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

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Hakan ERBAŞ

# DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULMUŞ MEME TÜMÖRLERİNDE ROSUVASTATİN'İN ARGİNAZ ENZİM AKTİVİTESİ, ORNİTİN VE POLİAMİN DÜZEYLERİNE ETKİSİ

**(Uzmanlık Tezi)**

**Dr. Oğuz BAL**

EDİRNE-2013

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, yönlendiren, tez çalışmamda çok değerli katkıları olan Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Hakan ERBAŞ başta olmak üzere Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Erol ÇAKIR'a, Sayın Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN'e, Sayın Doç. Dr. Sevgi ESKİOCAK'a, çalışmamızı destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne ve çalışmam boyunca destek veren tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER


**GİRİŞ VE AMAÇ** ..... 1

**GENEL BİLGİLER** ..... 3

- **MEME KANSERİ** ..... 3
- **MEME ANATOMİSİ** ..... 6
- **ARGİNAZ ENZİMİ** ..... 8
- **POLİAMİNLER** ..... 11
- **ROSUVASTATİN** ..... 15

**GEREÇ VE YÖNTEMLER** ..... 18

**BULGULAR** ..... 32

**TARTIŞMA** ..... 42

**SONUÇLAR** ..... 46

**ÖZET** ..... 48

**SUMMARY** ..... 50

**KAYNAKLAR** ..... 52

**EKLER**

# SİMGE VE KISALTMALAR

**AI** **:** Hepatik arginaz

**AII** **:** Ekstrahepatik arginaz

**ADC** **:** Arginin dekarboksilaz

**ADP** **:** Adenozin difosfat

**AMP** **:** Adenozin monofosfat

**ATP** **:** Adenozin trifosfat

**DFMO** **:** α-diflorometil ornitin

**DNA** **:** Deoksiribonükleik asit

**HMG KoA** **:** 3-hidroksi-3-metil-glutaril koenzim A

**NADPH** **:** Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

**NO** **:** Nitrik oksit

**NF-κB** **:** Nüklear faktör kappa B

**OAT** **:** Ornitin amino transferaz

**ODC** **:** Ornitin dekarboksilaz

**PAO** **:** Poliamin oksidaz

**SAM** **:** S-adenozilmetiyonin

**SAMDC** **:** S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz

**SSAT** **:** Spermidin/spermin N-asetil transferaz

**TCA** **:** Trikloroasetik asit

# GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümördür (1). Meme kanseri (invaziv duktal kanser) gelişmeden önce duktus epiteli, atipik duktal hiperplazi, duktal karsinoma insitu gibi evrelerden geçer ve sonunda meme kanseri oluşur (2).

Kanserle savaşta etiyolojik faktörler, kanser öncesi lezyonlar, kanser öncüllerini bilmenin yanında, önemli bir başka faktör de teşhisinin erken, doğru ve kolay tespit edilmesidir. Metastazların erken dönemde belirlenmesi yapılacak tedavinin planlanması ve başarısı açısından son derecede önemlidir. Erken dönemde metastaz bulunan hastaların çoğunluğunun asemptomatik olması ve görüntüleme yöntemlerinin bu dönemde yalancı negatif sonuçlar verebilmesi, bazı biyokimyasal belirleyicileri bu konuda önemli duruma getirmektedir (3).

Arginaz enzimi; L-Argininin, üre ve ornitine hidroliz edilmesini sağlar. Arginaz aktivitesinin en fazla olduğu doku karaciğerdir. Arginaz enzimi karaciğer dışında eritrosit, lökosit, trombosit, böbrek, beyin, pankreas, bağırsak, epidermis, akciğer, tükrük bezi, pankreas, iskelet ve kalp kasında bulunmaktadır (4).

Memeli hücrelerinin tümü poliaminler (putresin, spermidin ve spermin) içermektedir (5). Yapılan çalışmalar, poliaminlerin tüm hücrelerde büyüme ve bölünme için gerekli olan polikatyonik bileşikler olduğunu göstermiştir (6).

Sentetik bir molekül olan rosuvastatin, 3-hidroksi-3-metil-glutaril koenzim A (HMG KoA) redüktaz enzimi inhibitörüdür. Rosuvastatin; kolesterol sentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan HMG KoA'dan mevalonat asit oluşumunu katalizleyen enzimi selektif, reversible ve yarışmalı olarak inhibe eder. Rosuvastatinin, diğer statinlerde olduğu gibi HMG

KoA redüktaz inhibisyonundan bağımsız etkileri de vardır. Bunlar endotel fonksiyonunda iyileşme, antiinflamatuar, antitrombotik ve antioksidan etkilerdir (7).

Bu çalışmada; rosuvastatin'in, meme kanseri üzerindeki etkilerinin araştırılması planlanmıştır. İlk kez bu çalışma ile rosuvastatin'in, kanser ile ilişkili bulunan arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve poliamin düzeyleri üzerine olan etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

# GENEL BİLGİLER

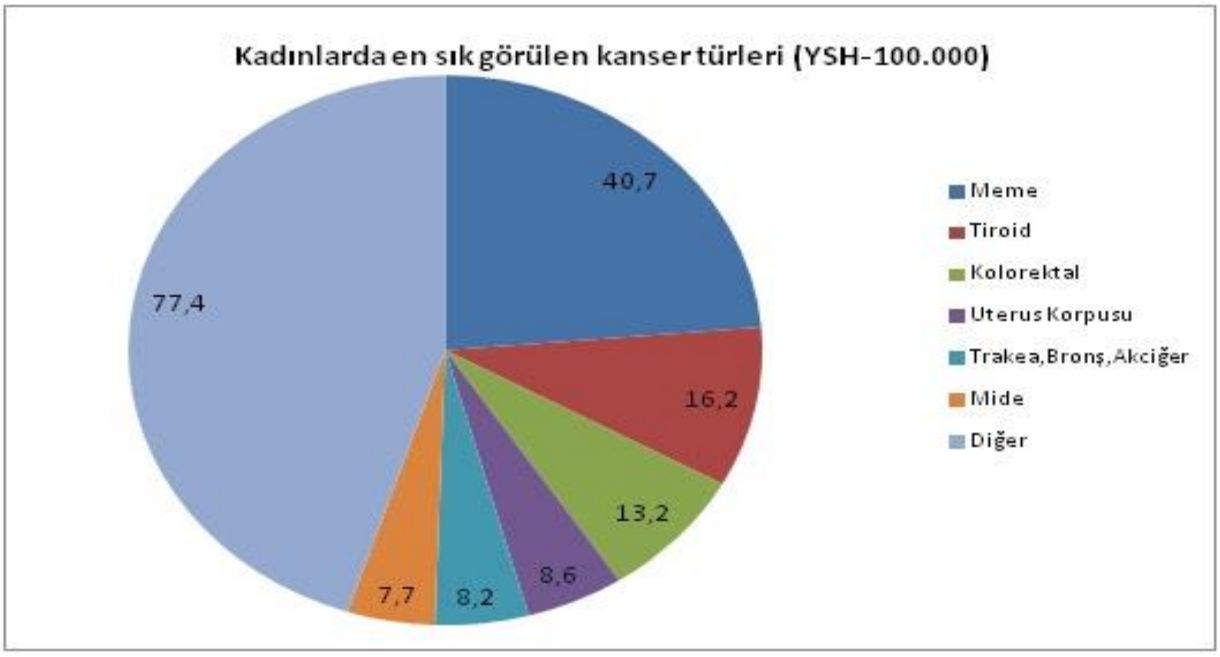
## MEME KANSERİ

Meme kanseri, meme ve epitelyum dokusundan kaynaklanan malign bir tümördür (8). Kanser sık görülen, çoğu zaman ölüm ile sonuçlanan bir sağlık problemidir (Tablo 1). Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser olup, ondan sonra sırayla tiroid ve kolorektal kanser gelir (Şekil 1) (9).

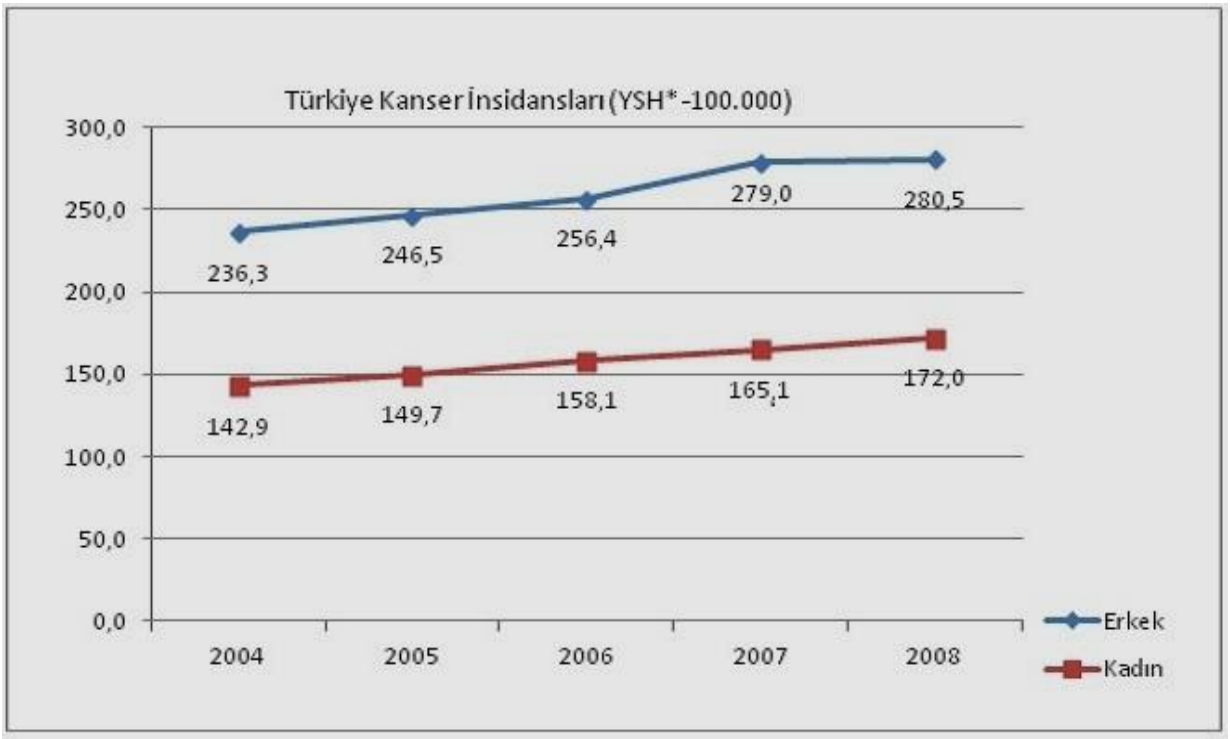
**Tablo 1. Türkiye 2009 yılı ölüm nedenlerinin cinsiyete göre dağılımı (9)**

| | Erkek | Kadın | Toplam |
|---|---|---|---|
| Kalp ve damar hastalıkları | 36,2 | 44,4 | 39,9 |
| Kanser | 24,4 | 16,0 | 20,7 |
| Solunum yolu hastalıkları | 10,1 | 7,4 | 8,9 |
| Metabolik hastalıklar | 4,8 | 8,3 | 6,4 |
| Zehirlenme ve travma | 4,9 | 2,8 | 4,0 |
| Diğer | 19,6 | 21,0 | 20,2 |

Türkiye'de 2004-2008 yılları arasında erkek ve kadınlar için kanser sıklığı aşağıda verilmiştir (Şekil 2) (9).

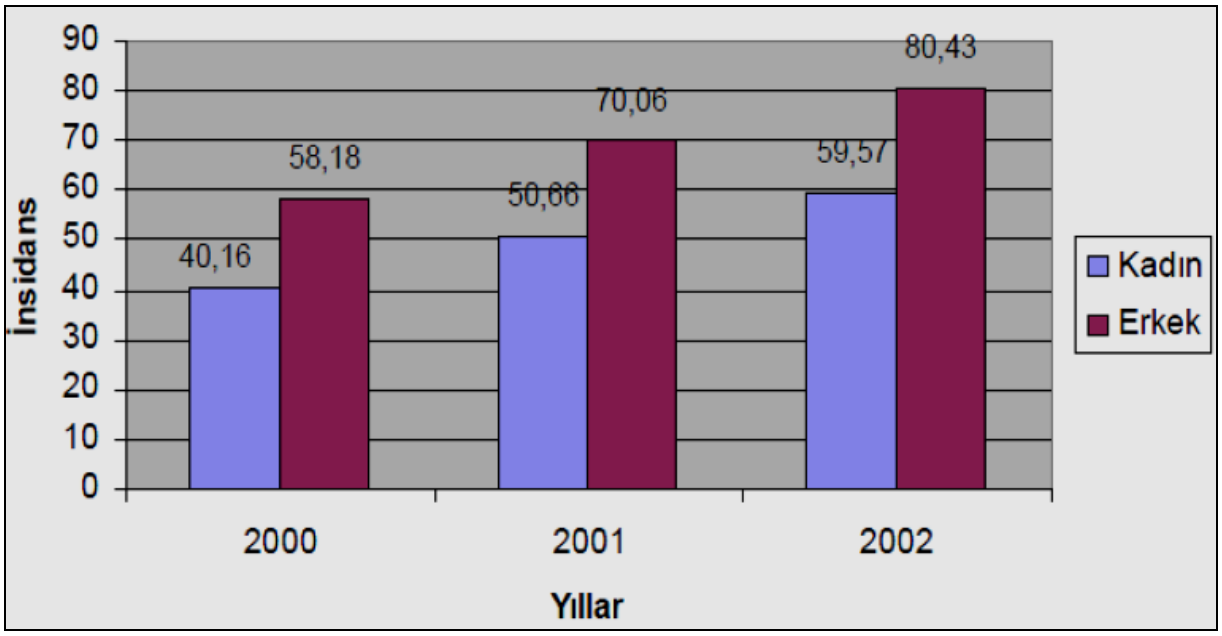



**Şekil 1. Türkiye'de 2008 yılına ait, kadınlarda sık görülen kanser türleri (9)**

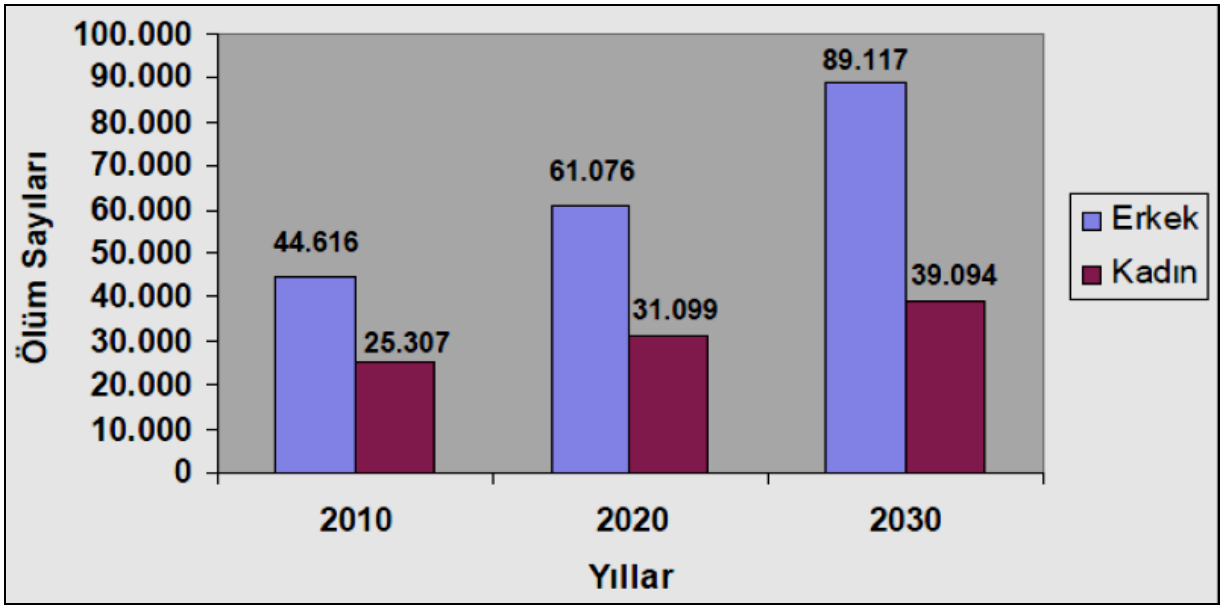



**Şekil 2. Türkiye'de kanser insidanslar (9)**

Ülkemizde 2009 yılında yayınlanan verilere göre, tahmin edilen kanser insidans ve beklenen ölüm hızlarında artış olduğu görülmektedir (Şekil 3 ve 4) (10).




**Şekil 3. Türkiye'de cinsiyete göre 2000-2002 yılları kanser insidans hızları (yüzbinde) (10)**




**Şekil 4. Türkiye'de kansere bağlı beklenen ölüm hızları (10)**

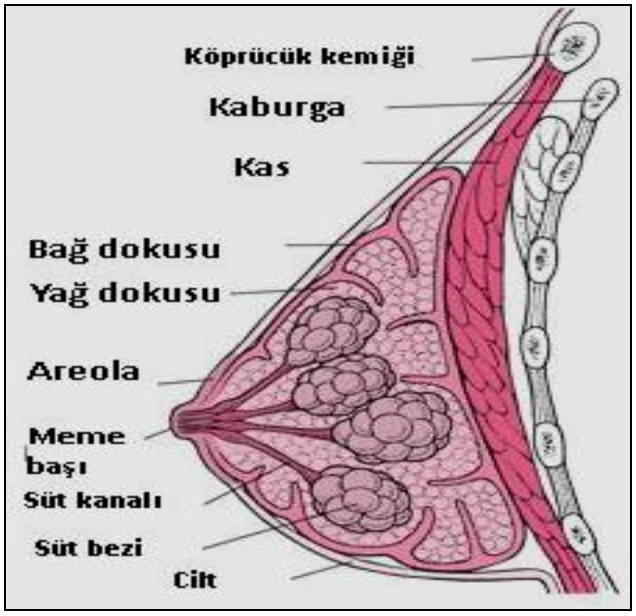
Kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık % 30'unu meme kanseri içerir. Avrupa'da yılda 180 bin, Amerika Birleşik Devletlerinde yılda 184 bin yeni olgu tespit edilmektedir (11). Meme kanseri 30 yaşından önce az görülmekle beraber, 30 yaşından sonra görülme hızı artmaktadır. Her kadının tüm yaşamı boyunca meme kanserine yakalanma ihtimali 1/10'dur (12). Kadınlarda tüm kansere bağlı ölümlerin % 18'i meme kanseri

nedeniyle olmaktadır. Akciğer kanserinden sonra meme kanseri, kansere bağlı ölümlerde ikinci sıradadır (13).

Meme kanseri erkeklerde ender görülür. Erkeklerde görülen meme kanseri tüm meme kanserleri içerisinde % 0,6 oranında olup, erkeklerde görülen tüm kanserler içinde ise % 1'in altında bulunmaktadır (14). Türkiye'de Sağlık bakanlığının 2008 yılı verilerine göre meme kanseri sıklığı yüzbinde 40 civarındadır (9).

**MEME ANATOMİSİ**

Meme; meme bezleri, kan damarları, lenfatikleri ve yağ dokusu içerir. Erişkin kadın memesi toraks ön duvarındaki yüzeyel faysa içerisine yerleşmiş, vertikalde 2. ve 6. kostalar arasında, transversde sternumla orta aksiler çizgi arasında uzanan bir organdır. Memenin üçte ikisi major pektoral kas, geri kalanı da serratus anterior kası önüne uzanır. Yüzeyel faysa ile meme derisi arasında ‘‘cooper ligamentleri’’ adı verilen uzanımla yer alır (15). Meme glandı morfolojik olarak her birinin duktusu olan 15-20 lob içerir (Şekil 5).




**Şekil 5. Meme anatomisi (16)**

**Risk Faktörleri**

**Yaş:** Yaş en önemli bağımsız faktördür. Meme kanseri daha çok postmenopozal dönemde görülür (17).

**Genetik faktörler:** Meme kanserinin genetik faktörlerle ilgisi % 10 kadar hastada olur. Tüm yaş gruplarındaki meme kanserlerinin % 4'ünde, 40 yaş üstündeki meme

kanserlerinin ise % 25'inde BRCA1 geni bulunmaktadır. BRCA2 geni ailevi olgularda meme kanserinin ortaya çıkışında ve bilateral oluşumunda rol alan bir gendir (17).

**Aile hikayesi:** Ailesinde meme kanseri hikayesi olmak meme kanseri için önemli bir risk faktörüdür. Anne ve kız kardeşinde meme kanseri bulunan bir genç kadında yaşam boyu meme kanseri gelişme riski % 50'dir. Aile öyküsü olan kadınlar meme kanserine daha erken yaşta yakalanma ve bilateral olma eğilimindedir (17).

**Herediter Sendromlar:** Meme kanseri riski bazı herediter sendromlarda artar. Bunlar Lynch Tip II, Li-Fraumeni Sendromu, Cowden Hastalığı ve Ataksi Telenjiektazidir (17).

**Menarş ve menopoz yaşı:** Erken menarş ve geç menopoz, kadınların hormonlara maruz kaldığı süreyi arttırdığından dolayı artmış meme kanseri riski ile birliktedir. Menarşın geciktirildiği her yıl meme kanseri riskini % 20 azaltmaktadır (17).

**İlk hamilelik-ilk doğum yaşı:** Nulliparite ve ilk doğumu geç yaşta yapmak meme kanseri riskini artırırken erken yaşta doğumla sonlanmış gebelik meme kanseri riskini % 10-13 azaltmaktadır. Çalışmalar gebeliğin getirdiği koruyucu etkinin özellikle ilk gebeliğin doğum yaşına bağlı olduğunu göstermiştir (17).

**Benign meme hastalığı:** Benign meme hastalığı ile meme kanseri riski arasındaki ilişki proliferasyonun olup olmamasına bağlı değişebilir. Basit kist, fibrozis, basit fibroadenom, duktus ektazisi gibi proliferasyon olmayan selim lezyonlar riski değiştirmeyebilir. Atipik hiperplazi olan kadınlarda 4-5 kat, atipik hiperplazi yanında birinci derece yakınında meme kanseri öyküsü olanlarda 9 kez risk artışı bulunmuştur (17).

**Hormon Replasman Tedavisi (HRT):** Hormon replasman tedavisinin uzun süre kullanımı ile meme kanseri arasında risk artışında bir ilişki düşünülmektedir. Östrojenin tek başına kısa süreli kullanımı risk artışına sebep olmazken bazı çalışmalarda uzun süreli kullanımında risk artışı bulunmuştur (17).

**Obezite:** Obezite postmenopozal hastalarda riski iki kat artırmasına karşın premenopozal kadınlarda obezite koruyucu gibi görünmektedir (17).

**Alkol:** Alkol alımının meme kanseri riskini artırdığı gösterilmiştir. Günde 15 gr veya daha fazla alkol tüketiminin riski % 50 artırdığı ifade edilmiştir. Özellikle 30 yaş altında alkol alımına başlamanın çok daha önemli bir risk faktörü olduğu vurgulanmıştır (17).

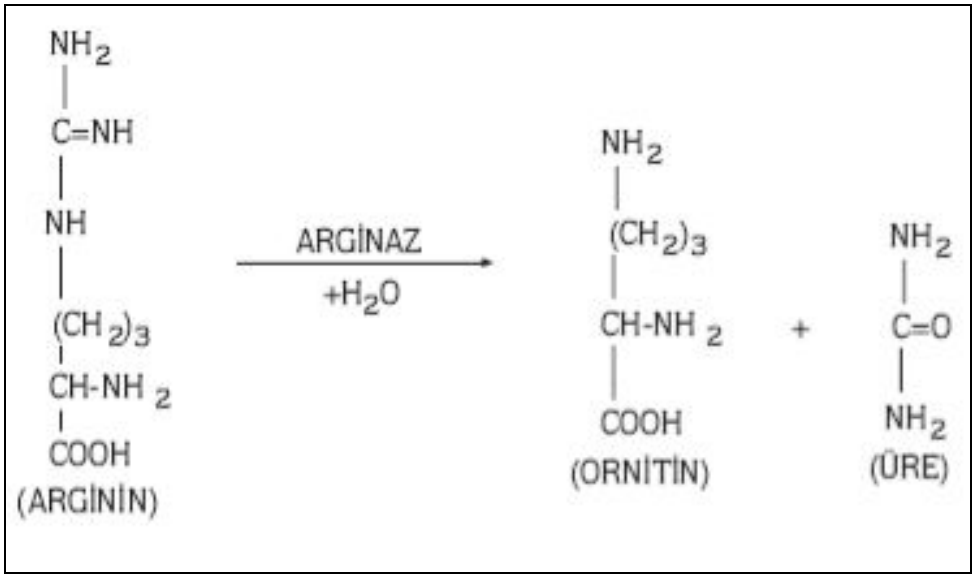
**Sigara:** Sigara ile meme kanseri arasında net bir ilişki saptanmamasına karşın pasif sigara dumanına maruz kalmanın bazı çalışmalarda meme kanseri riskini arttırdığı saptanmıştır (17).

**Fiziksel aktivite:** 40 yaş altında haftada 4 saat veya daha fazla egzersiz yapan kadınların meme kanserine yakalanma oranları, hiç egzersiz yapmayan kadınlara göre % 60 oranında azalmış olarak gösterilmiştir (17).

**Radyasyon:** Nükleer savaş, tanı ve tedavi nedeniyle iyonize radyasyona maruz kalanlarda meme kanseri riskinde artış olabilir. Radyasyona duyarlılık, matürasyonunu tamamlamamış meme dokusunda daha fazladır. Özellikle puberte ve 30 yaş arasındaki dönem tehlikelidir. Radyasyona bağlı meme kanseri gelişimi radyasyona maruz kalma süresi ile ilişkili bulunmuştur (17).

## ARGİNAZ ENZİMİ

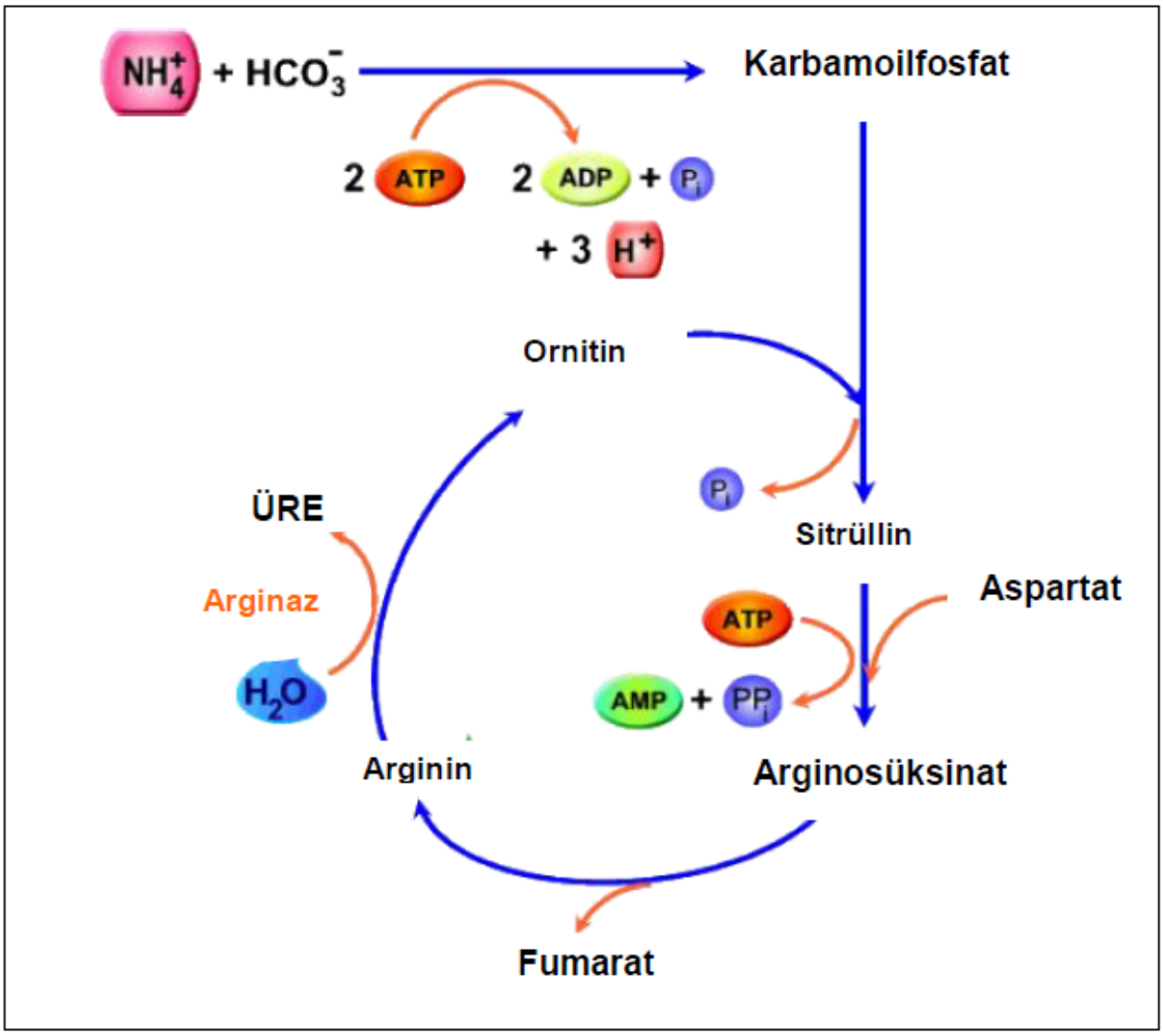
Nitrojen metabolizmasından sorumlu olan arginaz enzimi; L-Argininin, üre ve ornitine hidroliz edilmesini sağlar (Şekil 6) (18). Arginaz enziminin AI ve AII olmak üzere iki izoformu vardır. Arginaz I (hepatik arginaz) stoplazmada iken, arginaz II (ekstrahepatik arginaz) ise mitokondride bulunmaktadır (19). Arginaz I üre sentezi ve amonyağın detoksifikasyonunda görevli iken, arginaz II'nin ornitin, glutamat, prolin gibi biyosentetik fonksiyonlarla ilgili olduğu düşünülmektedir (20).



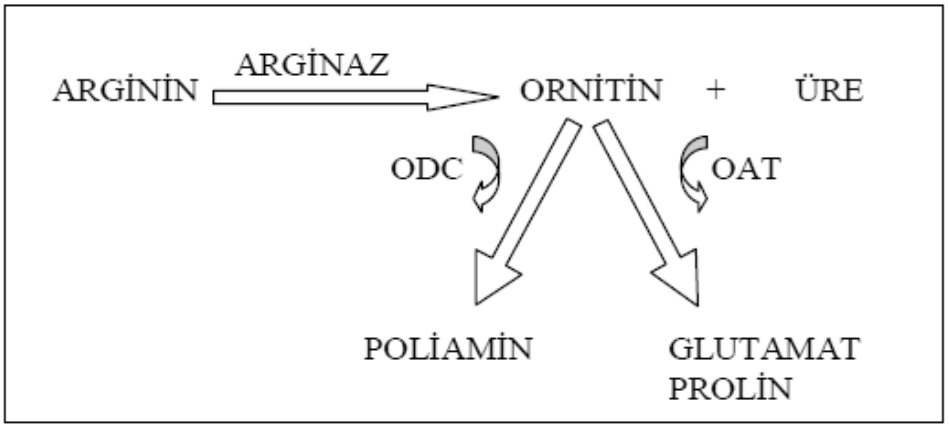

**Şekil 6. Arginin'den ornitin ve üre oluşumu (21)**

Arginaz aktivitesinin en fazla olduğu doku karaciğerdir. Arginaz karaciğer dışında eritrosit, lökosit, trombosit, böbrek, beyin, pankreas, bağırsak, epidermis, akciğer, tükrük bezi, pankreas, iskelet ve kalp kasında bulunmaktadır (4).

Üre, protein metabolizmasının son ürünü olup, vücuttan atılan azotun % 75'ten sorumludur. Üre biyosentezi, karaciğerde üre döngüsü enzimleriyle yapılır. Artmış amonyak düzeylerinin santral sinir sistemi üzerindeki toksik etkileri, karaciğerde Krebs-Henseleit üre döngüsü ile ortadan kaldırılır (Şekil 7) (22). Ornitinden ornitin dekarboksilaz (ODC) enzimi ile poliaminler ve ornitin aminotransferaz (OAT) enzimi ile de glutamat ve prolin oluşturulur (Şekil 8) (23).




**Şekil 7. Üre döngüsü (21)**




**Şekil 8. Ornitinden poliamin, prolin ve glutamat sentezi**

**Arginaz Enziminin Kinetik Özellikleri**

Bir metaloenzim olan arginazın tam katalitik aktivite gösterebilmesi ve kuarterner yapının oluşması için her subünitenin bir mol $Mn^{+2}$ içermesi gerekir (24). Arginaz aktivitesinin % 90-95'i $Mn^{+2}$ iyonlarına bağlıdır. Bu bağlanma enzimin ısıya dayanıklılığını yükseltmekte ve inhibitör maddelere karşı daha dayanıklı hale getirmektedir (25). Arginaz çok stabil bir enzimdir ve uzun süreler boyunca bile düşük sıcaklıkta saklandığı zaman aktivitesi azalmamaktadır (26).

$Co^{+2}$, $Ni^{+2}$, $Cd^{+2}$, $Mg^{+2}$, $Ca^{+2}$ gibi iki değerlikli iyonların, arginaz aktivitesi üzerine etkilerinin $Mn^{+2}$ iyonlarına göre daha az olduğu görülmüştür. $Hg^{+2}$, $Zn^{+2}$ ve $Ag^{+2}$ gibi ağır metaller ise arginaz aktivitesini düşürmektedir (25). Arginaz enzimi, maksimum aktivitesini gösterebilmesi için $Mn^{+2}$ iyonları yanında 55 °C'de preinkübasyon gerektirmektedir. 55 °C'de yapılan preinkübasyon, enzim aktivitesini $Mn^{+2}$ varlığında % 110 artırır (27). Arginazın arginini hidroliz edebilmesi için gerekli optimum pH, 9,4 ile 9,8 arasıdır (25).

Arginaz katalizörlüğünde meydana gelen reaksiyon sonucunda oluşan ornitin, arginazı inhibe ederken, ürenin böyle bir etkisi yoktur. Lösin, izolösin, lizin, prolin, sistein, valin ve tirozin gibi L-aminoasitlerin arginaz üzerine inhibitör etkisi bulunmaktadır. Ornitin ve lizin yarışmalı; valin, lösin, izolösin ve sistein ise yarışmasız inhibisyona yol açar (25). Östrojen, glukagon, kortikosteroidler ve tiroid hormonunun arginaz enzimini indüklediği bildirilmiştir (28).

### Arginaz Enziminin Klinik Önemi ve Kanserle Olan İlişkisi

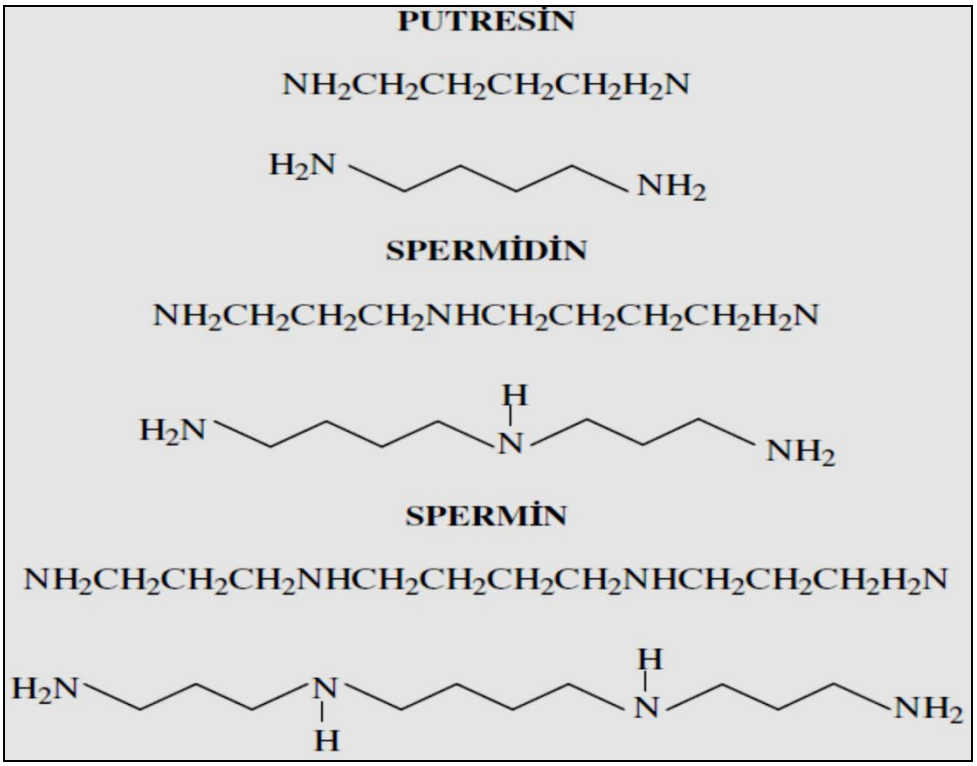
Arginaz ekspresyonu esas olarak kritik hastalıklar sırasında, inflamatuar döngüde ve hücrelerde immun cevap regülasyonunda meydana gelmektedir (29). Sağlıklı kişilerde serum arginaz aktivitesi düşüktür (30). Arginaz aktivitesinin psöriasis hastalığı gibi bazı cilt hastalıklarında ve hiperkeratinizasyonda arttığı belirtilmiştir (31). Serum arginaz aktivitesi akut hepatit, safra kanallarının malign tümörleri, siroz ve karaciğer metastazları gibi hücre hasarına yol açan karaciğer hastalıklarında yükselmektedir (32). Akut ve kronik pankreatitli hastalarda serum arginaz aktivitesi kontrol grubuna göre yüksek tespit edilmiş olup tedaviden sonra arginaz aktivitesi düşmüştür (33). Eritrosit arginaz düzeyinin talasemi ve pernisiyöz anemi gibi hastalıklarda, kurşun zehirlenmelerinde yükseldiği tespit edilmiştir (34).

Birçok araştırmacı tarafından arginazın kanser ile olan yakın ilişkisi, çeşitli şekillerde ortaya konmuştur. Meme kanserinde operasyon öncesi dönemde serum arginaz düzeyinin sağlıklı kadınlardan dört kat yüksek olduğu bulunmuştur (35). Sirozlu hastalarla yapılan bir çalışmada, sağlıklılara göre serum arginaz aktivitesi yüksek bulunmuştur (36). Peptik ülser ve gastrik kanserli hastalarda serum arginaz düzeyi incelenmiş olup, serum arginaz aktivitesi gastrik kanserli hastalarda, peptik ülserli hastalardan ve sağlıklı kişilerden anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Aynı araştırmacılar gastrik kanserin evresi ile serum arginaz aktivitesi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. İleri evre gastrik kanserde arginaz aktivite düzeyinin, erken evre gastrik kanser ve kontrol grubundan daha yüksek olduğu bulunmuştur. Araştırmalar, serum arginaz aktivitesindeki artışın kanser boyutu ile ilgili olduğunu göstermektedir (37). Küçük hücreli akciğer kanserinde yapılan çalışmada ornitin ve arginaz düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu görülmüş olup, arginazın kanserde bir belirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (38).

Çeşitli kanser türleri üzerinde yapılan birçok farklı çalışmada serum ve doku arginaz düzeyleri incelenmiş, arginaz enzim aktivitesi kanserle ilişkili bulunmuştur. Hatta bazı araştırmacılar kanserli hastalarda arginaz enzim aktivitesinin önemli bir belirteç olabileceğini vurgulamışlardır (37-40).

## POLİAMİNLER

Memeli hücrelerinin tümünde poliaminler bulunur. Bunlar putresin (diamin), spermidin (triamin) ve spermin (tetraamin)'dir (Şekil 9). Bu alifatik poliaminler suda eriyebilen, düşük molekül ağırlıklı, basit kimyasal yapıya sahip moleküllerdir (41).



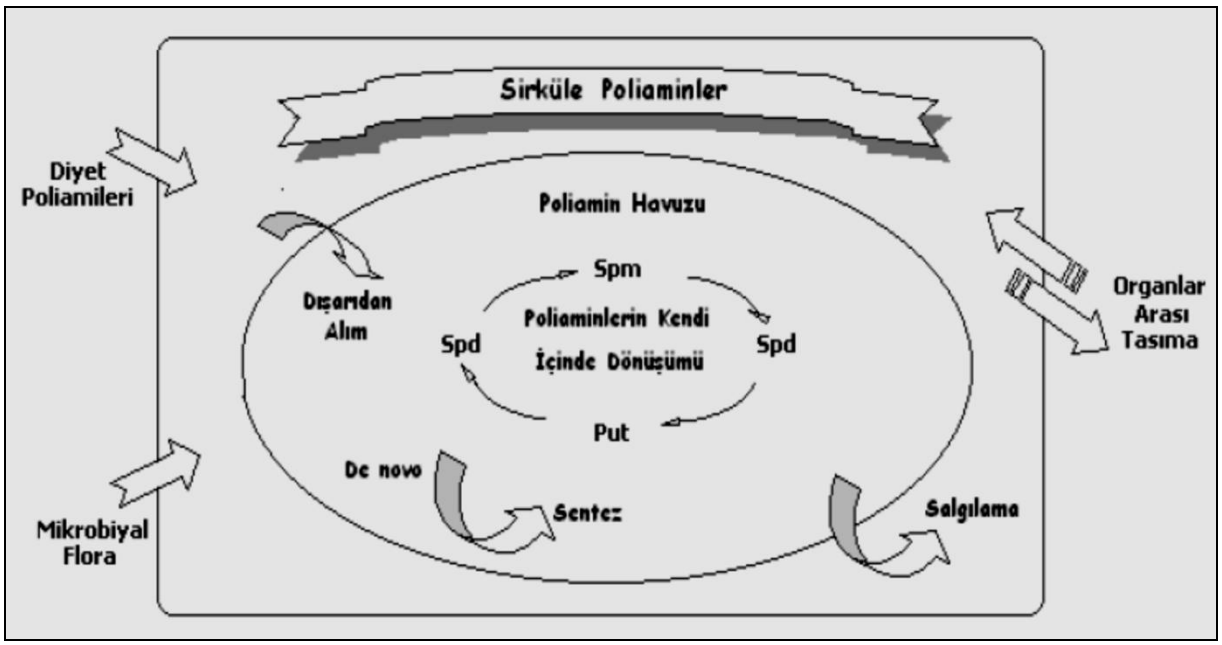

**Şekil 9. Poliaminlerin kimyasal yapıları (**42**)**

Yapılan çalışmalar, poliaminlerin tüm hücrelerde büyüme ve bölünme için gerekli olan polikatyonik bileşikler olduğunu göstermiştir (6). Hücre içi poliamin seviyesi çok sıkı sınırlar içerisinde tutulmaktadır. Poliamin seviyesindeki azalma hücre büyümesini engellerken, poliaminlerin aşırı artışı da hücreler için toksiktir. Bu yüzden, hücreler hızlı ve hassas bir şekilde poliamin seviyesini düzenleyici mekanizmalara sahiptir. Hücreler ihtiyaçlarına göre yeni poliaminler sentezleyebilirler veya her bir poliamini birbirine dönüştürebilirler (43). Hızlı çoğalan hücrelerde büyüme faktörleri veya hormonlar ile meydana gelen uyarılma, hücre içi poliamin seviyesinin yükselmesine sebep olur (44).

Poliaminler hücre bölünmesi, protein-DNA etkileşimleri, hücre farklılaşması, embriyonik gelişim, immunolojik etkileşimler, sinyal iletimi, apoptoz, DNA ve RNA konformasyonel değişimleri ile kanser gibi çok çeşitli alanlarda görevleri olan alifatik yapılardır (45). Hücrede poliaminler elektrostatik olarak DNA, RNA ve protein gibi negatif yüklü fosfolipidlere bağlanma özellikleri vardır (46). Pozitif yüklü poliaminler, negatif yüklü hücresel makromoleküller ile proteinler, DNA ve RNA gibi membran yapıları ile elektrostatik olarak etkileşimde olup, bu etkileşimler poliaminlerin hücre büyümesi, bölünmesi ve farklılaşmasında rol oynamasını sağlar (47). Ribozomları, nükleik asitleri ve membranları stabilize eden poliaminler hücreyi serbest radikallerden ve lipid peroksidasyonundan korurlar

(48). Bunun dışında poliaminler hücre membranında, nörotransmitter salınmasında ve bazı iyon kanallarında $Ca^{++}$ akışını düzenlemektedir (49).

Hücre içi poliamin havuzunun büyüklüğü ve dengesi poliaminlerin *de novo* sentezi, kendi içinde dönüşümleri, dışarıdan alınmaları, terminal yıkımları ve salgılama yolu ile korunmaktadır. Organların büyümeleri, yenilenmeleri ve metabolizmaları için poliaminlere ihtiyaç duyulduğundan poliamin havuzu aynı şekilde muhafaza edilmelidir. Organizma poliaminleri kendi kendine sentez edebilme yeteneğine sahip olsa da, besin ve mikrobiyal floradan sağlanan dış kaynaklı poliaminlere gereksinim duyar (Şekil 10) (50).



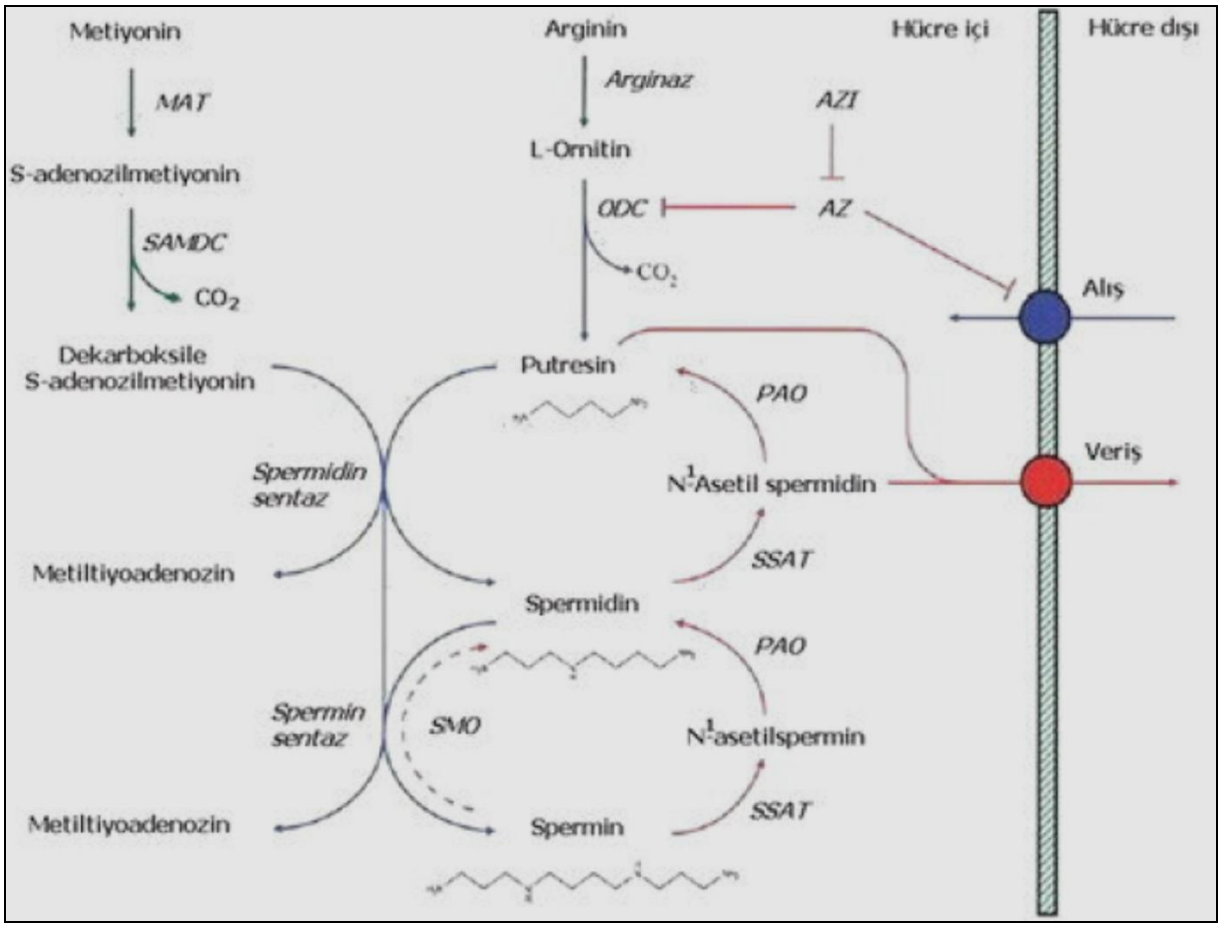

**Şekil 10. Poliamin homeostazı (**43**)**

**Poliamin Metabolizması**

Poliamin biyosentezindeki ilk reaksiyon, ornitin dekarboksilaz (ODC) tarafından ornitinin putresine olan dekarboksilasyonudur (46).

Putresin sentezi için bitkiler ve bazı mikroorganizmalar alternatif bir yol olan agmatin yolunu da kullanmaktadır. Agmatin yolunun memelilerde de bulunduğu bildirilmiştir. Bu yolda arginin, arginin dekarboksilaz (ADC) enzimi ile agmatin oluşturur. Oluşan agmatin, agmatinaz (agmatin amidinohidrolaz) enzimi ile putresini meydana getirir (51-53). Spermidin oluşumu, spermidin sentaz enzimi aracılığıyla dekarboksile S-adenozilmetiyoninden (SAM) bir aminopropil grubunun putresine eklenmesi ile gerçekleşir. İkinci bir aminopropil grubunun spermin sentaz ile spermidine eklenmesi ile spermin oluşur. Poliamin biyosentezini düzenleyen ornitin dekarboksilaz (ODC) ve S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz (SAMDC)

enzimleri ile biyosentez yolunda aktivite gösteren diğer enzimler uygun substrat varlığında görevlerini yaparlar (Şekil 11) (54).




**Şekil 11. Poliamin metabolizması (**55**)**

Ornitin dekarboksilaz iki alt üniteden meydana gelir ve aktivitesini yerine getirebilmek için piridoksal 5'fosfata ihtiyaç duyar (56).

S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz (SAMDC), poliamin sentezindeki ikinci önemli enzimdir. S-adenozilmetiyoninin dekarboksilasyonu bu bileşiği poliamin sentezine sokar ve bir metil vericisi olarak görev alır. Bu yüzden, spermidin ve spermin biyosentezi için çok gerekli bir enzimdir (57).

Poliamin katabolizması, hücresel aktivite kontrolünde poliamin sentezine göre daha düşük etkinliğe sahip olduğundan, araştırmacılar tarafından daha az ilgi görmüştür. Spermidin/spermin N-asetil transferaz (SSAT) hücre içi poliamin katabolizmasının en önemli enzimidir. Sperminin aminopropil grubunun Spermidin/spermin N-asetil transferaz (SSAT) varlığında asetilasyonu ile N-asetilspermin oluşur. Oluşan N-asetilspermin, poliamin oksidaz ile spermidin ve bir aldehit olan 3-asetamidopropanale dönüşür. Spermidinin aminopropil

grubu ise, spermidin/spermin N-asetil transferaz (SSAT) asetilasyonu ile N-asetilspermidin'e, N-asetilspermidin ise poliamin oksidaz ile putresin ve 3-asetamidopropanale dönüşür (58).

**Poliaminlerin Klinik Önemi ve Kanserle Olan İlişkisi**

Poliaminler hücre çoğalması için gerekli moleküllerdir. Tümör hücrelerinin gelişimi sırasında, poliamin düzeyinde ve poliamin biyosentez enzimlerinin düzenlenmesinde artma meydana gelmektedir. Yapılan çalışmalarda malign transformasyon için ornitin dekarboksilaz aktivitesine gereksinim duyulduğu gösterilmiştir (59).

Prostat kanserlerinde ve akut lenfoblastik löseminin teşhisinde, eritrosit poliaminlerinin ve beyin neoplastik büyümelerinde ornitin dekarboksilaz aktivitesinin bir belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (60-62). Spermidin/spermin N-asetil transferaz'ın (SSAT) mesane epitelinde güvenilir biyokimyasal belirteç olduğu saptanmıştır (63). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, poliaminlerin servikal kanserler içinde potansiyel bir belirteç olduğu düşünülmüştür (64). Kolon ve karaciğer kanserinde poliamin düzeylerinin kanser hücrelerinde arttığı gösterilmiştir (65).

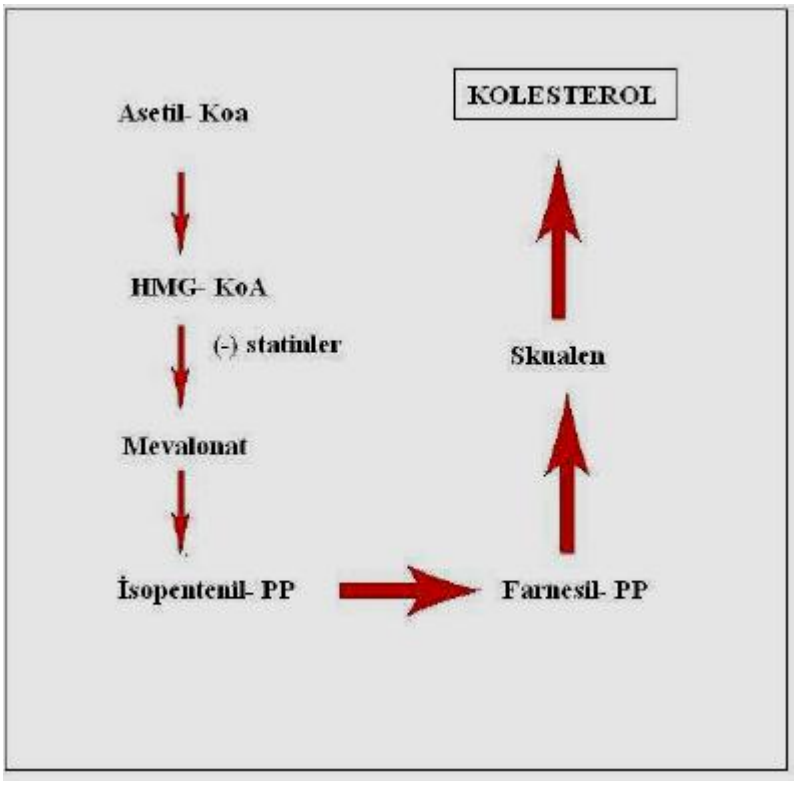
Poliamin biyosentez inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda, poliamin homeostazisinin engellenmesi ile tümör büyümesinin inhibe edilebileceği gösterilmiştir (61). Ornitin dekarboksilaz inhibitörü olan *a*-difloromethil ornitinin (DFMO), insan kolon kanseri hücrelerine uygulanması, gap junction oluşumunu kodlayan birçok geni, baskılanması ile sonuçlanmıştır (66). Gap junction proteinin, karsinogenezde hücre haberleşmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (67). Poliamin düzeyinde meydana gelen artışın, hücre çoğalması ile ilgili olduğu bilinmekle beraber son yıllarda yapılan çalışmalarda, bu moleküllerin hem normal hem de kanser gelişiminde önemli görevlere sahip oldukları gösterilmiştir (61,65,68).

**ROSUVASTATİN**

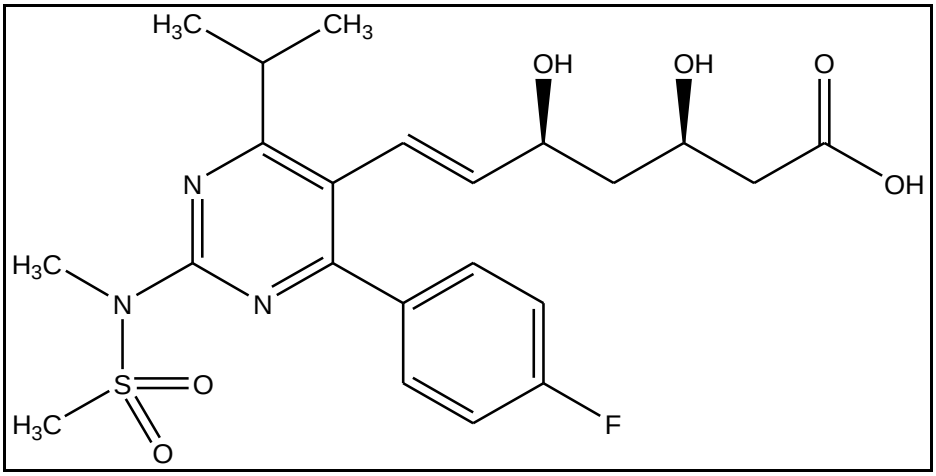
Sentetik bir molekül olan rosuvastatin; 3-hidroksi-3-metil-glutaril koenzim A (HMG KoA) redüktaz inhibitörüdür (Şekil 12) (69). Rosuvastatine metil sülfonamid grubunun eklenmesi, moleküle daha düşük lipofili özelliği katmış ve HMG KoA redüktaz enzimiyle artmış iyonik etkileşim sağlamıştır. Bu da enzimin afinitesini yükseltmiştir. Rosuvastatin; kolesterol sentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan HMG KoA'dan mevalonat asit oluşumunu katalizleyen enzimi, seçici, geri dönüşümlü ve yarışmalı olarak inhibe eder (Şekil 13).

Rosuvastatinin oral biyoyararlanımı yaklaşık olarak % 20'dir (7). Oral alınımını takiben 3 saatten kısa süre içinde maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşır. Yapılan hayvan çalışmalarında intraperitoneal ve intravenöz uygulanabildiği belirtilmiştir (70). Rosuvastatin

ekstrahepatik dokulara pasif difüzyonla geçebilmektedir. Plazma yarılanma ömrü yaklaşık 19 saattir. Rosuvastatinin % 90'ı değişmemiş olarak dışkı ile ve % 10'u böbrekler yoluyla uzaklaştırılır (7).




**Şekil 12. Rosuvastatinin etki mekanizması (**69**)**




**Şekil 13. Rosuvastatinin kimyasal yapısı**

Klinik olarak oral yolla 5-40 mg/kg dozda kullanılmaktadır. Ailevi ve ailevi olmayan hiperkolesterolemili hastalarda, diyabetes mellitus, kardiyovasküler riski yüksek hastalarda ve

diğer statinlere yeterli cevap alınamadığında tercih edilir. Günde tek doz kullanılır. Rosuvastatin hem hepatik hem de renal yolla vücuttan uzaklaştırıldığı için karaciğer ve böbrek yetmezliğinde dikkatli kullanılmalıdır. Yan etkileri rabdomiyoliz ve hepatotoksitedir. Bu nedenle ilaç başlanması sonrası erken dönemde toksisite takibi yapılmalıdır.

Rosuvastatinin diğer statinlerde olduğu gibi HMG KoA redüktaz inhibisyonundan bağımsız etkileride bulunmuştur. Bunlar endotel fonksiyonunda iyileşme, antiinflamatuvar, antitrombotik ve antioksidan etkilerdir (7). Rosuvastatinin antioksidan kapasiteyi artırarak oksidatif stresi azaltığı vurgulanmıştır (71). NADPH oksidazın down regülasyonu, glutatyon metabolizmasındaki enzimlerin ekspresyonunun artışı gibi antioksidan mekanizmalar ile DNA'da serbest radikal hasarının azalmasını sağladığı ileri sürülmüştür (72). Nükleer faktör-κB (NF-κB) hücre çoğalması, invazyonu, metastaz ve angiogenesisle ilgili gen ekspresyonu için gerekli bir nükleer transkripsiyon faktörüdür (73). NF-κB'nin bazı kanser türlerinde apopitotik hücre engellenmesinde önemli rol oynadığını belirten yayınlar mevcuttur (74). Rosuvastatin NF-κB aktivasyonunda azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (7). Statinlerin NO'i artırarak endotelyal ve kardiyovaskuler fonksiyonları düzeltiği vurgulanmıştır (75). Statinlerin kanser hücre çoğalmasını, hücre siklusunu G1-S fazını durdurarak ve apoptozu indükleyerek engellediği gösterilmiştir (75). Sikline bağımlı kinaz inhibitörleri p21 ve p27 indüksiyonu vasıtasıyla statinlerin G1-S geçişini engellediği öne sürülmüştür (76). Diğer bir çalışmada ise deneysel olarak pankreas kanseri oluşturulmuş farelerde statin uygulaması sonrası kanser hücrelerinin büyümesinin engellendiği gösterilmiştir (77). Başka bir çalışmada statinlerin kolorektal kanser görülme olasılığını % 47 oranında azaltığı bulunmuştur (78).

Bu çalışmada antioksidan ve antikarsinojen etkileri önceki çalışmalar ile gösterilmiş bir statin olan rosuvastatinin, meme kanseri gelişimi üzerindeki olası olumlu etkileri araştırılmak istenmiştir. Bu amaçla, meme kanseri oluşturulmuş deney hayvanlarında serum ve doku arginaz enzim aktiviteleri, poliamin düzeyleri ve doku ornitin düzeyleri incelenmiştir.

# GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada; yerel etik kurul onayı alınarak Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvar'ında gerçekleştirilmiştir (Ek 1).

## GEREÇLER

### Çalışma Grupları

Çalışmada ortalama ağırlıkları 27-32 gram arasında değişen (ortalama 30 gram), 7-8 haftalık, 50 tane erkek Balb/c cinsi fare kullanıldı. Çalışmadaki fareler, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvar'ından temin edildi. Denekler seçilerek, herbiri 10 fareden oluşan beş grup oluşturuldu. Tüm fareler deneyin sonuna kadar ayrı kafeslerde, %50-60 nem oranı, 22±1 °C ısıda, 12 saat gece-12 saat gündüz ışık periyodu olan ortamda tutuldu. Beş gruba da standart fare yemi günlük olarak verildi.

Hayvanlar 8 haftalık olduğunda, 3., 4., 5. gruba ehrlich asit tümör hücresi 200 µl subkutan olarak sol bacağa enjekte edildi. 7. günün sonunda tümör çapının 1 cm olduğu tespit edildi.

1) Grup (n=10): Sağlıklı Kontrol Grubu

2) Grup (n=10): Sağlıklı Tedavi Grubu olarak kabul edildi. Bu gruba tüm deney süresince (15 gün) hergün intraperitoneal olarak 1 mg/kg rosuvastatin verildi.

3) Grup (n=10): Tümör Kontrol Grubu olarak kabul edildi. Bu gruba ehrlich asit tümörü enjekte edildikten bir hafta sonrasından itibaren, tüm deney süresince (15 gün) hergün intraperitoneal olarak 1 mg/kg serum fizyolojik verildi.

4) Grup (n=10): Tedavi Grubu 1 olarak kabul edildi. Bu gruba ehrlich asit tümörü enjekte edildikten bir hafta sonrasından itibaren, tüm deney süresince (15 gün) hergün intraperitoneal olarak 1 mg/kg rosuvastatin verildi. Rosuvastatin Sanovel firmasından ücretsiz olarak temin edildi.

5) Grup (n=10): Tedavi Grubu 2 olarak kabul edildi. Bu gruba ehrlich asit tümörü enjekte edildikten bir hafta sonrasından itibaren, tüm deney süresince (15 gün) hergün intraperitoneal olarak 20 mg/kg rosuvastatin verildi.

Deney beş grup fare için de anestezi altında intrakardiyak kan alınması ve doku çıkarılması işlemi ile sonlandırıldı. Sakrifikasyon öncesi; ksilazin (5 mg/kg), ketamin (60 mg/kg) im olarak anestezi amaçlı verildi. Ardından meme tümör dokuları çıkarıldı ve buzlu % 0.9'luk serum fizyolojik ile yıkandı. Kan örnekleri 3000 g'de 10 dak. santrifüj edildikten sonra elde edilen serum ve doku örnekleri -80 °C'de deneyin yapılacağı güne kadar saklandı.

**Doku Örneklerinin Homojenize Edilmesi**

Tüm gruplardan elde edilen meme tümör dokularının homojenizasyonunda Tris tamponu kullanıldı. Derin dondurucudan çıkarılan dokular DIAX 900 model otohomojenizatör kullanılarak ağırlıklarının 10 katı soğuk 0.05 M Tris/HCl tamponu (pH: 8.05) ile homojenize edildi. Doku homojenizatları 8.000 g ve 4 °C'de 20 dakika süre ile santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi.

**Kullanılan Kimyasal Maddeler**

| | |
|---|---|
| Asetik asit ($CH_3COOH$) | (Merck, Almanya) |
| Bakır sülfat ($CuSO_4$) | (Merck, Almanya) |
| Benzoik asit ($C_7H_6O_2$) | (Merck, Almanya) |
| Demir klorür ($FeCl_3$) | (Merck, Almanya) |
| Diasetilmonoksim ($C_4H_7NO_2$) | (Merck, Almanya) |
| Fosforik asit ($H_3PO_4$) | (Merck, Almanya) |
| Hidroklorik asit (HCl) | (Merck, Almanya) |
| Mangan klorür ($MnCl_2$) | (Merck, Almanya) |
| Ninhidrin ($C_9H_6O_4$) | (Merck, Almanya) |
| L-Ornitin hidroklorür ($C_5H_{l3}C_lN_2O_2$) | (Merck, Almanya) |
| Sodyum karbonat ($Na_2CO_3$) | (Merck, Almanya) |
| Sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) | (Merck, Almanya) |
| Sodyum hidroksit (NaOH) | (Merck, Almanya) |

| | |
|---|---|
| Triklorasetik asit ($CCl_3COOH$) | (Merck, Almanya) |
| Tiyosemikarbazid ($CH_5N_3S$) | (Merck, Almanya) |
| Üre ($H_2NCONH_2$) | (Merck, Almanya) |
| L-arginin ($C_6H_{14}N_4O_2$) | (Merck, Almanya) |
| Sülfirik asit ($H_2SO_4$) | (Sigma, Almanya) |
| Folin | (Sigma, Almanya) |
| Albumin | (Sigma, Almanya) |
| Na-K Tartarat $NaK(COO)_2(CHOH)_2$ | (Panreac, İspanya) |
| Triton-X-100 | (Merck, Almanya) |
| Tris (Hidroksimetil) Aminomethan $NH_2C(CH_2OH)_3$ | (Carlo Erba Reagenti, Milano) |
| α-Isonitro-sopropiophenone ($C_9H_9NO_2$) | (Sigma, Almanya) |
| Potasyum fosfat monobazik ($H_2KO_4P$) | (Sigma, Japonya) |
| Sodyum fosfat dibazik ($HNa_2O4P$) | (Sigma, USA) |
| Trikloroasetik asit ($C_2HCl_3O_2$) | (Sigma, Almanya) |
| Metanol ($CH_4O$) | (Sigma, Almanya) |
| Sodyum karbonat ($CNa_2O_3$) | (Sigma, Almanya) |
| Dansil klorür ($C_{12}H_{12}ClNO_2S$) | (Sigma, İsviçre) |
| Aseton ($C_3H_6O$) | (Sigma, Almanya) |
| Hekzametilendiamin ($C_6H_{16}N_2$) | (Sigma, Fransa) |
| Spermidin ($C_7H_{19}N_3$) | (Sigma, İsviçre) |
| Spermin ($C_{10}H_{26}N_4$) | (Sigma, İsviçre) |
| Putresin ($C_4H_{12}N_2.2HCl$) | (Sigma, USA) |

**Alet ve Malzemeler**

| | |
|---|---|
| Etüv | Memmert 400, Almanya |
| Homojenizatör | DIAX 900, Almanya |
| Manyetik karıştırıcı | Daihan, Kore |
| Soğutmalı santrifüj | Heraeus, Almanya |
| Spektrofotometre | Elisa okuyucu, |
| Su banyosu | GFL-1083, Almanya |
| Elektronik tartı | Sartorius, Almanya |
| pH metre | pH level 1, Almanya |
| HPLC cihazı | Waters 2690, Milford, USA |
| Guard kolon | Waters 3.9x20 mm, Milford, USA |

| | |
|---|---|
| Distile su cihazı | Millipore, Fransa |
| Otomatik pipet | Eppendorf, Almanya |
| UV dedektör | Waters 2487, Milford, USA |
| Vorteks | Velp, İtalya |
| Cam malzemeler | Deney tüpleri, balon jojeler, beherler v.b |

## YÖNTEMLER

### Meme Dokusu Arginaz Aktivitesinin TDMU Yöntemi ile Ölçümü

Arginaz aktivitesi; substrat olan argininin örnekteki arginazla hidrolizi sonucunda oluşan üre miktarının TDMU yöntemi (79) ile spektrofotometrik olarak saptanması ile belirlenmiştir.

Üre için kullanılan birçok kimyasal metod gibi, TDMU yöntemi de Feron reaksiyonunu temel alır . Diasetilmonoksim, üre ile doğrudan olarak reaksiyona girmez. İlk önce asit ortamda ısı etkisi ile hidroksilamin ve diasetile hidrolize olur. Diasetil, asit çözeltide üre ile kondanse olur ve $H_2O$ ve renkli bir bileşik olan diazin meydana gelir. Bu rengi stabilize etmek için tiyosemikarbazid ve $Fe^{+2}$ iyonları kullanılır.

Diasetilmonoksim $\longrightarrow$ Diasetil + Hidroksilamin

Üre + Diasetil $\longrightarrow$ Diazin (renkli bileşik ) + $H_2O$

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

### Gerekli Ayıraçlar

Asit Karışımı: 0.12 M $FeCl_3$ (% 56.7'lik $H_3PO_4$ içinde) ve 3.24 g $FeCl_3.6H_2O$ bir miktar distile su ile bir balon jojede çözülür, üzerine % 85'lik $H_3PO_4$'ten 39.1 ml eklenir. Daha sonra distile suyla 100 ml'ye tamamlanır. Oda ısısında saklanır.

Hazırlanan çözeltiden 1 ml alınıp üzerine 999 ml % 20'lik (v/v) $H_2SO_4$ ilave edilir. Deney aşamasında asit karışımı olarak kullanılır. Oda ısısında saklanır.

Renk ayıracı (3.6 mM Tiyosemikarbazid (TSC)+61.7 mM Diasetilmonoksim (DAM): Bu karışım 0.0036 M TSC (91.14 g/mol) ve 0.0617 M DAM (101.1 g/mol) içermektedir. 6.238 g diasetilmonoksim ile 0.328 g tiyosemikarbazid karıştırılarak, bir miktar distile suda

çözüldükten sonra yine distile su ile litreye tamamlanır. Oda ısısında ve koyu renkli şişede uzun süre saklanabilir.

Karbonat tamponu (pH 9.7 100 mM $CO_3/HCO_3$):

a) 1.06 g $Na_2CO_3$ bir miktar distile su ile balon jojede çözülür ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. 0.1 M $Na_2CO_3$ elde edilir.

b) 0.84 g $NaHCO_3$ bir miktar distile su ile balon jojede çözülür ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. 0.1 M $NaHCO_3$ elde edilir.

Karbonat tamponunun hazırlanması için; 100 ml 0.1 M $Na_2CO_3$ üzerine, 0.1 M $NaHCO_3$ ilave edilerek pH 9.7'ye getirilir. Hazırlanan tampon çözelti 4 °C ısıda saklanır.

50 mM arginin çözeltisi: 0.87 g L-arginin balon jojede bir miktar distile suda çözülür. 0.1 M HCl ile pH 9.7'ye getirilir. Distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 4 °C ısıda saklanır.

9 mM $MnCl_2$ çözeltisi: 1.456 g $MnCl_2.2H_2O$ bir miktar distile su ile balon jojede çözülür ve 1000 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 4 °C ısıda saklanır.

Üre standardı (0.5 µmol üre/mL): 3 mg üre, 100 ml 0.016 M benzoik asit içinde çözülür. Deney sırasında kullanılan standart konsantrasyonu 0.2 µmol üre/mL olarak belirlenmiştir. Bu nedenle stok çözelti sulandırılarak kullanılacak olan konsantrasyon elde edilir. Üre standart çözeltisi 4 °C ısıda saklanmalıdır.

**Deneysel İşlemler**

Doku arginaz enzim aktivitesi tayini için iki deney düzeneği kuruldu. Birinci düzeneğe; numaralandırılmış deney tüpleri, ikinci düzeneğe ise kör, standart ve sıfır zaman tüpleri konuldu. İlk düzenekteki deney tüpleri üçlü, ikinci düzenekteki deney tüpleri ikili hazırlandı. Enzim kaynağındaki endojen üre aktivitesinin eliminasyonu amacı ile sıfır zaman tüpleri hazırlandı.

Enzim kaynağı olarak kullanılacak olan süpernatant, 9 mM $MnCl_2$ ile 1/10 oranında sulandırıldı. Örnek 55 °C'lik su banyosunda 20 dakika preinkübasyona bırakıldı. Bu aşamada deney ve sıfır zaman tüplerine, 0.4 ml 50 mM'lık arginin çözeltisi ve 0.4 ml 100 mM'lık karbonat tamponundan konuldu. Kör tüpüne 1 ml distile su, standart tüpüne ise 1 ml üre standardı (0.2 µmol/ml) konuldu. Ardından da enzimatik reaksiyonu engellemek amacı ile sıfır zaman, standart ve kör tüplerine 3'er ml asit karışımı konuldu.

20 dakikalık preinkübasyonun ardından, enzim kaynağı ve hazırlanmış olan deney tüpleri 37 ºC'de su banyosunda 3 dakika bekletilerek aynı ısılara gelmeleri sağlandı.

Daha sonra, 37 ºC'deki enzim kaynağından, deney ve sıfır zaman tüplerine 0.2 ml konarak, vorteks karıştırıcı ile iyice karıştırıldı. Deney tüpleri, enzimatik reaksiyonun oluşması için sallantılı su banyosunda 37 ºC'de 15 dakika inkübe edildi. 15 dakika inkübe edilen deney düzeneğine, sürenin sonunda hemen 3'er ml asit karışımı ilave edilerek reaksiyon durduruldu.

Bu işlemleri takiben, her iki düzenekteki tüplere 2'şer ml renk ayıracı ilave edildi ve vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı. Ardından tüm tüplerin ağızları kapatıldı ve tüpler 10 dakika kaynar su banyosunda bırakılarak renk oluşumu sağlandı.

Deney sonunda tüpler musluk suyu altında soğutularak, renkli çözeltilerin absorbansları 520 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüldü.

**Doku Arginaz Enzim Aktivitesinin Hesaplanması**

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

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

10: Süpernatantın $MnCl_2$ sulandırılma katsayısı

5: Süpernatantın inkübasyon ortamındaki sulanma katsayısı

4: İnkübasyon süresinin 1 saate tamamlanma katsayısı

0.2 µmol üre/mL'nin absorbansı: 0.086 olarak okunmuştur (Standart ürenin absorbansı)

Faktör = (0.2 µmol üre/mL) x 50 x 5 x 4 / 0.086

Faktör = 465.11 olarak hesaplandı.

Tümör dokusu için enzim aktivitesi; ünite olarak tanımlanmıştır. Bir ünite enzim aktivitesi, 1 saatte 37 °C'de substrat olarak kullanılan L-Arginin'den 1 µmol üre oluşturan enzim aktivitesinin mg protein cinsinden ifadesidir. Enzim aktivitesinin hesaplanmasında net

örnek absorbansları faktör (465.11) ile çarpılmıştır. Tümör dokusu için; µmol üre/mL/saat olarak enzim aktiviteleri bulundu ve ünite olarak tanımlandı.

Ünite = µmol üre/mL/saat

Enzim aktiviteleri, ml'deki protein miktarına bölünerek standardize edilmeye çalışıldı ve özgül ünite olarak tanımlandı.

Bir özgül ünite; enzim aktivitesinin mg/mL protein cinsinden ifadesidir.

Özgül Ünite = Ünite/mg protein (µmol üre/mg protein/saat); olarak belirtilmiştir.

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

Chinard Yöntemi (80) prensibi: Bu yöntem ornitinin, ninhidrin ile oluşturduğu mor renkli kompleksin kolorimetrik olarak ölçümüne dayanmaktadır.

**Gerekli Ayıraçlar**

% 10'luk trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi: 10 g TCA tartılır, distile su ile çözündürülür ve 100 mL'ye tamamlanır.

Ninhidrin ayıracı: 2.5 g ninhidrin, 40 ml 6 N $H_3PO_4$ ve 60 ml glasiyel asetik asitin içinde çözündürülür.

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

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

**Deneysel İşlemler**

Çalışılacak doku homojenatı % 10'luk TCA ile 1/1 oranında muamele edildikten sonra 3000 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant elde edildi. Deney tüpüne 1 ml süpernatant, kör tüpüne 1 mL distile su ve standart tüpüne de 1 mL 0.18 µmol/mL'lik ornitin solüsyonu konuldu. Tüplere sırayla 2.5 mL glasiyel asetik asit ve 0.25 mL ninhidrin ayıracı konuldu. Tüm tüpler vortekslenerek karıştırıldıktan sonra, 30 dakika kaynar su banyosunda tutuldu. Su banyosundan çıkarılan tüpler hızla soğutularak numunelerin 515 nm'de absorbansları spektrofotometrede ölçüldü.

**Ornitin Düzeyinin Hesaplanması**

Ornitin değerinin hesaplanması için şu formül kullanılmıştır.

$$\text{Ornitin (µmol/mL)} = \frac{\text{Deney absorbansı x 2 x (0.18 µmol ornitin/mL)}}{\text{Standart ornitin absorbans değeri}}$$

2: Homojenatın TCA ile sulandırılma katsayısı

0.18 µmol/mL: Standart ornitin konsantrasyonu

0.624: Standart ornitin absorbans değeri

$$\text{Ornitin (µmol/mL)} = \frac{\text{Deney absorbansı x 2 x 0.18}}{0.624}$$

Ornitin (µmol/mL) = Deney absorbansı x 0.576 olarak formüle edildi ve elde edilen ornitin değerleri protein miktarına bölünerek (µmol/mg protein) olarak standardize edildi.

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

Doku protein düzeyleri Lowry yöntemi ile saptandı (81). Bu yöntem alkali bakır tartarat ayıracının peptid bağları ile kompleks yapması prensibine dayanmaktadır. Her 7 yada 8 amino asit artığı 1 bakır atomunu bağlar. Fenol ayıracı; bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mavi-mor renk oluşur. Oluşan renk şiddeti 660 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

**Gerekli Ayıraçlar**

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

Alkali bakır ayıracı: 10 gr $Na_2CO_3$, 0.25 g Na-K tartarat, 0.05 g $CuSO_4$; ayrı ayrı tartılarak 0.5 N NaOH içinde balon jojede çözülür ve çözelti 0.5 N NaOH ile 100 mL'ye tamamlanır. Bu çözelti 4 ºC'de 1 ay saklanabilir.

% 5'lik Albumin standartı: % 5'lik albumin standartı hazırlamak için mevcut 5 g/dL'lik albumin standartı kullanılmıştır. Albumin solüsyonundan 0.1 mL alınarak ve distile su ile 100 mL'ye tamamlanarak % 5'lik albumin standartı elde edilmiş olur. Deneyde kullanılılan standart protein konsantrasyonu % 2 olduğundan, stok protein standartı sulandırılarak istenilen konsantrasyona ulaşıldı.

**Deneysel İşlemler**

Doku süpernatantları 1/10 oranında serum fizyolojik ile sulandırılıp vorteks yardımı ile iyice karıştırılarak protein ölçümü için elverişli hale getirildi. Numaralandırılmış deney, kör ve standart tüpleri hazırlandı. Deney tüpüne 1/10 oranında sulandırılmış olan süpernatanttan 0.5 mL standart tüpüne % 2'lik standarttan 0.5 mL ve kör tüpüne de 0.5 mL distile su konuldu. Ardından her tüpe 0.5 mL alkali bakır ayıracı ilave edildi. Tüpler vortekslenerek iyice karışmaları sağlandı. 10 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, her tüpe 2 mL fenol ayıracı eklendi ve tekrar vortekslendi. 30 dakika 37 ºC'lik su banyosunda bekletildikten sonra; tüplerdeki numunelerin köre karşı absorbansları 660 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüldü.

**Protein düzeyinin hesaplanması**

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

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

10: Süpernatantın serum fizyolojik ile sulandırılma katsayısı

2 : Süpernatantın 1 mL'ye tamamlanma katsayısı

2: Protein standartının konsantrasyonu

0.096: Standart proteinin absorbansı

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

Protein miktarı (% mg protein) = Deney Absorbansı x 416,6 olarak formüle edilmiştir. Elde edilen % mg protein, 100 mL'deki protein değeridir. Sonuç 100'e bölünerek protein miktarı mg/mL olarak hesaplandı.

**Serum Arginaz Enzim Aktivitesinin Munder Yöntemi İle Ölçülmesi**

Serum arginaz aktivitesi; substrat olan argininin örnekteki arginazla hidrolizi sonucunda oluşan üre miktarının Munder yöntemi (82) ile spektrofotometrik olarak saptanmasıyla belirlenmiştir. Yöntemde bazı revizyonlar yapılmıştır.

**Gerekli Ayıraçlar**

% 0.1'lik Triton-X-100: 0.1 mL Triton-X-100 alınıp 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

Asit karışımı: $H_2SO_4$ (% 96), $H_3PO_4$ (% 85), $H_2O$ 1:3:7 oranlarında alınarak karışım hazırlanır.

% 9'luk α-Isonitro-sopropiophenone (ISPF): 0.9 g ISPF tartılır ve % 100'lük etanol içerisinde çözülerek 10 mL'ye tamamlanır.

2 M HCl: 8.28 ml HCl alınır ve 50 mL'ye distile su ile tamamlanır.

0.5 M arginin çözeltisi: 8.71 g L-arginin balon jojede bir miktar distile suda çözülür. 0.1 M HCl ile pH 9.7'ye getirilir. Distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 4 °C ısıda saklanır.

10 mM $MnCl_2$ çözeltisi: 1.6187 g $MnCl_2.2H_2O$ bir miktar distile su ile balon jojede çözülür ve 1000 mL'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 4 °C ısıda saklanır.

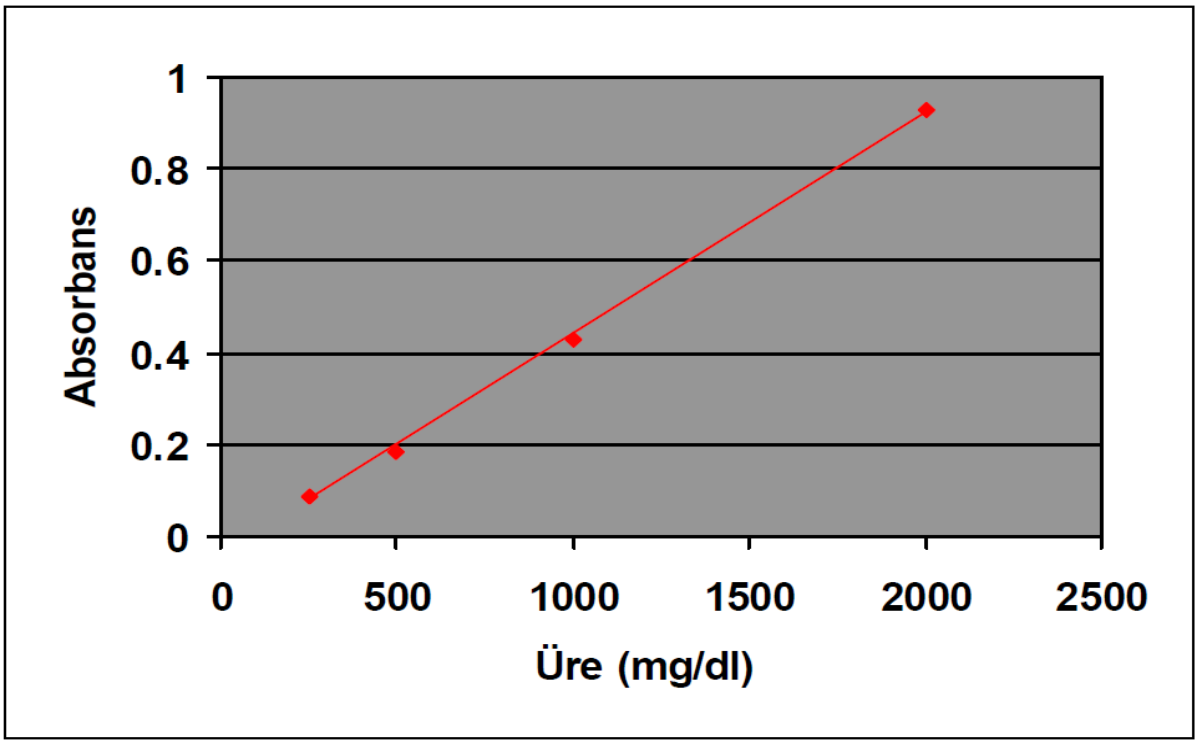
25 mM Tris-HCl çözeltisi: 3.0285 g tris tartılır bir miktar distile su ile balon jojede çözürülür ve 1000 mL'ye tamamlanır. HCl ile pH 7.5'e getirilir.

**Deneysel işlemler**

Numaralandırılmış deney, kör ve standart tüpleri hazırlandı. Deney tüplerine 100 µL örnek üzerine 100 µL triton-X-100 konuldu ve 30 dak. oda ısısında çalkalanmaya bırakıldı. Daha sonra bu tüplerden 100 µL alınarak üzerine 100 µL tris ilave edildi. Her bir deney tüpünden 100 µL pipetlenerek üzerine 10 µL $MnCl_2$ ilavesi yapıldı. Tüpler 10 dak 56 ˚C'de preinkübasyona bırakıldı. Üzerine 100 µL arginin ilavesinden sonra 37 ˚C'de 1 saat boyunca inkübe edildi. Daha sonra üzerine 900 µL asit karışımı ve 40 µL ISPF ilave edilerek 30 dak. kaynar su banyosuna bırakıldı. Tüplerdeki numunelerin absorbansı, mikro ELISA plaka okuyucu kullanılarak 540 nm. dalga boyunda ölçüldü.

**Serum Arginaz Enzim Aktivitesinin Hesaplanması**

Serum arginaz enzim aktivitesi, üre standart grafiği üzerinden hesaplandı (Şekil 14).




**Şekil 14. Üre standart çalışması regresyon grafiği**

**HPLC yöntemi ile Poliamin ölçümü**

**Gerekli ayıraçlar**

% 10'luk trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi: 10 gr TCA tartılır, distile su ile çözülür ve 100 mL'ye tamamlanır.

Dansil klorür çözeltisi (4 mg/mL): 0,4 gr dansil klorür tartılır, aseton ile çözülür ve aseton ile 100 mL'ye tamamlanır.

Poliamin standardı (0,006 M putresin+ 0,003 M spermidin+ 0,003 M spermin): 0,096 gr putresin, 0,043 gr spermidin, 0,060 gr spermin bir miktar distile suda çözüldükten sonra yine distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

0,006 M Hekzametilendiamin çözeltisi: 0,069 gr hekzametilendiamin tartılır, distile su ile çözülür ve 100 mL'ye tamamlanır.

Eluent A: %100 metanol içermektedir. Eluent B: %100 distile su içermektedir. Membranfiltre (0,2 mikron gözenek çaplı) ile filtre edildi.

**Serum Örneklerinin HPLC İçin Hazırlanması ve Çalışılması**

Çalışmaya başlamadan önce serum örnekleri -80 ºC'lik ortamdan çıkarılarak oda ısısında çözündürüldü. Deney tüplerine alınan 167 µL örnek üzerine 100 µL % 10'luk trikloroasetik asit eklendi. 10 dakika süreyle, dik açılı santrifüjde, 3000 g'de çevrilmek

süretiyle, ultrafiltrat elde edildi. 200 µL numune ultrafiltratına; sırasıyla 25 µL hekzametilendiamin, 25 µL doymuş sodyum karbonat, 50 µL dansil klorür eklenerek vorteksle iyice karıştırıldı. Benmaride 50 ºC'de 30 dakika bekletilmek süretiyle inkübe edildi ve ardından 5 dakika süreyle, dik açılı santrifüjde, 4000 g'de santrifüj edilerek örnekler analiz için hazır duruma getirildi (83).

**Doku Örneklerinin Homojenizasyonu, HPLC İçin Hazırlanması ve Çalışılması**

Poliamin düzeyi ölçümünden hemen önce derin dondurucudan çıkarılan meme tümör dokularının homojenizasyonunda fosfat tamponu kullanıldı. Dokular homojenizatör kullanılarak ağırlıklarının 5 katı kadar 0,05 M fosfat tamponu (pH:7,2) ile homojenize edildi. Deney tüplerine alınan 167 µL doku homojenatları üzerine 100 µL trikloroasetik asit eklendi. 10 dakika süreyle, dik açılı santrifüjde, 3000g'de çevrilmek süretiyle, ultrafiltrat elde edildi. 200 µL numune ultrafiltratına sırasıyla 25 µL hekzametilendiamin, 25 µL doymuş sodyum karbonat, 50 µL dansil klorür eklenerek vorteksle iyice karıştırıldı. Benmaride 50 ºC'de 30 dakika bekletilmek süretiyle inkübe edildi ve ardından 5 dakika süreyle, dik açılı santrifüjde, 4000 g'de santrifüj edildi. HPLC'de analiz için hazır duruma getirildi (84).

Kromatografik ayrıştırmanın yapılmasında HPLC cihazı kullanıldı. Analizler florometrik detektör kullanılarak, 370 nm eksitasyon ve 506 nm emisyon dalga boyunda yapıldı. µBondapak $C_{18}$ kolonu kullanıldı ve kolon ısısı 50 ºC'ye ayarlandı. Numune kabin ısısı +4 ºC, solventlerin akış hızı 1 mL/dk, sistem basıncı 900-1000 psi ve injeksiyon volumu 10 µL olarak uygulandı. Derivatize edilen poliaminler aşağıdaki mobil faz gradient programı kullanılarak ayrıştırıldı (Tablo 2).

**Tablo 2. Mobil faz gradient tablosu**

| Zaman (dk) | Akış hızı (mL/dk) | %A | %B |
|---|---|---|---|
| 0 | 1.0 | 80 | 20 |
| 11 | 1.0 | 80 | 20 |
| 11.01 | 1.0 | 100 | 0 |
| 25 | 1.0 | 80 | 20 |

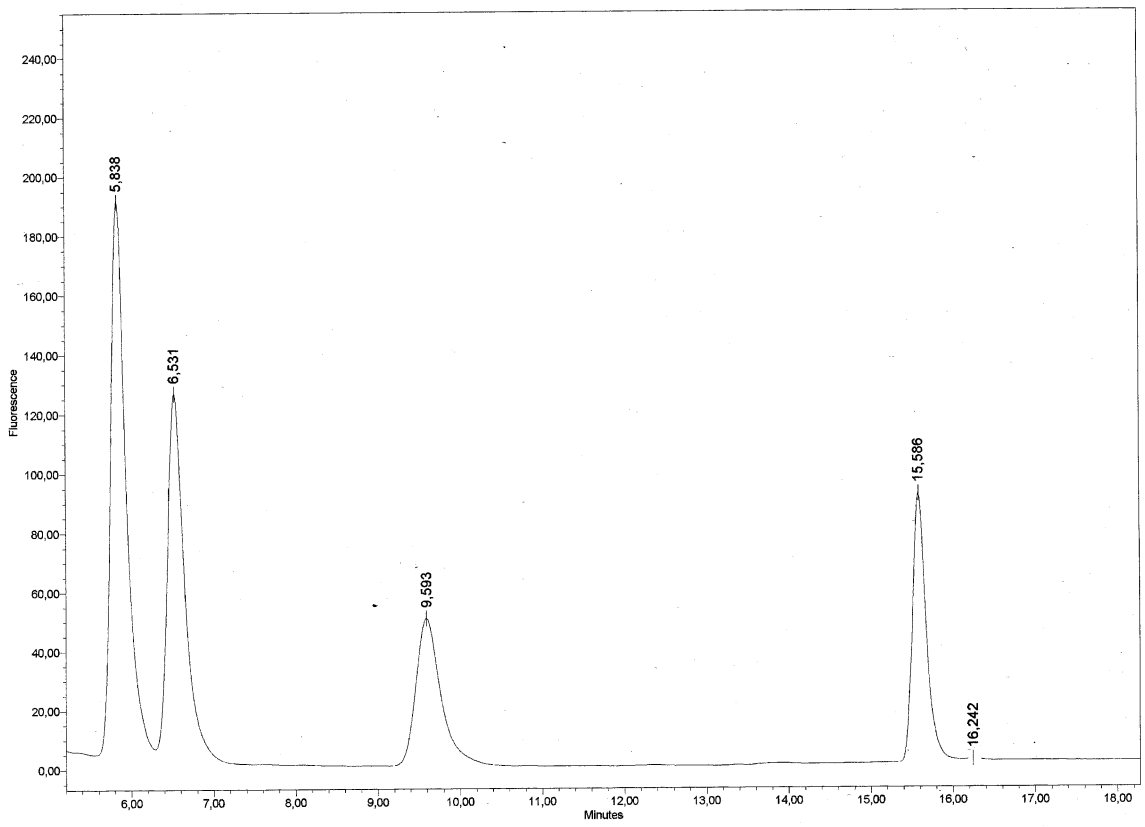
**A,B:** Eluentlerin HPLC için uygulanan % oranları.

Serum ve doku poliamin miktarları, numunelerden elde edilen HPLC kromatogramındaki pik alanlarının poliamin standart pik alanları ile karşılaştırılması sonucu hesaplandı. Serumdaki ölçümler nmol/mL olarak ifade edildi. Doku düzeyleri proteine oranlanarak ifade edildi (Tablo 3) (Şekil 15).

**Tablo 3. µBondapak $C_{18}$ kolonundan standart ve örneklere ait poliamin çıkış zamanları**

| Poliamin | HPLC Kromatogramında Çıkış Zamanı (dk) |
|---|---|
| Putresin | 5,83 |
| Internal Standart (IS) | 6,53 |
| Spermidin | 9,59 |
| Spermin | 15,58 |

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




**Şekil 15. Poliamin kalibrasyon standartlarını gösteren HPLC kromatogramı**
**1. Putresin (5,83) 2. Internal Standart (6,53) 3. Spermidin (9,59) 4. Spermin (15,58)**

## İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

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

Tümör kontrol ve tedavi grubu arasındaki arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve poliamin düzeyleri arasındaki farklılıklar öncellikle Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi ve anlamlı

bulunan test grupları devamında Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Elde edilen “p” değerleri 0.05’den küçük olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

# BULGULAR

Çalışmamızda tümör ve tedavi gruplarındaki farelerin tümör dokusunda arginaz enzim aktiviteleri, ornitin ve poliamin düzeyleri ölçülürken, serum örneklerinde ise arginaz enzim aktivitesi ve poliamin düzeyleri saptandı. Serum örneklerinde arginaz enzim aktivitesi ve poliamin düzeylerinin, doku örneklerinde ise arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve poliamin düzeylerinin ortalama ve ortalamanın standart hatası (SEM) Tablo 4 ve 5'de gösterilmiştir.

**Tablo 4. Grupların serum arginaz aktiviteleri ve poliamin düzeyleri.**

| **Grup** | **Serum Arginaz Aktivitesi** (U/L) ORT±SEM | **Serum Putresin Düzeyi** (nmol/mL) ORT±SEM | **Serum Spermidin Düzeyi** (nmol/mL) ORT±SEM | **Serum Spermin Düzeyi** (nmol/mL) ORT±SEM |
|---|---|---|---|---|
| 1. grup (n=10) | 2.89±0.15 | 225.38±83.55 | 32.66±8.63 | 30.71±6.06 |
| 2. grup (n=10) | 2.84±0.20 | 165.69±72.92 | 37.22±12.46 | 31.55±7.56 |
| 3. grup (n=10) | 3.71±0.13 | 1070.21±251.20 | 409.03±217.76 | 355.59±187.51 |
| 4. grup (n=10) | 2.94±0.13 | 16.45±9.34 | 3.21±1.38 | 10.44±4.93 |
| 5. grup (n=10) | 2.59±0.13 | 3.62±0.99 | 2.92±0.93 | 4.07±1.34 |

Serum arginaz aktivitelerinin tümör grubunda sağlıklı gruba göre istatiksel olarak anlamlı şekilde yükseldiği gözlendi ($p=0.002$). Rosuvastatin tedavisinin (4. Grup) ise, serum arginaz aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürdüğü gözlendi ($p=0.001$). Yüksek doz rosuvastatin tedavisininde serum arginaz aktivitesini, tümör grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürdüğü gözlendi ($p<0.001$). Serum arginaz düzeyindeki azalma yüksek doz rosuvastatin tedavisinde daha belirgin olarak sağlandı.

Serum putresin düzeylerinin tümör grubunda sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseldiği saptandı (p=0.043). Tedavi gruplarında ise rosuvastatin tedavisinin serum putresin düzeylerini tümör grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürdüğü gözlendi (p<0.001).

Serum spermidin düzeylerinin tümör grubunda sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseldiği gözlendi (p=0.029). Tedavi gruplarında ise rosuvastatin tedavisinin serum spermidin düzeylerini tümör grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürdüğü gözlendi (p<0.001).

Tümör grubunda; serum spermin düzeylerinin sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseldiği saptandı (p<0.001). Tedavi gruplarında ise; rosuvastatin tedavisinin serum spermin düzeylerini, tümör grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürdüğü bulundu (p<0.001) (Tablo 6). Serum değerleri incelendiğinde iki doz arasında istatistiksel bir anlam bulunamamıştır (p>0.05).

**Tablo 5. Grupların doku ornitin, poliamin düzeyleri ve arginaz enzim aktiviteleri**

| **Grup** | **Doku Arginaz Aktivitesi** (U/mg protein) ORT± SEM | **Doku Ornitin Düzeyleri** (µmol/mg protein) ORT± SEM | **Doku Putresin Düzeyi** (nmol/mg protein) ORT± SEM | **Doku Spermidin Düzeyi** (nmol/mg protein) ORT± SEM | **Doku Spermin Düzeyi** (nmol/mg protein) ORT± SEM |
|---|---|---|---|---|---|
| 3. grup (n=10) | 39.44±3.98 | 0.072±0.010 | 7.51±1.45 | 40.62±9.42 | 22.47±3.51 |
| 4. grup (n=10) | 21.87±2.74 | 0.045±0.003 | 4.51±1.27 | 29.96±10.42 | 10.41±3.05 |
| 5. grup (n=10) | 20.72±2.75 | 0.039±0.002 | 3.26±0.89 | 2.15±0.15 | 1.31±0.16 |

**Tablo 6. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar**

| **Gruplar** | **Serum Arginaz Aktivitesi** | | **Serum Putresin Düzeyi** | | **Serum Spermidin Düzeyi** | | **Serum Spermin Düzeyi** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | p | z | p | z | p | z | p | z |
| Grup 1 ve 3 | 0.002 | -2.948 | 0.043 | -2.041 | 0.029 | -2.195 | <0.001 | -3.326 |
| Grup 3 ve 4 | 0.001 | -3.175 | <0.001 | -3.402 | <0.001 | -3.808 | <0.001 | -3.677 |
| Grup 3 ve 5 | <0.001 | -3.781 | <0.001 | -3.782 | <0.001 | -3.808 | <0.001 | -3.830 |
| Grup 4 ve 5 | <0.165 | -1.437 | <0.089 | -1.741 | <0.853 | -0.202 | <0.684 | -0.512 |

Tümör grubunda artmış olan arginaz enzim aktivitesi, rosuvastatin tedavisi ile istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (p=0.003). Bu azalma rosuvastatin dozunun artmasıyla birlikte daha da belirginleşmiştir (p=0.002).

Tümör grubunda artmış olan ornitin düzeyleri, rosuvastatin tedavisi ile istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (p=0.019). Bu azalma rosuvastatin dozunun artmasıyla birlikte daha da belirginleşmiştir (p<0.001).

Tümör grubunda artmış olan doku putresin düzeylerinin, rosuvastatin tedavisiyle azaldığı gözlenmiştir. Bu azalma; düşük doz rosuvastatin tedavisinde istatistiksel olarak anlamlı değilken (p=0.190), yüksek doz tedavide anlamlı bulunmuştur (p=0.007).

Tümör grubunda artmış olan doku spermidin düzeylerinin, rosuvastatin tedavisiyle azaldığı gözlenmiştir. Bu azalma; düşük doz rosuvastatin tedavisinde istatistiksel olarak anlamlı değilken (p=0.579), yüksek doz tedavide anlamlı bulunmuştur (p<0.001).

Tümör grubunda artmış olan doku spermin düzeyleri, rosuvastatin tedavisi ile istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (p=0.015). Bu azalma, rosuvastatin dozunun artmasıyla birlikte daha da belirginleşmiştir (p<0.001) (Tablo 7). Doku parametreleri açısından incelendiğinde ise, iki tedavi grubu arasında spermidin ve spermin düzeyleri arasında anlamlı bir fark varken diğer parametreler açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır.

**Tablo 7. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar.**

| **Gruplar** | **Doku Arginaz Aktivitesi** | | **Doku Ornitin Düzeyi** | | **Doku Putresin Düzeyi** | | **Doku Spermidin Düzeyi** | | **Doku Spermin Düzeyi** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | p | z | p | z | p | z | p | z | p | z |
| Grup 3 ve 4 | 0.003 | -2.87 | 0.019 | -2.30 | 0.190 | -1.36 | 0.579 | -0.56 | 0.015 | -2.41 |
| Grup 3 ve 5 | 0.002 | -3.02 | <0.001 | -3.25 | 0.007 | -2.64 | <0.001 | -3.78 | <0.001 | -3.78 |
| Grup 4 ve 5 | 0.796 | -0.30 | <0.353 | -0.94 | 0.853 | -0.22 | <0.001 | -3.78 | <0.001 | -3.78 |

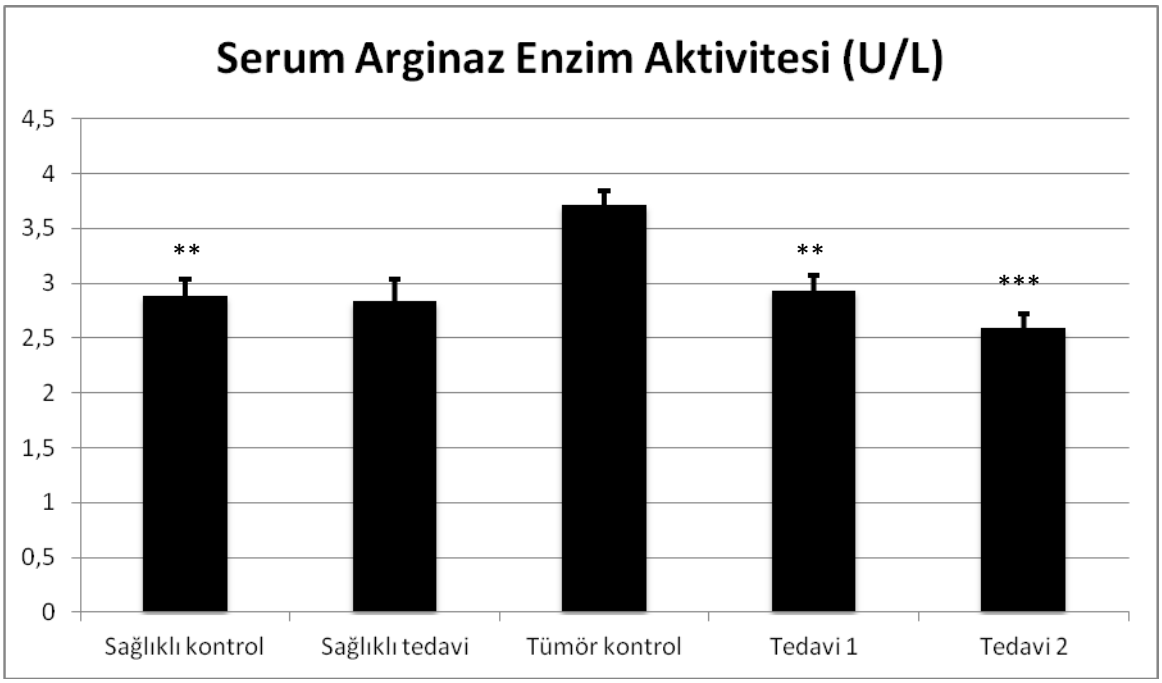
Deney grubunda yer alan her bir hayvana ait biyokimyasal parametreler Tablo 8 ve 9'da görülmektedir. Grupların serum ve doku arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve poliamin düzeyleri Şekil 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ve 24'de görülmektedir.

**Tablo 8. Deneklerin her birinin serum arginaz enzim aktivitesi ve poliamin düzeyleri**

| GRUPLAR | Serum Arginaz Aktivitesi (U/L) | Serum Putresin Düzeyleri (nmol/mL) | Serum Spermidin Düzeyleri (nmol/mL) | Serum Spermin Düzeyleri (nmol/mL) |
|---|---|---|---|---|
| Grup 1 | | | | |
| 1 | 3.27 | 243.50 | 26.70 | 36.94 |
| 2 | 2.28 | 10.00 | 0.90 | 27.26 |
| 3 | 2.97 | 227.20 | 45.07 | 32.79 |
| 4 | 3.44 | 21.70 | 0.90 | 4.56 |
| 5 | 3.66 | 55.10 | 64.27 | 21.30 |
| 6 | 2.56 | 38.30 | 0.90 | 15.87 |
| 7 | 3.03 | 78.40 | 28.37 | 72.81 |
| 8 | 2.43 | 216.30 | 34.60 | 26.66 |
| 9 | 2.24 | 819.50 | 81.17 | 49.31 |
| 10 | 3.06 | 543.80 | 43.67 | 19.60 |
| Grup 2 | | | | |
| 1 | 4.48 | 181.20 | 42.23 | 34.92 |
| 2 | 2.47 | 50.20 | 50.43 | 18.24 |
| 3 | 2.52 | 14.90 | 11.35 | 14.67 |
| 4 | 2.63 | 171.10 | 17.68 | 36.53 |
| 5 | 2.40 | 103.30 | 45.09 | 66.85 |
| 6 | 3.16 | 183.20 | 116.79 | 70.18 |
| 7 | 2.26 | 6.60 | 0.90 | 1.77 |
| 8 | 3.08 | 157.40 | 0.90 | 27.71 |
| 9 | 2.81 | 2.10 | 0.90 | 1.77 |
| 10 | 2.64 | 786.90 | 86.00 | 42.95 |
| Grup 3 | | | | |
| 1 | 3.66 | 965.23 | 56.65 | 49.56 |
| 2 | 4.28 | 1680.64 | 112.76 | 67.05 |
| 3 | 4.54 | 1262.54 | 43.24 | 67.60 |
| 4 | 3.60 | 2153.00 | 19.39 | 41.36 |
| 5 | 3.37 | 1939.40 | 1774.46 | 1671.95 |
| 6 | 3.41 | 67.10 | 20.09 | 65.87 |
| 7 | 3.96 | 1245.60 | 1644.60 | 1254.76 |
| 8 | 3.31 | 11.00 | 119.76 | 162.06 |
| 9 | 3.21 | 25.20 | 220.54 | 82.90 |
| 10 | 3.79 | 1352.45 | 78.90 | 92.83 |
| Grup 4 | | | | |
| 1 | 3.11 | 6.80 | 0.90 | 1.77 |
| 2 | 3.78 | 22.90 | 0.90 | 50.65 |
| 3 | 3.33 | 16.25 | 3.14 | 11.08 |
| 4 | 2.87 | 4.60 | 0.90 | 1.77 |
| 5 | 2.72 | 4.90 | 7.51 | 1.77 |
| 6 | 3.13 | 2.50 | 0.99 | 1.77 |
| 7 | 2.47 | 98.30 | 14.18 | 10.54 |
| 8 | 2.74 | 3.60 | 0.90 | 1.77 |
| 9 | 2.35 | 3.50 | 0.90 | 1.77 |
| 10 | 2.97 | 1.20 | 1.85 | 21.52 |
| Grup 5 | | | | |
| 1 | 3.02 | 2.30 | 3.54 | 6.81 |
| 2 | 2.87 | 9.20 | 0.90 | 1.77 |
| 3 | 2.25 | 9.20 | 0.90 | 1.77 |
| 4 | 2.76 | 2.20 | 8.41 | 15.23 |
| 5 | 2.41 | 0.70 | 8.12 | 1.77 |
| 6 | 3.03 | 3.61 | 0.90 | 3.96 |
| 7 | 1.84 | 3.50 | 2.57 | 1.77 |
| 8 | 2.13 | 1.20 | 0.90 | 1.77 |
| 9 | 2.87 | 3.65 | 2.14 | 4.17 |
| 10 | 2.76 | 0.70 | 0.90 | 1.77 |

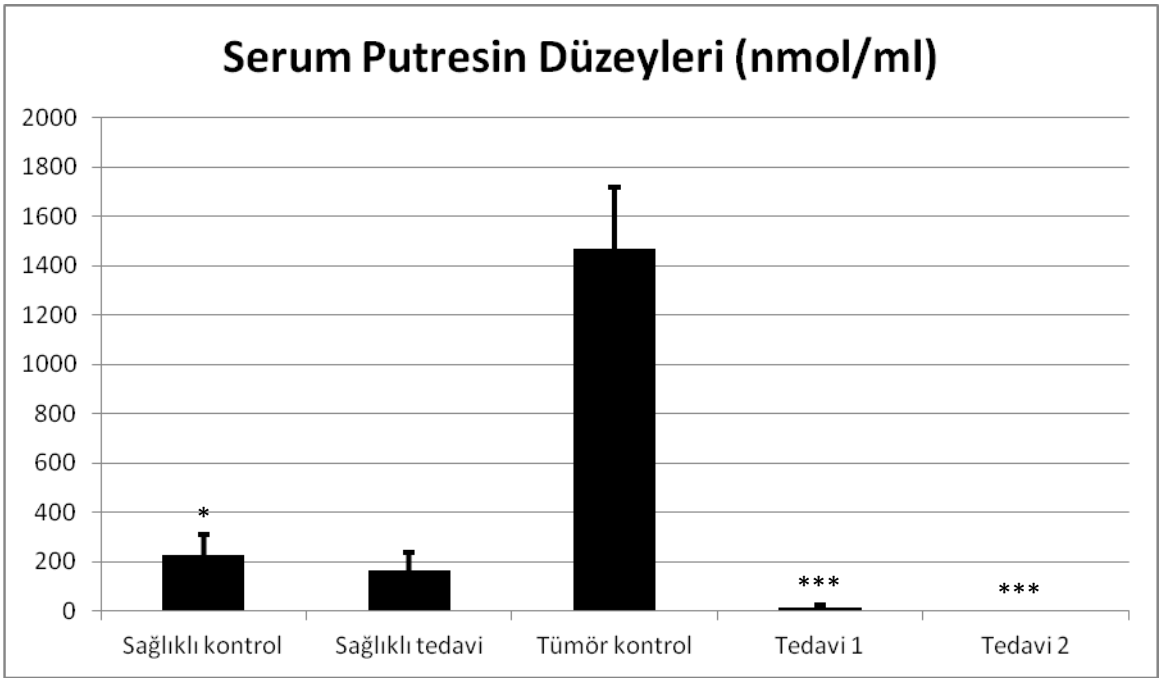
**Tablo 9. Deneklerin her birinin doku arginaz aktivitesi, ornitin ve poliamin düzeyleri**

| GRUPLAR | Doku Arginaz Aktivitesi (U/mg protein) | Doku Ornitin Düzeyleri (μmol/mg protein) | Doku Putresin Düzeyleri (nmol/mg protein) | Doku Spermidin Düzeyleri (nmol/mg protein) | Doku Spermin Düzeyleri (nmol/mg protein) |
|---|---|---|---|---|---|
| Grup 3 | | | | | |
| 1 | 40.05 | 0.136 | 4.68 | 53.79 | 30.12 |
| 2 | 24.03 | 0.076 | 16.77 | 64.56 | 37.59 |
| 3 | 34.13 | 0.069 | 13.94 | 80.49 | 23.20 |
| 4 | 45.30 | 0.065 | 5.40 | 20.03 | 8.08 |
| 5 | 22.09 | 0.060 | 2.21 | 28.35 | 11.51 |
| 6 | 34.27 | 0.053 | 3.66 | 73.13 | 29.98 |
| 7 | 43.06 | 0.039 | 7.62 | 5.77 | 22.75 |
| 8 | 51.14 | 0.044 | 7.43 | 5.30 | 21.63 |
| 9 | 64.74 | 0.055 | 8.42 | 9.65 | 5.35 |
| 10 | 35.61 | 0.124 | 5.02 | 65.13 | 34.55 |
| Grup 4 | | | | | |
| 1 | 15.96 | 0.047 | 0.14 | 4.20 | 2.27 |
| 2 | 39.02 | 0.032 | 10.31 | 93.50 | 10.02 |
| 3 | 22.32 | 0.040 | 1.60 | 9.70 | 4.26 |
| 4 | 23.10 | 0.055 | 9.46 | 29.72 | 11.22 |
| 5 | 20.95 | 0.031 | 0.85 | 16.48 | 17.40 |
| 6 | 22.25 | 0.029 | 8.85 | 85.60 | 34.05 |
| 7 | 25.74 | 0.048 | 2.85 | 34.58 | 12.75 |
| 8 | 6.07 | 0.053 | 6.95 | 9.65 | 4.29 |
| 9 | 15.22 | 0.069 | 0.17 | 8.39 | 2.77 |
| 10 | 28.13 | 0.050 | 3.92 | 7.81 | 5.07 |
| Grup 5 | | | | | |
| 1 | 16.05 | 0.034 | 0.22 | 2.41 | 1.40 |
| 2 | 6.25 | 0.032 | 3.15 | 2.15 | 1.25 |
| 3 | 22.76 | 0.037 | 3.61 | 2.03 | 0.89 |
| 4 | 36.35 | 0.051 | 3.26 | 1.11 | 0.46 |
| 5 | 18.72 | 0.043 | 3.14 | 2.21 | 2.01 |
| 6 | 24.94 | 0.043 | 2.74 | 2.95 | 1.55 |
| 7 | 17.66 | 0.040 | 0.19 | 1.97 | 0.69 |
| 8 | 30.96 | 0.033 | 2.62 | 1.77 | 1.97 |
| 9 | 12.49 | 0.033 | 3.22 | 2.48 | 1.76 |
| 10 | 21.07 | 0.047 | 10.46 | 2.45 | 1.18 |



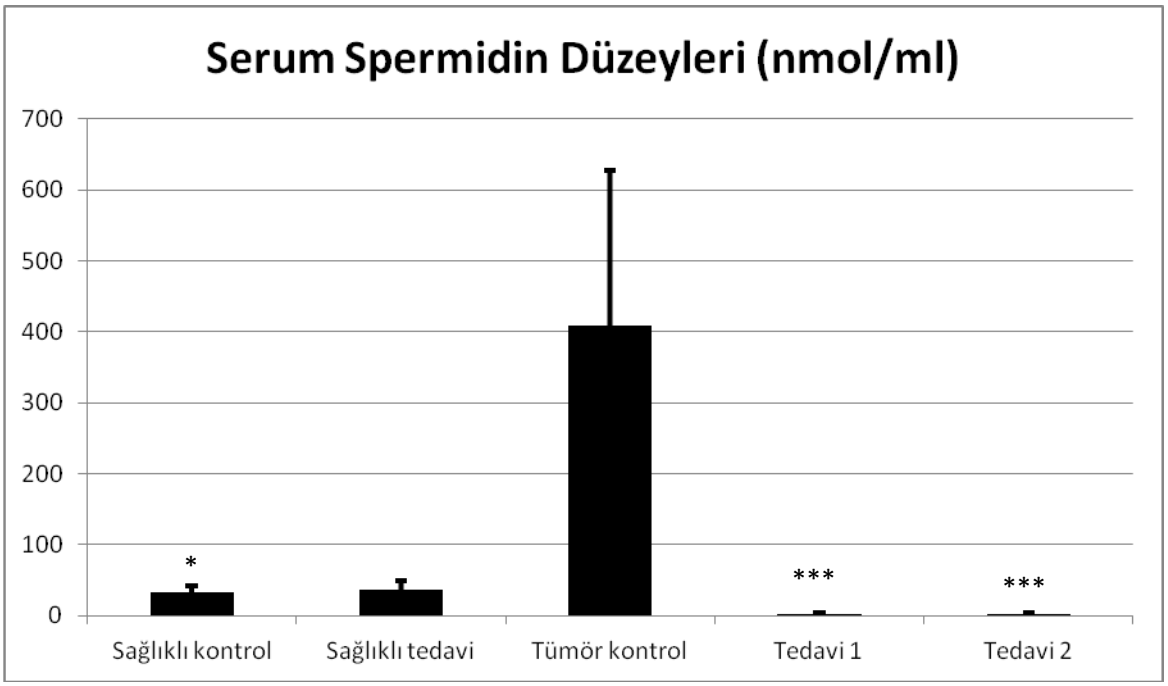

**: p<0.01, ***: p<0.001, tümör kontrol grubuna göre karşılaştırma.

**Şekil 16. Serum arginaz enzim aktivitesi**



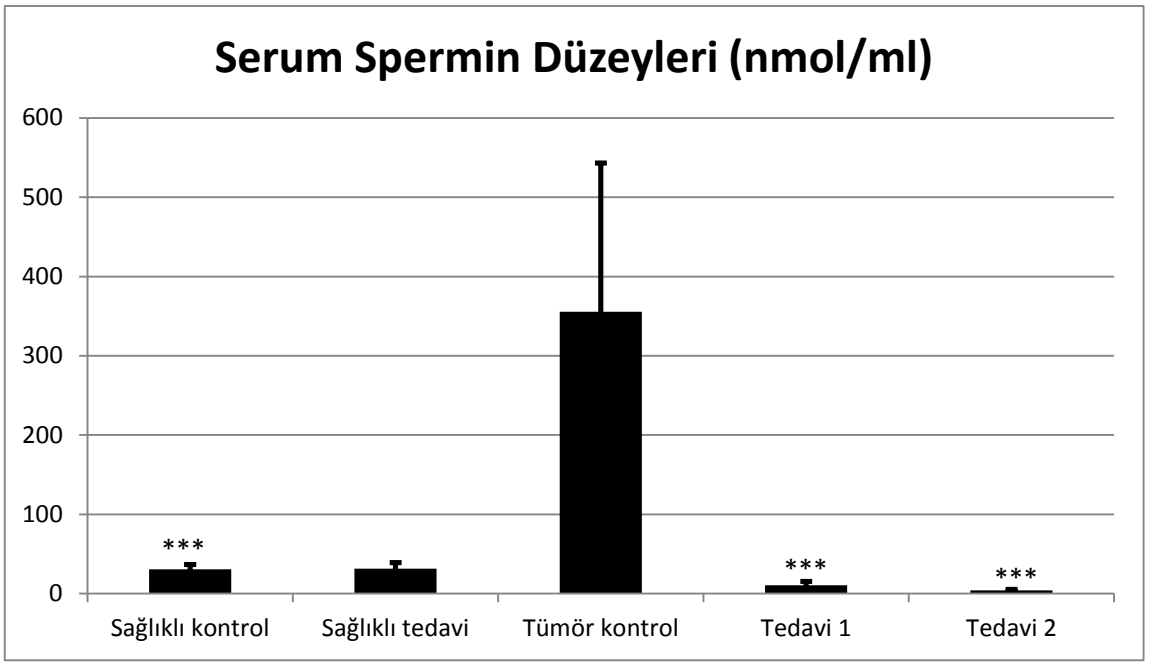

*: p<0.05, ***: p<0.001, tümör kontrol grubuna göre karşılaştırma.

**Şekil 17. Serum putresin düzeyleri**



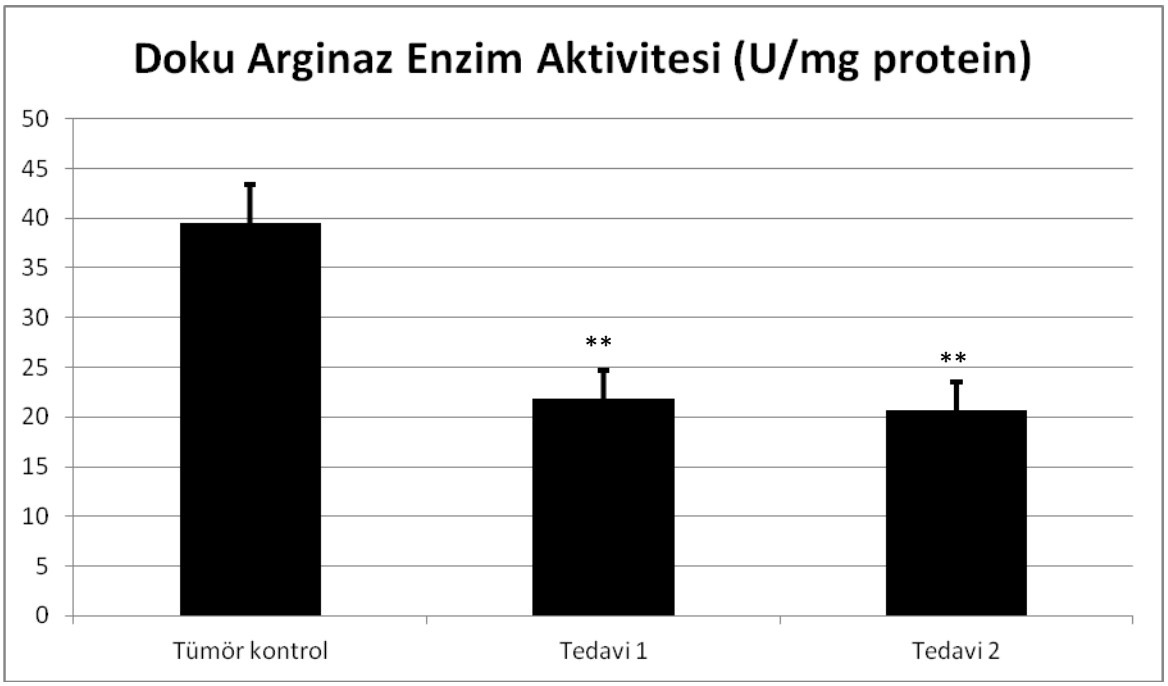

*: p<0.05, ***: p<0.001, tümör kontrol grubuna göre karşılaştırma.

**Şekil 18. Serum spermidin düzeyleri**



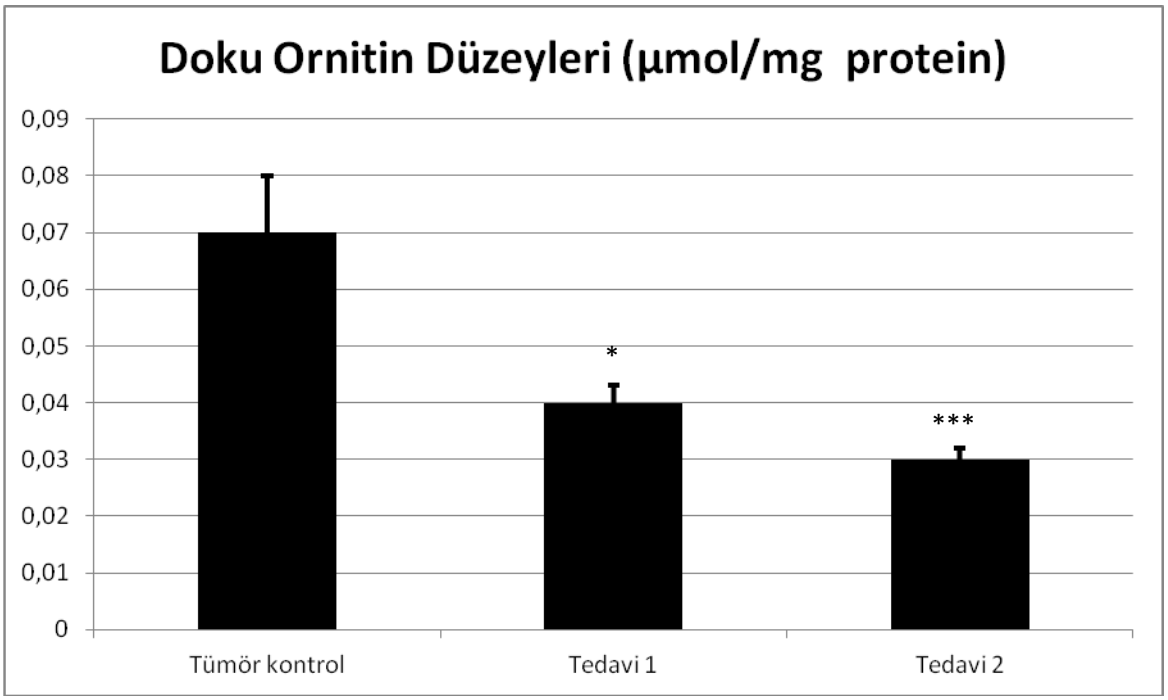

***: p<0.001, tümör kontrol grubuna göre karşılaştırma.

**Şekil 19. Serum spermin düzeyleri**



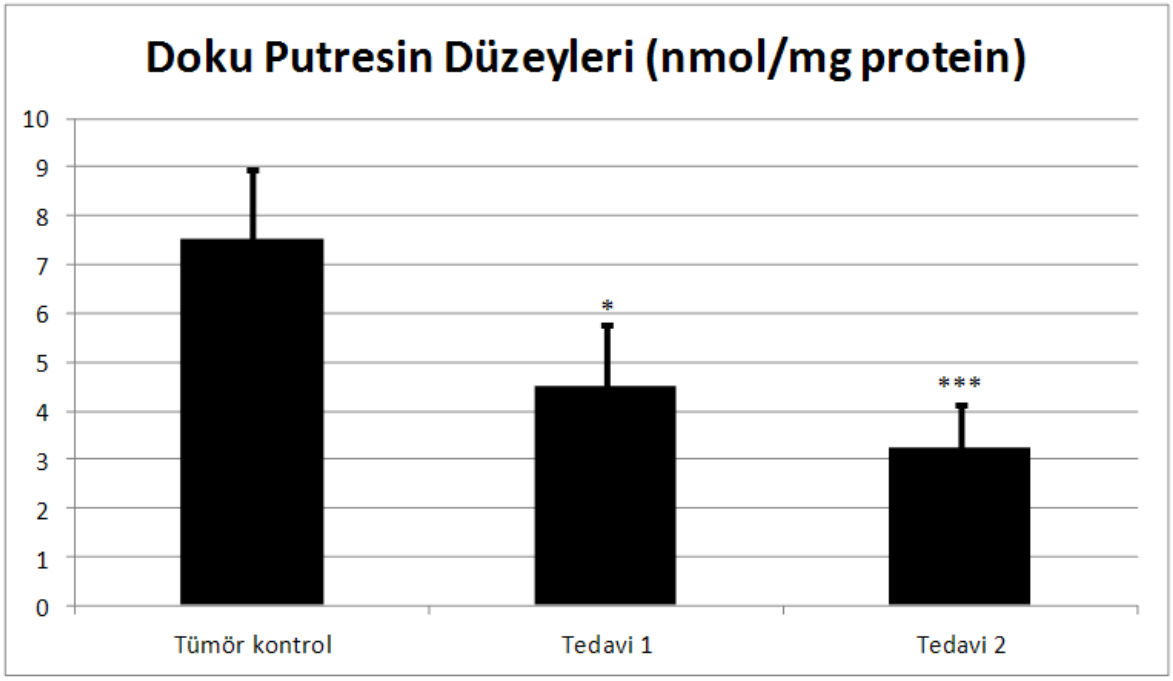

**: p<0.01, tümör kontrol grubuna göre karşılaştırma.

**Şekil 20. Doku arginaz enzim aktivitesi**



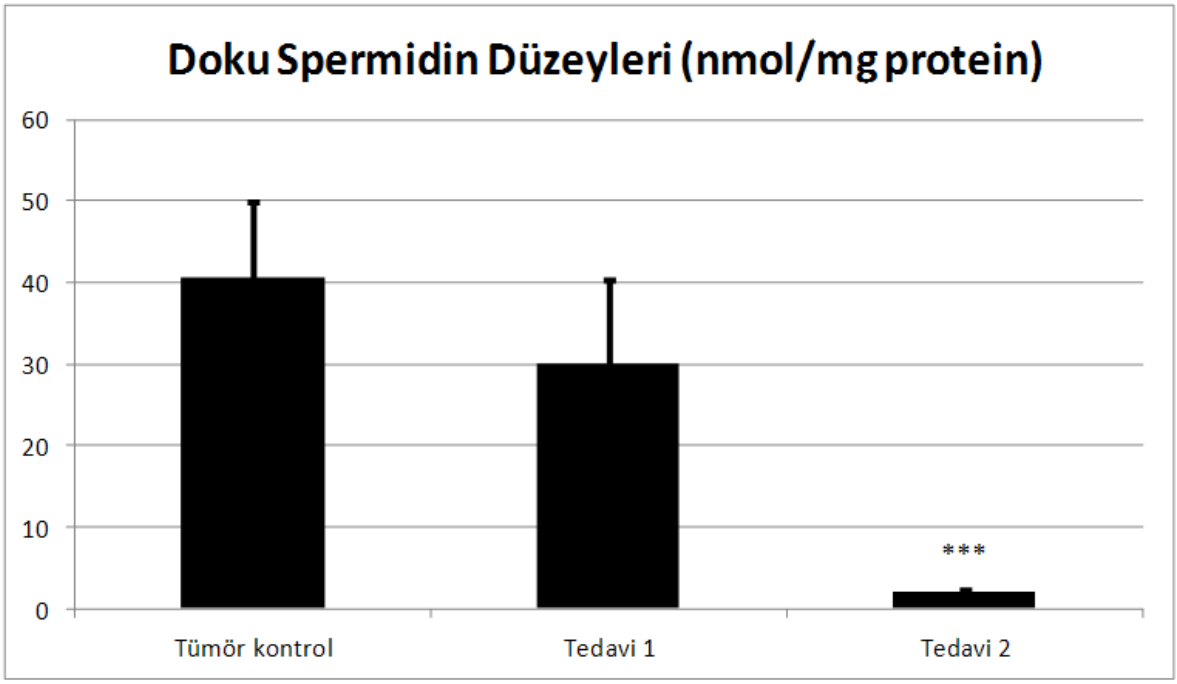

*: p<0.05, ***: p<0.001, tümör kontrol grubuna göre karşılaştırma.

**Şekil 21. Doku ornitin düzeyleri**



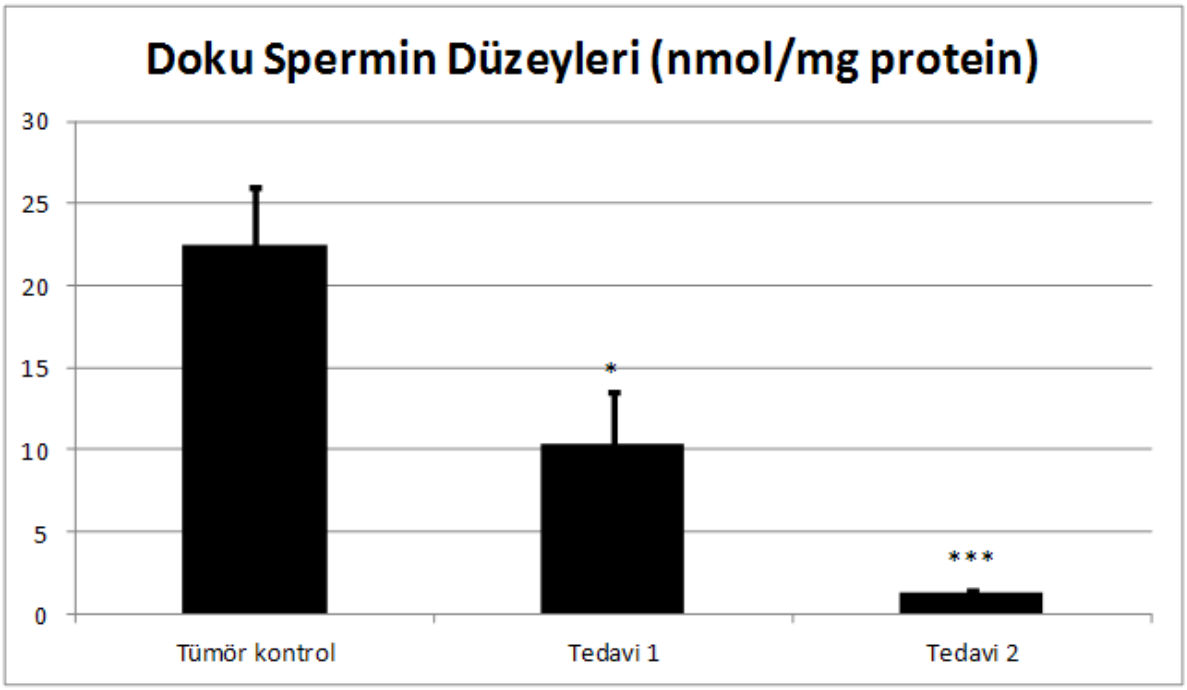

*: p<0.05, ***: p<0.001, tümör kontrol grubuna göre karşılaştırma.

**Şekil 22. Doku putresin düzeyleri**




***: p<0.001, tümör kontrol grubuna göre karşılaştırma.

**Şekil 23. Doku spermidin düzeyleri**




*: p<0.05, ***: p<0.001, tümör kontrol grubuna göre karşılaştırma.

**Şekil 24. Doku spermin düzeyleri**

# TARTIŞMA

Kanser; dünyada hemen her ülkede mortalite ve morbidite oranları açısından önde gelen sağlık sorunudur. Yüzyılın başında ölüme neden olan hastalıklar sıralamasında (7-8.) sıralarda iken, bugün birçok ülkede kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada gelmektedir (85).

Meme, kadınlarda süt üretimi için düzenlenmiş farklılaşmış bir ter bezidir. Meme kanseri, en çok lobül ile terminal duktus birleşme yerindeki epitelden köken alan bir adenokanserdir (2). Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser olup, akciğer kanserinden sonra kansere spesifik ölümlerde ikinci sıradadır (86).

Arginaz enzimi; arginini, üre ve ornitine çeviren hidrolitik bir enzimdir (18). Karaciğer arginaz aktivitesinin en yüksek olduğu dokudur. Ekstrahepatik dokulardaki aktivitesi, karaciğerden belirgin olarak daha düşüktür. Bu dokular arasında eritrosit, böbrek, beyin, bağırsak, pankreas, akciğer, tükürük bezleri ve testisler bulunmaktadır (4).

Arginaz enziminin kanserle yakından ilişkili olduğunu gösteren birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalar; kalın barsak, kolorektal, prostat, mide ve küçük hücreli akciğer kanseri gibi çeşitli kanser vakalarında serum ve doku arginaz düzeyinin arttığını gösterirken araştırmacılar arginaz enzim aktivitesi tayininin, kanser teşhisinde bir belirteç olabileceğini vurgulamışlardır (37,39,40,87-90). Boniface ve ark. yaptığı çalışmada; meme kanserli hastaların serumunda arginaz aktivitesinin yüksek olduğu ve cerrahi olarak tümör çıkarıldıktan sonra serumda arginaz aktivitesinin düştüğünü bildirmişlerdir (91). Meme kanserli hastaları içeren diğer çalışmalarda ise, serum arginaz aktivitesi, sağlıklı kadınlardan

yüksek bulunmuştur (35,92,93). Bu çalışmaları destekler şekilde bizim çalışmamızda da serum arginaz düzeyleri kanser grubunda sağlıklılara göre yüksek olarak bulundu.

Arginaz enzimiyle ortak substratı kullanan NOS, L-arginini NO ve sitrüline parçalayan enzimdir. NO ve NO metabolitlerinin tümörlü dokularda hücre büyümesi ve metaztazı inhibe ettiği, NO'in yüksek konsantrasyonlarında tümör gelişiminin inhibe edebileceği ve tümör hücrelerinin bu yolla apoptosisinin indüklenebileceği ifade edilmiştir (94). Kanserde arttığı bilinen arginaz enzimi ve NOS, arginini tüketmek için birbirleriyle yarışmaktadırlar (95). Arginaz enziminin L-arginin için Km değeri 2-20 mM olup, bu değer NOS için ise 1-20 μM'dür (96). Fakat, arginaz enziminin fizyolojik pH'da Vmax değeri, NOS enzimininden 1000 kat daha fazla olduğundan bu iki enzimin, L-argininin düşük konsantrasyonlarında bile, onu rahatlıkla kullanabileceğini göstermektedir (20). Birbiri ile yarışma halinde olan bu iki enzimden biri olan arginaz enzim aktivitesinin artması, NOS enzimini azaltarak üretimi ornitin lehine çevirebilir. Bu durum poliamin sentezini artırırken, NO üretiminin azalmasına yol açacaktır. Sonuç olarak ise NO düzeyinin azalması karsinojenik süreci hızlandırabilecektir (53).

Poliaminlerin bir analogu olan agmantin'in ise daha önceleri bakteri, bitki ve omurgasızlarda bulunduğu bildirilmiş ancak son yıllarda memelilerde de bulunduğu bildirilmiştir (53). Agmatin'in, arjininden, arjinin dekarboksilaz varlığında sentezlendiği ve tümör hücrelerinde büyümeyi önleyici bir ajan olarak varlık gösterdiği belirtilmiştir (97). Agmatin'in hücre çoğalmasını engelleyici bir ajan olması ve substrat olarak arjinini kullanması, agmatin üretiminin de artan arginaz enzim aktivitesi ile birlikte azalacağını akla getirmektedir. Bu durum yine tümör gelişimi yönünde olumsuz bir etkiye neden olabilecektir (53).

Ornitin, poliamin olarak söylenen bir grubun (putresin, spermidin ve spermin) öncül maddesidir. Hücre bölünmesi, protein-DNA etkileşimleri, hücre farklılaşması, embriyonik gelişim, immunolojik etkileşimler, sinyal iletimi, apoptoz, DNA ve RNA konformasyonel de ğişimleri ile kanser gibi çok çeşitli alanlarda poliaminlerin görevleri vardır. Poliaminlerin, hücrelerde nükleotit ve protein sentezini uyararak hücre proliferasyonunda rol oynadıkları, ayrıca hızlı büyüyen hücre ve dokularda yüksek konsantrasyonlarda bulundukları, hücre büyümesi ve farklılaşması için gerekli oldukları belirtilmiştir (45). Büyüme ile ilişkili genler, örneğin; c-fos ve c-myc proto-onkojenleri hücresel çoğalma sürecinde aktive olmaktadırlar. Mitojenik uyarıyı takiben poliamin sentezinde eş zamanlı bir artış ve c-fos proto-onkojeninin transkripsiyonu olmaktadır. Benzer olarak malign dönüşüm poliamin sentezinde bir artışa neden olmaktadır. Poliaminlerin c-myc ve c-fos transkripsiyonunu artırdığı gösterilmektedir

(98). Poliaminler bu yüzden büyüme süreci için gerekli maddeler olup aynı zamanda karsinogenezle ile de bağlantılıdır (99). Poliamin konsantrasyonlarının tümör gelişiminin erken döneminde arttığını, prostat ve mide kanserinde dokuda ve eritrositte, lösemide idrarda poliamin düzeylerinin yükseldiği böylelikle tümöral gelişime predispozisyon yarattığını gösteren birçok çalışma vardır (60,61,100). Ayrıca nöroblastom ve kolorektal gibi kanserlerde de poliamin düzeyleri artmaktadır (101,102).

Poliamin biyosentez inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda poliamin homeostazisinin engellenmesi ile tümör büyümesinin inhibe edilebileceğini gösterilmiştir. Ornitin dekarboksilaz enzimi poliamin sentezinde hız sınırlayıcı bir enzimdir. Ornitin dekarboksilaz inhibitörü olan *a*-diflorometil ornitinin (DFMO) insan meme kanseri hücrelerine uygulanması tümör invazyonunu yaklaşık olarak %70 oranında azaltmıştır (103). Jeong ve ark. meme kanseri çalışmasında serum poliamin düzeyinin meme kanserli hastalarda sağlıklılara göre artığını saptamıştır (104). Bu çalışmada da literatür bilgisi ile doğru orantılı olarak gerek poliaminlerin öncülü olan ornitin, gerekse poliaminlerden putresin, spermidin ve spermin tümör grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Rosuvastatin, kolesterol sentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan HMG KoA'dan mevalonat asit oluşumunu katalizleyen enzimi inhibe eder. Rosuvastatinin diğer statinlerde olduğu gibi HMG KoA redüktaz inhibisyonundan bağımsız etkileride vardır. Bunlar endotel fonksiyonunda iyileşme, antiinflamatuar, antitrombotik ve antioksidan etkilerdir (7). Statinler NO artırarak endotelyal ve kardiyovaskuler fonksiyonları düzeltirler (75). Diğer taraftan aynı araştırmacılar tarafından statinlerin bu etkilerini MCF-7 meme kanser hücrelerinde gerçekleştirirken kullandıkları mekanizmanın, iNOS sentezi ile NO üretiminin artırmak olduğunu kuvvetle vurgulamışlardır (75).

Jenny ve ark. yaptığı bir çalışmada, statinlerin kolorektal kanser görülme olasılığını azalttığını tespit etmişlerdir (78). Kotamraju ve ark. yaptıkları meme kanseri çalışmasında tedavi edici ajan olarak, bir statin olan fluvastatin ve simvastatini kullanmışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarından biri her iki statininde kanser hücrelerini apoptoza yönlendirmesiyken, diğer bulguya göre non-kanser hücrelerinin çoğalmasının durdurulmamasıydı (75). Statinler kanser hücre çoğalmasını, hücre siklusunu G1-S fazını durdurarak ve apoptozu indükleyerek engeller (75). Bu çalışmada rosuvastatinin meme kanserinde tedavi amaçlı kullanılması bir ilki temsil etmektedir.

Çalışmamızda hedeflenen diğer bir amaç rosuvastatin'in tedavi dozunun değerlendirilmesidir. Burada ilginç sonuçlara ulaşılmıştır. Bu amaçla iki farklı tedavi dozu uygulanmış, bir gruba düşük doz (1 mg/kg) rosuvastatin verilirken, diğer gruba yüksek doz

(20 mg/kg) rosuvastatin uygulaması yapılmıştır. Her iki farklı dozun araştırılan parametreler üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde; gerek serum arginaz ve poliamin düzeylerinde gerekse doku arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve poliamin düzeylerinde, artan tedavi dozu ile paralel bir azalma tespit edildi. Kanser açısından olumsuz olarak nitelendirilen bu parametrelerin serum ve doku düzeylerinin, yüksek doz rosuvastatin düzeyi ile azalması, ilacın bu konsantrasyonlarda kullanılmasının daha anlamlı olduğunu ortaya koyması açısından önemlidir.

Sonuç olarak, antikarsinojenik bir ajan olarak düşünülen rosuvastatin'in, bu etkisini gösterebilmesindeki mekanizmalardan biri, meme kanserli hastalarda serum ve doku arginaz enzim aktivitesini inhibe ederek yolağı NOS üzerinden NO oluşumuna kaydırması, bu sayede karsinojenik rolü bildirilen poliaminlerin öncü maddesi olan ornitin sentezini azaltması ve koruyucu etkileri çeşitli çalışmalar ile gösterilen NO üretimini teşvik etmesi olabilir. Kanser tedavisinde umut verici bir ajan olan rosuvastatin'in bu alandaki etkileri daha ileri çalışmalar ve yeni parametreler ile desteklenmelidir.

# SONUÇLAR

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvar'ında gerçekleştirilmiştir. Rosuvastatin'in deneysel olarak meme kanseri geliştirilmiş farelerde arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve poliamin düzeyleri üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanan bu çalışma sonucunda;

1) Serum arginaz enzim aktivitesi meme kanserinde anlamlı bir şekilde yükselirken, rosuvastatin tedavisi ile azaldığı saptandı.

2) Serum putresin düzeylerinin tümör grubunda anlamlı olarak yükseldiği, tedavi ile putresin düzeyinin anlamlı olarak düştüğü saptandı.

3) Serum spermidin düzeylerinin tümör grubunda anlamlı olarak yükseldiği, tedavi grupları ile tümör grubu karşılaştırıldığında ise tedavi gruplarında serum putresin düzeyinin anlamlı olarak düştüğü saptandı.

4) Serum spermin düzeylerinin tümör grubunda anlamlı olarak yükseldiği, tedavi ile putresin düzeyinin anlamlı olarak düştüğü saptandı.

5) Tümör doku örneklerinde rosuvastatin tedavisi sonucunda arginaz enzim aktivitesinin düştüğü, bu düşüşün tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu.

6) Rosuvastatin tedavisi sonucunda azalan arginaz enzim aktivitesi doğrultusunda, ornitin düzeylerinde de anlamlı bir azalma saptandı.

7) Doku putresin düzeyinin tümör grubunda anlamlı olarak yükseldiği, tedavi ile putresin düzeyinin anlamlı olarak düştüğü saptandı.

8) Doku spermin düzeylerinin tümör grubunda anlamlı olarak yükseldiği, tedavi ile spermin düzeyinin anlamlı olarak düştüğü saptandı.

9) Doku spermidin düzeylerinin tümör grubunda anlamlı olarak yükseldiği, tedavi ile düştüğü saptandı.

10) Rosuvastatin'in meme kanserinde arginaz enzim aktivitesini inhibe ederek poliamin sentezini baskılaması ve koruyucu rolü bilinen NO düzeyini artırarak kansere karşı koymada koruyucu bir rol üstlenebileceği vurgulandı.

11) Rosuvastatin'in meme kanserine karşı potansiyel bir koruyucu/tedavi edici ajan olarak, arginaz/poliaminler/NO mekanizması açısından olumlu bazı etkilerinin bulunabileceği, fakat rosuvastatin'in bu pozitif etkilerinin daha net bir hale getirilmesinin gerekli olduğu, bunun da ancak diğer kanser parametreleri ve mekanizmaları üzerindeki etkilerinin ileri çalışmalarla incelenmesi ile mümkün olabileceği sonucuna varıldı.

# ÖZET

Meme kanseri, dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümördür. Üre döngüsünün anahtar enzimi olan arginaz, L-argininden üre ve ornitin oluşturmaktadır. Kanserli hastalarda arginaz enzim aktivitesinin arttığı ve arginazın kanserde biyolojik bir belirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

Bu çalışmada meme kanseri oluşturulmuş farelerde serumda arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve poliamin (putresin, spermidin, spermin) düzeylerine, dokuda ise arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve poliamin (putresin, spermidin, spermin) düzeylerine, rosuvastatin'in etkisi araştırılmıştır.

Çalışmada 50 tane erkek Balb/c cinsi fare kullanıldı. Farelerin sol ayak iç bölgesine 0.2 mL erhlich asit tümör hücresi enjekte edildi. Fareler sağlıklı kontrol, sağlıklı tedavi, tümör kontrol, tedavi 1 ve tedavi 2 grupları olmak üzere 5 gruba ayrıldı ve kontrol grupları hariç diğer gruplara 1 mg/kg ve ikinci tedavi grubuna 20 mg/kg rosuvastatin 15 gün boyunca intraperitonel olarak verildi.

Tümörlü hayvanların serumunda artmış bulunan arginaz enzim aktivitesinin rosuvastatin tedavisi ile birlikte istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı gözlendi ($p=0.001$). Serum poliamin (putresin, spermidin, spermin) düzeylerinin, rosuvastatin tedavisi ile azaldığı saptandı. Doku arginaz enzim aktivitesi ve ornitin düzeyleri tedavi gruplarında tümör grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p=0.002$). Doku poliamin (putresin, spermidin, spermin) düzeylerinin ise yine rosuvastatin tedavisi ile birlikte azaldığı gözlendi.

Sonuç olarak, rosuvastatin'in arginaz enzim aktivitesini inhibe ederek yolağı nitrik oksit sentaz üzerinden nitrik oksit oluşumuna kaydırdığı, bu sayede poliaminlerin öncü

maddesi olan ornitin sentezini azalttığı ve nitrik oksit üretimini teşvik ederek kansere karşı koruyucu bir rol oynayabileceği söylenebilir. Kanser tedavisinde umut verici bir ajan olan rosuvastatin'in bu alandaki etkileri daha ileri çalışmalar ve yeni parametreler ile desteklenmelidir.

**Anaktar kelimeler:** Meme kanseri, arginaz, ornitin, poliaminler, rosuvastatin.

# EFFECTS OF ROSUVASTATIN ON ARGINASE ENZYME ACTIVITY, ORNITHINE AND NITRIC OXIDE LEVELS IN THE EXPERIMENTAL BREAST CANCER

## SUMMARY

Breast cancer is the most common malignant tumour of women around the world. As a key enzyme of the urea cycle, arginase leads to formation of urea and ornithine from L-arginine. In the patients with several different cancer, arginase has been found to be higher and reported to be a useful biological marker.

The aim of this study was to investigate effect of rosuvastatin on serum and cancer tissue arginase enzyme activity, ornithine and polyamine (putrescine, spermidine, spermine) levels.

In this study, 50 male Balb/c mice were used. 0.2 ml Erchlich acid tumor cell was injected into the subcutan part of their left foot. The mice were divided into five groups as healty control group, healty treatment, tumour control, treatment 1, treatment 2 groups. 1 mg/kg and 20 mg/kg dose of rosuvastatin were given intraperitonealy.

Increased serum arginase activity was significantly decreased with rosuvastatin treatment (p=0,001). In the tumour tissue, arginase activity and ornithine levels were significantly decreased in treatment groups than tumour group (p=0.002). Tissue polyamine (putresine, spermidine, spermine) levels also decreased with rosuvastatin treatment.

As a conclusion, we may suggest that rosuvastatin may have some protective effects on breast cancer development as inhibits arginase enzyme activity and ornithine levels, precursor of polyamines, and therefore inducing NO production via NOS. As a promising anticancer agent, the net effects of rosuvastatin in this mechanism should be supported with more advanced studies and new parameters.

**Key words:** Breast cancer, arginase, ornithine, polyamines, rosuvastatin.

# KAYNAKLAR


1. Bray F, McCarron P, Parkin DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. Breast Cancer Res 2004;6(6):229-39.

2. Aydıntuğ S. Meme kanserinde erken tanı. Sted 2004;13(6):226-8.

3. Hendrix MJ, Seftor EA, Kirschmann DA, Seftor RE. Molecular biology of breast cancer metastasis. Molecular expression of vascular markers by aggressive breast cancer cells. Breast Cancer Res 2000;2(6):417-22.

4. Meram İ, Ahi S, Tarakçıoğlu M. Kanserde serum arginaz aktivitesi. Van Tıp Dergisi 2000;7(1):20-3.

5. Moinard C, Cynober L, de Bandt JP. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. Clin Nutr 2005;24(2):184-97.

6. 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.

7. Luvai A, Mbagaya W, Hall AS, Barth JH. Rosuvastatin: a review of the pharmacology and clinical effectiveness in cardiovascular disease. Clin Med Insights Cardiol 2012;6:17-33.

8. Jemal A, Ward E, Thun MJ. Recent trends in breast cancer incidence rates by age and tumor characteristics among U.S. women. Breast Cancer Res 2007;9(3):28-34.

9. Türkiye İstatistik Kurumu. Türkiye'de Kanser Kayıtçılığı. 2013. http://kanser.gov.tr/index.php/daire-faaliyetleri/kanser-kayitciligi/108-t%C3%BCrkiyede kanser-kayitcigi.html. Erişim tarihi: 03.03.2013

10. Çakabay B. Meme Kanserinde Gasc1 Gen Ekspresyonu (tez). Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2012.

11. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. CA Cancer J Clin 2000;50(1):7-33.

12. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. J Clin Oncol 2003;21(17):3357-65.

13. Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, Folger SG, Mandel MG, Daling JR, et al. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. N Engl J Med 2002;346(26):2025-32.

14. Giordano SH, Cohen DS, Buzdar AU, Perkins G, Hortobagyi GN. Breast carcinoma in men: a population-based study. Cancer 2004;101(1):51-7.

15. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. Ankara: Güneş Kitabevi, 2006:401-4.

16. Meme anatomisi. http://www.ichmemecerrahisi.com/meme-anatomisi.gif. Erişim tarihi: 03.03.2013

17. Göksoy E. Genel Cerrahi Ders Kitabı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, 2010:372-7.

18. Erbas H, Aydogdu N, Usta U, Erten O. Protective role of carnitine in breast cancer via decreasing arginase activity and increasing nitric oxide. Cell Biol Int 2007;31(11):1414-9.

19. Yüksel M, Kandemir FM, Deveci H, Özdemir N. İneklerde seksüel siklusun farklı dönemlerinde uterus arginaz seviyelerinin araştırılması. YYU Veteriner Fakultesi Dergisi 2012;23(1):15–17.

20. Singh R, Pervin S, Karimi A, Cederbaum S, Chaudhuri G. Arginase activity in human breast cancer cell lines: N(omega)-hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells. Cancer Res 2000;60(12):3305-12.

21. Kandemir FM, Özdemir N. L- lizin ve L- ornitinin sığır böbrek doku arginaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi. Fırat Üniv Sağlık Bilimleri Derg 2008;22(1):1-4.

22. Altınışık M. Protein ve aminoasit metabolizması. Üre Döngüsü. 2006. www.mustafaaltinisik.org.uk/56-1-4-06.ppt. Erişim tarihi: 02.03.2013

23. Burtis CA, Ashwood ER (Çeviri: D. Aslan). Tietz klinik kimyada temel ilkeler. Ankara: Palme Yayıncılık; 2005:414-7.

24. Ash DE. Arginine metabolism: enzymology, nutrition, and clinical significance. J Nutr 2004;134(10):2741-897.

25. Kandemir FM. Koyun Dalak Doku Arginazının Bazı Kinetik Özellikleri (tez). Elazığ: Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2009.

26. Hosoyama Y. The reversible inactivation of rat-liver arginase in low pH. Eur J Biochem 1972;27(1):48-52.

27. Schımke RT. Adaptive characteristics of urea cycle enzymes in the rat. J Biol Chem 1962;237:459-68.

28. Ozan ST, Yaralıoğlu S, İleri T, Halifeoğlu İ. Akkaraman ve ivesi koyunlarında, gebelikte ve dogumdan sonra eritrosit, tükürük ve serum arginaz aktiviteleri ile serum üre ve östrojen düzeyleri. Tr J of Veterinary and Animal Sciences 1998;23(1999):345-50.

29. Morris SM. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. Br J Pharmacol 2009;157(6):922-30.

30. Porembska Z, Skwarek A, Mielczarek M, Barańczyk-Kuźma A. Serum arginase activity in postsurgical monitoring of patients with colorectal carcinoma. Cancer 2002;94(11):2930-4.

31. Lauharanta J, Käpyaho K. Arginase activity and polyamine biosynthesis inpsoriasis. Acta Derm Venereol 1983;63(4):277-82.

32. Anderson WAD, Scott TM. Gelişme bozuklukları. Kısa patoloji, (3. Baskı) Aykan TB, Tüzüner N, Sav A, İnce G. Nobel Tıp Yayınevi, İstanbul 1986:284.

33. Biczo G. Pathogenesis of Basic Amino Acid-Induced Experimental Acute Pancreatitits: The Role of Urea Cycle Metabolites and Polyamines (Dissertation). Szeged: Szeged Univ; 2010.

34. Fukumoto K, Karai I, Nishikawa Y, Horiguchi S. Erythrocyte arginase activity as an indicator of lead exposure. Br J Ind Med 1983;40(1):106-10.

35. Porembska Z, Luboiński G, Chrzanowska A, Mielczarek M, Magnuska J, Barańczyk-Kuźma A. Arginase in patients with breast cancer. Clin Chim Acta 2003;328(1-2):105-11.

36. Chrzanowska A, Gajewska B, Barańczyk-Kuźma A. Arginase isoenzymes in human cirrhotic liver. Acta Biochim Pol 2009;56(3):465-9.

37. Wu CW, Chi CW, Lin EC, Lui WY, P'eng FK, Wang SR. Serum arginase level in patients with gastric cancer. J Clin Gastroenterol 1994;18(1):84-5.

38. Gökmen SS, Yıldız R, Tabakoğlu E, Altıay G, Yavuz E, Gülen Ş. Akciğer Kanserli Hastalarda Eritrosit Arginaz Aktivitesi. Trakya Üniv Tıp Fak Derg 2005;22(2):76-81.

39. Mao H, Gao W, Lu G, Fang F, Teng L. Clinicopathological and prognostic implications of arginase expression in hepatocellular carcinoma. Clin Lab 2013;59(1-2):37-43.

40. Hsueh EC, Knebel SM, Lo WH, Leung YC, Cheng PN, Hsueh CT. Deprivation of arginine by recombinant human arginase in prostate cancer cells. J Hematol Oncol 2012;5:17.

41. Moinard C, Cynober L, de Bandt JP. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. Clin Nutr 2005;24(2):184-97.

42. Morgan DM, Wheeler-Jones CP. Human vascular endothelial cells incorporate spermine, but not spermidine or putrescine, into a 20 kDa protein. Biochem Soc Trans 1998;26(4):S367.

43. Schipper RG, Penning LC, Verhofstad AA. Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors? Semin Cancer Biol 2000;10(1):55-68.

44. Withrow C, Ashraf S, O'Leary T, Johnson LR, Fitzgerald ME, Johnson DA. Effect of polyamine depletion on cone photoreceptors of the developing rabbit retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 2002;43(9):3081-90.

45. Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. Biochem J 2003;376(1):1-14.

46. Davis RH, Morris DR, Coffino P. Sequestered end products and enzyme regulation: the case of ornithine decarboxylase. Microbiol Rev 1992;56(2):280-90.

47. Assaraf YG, Golenser J, Spira DT, Bachrach U. Polyamine levels and the activity of their biosynthetic enzymes in human erythrocytes infected with the malarial parasite, Plasmodium falciparum. Biochem J 1984;222(3):815-9.

48. Yatin M. Polyamines in living organisms. Journal of Cell and Molecular Biology 2002; 1:57-67.

49. Williams K. Interactions of polyamines with ion channels. Biochem J 1997;325(2):289-97.

50. Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG. The mechanism of inward rectification of potassium channels: "long-pore plugging" by cytoplasmic polyamines. J Gen Physiol 1995;106(5):923-55.

51. Tabor CW, Tabor H. Polyamines in microorganisms. Microbiol Rev 1985;49(1):81-99.

52. Slocum RD, Kaur-Sawhney R, Galston AW. The physiology and biochemistry of polyamines in plants. Arch Biochem Biophys 1984;235(2):283-303.

53. Erbaş H, Erten O, Dağlar A, İrfanoğlu ME. Meme kist sıvısı arginaz aktivitesi, ornitin ve üre düzeyleri. Türk Biyokimya Dergisi 2006;31(3):129–34.

54. Mackintosh CA, Pegg AE. Effect of spermine synthase deficiency on polyamine biosynthesis and content in mice and embryonic fibroblasts, and the sensitivity of fibroblasts to 1,3-bis-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea. Biochem J 2000;351(2):439-47.

55. Aloğlu SM. Boheminin Sıçan Prostat Kanseri Hücre Hatlarında Terapötik Öneminin Çeşitli Biyomarkırlarla Araştırılması (tez). İstanbul: Haliç Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2005.

56. Wu F, Christen P, Gehring H. A novel approach to inhibit intracellular vitamin B6-dependent enzymes: proof of principle with human and plasmodium ornithine decarboxylase and human histidine decarboxylase. Faseb J 2011;25(7):2109-22.

57. Sawhney RK, Tiburcio AF, Altabella T, Galston A. Polyamines in plants: An overview. Journal of Cell and Molecular Biology 2003;2:1-12.

58. Pegg AE. Spermidine/spermine-*N*1-acetyltransferase: a key metabolic regulator. Am J Physiol Endocrinol Metab 2008;294:E995–E1010.

59. Shantz LM, Pegg AE. Ornithine decarboxylase induction in transformation by H-Ras and RhoA. Cancer Res 1998;58(13):2748-53.

60. Zagaja GP, Shrivastav M, Fleig MJ, Marton LJ, Rinker-Schaeffer CW, Dolan ME. Effects of polyamine analogues on prostatic adenocarcinoma cells in vitro and in vivo. Cancer Chemother Pharmacol 1998;41(6):505-12.

61. Kruczynski A, Pillon A, Créancier L, Vandenberghe I, Gomes B, Brel V, et al. F14512, a polyamine-vectorized anti-cancer drug, currently in clinical trials exhibits a marked preclinical anti-leukemic activity. Leukemia 2013;10:108-9.

62. 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.

63. Alvarez-Múgica M, Fernández-Gómez JM, Cebrian V, Fresno F, Escaf S, Sánchez-Carbayo M. Polyamine-modulated factor-1 methylation predicts Bacillus Calmette-Guérin response in patients with high-grade non-muscle-invasive bladder carcinoma. Eur Urol 2013;63(2):364-70.

64. Mitchell MF, Tortolero-Luna G, Lee JJ, Hittelman WK, Lotan R, Wharton JT, et al. Polyamine measurements in the uterine cervix. J Cell Biochem Suppl 1997;28-29:125-32.

65. 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. In press 2013.

66. Itoh M, Bissell MJ. The organization of tight junctions in epithelia: implications for mammary gland biology and breast tumorigenesis. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2003;8(4):449-62.

67. Trosko JE. The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. J Biochem Mol Biol 2003;36(1):43-8.

68. Zell JA, Lin BS, Ziogas A, Anton-Culver H. Meat consumption, ornithine decarboxylase gene polymorphism, and outcomes after colorectal cancer diagnosis. J Carcinog 2012;11:17.

69. Prinz V, Laufs U, Gertz K, Kronenberg G, Balkaya M, Leithner C, et al. Intravenous rosuvastatin for acute stroke treatment: an animal study. Stroke 2008;39(2):433-8.

70. Uyar E. İn Vivo Sıçan Kalbinde Oluşturulan İskemi Reperfüzyon Hasarında Rosuvastatin'in Koruyucu Etkisinin İskemik Ön Koşullama İle Karşılaştırılması (tez). Diyarbakır: Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2012.

71. Kim YS, Ahn Y, Hong MH, Kim KH, Park HW, Hong YJ, et al. Rosuvastatin suppresses the inflammatory responses through inhibition of c-Jun N-terminal kinase and Nuclear Factor-kappaB in endothelial cells. J Cardiovasc Pharmacol 2007;49(6):376-83.

72. Schupp N, Schmid U, Heidland A, Stopper H. Rosuvastatin protects against oxidative stress and DNA damage in vitro via upregulation of glutathione synthesis. Atherosclerosis 2008;199(2):278-87.

73. Perkins S, Verschoyle RD, Hill K, Parveen I, Threadgill MD, Sharma RA, et al. Chemopreventive efficacy and pharmacokinetics of curcumin in the min/+ mouse, a model of familial adenomatous polyposis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2002;11(6):535-40.

74. Eroğlu C, Soyuer I, Soyuer S, Yıldız OG, Orhan O, Gündoğ M, ve ark. Eş zamanlı kemoradyoterapi ile tedavi edilen evre III küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde NF-κB'nin prognostik önemi. Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi 2005;15(3):138-43.

75. Kotamraju S, Williams CL, Kalyanaraman B. Statin-induced breast cancer cell death: role of inducible nitric oxide and arginase-dependent pathways. Cancer Res 2007;67(15):7386-94.

76. Sivaprasad U, Abbas T, Dutta A. Differential efficacy of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors on the cell cycle of prostate cancer cells. Mol Cancer Ther 2006;5(9):2310-6.

77. Sumi S, Beauchamp RD, Townsend CM, Uchida T, Murakami M, Rajaraman S, et al. Inhibition of pancreatic adenocarcinoma cell growth by lovastatin. Gastroenterology 1992;103(3):982-9.

78. Poynter JN, Gruber SB, Higgins PD, Almog R, Bonner JD, Rennert HS, et al. Statins and the risk of colorectal cancer. N Engl J Med 2005;352(21):2184-92.

79. Gayer JW, Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. Analy Biochem 1986;39:412-7.

80. Chinard FP. Photometric estimation of proline and ornithine. J Bil Chem 1952;199:91-5.

81. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-75.

82. Munder M, Eichmann K, Moran JM, Centeno F, Soler G, Modolell M. Th1/Th2-regulated expression of arginase ısoforms in murine macrophages and dendritic cells. The Journal of Immunology 1999;163:3771–7.

83. Fu S, Xiao C, Zhao W, Yu X. Polyamines analysis by HPLC and their application as tumor markers. Frontiers in Bioscience 2012;E4:1795-801.

84. Fu S, Zou X, Wang X, Liu X. Determination of polyamines in human prostate by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1998;709(2):297-300.

85. Haydaroğlu A, Bölükbaşı Y, Özsaran Z. Ege Üniversitesi'nde kanser kayıt analizleri: 34134 Olgunun değerlendirmesi. Türk Onkoloji Dergisi 2007;22(1):22-8.

86. Coughlin SS, Ekwueme DU. Breast cancer as a global health concern. Cancer Epidemiol 2009;33(5):315-8.

87. Leu SY, Wang SR. Clinical significance of arginase in colorectal cancer. Cancer 1992;70(4):733-736.

88. Süer Gökmen S, Yörük Y, Cakir E, Yorulmaz F, Gülen S. Arginase and ornithine, as markers in human non-small cell lung carcinoma. Cancer Biochem Biophys 1999;17(1-2):125-31.

89. Konarska L, Kolasa T, Albrecht P, Reguła A. Can arginase be a marker of the large bowel neoplasia. Acta Biochim Pol 1993;40(1):164-6.

90. Harris BE, Pretlow TP, Bradley EL Jr, Whitehurst GB, Pretlow TG 2nd. Arginase activity in prostatic tissue of patients with benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. Cancer Res 1983;43(6):3008-12.

91. de Boniface J, Mao Y, Schmidt-Mende J, Kiessling R, Poschke I. Expression patterns of the immunomodulatory enzyme arginase 1 in blood, lymph nodes and tumor tissue of early-stage breast cancer patients. Oncoimmunology 2012;1(8):1305-12.

92. Perez G, Olivares IM, Rodriguez MG, Ceballos GM, Garcia Sanchez JR. Arginase activity in patients with breast cancer: an analysis of plasma, tumors, and its relationship with the presence of the estrogen receptor. Onkologie 2012;35(10):570-4.

93. Mahmoud AA, El-Said SEM, Mandour MAM, Zakhary MM, Maximous DW. Arginase activity in breast cancer: is it a significant biomarker. Bull Pharm Assiut 2009;32(2):241-7.

94. Cui S, Reichner JS, Mateo RB, Albina JE. Activated murine macrophages ınduce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or –independent. Cancer Research 1994;54:2462-7.

95. Wu G, Morris SM Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. Biochem J 1998;336(Pt1):1-17.

96. Grody WW, Dizikes GJ, Cederbaum SD. Human arginase isozymes. Isozymes Curr Top Biol Med Res 1987;13:181-214.

97. Wang JF, Su RB, Wu N, Xu B, Lu XQ, liu Y, et al. Inhibitory effect of agmantine on proliferation of tumour cells by modulation of polyamine metabolism. Acta Phar. Sinica 2005;26:616-22.

98. Bachrach U, Wang YC, Tabib A. Polyamines: new cues in cellular signal transduction. News Physiol Sci 2001;16:106-9.

99. Gugliucci A. Polyamines as clinical laboratory tools. Clin Chim Acta 2004;344(1-2):23-35.

100. Russo F, Linsalata M, Giorgio I, Caruso ML, Armentano R, Di Leo A. Polyamine levels and ODC activity in intestinal-type and diffuse-type gastric carcinoma. Dig Dis Sci 1997;42(3):576-9.

101. Chun KS, Kim EH, Lee S, Hahm KB. Chemoprevention of gastrointestinal cancer: the reality and the dream. Gut Liver 2013;7(2):137-49.

102. Gamble LD, Hogarty MD, Liu X, Ziegler DS, Marshall G, Norris MD, et al. Polyamine pathway inhibition as a novel therapeutic approach to treating neuroblastoma. Front Oncol 2012;2:162.

103. Manni A, Washington S, Griffith JW, Verderame MF, Mauger D, Demers LM, et al.. Influence of polyamines on in vitro and in vivo features of aggressive and metastatic behavior by human breast cancer cells. Clin Exp Metastasis 2002;19(2):95-105.

104. 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.

# EKLER

# Ek 1

**T.C.**

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**

**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI**

**Oturum Sayısı: 09** **Karar Tarihi: 28.10.2011**

KARAR NO: **2011.09.05**

Yürütücülüğünü Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Hakan ERBAŞ'ın yaptığı uzmanlık öğrencisi Dr. Oğuz Bal'ın tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2011/71 protokol nolu "Deneysel olarak oluşturulmuş meme tümörlerinde rosuvastatin'in arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve poliamin düzeylerine etkisi" başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda: Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

| Ünvani/Adı/Soyadı | Araştırma ile İlişki | Toplantı Katılımı | İmza |
|---|---|---|---|
| Doç.Dr. Burhan AKSU<br>Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi | ☐ var<br>☐ yok | ☐ evet<br>☐ hayır | |
| Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA<br>Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi | ☐ var<br>☒ yok | ☐ evet<br>☐ hayır | |
| Vet.Hek. Ziya ÇUKUR<br>Veteriner Hekim | ☐ var<br>☐ yok | ☐ evet<br>☐ hayır | |
| Hüseyin KOÇ<br>Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivi Üye | ☐ var<br>☐ yok | ☐ evet<br>☐ hayır | |
| İlyas ÖZMEN<br>Sivil Üye | ☐ var<br>☐ yok | ☐ evet<br>☐ hayır | |
| Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN<br>Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi | ☐ var<br>☐ yok | ☐ evet<br>☐ hayır | |
| Doç.Dr. S. Arzu VARDAR<br>Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi | ☐ var<br>☒ yok | ☒ evet<br>☐ hayır | |
| Doç. Dr. Nilda TURGUT<br>Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi | ☐ var<br>☐ yok | ☐ evet<br>☐ hayır | |
| Yrd.Doç.Dr. Ruşen COŞAR-ALAŞ<br>Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi | ☐ var<br>☐ yok | ☐ evet<br>☐ hayır | |
| Yrd.Doç.Dr. Y. Atakan SEZER<br>Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi | ☐ var<br>☒ yok | ☒ evet<br>☐ hayır | |