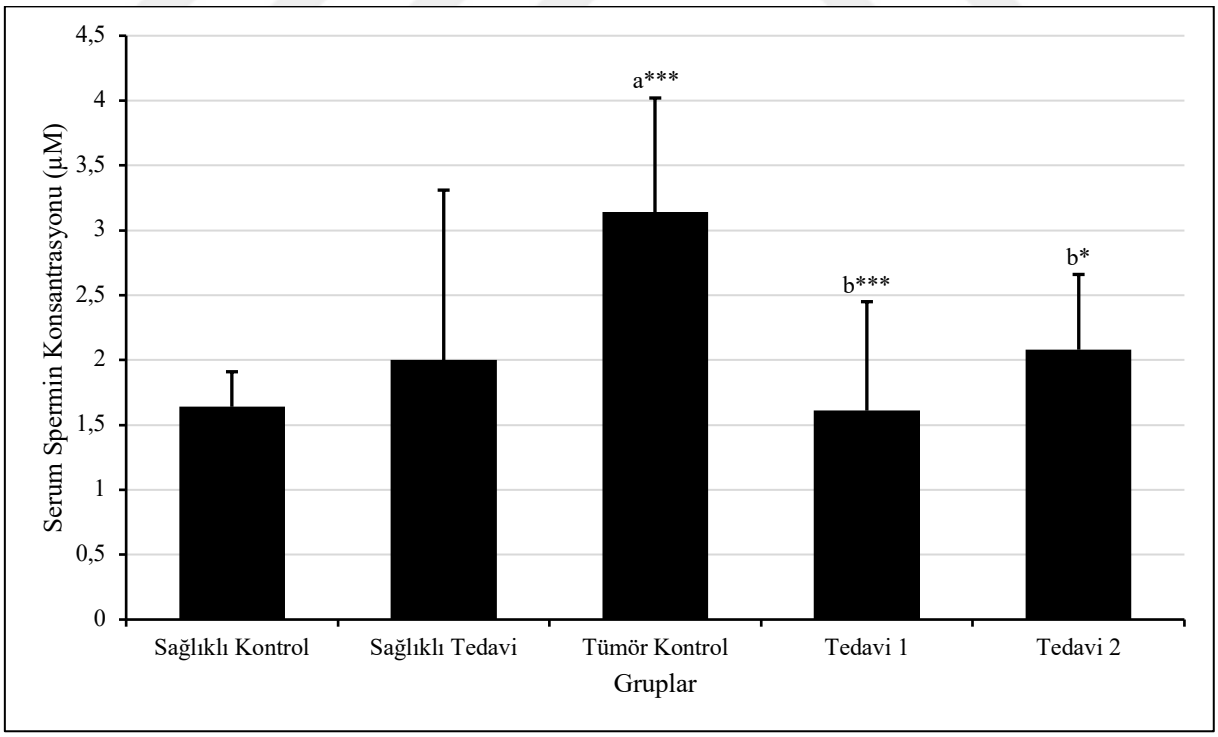
Mann-Whitney U, **: p<0,01.
a: Sağlıklı kontrol grubu ile, b: Tümör kontrol grubu ile karşılaştırma.

Şekil 10. Serum putresin konsantrasyonu (µM)



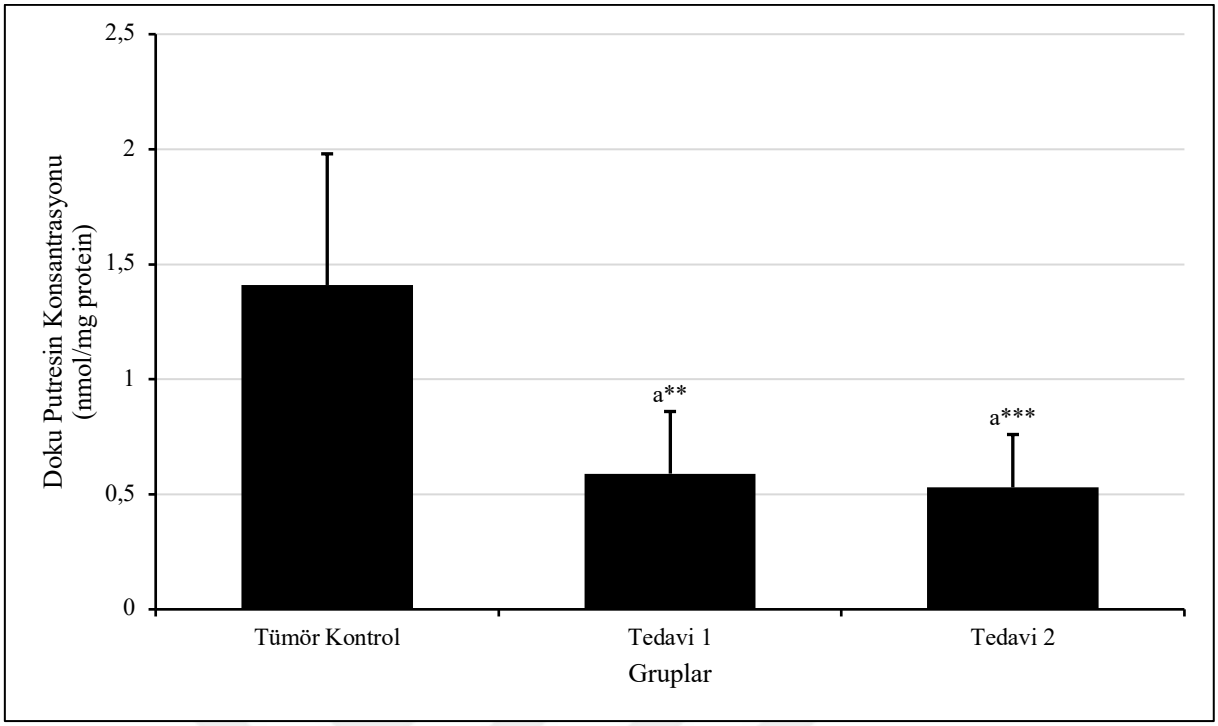
Mann-Whitney U, *: p<0,05, **: p<0,01.
a: Sağlıklı kontrol grubu ile, b: Tümör kontrol grubu ile karşılaştırma.

Şekil 11. Serum Spermidin Konsantrasyonu (µM)



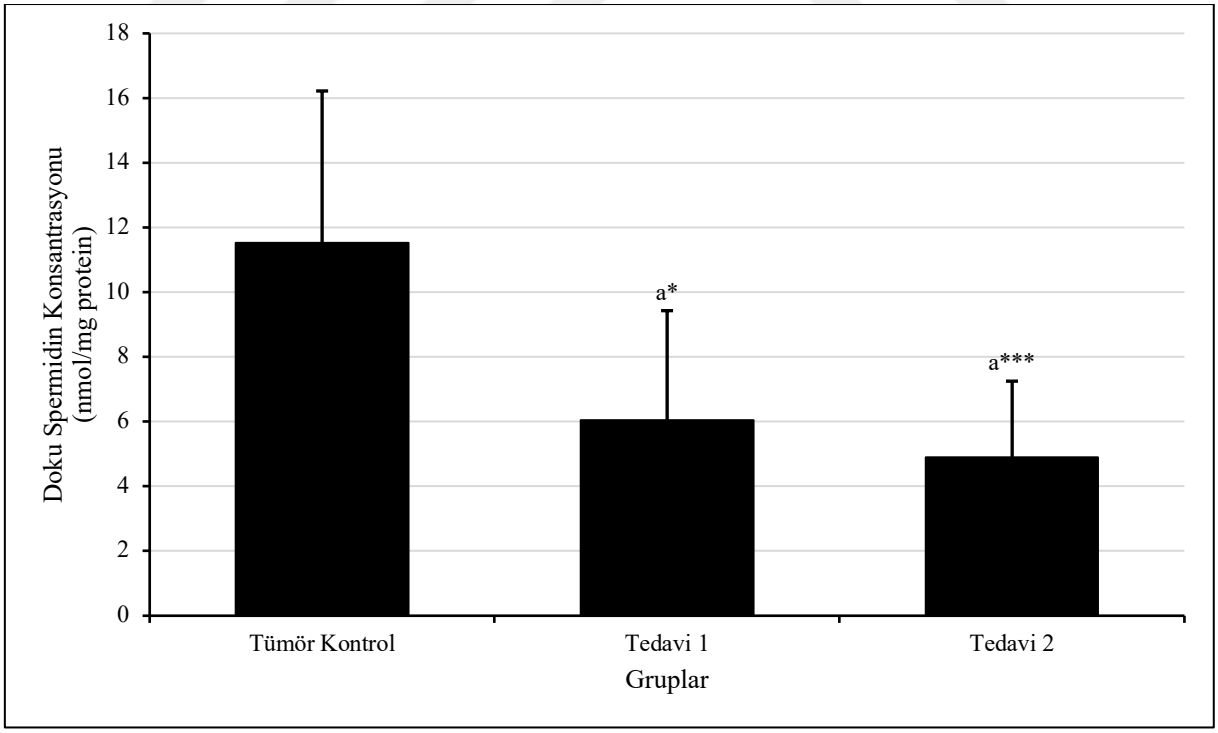
Mann-Whitney U, *: p<0,05, ***: p<0,001.
a: Sağlıklı kontrol grubu ile, b: Tümör kontrol grubu ile karşılaştırma.

Şekil 12. Serum Spermin Konsantrasyonu (µM)



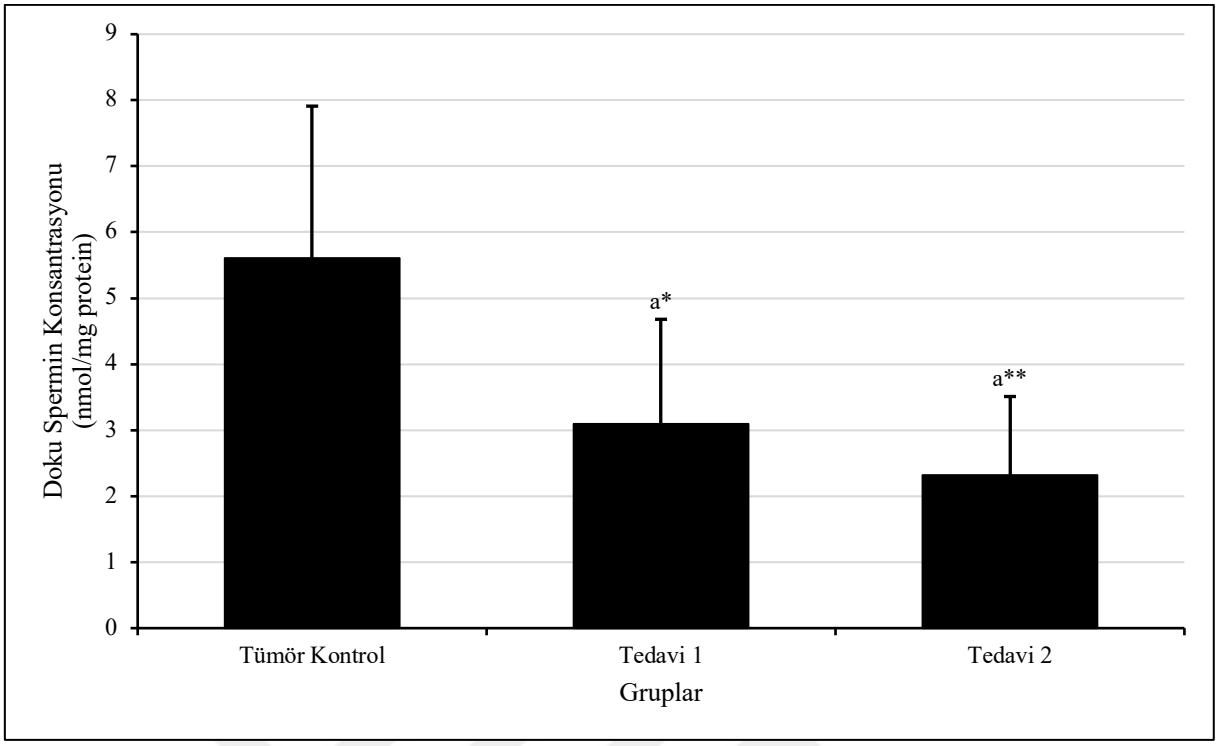
Mann-Whitney U, **: p<0,01, ***: p<0,001.
a: Tümör kontrol grubu ile karşılaştırma.

Şekil 13. Doku Putresin Konsantrasyonu (nmol/mg protein)



Mann-Whitney U, *: p<0,05, ***: p<0,001.
a: Tümör kontrol grubu ile karşılaştırma.

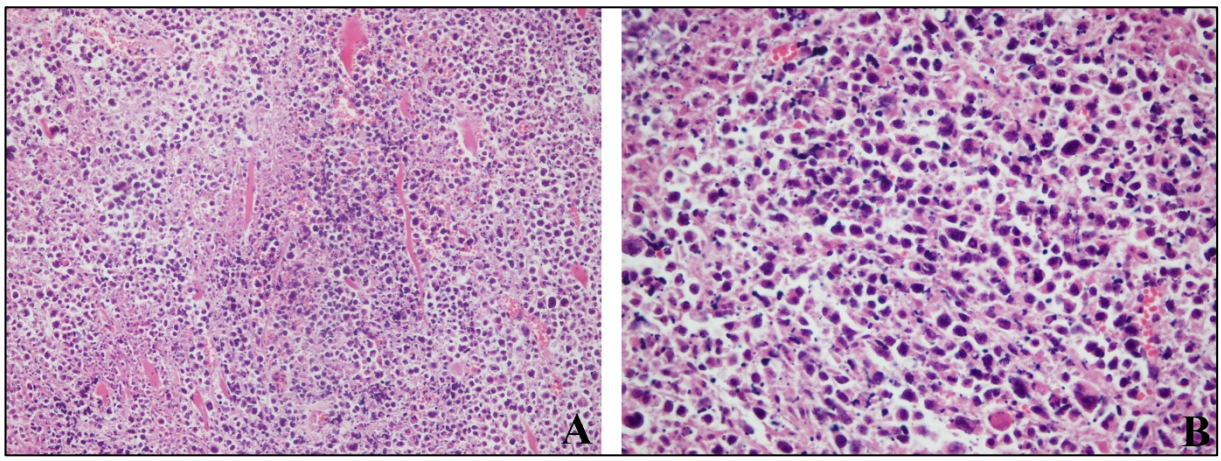
Şekil 14. Doku Spermidin Konsantrasyonu (nmol/mg protein)



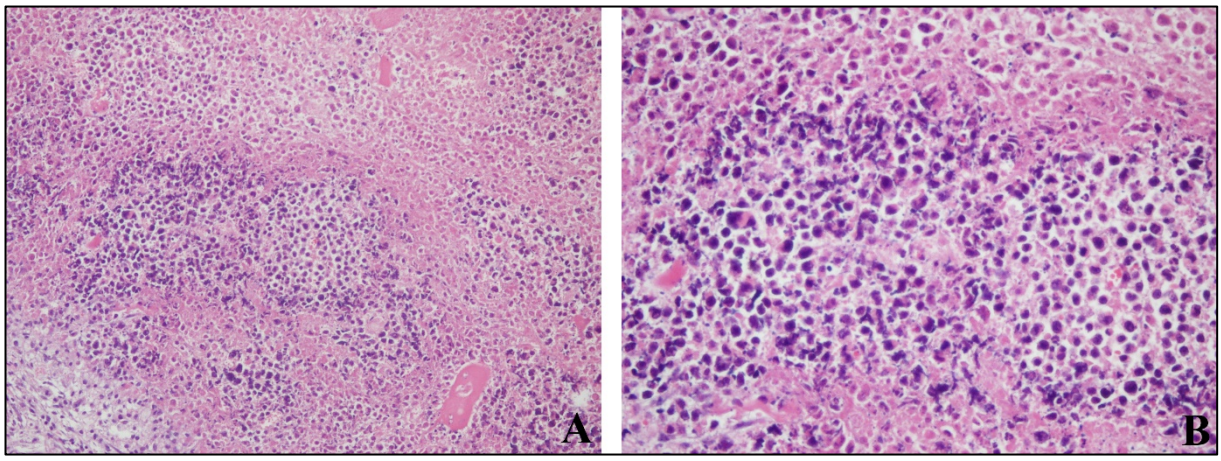
Mann-Whitney U, *: p<0,05, **: p<0,01.
a: Tümör kontrol grubu ile karşılaştırma.

Şekil 15. Doku Spermin Konsantrasyonu (nmol/mg protein)

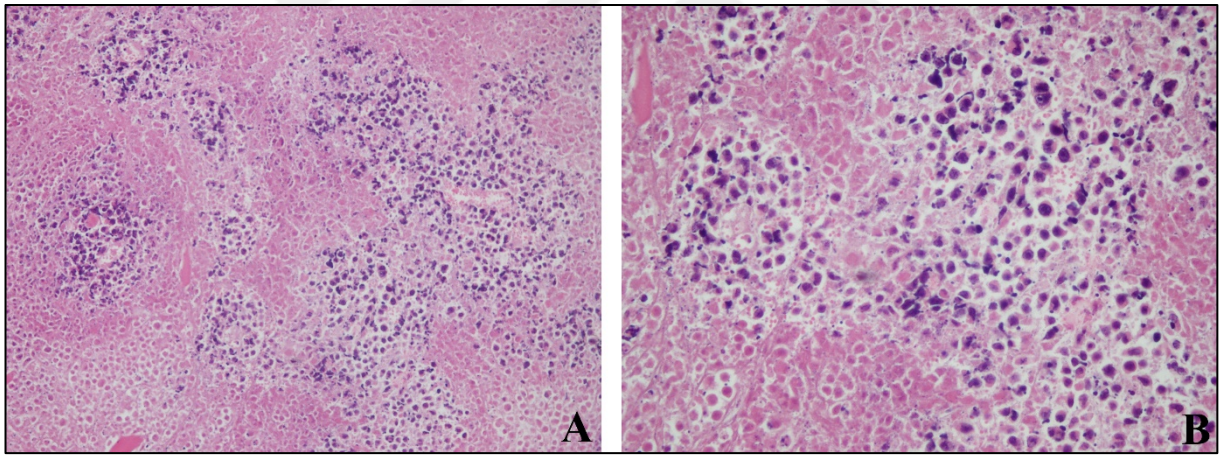
Yapılan histopatolojik incelemede tümör kontrol grubuna ait görüntüde meme kanseri dokusu oluştuğu tespit edildi. Tedavi grubu 2'de daha belirgin olmak üzere tedavi gruplarının histopatolojik görüntüsünde tümör kontrol grubuna kıyasla tümör dokusunun küçüldüğü ve belirgin bir iyileşme olduğu gözlendi. Tümör kontrol grubu, tedavi grubu 1 ve tedavi grubu 2'ye ait tümör dokusu histopatolojik fotoğrafları Şekil 16, 17 ve 18'de verilmiştir.



Şekil 16. Tümör kontrol grubuna ait tümör dokusu histopatolojik görünümü (Hematoksilen ve Eozin, A: x200, B: x400)



Şekil 17. Tedavi grubu 1'e ait tümör dokusu histopatolojik görünümü (Hematoksilen ve Eozin, A: x200, B: x400)



Şekil 18. Tedavi grubu 2'ye ait tümör dokusu histopatolojik görünümü (Hematoksilen ve Eozin, A: x200, B: x400)

Tüm deney gruplarındaki her bir farenin serum ve tümör dokusundaki poliamin konsantrasyonları sırasıyla Tablo 7 ve Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 7. Her bir farenin serum putresin, spermidin ve spermin konsantrasyonu

Gruplar Grup 1	Serum Putresin Konsantrasyonu (µM)	Serum Spermidin Konsantrasyonu (µM)	Serum Spermin Konsantrasyonu (µM)
1	2,020	5,425	1,930
2	0,949	2,542	1,828
3	1,290	4,581	1,712
4	1,359	3,345	1,826
5	1,871	3,890	1,188
6	1,329	4,331	1,365
7	0,720	4,057	1,512
8	0,510	3,403	1,912
9	0,720	1,314	1,808
10	1,483	6,137	1,331
Grup 2			
1	1,695	3,753	1,981
2	0,651	1,817	1,356
3	0,990	1,749	1,154
4	0,743	2,488	2,804
5	0,747	2,067	0,802
6	2,144	2,573	0,799
7	1,032	1,447	3,029
8	1,173	0,862	3,234
9	1,620	2,392	4,430
10	1,624	5,943	0,453
Grup 3			
1	2,340	9,209	2,414
2	3,389	5,460	3,507
3	4,076	12,795	2,041
4	2,019	5,133	4,487
5	1,886	3,813	4,320
6	1,990	4,774	3,059
7	2,456	6,082	2,374
8	1,354	5,474	2,365
9	1,622	4,356	2,894
10	1,980	3,523	3,982
Grup 4			
1	1,298	1,825	3,758
2	1,976	4,028	0,861
3	2,013	4,322	1,966
4	1,778	3,524	1,284
5	1,150	4,312	0,897
6	0,904	2,136	1,102
7	1,698	2,386	1,373
8	0,947	2,237	1,402
9	1,126	3,784	1,608
10	1,382	5,557	1,892
Grup 5			
1	0,841	2,513	2,543
2	0,812	2,437	3,070
3	1,064	2,811	2,249
4	1,447	6,099	2,600
5	2,573	8,374	1,588
6	0,921	2,309	1,747
7	0,788	1,926	2,472
8	0,958	3,385	1,686
9	0,827	2,338	1,446
10	1,016	5,771	1,390

Tablo 8. Her bir farenin doku putresin, spermidin ve spermin konsantrasyonu

Gruplar **Grup 1**	**Doku Putresin Konsantrasyonu** (nmol/mg protein)	**Doku Spermidin Konsantrasyonu** (nmol/mg protein)	**Doku Spermin Konsantrasyonu** (nmol/mg protein)
1	1,490	12,173	5,264
2	0,885	6,809	2,770
3	0,970	7,821	4,014
4	0,854	7,587	3,710
5	0,886	6,352	4,211
6	1,818	11,164	4,340
7	0,996	11,494	6,441
8	2,341	17,305	8,170
9	2,207	20,486	10,099
10	1,666	14,020	7,128
Grup 2			
1	0,771	8,670	3,723
2	0,447	4,787	3,516
3	0,279	2,446	1,685
4	0,972	11,486	5,650
5	0,583	5,937	3,386
6	0,753	7,873	4,107
7	0,270	2,588	1,225
8	0,304	2,316	1,006
9	0,483	4,020	1,777
10	0,989	10,375	4,797
Grup 3			
1	0,527	5,609	2,859
2	0,599	6,618	3,248
3	0,232	1,781	0,718
4	0,760	5,969	2,489
5	0,978	9,471	4,648
6	0,673	6,555	3,130
7	0,293	2,538	1,230
8	0,502	3,462	1,282
9	0,401	3,914	1,983
10	0,318	3,006	1,592

TARTIŞMA

Kanser 21. yüzyılın önemli bir toplumsal, ekonomik ve halk sağlığı sorunlarından biridir. Dünya genelinde ölümlerin %16,8'inin sebebi kanserdir (2). Önümüzdeki yıllarda kanser kaynaklı mortalitenin artacağı öngörülmektedir. Nüfus projeksiyonlarındaki artışla birlikte değerlendirildiğinde kanserin sağlık sistemi üzerindeki yükünün artması beklenmektedir (1). Türkiye'de 2023 yılında meydana gelen ölüm nedenleri arasında kanser ikinci sırada yer almaktadır (16).

Meme kanseri kadınlarda dünya genelinde en yaygın görülen kanserdir (17). Kadınlarda kanser sebepli ölümlerin önde gelen nedeni meme kanseridir (2). Türkiye'de kadınlarda en sık tanı konulan kanser türü %26 ile meme kanseridir (18). Metastaz tespit edilmemiş erken evre meme kanseri potansiyel olarak tedavi edilebilir bir hastalıktır (4). Erken tanı ve uygun tedavi ile meme kanseri ölüm oranlarının azaltılabileceği düşünülmektedir (5). Bu sebeple meme kanseri tanısında kullanılabilecek biyobelirteçler ve potansiyel tedavi edici moleküller üzerinde araştırmalar yapılması önem kazanmıştır.

Putresin, spermidin ve spermin; memeli hücrelerinde bulunan başlıca poliaminlerdir (22). Poliaminlerin sentezinde ODC isimli enzim görevlidir. Bu enzim üre döngüsünde yer alan ornitinden putresini sentezler. Bu sentez basamağı poliamin sentezindeki hız kısıtlayıcı basamaktır (6). Poliaminler hücrelerin büyümesi ve proliferasyonu için gerekli olan moleküllerdendir. Poliaminlerin hızlı büyüme geçiren dokularda biriktiği ve poliamin biyosentezindeki bozuklukların kanser gelişimiyle ilişkili olduğu bilinmektedir (7). Tümör dokusundaki anormal hiperproliferatif hücrelerin hücre büyümesini sürdürmek için poliaminlere ihtiyaç duydukları tespit edilmiştir (107). Kanserde artan poliaminlerin tümör hücrelerinin büyümesini ve proliferasyonunu desteklediği gösterilmiştir (6). Kanserli hastaların

tümör dokusu, idrar ve serumunda poliamin birikimi olduğu bilinmektedir. Artmış poliamin düzeylerinin; nöroblastom, hepatoselüler karsinom, kolorektal, mide, prostat, akciğer ve meme kanserinin progresyonuyla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (7). Kanserde idrar ve serumdaki poliamin artışının tümör eradikasyonu sonrası azaldığı, nüks sonrası ise tekrar arttığı gösterilmiştir (111). İdrar, serum veya diğer vücut sıvılarındaki poliamin düzeylerinin akciğer, karaciğer, kolon ve pankreas kanserinin tanısında biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (38).

Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan yöntemlerden biri kemoterapidir (71). Ancak kemoterapi ajanlarına karşı oluşabilen ilaç direnci sebebiyle yeni ilaçların geliştirilmesi önem kazanmıştır (72). Flavonoidler çeşitli bitkilerde bulunan polifenolik yapıya sahip organik bileşiklerdir (75). Antioksidan, antiinflamatuar, antikanser, antiviral ve antialerjik etkilere sahip oldukları bilinmektedir (77). Flavonoid ailesine ait moleküllerden biri de kuersetindir (78). Kuersetin başlıca elma, çilek, üzüm, kırmızı soğan, brokoli ve çay gibi bitkisel besinlerde bulunmaktadır (11). Kuersetinin antioksidan, antiproliferatif, antikanser, antiinflamatuar, antialerjik, antiviral ve kardiyoprotektif etkileri olduğu bilinmektedir (12,13,77,80). Kuersetinin pek çok faydalı etkisinin çalışmalarda gösterilmiş olmasına rağmen, *in vivo* meme kanseri modelinde poliamin metabolizması üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmaya yapılan literatür taramasında rastlanmamıştır.

Bu çalışmada deneysel olarak meme kanseri oluşturulmuş farelerde kuersetinin poliamin metabolizması üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla farelerin serum ve tümör dokularında putresin, spermidin ve spermin düzeyleri ölçülmüştür.

Meme kanseri hastaları ve meme kanserli fare modelinde yapılan çalışmalarda serum poliamin düzeylerinin normalden yüksek olduğu gösterilmiştir (112,113). Bu çalışmada da literatüre uyumlu olarak tümör kontrol grubunda serum putresin, spermidin ve spermin seviyelerinin sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu bulunmuştur.

B hücreli lenfoma ve nöroblastom modeli fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, ODC enzim inhibitörü olan α-diflorometilornitin (DFMO) ile poliamin sentez inhibisyonunun tümör gelişimini bozduğu tespit edilmiştir (6). Yapılan *in vitro* bir çalışmada kuersetinin kolon kanseri hücre hattında ODC enzim aktivitesini azaltarak poliamin sentezini baskıladığı, bunun sonucunda poliamin seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (107). Bizim çalışmamızda da kuersetin uygulanan tedavi grupları için tümör dokusu ve serum putresin, spermidin ve spermin düzeylerinin tümör kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Yapılan histopatolojik incelemede özellikle tedavi grubu 2'de olmak

üzere tedavi gruplarının tümör dokusu histopatolojik görünümünde tümör kontrol grubuna kıyasla belirgin bir iyileşme gözlenmiş olması, poliamin düzeyleri ile ilgili bulgularımızı desteklemektedir. Poliamin sentezinin ilk ve hız kısıtlayıcı basamağının enzimi olan ODC aktivitesi bu çalışmanın bir kısıtlılığı olarak ölçülmemiş olmasına rağmen; kuersetin tedavisinin putresin dahil üç poliaminin her birinin seviyelerini azaltmış olması, olası mekanizmaların en azından birinin kuersetinin poliamin sentezini ODC enziminin görev aldığı yol aracılığıyla baskılaması olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde kuersetinin poliamin metabolizması üzerine etkilerini *in vivo* kanser modeli üzerinde inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan çalışmamız orijinal ve özgün bir çalışma niteliğindedir.

Çalışmamızın bir diğer amacı kuersetinin etkili olduğu tedavi dozunun araştırılmasıdır. Bu amaçla tedavi gruplarındaki farelere düşük ve yüksek doz olarak 10 mg/kg ve 30 mg/kg olmak üzere iki ayrı dozda kuersetin uygulanmıştır. Gerek serumda gerekse tümör dokusunda her iki dozun da poliamin düzeylerini tümör kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı gözlenmiştir. Grupların ortalama poliamin düzeyleri incelendiğinde tümör dokusunda poliamin düzeylerinin doza bağlı olarak yüksek doz tedaviyle daha fazla azaldığı tespit edilmiştir. Ancak düşük doz tedaviyle de hem serum hem de doku poliamin düzeylerinin tümör kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı göz önüne alındığında; tedavi için 10 mg/kg dozun yeterli olabileceği, fakat 30 mg/kg tedavi dozunun daha etkili olabileceği gözlenmektedir. Yapılan histopatolojik çalışmalar da bu bulguyu desteklemiştir. Diğer yandan serum örneklerinde tedavinin poliamin düzeyleri üzerinde genel azaltıcı etkisi gözlenmekle birlikte, yüksek dozda bu etkinin artışı gözlenmemiştir.

Daha önceki çalışmalar dahilinde ve bu çalışmadan elde edilen sonuçlar paralelinde meme kanserinin serum putresin, spermidin ve spermin düzeylerinde artışa sebep olduğu sonucuna varılabilir. Kuersetinin meme kanserinde artmış olan putresin, spermidin ve spermin düzeylerini azaltarak poliamin metabolizması üzerinde olumlu bir etki oluşturabileceği ifade edilebilir. Bu etkinin tam olarak hangi mekanizma(lar) üzerinden oluştuğu net olarak bilinmese de, olası mekanizmaların biri ODC enziminin görev aldığı biyosentez yolunun baskılanması olabilir. Poliaminlerin hücre büyümesi ve proliferasyonu için gerekli moleküller oldukları ve kanser ile ilişkileri göz önüne alındığında kuersetinin poliamin metabolizması üzerindeki bu baskılayıcı etkisi aracılığıyla meme kanserine karşı bir antikanser aktivite gösterebileceği ifade edilebilir. Kuersetinin meme kanserinde poliamin metabolizması üzerindeki bu etkilerini hangi mekanizmalar aracılığıyla gösterdiğinin açıklanması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Kuersetinin meme kanserine karşı olası antikanser etkisi, kanserle ilgili diğer

parametre ve mekanizmalar üzerindeki etkileri ile birlikte incelenerek daha kapsamlı çalışmalarla desteklenmelidir.

SONUÇLAR

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Deneysel olarak meme kanseri oluşturulmuş fareler üzerinde kuersetin tedavisinin; kanserle ilişkili olduğu bilinen putresin, spermidin, spermin düzeyleri ve tümör dokusu histopatolojisi üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla farelerin serum ve tümör dokusunda putresin, spermidin, spermin konsantrasyonları ölçülmüş ve tümör dokusunda histopatolojik inceleme yapılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda;

1) Serum putresin düzeyinin tümör kontrol grubunda sağlıklı kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığı, tedavi gruplarında ise kuersetin tedavisi ile tümör kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Bu azalmanın yüksek doz tedavi grubunda düşük doz tedavi grubuna kıyasla daha fazla olduğu gözlenmiştir.

2) Serum spermidin düzeyinin tümör kontrol grubunda sağlıklı kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığı, tedavi gruplarında ise kuersetin tedavisi ile tümör kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Yüksek ve düşük doz tedavi grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

3) Serum spermin düzeyinin tümör kontrol grubunda sağlıklı kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığı, tedavi gruplarında ise kuersetin tedavisi ile tümör kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. Yüksek ve düşük doz tedavi grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

4) Tümör dokusunda putresin düzeyinin, tedavi gruplarında tümör kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Yüksek ve düşük doz tedavi grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

5) Tümör dokusunda spermidin düzeyinin, tedavi gruplarında tümör kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Yüksek ve düşük doz tedavi grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

6) Tümör dokusunda spermin düzeyinin, tedavi gruplarında tümör kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Yüksek ve düşük doz tedavi grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

7) Tedavi grubu 2'de daha belirgin olmak üzere tedavi gruplarının histopatolojik görüntüsünde tümör kontrol grubuna kıyasla belirgin bir iyileşme olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamız; deneysel olarak meme kanseri oluşturulmuş farelerde kuersetinin serum ve tümör dokusunda artan ve kanserle ilişkili oldukları bilinen putresin, spermidin ve spermin düzeylerini azaltarak antikanser etkiye sahip olabileceğini göstermiştir.

ÖZET

Meme kanseri dünya genelinde kadınlarda en sık görülen kanser türü ve kanser sebepli ölümlerin önde gelen nedenidir. Putresin, spermidin ve spermin memeli hücrelerinde bulunan başlıca üç poliamindir. Poliaminler hücre büyümesi ve çoğalması için gerekli moleküllerdir. Yüksek poliamin düzeylerinin kanserle ilişkili olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmanın amacı, deneysel olarak meme tümörü oluşturulmuş farelerde kuersetinin serum ve tümör dokusunda birer poliamin olan putresin, spermidin ve spermin düzeylerine etkisini incelemektir.

Çalışmada 50 adet erkek Balb/c cinsi fare kullanıldı. Sağlıklı kontrol ve tedavi, tümör kontrol, tedavi 1 ve 2 olmak üzere 5 deney grubu oluşturuldu (n=10). Tümör kontrol, tedavi 1 ve 2 gruplarındaki farelerin sol bacak içlerine subkutan yolla 200µL Ehrlich assit tümör hücresi enjekte edilerek meme kanseri modeli oluşturuldu. Sağlıklı ve tümör kontrol grubuna sadece çözücü sıvı uygulanırken, sağlıklı tedavi ve tedavi 1 grubuna 10 mg/kg, tedavi 2 grubuna 30 mg/kg kuersetin 14 gün boyunca intraperitoneal yolla enjekte edildi. Tümör dokusu ve serumda putresin, spermidin ve spermin düzeyleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemiyle ölçüldü.

Tümör kontrol grubunda sağlıklı kontrol grubuna kıyasla serum putresin, spermidin ve spermin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu. Her iki tedavi grubunda tümör dokusu ve serum putresin, spermidin ve spermin düzeyleri tümör kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu. Tedavi grubu 2'de daha belirgin olmak üzere tedavi gruplarının histopatolojik görüntüsünde tümör kontrol grubuna göre belirgin bir iyileşme gözlendi.

Sonuç olarak çalışmamız, deneysel olarak meme tümörü oluşturulmuş farelerde kuersetinin serum ve tümör dokusunda artan putresin, spermidin ve spermin düzeylerini azaltarak antikanser etkiye sahip olabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, putresin, spermidin, spermin, kuersetin

EFFECTS OF QUERCETIN ON POLYAMINE METABOLISM IN EXPERIMENTALLY INDUCED BREAST TUMOURS

SUMMARY

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide and the leading cause of cancer-related deaths. Putrescine, spermidine and spermine are the three main polyamines found in mammalian cells. Polyamines are essential molecules for cell growth and proliferation. High polyamine levels are known to be associated with cancer.

The aim of this study was to investigate the effect of quercetin on the levels of putrescine, spermidine and spermine, which are polyamines, in serum and tumour tissue in mice with experimentally induced breast tumours.

In the study, 50 male Balb/c mice were used. Five experimental groups were formed as healthy control and treatment, tumour control, treatment 1 and 2 (n=10). A breast cancer model was created by injecting 200µL Ehrlich ascites tumour cells subcutaneously into the left inner leg of the mice in the tumour control, treatment 1 and 2 groups. Healthy and tumour control groups were injected intraperitoneally with dissolving agent, healthy treatment and treatment 1 groups with 10 mg/kg, treatment 2 group with 30 mg/kg quercetin for 14 days. Putrescine, spermidine and spermine levels in tumour tissue and serum were measured by high performance liquid chromatography.

Serum putrescine, spermidine and spermine levels were statistically significantly higher in the tumour control group compared to the healthy control group. In both treatment groups,

tumour tissue and serum putrescine, spermidine and spermine levels were found to be statistically significantly lower compared to the tumour control group. A remarkable improvement was observed in the histopathological appearance of the treatment groups, more prominent in treatment group 2, compared to the tumour control group.

In conclusion, our study showed that quercetin may have anticancer effect by reducing the increased levels of putrescine, spermidine and spermine in serum and tumour tissue in mice with experimentally induced breast tumour.

Key words: Breast cancer, putrescine, spermidine, spermine, quercetin

KAYNAKLAR

1. Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, Soerjomataram I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. Cancer 2021;127(16):3029-30.
2. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 2024;74(3):229-63.
3. Katsura C, Ogunmwonyi I, Kankam HK, Saha S. Breast cancer: presentation, investigation and management. Br J Hosp Med (Lond) 2022;83(2):1-7.
4. Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. Lancet 2017;389(10074):1134-50.
5. Wang L. Early Diagnosis of Breast Cancer. Sensors (Basel) 2017;17(7):1572.
6. Nakanishi S, Cleveland JL. Polyamine Homeostasis in Development and Disease. Med Sci (Basel) 2021;9(2):28.
7. Novita Sari I, Setiawan T, Seock Kim K, Toni Wijaya Y, Won Cho K, Young Kwon H. Metabolism and function of polyamines in cancer progression. Cancer Lett 2021;519:91-104.
8. Thomas T, Thomas TJ. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. Cell Mol Life Sci 2001;58(2):244-58.
9. Bachrach U. Polyamines and cancer: minireview article. Amino Acids 2004;26(4):307-9.
10. Pallag A, Bungau S, Tit DM, Jurca T, Sirbu V, Honiges A, et al. Comparative study of polyphenols, flavonoids and chlorophylls in Equisetum arvense L. populations. Rev Chim 2016;67:530-3.
11. Cione E, La Torre C, Cannataro R, Caroleo MC, Plastina P, Gallelli L. Quercetin, Epigallocatechin Gallate, Curcumin, and Resveratrol: From Dietary Sources to Human MicroRNA Modulation. Molecules 2019;25(1):63.
12. Yang D, Wang T, Long M, Li P. Quercetin: Its Main Pharmacological Activity and Potential Application in Clinical Medicine. Oxid Med Cell Longev 2020;2020:8825387.

13. Kim JK, Park SU. Quercetin and its role in biological functions: an updated review. Excli j 2018;17:856-63.

14. Asgharian P, Tazekand AP, Hosseini K, Forouhandeh H, Ghasemnejad T, Ranjbar M, et al. Potential mechanisms of quercetin in cancer prevention: focus on cellular and molecular targets. Cancer Cell Int 2022;22(1):257.

15. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin 2021;71(3):209-49.

16. Ölüm ve Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2023 [internet]. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) (Erişim tarihi 02.12.2024) https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-ve-Olum-Nedeni-Istatistikleri-2023-53709

17. Yip CH, Rhodes A. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer. Future Oncol 2014;10(14):2293-301.

18. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. Türkiye Kanser İstatistikleri 2018. Ankara, 2022.

19. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. Int J Biol Sci 2017;13(11):1387-97.

20. Obeagu EI, Obeagu GU. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. Medicine (Baltimore) 2024;103(3):e36905.

21. Holbert CE, Cullen MT, Casero RA, Jr., Stewart TM. Polyamines in cancer: integrating organismal metabolism and antitumour immunity. Nat Rev Cancer 2022;22(8):467-80.

22. Xuan M, Gu X, Li J, Huang D, Xue C, He Y. Polyamines: their significance for maintaining health and contributing to diseases. Cell Commun Signal 2023;21(1):348.

23. Li QZ, Zuo ZW, Zhou ZR, Ji Y. Polyamine homeostasis-based strategies for cancer: The role of combination regimens. Eur J Pharmacol 2021;910:174456.

24. Lightfoot HL, Hall J. Endogenous polyamine function--the RNA perspective. Nucleic Acids Res 2014;42(18):11275-90.

25. Pasini A, Caldarera CM, Giordano E. Chromatin remodeling by polyamines and polyamine analogs. Amino Acids 2014;46(3):595-603.

26. Bachrach U. Naturally occurring polyamines: interaction with macromolecules. Curr Protein Pept Sci 2005;6(6):559-66.

27. Minois N, Carmona-Gutierrez D, Madeo F. Polyamines in aging and disease. Aging (Albany NY) 2011;3(8):716-32.

28. Pegg AE. Functions of Polyamines in Mammals. J Biol Chem 2016;291(29):14904-12.

29. Casero RA, Jr., Marton LJ. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. Nat Rev Drug Discov 2007;6(5):373-90.

30. Schulze A, Harris AL. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. Nature 2012;491(7424):364-73.

31. Asai Y, Itoi T, Sugimoto M, Sofuni A, Tsuchiya T, Tanaka R, et al. Elevated Polyamines in Saliva of Pancreatic Cancer. Cancers (Basel) 2018;10(2):43.

32. Kingsnorth AN, Lumsden AB, Wallace HM. Polyamines in colorectal cancer. Br J Surg 1984;71(10):791-4.

33. Nishioka K, Romsdahl MM, McMurtrey MJ. Serum polyamine alterations in surgical patients with colorectal carcinoma. J Surg Oncol 1977;9(6):555-62.

34. Takayama T, Tsutsui H, Shimizu I, Toyama T, Yoshimoto N, Endo Y, et al. Diagnostic approach to breast cancer patients based on target metabolomics in saliva by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Clin Chim Acta 2016;452:18-26.

35. Li J, Meng Y, Wu X, Sun Y. Polyamines and related signaling pathways in cancer. Cancer Cell Int 2020;20(1):539.

36. Evageliou NF, Hogarty MD. Disrupting polyamine homeostasis as a therapeutic strategy for neuroblastoma. Clin Cancer Res 2009;15(19):5956-61.

37. Shantz LM, Levin VA. Regulation of ornithine decarboxylase during oncogenic transformation: mechanisms and therapeutic potential. Amino Acids 2007;33(2):213-23.

38. Casero RA, Jr., Murray Stewart T, Pegg AE. Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities. Nat Rev Cancer 2018;18(11):681-95.

39. Law GL, Raney A, Heusner C, Morris DR. Polyamine regulation of ribosome pausing at the upstream open reading frame of S-adenosylmethionine decarboxylase. J Biol Chem 2001;276(41):38036-43.

40. Park MH, Igarashi K. Polyamines and their metabolites as diagnostic markers of human diseases. Biomol Ther (Seoul) 2013;21(1):1-9.

41. Akyol Z, Çoker-Gürkan A, Arisan ED, Obakan-Yerlikaya P, Palavan-Ünsal N. DENSpm overcame Bcl-2 mediated resistance against Paclitaxel treatment in MCF-7 breast cancer cells via activating polyamine catabolic machinery. Biomed Pharmacother 2016;84:2029-41.

42. Cho LY, Yang JJ, Ko KP, Ma SH, Shin A, Choi BY, et al. Gene polymorphisms in the ornithine decarboxylase-polyamine pathway modify gastric cancer risk by interaction with isoflavone concentrations. Gastric Cancer 2015;18(3):495-503.

43. Choi Y, Oh ST, Won MA, Choi KM, Ko MJ, Seo D, et al. Targeting ODC1 inhibits tumor growth through reduction of lipid metabolism in human hepatocellular carcinoma. Biochem Biophys Res Commun 2016;478(4):1674-81.

44. Fahrmann JF, Grapov DD, Wanichthanarak K, DeFelice BC, Salemi MR, Rom WN, et al. Integrated Metabolomics and Proteomics Highlight Altered Nicotinamide- and Polyamine Pathways in Lung Adenocarcinoma. Carcinogenesis 2017;38(3):271-80.

45. Tsoi TH, Chan CF, Chan WL, Chiu KF, Wong WT, Ng CF, et al. Urinary Polyamines: A Pilot Study on Their Roles as Prostate Cancer Detection Biomarkers. PLoS One 2016;11(9):e0162217.

46. Vargas AJ, Ashbeck EL, Wertheim BC, Wallace RB, Neuhouser ML, Thomson CA, et al. Dietary polyamine intake and colorectal cancer risk in postmenopausal women. Am J Clin Nutr 2015;102(2):411-9.

47. Bello-Fernandez C, Packham G, Cleveland JL. The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90(16):7804-8.

48. Ozfiliz P, Kizilboga T, Demir S, Alkurt G, Palavan-Unsal N, Arisan ED, et al. Bag-1 promotes cell survival through c-Myc-mediated ODC upregulation that is not preferred under apoptotic stimuli in MCF-7 cells. Cell Biochem Funct 2015;33(5):293-307.

49. Koomoa DL, Geerts D, Lange I, Koster J, Pegg AE, Feith DJ, et al. DFMO/eflornithine inhibits migration and invasion downstream of MYCN and involves p27Kip1 activity in neuroblastoma. Int J Oncol 2013;42(4):1219-28.

50. Funakoshi-Tago M, Sumi K, Kasahara T, Tago K. Critical roles of Myc-ODC axis in the cellular transformation induced by myeloproliferative neoplasm-associated JAK2 V617F mutant. PLoS One 2013;8(1):e52844.

51. Hogarty MD, Norris MD, Davis K, Liu X, Evageliou NF, Hayes CS, et al. ODC1 is a critical determinant of MYCN oncogenesis and a therapeutic target in neuroblastoma. Cancer Res 2008;68(23):9735-45.

52. Rimpi S, Nilsson JA. Metabolic enzymes regulated by the Myc oncogene are possible targets for chemotherapy or chemoprevention. Biochem Soc Trans 2007;35(Pt 2):305-10.

53. Phanstiel Ot. An overview of polyamine metabolism in pancreatic ductal adenocarcinoma. Int J Cancer 2018;142(10):1968-76.

54. Cervelli M, Pietropaoli S, Signore F, Amendola R, Mariottini P. Polyamines metabolism and breast cancer: state of the art and perspectives. Breast Cancer Res Treat 2014;148(2):233-48.

55. Tomasi ML, Ryoo M, Skay A, Tomasi I, Giordano P, Mato JM, et al. Polyamine and methionine adenosyltransferase 2A crosstalk in human colon and liver cancer. Exp Cell Res 2013;319(12):1902-11.

56. Nilsson JA, Keller UB, Baudino TA, Yang C, Norton S, Old JA, et al. Targeting ornithine decarboxylase in Myc-induced lymphomagenesis prevents tumor formation. Cancer Cell 2005;7(5):433-44.

57. Zabala-Letona A, Arruabarrena-Aristorena A, Martín-Martín N, Fernandez-Ruiz S, Sutherland JD, Clasquin M, et al. mTORC1-dependent AMD1 regulation sustains polyamine metabolism in prostate cancer. Nature 2017;547(7661):109-13.

58. Roy UK, Rial NS, Kachel KL, Gerner EW. Activated K-RAS increases polyamine uptake in human colon cancer cells through modulation of caveolar endocytosis. Mol Carcinog 2008;47(7):538-53.

59. Ignatenko NA, Babbar N, Mehta D, Casero RA, Jr., Gerner EW. Suppression of polyamine catabolism by activated Ki-ras in human colon cancer cells. Mol Carcinog 2004;39(2):91-102.

60. Ou Y, Wang SJ, Li D, Chu B, Gu W. Activation of SAT1 engages polyamine metabolism with p53-mediated ferroptotic responses. Proc Natl Acad Sci U S A 2016;113(44):E6806-e12.

61. Li L, Mao Y, Zhao L, Li L, Wu J, Zhao M, et al. p53 regulation of ammonia metabolism through urea cycle controls polyamine biosynthesis. Nature 2019;567(7747):253-6.

62. Hayes CS, Shicora AC, Keough MP, Snook AE, Burns MR, Gilmour SK. Polyamine-blocking therapy reverses immunosuppression in the tumor microenvironment. Cancer Immunol Res 2014;2(3):274-85.

63. Liu R, Li P, Bi CW, Ma R, Yin Y, Bi K, et al. Plasma N-acetylputrescine, cadaverine and 1,3-diaminopropane: potential biomarkers of lung cancer used to evaluate the efficacy of anticancer drugs. Oncotarget 2017;8(51):88575-85.

64. Xu H, Liu R, He B, Bi CW, Bi K, Li Q. Polyamine Metabolites Profiling for Characterization of Lung and Liver Cancer Using an LC-Tandem MS Method with Multiple Statistical Data Mining Strategies: Discovering Potential Cancer Biomarkers in Human Plasma and Urine. Molecules 2016;21(8):1040.

65. Niemi RJ, Roine AN, Häkkinen MR, Kumpulainen PS, Keinänen TA, Vepsäläinen JJ, et al. Urinary Polyamines as Biomarkers for Ovarian Cancer. Int J Gynecol Cancer 2017;27(7):1360-6.

66. Johnson CH, Dejea CM, Edler D, Hoang LT, Santidrian AF, Felding BH, et al. Metabolism links bacterial biofilms and colon carcinogenesis. Cell Metab 2015;21(6):891-7.

67. Giskeødegård GF, Bertilsson H, Selnæs KM, Wright AJ, Bathen TF, Viset T, et al. Spermine and citrate as metabolic biomarkers for assessing prostate cancer aggressiveness. PLoS One 2013;8(4):e62375.

68. Pirnes-Karhu S, Jantunen E, Mäntymaa P, Mustjoki S, Alhonen L, Uimari A. Spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase activity associates with white blood cell count in myeloid leukemias. Exp Hematol 2014;42(7):574-80.

69. Rounbehler RJ, Li W, Hall MA, Yang C, Fallahi M, Cleveland JL. Targeting ornithine decarboxylase impairs development of MYCN-amplified neuroblastoma. Cancer Res 2009;69(2):547-53.

70. Lewis EC, Kraveka JM, Ferguson W, Eslin D, Brown VI, Bergendahl G, et al. A subset analysis of a phase II trial evaluating the use of DFMO as maintenance therapy for high-risk neuroblastoma. Int J Cancer 2020;147(11):3152-9.

71. Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. Int J Med Sci 2012;9(3):193-9.

72. Tang SM, Deng XT, Zhou J, Li QP, Ge XX, Miao L. Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. Biomed Pharmacother 2020;121:109604.

73. Mokbel K, Mokbel K. Chemoprevention of Breast Cancer With Vitamins and Micronutrients: A Concise Review. In Vivo 2019;33(4):983-97.

74. Steck SE, Murphy EA. Dietary patterns and cancer risk. Nat Rev Cancer 2020;20(2):125-38.

75. Forni C, Rossi M, Borromeo I, Feriotto G, Platamone G, Tabolacci C, et al. Flavonoids: A Myth or a Reality for Cancer Therapy? Molecules 2021;26(12):3583.

76. Ponte LGS, Pavan ICB, Mancini MCS, da Silva LGS, Morelli AP, Severino MB, et al. The Hallmarks of Flavonoids in Cancer. Molecules 2021;26(7):2029.

77. Ezzati M, Yousefi B, Velaei K, Safa A. A review on anti-cancer properties of Quercetin in breast cancer. Life Sci 2020;248:117463.

78. Georgiou N, Kakava MG, Routsi EA, Petsas E, Stavridis N, Freris C, et al. Quercetin: A Potential Polydynamic Drug. Molecules 2023;28(24):8141.

79. Kasiri N, Rahmati M, Ahmadi L, Eskandari N, Motedayyen H. Therapeutic potential of quercetin on human breast cancer in different dimensions. Inflammopharmacology 2020;28(1):39-62.

80. Li Y, Yao J, Han C, Yang J, Chaudhry MT, Wang S, et al. Quercetin, Inflammation and Immunity. Nutrients 2016;8(3):167.

81. Chirumbolo S. The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function. Inflamm Allergy Drug Targets 2010;9(4):263-85.

82. Noroozi M, Burns J, Crozier A, Kelly IE, Lean ME. Prediction of dietary flavonol consumption from fasting plasma concentration or urinary excretion. Eur J Clin Nutr 2000;54(2):143-9.

83. Ranganathan S, Halagowder D, Sivasithambaram ND. Quercetin Suppresses Twist to Induce Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells. PLoS One 2015;10(10):e0141370.

84. Ward AB, Mir H, Kapur N, Gales DN, Carriere PP, Singh S. Quercetin inhibits prostate cancer by attenuating cell survival and inhibiting anti-apoptotic pathways. World J Surg Oncol 2018;16(1):108.

85. Hisaka T, Sakai H, Sato T, Goto Y, Nomura Y, Fukutomi S, et al. Quercetin Suppresses Proliferation of Liver Cancer Cell Lines In Vitro. Anticancer Res 2020;40(8):4695-700.

86. Niazvand F, Orazizadeh M, Khorsandi L, Abbaspour M, Mansouri E, Khodadadi A. Effects of Quercetin-Loaded Nanoparticles on MCF-7 Human Breast Cancer Cells. Medicina (Kaunas) 2019;55(4):114.

87. Pham TND, Stempel S, Shields MA, Spaulding C, Kumar K, Bentrem DJ, et al. Quercetin Enhances the Anti-Tumor Effects of BET Inhibitors by Suppressing hnRNPA1. Int J Mol Sci 2019;20(17):4293.

88. Sturza A, Pavel I, Ancușa S, Danciu C, Dehelean C, Duicu O, et al. Quercetin exerts an inhibitory effect on cellular bioenergetics of the B164A5 murine melanoma cell line. Mol Cell Biochem 2018;447(1-2):103-9.

89. Li S, Pei Y, Wang W, Liu F, Zheng K, Zhang X. Quercetin suppresses the proliferation and metastasis of metastatic osteosarcoma cells by inhibiting parathyroid hormone receptor 1. Biomed Pharmacother 2019;114:108839.

90. Kim WK, Bang MH, Kim ES, Kang NE, Jung KC, Cho HJ, et al. Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells. J Nutr Biochem 2005;16(3):155-62.

91. Long B, Zhou H, Xiao L, Jiang X, Li J, Ma Z, et al. Targeting NUF2 suppresses gastric cancer progression through G2/M phase arrest and apoptosis induction. Chin Med J (Engl) 2024;137(20):2437-51.

92. Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. Eur J Pharmacol 2008;585(2-3):325-37.

93. Abarikwu SO, Pant AB, Farombi EO. Dietary antioxidant, quercetin, protects sertoli-germ cell coculture from atrazine-induced oxidative damage. J Biochem Mol Toxicol 2012;26(11):477-85.

94. Lee TJ, Kim OH, Kim YH, Lim JH, Kim S, Park JW, et al. Quercetin arrests G2/M phase and induces caspase-dependent cell death in U937 cells. Cancer Lett 2006;240(2):234-42.

95. Catanzaro D, Ragazzi E, Vianello C, Caparrotta L, Montopoli M. Effect of Quercetin on Cell Cycle and Cyclin Expression in Ovarian Carcinoma and Osteosarcoma Cell Lines. Nat Prod Commun 2015;10(8):1365-8.

96. Choi EJ, Bae SM, Ahn WS. Antiproliferative effects of quercetin through cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MDA-MB-453 cells. Arch Pharm Res 2008;31(10):1281-5.

97. Kim SH, Yoo ES, Woo JS, Han SH, Lee JH, Jung SH, et al. Antitumor and apoptotic effects of quercetin on human melanoma cells involving JNK/P38 MAPK signaling activation. Eur J Pharmacol 2019;860:172568.

98. Lee WJ, Hsiao M, Chang JL, Yang SF, Tseng TH, Cheng CW, et al. Quercetin induces mitochondrial-derived apoptosis via reactive oxygen species-mediated ERK activation in HL-60 leukemia cells and xenograft. Arch Toxicol 2015;89(7):1103-17.

99. Gao X, Wang B, Wei X, Men K, Zheng F, Zhou Y, et al. Anticancer effect and mechanism of polymer micelle-encapsulated quercetin on ovarian cancer. Nanoscale 2012;4(22):7021-30.

100. Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. Mediators Inflamm 2007;2007:45673.

101. Pratheeshkumar P, Budhraja A, Son YO, Wang X, Zhang Z, Ding S, et al. Quercetin inhibits angiogenesis mediated human prostate tumor growth by targeting VEGFR- 2 regulated AKT/mTOR/P70S6K signaling pathways. PLoS One 2012;7(10):e47516.

102. Balakrishnan S, Bhat FA, Raja Singh P, Mukherjee S, Elumalai P, Das S, et al. Gold nanoparticle-conjugated quercetin inhibits epithelial-mesenchymal transition, angiogenesis and invasiveness via EGFR/VEGFR-2-mediated pathway in breast cancer. Cell Prolif 2016;49(6):678-97.

103. Hashemzaei M, Delarami Far A, Yari A, Heravi RE, Tabrizian K, Taghdisi SM, et al. Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. Oncol Rep 2017;38(2):819-28.

104. Kee JY, Han YH, Kim DS, Mun JG, Park J, Jeong MY, et al. Inhibitory effect of quercetin on colorectal lung metastasis through inducing apoptosis, and suppression of metastatic ability. Phytomedicine 2016;23(13):1680-90.

105. Iriti M, Kubina R, Cochis A, Sorrentino R, Varoni EM, Kabała-Dzik A, et al. Rutin, a Quercetin Glycoside, Restores Chemosensitivity in Human Breast Cancer Cells. Phytother Res 2017;31(10):1529-38.

106. Hui C, Qi X, Qianyong Z, Xiaoli P, Jundong Z, Mantian M. Flavonoids, flavonoid subclasses and breast cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. PLoS One 2013;8(1):e54318.

107. Linsalata M, Orlando A, Messa C, Refolo MG, Russo F. Quercetin inhibits human DLD-1 colon cancer cell growth and polyamine biosynthesis. Anticancer Res 2010;30(9):3501-7.

108. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193(1):265-75.

109. Taibi G, Schiavo MR, Gueli MC, Rindina PC, Muratore R, Nicotra CM. Rapid and simultaneous high-performance liquid chromatography assay of polyamines and monoacetylpolyamines in biological specimens. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2000;745(2):431-7.

110. Morgan DM. Determination of polyamines as their benzoylated derivatives by HPLC. Methods Mol Biol 1998;79:111-8.

111. Soda K. The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. J Exp Clin Cancer Res 2011;30(1):95.

112. Byun JA, Lee SH, Jung BH, Choi MH, Moon MH, Chung BC. Analysis of polyamines as carbamoyl derivatives in urine and serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Biomed Chromatogr 2008;22(1):73-80.

113. Erbaş H, Bal O, Çakır E. Effect of rosuvastatin on arginase enzyme activity and polyamine production in experimental breast cancer. Balkan Med J 2015;32(1):89-95.

EKLER

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 2022/09
Karar No: 2022.09.03
Karar Tarihi: 28.09.2022
Hayvan Sayısı ve Cinsi: Balb/c 50 adet

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana bilim dalı öğretim üyesi, Prof. Dr. Hakan ERBAŞ'ın yaptığı, Araş. Gör. Dr. Furkan SERİN'in tıpta uzmanlık tezi olarak planlanan, TÜHADYEK-2022/31 protokol no'lu, **"Deneysel Olarak Oluşturulmuş Meme Tümörlerinde Kuersetin'in Poliamin Metabolizması Üzerine Etkileri"** başlıklı çalışma isteği görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmelik ve Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

KABUL

Prof. Dr. Hakan ERBAŞ
Başkan
Araştırma ile İlişki: ☑ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☑ hayır

Prof. Dr. Enis ULUÇAM
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☑yok
Toplantı Katılım: ☑evet ☐ hayır

Prof. Dr. Suat ERDOĞAN
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Y. Atakan SEZER
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Tevfik AKTOZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒yok
Toplantı Katılım: ☒evet ☐ hayır

Prof. Dr. Necdet SÜT
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Elvan BAKAR
Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒yok
Toplantı Katılım: ☒evet ☐ hayır

Doç. Dr. Filiz SANAL
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Dr. Öğr. Üyesi F. Gülfeşan ÇANAKÇI
Diş Hekimliği Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Vet. Hek. Kenan SELVİ
Vet. Hek. Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☑yok
Toplantı Katılım: ☑ evet ☐ hayır

Ecz. Fulya GÜLER
Sivil Toplum Kuruluşu Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Tarık AYKIZ
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒yok
Toplantı Katılım: ☒evet ☐ hayır