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

Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Hakan ERBAŞ

DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULMUŞ MEME TÜMÖRLERİNDE CURCUMİN'İN ARGİNAZ ENZİM AKTİVİTESİ, ORNİTİN VE NİTRİK OKSİT DÜZEYLERİNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Ezgi KÜRKÇÜ

EDİRNE-2008

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

Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Hakan ERBAŞ

DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULMUŞ MEME TÜMÖRLERİNDE CURCUMİN'İN ARGİNAZ ENZİM AKTİVİTESİ, ORNİTİN VE NİTRİK OKSİT DÜZEYLERİNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Ezgi KÜRKÇÜ

TÜBAP

Tez No

EDİRNE-2008

TEŞEKKÜR

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tez çalışmamda ve eğitimimde büyük katkıları olan sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Hakan ERBAŞ'a, yüksek lisans eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen hocalarım Prof. Dr. Erol ÇAKIR, Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN, Doç. Dr. Sevgi ESKİOCAK'a, bu çalışmada benden yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Nurettin AYDOĞDU'ya, Yük. Lis. Öğr. Selda ŞENTÜRK'e ve Biyokimya ABD'deki tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

- **MEME KANSERİ** 3
- **MEME ANATOMİSİ** 6
- **ARGİNAZ ENZİMİ** 8
- **NİTRİK OKSİT** 16
- **CURCUMİN (TURMERIC)** 18
- **CURCUMİN VE KANSER** 20

GEREÇ VE YÖNTEMLER 22

- **GEREÇLER** 22
- **YÖNTEMLER** 24
- **İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME** 33

BULGULAR 34

TARTIŞMA 44

SONUÇLAR 48

ÖZET 50

SUMMARY 52

KAYNAKLAR 54

RESİMLER LİSTESİ 63

ÖZGEÇMİŞ 65

EKLER 66

SİMGE VE KISALTMALAR

AI	**:** Hepatik arginaz
AII	**:** Ekstrahepatik arginaz
ADP	**:** Adenozin difosfat
AMP	**:** Adenozin monofosfat
ATP	**:** Adenozin trifosfat
COX-2	**:** Siklooksijenaz–2
DNA	**:** Deoksiribonükleik asit
DMSO	**:** Dimetilsülfoksit
FAD	**:** Flavin adenin dinükleotid
FMN	**:** Flavin mono nükleotid
GST	**:** Glutatyon-s-transferaz
IL-1	**:** İnterlökin-1
NADPH	**:** Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgen)
NO	**:** Nitrik oksit
eNOS	**:** Endotelyal nitrik oksit
iNOS	**:** İndüklenebilir nitrik oksit
nNOS	**:** Nöronal nitrik oksit
NF-κB	**:** Nüklear faktör kappa B
NNDA	**:** N-Naphthylethylene diamin
OAT	**:** Ornitin amino transferaz
ODC	**:** Ornitin dekarboksilaz
RNA	**:** Ribonükleikasit
TNF	**:** Tümör nekrozis faktör

GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, dünyada kadınlar arasında en sık görülen malign tümör olup kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturan ve kansere bağlı ölümlerde %18 ile beşinci sırayı alan önemli bir sağlık problemidir (1-3).

Meme kanseri, en çok lobül ile terminal duktus birleşme yerindeki epitelden köken alan bir adenokanserdir. Son yıllardaki bilgilere göre meme kanseri (invaziv duktal kanser) gelişmeden önce duktus epiteli, atipik duktal hiperplazi, duktal karsinoma insitu gibi evrelerden geçer ve sonunda meme kanseri oluşur (4).

Kanserle savaşta etiyolojik faktörler, kanser öncesi lezyonlar, kanser prekürsörlerini bilmenin yanında, önemli bir başka faktör de teşhisinin erken, doğru ve kolay konabilmesidir (5). Metastazların erken dönemde belirlenmesi yapılacak tedavinin planlanması ve başarısı açısından aynı derecede önemlidir (6). Erken dönemde metastaz bulunan hastaların çoğunluğunun asemptomatik olması ve görüntüleme yöntemlerinin bu dönemde yalancı negatif sonuçlar verebilmesi, bazı biyokimyasal belirleyicilerin bu konudaki önemini gündeme getirmektedir (6,7). Çeşitli kanser hastalarında yapılan araştırmalar kanserin bu hastaların karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmalarında bir takım bozukluklara neden olduğunu göstermiştir (8).

Üre döngüsünün bir enzimi olan arginaz, L-argininin, üre ve ornitine hidrolizini katalizler. Karaciğer dışı arginazın, prolin, glutamik asit, poliamin sağlanmasında rol oynadığı ileri sürülmüştür. Poliaminler, kanser hücreleri gibi hızla bölünen ve çoğalan hücreler tarafından fazla miktarlarda sentezlenen organik katyonlardır. Arginaz aktivitesinin bazı kanser tiplerinde değiştiği gösterilmiştir (9).

Nitrik Oksit Sentaz (NOS) L-argininin, nitrik oksit (NO) ve L-sitrülline oksidasyonunun katalizinden sorumlu enzimdir (10). NO, normal fizyolojik koşullar ile birçok patofizyolojik durumda homeostazın sürdürülmesinde önemli bir etkendir (11). Bazal vasküler tonusun sağlanması, trombosit aktivasyonunun önlenmesi ve endotele lökosit adezyonunun sınırlandırılmasında önemli rol oynadığı bildirilmiştir (12). NO normal fizyolojik olayların sürdürülebilmesi için gerekli olmakla birlikte indüklenebilir NOS (iNOS) ile üretilen yüksek konsantrasyonlardaki NO ise hasarı artırır. Dolayısıyla, NO akut inflamatuar olaylarda hem koruyucu hem de hasarlayıcı bir molekül olarak etki gösterebilir (11).

Özellikle patolojik koşullarda iNOS'a bağlı NO'in aşırı üretimi; serbest radikal ve peroksinitrit oluşumuna, protein hasarına, lipid peroksidasyonunun artışına, DNA hasarına, hücresel enerji kaybına, mitokondrial elektron transport zinciri enzimlerine etki ederek mitokondrial respirasyonun durmasına, DNA replikasyonunun inhibisyonu ile hücre ölümüne neden olabilir (13). Ayrıca NO'in, kanser gelişiminde kimyasal koruyucu ajan ve kanser tedavisinde önemli bir role sahip olabileceği kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi ve anti-poliferatif özellik gösterdiği ifade edilmektedir (14).

Curcuma longa (Turmeric), köri tozuna sarı rengi veren zencefil ailesine ait otsu bir bitkidir. Turmeric'in en aktif bileşeni olan curcumin'in (15) anti-inflamatuar, antioksidan ve antikarsinojenik aktiviteleri gösterilmiştir (16).

Bu çalışmanda; antikarsinojenik özelliği ortaya konmuş olan curcumin'in, meme kanseri üzerindeki etkilerinin araştırılması planlanmıştır. İlk kez bu çalışma ile curcumin'in kanser ile ilişkili bulunan arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve NO düzeyleri üzerine olan etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

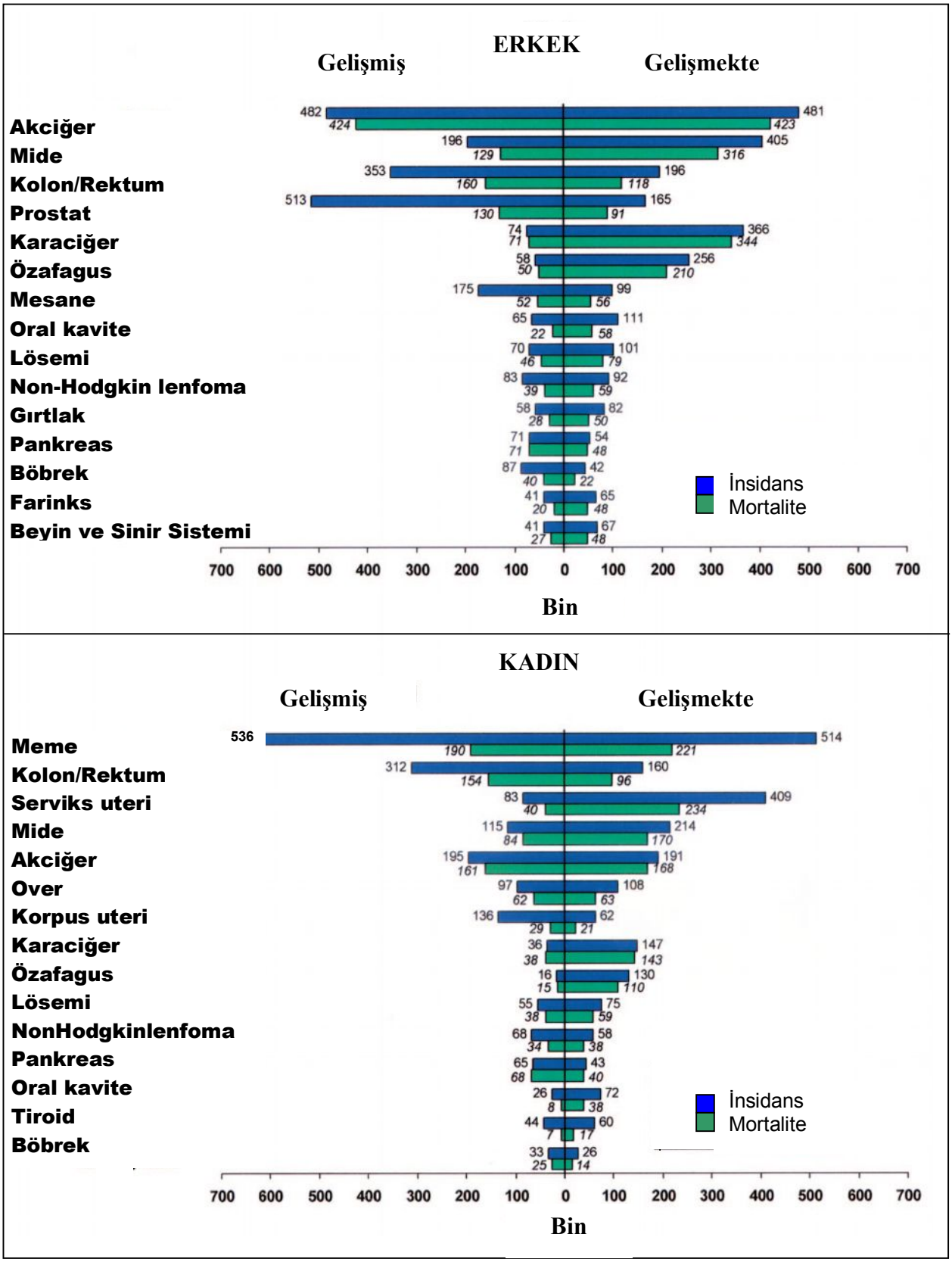
GENEL BİLGİLER

MEME KANSERİ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir. Batı toplumlarında yaklaşık her 8 kadından biri, hayatının bir döneminde bu hastalığa yakalanmaktadır. Dünyada meme kanseri görülme oranı giderek artmaktadır (3). Yaklaşık olarak yılda 10 milyon kanser tanısı konmakta ve her yıl 6 milyondan fazla kişi kanser hastalığından ölmektedir. Bugün dünya üzerinde 22 milyondan fazla kanser hastası bulunmaktadır (17).

2002 yılı verilerine dayanarak, cinsiyete göre dünyada gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki kanser görülme sıklığı ve ölüm oranlarına bakıldığında, erkeklerde en çok akciğer ve mide kanseri, kadınlarda ise meme ve kolorektal kanserlerin başta geldiği görülmektedir. Her iki cins için de kanser görülme sıklığı sırasıyla akciğer, meme ve kolorektal kanserleri şeklindedir (Şekil 1) (3,18). Meme kanseri sıklığı dünya üzerinde ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. Yıllık görülme sıklığındaki artış, düşük riskli toplumlarda yüksek riskli toplumlara göre daha belirgindir. Bu nedenle yıllar içinde batı ülkelerinde yaşayan kadınlarla, doğu ülkelerinde yaşayan kadınlar arasında meme kanserine yakalanma riski farkının kapanacağı beklenmektedir (2). Meme kanseri sıklığı yaşla da ilişkili bulunmuştur. 30 yaşından önce nadir olarak görülmekle birlikte, yaşı takip eden reprodüktif yıllarda hızlı bir tırmanış göstermektedir. Menapoz dönemindeki hafif bir azalmayı takiben, menapoz sonrası yıllarda yavaş eğimle sürekli devam eden bir artış ortaya çıkarken; 45-49 yaş ve 70-74 yaşları arasında ise en sık olarak ortaya çıkmaktadır (19).

Meme kanseri erkeklerde nadir görülür. Erkeklerde 2003 yılı itibariyle 1300 yeni vaka tanısı konmuştur. Erkeklerde görülen meme kanseri tüm meme kanserleri içerisinde %0.6



Şekil 1. Dünyada gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki kanser vakalarının 2002 yılı insidans ve mortalite değerleri (3).

oranında yer alırken erkeklerde görülen tüm malingniteler içerisinde ise %1'in altında bir yer almaktadır (20).

2006 yılı ABD istatistiklerine göre kadınlar arasında en yaygın üç kanser tipi %54 oranı ile meme, akciğer/bronş ve kolon/rektum kanserleridir. Tüm bu kanser vakaları arasında yalnızca meme kanserinin oranının %31 (212,920) olduğu düşünülmektedir (21). Türkiye sağlık istatistiklerine bakıldığında ise yıllara göre ölüm nedenleri arasında kanser ikinci sırada yer almaktadır (Tablo 1) (22).

Tablo 1. Türkiye de yıllara göre ölüm nedenleri (22).

	2000		**2003**	
Ölüm nedenleri	**Sayı**	**Yüzde**	**Sayı**	**Yüzde**
Dolaşım sistemi hastalıkları	78.666	45.1	89.077	48.3
Kanserler	23.681	13.6	23.775	12.9
İyi tanımlanmayan haller	17.025	9.8	17.815	9.7
Perinatal mortalite	7.336	4.2	6.433	3.5
Enfeksiyon hastalıkları	5.516	3.2	5.595	3.0
Kazalar	6.267	3.6	4.095	2.2
Konjenital anomaliler	3.496	2.0	2.673	1.5
Endokrin hastalıklar	3.757	2.2	2.389	1.3
Sindirim sistemi hastalıkları	2.877	1.7	2.163	1.2
İntihar ve benzeri durumlar	1.574	0.9	1.863	1.0
Solunum sistemi hastalıkları	2.754	1.6	1.642	0.9
Dış sebepler	464	0.3	544	0.3
Sinir sistemi hastalıkları	349	0.2	178	0.1
Hemopoetik sistem hastalıkları	161	0.1	108	0.1
Ürogenital sistem hastalıkları	78	0.0	62	0.0
Diğer	20.297	11.6	25.917	14.1
Toplam	**174.315**	**100.0**	**184.330**	**100.0**

Meme kanserinin ülkemizde kadın kanserleri arasında birinci sırada yer aldığı, kanser ölümleri arasında akciğer kanserinden sonra ölüm nedeni olarak ikinci sırada olduğu görülmektedir (2,23).

Tablo 2. Türkiye'de kadınlarda en sık görülen beş kanser türleri (2002) (23).

Organlar	**Olgu sayısı**	**Yüzde %**	**İnsidans (Yüz Binde)**
Meme	5284	25.49	15.45
Deri	1370	6.61	4.10
Mide	1127	5.44	3.30
Over	1073	5.18	3.17
Kalın Barsak	949	4.58	2.77
Diğer	10930	52.72	31.96
Toplam	**20733**	**100.00**	**60.62**

Tablo 3. Türkiye'de kadınlarda en sık görülen on kanser türleri (2003) (23).

Organlar	Olgu sayısı	Yüzde %	İnsidans (Yüz Binde)
Meme	5634	26.58	16.25
Deri	1697	8.01	4.90
Mide	1173	5.53	3.38
Over	1137	5.36	3.28
Kalın Barsak	1007	4.75	2.90
Akciğer	926	4.37	2.67
Endometriyum	813	3.84	2.35
Troid	797	3.76	2.30
Serviks	763	3.60	2.20
Kemik İliği	743	3.51	2.14
Diğer	6508	30.70	18.77
Toplam	**21198**	**100.00**	**61.25**

Türkiye'de Sağlık Bakanlığı verilerine göre 2002 yılında kadınlarda görülen meme kanseri insidansı; yüz binde 15.45 iken 2003 yılında yüz binde 16.25'e (Tablo 2 ve 3) yükselmiştir. Bu oran meme kanserinin kadınlarda en sık görülen tüm kanser türleri içinde %25.49'dan %26.58'e yükseldiğini göstermektedir.

MEME ANATOMİSİ

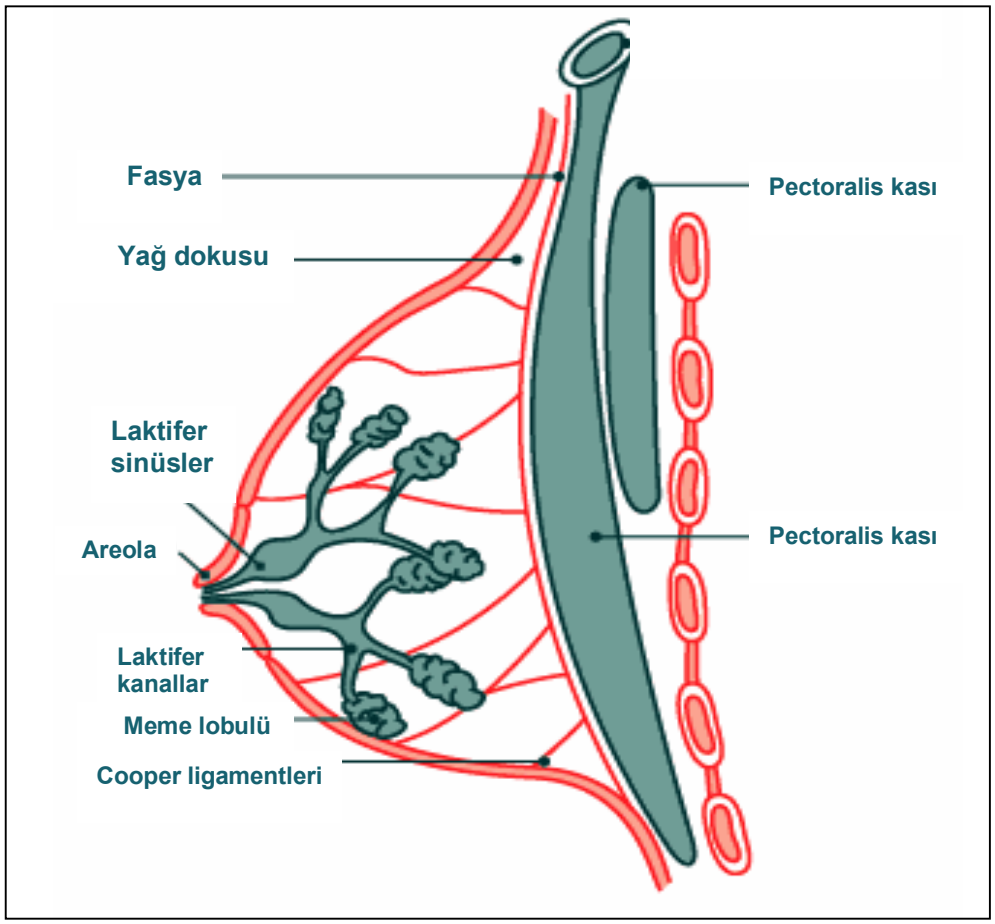
Memeler toraksın üzerinde ve sternumun iki yanında 2. ve 6. kostalar arasında yer alır. Her bir meme tabanı pektoralis major ve pektoralis minör kasları üzerine oturur. Meme bezinin önün de yüzeyel fasya, arkasında derin fasya bulunur. Meme derisinden derin fasyaya doğru uzanan ligamentlere "cooper ligamentleri" denir. Bu ligamentler memeyi yerine tespit ederler. Kanserin gerek yayılma gerekse ilk belirtilerini ortaya koymada önem taşırlar. Meme lobüller (süt bezleri) ve ductuslar (süt kanalları) olmak üzere iki kısımdan oluşur. Lobüller ve ductuslar arası boşluğu destek ve yağ dokusu doldurmaktadır (24).

Meme malign tümörlerinin önemli bölümü adenokarsinomlardır ve günümüzde bunların memenin terminal duktal lobuler ünitesinden köken aldığı kabul edilmektedir. Skuamöz hücreli karsinom, phyllodes tümör, sarkom ve lenfoma gibi adenokarsinom dışı diğer malign tümörler ise %5'den az bir grubu oluşturmaktadır. Histolojik olarak meme karsinomları in situ ve invaziv karsinomlar olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır.

Meme kanserinin histolojik sınıflaması (WHO sınıflaması):

1. Insitu karsinom

- Insitu duktal karsinom
- Insitu lobuler karsinom



Şekil 2. Meme anatomisi (25).

2. İnvaziv karsinom

- İnvaziv duktal karsinom
- İnvaziv lobuler karsinom
- Tubuler karsinom
- İnvaziv kribriform karsinom
- Medüller karsinom
- Müsinöz karsinom
- İnvaziv papiller karsinom
- İnvaziv mikropapiller karsinom
- Apokrin karsinom
- Sekretuar (juvenil) karsinom
- Adenoid kistik karsinom
- Metaplastik karsinom
- Nöroendokrin karsinom
- İnflamatuar karsinom olarak sınıflandırılmıştır (26).

Memenin Kan Dolaşımı

Arteryal dolaşım

Memenin arteryal beslenmesini sağlayan internal torasik arterin perforan dalları, posterior interkostal arterlerin lateral dalları, aksiler arterin dalları olmak üzere üç ana arter bulunmaktadır.

Venöz dolaşım

Memenin venöz drenajı, meme kanserinin metastazı açısından önemlidir. Venöz damarlar, arterlere ve lenfatik damarlara eşlik ederler.

Memenin lenfatik drenajı

Memenin lenfatik drenaj sisteminin izlediği primer yol aksiller lenf ganglionlarından geçer. Tüm memenin lenfatik akımının %3-25'inin internal mammaryan, %75-97'sinin aksiler lenf ganglionlarına drene olduğu gösterilmiştir (2). Meme kanserlerinde aksiller lenf nodlarının değerlendirilmesi çok önemlidir.

Tümörlü hastada aksillasında tutulum yoksa 10 yıllık sağ kalım %75-80'dir. Meme kanserleri %5 ten az bir oranda sadece aksiller metastazlar ile bulgu verebilir (27). Meme dokusunun ana kitlesi genellikle üst yarıda ve daha çok dış kadranda yerleşmiştir. Bu nedenle Lee ve arkadaşlarıda maling lezyonların üst dış kadranda daha sık olarak görülmesini, üst dış kadranda daha fazla meme dokusu bulunmasıyla açıklamışlardır (28).

Risk Faktörleri

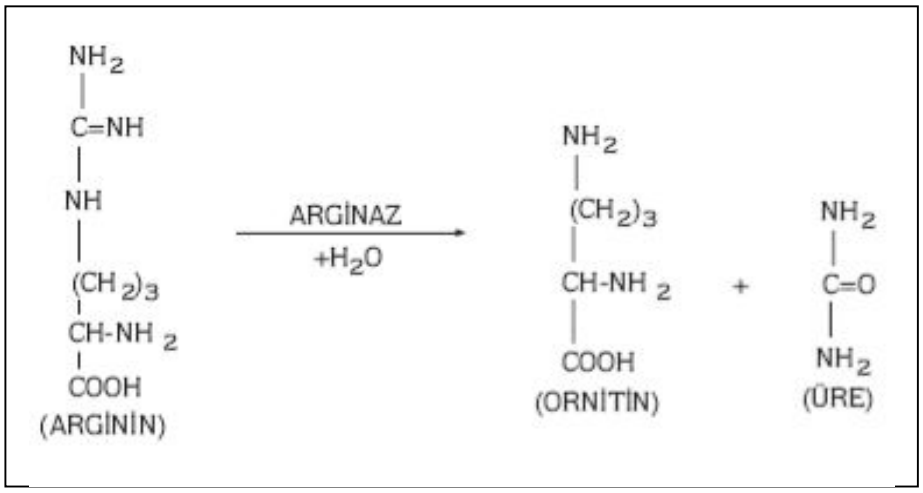
İnsanlarda meme kanserinin sebebi bilinmemektedir. Genetik, çevresel, hormonal, sosyobiyolojik ve psikolojik etkenlerin oluşumunda rol aldığı kabul edilmekle birlikte, meme kanserli kadınların %70- 80'i bu risk faktörlerine sahip değildir. Kromozomal mutasyonların insanda kanser ortaya çıkış ve gelişimi ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (Tablo 4) (29).

ARGİNAZ ENZİMİ

Arginaz, (L-arjinin amidinohidrolaz; E.C.3.5.3.1) nitrojen metabolizmasından sorumlu anahtar enzim (10) olarak L- Argininin, üre ve ornitine hidrolize olmasını katalizler (Şekil 3) (9). Arginaz enziminin AI ve AII olmak üzere iki izoformu vardır. AI (hepatik arginaz) sitosolik bir enzimdir ve karaciğerde yer alır. AII (ekstrahepatik arginaz) ise mitokondrial matrikste lokalize olmuştur. AI esas olarak üre sentezi ve amonyağın detoksifikasyonuyla ilgili iken, AII'nin ornitin, prolin, glutamat sentezi gibi biyosentetik fonksiyonlarla ilgili olduğu düşünülmektedir (35).

Tablo 4. Meme kanseri oluşumunda önemli risk faktörleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (1,2, 30-33).

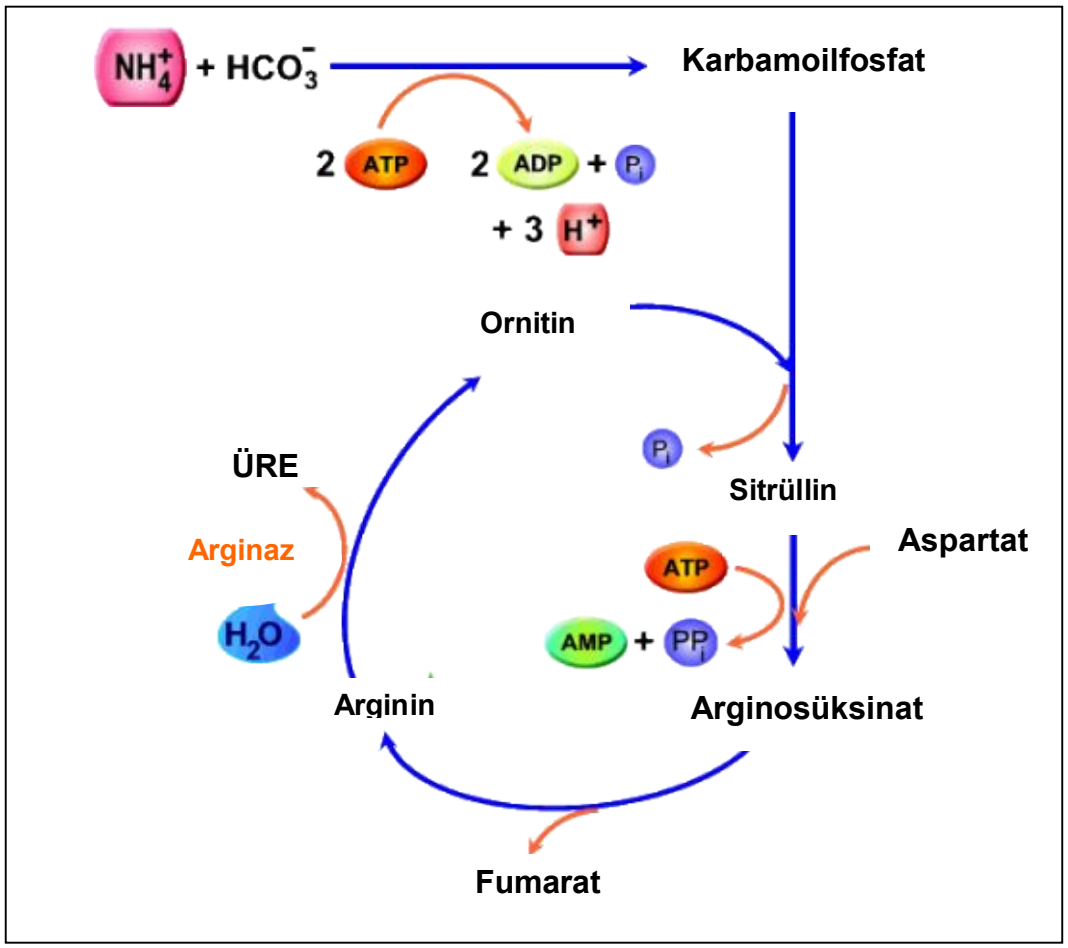
Faktör	Risk	Açıklama
Yaş	Artırır	Meme kanseri genellikle postmenapoz dönemde görülmektedir. Yaş arttıkça risk artmaktadır, bundan dolayı yaş en önemli risk faktörüdür.
Aile hikayesi a)Birinci derece akrabalarda meme kanseri b) BRCA1 ve BRCA2 geni mutasyonları	Artırır	a)Anne, kız kardeş ve kızında meme kanseri olanlarda risk 2 kat artmaktadır. b) Her iki gende herediter meme kanserlerinin %60'ından, tüm meme kanserlerinin ise %5 ila 10'undan sorumludur.
Endojen hormonal faktörler a) Menarş yaşı b) Menapoz yaşı c) Doğum ve ilk doğum yaşı	Artırır	a) Erken yaşta (11 yaşından önce) menarş, b) Geç menapoz (54 yaşından sonra) meme kanseri riskini arttırır. c) İlk doğum yaşı 35'ten sonra olanlar ve hiç çocuk sahibi olmayanlar yüksek risk grubunda yer almaktadır.
Ekzojen hormonal faktörler a) Oral kontraseptifler b) Östrojen replasman tedavisi	Tartışmalı	a) Uzun süreli ve erken yaşta oral kontraseptif kullanımı riski arttırmaktadır. b) Östrojen replasman tedavisi 5 yıl ve üzerinde kullanımda postmenopozal kadında meme kanseri riskini arttırır fakat meme kanserinin gelişimini uyarmakta, ama yoktan bir kanser oluşumuna sebebiyet vermemektedir.
Obezite	Tartışmalı	Postmenapozal kadınlarda riski 2 katı arttırmaktadır, buna karşın premenapozal kadınlarda insidans obezlerde düşük, zayıflarda fazladır.
Diyet	Artırır	Yüksek yağlı diyet meme kanseri riskini arttırır.
Alkol	Artırır	Günde ortalama 1 tane alkollü içki tüketen bayanlarda meme kanseri riski %7 oranında artmaktadır.
Benign meme hastalığı	Artırır	Proliferatif epitalyal değişikliği mevcut kadınlarda 2 kat, atipik hiperplazi mevcut olanlarda 4 kat meme kanseri riski vardır
Geçirilmiş meme kanseri	Artırır	Meme kanseri oluşan bir kadında hayatı boyunca ikinci meme kanseri olma riski %25-30 civarıdır.
Çevresel faktörler a) Elektromanyetik alanlar b) İyonizan radyasyon	Artırır	a) Mesleki olarak maruz kalma riski arttırır. b) Nükleer savaş veya tanı ve tedavi nedeniyle radyasyona maruz kalma riski arttırır.
Sosyo-ekonomik grup	Artırır	Yüksek sosyo-ekonomik gruba sahip gruplardaki kadınlarda risk yüksektir.



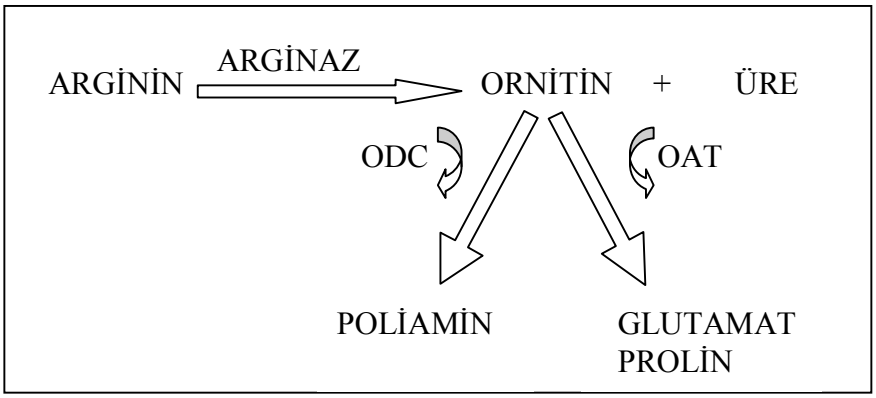
Şekil 3. Argininden ornitin ve üre oluşumu (34).

Karaciğer, arginaz aktivitesinin en yüksek olduğu dokudur. Ekstra hepatik dokulardaki aktivitesi, karaciğerden belirgin olarak daha düşüktür. Bu dokuların başında eritrositler, lökositler, trombositler, plazma, böbrek, iskelet ve kalp kası, beyin, bağırsak, pankreas, akciğer, epidermis, plasenta laktasyondaki meme bezi, tükürük bezleri, testisler gelmektedir (36). Eritrosit arginaz aktivitesi, serum arginaz aktivitelerinin yaklaşık 200 katıdır. Tükrük arginaz aktivitesi ise eritrosit aktivitesinin 1/6'sı kadardır (37). Arginaz enzimi güçlü bir immün inhibitördür ve kanser hücrelerinin sitoplazması içerisinde normal hücrelere göre çok daha büyük miktarda bulunmaktadır (38).

Arginazın tetiklediği tepkimenin üre ve ornitin olmak üzere iki ürünü vardır (39). Üre insanlarda protein metabolizmasının son ürünü olup, vücuttan atılan azotun %75'ten fazlasından sorumludur. Amino grubu azotundan elde edilen amonyaktan oluşan üre biyosentezi, üre döngüsünün hepatik enzimleri tarafından yürütülür. İnsan ve hayvan çalışmaları, artmış amonyak düzeylerinin santral sinir sistemi üzerinde toksik etkileri olduğunu göstermiştir. Amonyağın toksik etkisi, karaciğerde Krebs-Henseliet üre döngüsü ile ortadan kaldırılır (Şekil 4). Ürenin %90'dan fazlası böbreklerden ekskrete olur, geri kalan ise gastrointestinal traktüs ve ciltten atılıma uğrar (40). Ornitin, ornitin dekarboksilaz (ODC) tarafından poliaminleri oluşturmak (42) ve ornitin aminotransferaz (OAT) enzimince glutamat ve proline dönüştürülmek üzere kullanılır (Şekil 5) (43). Ornitinden OAT tarafından oluşturulan prolin, kollajen ve kazein gibi bazı önemli proteinlerin yapısına katılırken, glutamat ise amonyum iyonu transportu, enerji metabolizması, amino asitlerin birbirine çevrilmesinde anahtar bir ara metabolit olarak kullanılmaktadır (44) .



Şekil 4. Üre döngüsü (41).



Şekil 5. Ornitinden poliamin, prolin ve glutamat sentezi.

Arginaz Enziminin Kinetik Özellikleri

Bir metalloenzim olan arginazın, tam aktivite gösterebilmesi, alt birimlerine ayrılmaması ve kuaterner yapısının şekillenmesi için her alt birimin bir mol mangan iyonu (Mn^{+2}) içermesi gerekmektedir (45). Arginaz enzimi dimerik yapıdadır (34) ve deneysel

kanıtların büyük bir kısmı, 1 mol arginaz enzimine 4 mol Mn^{+2} bağlanarak tetramer yapı kazandığını göstermektedir. 1 mol arginaz 2 mol Mn^{+2} içerdiğinde katalitik aktivite %50 olmaktadır (46). Arginaz enzimi tam bir aktivite gösterebilmek için kofaktör olarak Mn^{+2} iyonlarına ihtiyaç duymaktadır. Bu da enzimin tetramerik yapıya sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Mn^{+2} katyonları, arginaz enzimine bağlanarak enzimi dayanıklı hale getirmektedir (34). Arginaz çok stabil bir enzimdir ve uzun süreler boyunca bile düşük sıcaklıkta saklandığı zaman aktivitesi kaybolmamaktadır (49).

Mn^{+2} iyonları ile aktivasyonun karaciğer arginaz aktivitesinde 4-5 kat, eritrosit aktivitesinde 2-6 kat artışa neden olduğunu bildirilmiştir (50). Fe^{+2}, Co^{+2}, Ni^{+2} gibi farklı metal iyonlarının da farklı dokularda arginaz enzimini aktive ettiği veya stabilitesini sağladığı gösterilmiştir (51). Hg^{+2}, Ag^{+2} gibi ağır metal iyonları ise enzimin aktivitesini azaltmaktadır (47)**.** Arginazın optimum pH'ı alkalidir ve enzim maksimum hızı pH 9.0-9.5 arasında göstermektedir (52). Enzim aktivitesi pH 7.4'te %10-30 oranında azalmakta, pH 7'nin altında ise enzimin aktivitesi kaybolmaktadır (53).

Lizin, ornitin ve dallanmış zincirli amino asitlerle arginaz aktivitesinin inhibisyonu birçok doku ve türde geniş olarak kaydedilmiştir (54). Kaysen ve Strecker (51) argininin yüksek konsantrasyonlarıyla enzimin aktivasyonunun, belirli amino asitlerin spesifik konsantrasyonları ile engellendiğini göstermişlerdir. Çünkü bazı amino asitlerin modifikatör olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Arginaz enzimi katalizörlüğünde meydana gelen reaksiyonun ürünlerinden ornitin, arginazı inhibe ederken, ürenin böyle bir etkisi bulunmamaktadır. Ornitin dışında; lösin, izolösin, lizin, prolin, sistein, valin, tirozin gibi L-amino asitlerin de arginaz üzerine inhibitör etkisi vardır. Ornitin ve lizin yarışmalı; valin, izolösin, lösin ve sistein ise yarışmasız inhibisyona neden olur (55).

Arginaz enzimi hormonal etkiye bağlı olarak değişim göstermektedir. Östrojen, kortikosteroidler, glukagon ve tiroid hormonunun arginaz ve diğer üre döngüsü enzimlerini indükledikleri bildirilmiştir (56).

Arginaz Enziminin Klinik Önemi ve Kanserle Olan İlişkisi

Arginaz üre siklusunun son basamağını katalizler ve bu nedenle de esas olarak karaciğerde bulunur (57). Arginaz ekspresyonu esas olarak kritik hastalıklar sırasında inflamatuar süreçte ve hücrelerde immün cevap regülasyonunda meydana gelir. Arginaz ayrıca nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesini de indüklemektedir (58) ve NOS ile beraber yara iyileşmesi, immün cevap, tümör biyolojisi ve yangının düzenlenmesinde rol oynamaktadır

(59). Serum arginaz aktivitesi sağlıklı kişilerde düşüktür (49). Arginaz aktivitesinin psoriasis gibi bazı cilt hastalıklarında, hiperkeratinizasyonda, gebelikte ve laktasyonda arttığı bildirilmiştir (60). Ayrıca karaciğerin maling ve bening hastalıklarında, akut hepatitte, memenin bening hastalıklarında serum arginaz aktivitesi artmaktadır (61). Hepatobilier kanaldaki maling tümörlü hastalarda serum arginaz aktivitesinin artması, arginazdan zengin karaciğer hücrelerinden enzim salındığını göstermektedir. Bu durum akut hepatitte de serum arginaz aktivitesinin yükselmesine yol açmaktadır (62). Plazma ve eritrosit arginaz aktivitesinin hematolojik hastalığı olan çocuklarda yüksek olduğu, plazma ve eritrosit arginaz aktivitesi ölçümünün hemolitik işleyişin ortaya konmasında ve tanıda iyi bir belirteç olabileceği gösterilmiştir (63). Başka bir çalışmada, plazma arginaz aktivitesinin orak hücre anemisi hastalıklarında önemli ölçüde artış gösterdiği bulunmuştur (64).

Arginazın kanserle olan yakın ilişkisi, birçok araştırmacı tarafından çeşitli şekillerde ortaya konmuştur. Meme kanserinde preoperatif dönemde serum arginaz düzeyinin sağlıklı kadınlardan 4 kat yüksek olduğu bulunmuştur (61). Primer kolorektal kanserli ve karaciğere metastazı olan hastalarla yapılan bir çalışmada, sağlıklılara göre serum arginaz aktivitesinin yüksek olduğu ve ayrıca primer kolorektal karsinomlu hastaların tanısında bu enzimin faydalı bir belirteç olabileceği gösterilmiştir (57). Peptik ülser ve gastrik kanserli hastalarda serum arginaz aktivite düzeyi incelenmiş ve serum arginaz aktivite düzeyinin gastrik kanserli hastalarda peptik ülserli hastalardan ve sağlıklı kişilerden önemli oranda yüksek olduğu saptanmıştır. Aynı araştırmacılar gastrik kanserin evresi ile serum arginaz aktivite düzeyi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Erken evre gastrik kanserli hastalarda, ortalama serum arginaz aktivite düzeylerini kontrol grubundan önemli derecede yüksek bulmuşlar ve arginaz enzim aktivitesinin ileri evre gastrik kanserde erken evre gastrik kanser ve kontrol grubundan daha yüksek düzeyde olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar, serum arginaz aktivitesindeki artışın kanserin boyutu ile ilgili olduğunu düşünmektedirler (65). Benzer şekilde gastrik kanserli hastaların dokularında arginaz aktivitesinin normal gastrik mukozal dokulara oranla önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur (66). Başka bir çalışmada da, küçük hücreli veya küçük hücreli dışı akciğer kanserinde ornitin ve arginaz enzim aktivite düzeyleri yüksek bulunmuş ve arginaz enziminin kanserde bir belirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (60,67).

Sonuç olarak; yapılan birçok çalışmadan da anlaşılacağı üzere çeşitli kanser türlerinde serum ve doku arginaz enzim düzeyleri incelenmiş, arginaz enzim aktivitesi kanserle ilişkili bulunmuştur. Hatta bazı araştırıcılar kanserli hastaları belirlemede arginaz enzim aktivitesinin önemli bir belirteç olarak kullanılabileceğini vurgulamışlardır (57,60,61,65,66,67).

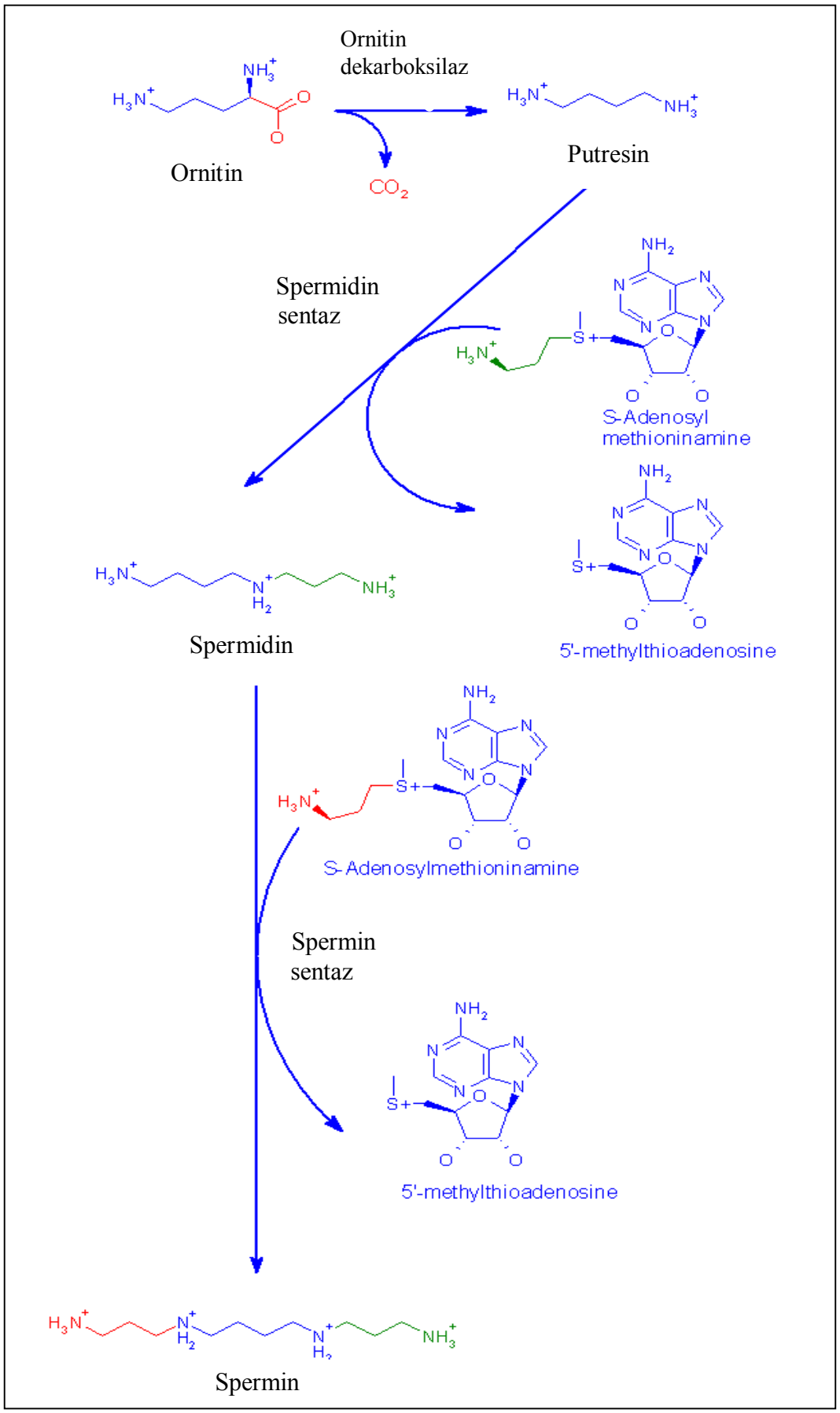
Poliaminler

Hücrelerin büyüme ve gelişmesi için önemli biyomoleküller olan poliaminler (putresin, spermin ve spermidin) tüm memeli hücrelerinde bulunurlar (68). Putresin, spermidin ve spermin hücre büyümesi için gerekli olan, transkripsiyon, translasyon ve protein sentezinin başlamasını kolaylaştıran alifatik poliaminlerdir (60). Hücre poliferasyonu ile yakından ilişkilidirler. Bakteri ve memeli hücre kültürleri için büyüme faktörleri olup hücre bütünlüğünün, hücre içi organel ve membranlarının stabilizasyonundan sorumludurlar. Çok sayıda pozitif yük taşımaları nedeniyle, polianyonik özellikte olan DNA ve RNA'larla kolayca birleşerek, DNA ve RNA'nın biyosentezinin uyarılması, DNA stabilizasyonu ve bakteriofajlarda DNA paketlenmesi gibi temel olaylarda görev alırlar (47).

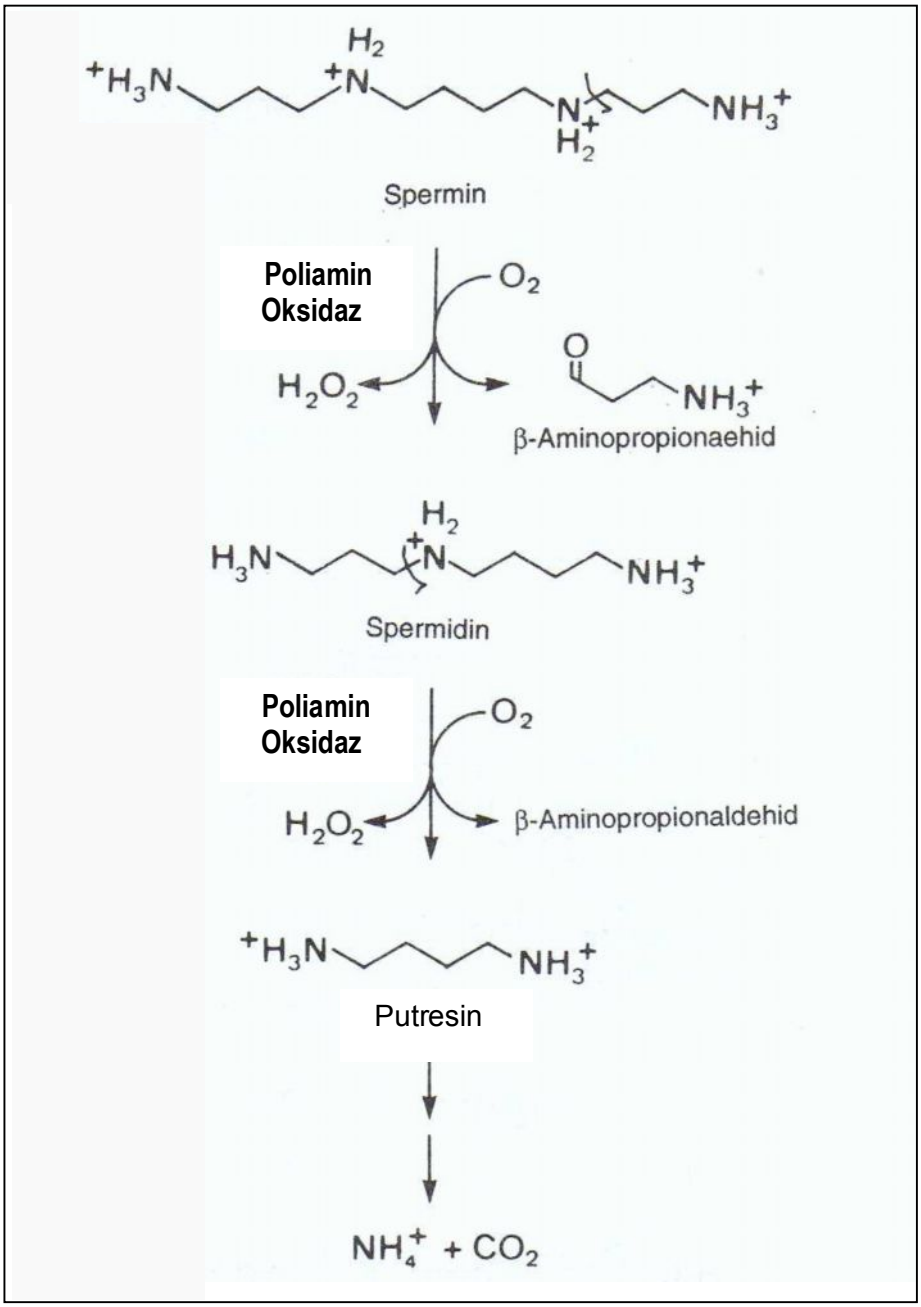
Poliamin biyosentezindeki ilk reaksiyon, ornitin dekarboksilaz (ODC) tarafından kataliz olunur. Ornitinden ODC aracılığı ile bir molekül CO_2 çıkması ile putressin oluşur. Putresssin; spermidin sentaz ile spermidine, spermidin de spermin sentaz tarafından spermine dönüştürülür ki bu esnada her iki reaksiyonda da dekarboksillenmiş S-adenosilmetyoninamin, 5'metiltiyoadenosine çevrilir (Şekil 6) (47).

Arjinaz aktivitesinin yükselmesinin poliamin biyosentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan ODC aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (69). ODC, poliaminler tarafından pozitif ve negatif feedbackle regüle edilir. Yüksek poliamin konsantrasyonların da ODC aktivitesi azalırken, düşük poliamin konsantrasyonların da ise ODC aktivitesi artmaktadır (70). Hücre poliferasyonunun arttığı fizyolojik ve patolojik durumlarda poliamin düzeylerinin de arttığı gösterilmiştir. Poliamin düzeylerinin, artmış kanser hücreleri poliferasyonunda, inflamatuar durumlarda, infeksiyon ve travma durumlarında, otoimmün hastalıklarda yükseldiği gösterilmiştir (71). Ayrıca, poliamin üretiminin hücre hasarı tamir fazının şiddeti ile paralel olduğu bildirilmiştir (72). Poliaminlerin hücre poliferasyonunu sağladığı ve ornitin düzeylerini arttırabildiği bundan dolayı da artan arginaz aktivitesinin kanser gelişimine neden olabileceği gösterilmiştir (9).

Poliaminler esas olarak kırmızı kan hücrelerinde (RBCs) taşınmaktadır (73). Hücre içi poliamin metabolizmasının ve dolaşımdaki poliamin miktarının maling olaylarda arttığı, özellikle de eritrosit poliamin miktarının klinikte hücre proliferasyonunun bir indeksi olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (74). Poliaminler, karaciğer peroksizomlarında bulunan poliamin oksidaz enzimi ile önce sperminin spermidine ve ardından spermidinin de putressine okside olması ile katabolize olurlar (Şekil 7) (47).



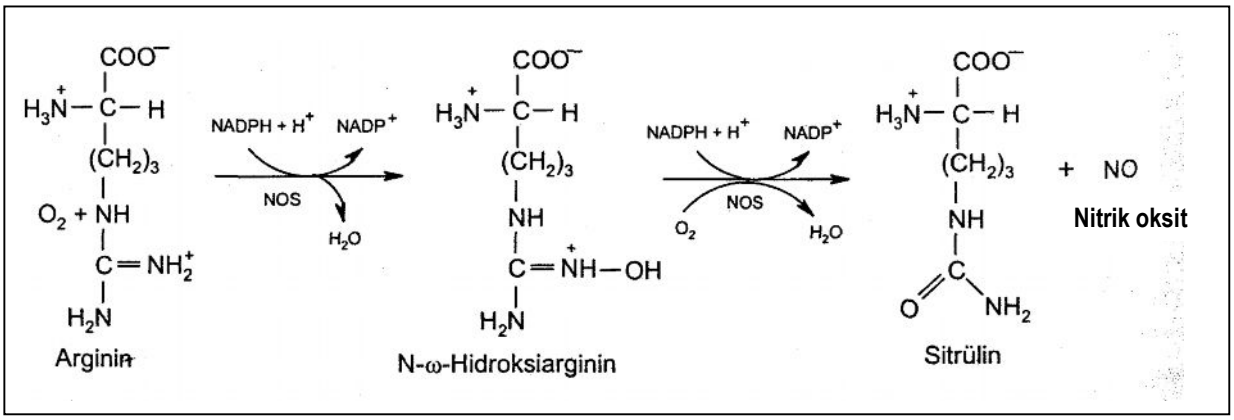
Şekil 6. Poliamin sentezi (48).



Şekil 7. Poliamin katabolizması (47).

NİTRİK OKSİT

Vazodilatör etkili nitrik oksit (NO), yarılanma ömrü çok kısa olan ve tüm memelilerde var olan biyolojik bir amin, önemli bir haberci moleküldür. Arginin, bir monooksijenaz olan NOS ile sitrüllin ve NO'ya katabolize olur (Şekil 8). NOS kompleks bir enzimdir. Aktivitesi için NADPH, FAD, FMN, hem ve tetrahidrobiopteridine gereksinim duyar (12,75). NOS enzimi bağışıklık yanıtı ile sinir ve kalp-damar sistemleri başta olmak üzere damar endotel ve böbrek epitel hücreleri, miyositler, hepatositler, makrofajlar ve nöronlar gibi birçok hücre tipinde bulunmaktadır (75).



Şekil 8. Argininden NO ve sitrüllin oluşumu (76).

NO, Molekül ağırlığı 30 g/mol olup, −151 ºC kaynama noktasına sahip, hem yağda hem suda çözünebilme yeteneği sayesinde biyolojik membranlardan çok rahat geçen ve bu sayede çok önemli biyolojik roller üstlenen, çözünür guanilat siklaza bağlanarak onun aktivitesini 400 kat arttırabilen, 3−5 sn kadar kısa yarılanma ömrüne sahip gaz tabiatında bir maddedir. Basit kimyasal yapısına rağmen oldukça farklı ve zıt yönde etkileri mevcuttur (76). Üç tip nitrik oksit sentaz isoformu mevcuttur:

1) nNOS: Sinir ve bazı dokularda (akciğer, pankreas, mide ve uterus) bulunan nöronal tip ki bu kalsiyuma bağımlıdır.

2) eNOS: Endotel hücrelerde bulunan ve yine kalsiyuma bağımlı olan endotelyal tip.

3) iNOS: İmmünolojik uyaranlarla indüklenen ve kardiyomiyositler, hepatositler, nöronlar, mikroglial hücreler, nötrofiller, vasküler endotel ve düz kas hücrelerinde bulunan, kalsiyumdan bağımsız indüklenebilir tip. nNOS ve eNOS fizyolojik olayların meydana gelmesinde, hücreler arası ve hücre içi haberleşmede rol oynamaktadır. Dejenerasyon ve inflamasyon sırasında her iki izoformda upregule olabilmektedir. iNOS ise immünolojik savaşta ve nöronal hasar sonrasında etkili olmaktadır. Özellikle travma ve viral enfeksiyon sonrasında ekspresyonu artmaktadır. Normal fizyolojik koşullarda NO konsantrasyonları 100-500 nM düzeylerinde iken endotoksin, γ-interferon, IL-1, TNF-α gibi ajanlarla iNOS'un tetiklenmesi sonucunda düzeyleri yaklaşık 10 kat artmaktadır (11,13,77).

Günümüzde nitrik oksitin vasküler endotelden sürekli olarak salındığı, böylece vasküler tonusun regülasyonunda önemli rolü olduğu kabul edilmektedir. Ayrıca hem birçok fizyolojik fonksiyonun gerçekleşmesi için gerekli olduğu ve antioksidan savunmaya katkıda bulunduğu, hem de aşırı üretim durumunda radikal etki gösterdiği vurgulanmaktadır (78).

NO'in serbest radikal olarak aktivitesi çok yüksektir. Bu nedenle makrofajlarda oksijen ve süperoksit radikali (O_2^-) ile etkileşerek mikroorganizmalar için zehirli olan

hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) oluşturur. NO, hemoglobin ve hem içeren diğer proteinler tarafından inhibe edilir. Ayrıca, NOS'ın kimyasal inhibitörleri NO oluşumunu önemli derece azaltır ve bu yolla vazokonstriksiyona bağlı olarak kan basıncı artar. Ayrıca kardiovasküler sistem üzerine de NO'in vasodilate edici etkisi vardır. Guanilat siklaz enzimini aktive ederek cGMP oluşumuna yol açtığı, trombosit agregasyonunu inhibe ettiği ve damar genişlemesini sağladığı öne sürülmüştür (75).

NO birçok fizyolojik süreçte vasküler sistemin regülasyonunda, nörotransmisyonda ve çeşitli homeostatik olaylarda önemli rol oynamaktadır. Diyabet, şok, infarksiyon, nörodejenerasyon, artrit, kronik inflamasyon gibi birçok patolojik durumda NO sentezinin üretimi uyarılmaktadır (79). Birçok fizyolojik süreçte etkin olan NO ve nitrit, nitrat, S-nitrosothiol, nitrosamin, peroksinitrit gibi NO metabolitleri, mitokondrial respirasyon inhibisyonu, gen mutasyonuyla sonuçlanan protein ve DNA hasarı, protein fonksiyon bozuklukları, nekrosis ve apoptosis gibi NO'in birçok sitotoksik ve genotoksik etkisine aracılık etmekte önemli role sahiptirler. Ayrıca, NO ve NO metabolitlerinin tümör dokusunun metastazında ve hücre gelişiminde inhibe edici etkisi olduğu gösterilmiştir (80).

CURCUMİN (TURMERIC)

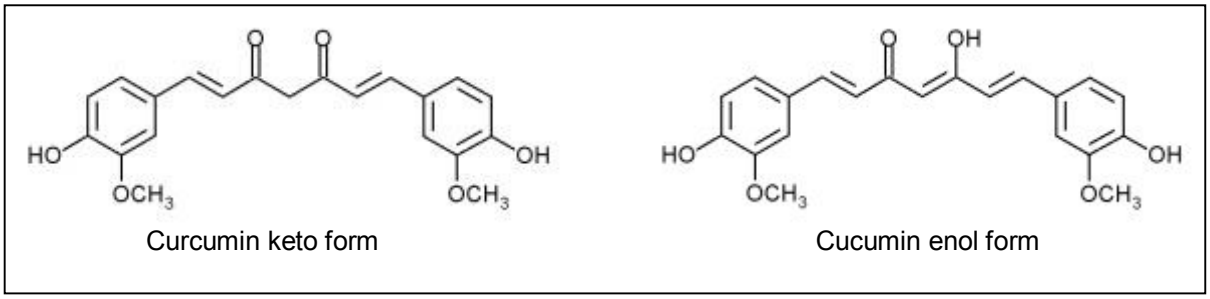
Turmeric (*Curcuma longa*), zencefil ailesine ait çok yıllık otsu bir bitkidir ve yaygın olarak güney ve güneydoğu tropikal Asya'da yetiştirilmektedir. Turmeric'in aktif bileşeni olan curcumin, baharatın %2 ila %5'ini oluşturmaktadır. Curcuminden dolayı sarı renk karakterindeki Turmeric, ilk kez 1842 yılında Vogel tarafından izole edilmiştir. Curcumin neredeyse su içerisinde hiç çözünmeyen turuncu-sarı kristal gibi bir tozdur. Curcumin'in yapısının diferuloylmethan olduğunu 1910 yılında Lampe ve Milobedeska ortaya koymuşlardır (81).

Curcuma longa bitkisinin rizomlarından isole edilen curcumin [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione] genellikle gıda ürünlerinde renklendirici ve tatlandırıcı baharat olarak kullanılmaktadır (82,83).

Curcumin'in Kimyasal Özellikleri

Curcumin polifenolik bir bileşiktir ve bis-α, β-unsature β-diketondur. Keto ve enol formu bulunmaktadır (Şekil 9). Keto formu asidiktir ve nötral sıvı solusyonlarda ve hücre membranlarında bulunmaktadır. pH 3-7 aralığında curcumin güçlü bir H atom donörüdür. Buna karşın pH 8'in üzerinde enol form hakimdir ve curcumin bir elektron donörü gibi

hareket etmektedir ki bu fenolik antioksidanların çöpçü aktivitesi için tipik bir mekanizmadır. Curcumin bazik pH'a karşı dayanıksızdır ve 30 dakika içerisinde *trans*-6-(4′-hidroksi-3′metoksifenil)-2-4-diokso-5-hekzanal, ferulik asit, feruloilmetan ve vanilline indirgenir. pH 7'nin üzerinde rengi sarıdan kırmızıya doğru döner. Moleküler ağırlığı 368.37 g/mol ve erime noktasıda 183 ˚C'dır. Curcumin suda çözünmeyen fakat aseton, DMSO ve etanolde çözünebilen bir moleküldür (84).



Şekil 9. Curcumin'in keto ve enol formu (85).

Doğal *Curcuma longa* bitkisinde 3 önemli curcuminoid bulunmaktadır. Bunlar curcumin, demetoksicurcumin ve bisdemetoksicurcumindir (86).

Curcumin'in Farmakokinetik Özellikleri

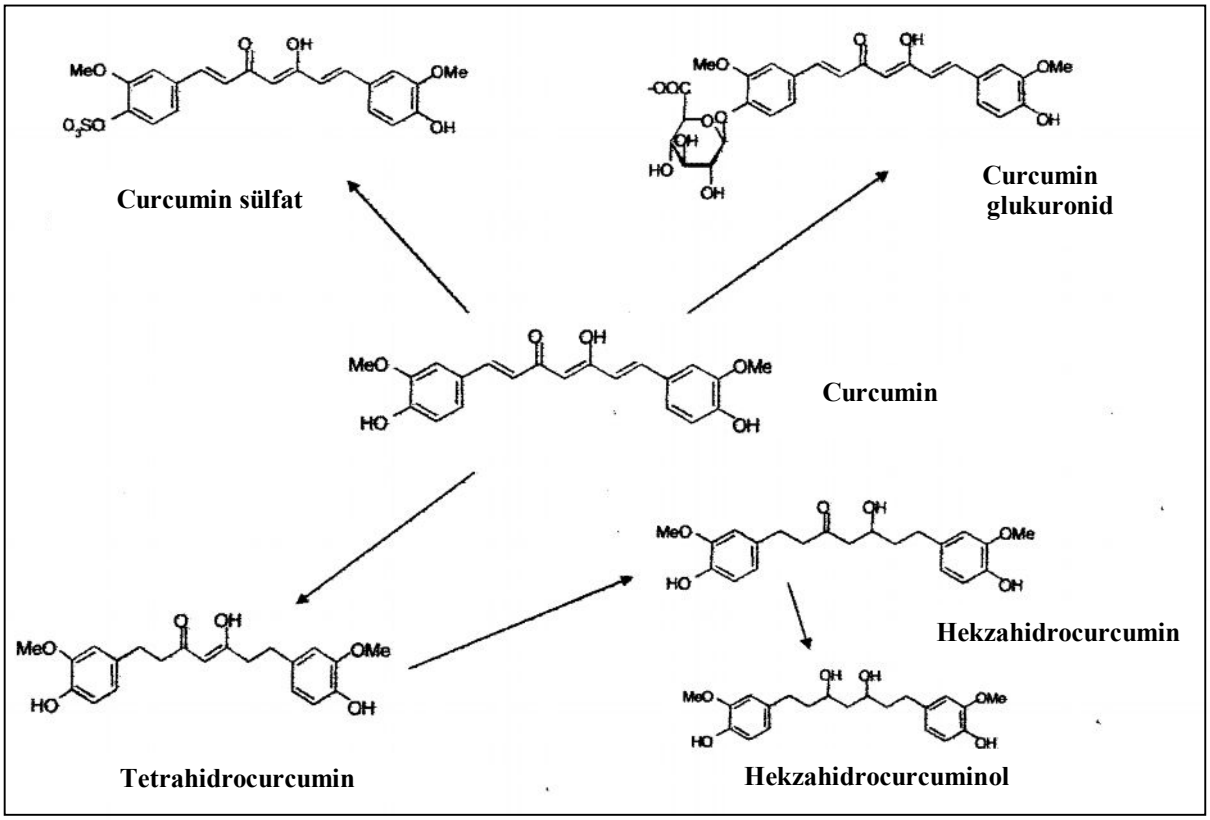
Curcumin'in transformasyonu barsaklardan absorbsiyonu sırasında gerçekleşmekte ve oldukça polar renksiz transforme ürünler meydana gelmektedir (Şekil 10) (87).

Sıçanlara oral yolla curcumin verilerek yapılan bir çalışmada, curcumin'in %60'ının emildiği ve idrar içerisinde glukuronid ve sülfat konjugatları olduğu, ayrıca curcumin'in büyük oranda gaitayla atıldığı gösterilmiştir. Daha sonraki yapılan çalışmalarda ise farelere intraperitonel olarak verilen curcumin'in (0.1 g/kg) ilk olarak dihidrocurcumin ve tetrahidrocurcumine biyotransformasyona uğradığı ve bu bileşiklerin hemen monoglukuronid konjugatları haline dönüştüğü gösterilmiştir. HPLC tekniği ile yapılan çalışmalarda, sıçanlara oral yolla verilen ve plazma içerisinde az miktarda bulunan curcumin'in yüksek oranlarda curcumin glukuronid ve curcumin sülfat, az miktarda ise heksahidrocurcumin, heksahidrocurcuminol ve heksahidrocurcumin glukuronid olabileceği gösterilmiştir (84).

Biotransformasyona uğramış olan curcuminin, stabil formunun tetrahidrocurcumin olduğu ve bu formun curcumin'in biyolojik etkileri üzerinde önemli role sahip olabileceği ayrıca curcumin'in redüksiyon ve glukuronidasyon gibi mikrosomal enzimatik reaksiyonlarla metabolik aktivite gösterebileceği bulunmuştur (87).

Curcumin'in Klinik Özellikleri

Turmeric diyetlerde baharat, yiyecek ve tekstilde de renk verici ajan olarak kullanılmasının yanında birçok hastalıkta da tedavi amaçlı kullanılmaktadır (84).



Şekil 10. Curcumin metabolitlerinin kimyasal yapısı (84).

Curcumin'in birçok farklı farmakolojik aktiviteleri ve biyolojik faydaları son yıllarda önemli ölçüde dikkat çekmiştir (88). Curcumin'in anti-oksidan, anti-tümör, anti-inflamatuar, anti-karsinogenik, anti-alerjik, anti-demans etkileri ve serbest radikal çöpçüsü olduğu yapılan birçok çalışmayla gösterilmiştir. Ayrıca curcumin'in anoreksia, öksürük, diabetes, karaciğer rahatsızlıkları, romatizma, Alzheimer, safra ile ilgili rahatsızlıklar, sinüzit gibi hastalıklara karşı güçlü bir ajan olduğuna inanılmaktadır (81,86,89,90).

CURCUMİN VE KANSER

Birçok çalışma curcumin'in aynı zamanda güçlü bir anti-kanser ajan olduğunu göstermekte ve deri, meme bezi, ağız, özafagus, mide, bağırsak, kolon, akciğer ve karaciğerin tümörgenesisini baskıladığını ortaya koymaktadır. Curcumin'in farklı tümörler üzerinde çok çeşitli mekanizmalarla anti-kanserogenik etki gösterdiği ifade edilmiştir. İnflamasyonu baskıladığı, hücre poliferasyonunu inhibe ettiği, belli onkogenleri baskıladığı, transkripsiyon

faktörü NF-κB' yi inhibe ettiği, COX2 enzimini baskıladığı, tümör implantasyonunu inhibe ettiği, karsinogenlerin biyotransformasyonunu inhibe ettiği ve glutatyon-s-transferaz (GST) enzimini aktive ettiği çeşitli çalışmalar ile ortaya konmuştur. (81,88,91).

NF-κB hücre poliferasyonu, hücre invasyonu, metastaz ve angiogenesisle alakalı gen ekspresyonu için gerekli bir nükleer transkripsiyon faktörüdür (82). NF-κB'nin bazı kanser türlerinde (akciğer, mide, prostat gibi) apopitotik hücre ölümünün engellenmesinde önemli rol oynadığını ortaya koyan yayınlar mevcuttur (92). COX–2 overekspresyonu kanserde önem taşıyan pek çok hücresel mekanizmayı etkilemektedir. COX–2 ekspresyonunun apoptozisi ve hücrelerarası adezyonu azaltan; angiyogenezi ve proliferasyonu arttıran etkileri bulunmuştur (93). İnsan meme kanserinin ksenograft modelinde yapılan bir çalışmada diyetle verilen curcumin tedavisinin meme kanserinin akciğer metastazları insidansını önemli ölçüde azalttığı ve bunun da curcumin'in NF-κB ve COX–2 ekspresyonunu baskılaması sonucu gerçekleştiği öne sürülmüştür (91).

GST geniş çaplı kanserojen bileşiklerin detoksifikasyonunda görev alan ve DNA zararına karşı dokuları koruduğu düşünülen bir enzimdir. Bu enzimin ilaçlar, yiyecek bileşenleri ya da yiyecek katkı maddeleri ile vücuda alınan toksik ve kanserojenik bileşiklere karşı dokuları koruduğu ileri sürülmektedir (94). Curcumin tümör nekrosis faktöre (TNF) bağlı NF-κB'yi ve COX-2'yi inhibe ettiği, GST'yi ise aktive ettiği bildirilmiştir. Böylece hücre poliferasyonu, tumörün invasyonunu ve angiyogenesisin baskılanması, tümör hücrelerinin apoptosisinin ise teşvik edilmesini sağladığı dolayısı ile de bu mekanizmalar üzerinden bir anti-kanser ajan olarak işlev gördüğü çeşitli araştırma ve araştırıcılar tarafından dile getirilmiştir (81,88,95).

Diğer yandan, kanserle ilişkisi ortaya konmuş ve kanserli hastalarda arttığı bildirilen arginaz enzim aktivitesi üzerine, curcumin'in etkilerini inceleyen herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Curcumin'in diğer çalışmalarda ileri sürülen etki mekanizmalarına ek olarak, kanser üzerine yararlı bir takım etkiler göstermesi, arginaz enzim inhibisyonu ile olabilir. Azalan arginaz enzim aktivitesinin yanında, yine karsinojenik etkisi gösterilen ve poliaminlerin ön maddeleri olan ornitin düzeylerinin azalması da söz konusu olabilecektir. Bu mekanizmaya NO'in dahil olması ve NO'in de anti-karsinojenik bazı etkilere sahip olduğunun gösterilmesi, curcumin'in anti-karsinojenik etki mekanizması üzerinde bu sistemin önemli bir parça olabileceğini akla getirmektedir.

Sonuç olarak bu çalışma ile ilk defa curcumin'in serum ve doku arginaz enzim aktiviteleri, NO düzeyleri ve doku ornitin düzeyleri üzerine olan etkilerinin araştırılması planlanmış ve bu sistem üzerindeki net etkilerinin ortaya konması hedeflenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

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

GEREÇLER

Çalışma Grupları

Çalışmada ortalama ağırlıkları 25-30 gram arasında değişen (ortalama 27 gram), 7-8 haftalık, 43 tane erkek Balb/c cinsi fare kullanıldı. Çalışma fareleri Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvar'ından temin edildi.

Denekler seçilerek, 7-9-9-9 ve 9'ar 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 tutuldular. Beş gruba da standart fare yemi günlük olarak verildi.

Hayvanlar 8 haftalık olduğunda 2., 3., 4., 5. gruba ehrlich asit tümör hücresi 200 µl subkutan sol bacağa enjekte edildi. 7. günün sonunda tümör çapının 1 cm. olduğu tespit edildi. İkinci grupta 6. günde, üçüncü ve dördüncü gruplarda ise 7. günde ölen fareler çalışma dışı bırakıldı.

1) Grup (n=7): Sağlıklı Kontrol Grubu

2) Grup (n=8): Tümör Kontrol Grubu 1 olarak kabul edildi. Bu gruba ehrlich asit tümörü enjekte edilmesinden 5 gün öncesinden itibaren tüm deney süresince (23 gün) gün aşırı olmak kaydıyla oral olarak 100 µl etil alkol verildi.

3) Grup (n=8): Tümör Kontrol Grubu 2 olarak kabul edildi. Bu gruba ehrlich asit tümörü enjekte edildikten bir hafta sonrasından itibaren tüm deney süresince gün aşırı olmak kaydıyla oral olarak 100 µl etil alkol verildi.

4) Grup (n=8): Tedavi grubu 1 olarak kabul edildi. Ehrlich asit tümörü enjekte edilmeden 5 gün öncesinde tedaviye başlandı ve tüm deney süresince 100 mg/kg curcumin 100µl etilalkol içinde çözülüp gün aşırı olarak oral yolla verildi.

5) Grup (n=9): Tedavi grubu 2 olarak kabul edildi. Ehrlich asit tümörü enjekte edildikten 1 hafta sonra tedaviye başlandı ve tüm deney süresince 100 mg/kg curcumin 100µl etilalkol içinde çözülüp gün aşırı olarak oral yolla verildi.

Curcumin %9'luk etil alkol içerisinde çözüldüğünden kontrol grubuna da aynı dozda etil alkol uygulandı. Deney beş grup fare için de anestezi altında intrakardiyak kan alınması ve doku çıkarılması işlemi ile sonlandırıldı. Sakrifikasyon öncesi; ksilazin (5-10 mg/kg), ketamin (60-80 mg/kg) im olarak anestezi amaçlı verildi. Ardından meme tümör dokuları çıkarıldı ve buzlu %0.9'luk serum fizyolojik ile yıkandı, kan örnekleri ise 4000 rpm de 10 dak. santrifüj edildikten sonra 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 oto homojenizatör kullanılarak ağırlıklarının 10 katı soğuk 0.05 M Tris/HCl tamponu (pH: 8.05) ile homojenize edildi. Doku homojenizatları 11.000 rpm ve 4 °C'de 20 dakika süre ile santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi.

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetik asit (CH_3COOH)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Bakır sülfat ($CuSO_4$)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Benzoik asit ($C_7H_6O_2$)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Demir klorür ($FeCl_3$)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Diasetilmonoksim ($C_4H_7NO_2$)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Fosforik asit (H_3PO_4)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Hidroklorik asit (HCl)	(Merck KgaA, Darmstadt- Almanya)
Mangan klorür ($MnCl_2$)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Ninhidrin ($C_9H_6O_4$)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
L-Ornitin hidroklorür ($C_5Hl_3ClN_2O_2$)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Potasyum klorür (KCl)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
L-Sitrülin ($C_6H_{13}N_3O_3$)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)

Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Sodyumhidroksit (NaOH)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Triklorasetik asit (CCl_3COOH)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Tiyosemikarbazid (CH_5N_3S)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Tiyoüre (H_2NCSNH_2)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Üre ($H_2NCONH2$)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
L-arginin ($C_6H_{14}N_4O_2$)	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Sülfirik asit (H_2SO_4)	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze - Almanya)
Folin	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze - Almanya)
Albumin	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze - Almanya)
Na-K Tartarat ($NaK(COO)_2(CHOH)_2$)	Panreac Montplet&Estaban, Madrid - İspanya)
Triton-X-100	(Merck KgaA, Darmstadt - Almanya)
Tris (Hidroksimetil) Aminomethan ($NH_2C(CH_2OH)_3$)	(Carlo Erba Reagenti - Milano)
α-Isonitro-sopropiophenone ($C_9H_9NO_2$)	(Sigma Aldrich GmbH, Seelze - Almanya)

Alet ve Malzemeler

Etüv	: Memmert 400	(GmbH + Co KG, Schwabach-Almanya)
Homojenizatör	: DIAX 900	(Heidolp-Almanya)
Manyetik karıştırıcı	: Ikamag RH	(Janke&Kunkel GmbH&CO, Almanya)
Soğutmalı santrifüj	: Universal 30 RF	(Hettich Zentifuge, Tuttlingen-Almanya)
Spektrofotometre	: UV-160A	(Shimadzu Corporation, Japonya)
Su banyosu	: Elektromag GFL-1083	(Geselschaft für Labortechnik, Alm.)
Elektronik tartı	: Sartorius	(Sartorius AG, Götting-Almanya)
pH metre	: pH level 1	(Inolab WTW, Weilheim-Almanya)
Cam malzemeler	: Deney tüpleri, balon jojeler, beherler v.b	

YÖNTEMLER

Meme Dokusu Arginaz Aktivitesinin TDMU Yöntemi ile Ölçümü

Arginaz aktivitesi; substrat olan argininin örnekteki arginazla hidrolizi sonucunda oluşan üre miktarının TDMU yöntemi (96) ile spektrofotometrik olarak saptanması ile belirlenmiştir.

Üre için kullanılan birçok kimyasal metod gibi, TDMU yöntemi de Feron reaksiyonunu temel alır (Şekil 16). Diasetilmonoksim, üre ile direkt olarak reaksiyona girmez.

İlk önce asit ortamda ısı etkisi ile hidroksilamin ve diasetile hidrolize olur. Diasetil, asit çözeltide üre ile kondanse olur ve H_2O ve renkli bir bileşik olan diazin meydana gelir. Bu rengi stabilize etmek için tiyosemikarbazid ve Fe^{+2} iyonları kullanılır.

Diasetilmonoksim	⟶	Diasetil + Hidroksilamin
Üre + Diasetil	⟶	Diazin (renkli bileşik) + H_2O

Şekil 11. Feron reaksiyonu (93).

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 $FeCl_3.6H_20$ bir miktar distile su ile bir balon jojede çözündürülüp, 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'ten ilave edilir. Deney aşamasında asit karışımı olarak kullanılır. Oda ısısında saklanır.

Renk ayıracı (3.6 mM Tiyosemikarbazid (TSC)+61.7 mM Diasetilmonoksim (DAM): Bu karışım 0.0036 M TSC (91.14 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 çözündürülür 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 çözündürülür 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 çözündürülür. 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 çözündürülür 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 çözündürülür. Deney sırasında kullanılan standart konsantrasyonu 0.2 µmol üre/ml olarak belirlenmiştir. Bu nedenle stok çözelti sulandırılarak kullanılacak olan konsantrasyon elde edilir. Üre standart çözeltisi 4 °C ısıda saklanmalıdır.

Deneysel işlemler

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

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

Daha sonra 37 ºC'ye gelen 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, 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.

$$\frac{(0.2\ \mu mol\ üre/ml)\ x\ 50\ x\ 5\ x\ 4}{0.2\ \mu mol\ üre/ml'nin\ absorbansı} = Faktör$$

50: 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: 0.637 olarak okunmuştur (Standart ürenin absorbansı)

Faktör = (0.2 µmol üre/ml) x 50 x 5 x 4 / 0.637

Faktör = 313.97 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 (313.97) 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 (97) prensibi: Bu yöntem ornitinin ninhidrin ile oluşturduğu mor renkli kompleksin kolorimetrik olarak ölçümüne dayanmaktadır.

Gerekli ayıraçlar

%10'luk trikloro asetik 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 işlemler

Çalışılacak doku homojenatı %10'luk TCA ile 1/1 oranında muamele edildikten sonra 3000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve böylece süpernatant elde edilmiş oldu. Deney tüpüne 1 ml süpernatant, kör tüpüne 1 ml distile su ve standart tüpüne de 1 ml 0.18 µmol/ml'lik ornitin solüsyonu konuldu. Tüplere sırayla 2.5 ml glasiyel asetik asit ve 0.25 ml ninhidrin ayıracı konuldu. Tüm tüpler vortekslenerek karıştırıldıktan sonra 30 dakika kaynar su banyosunda tutuldu. Su banyosundan çıkarılan tüpler hızla soğutularak 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

0.872: Standart ornitin absorbans değeri

$$\text{Ornitin } (\mu\text{mol/ml}) = \frac{\text{Deney absorbansı x 2 x } (0.18)}{0.872}$$

Ornitin (µmol/ml) = Deney absorbansı x 0.413 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 (98). 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 660 nm'de 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 mg'lık Albumin standartı: %5 mg'lık 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 mg'lık albumin standartı elde edilmiş olur. Deneyde kullanılacak standart protein konsantrasyonu %2 mg olarak belirlendiğinden, stok protein standartı sulandırılarak istenilen konsantrasyon elde edildi.

Deneysel işlemler

Doku süpernatantları 1/50 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 1/50 oranında sulandırılmış olan süpernatanttan 0.5 ml standart tüpüne %2 mg'lık standarttan 0.5 ml ve kör tüpüne de 0.5 ml distile su konuldu. Ardından her tüpe 0.5 ml alkali bakır ayıracı ilave edildi. Tüpler vortekslenerek iyice karışmaları sağlandı. 10 dakika oda ısısında bekletildikten sonra her tüpe 2 ml fenol ayıracı eklendi ve tekrar vortekslendi. 30 dakika 37 ºC'lik su banyosunda

bekletildikten sonra; tüplerin köre karşı absorbansları 660 nm dalga boyunda spektrofotometre ile okundu.

Protein düzeyinin hesaplanması

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

$$\text{Protein miktarı (\% mg protein)} = \frac{\text{Deney absorbansı x 50 x 2 x 2}}{\text{Standart protein absorbansı}}$$

50: Süpernatantın serum fizyolojik ile sulandırılma katsayısı

2 : Süpernatantın 1 ml'ye tamamlanma katsayısı

2: Protein standartının konsantrasyonu

0.536: Standart proteinin absorbansı

$$\text{Protein miktarı (\% mg protein)} = \frac{\text{Deney absorbansı x 50 x 2 x 2}}{0.536}$$

Protein miktarı (% mg protein) = Deney Absorbansı x 373.1 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 (99) 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 ISPF (α-Isonitro-sopropiophenone): 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.

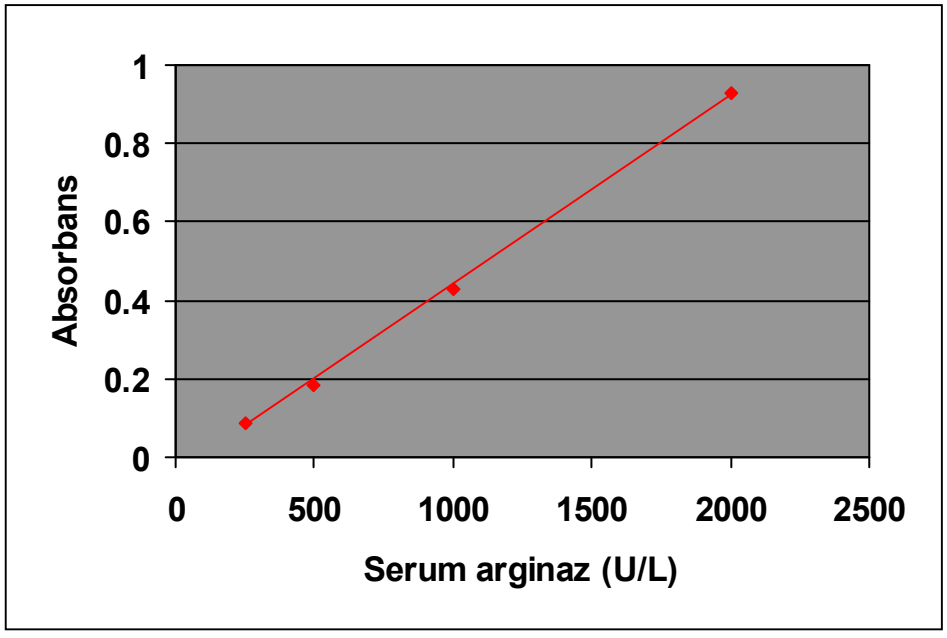
25 mM Tris-HCL çözeltisi: 3.0285 g tris tartılır bir miktar distile su ile balon jojede çözürülür ve 1000 ml'ye tamamlanır. HCl ile pH 7.5'e getirilir.

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 çalkalamaya bırakıldı. Daha sonra bu tüplerden 100 µl alınarak üzerine 100 µl tris ilave edildi ve bu tüplerden 100 µl çekilerek üzerine 10 µl $MnCl_2$ ilavesi yapıldı. 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. Tüplerin 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 12).



Şekil 12. Üre standart çalışması regresyon grafiği.

NO Tayini

NO tayini: Cartos ve Wakid yöntemi (100) kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Gerekli ayıraçlar

Kadmiyum granülleri: 0.1 mol/L H_2SO_4 içinde saklandığı sürece 9 ay stabildir.

Glisin-NaOH buffer: 7.5 g glisin bir miktar distile suda çözüldü. 2 mol/L NaOH çözeltisi ile pH'sı 9,7'ye ayarlandı. Bu çözelti 1 ay 0-8 $^{\circ}$C'de stabildir.

Sülfanilamid: 5 g sulfanilamid 3 mol/L sıcak HCl içinde çözülür ve daha sonra soğumaya bırakıldı. 1 yıl oda sıcaklığında stabil kalabilir.

N-Naphthylethylene diamine (NNDA): 50 g NNDA 250 ml distile su içinde çözüldü. 2 ay 0-8 $^{\circ}$Cde stabildir.

Çinko sulfat ($ZnSO_4$): 75 mmol/L; 10.8 mg alınıp 500 ml'ye tamamlandı.

Bakır sulfat ($CuSO_4$): 5 mmol/L; 250 mg alınıp 200 ml'ye tamamlandı.

Sodyum hidroksit (NaOH): 55 mmol/L; 1.1 g alınıp 500 ml'ye tamamlandı.

Standartlar: $NaNO_2$ standardı 10 mmol/L'lik sodyum tetra borat çözeltisi içinde hazırlandı (69 mg $NaNO_2$, 380 mg borat ($Na_2B_4O_710\ H_2O$) 100 ml içinde çözüldü).

KNO_3 standardı: 102 mg potasyum nitrat alınıp 10 mmol'lik 100 ml sodyum tetra borat içinde çözüldü.

Deneysel işlemler

Deproteinizasyon: Test tüpüne 0.5 ml distile su, 2 ml $ZnSO_4$, 2.5 mL NaOH ilave edilip 10 dk. Oda ısısında beklettikten sonra 4000 g' de 20 dk. santrifüj edildi.

Kadmiyum granüllerinin aktivasyonu: Granüller 3 defa distile su ile yıkanır. 1-2 dk. içinde $CuSO^{+}$ içinde çalkalanarak bekletilip, 3 defa da Glisin- NaOH ile yıkanıp 10 dk. içinde kullanılmak üzere kurutma kağıdı ile kurutuldu.

Sonucun hesaplanması: KNO_3' ün 10 milimolarlık çözeltisinden 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 200 milimolarlık seri dilüsyonlar hazırlanır ve numunelere uygulanan tüm işlemler standartlara da uygulandı.

1ml glisin-NaOH buffer tüm tüplere konuldu. 1'er ml deproteinize numunelerden ve standartlardan alındı. 2.5 g tartılan ve aktivasyon işleminden geçirilen kadmiyumlardan tüm tüplerin üzerine konuldu. 90 dk. oda ısısında karıştırarak beklendi. Süre sonunda nitrit ölçümü için bu tüplerden 2'şer ml alınarak üzerine 1 ml sülfanilamid ve 1 ml NNDA ilave edildi. Karıştırılır ve 45 dk. beklendikten sonra 545 nm'de okuma yapıldı.

Direkt nitrit ölçümü: $NaNO_2$ standartlarını 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 200 milimolarlık seri dilüsyonlar hazırlandı ve deproteinize numunelerden kadmiyum ile reaksiyona sokmadan direkt olarak 2'şer ml alınarak ayrı tüplere konuldu. Üzerine 1 ml sülfanilamid ve 1 ml NNDA eklendi. 45 dk. sonra 545 nm'de okuma yapıldı.

Nitrat aktivitesinin hesaplanması

Bulunan nitrat değerlerinden nitrit değerleri çıkarıldıktan sonra sulandırma faktörü olan 20 ile çarpılıp yine nitrat standardından elde edilen faktör ile çarptıktan sonra çıkan sonuç milimol/litre olarak hesaplanmış olur.

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 NO 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 aktivitesi, ornitin ve NO düzeyleri ölçülürken, serum örneklerinde ise arginaz enzim aktivitesi ve NO düzeyleri ölçüldü. Öncelikli olarak serum örnekleri için gruplar arası farklılıklar Kruskal Wallis testi ile analiz edildi. Grup 1, 2 ve 4 arasında gerek arginaz enzim aktivitesi gerekse NO düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunurken, grup 1, 3 ve 5 arasında sadece arginaz aktivitesi açısından anlamlı bir fark saptandı (Tablo 5). Gruplar arası ikili karşılaştırmalar non-parametrik bir test olan Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Serum örneklerinin arginaz enzim aktivitesi ve NO düzeyileri, doku örneklerinin ise arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve NO düzeyleri ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 6 ve 8'de gösterilmiştir.

Tablo 5. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar.

Gruplar	Serum Arginaz Aktivitesi	Serum NO Düzeyi
Grup 1-2-4	P = 0.001	P = 0.005
Grup 1-3-5	P = 0.001	P = 0.199

Tablo 6. Grupların serum NO düzeyleri ve arginaz enzim aktiviteleri.

Grup	Serum NO Düzeyi (mmol/L) ORT±SS	Serum Arginaz Aktivitesi (U/L) ORT±SS
1. grup (n = 7)	10.95±7.39	1.31±0.24
2. grup (n = 8)	4.06±3.19	9.10±1.40
3. grup (n = 8)	9.27±3.13	14.63±8.84
4. grup (n = 8)	20.62±13.14	8.96±3.42
5. grup (n = 9)	17.96±9.79	10.36±3.45

Tablo 7. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar.

Gruplar	Serum NO Düzeyi		Serum Arginaz Aktivitesi	
	p	z	p	z
Grup 1 ve 2	0.029	-2.209	< 0.001	-3.240
Grup 1 ve 3	0.687	-0.234	< 0.001	-3.24
Grup 2 ve 4	0.001	-3.050	0.645	-0.525
Grup 3 ve 5	0.114	-1.638	0.481	-0.770

Serum NO düzeylerinin tümör grubunda sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü gözlendi ($p<0.05$). 4. grupta, curcumin tedavisinin serum NO düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseldiği ($p<0.001$), 5. grupta ise NO düzeyinin yükseldiği fakat bu artışın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı bulundu ($p>0.05$).

Arginaz enzim aktivitesinin tümör kontrol gruplarında sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı saptandı ($p<0.001$). Tedavi ve tümör kontrol grupları arasında ise anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$) (Tablo 7).

Tablo 8. Grupların doku arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve NO düzeyleri.

Grup	Doku Arginaz Enzim Aktivitesi (U/mg protein) ORT±SS	Doku Ornitin Düzeyleri (µmol/mg protein) ORT±SS	Doku NO Düzeyleri (µmol/mg protein) ORT±SS
2. grup (n=8)	110.48±35.66	0.074±0.018	0.99±0.65
3. grup (n=8)	68.98±28.40	0.056±0.031	1.57±0.39
4. grup (n=8)	36.28±9.09	0.053±0.079	2.36±1.17
5. grup (n=9)	27.65±6.94	0.056±0.026	1.52±0.63

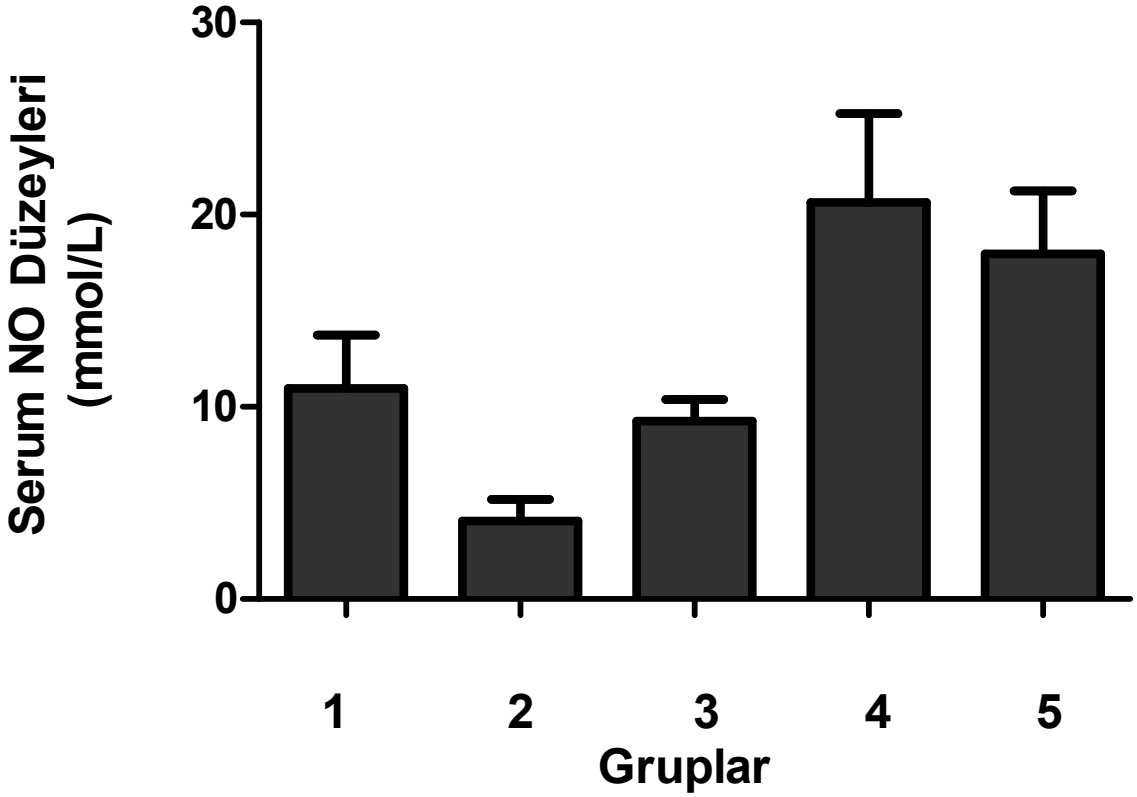
Tablo 9. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar.

Gruplar	Doku Arginaz Enzim Aktivitesi		Doku Ornitin Düzeyi		Doku NO Düzeyi	
	p	z	p	z	p	z
Grup 2 ve 4	< 0.001	-3.363	0.007	-2.629	0.015	-2.366
Grup 3 ve 5	< 0.001	-3.464	0.888	-0.144	0.743	-0.385

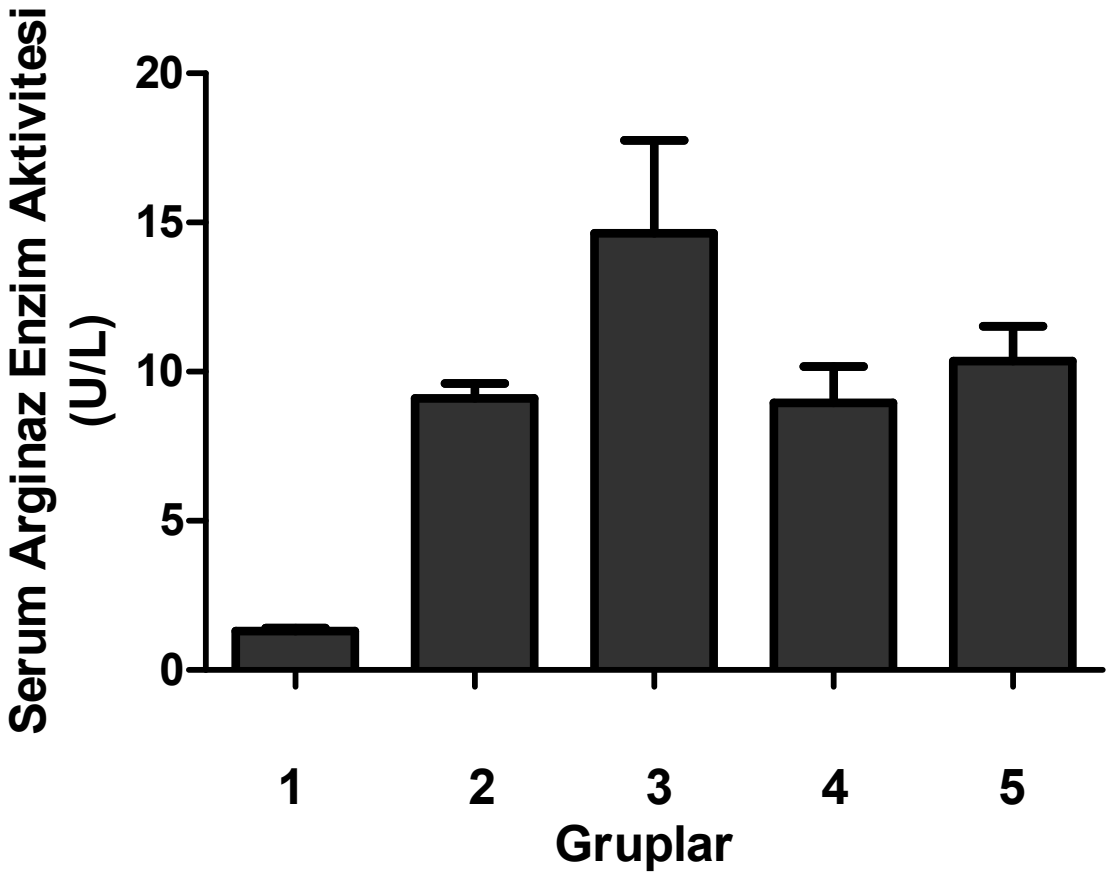
Doku örnekleri söz konusu edilen üç parametre açısından incelendiğinde ise; tümör kontrol gruplarında artmış olan arginaz enzim aktivitesinin, curcumin tedavisi ile birlikte istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü görüldü ($p<0.001$).

Ornitin düzeyleri, 2 ve 4. gruplar arasında anlamlı olarak farklıydı. Önce başalyan curcumin tedavisi ile birlikte doku ortitin düzeyinin anlamlı olarak düştüğü saptandı ($p=0.007$), 3 ve 5. gruplar arasında ise ornitin düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0.05$).

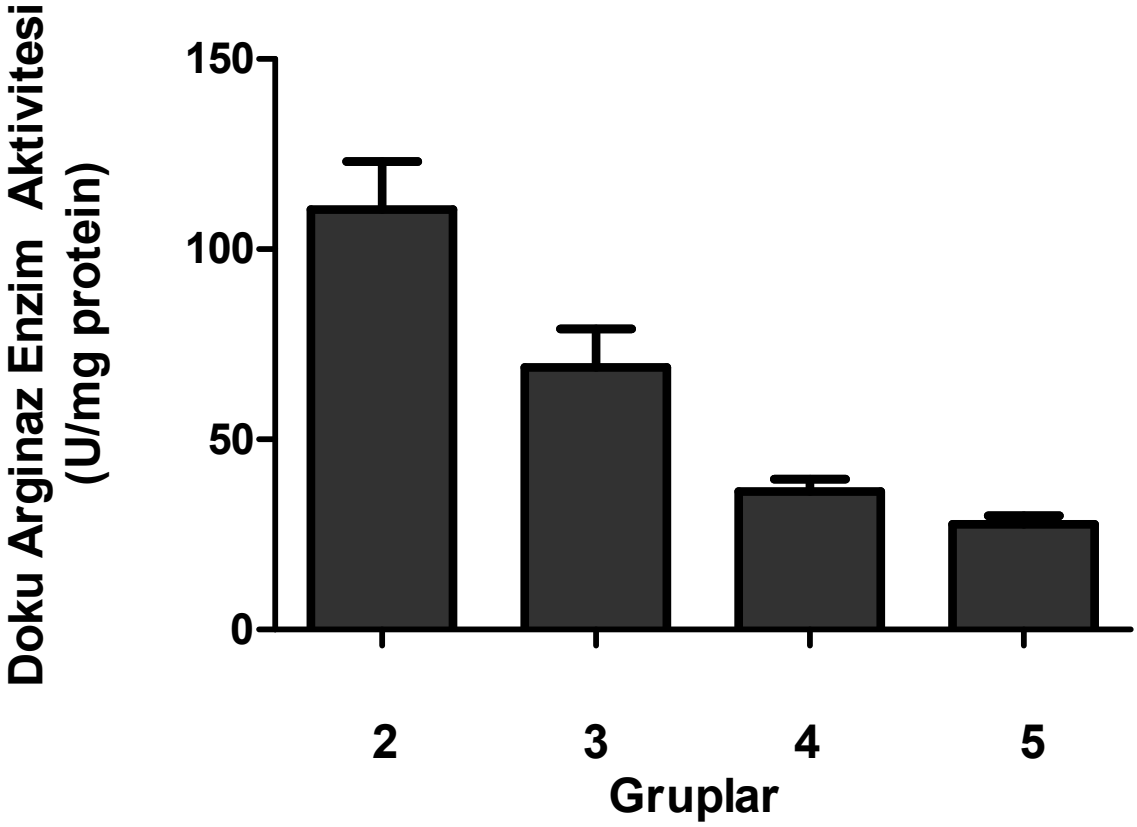
NO düzeyleri karşılaştırıldığında ise; 2 ve 4. gruplar arasında yine anlamlı bir fark bulunurken ($p<0.05$) 3 ve 5. gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$). Curcumin tedavisinin doku NO düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırdığı saptandı ($p=0.015$) (Tablo 9).



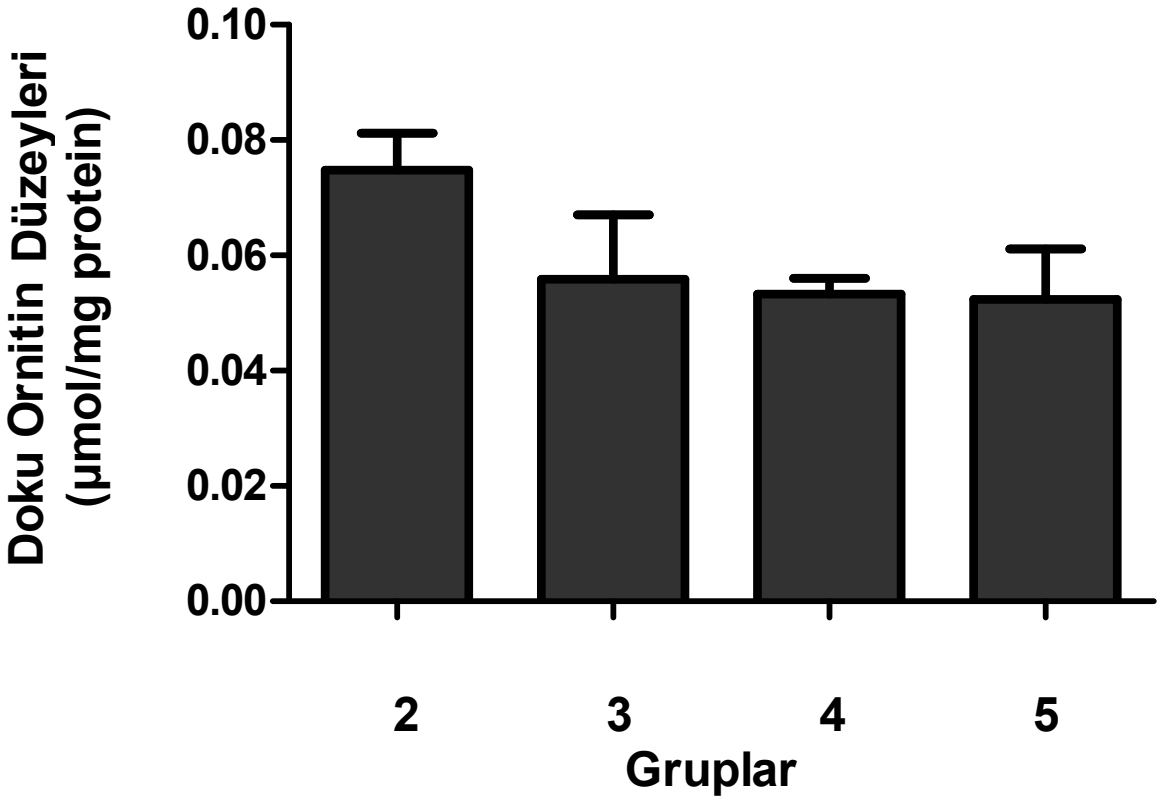
Şekil 13. Serum NO düzeyleri.



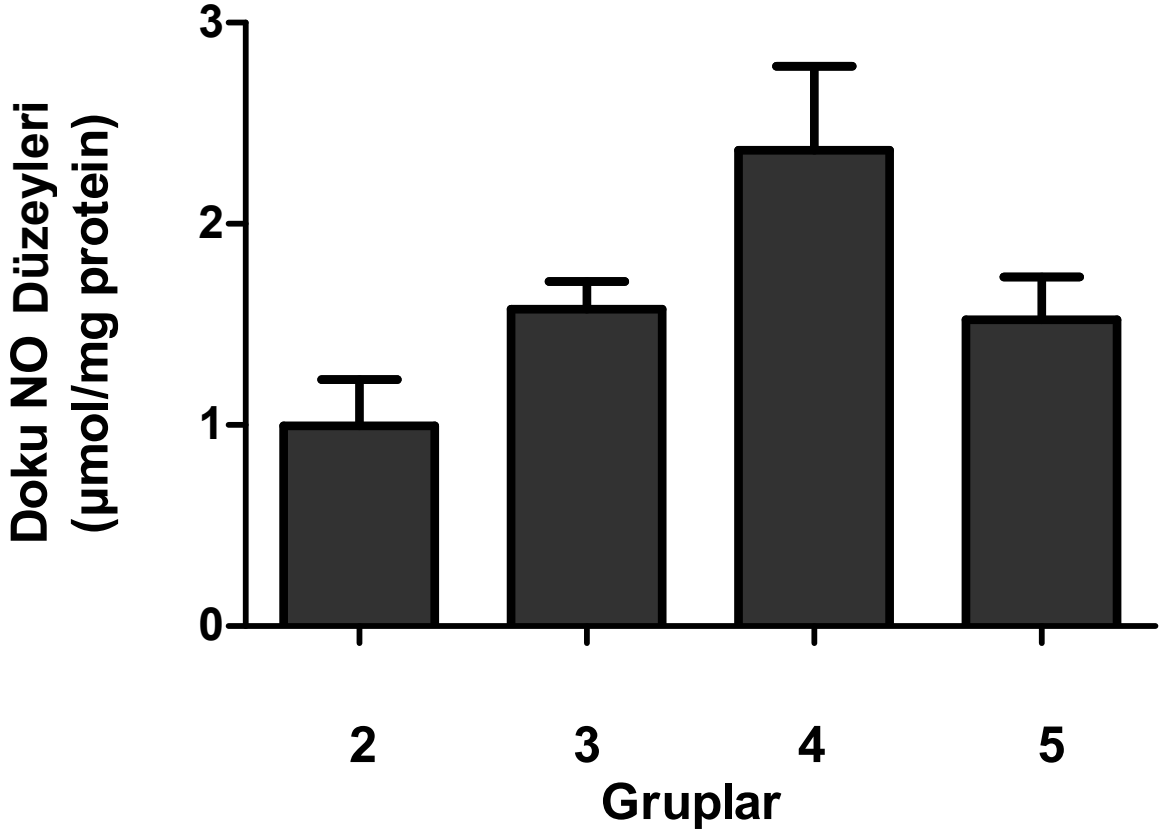
Şekil 14. Serum arginaz enzim aktiviteleri.



Şekil 15. Doku arginaz enzim aktiviteleri.



Şekil 16. Doku ornitin düzeyleri.



Şekil 17. Doku NO düzeyleri.

Tablo 10. Deneklerin her birinin serum arginaz enzim aktivitesi ve serum NO düzeyleri.

GRUPLAR	Serum Arginaz Aktivitesi (mmol/L)	Serum NO Düzeyleri (mmol/L)
Grup 1: Sağlıklı Kontrol Grubu		
1	1.23	9.17
2	0.96	3.33
3	1.62	10.83
4	1.41	10
5	1.59	6.67
6	1.11	10
7	1.28	26.67
Grup 2: Tümör Kontrol Grubu 1		
1	8.56	10.83
2	10.09	0.83
3	11.78	4.17
4	9.71	3.33
5	9.28	2.5
6	7.75	0.83
7	7.72	5
8	7.96	5
Grup 3: Tümör Kontrol Grubu 2		
1	12.73	10
2	6.3	11.67
3	10.86	10.83
4	10.8	7.5
5	22.33	2.5
6	6.86	12.5
7	14.52	10
8	32.7	9.17
Grup 4: Tedavi Grubu 1		
1	11.57	6.67
2	3.72	42.5
3	8.92	20.83
4	11.57	24.17
5	8.61	29.17
6	4.02	5.83
7	10.74	7.5
8	12.58	28.33
Grup 5: Tedavi Grubu 2		
1	7.48	31.67
2	15.37	13.33
3	11.84	8.33
4	13.23	20
5	9.23	8.33
6	14.36	15.83
7	9.03	6.67
8	7.01	27.5
9	5.74	30

Tablo 11. Deneklerin her birinin doku arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve NO düzeyleri.

GRUPLAR	Doku Arginaz Enzim Aktivitesi (U/mg protein)	Doku Ornitin Düzeyleri (µmol/mg protein)	Doku NO Düzeyleri (µmol/mg protein)
Grup 2: Tümör Kontrol Grubu 1			
1	127	0.04	1.41
2	81.6	0.066	1.12
3	70	0.078	1.47
4	99.6	0.104	0.19
5	166.2	0.07	0.62
6	70	0.088	0.19
7	142.4	0.078	2.06
8	127.1	0.074	0.91
Grup 3: Tümör Kontrol Grubu 2			
1	113.1	0.033	0.98
2	40.3	0.069	1.88
3	60.1	0.039	2.15
4	55.1	0.109	1.27
5	113.6	0.031	1.64
6	66.6	0.028	1.23
7	50.6	0.042	1.84
8	52.5	0.096	1.61
Grup 4: Tedavi Grubu 1			
1	29.3	0.057	3.44
2	47.9	0.059	4.37
3	34.4	0.054	2.93
4	24.6	0.051	1.29
5	46.6	0.064	1.41
6	43	0.053	0.92
7	38.2	0.037	2.44
8	26.3	0.051	2.13
Grup 5: Tedavi Grubu 2			
1	29.4	0.072	1.33
2	39.8	0.024	2.39
3	20.9	0.058	0.96
4	23.6	0.066	1.28
5	30.2	0.011	2.53
6	23.7	0.073	1.74
7	32.2	0.076	1.8
8	17.1	0.088	0.94
9	32	0.039	0.74

TARTIŞMA

Arginaz; üre ve ornitini meydana getirirken L-arginini substrat olarak kullanan bir enzimdir (10). Ayrıca L-arginin; NO, sitrülin, agmatin, kreatin ve protein sentezi için de substrat olarak kullanılmaktadır. Fakat, L-arginin metabolizmasında baskın olan yolağın, arginazın üre sentezinde anahtar enzim olarak kullanıldığı reaksiyon olduğu öne sürülmüştür (101). Arginaz enzim aktivitesi varlığı, meme bezi, beyin, barsak, böbrek ve akciğer gibi bir çok karaciğer dışı organda da bulunmuştur (102). Ekstraheptik arginazın hücre üremesi ve doku tamiri gibi düzenleyici mekanizmalara katılabileceği öne sürülmüştür (103).

Arginazın 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 göstermekte ve araştırmacılar arginazın kanser vakaları için belirleyici bir enzim olabileceğini ileri sürmektedirler (38,65,67,104-106). Meme kanserli hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda da serum arginaz aktivitesi, sağlıklı kadınlardakinden yüksek bulunmuştur (9,107).

Ornitin, poliamin olarak ifade edilen bir grubun (spermin, spermidin ve pütresin) öncül maddesidir. Poliaminlerin, hücrelerde nükleotit ve protein sentezini uyararak hücre proliferasyonunda önemli rol oynadıkları (47), ayrıca hızlı büyüyen hücre ve dokularda yüksek konsantrasyonlarda bulundukları, hücre büyümesi ve farklılaşması için gerekli oldukları gösterilmiştir (70). Büyüme süreci için gerekli olan poliaminlerin aynı zamanda kanser gelişimi ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (108). Poliamin konsantrasyonlarının meme kanserinde de arttığı, tümör poliamin konsantrasyonları ile tümörün yeniden nüks etmesi arasında pozitif bir korelasyon olduğu ve meme kanseri poliamin oranlarının biyolojik belirteç olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (107). Meme tümör dokusunda poliamin sentezinin artış nedeni bilinmemekle birlikte, yüksek miktardaki östrojen içeriğinin poliamin

sentezini indükleyerek meme kanser gelişimine yol açabileceği, öne sürülen mekanizmalardan biridir (35).

Arginaz enzimiyle ortak substratı kullanan NOS, L-arginini NO ve sitrüline parçalayan enzimdir (101). Kanserde arttığı bilinen arginaz enzimi ve NOS, arginini tüketmek için birbirleriyle yarışmaktadırlar (109). Arginaz enziminin L-arginin için Km değeri 2-20 mM olup, bu değer NOS için ise 1-20 μM'dür (110). Fakat, arginaz enziminin fizyolojik pH'da Vmax değeri, NOS enzimininden 1000 kat daha fazla olduğundan (111) bu iki enzimin, L argininin düşük konsantrasyonlarında bile, onu rahatlıkla kullanabileceğini ortaya koymaktadır (35).

İlginç bir molekül olan NO'in birçok biyolojik etkisi gösterilmiştir (14) NO'nun tümör oluşumu mekanizması üzerindeki net etkisi kopleks ve tam olarak belli olmamakla beraber birçok fizyolojik mekanizmada NO ve nitrat, nitrit, S-nitrotiyoller, nitrozaminler ve peroksinitrit gibi NO metabolitlerinin, NO'in sitotoksik ve/veya genotoksik etkilerini ortaya çıkarmada önemli rolleri olduğu ortaya konmuştur. Bu etkiler mitokondriyal solunumun inhibe edilmesi, protein ve DNA hasarı sonucu gen mutasyonu, protein fonksiyonunun kaybı, nekroz ve hücre ölümü şeklinde olabilmektedir (80). NOS enzim aktivitesi ile oluşan NO'in kanser gelişimi yönünde negatif etkisinin olduğu bildirilmiştir. Hem birçok fizyolojik fonksiyonun gerçekleşmesi için gerekli olan, hem de aşırı üretimi durumunda radikalik etki gösteren NO; organizmada çift yönlü etki oluşturabilmektedir (109). NO'in, konak savunması ve immunolojik reaksiyonlarda da fonksiyonu olduğu düşünülmektedir. Artmış NO'in, vazodilatasyon, trombosit yapışmasının engellenmesi ile dokuların mikrosirkülasyonunda rahatlamaya ve sonuçta dokuların oksijenlenmesi yönünde çok yararlı etkileri olabileceği öne sürülmüştür (112).

Diğer yandan NO ve NO metabolitlerinin tümörlü dokularda hücre büyümesi ve metaztazı inhibe ettiği (80), NO'in yüksek konsantrasyonlarında tümör gelişiminin inhibe edebileceği (113) ve tümör hücrelerinin bu yolla apoptosisinin indüklenebileceği belirtilmiştir (114). Aynı zamanda, NO'in kimyasal duyarlılığı ve immün duyarlılığı olan bir ajan olarak kullanılabileceği, kanser tedavisinde immünoterapi veya kemoterapide sinerjistik etki göstererek etkin olabileceği belirten çalışmalar bulunmaktadır (14).

Çalışmamızda da serum NO düzeylerine baktığımızda, NO değerlerinin tümör oluşturulan gruplarda sağlıklı gruplara oranla anlamlı bir şekilde düştüğü gözlenmektedir. Bu sonuç da NO ile kanser arasındaki ilişki konusunda bizlere anlamlı bir fikir vermektedir.

Meme kanserli hastalarda, tümör dokusu ve serum arginaz enzim aktiviteleri ile ornitin düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu ve bu mekanizma sonucu poliamin

biyosentezinin artacağı, bu durumun ise kanser gelişimi yönündeki mekanizmayı tetikleyebileceği, çeşitli çalışmalarda ifade edilmiştir (10,61,67). Bu olguya ek olarak, kanser oluşumunda koruyucu bir rol üstendiği bildirilen NO düzeyinin, artan arginaz enzim aktivitesine bağlı olarak azalması, kanser gelişimi yönündeki mekanizma üzerinde tabloyu tamamlayan bir unsur olarak gösterilebilir (10,14). Bu çalışmada kanserli hasta grubunda artmış arginaz enzim aktivitesi karşısında bulunan azalmış NO düzeyi, bu teoriyi desteklemektedir.

Son yıllarda, curcumin'in antikarsinojenik özelliğine yönelik çalışmalar, artış göstermiştir. Curcumin'in güçlü bir antioksidan, anti-inflamatuar olduğu, karsinojen DNA hasarını ve tumörgenesisi inhibe ettiği, yapılan deneylerle hayvan modelleri üzerinde gösterilmiştir (86). Curcumin'in deri, meme bezi, ağız, özafagus, mide, bağırsak, kolon, akciğer ve karaciğer gibi kanser tiplerinde tümörgenesisi baskıladığı düşünülmektedir. Farklı tümör tipleri üzerindeki anti-kanser etki mekanizması açıklanırken, bunlardan birinin TNF'ye bağlı NF-κB'yi ve COX-2'yi inhibe ederek, GST'yi ise aktive ederek oluşabileceği ileri sürülmüştür. Böylece curcumin hücre poliferasyonu, tümörün invasyonunu ve angiyogenesisi baskılarken, tümör hücrelerinin apoptosisini ise teşvik edebilecektir (81,88,95).

Meme kanserli hayvanlara uygulanan curcumin tedavisinin serum NO düzeylerini anlamlı bir şeklide artırdığı saptanırken, aynı oranda bir azalma arginaz enzim aktivitesi üzerinde saptanamamıştır. Fakat, curcumin'in sadece NO düzeylerini artırması bile kanser oluşumunu önleme yönünde olumlu bir etki olarak değerlendirilebilir. Doku örneklerinde ise yine uyguladığımız curcumin tedavisinin, arginaz enzim aktiviteleri ve ornitin düzeylerini anlamlı bir şekilde azaltırken, NO düzeylerini anlamlı olarak artırdığını gözlemledik. Dolayısı ile curcumin'in antikanserojenik bir ajan olarak yukarıda özetlenen etki mekanizma(lar)ının yanında diğer bir etki mekanizması olarak, arginaz enzim inhibiyonu sonucunda azalan ornitin ve poliamin düzeyleri ayrıca olumlu etkileri belirtilmiş olan NO artışı gösterilebilir.

Çalışmamızda hedeflenen diğer bir unsur olan ve curcumin'in tedavisine başlama zamanının etkinliğinin değerlendirlmesinde de ilginç sonuçlara ulaşılmıştır. Bu amaçla iki farklı tedavi uygulaması yapılmış, bir gruba curcumin verilmesi hayvanlara kanser hücresi enjeksiyonu yapılmadan önce uygulandığı halde, ikinci gruba hayvan vücudunda kanser dokusu oluştuktan sonra curcumin verilmeye başlanmıştır. Bu iki grup verileri arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve NO düzeyleri açısından değerlendirildiğinde; net olarak kanser hücresi vucuda verilmeden önce curcumin alınımının çok daha etkin olduğu saptanmıştır. Bu nedenle zaten bir baharat olarak kullanılan curcumin'in doğal olarak besinler ile günlük diyetle

alınımının kanser oluşumunu engelleyici bir faktör olarak değerlendirilmesi mümkün olabilecektir.

Sonuç olarak, antikarsinojenik bir ajan olarak gösterilen curcumin'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. Curcumin'in bu olumlu etkilerini daha net bir şekilde gösterebilmesi, günlük diyetle kanser oluşumundan çok daha önce alınmaya başlaması ile mümkün olabilecektir. Kanser tedavisinde umut verici bir ajan olan curcumin'in bu alandaki etkileri daha ileri çalışmalar ve yeni parametreler ile desteklenmelidir.

SONUÇLAR

Antikarsinojenik özelliği ortaya konmuş olan curcumin'in deneysel olarak meme kanseri geliştirilmiş farelerde arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve NO düzeyleri üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanan bu çalışma sonucunda;

1) Serum arginaz enzim aktivitesi tümör gruplarında sağlıklı kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

2) Serum NO aktivitesinin tümör grubunda anlamlı olarak düştüğü, tedavi grupları ile tümör grupları karşılaştırıldığında ise tedavi gruplarında serum NO düzeyinin anlamlı olarak yükseldiği saptandı.

3) Serum arginaz enzim aktivitesinde tedavi sonrası bir miktar düşüş olsa bile bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlendi.

4) Tümör doku örneklerinde curcumin tedavisi ile arginaz enzim aktivitesinin anlamlı şekilde düştüğü saptandı.

5) Curcumin tedavisi sonucunda azalan arginaz aktivitesi doğrultusunda; ornitin düzeylerinin de anlamlı olarak azaldığı bulundu.

6) Diğer yandan curcumin tedavisinin NO düzeylerini anlamlı olarak arttırdığı saptandı.

7) Curcumin'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.

8) Kanser oluşturulmadan verilen curcumin'in arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve NO düzeylerine olan etkilerinin, kanser oluşturulduktan sonra, curcumin verilişine göre daha etkin olduğu bulundu.

9) Curcumin'in meme kanserine karşı potansiyel bir koruyucu/tedavi edici ajan olarak, arginaz/poliaminler/NO mekanizması açısından olumlu bazı etkilerinin bulunabileceği, fakat curcumin'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 tümör olup kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır.

Üre döngüsünün anahtar enzimi olan arginaz, nitrik oksit sentaz (NOS) ile aynı substratı kullanarak 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 serum arginaz enzim aktivitesi ve nitrik oksit (NO) düzeylerine, dokuda ise arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve NO düzeylerine, antikarsinojenik etkisi çeşitli çalışmalarla gösterilmiş olan curcumin'in etkileri araştırılmıştır.

Çalışmada 43 tane erkek Balb/c cinsi fare kullanıldı. Farelerin sol ayak iç bölgesine 0.2 ml erhlich asit tümör hücresi enjekte edildi. Fareler sağlıklı kontrol, tümör öncesi curcumin tedavisi ve tümör oluşturulduktan sonra curcumin tedavisi alan gruplar ile bunların tümör kontrol grupları olmak üzere 5 gruba ayrıldı ve gruplara 100 mg/kg curcumin oral olarak verildi.

Tümörlü hayvanların serumunda artmış bulunan arginaz enzim aktivitesinin curcumin tedavisi ile birlikte azaldığı, fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Azalan NO düzeylerinin, curcumin tedavisi ile yükseldiği saptandı. Doku arginaz enzim aktivitesi ve ornitin düzeyleri tedavi grubunda tümör gruplarına göre anlamlı olarak düşük bulundu. Doku NO düzeyinin ise yine curcumin tedavisi ile birlikte yükseldiği görüldü.

Sonuç olarak, curcumin'in arginaz enzim aktivitesini inhibe ederek yolağı NOS üzerinden NO oluşumuna kaydırdığı, bu sayede poliaminlerin öncü maddesi olan ornitin sentezini azalttığı ve NO üretimini teşvik ederek kansere karşı koruyucu bir rol

oynayabileceği söylenebilir. Kanser tedavisinde umut verici bir ajan olan curcumin'in bu alandaki etkileri daha ileri çalışmalar ve yeni parametreler ile desteklenmelidir.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, arginaz, ornitin, nitrik oksit, curcumin.

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

Ezgi KÜRKÇÜ

SUMMARY

Breast cancer forms almost 30% of all the cancer types which makes it the most frequent tumor type found in women around the world.

As a key enzyme of the urea cycle, it leads to the formation of urea and ornithine from L-arginine by using the same substrate with nitric oxide synthase (NOS). In the patients with cancer, arginase has been found to be higher and was reported to be a useful biological marker. The aim of this study was to investigate the possible effects of curcumin which shown as an anticarcinogenic substance, on arginase enzyme activity, ornithine and nitric oxide (NO) levels in the experimental model of breast cancer in mice.

In the study, 43 male Balb/c mice were used. 0.2 ml Erhlich acid tumor cell was injected into the subcutan part of their left foot. Mice were divied into five groups as healty control group, curcumin treatment before tumour formation, curcumin treatment after tumour formation and cancer control groups. 100 mg/kg curcumin were given orally.

Increased serum arginase activity was decreased with curcumin treatment but this difference was not statistically significant. On the other hand, decreased NO levels were increased with curcumin treatment. In the tumour tissue, arginase activity and ornithine levels

were significantly decreased with curcumin treatment. Tissue NO levels were also increased with the curcumin treatment.

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

Key words: Breast cancer, arginase, ornithine, nitric oxide, curcumin.

KAYNAKLAR

1. Bray F, Mc Carron P, Parkin M. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. Breast Cancer Res 2004; 6: 229-239.

2. Aydıner A,Topuz E. Meme kanseri tanı tedavi takip. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2007.

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

4. Aydıntuğ S. Meme kanserinde erken tanı. Sted 2004; 13 (6): 226-228.

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

6. Hendrix MJC, Seftor EA, Kirschmann DA, Seftor REB. Molecular biology of breast metastasis: Molecular expression of vascular markers by aggressive breast cancer cells. Breast Cancer Res 2000; 2: 417-422.

7. Simmons RM, Rubin E, Pisch J. Breast cancer. In: Harvey JC, Beattle EJ (Eds.) Cancer surgery. W.B. Saunders Company: NY USA; 1996. p.525-561.

8. Heber D, Byerley LO, Chlebowski RT. Metabolic abnormalities in the cancer patient. Cancer 1985; 55: 225-229.

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

10. Erbas H, Aydogdu N, Usta U, Erten O. Protective role of carnitine in breast cancer via decreasing arginase activity and increasing nitric oxide. Cell Biology International 2007; 31: 1414-1419.

11. Kuyumcu A, Düzgün PA, Özmen MM, Besler TH. Travma ve enfeksiyonda nitrik oksidin rolü. Ulus Travma Derg 2004; 10 (3): 149-159.

12. Mutlu C, Koyutürk M, Karpuz V. Preeklamptik ve normal plasentada endotelyal nitrik oksit sentetaz immünreaktivitesinin incelenmesi. Cerrahpaşa J Med 2005; 36: 109-115.

13. Kuşçuoğlu U. Deneysel omurilik yaralanmasında agmatin'in doza bağımlı nöroprotektif etkilerinin incelenmesi (tez). İstanbul: T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroşirürji Kliniği; 2004.

14. Bonavida B, Khineche S, Huerta-Yepez S, Garbán H. Therapeutic potential of nitric oxide in cancer. Drug Resist Updat 2006; 9 (3): 157-173.

15. Raza A. RX: Spicing cancer treatment. http:/3quarksdaily.blogs.com/3quarksdaily/2005/12/empty.html.

16. Verma SP, Goldin BR. Copper modulates activities of genistein, nitric oxide, and curcumin in breast tumor cells. Biochem Biophys Res Commun 2003; 310 (1): 104-108.

17. Sener SF, Grey N. The global burden of cancer. J Surg Oncol 2005; 92 (1): 1-3.

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

19. Topal Çolak A. Meme kanserli hastalarda serum leptin düzeyleri ve histopatolojik parametrelerle ilişkisi (tez). İstanbul: Sağlık Bakanlığı Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi I.İç Hastalıkları Kliniği; 2004.

20. Giordano SH, Cohen DS, Buzdar AU, Perkins G, Hortobagyi GN. Breast carcinoma in men: a population-based study. Cancer 2004; 101: 51-57.

21. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C et al. Cancer Statistics, 2006. CA Cancer J Clin 2006; 56: 106–130.

22. Hamzaoğlu O, Özcan U. Türkiye sağlık istatistikleri 2006. Ankara: Türk Tabipleri Birliği Yayınları 2005.

23. Turkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, organlara göre kanser sıklığının dağılımı ve kadınlarda en sık görülen 10 kanser. http//www.saglık.gov.tr.2003.

24. Karayurt Ö. Meme Kanseri. http://www.saglik.gov.tr/extras/birimler/ksdb/meme_kanseri.

25. Meme anatomisi. www.cancerline.com/CancerLineHCP/9898_21482_0...

26. İlvan Ş. Meme Karsinomu Patolojisi. İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Meme Kanseri Sempozyum Dizisi No: 54; 2006: 65 – 71.

27. Aksilla Mamografisi. http://www.geocities.com/radyodiagnostik/tezuc.htm.

28. Lee H.S. Why is carcinoma of the breast more frequent in the upper outer quadrant? A case series based on needle core biopsy diagnoses. The Breast 2005; 14 (2): 151-152.

29. Tannock IF, Hill RP (eds) : The basic science of Oncology. 2nd ed. NewYork,Mc Graw - Hill, 1992.

30. Erel T. Meme kanseri ve hormon replasman tedavisi, Ovulasyon indüksiyon ajanları ve oral kontraseptiflerin etkileri. Meme Kanseri Sempozyum Dizisi No: 54; 2006:43- 48.

31. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of Breast Diseases Breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics. BJM 2000; 321:624-628.

32. Akhtar MS, Almas K, Aslam N, Atta-Ur-Rehman. Breast cancer risk in relation to dietary fat along with some other nutrients. Medical Journal of İslamic Academy of Sciences 2001; 14 (2): 53-60.

33. Nkondjock A, Robidoux A , Paredes Y, Narod SA, Ghadirian P. Diet, lifestyle and BRCA-related breast cancer risk among French-Canadians Breast Cancer Research and Treatment 2006; 98: 285–294.

34. Özdemir N, Özçelik M. Manda karaciğer ve böbrek doku arginazının fotoinaktivasyonu ve kinetik özellikleri. Turk J Vet Anim Sci 2001; 25: 995-1000.

35. 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 ınduces apoptosis in MDA-MB-468 cells. Cancer Research 2000; 60: 3305–3312.

36. Meram İ, Ahi S, Tarakçıoğlu M. Kanserde serum arginaz aktivitesi. Van Tıp Dergisi 2000; 7 (1): 20-23.

37. Balcı N. Sürekli gürültüye maruz kalınan bazı iş kollarında çalışan kişilerde serum total sialik asit, ksantin oksidaz, malondialdehit, nitrik oksit, arginaz ve ornitin değerleri (tez). Kahramanmaraş: T.C. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi; 2007.

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

39. Erbaş H, Erten O, Dağlar A, İrfanoğlu ME. Meme kist sıvısı arginaz aktivitesi, ornitin ve üre düzeyleri. Türk Biyokimya Dergisi 2006; 31 (3); 129–134.

40. Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood (Çeviri: Prof Dr. Diler Aslan) Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler Protein Olmayan Azot Metabolitleri. Ankara: Palme yayıncılık; 2005: 414-417.

41. Altınışık M. Üre döngüsü www.mustafaaltinisik.org.uk/8.

42. Chang CI, Liao JC, Kuo L Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity. Cancer Research 2001; 61: 1100-1106.

43. Takkı K, Simell O. Genetic aspects in gyrate atrophy of the choroid and retina with hyperornithinameia. Br J Ophthalmol 1974; 58: 907-916.

44. Kandemir FM, Özdemir N. L- Lizin ve L- Ornitinin sığır böbrek doku arginaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi. Fırat Üniversitesi 2008; 22 (1): 1-4.

45. Benzer F, Ateşşahin A, Karahan İ. Yüksek dozda gentamisin verilen ratlarda karaciğer ve böbrek arginazı üzerine manganez klorürün etkileri. F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi 2006; 20 (3): 239-243.

46. Brock AA, Chapman SA, Ulman EA, Wu G. Dietary manganese deficiency decreases rat hepatic arginase activity. J Nutr 1994; 124 (6): 913.

47. Rodvell VW (Çeviri: N.Dikmen). Proteinlerin ve aminoasitlerin metabolizması. Harper' ın Biyokimyası. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004; 307-59.

48. King MW. Polyamnine Biosynthesis. 2007. www.med.unibs.it/~marchesi/polyamine_synth.gif.

49. Porembska Z, Skwarek A, Mielczarek M, Baraczyk-Kuzma A. Serum arginase activity in postsurgical monitoring of patients with colorectal carcinoma. Cancer 2002; 94: 2930–2934.

50. Colombo JP, Konarska L. Arginase. In Bergmayer H.U. ed. Methods of Enzymatic Analysis. 3rd. ed. Winheim: Verlag Chemie 1984; 285-295.

51. Kaysen GA, Strecker HJ. Purification and properties of arginase of rat kidney. Biochem J 1973; 133: 779-788.

52. Ash DE. Arginine metabolism: enzymology, nutrition, and clinical significance structure and function of arginases. J.Nutr 2004;134:2760S-2764S.

53. Schımke RT. Adaptive characteristics of urea cycle enzymes in the rat. The Journal of Biogicaol Chemistry 1962; 237 (2): 459-468.

54. Erişir M, Ozan S. Sığır rumen doku arginazının bazı amino asitler tarafından inhibisyonu ve kinetiği. Türk J Vet Anim Sci 2000; 24: 65-70.

55. İlhan N, Gülen Ş. Tiroid arginaz enzim aktivitesinin farklı metal iyonları varlığında ısıya karşı stabilitesi. Biyokimya Dergisi 1993; 18: 59-67.

56. Ozan S, Yaralıoğlu S, İleri T, Halifeoğlu İ. Akkaraman ve ivesi koyunlarında, gebelikte ve doğumdan sonra eritrosit, tükürük ve serum arginaz aktiviteleri ile serum üre ve östrojen düzeyleri. Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences 1999; 23: 345-350.

57. Erısır M, Ercel E, Yılmaz S, Ozan S. Evaluation of optimal conditions for arginase activity in streptozotocin induced diabetic rats. Vet. Met.- Czech 2005; 50: 69-76.

58. Bansal V, Ochoa JB. Arginine availability, arginase, and the immune response. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care 2003; 6: 223–228.

59. Efron DT, Barbul A. Arginine and nutrition in renal disease. J Ren Nutr 1999; 9 (3): 142-144.

60. 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.

61. Straus B, Cepelak I, Festa G. Arginase, a new marker of mammary carcinoma. Clin Chim Acta 1992; 210 (1-2): 5-12.

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

63. Bjelaković G, Milenović D, Zivić R, Nikolić J, Kostić G, Bjelković B. Arginase activity in plasma and erythrocytes in children with hematologic diseases. Srp Arh Celok Lek 1998; 126 (5-6): 153-156.

64. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension and mortality in sickle cell disease. JAMA 2005; 294(1): 81–90.

65. Wu CW, Chi CW, Lin EC et al. Serum arginase level in patients with gastric cancer. J Clin Gastroenterol 1994; 18 (1): 84-89.

66. Wu CW, Wang SR, Chang TJ, Lin EC, Chang KL, Huang MH et al. Content of glucocorticoid receptor and arginase in gastric cancer and normal gastric mucosal tissues. Cancer 1989; 64 (12): 2552-6.

67. Gökmen S, Yörük Y, Yorulmaz F, Gülen Ş. Arginase and ornithine as markers in human non-small cell lung carcinoma. Cancer Biochem Biophys 1999; 17:125-131.

68. Pegg AE, Mc Cann PP. Polyamine metabolism and function. Am J Physiol 1982; 243 (12): 212-221.

69. Kurtuluş H, Eskiocak S, Tütüncüler F, Başaran ÜM, Gülen Ş. Deneysel sistemik hipoksi geliştirilmiş yenidoğan ratlarda N-asetilsistein uygulamasının etkileri. Türk Biyokimya Dergisi 2003; 28 (2); 40-44.

70. Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. Biochem J 2003; 376: 1–14.

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

72. Que LG, Kantrow SP, Jenkinson CP, Piantadosi CA, Huang YCT. Induction of arginase isoforms in the lung during hyperoxia. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 1998; 275: 96-102.

73. Linsalata M, Leo S, Guerra V, Di Leo A. Erythrocyte polyamines and prognosis in colorectal cancer patients [abstract]. Anticancer Res 2000; 20 (3B): 2113-2117.

74. Moulinoux JP, Quemener V, Khan NA. Biological significance of circulating polyamines in oncology. Cell Mol Biol 1991; 37 (8):773-783.

75. Gürdol F, Ademoğlu E, (Editörler). Biyokimya Azotlu Biyomoleküllerin Metabolizması İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2006: 438-439.

76. Lancaster JR, JR in Nitric Oxide: Biology and Pathobiology Ignarro, LJ, ed. Academic Press, San Diego, CA 2000: p. 209-224.

77. Shareef S, Sawada A, Neufeld AH. Isoforms of nitric oxide synthase in the optic nerves of rat eyes with chronic moderately elevated intraocular pressure. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999; 40 (12): 2884-2891.

78. Wiesinger H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. Progress in Neurobiology 2001; 64: 365–391.

79. Stankevicius E, Kevelaitis E, Vainorius E, Simonsen U. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. Medicina (Kaunas) 2003; 39 (4): 333-341.

80. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. Nat Rev Cancer 2006; 6: 521-534.

81. Aggarwal B, Bhatt ID, Ichikawa H, Ahn KS, Sethi G, Sandur SK et al. Curcumin — Biological and Medicinal Properties. 7034_book.fm 2006: p. 297-367.

82. 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): 535-540.

83. Natarajan C, Bright JJ. Curcumin inhibits experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through janus kinase-stat pathway in T-lymphocytes. The Journal of Immunology 2002; 169: 6506–6513.

84. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. Eur J Cancer 2005; 41 (13): 1955-1968.

85. Curcuminin keto ve enol formu www.edinformatics.com/.../keto.jpg.

86. Lin JK, Lin-Shiau SY. Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin. Proc Natl Sci Counc Repub China B 2001; 25 (2): 59-66.

87. Pan MH, Huang TM, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. Drug Metab Dispos 1999; 27 (4): 486-494.

88. Sharma RA, Ireson CR, Verschoyle RD, Hill KA, Williams ML, Leuratti C et al. Effects of dietary curcumin on glutathione S-transferase and malondialdehyde-DNA adducts in rat liver and colon mucosa: relationship with drug levels. Clin Cancer Res 2001; 7 (5): 1452-1458.

89. Wang X, Jiang Y,Wang YW, Huang MT, Ho CT, Huang Q. Enhancing anti-inflamation activity of curcumin through O/W nanoemulsions. Food Chemistry 2008; 108: 419-424.

90. Tohda C, Nakayama N, Hatanaka F, Komatsu K. Comparison of anti-inflammatory activities of six curcuma rhizomes: a possible curcuminoid-independent pathway mediated by curcuma phaeocaulis extract. Evid Based Complement Alternat Med 2006; 3 (2): 255-260.

91. Aggarwal BB, Shishodia S, Takada Y, Banerjee S, Newman RA, Bueso-Ramos CE et al. Curcumin suppresses the paclitaxel-ınduced NF-κB pathway in breast cancer cells and ınhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice. Clin Cancer Res 2005; 11 (20): 7490-7498.

92. Eroğlu C, Soyuer I, Soyuer S, Yıldız OG, Orhan O, Gündoğ M ve ark. Eşzamanlı kemoradyoterapi ile tedavi edilen evre III küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde NF-κB'nin prognostik önemi. UHOD 2005; 15 (3): 138-143.

93. İnce AT, Övünç O. Cyclooxygenase–2 ve Karsinogenez. Güncel Gastroenteroloji 2005; 9 (1): 70-77.

94. Arslan S, Budak M, Bardakçı S. GSTM1 polimorfizmi ile primer beyin tümörleri arasındaki ilişkinin araştırılması. Fen Bilimleri Dergisi 2005; 26 (1): 1-10.

95. Singh S, Aggarwal BB. Activation of Transcription Factor NF-kB Is Suppressed by Curcumin (Diferulolylmethane). The Journal of Biological Chemistry 1995; 270 (42): 24995-25000.

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

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

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

99. Munder M, Eichmann K, Moran JM, Centeno F, Soler G, Modolell M. Th1/Th2-Regulated Expression Of Arginase Isoforms in Murine Macrophages And Dendritic Cells. The Journal of Immunology 1999; 163: 3771–3777.

100. Cortas NK, Wakid NW. Determination inorganic nitrate in serum and urine by kinetic cadmium-reduction method. Clin Chem 1990; 36: 1440-1443.

101. Wu G, Morris SM. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond Biochem J 1998; 336: 1-17.

102. Gotoh T, Araki M, Mori M. Chromosomal localization of the human arginase II gene and tissue distribution of its mRNA. Biochem Biophys Res Commun 1997; 233: 487-491.

103. Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, Moss DW, Holmes LS, Baylis SA, et al. Roles of nitric oxide in tumor growth. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 4392-4396.

104. Konarska L, Kolasa T, Albrecht P, Regula A. Can arginasebe a marker of the large bowel neoplasia? Acta Biochim Pol. 1993; 40 (1): 164-166.

105. Harris BE, Pretlow TP, Bradley EL Jr, Whitehurst GB, PretlowTG. Arginase activity in prostatic tissue of patients with benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. Cancer Res. 1983; 43 (6): 3008-3012.

106. Loser C, Folsch UR, Paprotny C, Creutzfeldt W. Polyamine concentrations in pancreatic tissue, serum, and urine of patients with pancreatic cancer. Pancreas 1990; 5 (2): 119-127.

107. Kingsnorth AN, Wallace HM, Bundred NJ Dixon JM. Polyamines in breast cancer. Br J Surg 1984; 71 (5): 352-6.

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

109. Cheeseman KH. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. Molec Aspects Med 1993; 14: 191-197.

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

111. Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. Ann Rev Physiol 1995; 57: 707-736.

112. Çekmen MB, Turgut M, Türköz Y, Aygün D, Gözükara EM. Nitrik oksit ve nitrik oksit sentazın fizyolojik ve patolojik özellikleri. Turkiye Klinikleri J Pediatr 2001; 10: 226-235.

113. Hofseth LJ, Hussain SP, Wogan GN, Harris CC. Nitric oxide in cancer and chemoprevention. Free Radic Biol Med 2003; 34: 955-968.

114. Cui S, Reichner JS, Mateo RB, Albina JE. Activated murine macrophages induce apoptosis in tumour cells through nitric oxide-dependent or-independent mechanisms. Cancer Res 1994; 54: 2462-2467.

RESİMLEMELER LİSTESİ

ŞEKİLLER **Sayfa No**

Şekil 1. Dünyada gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdekikanser vakalarının 2002 yılı insidans ve mortalite değerleri. 4
Şekil 2. Meme anatomisi 7
Şekil 3. Argininden ornitin ve üre oluşumu 10
Şekil 4. Üre döngüsü 11
Şekil 5. Ornitinden poliamin, prolin ve glutamat sentezi 11
Şekil 6. Poliamin sentezi 15
Şekil 7. Poliamin katabolizması 16
Şekil 8. Argininden NO ve sitrüllin oluşumu 17
Şekil 9. Curcuminin keto ve enol formu 19
Şekil 10. Curcumin metabolitlerinin kimyasal yapısı 20
Şekil 11. Feron reaksiyonu 25
Şekil 12. Üre standart çalışması regresyon grafiği 31
Şekil 13. Serum NO düzeyleri 37
Şekil 14. Serum arginaz enzim aktiviteleri 38
Şekil 15. Doku arginaz enzim aktiviteleri 39
Şekil 16. Doku ornitin düzeyleri 40
Şekil 17. Doku NO düzeyleri 41

TABLOLAR

Tablo 1. Türkiye de yıllara göre ölüm nedenleri 5

Tablo 2. Türkiye'de kadınlarda en sık görülen beş kanser türleri 5
Tablo 3. Türkiye'de kadınlarda en sık görülen on kanser türleri 6
Tablo 4. Meme kanseri oluşumunda önemli risk faktörleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir 9
Tablo 5. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar 34
Tablo 6. Grupların serum NO düzeyleri ve arginaz enzim aktiviteleri 34
Tablo 7. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar 35
Tablo 8. Grupların doku arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve NO düzeyleri 35
Tablo 9. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar 35
Tablo 10. Deneklerin her birinin serum arginaz enzim aktivitesi ve serum NO düzeyleri 42
Tablo 11. Deneklerin her birinin doku arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve NO düzeyleri 43

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılı Edirne doğumluyum. İlkokulu Şehit Asım İlköğretim Okul'unda okudum. Yüksel Yeşil İlköğretim Okul'unda orta öğrenimimi tamamladım ve Edirne Anadolu Öğretmen Lisesi'nden 2001 yılında mezun oldum. Aynı yıl Trakya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne girdim ve 2005 yılında mezun olduktan sonra Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimime başladım. 2008 yılında yüksek lisans öğrenimimi halen sürdürmekteyim.

EKLER

Ek 1. Etik kurul raporu.