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

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Hakan ERBAŞ

DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULMUŞ MEME TÜMÖRÜNDE EPİGALLOKATEŞİN-3-GALLAT'IN OLASI TEDAVİ EDİCİ ROLÜ

(Yüksek Lisans Tezi)

Aycan ÜNAL

EDİRNE – 2016

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

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Hakan ERBAŞ

DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULMUŞ MEME TÜMÖRÜNDE EPİGALLOKATEŞİN-3-GALLAT'IN OLASI TEDAVİ EDİCİ ROLÜ

(Yüksek Lisans Tezi)

Aycan ÜNAL

Destekleyen Kurum: TÜBAP 2015/49

Referans No: 10059242

EDİRNE – 2016

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyokimya** Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve **Prof. Dr. Hakan ERBAŞ** danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi **Aycan ÜNAL** tarafından tez başlığı "**Deneysel Olarak Oluşturulmuş Meme Tümöründe Epigallokateşin-3- Gallat'ın Olası Tedavi Edici Rolü**" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı **15/12/2016** tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "Yüksek Lisans Tezi" olarak kabul edilmiştir.

.....

Prof. Dr. Erol ÇAKIR

JÜRİ BAŞKANI

.....

Prof. Dr. Hakan ERBAŞ

ÜYE

.....

Prof. Dr. Özlem BALCI EKMEKÇİ

ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ

Enstitü Müdürü V.

TEŞEKKÜR

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum tez çalışmamda emeği geçen danışman hocam sayın Prof. Dr. Hakan ERBAŞ'a, eğitimimde katkıları olan Prof. Dr. Erol ÇAKIR, Prof. Dr. Sevgi ESKİOCAK, Prof. Dr. Selma SÜER GÖKMEN hocalarıma, çalışmamda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Nurettin AYDOĞDU ve Yrd. Doç. Dr. Ebru TAŞTEKİN hocalarıma, bana her zaman destekte bulunan Prof. Dr. İlker DIBIRDIK, Yrd. Doç. Dr. Eray ÖZGÜN ve Öğr. Gör. Dr. Gülben SAYILAN ÖZGÜN hocalarıma, Vet. Hek. Ziya ÇUKUR ve Deney Hayvanları Birimi çalışanlarına, çalışma arkadaşlarıma, çalışmamızı destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne, bu süreçte her zaman yanımda bulunan aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

- **MEME KANSERİ** 3
- **MEMENİN ANATOMİK YAPISI** 5
- **ARGİNAZ ENZİMİ** 8
- **NİTRİK OKSİT** 14
- **EPİGALLOKATEŞİN-3-GALLAT** 19

GEREÇ VE YÖNTEMLER 26

BULGULAR 42

TARTIŞMA 50

SONUÇLAR 56

ÖZET 58

SUMMARY 60

KAYNAKLAR 62

ŞEKİLLER LİSTESİ 75

ÖZGEÇMİŞ 77

EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

ADH : Antidiüretik hormon
ADP : Adenozin difosfat
AP : Activator protein
ASL : Arginosüksinat liyaz
ASS : Arginosüksinat sentetaz
ATP : Adenozin trifosfat
BH4 : Tetrahidrobiopterin
BRCA : Breast Cancer Susceptibility
cGMP : Cyclic guanosine monophosphate
DNA : Deoksiribonükleik asit
DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü
EC : Epicatechin
ECG : Epicatechin-3-gallate
EDRF : Endotel Derived Relaxing Factor
EGC : Epigallocatechin
EGCG : Epigallocatechin-3-gallate
eNOS : Endotelyal nitrik oksit sentaz
FAD : Flavin adenin dinükleotid
FMN : Flavin mono nükleotid
GİS : Gastrointestinal sistem
IARC : International Agency on Cancer for Research
iNOS : İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

ip : İntraperitoneal

iv : İntravenöz

LDL : Low density lipoprotein

L-NA : N-nitro-L-arginin

L-NAA : L-amino-N-arginin

L-NAME : N-nitro-L-arginin metil ester

L-NIO : N-iminoetil-L-ornitin

L-NMMA : N-monometil-L-arginin

MMP : Matrix metalloproteinase

NADPH : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NCI : National Cancer Institute

NFkB : Nuclear factor kapa-light-chain-enhancer of activated B cells

nNOS : Nöronal nitrik oksit sentaz

NO : Nitrik oksit

NOS : Nitrik oksit sentaz

$O_2^{\bullet -}$: Süperoksit anyonu radikali

TNF : Tumor necrosis factor

GİRİŞ VE AMAÇ

Memede meydana gelen patolojik değişiklikler, insanların ve hekimlerin ilk çağlardan beri dikkatini çekmiştir. Bu da, önemli sayılacak olan gözlemlerin yapılmasını sağlamıştır.

Meme kanseri; sık görülüyor olması, sıklığının giderek artması, erken evrelerde tanı konulup tedavi edilebilir olması gibi özellikleri nedeniyle önemini giderek arttırmaktadır (1,2). Tarama programları sayesinde kanserin erken evrede teşhis edilmesinin ve etkin bir tedavi ile de tamamen yok edilmesinin mümkün olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte hastalar sigarayı bırakmak, sağlıklı beslenme alışkanlıkları kazanmak gibi yaşam biçimlerinde yapacakları değişikliklerle, kansere yakalanma riskini önemli oranlarda azaltabilmektedir (3).

Tümörün tedaviye verdiği yanıtın değerlendirilmesinde ve metastazların erken dönemde önlenebilmesinde tümör belirteçleri kullanılır. Arginaz enzimi aktivitesi, kanser türlerinde artar. Bu da arginaz enziminin, kanserde belirteç olarak kullanılma potansiyelini ortaya koymaktadır (4).

L-Arginin'in üre ve L-Ornitin'e hidrolizinden sorumlu olan Arginaz, bir metalloenzimdir. Memelilerde Arginaz'ın; Arginaz I (Hepatik) ve Arginaz II (Ekstrahepatik) olarak iki izoformu bulunur (5). Birinci izoenzim olan Arginaz I karaciğerde baskın olan sitozolik enzimdir, üre döngüsünden sorumludur. İkinci izoenzim olan Arginaz II ise birçok dokunun mitokondrisinde yer alır, hücredeki arginin/ornitin konsantrasyonun düzenlenmesinde görev alır (6).

Nitrik oksit (NO)'in kanserle yakından ilişkisi bulunmaktadır. NO, nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığıyla sentezlenmektedir. Bu enzim arginaz ile aynı substratı yani

arginini kullanmaktadır (7). NO, normal fizyolojik koşullarda dengenin sürdürülmesinde önemlidir (8). NO'nun önemli fonksiyonları vardır. Bunlar arasında; vasküler tonusun sağlanması, trombosit aktivasyonunun önlenmesi ve endotele lökosit adezyonunun sınırlandırılması sayılabilir (7).

Yeşil çay ve onun içerdiği kateşinlerin, kanser oluşmaması için bazı koruyucu etkilere sahip olduğu ileri sürülmüştür. Bu etkiler; hücre çoğalmasını önleme, hücre döngüsünü bloke etme (9), etken reseptörleri baskı altına alma, sitokinlerin salınımını azaltma (10), mitotik uyarıları baskı altına alma, mutajenite ve genotoksisite önlenmesi, detoksifikasyon enzimlerini etkin hale getirme, serbest radikalleri temizleme, kanser hücrelerinin apoptosisini hızlandırma (11) ve yeni damar oluşumunu engelleme (12) gibi mekanizmalarla açıklanmaktadır. Yeşil çay polifenolleri, proteinlere bağlanma özellikleriyle belirli enzim ve reseptörleri etkileyebilir. Yeşil çayın, tümör metastazına engel olarak, kanserin yayılmasına karşı etkili olabileceği bildirilmiştir (13).

Yeşil çayda bulunan, fenolik yapıda olan kateşinlerin en önemlilerinden biri Epigallokateşin-3-gallat (EGCG)'tır. EGCG, en çok miktarda bulunan ve yeşil çayın farmakolojik etkinliklerinden sorumlu olan kateşindir (14). EGCG; C vitaminine göre 100 kat, E vitaminine göre 25 kat daha fazla antioksidan aktiviteye sahiptir (15). Çay kateşinlerinin; antimikrobiyal, antioksidan, anti-HIV, anti-mutajenik, antikanserojen özellikleri ve kalp-damar hastalıklarını engelleyici etkileri olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (15-17). EGCG'nin, kanser önleyici bir madde olduğu Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tarafından bildirilmiştir (15).

Bu çalışmada; önceki çalışmalarda antikarsinojenik özelliği ortaya konmuş olan EGCG'nin, meme kanseri üzerindeki etkilerinin araştırılması planlanmıştır. İlk kez bu çalışma ile EGCG'nin, kanser ile ilişkili bulunan arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve NO mekanizması üzerine olan etkileri, immünohistokimyasal parametreler ile desteklenerek incelenmiştir.

GENEL BİLGİLER

MEME KANSERİ

Vücudu oluşturan hücrelerin bir düzen içinde, aralarında iş bölümü yaparak bir araya gelmeleriyle organ ve dokular meydana gelir. Hücreler, organizmanın esas birimidir. Hücreler belirli bir hızda kontrollü olarak çoğalırken, yaşlanan hücreler ise aynı şekilde yıkıma uğramaktadır (1,18,19).

Vücudumuzdaki bu hücrelerin görevlerini yerine getirmesi, DNA'nın kontrolünde olur. Çeşitli sebeplerle DNA'da görülen değişimler, hücrelerin çoğalmasını kontrol eden mekanizmanın ortadan kalkmasına neden olur. Hücrelerde, kontrol dışı aşırı çoğalmanın başlamasına neden olur. Kontrolsüz olarak çoğalım gösteren bu hücreler, 'kanser' adı verilen tabloya neden olur. Kadınlarda meme dokusu, kanserin geliştiği en önemli dokulardandır. Bunun yanı sıra, birçok iyi huylu tümör ve akut inflamasyon da bu dokuda görülmektedir (1,19,20).

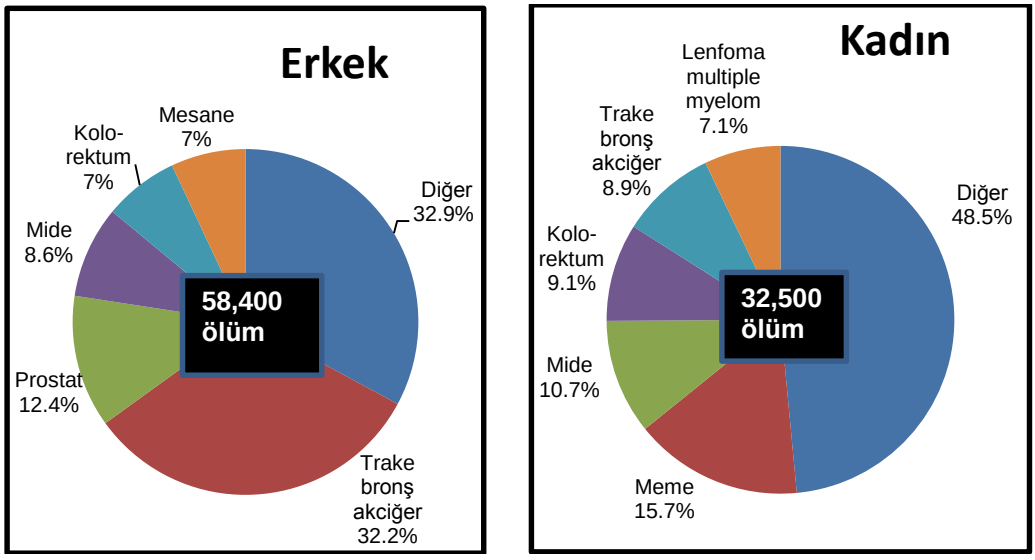
Meme kanseri, meme dokusunda başlayan bir kanser türüdür. Günümüzde, sekiz kadından birine meme kanseri teşhisi konulmaktadır (21). Dünyada kadınlar arasında en çok görülen malign tümör olması açısından da meme kanseri önemlidir. Kadınlarda tüm kanserlerin yaklaşık olarak %29'unu oluşturmaktadır. Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin %14'üne meme kanseri neden olmaktadır. Akciğer ve bronş kanserlerinden sonra ikinci sırayı meme kanserine bağlı ölümler almaktadır (22). Erkeklerde de kadınlar kadar çok olmasa da meme kanserinin görülme ihtimali vardır. Meme kanseri, her 100 kadına karşılık 1 erkekte görülebilmektedir. Erkeklerde risk faktörleri olarak; radyasyona maruz kalma, BRCA 1/2 gen mutasyonları, Klinefelter

sendromu, testiküler bozuklukları, diyabet, jinekomasti, aile öyküsü ve obezite sayılabilir (23,24).

DSÖ'ye bağlı olan International Agency on Cancer for Research'un (IARC) 2012 yılında yapmış olduğu değerlendirmede; bir yıl içinde yaklaşık 1.672.000 yeni meme kanseri olgusu ve 522.000 meme kanserinden ölüm olduğu hesaplanmıştır. Meme kanserli hastalarda hesaplanan 5 yıllık sağ kalım oranına bakıldığında; bu oranın gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Aradaki bu önemli farkın sebebi, gelişmiş olan ülkelerde tarama mamografisi sayesinde erken tanı konması ve daha iyi tedavi olanakları bulunmasıdır. Meme kanseri fatalite hızı gelişmiş olan ülkelerde %25 iken (197.618 ölüm/788.200 olgu), az gelişmiş ülkelerde ise %37 olarak bildirilmiştir (324.289 ölüm/882.949 olgu) (25).

Türkiye'nin batı bölgelerindeki yaşamın batı toplumundakilerine benzerliğinden dolayı, ülkenin doğusu ile batısı arasında meme kanseri sıklığı farkı görülmektedir. Batı tipi yaşam biçiminde meme kanserinin insidans hızının artması ile ilgili öğeler olarak; kadınlarda erken menarş (12 yaşından küçük olması), geç doğum (30 yaşından büyük olması), geç menopoz (55 yaşından büyük olması), daha fazla hormon replasman tedavisi alınması, daha kısa laktasyon süresi ve beslenme alışkanlıklarındaki değişiklikler sayılabilir. Kadınlardaki dört kanserden biri memede yerleşmektedir. Meme kanseri, Türkiye'de kadınlarda en sık görülen kanserden ölüm nedenidir (Şekil 1) (26-28).

Dünya üzerinde görülen meme kanseri sıklığı, ülkeler açısından bakıldığında farklılık göstermektedir (22). Yılda yeni olgu sayısı Avrupa'da 459.000, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde ise 233.000 olarak saptanmıştır (25). 1970 yılından itibaren Japonya, Singapur ve Çin'de ekonominin batı tarzı gelişim göstermesiyle birlikte doğurganlık batı ülkelerine benzemeye başlamıştır. Bu nedenle meme kanseri görülme oranındaki fark giderek azalmaktadır (18). Avrupa ülkelerinde meme kanseri görülme sıklığı, kuzey ülkelerinden güneye ve batı ülkelerinden doğuya doğru gittikçe azalmaktadır (25).



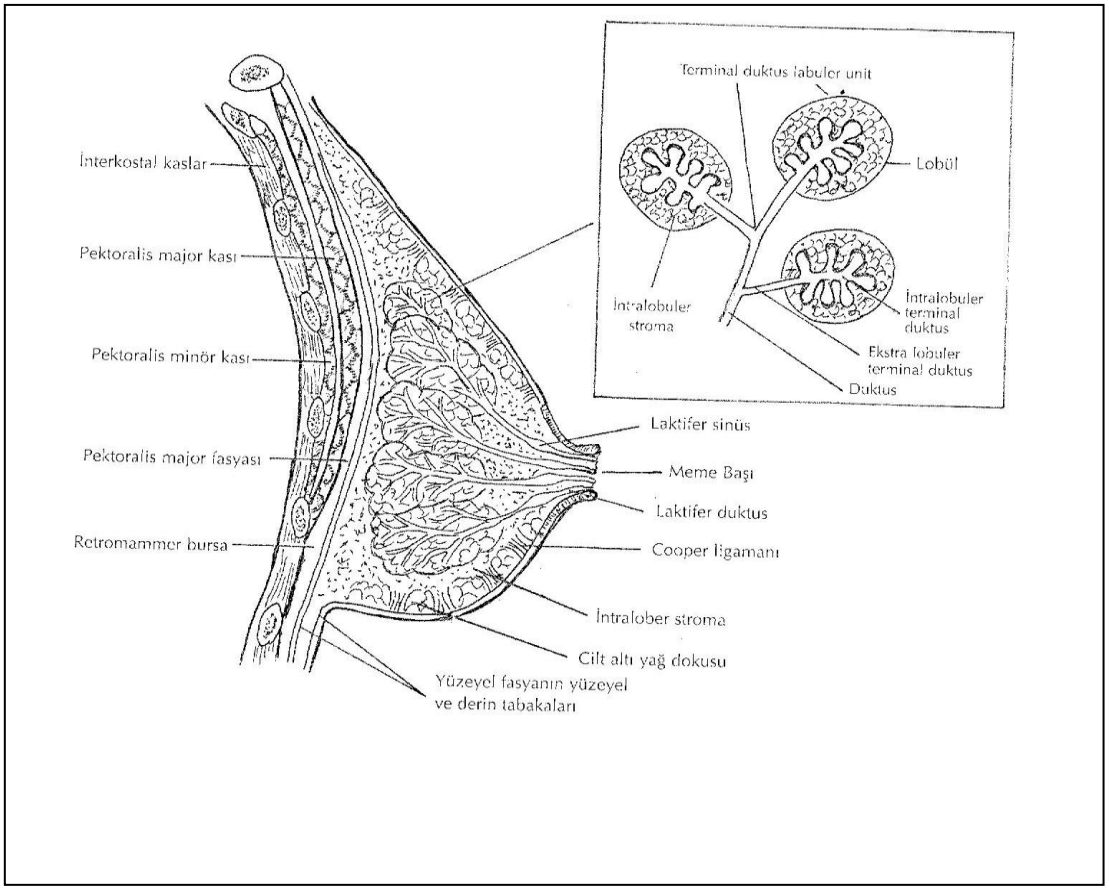
Şekil 1. 2014 yılı Türkiye kanser verileri (28)

MEMENİN ANATOMİK YAPISI

Erişkin olan bir kadında meme bezi, genellikle ön göğüs duvarının yüzeyel pektoral fasyasının yüzeyel ve derin katmanları arasında bulunur (29). 2. ve 7. kaburgaların arasında memeler konumlanır. Sternumun kenarından, ön ve orta aksiller çizgiye değin yer alırlar.

Memenin üst-dış tarafı, diğer kısımlara göre daha fazla salgı bezi niteliğinde olan eleman içerir. Benign ve malign tümörler bu kadranda çok görülür. “Spence’nin aksiller kuyruğu”, meme dokusunun koltuk altına doğru olan uzantısıdır. Bu yapı, Langer deliği denen açıklıktan derin fasyayı geçerek aksillaya kadar devam eder. Memede meydana gelen fizyolojik olaylar burada da görülür.

Meme; lobüller ve ductuslar şeklinde iki bölüm içerir. Lobüller ve ductuslar arasındaki boşlukta destek ve yağ dokusu bulunmaktadır. Memede süt salgılayan kısım olan lobüller, ductuslar ile beraber memenin tam orta yerinde bulunan areola denilen koyu renkli bölgede meme başına açılırlar. Memede lobüllerin birleşmesiyle loblar meydana gelir (Şekil 2) (30). Areola denilen çembersel pigment alan, memenin baş çevresini oluşturur. Areola epitelinde yer alan unsurlar; küçük tüyler, yağ ve ter bezleri, aksesuar meme bezleri. En yoğun meme dokusu, üst dış kadranda yer alır. Aksiller bölge de üst dış kadran içerisindedir. Meme dokusu fazla olduğu için bu bölümde daha çok tümör oluşumu gözlenir (31-33).



Şekil 2. Memenin anatomik yapısı (30)

Memenin çapı ortalama 10-12 cm arasında olup, en fazla kalınlığı santral bölgede göstermekte ve 5-7 cm arasında değişmektedir. Laktasyon dönemi dışında iken bir meme 150 ile 200 gram, laktasyon döneminde ise 400 ile 500 gram ağırlığındadır (29). Memenin genişliği ve sınırları her kadın için değişim gösterir. Yine gebelik, emzirme, şişmanlama, zayıflama ve yaşlılık nedenleri ile de aynı kadın için değişiklik görülebilir.

Memenin kanlanmasını sağlayan damarlar; lateral torasik arter, arteria mamoria interna ve arteria interkostalislerdir. Aksiller lenf bezleri, internal mamarian lenf bezleri, supraklavikular lenf bezleri, intraklavikular lenf bezleri ise memenin lenf bezleridir (31-33).

Meme kanseri; duktal karsinom (infiltratif duktal karsinom ve non-infiltratif duktal karsinom) ve lobüler karsinom (infiltratif lobüler karsinom ve noninfiltratif lobüler karsinom) olmak üzere iki ana sınıfa ayrılmaktadır (34). Memede en fazla süt kanallarının neden olduğu duktal karsinom görülür. Süt üreten keseciklerin neden

olduğu lobular karsinom ise daha az sıklıkla da olsa görülebilir. Meme kanserinin öteki türleri ise ender olarak görülmektedir (35).

Risk Faktörleri

Meme kanserine yol açan nedenler tam olarak bilinmemektedir. Fakat bazı faktörlerle ilişkisi olduğu tespit edilmiştir. Bazı risk faktörleri hasta tarafından kontrol edilebilirken, bazılarının kontrolü mümkün değildir.

1- Kontrol edilemeyen risk faktörleri

a- Yaş: Bireyin yaşının ilerlemesine bağlı olarak meme kanseri olma riski artış göstermektedir. Meme kanseri, 20 yaş altında pek görülmez. Çoğunlukla hastalar 50 yaşın üzerindedir. Meme kanseri olguları sıklıkla postmenopozal dönemde görülür (36).

b- Cinsiyet: Meme kanserlerinin yaklaşık %99'u kadınlarda, %1 kadarlık kısmı da erkeklerde görülür. Meme kanseri yalnızca kadınlara özgü değildir (37).

c- Genetik faktörler: Meme kanserinin genetik faktörlerle ilgisi hastaların %10 kadarında olur. BRCA1 geni tüm yaş gruplarındaki meme kanserlerinin %4'ünde, 40 yaş üstündeki meme kanserlerinin ise %25'inde bulunmaktadır. BRCA2 geni ailevi olgularda; meme kanserinin ortaya çıkışında ve bilateral oluşumunda görev alan bir gendir (36).

d- Diğer memede kanser varsa: Memenin birinde görülen kanser, öteki memede de kanser görülme riskini sağlıklı insanlara göre yaklaşık 2-6 kat arttırmaktadır (37).

e- Erken menstrüasyon ve geç menopoz: İlk menstrüasyonun 12 yaşından önce olması ve menopoz dönemine 50 yaşından sonra girilmesi, kadınlarda meme kanseri riskini arttırmaktadır. Erken menarş ve geç menopoz, kadınların hormonlara maruz kaldığı süreyi arttırmaktadır. Bu da meme kanseri riskini arttırmaktadır. Menarşın geciktirildiği her yıl, meme kanseri olma tehlikesini %20 azaltmaktadır (36).

f- Doğum hikayesi: Kadınlar içerisinde hiç doğum yapmamış olanlar, meme kanseri bakımından tehlikeli sınıfta yer alırlar. İlk doğum yapma yaşı 30 ve üzerinde olanların meme kanseri olma tehlikesi, ilk doğum yapma yaşı 20 olan kadınlara oranla 4-5 kat daha yüksektir (36).

g- Irk: Meme kanseri, beyaz ırka mensup kadınlarda siyah ırka göre daha yüksek bulunmaktadır (38).

2- Kontrol edilebilir risk faktörleri:

a- Alkol: Alkol kullanmanın meme kanseri olma riskini arttırdığı ispatlanmıştır. Günde 15 gr veya daha fazla alkol tüketiminin meme kanseri riskini %50 arttırdığı bildirilmiştir. Özellikle de alkol kullanımına 30 yaşından önce başlanmasının, çok daha tehlikeli bir faktör olduğu vurgulanmıştır (36).

b- Yağlı diyet ve şişmanlık: Yüksek yağlı diyet meme kanseri olma riskini arttırmaktadır. Obezite postmenapozal kadınlarda meme kanseri riskini 2 kat arttırmaktadır. Premenapozal kadınlarda ise insidans, obezlerde düşük iken zayıflarda yüksektir (39).

c- Radyasyon: Meme kanserine neden olan unsurlardan biri de, 30 yaşın altında ve ergenlikten önce radyasyona maruz kalmaktır (36).

d- Oral kontraseptiflerin kullanılması: 35 yaş altında uzun süre oral kontraseptif kullanımı, meme kanseri riskini hafifte olsa arttırmaktadır. Birinci dereceden akrabalarında meme kanseri görülen kadınların, gerek olmadıkça oral kontraseptif kullanmamaları tavsiye edilmektedir (39).

e- Menopoz sonrası hormon tedavisi: Hormon replasman tedavisinin uzun süre kullanımı ile meme kanseri riskinde bir artış olduğu düşünülmektedir. Östrojenin tek başına kısa süreli kullanımı meme kanserinde risk artışına neden olmaz. Fakat bazı çalışmalarda uzun süreli östrojen kullanımında meme kanserinde risk artışı olduğu bulunmuştur (36).

f- Egzersiz: Haftada 4 saat veya daha fazla egzersiz yapan 40 yaşın altındaki kadınların meme kanserine yakalanma oranlarının, hiç egzersiz yapmayan kadınlara göre %60 oranında azalmış olduğu gösterilmiştir (36).

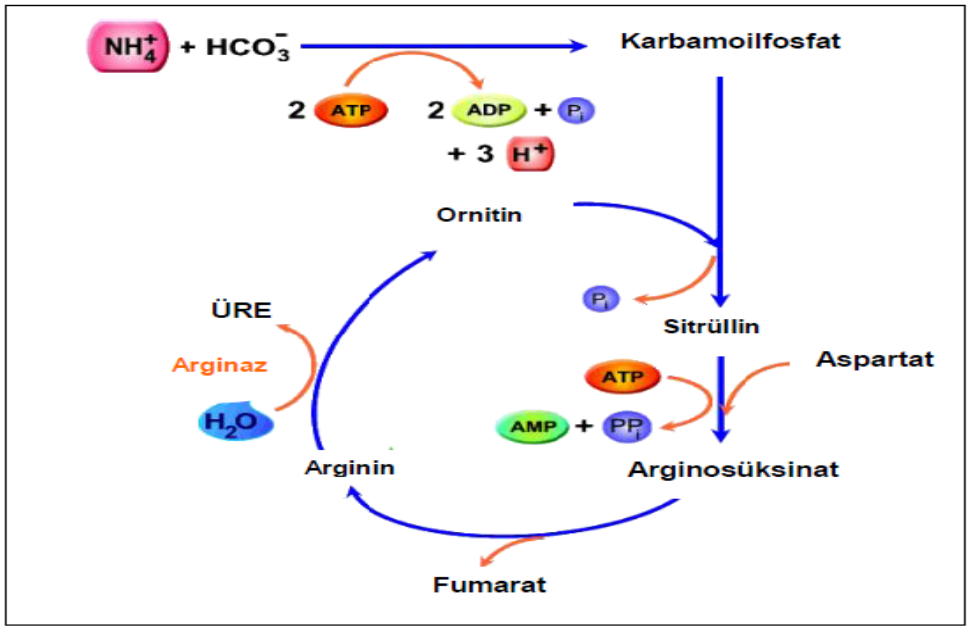
ARGİNAZ ENZİMİ

Amonyak, nitrojen metabolizmasında merkezi rol oynar. Başlıca amino asitlerin yıkımından oluşan amonyak diğer kaynaklardan da meydana gelmektedir. Çok toksik olması nedeni ile canlı organizmasından en kısa sürede atılarak uzaklaştırılmaktadır. Amonyağın organizmadan atılma şekli, canlının hayatını sürdürdüğü ortamdaki suyun miktarına göre değişir. Suda yaşayan canlılar (memeliler hariç), amonyağı hiç bir değişikliğe uğratmadan atarlar. Karada yaşayan canlılar ise ortamda yeterli miktarda su varsa amonyağı üre halinde atarlar. Su düzeyi çok az ise canlılar

amonyağı ürik asit halinde vücuttan atarlar. Canlılar; azot metabolizması son ürününe göre amonyatelik, üreotelik ve ürikotelik olarak ayrılırlar (40,41).

Üre döngüsü, nitrojenin düzenlenmesinde ve amonyak detoksifikasyonunda görev alır. Bu döngünün büyük bir bölümü, üre sentezinde görevli olan enzimlerle beraber karaciğerde bulunur. Üre döngüsünün son enzimi Arginaz (L-arginin amidinohidrolaz E.C. 3.5.3.1) olup, L-arginini üre ve ornitine hidrolize eder (41,42) (Şekil 3). Arginaz, iki izoenzime sahiptir. Arginazın sitozolik formu Arginaz I'dir. Arginaz I, karaciğerde yüksek düzeylerde bulunur. Amonyağın detoksifikasyonundan sorumludur. Arginaz II ise arginazın mitokondrial formudur. Üre döngüsü bulunmayan ekstrahepatik dokularda bulunmaktadır. Özellikle bulunduğu yerler; böbrek, beyin, testis, deri, ince bağırsak, prostat, akciğer ve lökositlerdir. Toplam arginaz aktivitesinin ufak bir bölümünü meydana getirir (43). Arginaz, Co^{+2} ve Mn^{+2} elementleri tarafından aktiflenir (44). Arginaz II, proteinlerin yapısında yer alan prolin ve hidroksiprolinin sentezinin öncülü olan ornitin sentezinde (45,46), poliaminlerin biyosentezinde, immun cevap oluşumunda görev yapar. Tümör biyolojisinde de görev aldığı tespit edilmiştir (47-49).

Arginin, çeşitli dokularda farklı metabolik olaylara katılır ve bazı önemli bileşiklerin yapılarında da bulunur. Protein sentezi, glukoz ve glikojen oluşumu, ornitin, üre, NO, kreatin, agmatin, prolin ve glutamat sentezi, poliaminlerin biyosentezine katılır, antidiüretik hormon (ADH) yapısında da bulunur (43,44,50,51).

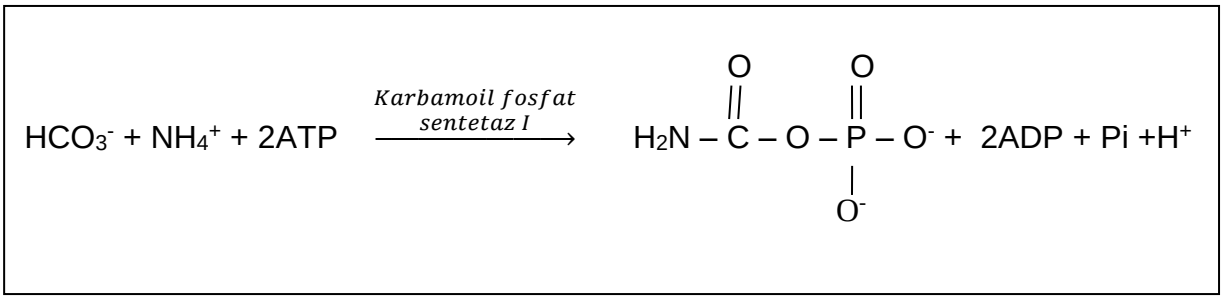


Şekil 3. Üre döngüsü (42)

İnce bağırsak lümeninden enterositler tarafından ekzojen arginin alınır, aktif transportla emilimi gerçekleşir. Argininin küçük bir kısmı enterositlerde metabolize olup protein sentezinde kullanılır. Portal dolaşımla karaciğere taşınan metabolize olmamış arginin ise bir miktar daha metabolize olur. Karaciğerde metabolize olmamış arginin sistemik dolaşıma geçer. Çeşitli dokulara dağılır ve metabolik olaylara katılır. Glomeruler filtrasyona uğrayan argininin neredeyse tamamına yakınının geri emilimi olur (44,52). Ağız yolu ile alınan arginin, yaklaşık 1 veya 2 saat sonra plazmada en üst seviyelere ulaşır (53).

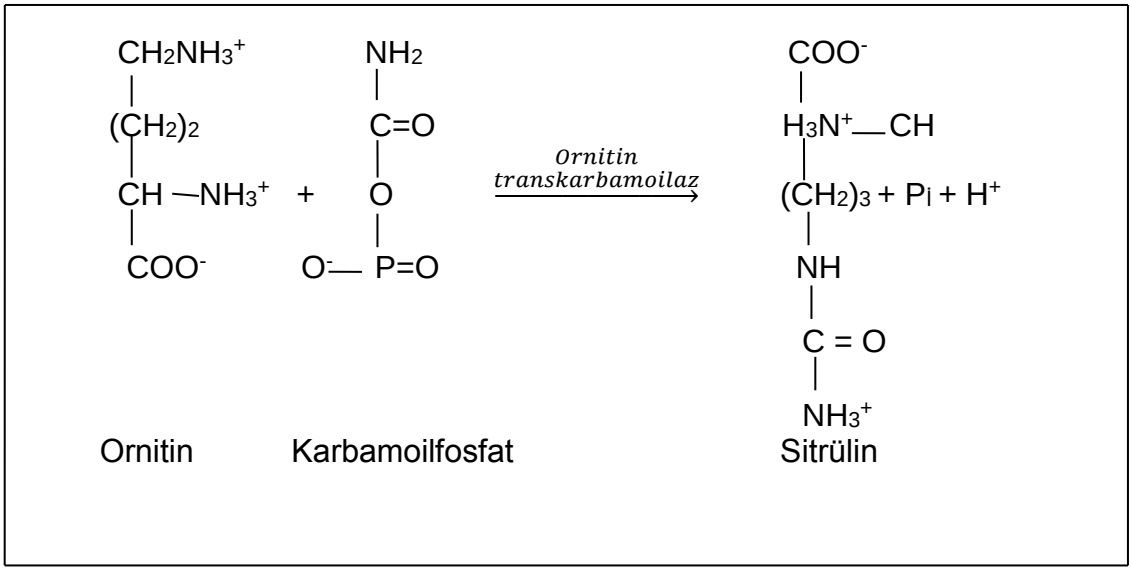
Vücutta endojen argininin sentezi, üç şekilde gerçekleşir: Sitrülinden arginin sentezi şeklinde, glutamattan arginin sentezi şeklinde ve proteinlerin yıkılımı ile arginin oluşur (43,44).

İnce bağırsak, böbrek ve üre döngüsünün bir parçası olarak karaciğerde, sitrülinden arginin sentezi gerçekleşir. Sitrülin, ince bağırsakta glutaminden oluşur ve sistemik dolaşıma geçer. Böbrekler tarafından alınan sitrülinin proksimal tubullerde arginine çevrilimi gerçekleşir. Sentez sırasında görevli enzimler; arginosüksinat sentetaz (ASS) ve arginosüksinat liyaz (ASL)'dır. Gerekli enerji, ASS'nin katalizi sonucu ATP'den sağlanır (44).



Şekil 4. Karbamoil fosfat oluşumu (54)

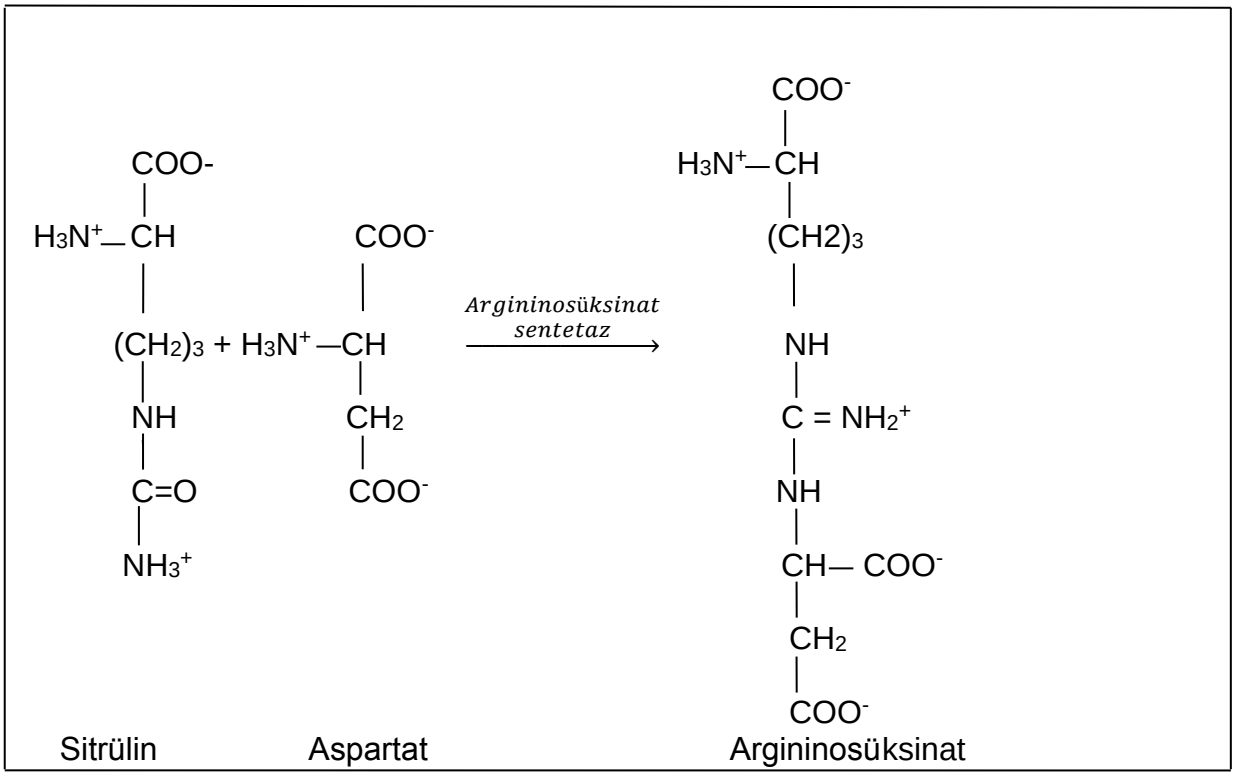
Sitrülinin karbamoil kısmına (Şekil 4) (54) aspartatın amino grubu bağlanır ve böylece arginosüksinat bileşiği meydana gelir. Argininosüksinat ise ASL tarafından arginin ve fumarata dönüştürülür. Oluşan arginin, plazma arginin düzeyine yaklaşık %10 kadar katkı sağlar. ASS ve ASL, karaciğerde üre siklusunun parçası olarak görev alırlar. Böbrekteki tepkimelerin aynısı burada da meydana gelmektedir (44).



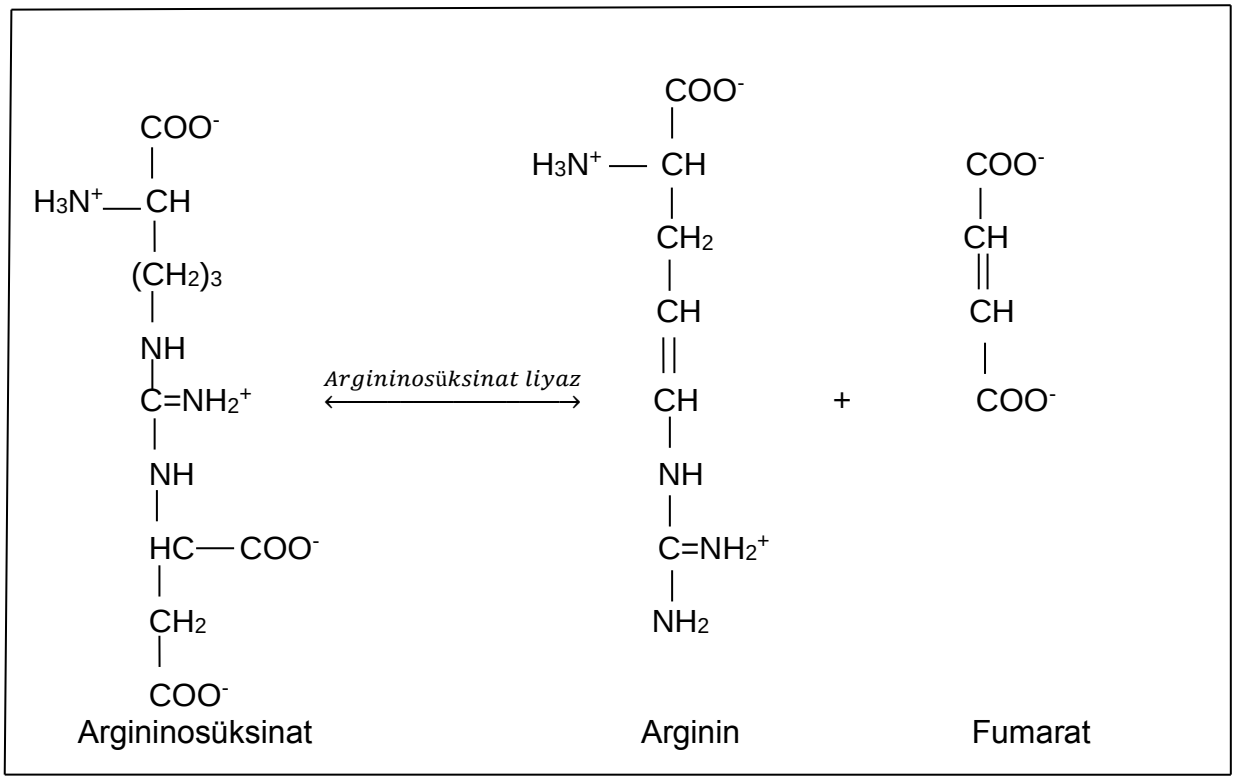
Şekil 5. Ornitinden sitrülin oluşumu (54)

Glutamatın α amino grubuna, asetil KoA aktarılır. Böylece N-asetil-glutamat oluşur. Reaksiyonda görevli enzim N-asetil glutamat sentazdır. N-asetil glutamat, N-asetil glutamat kinaz tarafından fosforilasyona uğratılır ve N-asetil-γ-glutamil fosfat oluşur. Fosfat grubu, ATP'den sağlanır. N-asetil-γ-glutamil fosfat, N-asetilglutamat dehidrogenazla indirgenir ve N-asetil-glutamat-γ-semialdehit oluşur. N-asetilglutamat-γ-semialdehitin aminotransferaz tarafından transaminasyonu ile N-asetilornitin oluşur. N-asetilornitinin asetil grubunun N asetil ornitaz ile hidrolizi sonucu da ornitin meydana gelir. Ornitinin arginine dönüşümü, 3 basamakta üre döngüsünde gerçekleşir. Karbamoilfosfatın karbamoil grubu ornitin transkarbamilaz tarafından ornitine aktarılır ve sitrülin oluşur (Şekil 5) (54). Sitrülinden arginosüksinat (Şekil 6) (54), arginosüksinattan da arginin ve fumarat (Şekil 7) (44,54) oluşur.

Arginin glikojenik bir aminoasittir. Arginaz aracılığı ile ornitin ve üreye çevrilir. Karaciğerde, üre döngüsünün parçası olarak bu reaksiyon gerçekleşir. Ornitin transaminasyonla glutamat-γ-semialdehit üzerinden α-ketoglutarata (Sitrik asit siklusunun bir metaboliti olup glukoneogenez substratıdır) çevrilir. Oluşan glukoz ise ihtiyaç durumuna göre karaciğer ve kasta glikojene dönüşür (44).



Şekil 6. Arginosüksinat oluşumu (54)



Şekil 7. Arginin ve fumarat oluşumu (54)

Arginaz Enziminin Tıbbi Açıdan Önemi ve Kanserle Olan Bağı

Sağlıklı yetişkinlerde arginin esansiyel değildir, noksanlığına pek rastlanmaz. Fakat; aşırı negatif azot dengesine bağlı olarak vücutta noksanlığı gelişebilir. Arginaz eksikliği nedeni olan durumlar; çok hızlı büyüme, hamilelik, travma, sepsis, kanda aşırı amonyak, arginine rakip olan lizinin varlığı ve malnütrisyondur (55,56). Saçların kırılması ve dökülmesi, kötü yara iyileşmesi, konstipasyon, musküler distrofi benzeri kassal zayıflıklar ise, arginaz eksikliği belirtileridir. Karaciğerde, glukoz ve lipid metabolizmasında anormallikler görülür. Karaciğer yağlanması, hepatik siroz ve hepatik koma gelişebilen durumlardandır. Böyle durumlarda argininin dış ortamdan alınması zorunludur (56).

Hiperargininemi, otozomal resesif kalıtım gösteren arginaz eksikliğine bağlı olarak gelişir. Enzimde kısmi veya tam bozukluk vardır. Çok ender görülen bir genetik hastalıktır. Doğum sonrası ilk yıl arginin fazlalığı asemptomatiktir. Bulguların ortaya çıkması diyetteki protein miktarı artışına bağlıdır. Mental gerilik, epileptik nöbetler, spastik dipleji görülebildiği gibi hiperammonemik koma da gelişir. Kan, idrar ve serebrospinal sıvıda arginin ve amonyak yükselmesi ile kendine özgü bir tablo gelişir. Eritrositlerde, arginaz aktivitesi azalmış olarak tespit edilir. Bu hastalara, arginin ve proteinden fakir diyetin yanında semptomatik tedavi de uygulanır (44,57,58).

Argininin esas görevi nitrik oksit (NO) sentezinde bir öncü madde olmasıdır. L-arginin endotel hücrelerinde NO yardımı ile vazokonstriksiyonu, trombotik aktiviteyi, düz kas hücresi proliferasyonunu, enflamasyonu, intimal lezyon oluşumunu baskılar (59,60).

Arginaz enzim aktivitesi üzerinde hormonların nasıl etki yaptığını araştırmak üzere çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Glukokortikoidlerin; protein yıkılımına neden olarak üre döngüsü enzimlerini ve arginazı yükselttiği, kortikosteroidlerin karaciğer arginazını aktive ettiği saptanmıştır. Fakat; glukokortikoidlerin böbrek arginazı üzerinde etkili olmadığı tespit edilmiştir (61,62).

Çeşitli kanser türlerinde araştırmacıların yapmış oldukları çalışmalarla, arginazın kanserle olan yakın ilişkisi ortaya çıkarılmıştır. Meme kanseri olan kadınların ameliyat öncesinde serum arginaz düzeyinin, hasta olmayan kadınlarınkine göre 4 kat daha yüksek olduğunu Stratus ve ark. (63) bildirmiştir. Kolorektal kanserli hastalarda ise serum arginaz düzeyini Leu ve ark. (64) araştırmışlardır. Kolorektal kanserli dokularda sağlıklı mukozal dokulara oranla 2 kat

artmış arginaz aktivitesi bulunmuştur. Gastrik kanserli hastalarda, Wu ve ark. (65) plazma arginaz aktivitesini araştırmışlar ve beklenenden fazla bir aktivite bulunmuştur. Hepatobilier kanalda kötü huylu tümör bulunan hastaların serum arginaz aktivitesinde artış olmuştur. Bu durum da, arginaz bakımından zengin olan karaciğer hücreleri tarafından enzim salgılandığını göstermektedir. Akut hepatitte de aynı durum, serum arginaz aktivitesinde artışa neden olmaktadır.

Bu çalışmalar nedeniyle arginazın ölçümünün, kanserin tanısında bir belirteç olabileceği bildirilmiştir (63,64).

NİTRİK OKSİT

Furchgott ve Zawadski adlı araştırmacılar 1980 yılında endotel hücreleri tarafından asetil kolin uyarısıyla yapılan damar düz kasını gevşetici bir madde bulduklarını bildirdiler. Buldukları maddeye endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF: Endotel Derived Relaxing Factor) adı verildi. Palmer ve arkadaşları 1987'de EDRF'nin bilinen biyolojik etkilerinde nitrik oksit (NO) adlı bir gazın sorumlu olduğunu buldular (66-69).

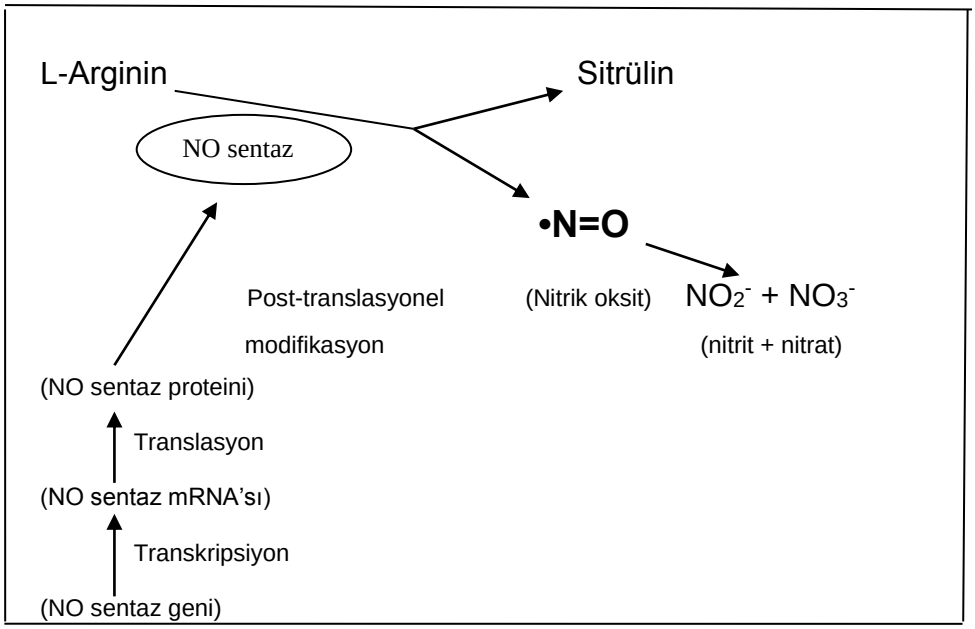
Geçen son on yılda NO ile ilgili yapılan çalışmalar; bu gazın eskiden bilindiği gibi sadece hava kirliliğine neden olmadığını, aslında pek çok biyolojik işlemde önemli rolü olduğunu göstermiştir (70,71).

Nitrik oksit, renksiz bir gazdır. NO yüksek konsantrasyonunda oksijensiz ortamda oldukça stabildir, suda erime özelliği gösterir. NO düşük konsantrasyonunda ise oksijen varlığında bile stabildir. Havadaki NO, kısa sürede O_2 ile oksitlenir ve nitrojen dioksite çevrilir. Nitrojen dioksit, dokular için oldukça zararlı bir bileşiktir. Nitrik oksit, üzerinde çiftlenmemiş elektron bulundurur. Bu özellikleri, ona hiçbir bariyerle karşılaşmadan hücreden hücreye kolaylıkla geçmesini sağlamaktadır. Nitrik oksit, aynı zamanda taşıdığı çiftlenmemiş elektron nedeniyle radikal molekül olarak kabul edilir. Hücreler için serbest radikallerin her konsantrasyonda zararlı etkileri vardır. NO'nun ise düşük konsantrasyonlarda önemli fizyolojik işlevleri vardır. Fazla ve kontrol dışı olan NO sentezi de hücrelere zarar vermektedir. NO, sahip olduğu bu özellikleri ile iyi bir fizyolojik haberci molekülü özelliği kazanmaktadır (72).

Oksijene kıyasla düşük konsantrasyondaki NO, hemoglobine 3000 kat fazla olan bir affiniteyle bağlanır. Oksi formundaki hemoglobin ise, NO'yu kısa sürede nitrata (NO_3^-) oksitleyerek etkisiz duruma getirir. Özellikle de dolaşımdaki

oksihemoglobin, NO için güçlü bir inhibitördür. NO, nitrite de (NO_2^-) okside olabilir; ancak nitrit tekrar oksitlenir ve kısa sürede nitrata dönüşür (73). Diğer serbest radikaller gibi NO'da çok kısa yarılanma süresine sahiptir. 2-30 saniye gibi kısa bir süre içinde de daha stabil bir yapı olan nitrata oksitlenir (74,75).

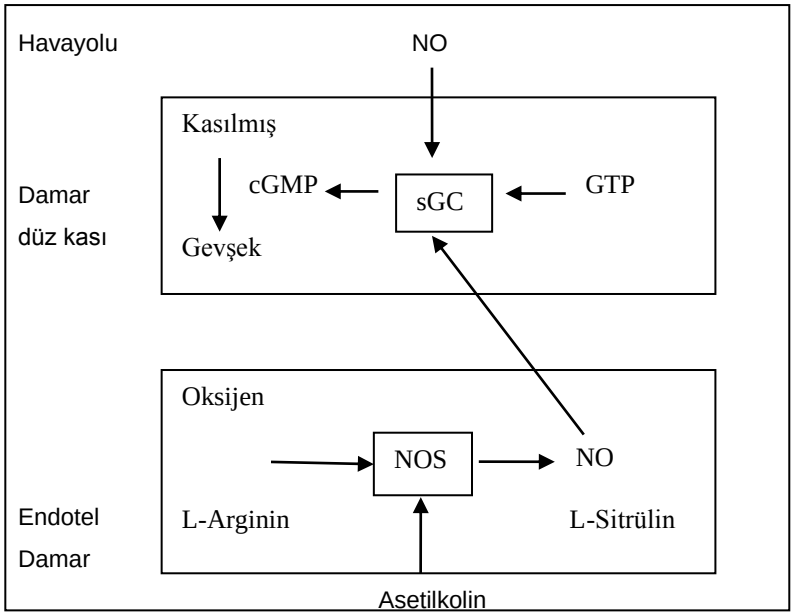
Nitrik oksit; düz kas, endotel hücresi ve diğer memeli hücrelerinde L-arginin amino asidinin guanido nitrojeninin nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi yardımı ile oksitlenmesi sonucunda sentez edilir (Şekil 8) (72). Sentez için nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), kalmodulin, oksijen ve dört kofaktöre ihtiyaç vardır. Bu kofaktörler; hem, flavin mononükleotid, flavin adenin dinükleotid ve tetrahidrobiyopterindir (76).



Şekil 8. NO'nun L-argininden NOS geni tarafından sentezi (72)

Asetil kolin, bradikinin, glutamat, adenozin difosfat (ADP) gibi fizyolojik uyarılar endotel hücrelerinde NOS'u aktif hale getirirler. Bu enzim Kalsiyum-kalmoduline bağımlıdır. Aktifleşince, L-arginin ve oksijenin reaksiyona girerek L-sitrülin ve NO'ya dönüşmesini sağlar (66-70). NOS enzimini yarışmalı yol ile inhibe eden L-arginin anologlarının bulunması, çalışmalarda kullanılması nedeniyle NO'nun geniş olarak biyolojik rolünü araştırma olanağı bulunmuştur. Bu reaksiyon sonucu oluşan NO, damar düz kası hücrelerine diffüze olur. Guanilat siklaz enziminin hem grubuna bağlanır ve enzimi aktif duruma getirir. Aktifleşen guanilat siklaz enzimi ise guanozin

trifosfatı siklik guanozin monofosfata (cGMP) çevirir. cGMP'de kas gevşemesine sebep olur (66) (Şekil 9).



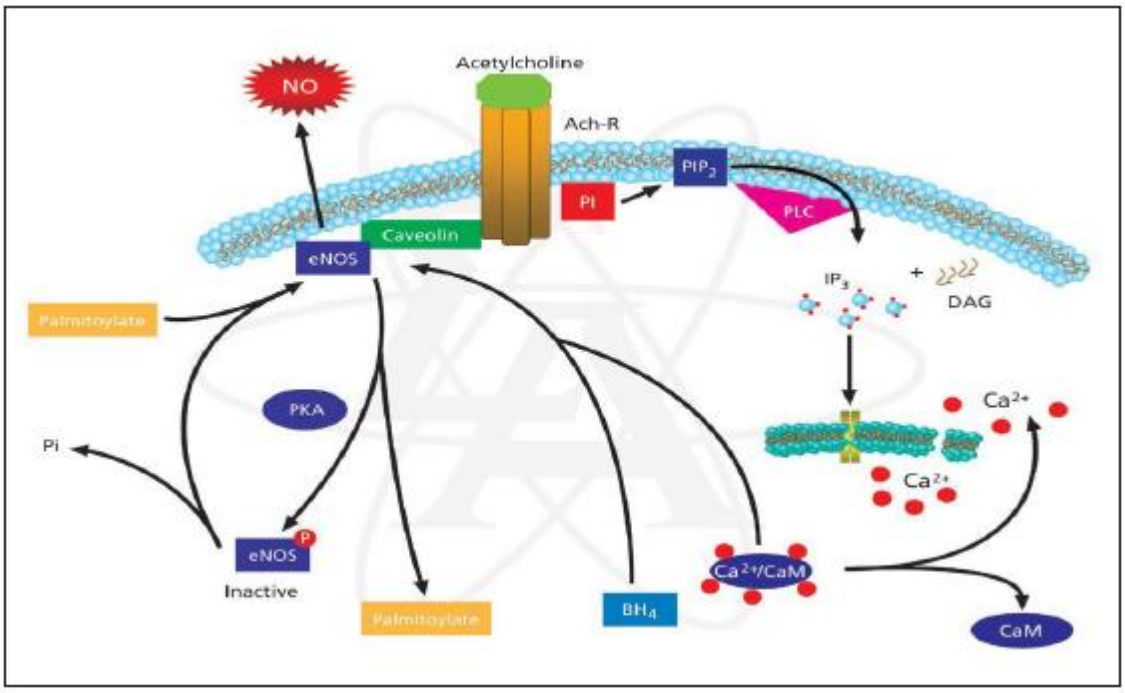
Şekil 9. Nitrik oksitin damar düz kasındaki fizyoloik ve farmakolojik etkileri (66)

Nitrik oksit sentaz (NOS)'ın üç izoformu vardır. Bunlardan ikisi yapısal formudur. Diğeri ise sitokin ve diğer bileşikler tarafından uyarılabilen formudur. Yapısal izoformları; endotelyal NOS (eNOS veya NOS3) ve nöronal NOS (nNOS veya NOS1)'tur (77). Hücrede infeksiyon ve inflamasyon gibi anormal durumlarda ise indüklenen izoformu (iNOS veya NOS2) uyarılır (78).

1) Endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS): Enzim ilk kez endotel hücrelerinde tanımlanmıştır. Aktif hale gelmesi için kalsiyuma ihtiyaç vardır. eNOS ve nNOS'un sentez süresi kısadır ve üretilen NO miktarı çok düşüktür. Bunun nedeni, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun düşmesiyle enzimin inaktif hale geçmesidir (79).

Endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS), 134 kDa'lık iki benzer monomerden meydana gelen bir dimerdir. eNOS monomeri, fonksiyonel olarak iki farklı bölgeye sahiptir. Bu bölgeler; N-terminal oksijenaz bölgesi ve C-terminal redüktaz bölgesidir. eNOS enzimi yalnızca dimerik formda iken fonksiyoneldir (80,81). Redüktaz bölgesi; NADPH, FAD ve FMN flavinleri ve kalmodulin için bağlanma bölgelerine sahiptir. N-terminal oksijenaz bölgesi katalitik bölge içerir. Bu bölge; L-arginin, BH4 ve hem için bağlanma bölgelerine sahiptir. Redüktaz bölgesi, flavinlerden oksijenaz bölgesine bağlı "hem" grubuna elektron transferi yapar.

“Hem” molekülünün bağlanması ile enzim dimerik hale gelmeye başlar. Hem’in yokluğunda ise enzim monomer halde kalır. Enzime dimerik halde iken BH4 bağlanabilir ve dimeri kararlı hale getirir. Aynı zamanda çinko iyonları ile de kararlı hale geçiş sağlanır. eNOS dimerinin fonksiyonel aktivitesi BH4 moleküllerinin bağlanma sayısı ile ilişkilidir. Bir eNOS dimerine BH4 bağlanmamış ise $O_2^{\bullet-}$ üretmeye eğilimlidir. eNOS dimerine BH4 molekülünün birinin bağlanması ise NO ve $O_2^{\bullet-}$‘nin her ikisini de üretme eğilimi ile sonuçlanır. Yüksek seviyede BH4 varlığında ise doymuş bir dimer oluşturulur ve yalnızca NO sentezleyen bir enzim oluşması sağlanır. Hücre içi artan Ca düzeyleri kalsiyum/kalmodulin kompleksinin oluşmasını sağlar. Bu kompleks kaveolinle yer değiştirir. NOS enzimindeki kalmodulin bölgesine bağlanarak enzimi aktif hale getirir (80-82) (Şekil 10).



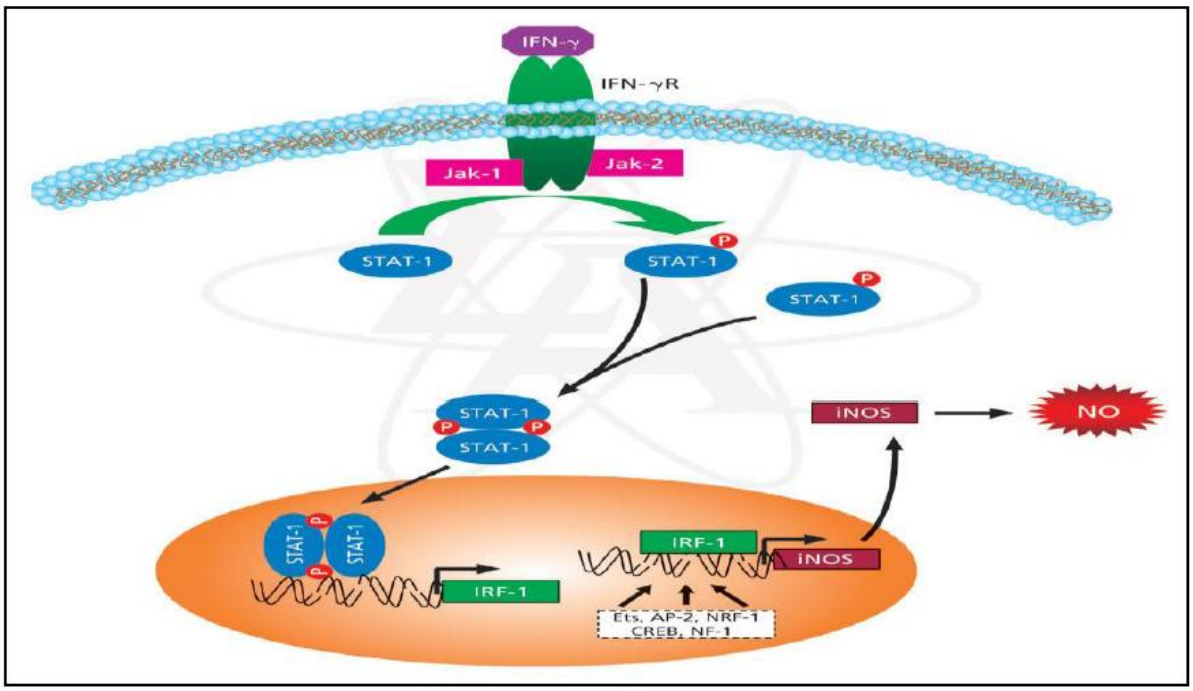
Şekil 10. eNOS enziminin etki mekanizması (82)

2) İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS): 130 kDa’lık sitozolik bir enzimdir (80). Endotoksin ve sitokinler (IL-1, TNF, IF-γ) tarafından indüklenir. İndüklendiğinde daha uzun sürede ve büyük miktarlarda NO üretir, Ca^{+2}’den bağımsız bir sistemdir. iNOS makrofajlarda, epitelyum hücrelerinde ve damar düz kas hücrelerinde yer alır (83).

L-argininden NO oluşumu, N-monometil-L-arginin (L-NMMA), N-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME), N-nitro-L-arginin (L-NA), L-amino-N-arginin (L-NAA) ve

N-iminoetil-L-ornitin (L-NIO) gibi ajanlar tarafından kompetitif olarak inhibe edilebilir (73).

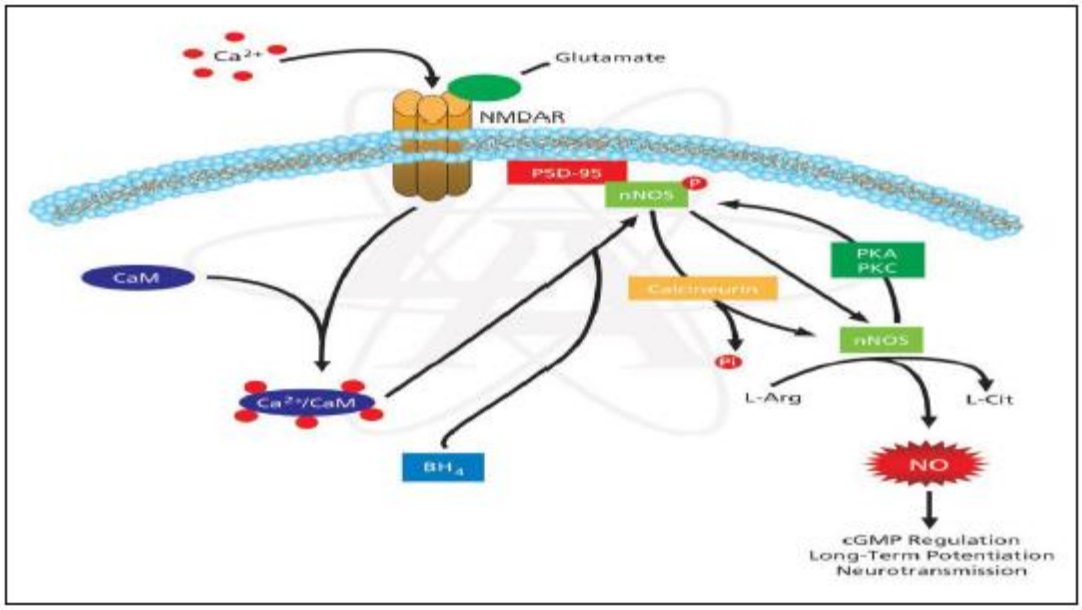
Sentezlenen NO, hücre membranları arasına difüze olur. Henüz depolanma mekanizması kesin olarak bilinmemektedir. NO dokularda ve oksijenlenmiş fizyolojik sıvılarda hızlı bir şekilde yıkıma uğrar. NO'nun eliminasyon yarılanma süresi, dokuya ve türe göre değişmektedir. Bu süre 10-60 saniye arasında değişmektedir. NO'nun inaktivasyonunu hızlandıran serbest oksijen radikallerinin nötralize edilmesi Superoksit dismutaz enziminin ortama katılması ile gerçekleşir. NO yıkımı yavaşlar, etkisi potansiyalize edilir (82,84) (Şekil 11).



Şekil 11. iNOS enziminin etki mekanizması (82)

3) Nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS): 160 kDA'lık polipeptiddir. Enzim, sitokrom P450 ile %36 benzerlik göstermektedir. NADPH, FAD, FMN ve kalmodulin için bağlanma bölgesine sahiptir (Şekil 12) (82). nNOS başta beyin, spinal kord, sempatik gangliyon gibi sinir sisteminde yer alır.

Solunum fonksiyonlarında, gastrointestinal sistem (GİS) motilitesinde, tüm dokuların kan basınçlarının ve akış hızının düzenlenmesinde nNOS görev alır (79).



Şekil 12. nNOS enziminin etki mekanizması (82)

EPİGALLOKATEŞİN-3-GALLAT

Çay, dünya üzerinde sudan sonra en fazla tüketilen içecektir (85). Günümüzde ticari olarak üretilen çaylar; siyah çay (%76), yeşil çay (%22) ve oolong çayı (%2) dır (86). *Camellia sinensis* bitkisinin yapraklarından elde edilirler. Çeşitli bileşikler içerirler; fakat en önemlisi polifenollerdir (87). Yeşil çayın diğer bileşenleri olarak kafein, theanin, vitaminler, organik asitler, polisakkaritler, protein, lignin, florid ve mineraller sayılır (86,88) (Tablo 1). Polifenollerin miktarı genetik özelliklere bağlıdır. Ancak iklim, ışık, yağış miktarı gibi çevresel faktörlerden de etkilenip değişiklik gösterir (89).

Çin mitolojisine göre; M.Ö. 2737'de imparator Shen Nung çayı ilk bulan kişidir. M.Ö. 2700'lerde yeşil çayın sağlığa faydaları ile ilgili ilk bilgiler vardır. M.S. 1211 yılında ise Japon rahip Eisai tarafından ilk bilimsel yayın yazılmıştır. 16. yüzyılda Avrupalılar tarafından, yeşil çayın tedavi edici olduğu söylenen etkileri keşfedilmiştir. Ateş, baş ağrısı, mide ağrısı ve kesiklerin ağrısını azaltmaya çalışırken etkileri anlaşılmıştır (90).

Yapılan çalışmalar ile yeşil çayın; antioksidan, antienflamatuar, antimutajenik, antikanserojenik, antianjiyogenik, apoptotik, obezliği önleyici, kolesterolü düşürücü, damar sertliğini önleyici, antidiabetik, antibakteriyel, antiviral ve yaşlanmayı geciktirici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (13,91). Yeşil çayın sağlık açısından faydalı olan etkilerine, özellikle içeriğinde yer alan kateşinlerin neden olduğu belirtilmektedir.

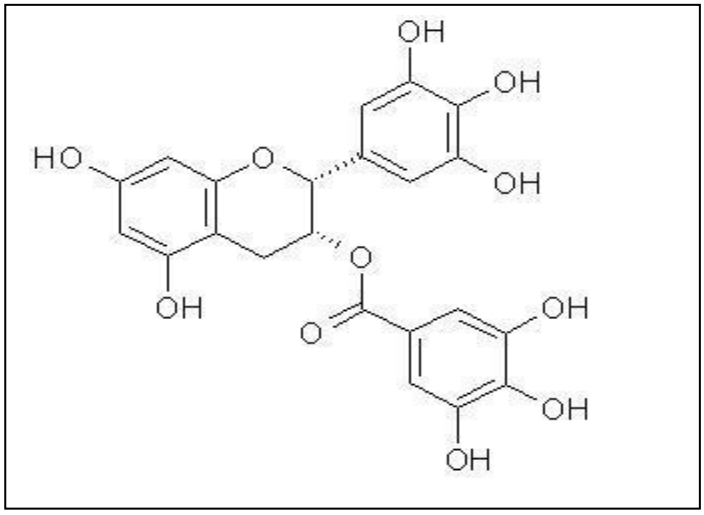
Tablo 1. Çay yaprağının kimyasal içeriği (86)

Bileşen	% Kuru Madde
Flavanoller (Kateşinler)	17-30
Kateşin (C)	1-2
Gallokateşin (GC)	3-4
Epikateşin (EC)	1-3
Epikateşin gallat (ECG)	3-6
Epigallokateşin (EGC)	3-6
Epigallokateşin gallat (EGCG)	3-9
Leykoantosiyaninler	2-3
Flavonoller ve flavonol glikozitleri	3-4
Aminoasit ve protein	15-19
Basit karbohidratlar	4
Kafein	3-4
Polifenolik asitler ve depsitler	5
Kül	5
Polisakkaritler	13
Selüloz	7
Lipitler	2-3
Lignin	6
Pigmentler	0,5
Organik asitler	0,5-1,5
Toplam polifenoller	30-36

Yeşil çay ve içeriğindeki kateşinlerin, kansere karşı koruyucu etkisi olduğunu ifade eden yayınlar vardır. Bu etki; hücre döngüsünü durdurma, hücre çoğalmasını engelleme (9), sitokinlerin salınımını azaltma, etken reseptörleri baskılama (10), mitotik uyarıları baskılama (92), detoksifikasyon enzimlerini etkinleştirme, mutajeniteyi ve genotoksisiteyi önleme, serbest radikal temizleme, kanser hücrelerinin apoptosisini hızlandırma (11) ve anjiojenesisi engelleme (12) gibi mekanizmalarla ifade edilmektedir.

Kateşinler polifenoller grubundandır. Şarap, çikolata, meyve ve çay içinde yer alan flavanollerdir. Ayrıca meyveler ve meyve suları da polifenolik kateşinleri içermektedir (93,94). Kateşinler, yeşil çayın kuru ağırlığının %30-42'sini oluşturur. Epigallokateşin-3-gallat (EGCG) (Şekil 13) (82), epigallokateşin (EGC), epikateşin-3-gallat (ECG) ve epikateşin (EC) çay yapraklarında bulunan kateşinlerdir (87). Çay flavanolleri, farklı antioksidan etkilere sahiptir. Hidroksil gruplarının sayısı, bağ yaptıkları yerler ve galloil parçalarının varlığına bağlı olarak bu etkiler görülmektedir

(95,96). Çay yapraklarında bulunan major kateşinlerin (Şekil 14) (97) antioksidan aktiviteleri; epigallokateşin gallat>epigallokateşin>epikateşin gallat>epikateşin olarak sıralanır. Epigallokateşinin molekül formülü $C_{22}H_{18}O_{11}$'dir ve molekül ağırlığı ise 458,4 Dalton'dur. Bitkilerde bulunan kateşinler, doğal antioksidan aktiviteleriyle bilinirler ve gastrointestinal, vasküler, viral, inflamatuar hastalıklarda tedavi amacıyla kullanılırlar (93,94).



Şekil 13. EGCG'nin kimyasal şekli (82)

Yapılarında yer alan çift bağdan dolayı, flavanoidlerin 8 farklı yapısı bulunmaktadır (98-102). Bunlar;

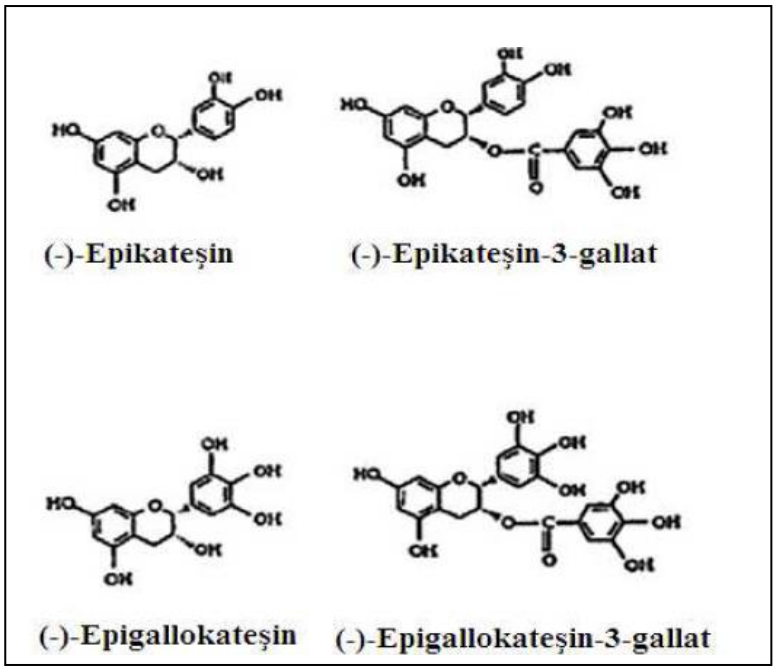
1. Kateşin (K),
2. Epikateşin (EC),
3. Gallokateşin (GC),
4. Epigallokateşin (EGC),
5. Kateşingallat (KC),
6. Epikateşingallat (EKC),
7. Gallokateşingalat (GCG),
8. Epigallokateşingallat (EGCG).

Yiyeceklerde olduğu gibi canlı organizmalarda da oksidasyon reaksiyonları gerçekleşmektedir. Oksidasyon, insanlarda hücrelere enerji sağlar. Bu olay sırasında çeşitli hastalıklara sebep olan serbest radikaller de meydana gelmektedir. Lipitlerin oksidasyonu, serbest radikal zincir tepkimesidir. Reaktif radikal ile hidroksitlerin artışına sebep olur. Bunlar; LDL'nin oksidasyonunu, membran ve trombosit

fonksiyonunu etkiler. Serbest radikaller, DNA'da mutasyonlara da yol açabilirler. Çay kateşinleri, hidrojen atomundan serbest radikal alıcısı gibi yaparak zincir oksidasyon reaksiyonunu keserek antioksidan etki gösterirler (99).

Çay bileşimindeki kateşinler; kimyasal olarak suda çözünebilir, renksiz moleküllerdir (98,100). Heterosiklik oksijen halkasının moleküldeki konformasyonundan dolayı, moleküllerde kimyasal farklılıklar görülmektedir.

Kateşinler, A halkasında meta-5,7-dihidroksil ve B halkasında di veya tri-hidroksil gruplarıyla kendilerine özgüdürler. EC; B halkasında 3' ve 4' karbonlarında orto-hidroksil, EGC; B halkasında tri-hidroksil grubu taşımaktadır. ECG; B halkasında di-hidroksil grubu ve C halkası 3. karbonuna bağlı gallat grubu taşımaktadır. EGCG; B halkasında tri-hidroksil ve C halkasında gallat grubu taşımaktadır. EGCG ve ECG'deki antioksidan aktivitelerini arttıran gallat halkasıdır (98,103,104).



Şekil 14. Yeşil çayda bulunan majör polifenoller (97)

Kateşinler ince barsaktan absorbe edilirler. Metilasyon, glukuronidasyon ve sülfasyon ile hızla konjuge metabolitlerine dönüşürler. Safraya atılan konjuge kateşinler, kolondaki bakteriler tarafından dekonjuge edilerek daha basit metabolitlere parçalanır. EGCG safra yolu ile atılırken, EC ve ECG ise safra ve idrar yolu ile atılmaktadır. Kateşinler için oral, intravenöz (iv), intraperitoneal (ip) uygulama

sonrası faz II reaksiyonu tanımlanmış; fakat faz I reaksiyonu gösterilmemiştir (98,103).

Kateşinlerin biyoyararlanımı, düşük absorpsiyon ve yüksek eliminasyon özellikleri nedeniyle sınırlıdır. Yarı ömrü en fazla olan kateşin, EGCG (173 dk)'dir (105).

Yeşil çayda bulunan, fenolik yapıda olan kateşinlerin en önemlilerinden biri EGCG'dir. Bu kateşin, yeşil çayın farmakolojik aktivitelerinden sorumlu olup, en fazla oranda bulunan kateşindir (14).

Epigallokateşin-3-gallat (EGCG)'ın, yeşil çayda bulunan en etkin kateşin olduğu ve C vitaminine göre 100 kat, E vitaminine göre 25 kat daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu öne sürülmüştür (15). Çay kateşinlerinin; antimikrobiyal, antioksidan, anti-HIV, anti-mutajenik, antikanserojen özellikleri ve kalp-damar hastalıklarını önleyici etkileri olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (15-17). Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI)'ne göre, EGCG'nin kanser önleyici bir madde olduğu belirtilmiştir (15).

Polifenoller; hücrelerde oluşan serbest radikallerin oksidatif hasarından koruyan, tümörleşme karşıtı, fonksiyonel antioksidan moleküllerdir. EGCG; kanser genlerinin ekspresyonuyla ilişkili enzimlerin, hücrelerin sınırsız yaşama yetenekleriyle ilgili olan telomerazı ve DNA metiltransferazı baskılar. EGCG'nin anti-mutajenik, anti-anjiyojenik, anti-proliferatif, pro-apoptotik etkileri vardır. İn vivo ve in vitro ortamda bu etkilerin görüldüğü öne sürülmüştür (106).

Mevcut literatür bilgisine göre, EGCG'nin hücre çoğalması veya hücre ölümü üzerindeki etkilerine önem verilmiştir. EGCG'nin apoptoza yönlendiren etkileri; insan prostat kanseri hücre serilerinde (107), insan epidermoid karsinoma A431 hücrelerinde (108), meme karsinoma MCF-7 hücreleri (109), melanoma hücreleri (110) ve pankreas kanser hücreleri (111) gibi birçok insan hücre hattında gösterilmiştir.

Epigallokateşin-3-gallat'ın antioksidan etkinliklerinin, aromatik halkalara ve hidroksil gruplarına bağlı olabileceği vurgulanmıştır. Bu özelliklerine bağlı olarak serbest radikalleri yakaladığı ve nötr hale getirdiği ileri sürülmüştür. Apoptoz indüksiyonu ve hücre replikasyonunun inhibisyonu tümör başlangıcı ve yayılmasının biyokimyasal işaretçileridir. Bunlar tümörün gelişimini ve büyümesini engeller. EGCG'nin, proteaz olan ürokinazı da inhibe ettiği ileri sürülmüştür. Ürokinaz, kanserli

hücrelerin metastaz amacıyla kullandıkları enzimdir. EGCG ve ECG'nin, metalloproteinaz-2 (MMP-2) (gelatinaz-A olarak da bilinir) ve metalloproteinaz-9 (MMP-9) (gelatinaz-B)'u inhibe ettiği ileri sürülmüş olup bu enzimler, tümör invazyonu ve metastazında görev almaktadır. EGCG'nin anti-matriks metalloproteinaz ve anti-anjiojenesis etkileri de vardır (112). EGCG'nin; insanda antioksidan (113-115), anti-mutajenik, anti-karsinojenik (116) ve anti-HIV (17) etkileri de vardır.

Çay polifenolleri sahip oldukları nitelikleri ile kanserin başlama ve ilerleme evrelerine karşı etki gösterirler (17). Yeşil çayda bulunan, ana yapıları birbirine benzeyen fakat yan zincirlerinde farklı gruplar taşıyan kateşinlerin anti-kanser etkileri de değişik olmaktadır. Kateşinlerin anti-kanser etkileri yapıya özgüdür (107). EGCG ile işlem yapıldığında, telomerazın kısaldığı ve aktivitesinin azaldığı sonucu bulunmuştur. Bu da telomeraz inhibisyonunun EGCG kaynaklı olduğunu belirtir. Telomeraz hedefli sonuçlar bize kanser tedavileri için yeni fikirler verebilir (109).

Epigallokateşin-3-gallat ve diğer kateşinler prooksidan etki de gösterirler. Kateşinlerin metabolize olmaları radikal üretimine (fenolik radikal ve $O_2^{\cdot -}$ formuna dönüşerek) katkı sağlamaktadır. Böylece hücre apoptozuna sebep olabilmektedir. Kateşinler organizmada ikiyüzlü davranış sergiler. Kateşinlerin karaciğerde toksik veya koruyucu etki göstermesinin, uygulanan doza ve uygulama yoluna bağlı olduğu görüşü ileri sürülmektedir (117,118).

Apoptozis; hasarlı veya normal olmayan yapıdaki hücreleri ortadan kaldıran mekanizmadır. EGCG'nin oksidatif strese karşı koruma sağlarken, apoptik yolakları etkilediği gösterilmiştir (98). EGCG, programlı hücre ölümünü birçok mekanizmalar ile indükler. Bu mekanizmalar; G0/G1 fazı hücre döngüsü arresti yaparak NFkB (119) ve Tümör nekroze faktör (TNF) gen ekspresyonu ve salımının inhibisyonu (120), mitokondrial depolarizasyon (121), büyüme faktörlerinin sinyalizasyonunun (122), kaspaz-8 (123) ve kaspaz-3 (124) aktivasyonunun önlenmesi gibi mekanizmalardır.

Epigallokateşin-3-gallat'ın kanserli hücrelerin hücre döngüsünü duraklattığı, apoptoza götürdüğü gözlemlenmiştir. Bu sırada normal hücrelere etki etmemekte veya etkisi az olmaktadır (125). Bu durumda EGCG, tümör hücrelerini apoptoza götürebilir. Sahip olduğu seçimli apoptotik yeteneğiyle EGCG, araştırılması gereken anti-neoplastik bir ajandır (15).

TNF, tümörün meydana gelmesinde temel bir sitokindir. AP1 ve NFkB, hücre dışı sinyallere hızlı bir şekilde yanıt veren transkripsiyon faktörleridir. EGCG, AP1 ve NFkB aktivasyonunu baskılar, TNF gen ekspresyonunu engeller (119,126).

Epigallokateşin-3-gallat, bitki türevi kateşin olup endotele bağımlı damar gevşemesine neden olur. Buna ait protein fosforilasyonunu arttırarak, endotel hücrelerinde doğal eNOS aktivatörü olarak görev yapar (127).

Çalışmamızda, deneysel olarak oluşturulmuş meme tümöründe antikanserojenik etkisi olduğu düşünülen EGCG'nin; arginaz enzim aktivitesi, ornitin, NO düzeyleri ve eNOS üzerindeki etkileri incelenerek, EGCG'nin kanserde olası koruyucu ve/veya tedavi edici bir ajan olarak kullanılabilirliğinin araştırılması planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma; yerel etik kurul onayı alındıktan sonra (Ek 1) Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

GEREÇLER

Çalışma Grupları

Çalışmada 7-8 haftalık, ortalama ağırlıkları 27-32 gram arasında değişen (ortalama 30 gram), Balb/c cinsinden olan 50 tane dişi fare kullanıldı. Çalışmada kullanılan farelerin temini, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarından sağlandı. Denekler rastgele seçildi ve her bir grup 10'ar fareden oluşmak üzere beş grup oluşturuldu. Tüm fareler deneyin sonuna kadar ayrı kafeslerde tutuldu. Nem oranının %50-60, ısının 22±1 °C olmasına dikkat edildi. Fareler 12 saat gece-12 saat gündüz ışık periyodu olan ortamda tutuldu. Standart fare yemi günlük olarak beş gruba da verildi.

Hayvanların 8 haftalık olması beklendi. 3., 4. ve 5. gruplarda meme kanseri oluşturuldu. Meme kanseri oluşturmak için, sol bacağa subkutan olarak 200 µl Ehrlich asit tümör hücresi enjekte edildi. 7. günün sonunda tümör çapının 1 cm olduğu tespit edildi. 7. günden sonra tedavilere başlandı.

1. Grup (n=10): Sağlıklı kontrol grubu olarak kabul edildi. Bu gruba tüm deney süresi olan 16 gün boyunca, her gün intraperitoneal olarak serum fizyolojik verildi.

2. Grup (n=10): Sağlıklı tedavi grubu olarak kabul edildi. Bu gruba tüm deney süresi olan 16 gün boyunca her gün intraperitoneal olarak düşük doz EGCG (5 mg/kg) verildi.

3. Grup (n=10): Meme kanseri kontrol grubu olarak kabul edildi. Bu gruba Ehrlich asit tümörü enjekte edildikten bir hafta sonrasından başlanarak, tüm deney süresi olan 16 gün boyunca her gün intraperitoneal olarak serum fizyolojik verildi.

4. Grup (n=10): Tedavi grubu 1 olarak kabul edildi. Bu gruba Ehrlich asit tümörü enjekte edildikten bir hafta sonrasından başlanarak, tüm deney süresi olan 16 gün boyunca her gün intraperitoneal olarak düşük doz EGCG (5 mg/kg) verildi.

5. Grup (n=10): Tedavi grubu 2 olarak kabul edildi. Bu gruba Ehrlich asit tümörü enjekte edildikten bir hafta sonrasından başlanarak, tüm deney süresi olan 16 gün boyunca her gün intraperitoneal olarak yüksek doz EGCG (30 mg/kg) verildi.

3. ve 4. gruptan birer fare tedavi başlamadan önce öldü. Tedavinin 7. günü 5. gruptan bir fare, tedavinin 13. günü 4. ve 5. gruplardan birer fare öldüğü için çalışmadan çıkarıldı.

Deney 17. günde sonlandırıldı, intrakardiyak kan alımı ve doku çıkarılması işlemleri gerçekleştirildi. Sakrifikasyon öncesinde ksilazin (5 mg/kg) ve ketamin (60 mg/kg) im olarak anestezi amaçlı olarak farelere verildi. Meme tümör dokuları çıkarıldı ve buzlu %0.9'luk serum fizyolojik ile yıkandı. Kan örnekleri 3000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serum ve doku örnekleri deneylerin yapılacağı güne kadar -80 °C'de saklandı. Çıkarılan meme tümör dokuları histopatolojik inceleme için formaldehitte saklandı.

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetik asit (CH_3COOH)	(Merck, Almanya)
Bakır sülfat ($CuSO_4$)	(Merck, Almanya)
Benzoik asit ($C_7H_6O_2$)	(Merck, Almanya)
Demir-3-klorür ($FeCl_3$)	(Merck, Almanya)
Diasetilmonoksim ($C_4H_7NO_2$)	(Merck, Almanya)
Fosforik asit (H_3PO_4)	(Merck, Almanya)
Hidroklorik asit (HCl)	(Merck, Almanya)
Mangan klorür ($MnCl_2$)	(Merck, Almanya)
Ninhidrin ($C_9H_6O_4$)	(Merck, Almanya)

L-Ornitin hidroklorür ($C_5Hl_3ClN_2O_2$)	(Merck, Almanya)
Potasyum klorür (KCl)	(Merck, Almanya)
L-Sitrulin ($C_6H_{13}N_3O_3$)	(Merck, Almanya)
Sodyum karbonat (Na_2CO_3)	(Merck, Almanya)
Sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$)	(Merck, Almanya)
Sodyumhidroksit (NaOH)	(Merck, Almanya)
Trikloroasetik asit (CCl_3COOH)	(Merck, Almanya)
Tiyosemikarbazid (CH_5N_3S)	(Merck, Almanya)
Tiyoüre (H_2NCONH_2)	(Merck, Almanya)
Üre (H_2NCONH_2)	(Merck, Almanya)
L-arginin ($C_6H_{14}N_4O_2$)	(Merck, Almanya)
Sülfirik asit (H_2SO_4)	(Sigma, Almanya)
Folin	(Sigma, Almanya)
Albümin	(Sigma, Almanya)
Na-K tartarat ($NaK(COO)_2(CHOH)_2$)	.(Panreac, İspanya)
Triton-X-100	(Merck, Almanya)
Tris (Hidroksimetil) aminomethan ($NH_2C(CH_2OH$)	(Carlo Erba Reagenti, Milano)
α-Isonitro-sopropiophenone ($C_9H_9NO_2$)	(Sigma, Almanya)

Alet ve Malzemeler

Etüv: Memmert 400	(GmbH+Co KG, Schwabach-Almanya)
Homojenizatör: DIAX 900	(Heidolph, 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, Almanya)
Elektronik tartı: Sartorius	(Sartorius AG, Göttingen-Almanya)
pH metre: pH level 1	(Inolab WTW, Weilheim-Almanya)

Cam malzemeler: Deney tüpleri, balon joje, mezür, beher v.b

Doku Örneklerinin Homojenize Edilmesi

Gruplardan elde edilen meme tümör dokularının homojenizasyonunda Tris tamponu kullanıldı. Derin dondurucudan çıkarılan dokular DIAX 900 model

otohomojenizatör kullanılarak ağırlıklarının 10 katı kadar miktarda olan soğuk 0.05 M Tris/HCl tamponu (pH: 8.05) ile homojenize edildi. Süpernatantların elde edilmesi için, doku homojenizatları 8000xg'de ve 4 °C'de 20 dakika santrifüj edildi.

YÖNTEMLER

Meme Dokusu Arginaz Aktivitesinin TDMU Yöntemi ile Ölçümü

Substrat olan argininin örnekteki arginazla hidrolizi sonucunda üre oluşur. Oluşan üre miktarının TDMU yöntemi (128) ile spektrofotometrik olarak saptanmasıyla arginaz aktivitesi belirlenmiştir.

TDMU yöntemi de, üre için kullanılan birçok kimyasal metod gibi Feron reaksiyonunu esas alır. Diasetilmonoksim, üre ile direkt reaksiyon vermez. Öncelikle, asit ortamda ısının da etkisi ile hidroksilamin ve diasetile hidrolize olur. Diasetil, asit çözeltide üre ile kondanse olduktan sonra, H_2O ve renkli bir bileşik olan diazin meydana gelir. Tiyosemikarbazid ve Fe^{+2} iyonları, bu rengi stabilize etmek için kullanılır.

Diasetilmonoksim $\longrightarrow$ Diasetil + Hidroksilamin

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

Örnekteki üre düzeyinin 0.3 µmol/ml'den fazla olduğu konsantrasyonların, Beer-Lambert kanununa uymaması ise bu metodun dezavantajıdır. Ancak bu olumsuz durum, yüksek absorbans değeri veren örneklerin dilüsyonu ile önlenebilmektedir.

Gerekli ayıraçlar

Asit karışımı hazırlanması: 3.24 g $FeCl_3.6H_2O$, bir miktar distile su ile birlikte bir balon jojede çözündürülür. Üzerine %85'lik H_3PO_4'ten 39.1 ml ilave edilir. Daha sonra da distile suyla 100 ml'ye tamamlanır. Oda ısısında saklanır.

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

Renk ayıracı (3.6 mM Tiyosemikarbazid (TSC) + 61.7 mM Diasetilmonoksim (DAM)) hazırlanması: 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 çözündürülür ve yine distile su ile litreye tamamlanır. Oda ısısında koyu renkli şişe içerisinde uzun süre saklanabilir.

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

a) 1.06 g Na_2CO_3 bir miktar distile su ile balon jojede çözündürülür ve daha sonra yine distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Böylece 0.1 M Na_2CO_3 çözeltisi elde edilir.

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

Karbonat tamponunun hazırlanması için; 100 ml 0.1 M Na_2CO_3 çözeltisi üzerine 0.1 M $NaHCO_3$ eklenir ve pH 9.7'ye ayarlanır. Hazırlanan tampon çözelti 4 °C ısıda saklanır.

Arginin çözeltisi (50 mM)hazırlanması: 0.87 g L-arginin, balon joje içerisinde bir miktar distile su ile çözündürülür. 0.1 M HCl ile pH'ı 9.7'ye ayarlanır. Daha sonra distile suyla 100 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 4 °C ısıda saklanır.

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

Üre standardı (0.5 µmol üre/ml) çözeltisi hazırlanması: 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

Dokudaki arginaz enzim aktivitesinin tayini için iki deney düzeneği kuruldu. Numaralandırılmış deney tüpleri birinci düzeneğe, kör, standart ve sıfır zaman tüpleri ise ikinci düzeneğe konuldu. İlk düzenekte yer alan deney tüpleri üçlü, ikinci düzenekte bulunan deney tüpleri ise ikili olacak şekilde hazırlandı. Sıfır zaman tüpleri, enzim kaynağındaki endojen üre aktivitesinin eliminasyonu amacıyla hazırlandı.

Enzim kaynağı olarak kullanılacak olan süpernatanta, 9 mM $MnCl_2$ ile 1/50 oranında sulandırılma yapıldı. 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 konuldu. Standart tüpüne ise 1 ml üre standardı (0.2 µmol/ml) konuldu. Ardından da sıfır zaman, standart ve kör tüplerine enzimatik reaksiyonu engellemek için 3'er ml asit karışımı konuldu.

20 dakikalık preinkübasyondan sonra, enzim kaynağı ve hazırlanmış olan deney tüpleri 37 °C'de su banyosunda 3 dakika bekletilerek, numunelerin aynı ısılara gelmeleri sağlandı.

Daha sonra, 37 °C'de bulunan enzim kaynağından, deney ve sıfır zaman tüplerine 0.2 ml konuldu, vorteks karıştırıcı ile iyice karıştırıldı. Enzimatik reaksiyonun oluşması için, deney tüpleri sallantılı su banyosunda 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi. 15 dakika inkübe edilen deney düzeneğine, sürenin bitiminde hemen 3'er ml asit karışımı eklenerek, reaksiyon durduruldu.

Bu işlemlerden sonra, her iki düzenekteki tüplere 2'şer ml renk ayıracı eklendi ve tüpler vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı. Daha sonra tüm tüplerin ağızları parafilm ile kapatıldı. Tüpler 10 dakika boyunca kaynar su banyosunda bırakılarak renk oluşumu sağlandı.

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

Doku arginaz enzim aktivitesinin hesaplanması

Gerçek arginaz absorbans değerini bulmak için, deney tüplerinin absorbans değerinden sıfır zaman tüplerinin absorbans değerleri çıkartılarak hesap yapıldı. Net absorbans değerini elde etmek için de, tüm deney tüplerinin absorbans değerlerinden kendi sıfır zaman absorbans değerleri çıkartıldı. Böylece enzim kaynağındaki endojen ürenin verdiği absorbans değeri hesabın dışında bırakıldı.

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

50: Süpernatantın $MnCl_2$ sulandırılma katsayısı

5: Süpernatantın inkübasyon ortamındaki sulanma katsayısı

4: İnkübasyon süresinin 1 saatte tamamlanma katsayısı

0.2 µmol üre/ml'nin absorbansı: 0.587 olarak okunmuştur.

Faktör = (0.2 µmol üre/ml) x 50 x 5 x 4 / 0.587

Faktör = 340.72 olarak hesaplandı.

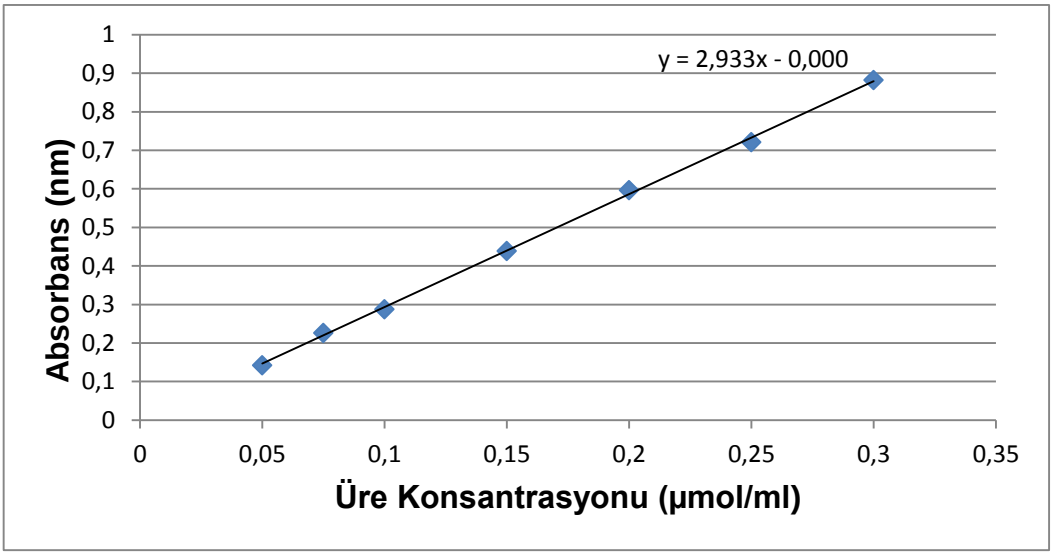
Enzim aktivitesi, tümör dokusu için ünite olarak tanımlanmıştır. Bir ünite enzim aktivitesi; 1 saatte 37 °C'de substrat olarak kullanılan L-arginin'den 1 µmol üre oluşturan enzim aktivitesinin, mg protein cinsinden ifadesidir. Enzim aktivitesinin hesaplanmasında, net örnek absorbansları faktör (340.72) 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 edildi 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.



Şekil 15. Üre standart çalışması regresyon grafiği

Meme Dokusu Ornitin Düzeyinin Chinard Yöntemi ile Ölçümü

Bu yöntemde; ornitin, ninhidrin ile mor renkli kompleks oluşturur. Oluşan mor renkli kompleksin kolorimetrik olarak ölçümü ile meme dokusu ornitin düzeyi ölçülür (129).

Gerekli ayıraçlar

%10'luk trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi: 10 g TCA tartıldıktan sonra distile su ile çözündürülüp 100 ml'ye tamamlanır.

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

Derişik glasiyel asetik asit: Deneyde kullanılan tüp sayısına göre glasiyel asetik asitten bir miktar alınır.

0.3 µmol/ml standart ornitin solüsyonu: 0.0506 g L-ornitin tartılır. Distile suda çözündürülerek 1 litreye tamamlanır. Böylece 0.3 µmol/ml'lik ornitin konsantrasyonu elde edilmiş olur. Deneyde kullanılan standart konsantrasyonu 0.18 µmol/ml olarak belirlendiği için, stok ornitin çözeltisi sulandırıldı ve bu konsantrasyon elde edildi.

Deneysel işlemler

Doku homojenizatı, %10'luk TCA ile 1/1 oranında sulandırıldıktan sonra 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. 1 ml süpernatant deney tüpüne, 1 ml distile su kör tüpüne ve 1 ml 0.18 µmol/ml'lik ornitin standartı ise standart tüpüne konuldu. Ardından tüplere sırasıyla 2.5 ml glasiyel asetik asit ve 0.25 ml ninhidrin ayıracı eklendi. Tüm tüpler vorteks ile karıştırıldıktan sonra, 30 dakika kaynar su banyosunda tutuldu. Su banyosundan çıkarılan tüpler hızla soğutuldu. Tüplerdeki numunelerin absorbansları, 515 nm dalga boyunda spektrofotometre yardımı ile ölçüldü.

Ornitin düzeyinin hesaplanması

Ornitin değerinin hesaplanması için şu formül kullanılmıştır.

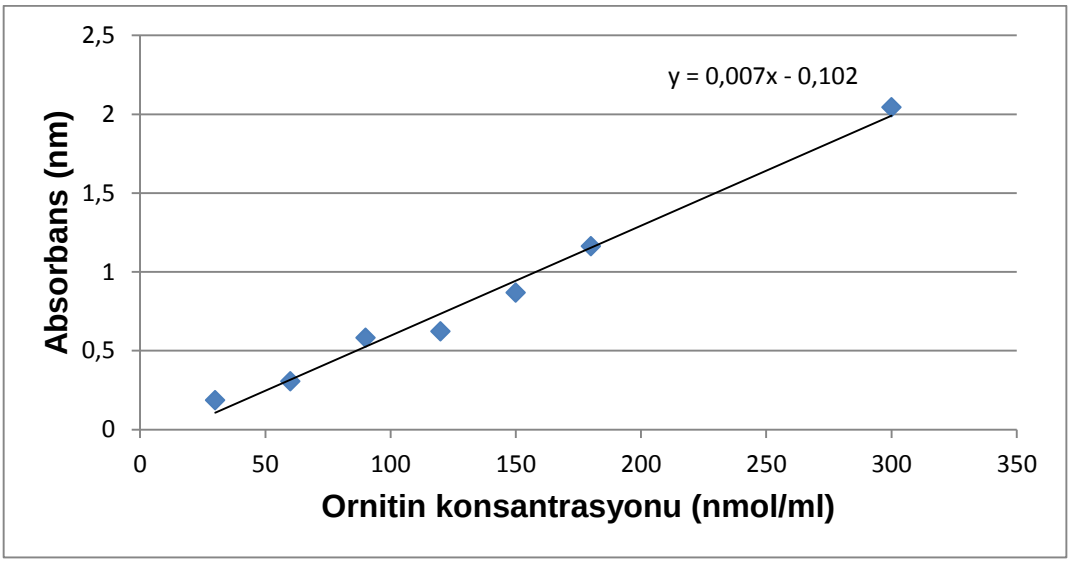
$$\text{Ornitin (µmol/ml)} = \frac{\text{Deney absorbansı} \times 2 \times (180\ \text{nmol/ml})}{\text{Standart ornitinin absorbans değeri}}$$

2: TCA ile sulandırılma katsayısı

180 nmol/ml: Standart ornitin konsantrasyonu

1.162: Standart ornitin absorbans değeri

Ornitin (µmol/ml) = Deney numuneleri absorbansı × 0.310 olarak formüle edildi. Elde edilen ornitin değerleri protein miktarına bölünerek (µmol/mg protein) standardize edildi.



Şekil 16. Ornitin standart çalışması regresyon grafiği

Meme Dokusu Protein Düzeyinin Lowry Yöntemi ile Ölçülmesi

Dokuların protein düzeyleri Lowry yöntemi ile ölçüldü (130). Bu yöntemin prensibi; alkali bakır tartarat ayıracının peptid bağları ile kompleks yapmasına dayanmaktadır. Her yedi ya da sekiz amino asit artığı bir bakır atomunu bağlar. Fenol ayıracı; alkali bakır tartarat ayıracı ile muamele edilmiş karışıma eklendiğinde mavi-mor bir renk oluşur. Oluşan renk konsantrasyonu, 660 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Gerekli ayıraçlar

Fenol ayıracı: 2 N folin ayıracından 2.5 ml alınır. Distile su ile 45 ml'ye tamamlanır. Bu ayıraç her kullanım için taze hazırlanmalıdır.

Alkali bakır tartarat ayıracı: 10 g Na_2C0_3, 0.25 g Na-K tartarat ve 0.05 g $CuSO_4$ ayrı ayrı tartılır. 0.5 N NaOH içinde balon jojede çözülür. Çözelti 0.5 N NaOH ile 100 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan bu çözelti 4 °C'de 1 ay saklanabilir.

Albumin standartı (5 mg/dl): %5'lik albumin standartı hazırlamak için mevcut 5 g/dl'lik albumin standartı kullanılmıştır. 0.1 ml albumin solüsyonundan alınır, distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Sonuçta 5 mg/dl'lik albumin standartı elde edilmiş olur.

Deneyde kullanılan standart protein konsantrasyonu 2 mg/dl olduğu için, stok protein standartı sulandırılarak istenilen konsantrasyon elde edildi.

Deneysel işlemler

Doku süpernatantları 1/50 oranında serum fizyolojik ile sulandırıldı. Vorteks yardımı ile iyice karıştırıldı ve protein ölçümü için uygun duruma getirildi. Numaralandırılmış deney, kör ve standart tüpleri hazırlandı. Deney tüpüne 0.5 ml 1/50 oranında sulandırılmış olan süpernatanttan, standart tüpüne 0.5 ml %2'lik standarttan ve kör tüpüne ise 0.5 ml distile su konuldu. Daha sonra her tüpe 0.5 ml alkali bakır tartarat ayıracı ilave edildi. Tüplerin vorteks ile iyice karışmaları sağlandı. Tüpler 10 dakika oda ısısında bekletildi. Her tüpe 2 ml fenol ayıracı eklendi ve tekrar vorteks işlemi yapıldı. Tüpler 30 dakika, 37 °C'lik su banyosunda bekletildi. Tüplerdeki numunelerin absorbansları köre karşı 660 nm dalga boyunda spektrofotometre yardımı ile ölçüldü.

Protein düzeyinin hesaplanması

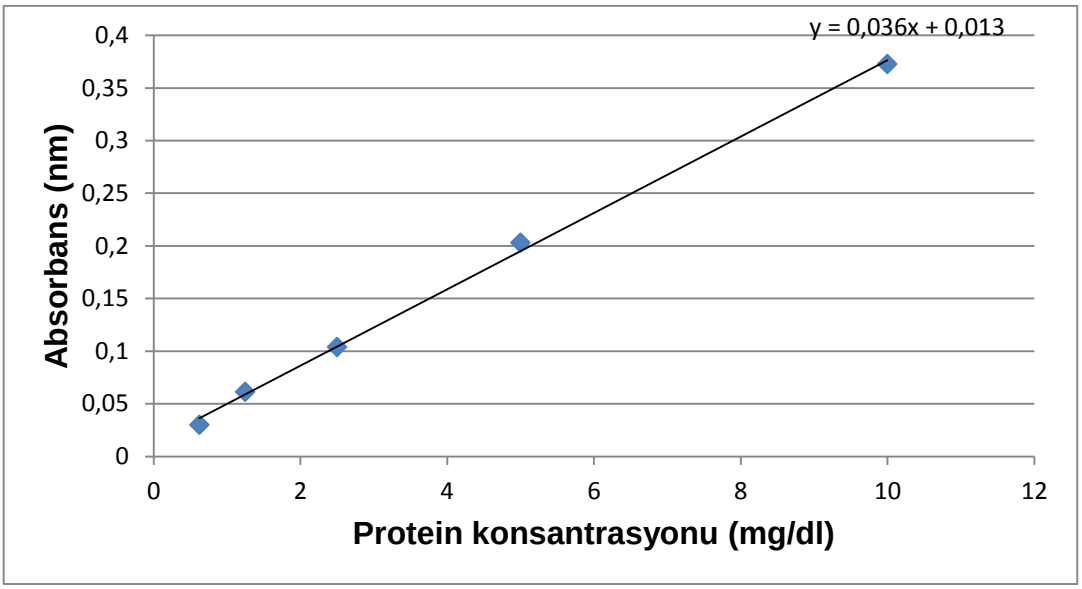
Deneyde ölçülen absorbanslar, aşağıdaki formülde yerine konarak protein düzeyleri hesaplandı.

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

50: Süpernatantın serum fizyolojik ile sulandırılma katsayısı
2: Süpernatantın 1 ml'ye tamamlanma katsayısı
2: Protein standartının konsantrasyonu
0.085: Standart proteinin absorbansı

$$\text{Protein miktarı (\% mg protein)} = \frac{\text{Deney absorbansı x 50 x 2 x 2}}{0.085}$$

Protein miktarı (% mg protein) = Deney Absorbansı x 2353 olarak formüle edilmiştir. Elde edilen % mg protein, 100 ml'de bulunan protein değeridir. Sonucun 100'e bölünmesi ile protein miktarı mg/ml olarak hesaplandı.



Şekil 17. Protein standart regresyon eğrisi

Serum Arginaz Enzim Aktivitesinin Munder Yöntemi İle Ölçülmesi

Substrat olan arginin örnekteki arginazla hidroliz olur. Bunun sonucunda oluşan üre miktarının spektrofotometrik olarak saptanmasıyla serum arginaz aktivitesi belirlenmiştir (131). Yöntemde birtakım yenilikler yapılmıştır (132).

Gerekli Ayıraçlar

%0.1'lik Triton-X-100 çözeltisi: 0.1 ml Triton-X-100 çözeltisi alınır, 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

Asit karışımı: H_2SO_4 (%96), H_3PO_4 (%85), H_2O 1:3:7 oranlarında alınır, asit karışımı hazırlanır.

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

2 N 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 su içerisinde çözündürülür. 0.1 M HCl ile pH 9.7'ye ayarlanır. Daha sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 4 °C ısıda saklanır.

10 mM $MnCl_2$ çözeltisi: 1.6187 g $MnCl_2.2H_20$ bir miktar distile su ile balon jojede çözündürülür, 1000 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 4 °C ısıda saklanır.

25 mM Tris-HCl çözeltisi: 3.0285 g tris tartılır ve bir miktar distile su ile balon jojede çözündürülür. Daha sonra 1000 ml'ye tamamlanır. 2 M HCl ile pH 7.5'e ayarlanır.

Deneysel işlemler

Numaralandırılmış deney, kör ve standart tüpleri hazırlandı. Deney tüplerine 100 µl örnek üzerine 100 µl triton-X-100 çözeltisi konuldu. Tüpler 30 dakika oda ısısında çalkalamaya bırakıldı. Daha sonra bu tüplerdeki numunelerden 100 µl alındı ve üzerine 100 µl tris çözeltisi ilave edildi. Tüm tüplerden 100 µl çözelti çekildi ve üzerine 10 µl $MnCl_2$ çözeltisi ilave edildi. Sonra tüpler 10 dakika 56 °C'de preinkübasyona bırakıldı. Tüplerin üzerine 100 µl arginin çözeltisi ilave edilerek, 37 °C'de 1 saat boyunca inkübe edildi. Daha sonra bunların üzerine de 900 µl asit karışımı ve 40 µl ISPF çözeltisi ilave edildi ve tüpler 30 dakika kaynar su banyosuna bırakıldı. Tüplerdeki numunelerin absorbansı, mikro ELISA plaka okuyucu kullanılarak 540 nm dalga boyunda ölçüldü.

Serum arginaz enzim aktivitesinin hesaplanması

Serum arginaz enzim aktivitesi, üre standart grafiği üzerinden hesaplandı.

NO Tayini

NO tayini: Cortas ve Wakid yöntemi (133) kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Gerekli ayıraçlar

Kadmiyum granülleri: 0.1 M H_2SO_4 içinde saklandığı müddetçe 9 ay stabildir.

Glisin-NaOH çözeltisi: 7.5 g glisin bir miktar distile suda çözündürüldükten sonra, 2 N NaOH çözeltisi ile çözeltinin pH'ı 9.7'ye ayarlandı. Bu çözelti 0-8 °C'de 1 ay saklanabilir.

Sülfanilamid çözeltisi: 5 g sülfanilamid, 3 M sıcak HCl içinde çözündürülerek, ardından soğumaya bırakıldı. Bu çözelti oda sıcaklığında 1 yıl saklanabilir.

N-Naphthylethylene diamine (NNDA) çözeltisi: 50 g NNDA 250 ml distile suda çözündürüldü. Bu çözelti 0-8 °C'de 2 ay saklanabilir.

Çinko sülfat ($ZnSO_4$) (75 mmol) çözeltisi: 10.8 mg $ZnSO_4$ tartıldı, distile suda çözündürülerek, distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

Bakır sülfat ($CuSO_4$) (5 mmol) çözeltisi: 250 mg $CuSO_4$ tartıldı, distile suda çözündürülerek, distile su ile 200 ml'ye tamamlandı.

Sodyum hidroksit (NaOH) (55 mmol) çözeltisi: 1.1 g NaOH tartıldı, distile suda çözündürülerek, distile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

Standartlar: $NaNO_2$ standardı, sodyum tetra borat çözeltisi (10 mmol) içinde hazırlandı (69 mg $NaNO_2$ ve 380 mg sodyum tetra borat ($Na_2B_4O_7.10H_2O$) tartıldı ve 100 ml distile su içinde çözündürüldü).

KNO_3 standardı: 102 mg potasyum nitrat tartıldı ve 100 ml sodyum tetra borat çözeltisi (10 mmol) içinde çözündürüldü.

Deneysel işlemler

Deproteinizasyon: Test tüpüne 0.5 ml distile su, 2 ml $ZnSO_4$ çözeltisi ve 2.5 ml NaOH çözeltisi ilave edilerek vorteks cihazında karıştırıldı. Numuneler 10 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 4000 rpm'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi.

Kadmiyum granüllerinin aktivasyonu: Granüller 3 defa distile su ile yıkandı. 1-2 dakika $CuSO_4$ çözeltisi içinde çalkalanarak bekletildi. 3 defa da glisin-NaOH çözeltisi ile yıkandı. 10 dakika içinde kullanılmak üzere kurutma kağıdı ile kurutuldu.

Sonucun hesaplanması: KNO_3'un 10 milimolarlık çözeltisinden 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 200 milimolarlık seri dilüsyonlar hazırlandı. Numunelere uygulanan tüm işlemler standartlara da uygulandı. Tüm tüplere 1ml glisin-NaOH çözeltisi konuldu. Deproteinize numunelerden ve standartlardan 1 ml alındı. Tüm tüplerin üzerine 2-3 g tartılan, aktivasyon işleminden geçirilen kadmiyumlardan konuldu, vorteks cihazı ile 90 dakika oda ısısında karıştırıldı, beklendi. Nitrit ölçümü için süre sonunda bu tüplerden 2'şer ml alındı. Üzerine 1 ml sülfanilamid ve 1 ml NNDA çözeltileri ilave edilerek karıştırıldı. 30 dakika beklendi ve 545 nm'de numunelerin konsantrasyonları spektrofotometrik olarak tayin edildi.

Direkt nitrit ölçümü: $NaNO_2$ standartlarını 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 200 milimolarlık seri dilüsyonlar hazırlandı. Deproteinize numunelerden kadmiyum ile reaksiyona sokmadan direkt olarak 2'şer ml alındı ve ayrı tüplere konuldu. Üzerine 1

ml sülfanilamid ve 1 ml NNDA çözeltileri eklendi. 30 dakika sonra 545 nm'de numunelerin konsantrasyonları spektrofotometrik olarak tayin edildi.

Nitrat aktivitesinin hesaplanması

Bulunan nitrat değerlerinden nitrit değerleri çıkarıldı. Daha sonra sulandırma faktörü olan 20 ile çarpıp yine nitrat standardından elde edilen faktör ile çarptıktan sonra çıkan sonuç milimol/litre olarak hesaplandı.

İmmünohistokimyasal Yöntem

İmmünohistokimya; immünolojik ilkelere dayanarak, varlığı araştırılan antijenlere karşı geliştirilmiş, poliklonal veya monoklonal antikorlar aracılığı ile dokudaki antijeniteyi gösteren bir yöntemdir. Çalışmamızda immünohistokimyasal boyamalar tam otomatik immünohistokimya boyama cihazı (Roche Ventana, Benchmark XT) kullanılarak aşağıdaki işlem basamakları ile uygulanmıştır.

Yöntemin uygulanışı

1. Tümör ve tümör çevresi doğal dokuları en iyi örnekleyen kesite ait parafin bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler yapıldı. Kesitler pozitif şarjlı lamlara alındı.

2. Kesitler 1 gece 37 °C etüvde bekletilerek deparafinizasyon işlemine başlandı.

3. Deparafinizasyona ksilen ile devam edildi. Bu işlem 60 °C etüvde 3 kez 10'ar dakika ksilende bekletme ve her 10 dakikanın ardından 5'er dakika solüsyon yenilenerek dışarıda soğumaya bırakma şeklinde uygulandı.

4. Ksilenin giderilmesi için %96'lık alkol muamelesine geçildi. Kesitler alkolde 60 °C etüvde 4 defa her seferinde solüsyon yenilenerek, 10'ar dakika tutuldu.

5. Lamlar 3 kez distile sudan geçirildi.

6. eNOS antikorları için 1 saat antijen geri kazanımı işlemi yapıldı. Bu işlem için 1/10 oranında distile su ile dilüe edilen (90 mL distile su + 10 mL EDTA buffer), "EDTA buffer 10X pH 8,0" (Kod: 15-M820, Lot.50930) solüsyonu kullanıldı.

7. Dokularda bulunan endojen peroksiti bloke etmek için 10 dakika 37 °C etüvde metanolde hazırlanmış %3'lük H_2O_2 uygulaması yapıldı.

8. Lamlar 3 kez distile sudan geçirildi.

9. Lamlar pH 7,4 olarak hazırlanmış PBS solüsyonunda 10 dakika bekletildi.

10. Reaktiflerin kesit dışına taşmasını engellemek için lamlardaki kesitlerin etrafı Pap-pen ile çizildi.

11. Her bir lama Large Volume Ultra V Blok (Kod No: TA-125-UB, Neomarkers, Fremont, CA, ABD) damlatıldı ve 7 dakika bekletildi. Sonra solüsyon lamlar üzerinden PBS ile uzaklaştırıldı.

12. Her bir vaka için ayrı ayrı numaralandırılmış lamlara eNOS antikorları damlatılarak oda sıcaklığında, ancak nemli ortamda (“chamber” içinde) 60 dakika inkübasyon yapıldı.

13. Lamlar üzerindeki antikorlar distile su ile uzaklaştırılıp PBS solüsyonuna alınarak 5 dakika bekletildi.

14. Zemin boyanmasını engellemek için, Super Block Sensi Tek Anti Polyvalent HRP kitinin (Scy Tek, Kod. SHP 125, Utah, USA) 1 nolu Super Block (Ref: AAA125, lot.18325) damlatıldı ve 10 dakika bekletildi.

15. PBS solüsyonu ile 5 dakika yıkanan lamlara, yukarıda tanımlanan kitin 2 nolu biotine bağlanacak olan işaretleyici solüsyonu Anti-Polyvalent Biotinylated antibody, (Ref: ABF125, Lot. 18452) damlatıldı ve 20 dakika daha bekletildi.

16. Tekrar PBS solüsyonu ile 5 dakika yıkanan lamlara, yine aynı kitin 3 nolu solüsyonu, Sensi Tek HRP Streptavidin biotinylated peroxidase-complex, (Ref: ABG125, Lot. 18452) damlatıldı ve 20 dakika bekletildi.

17. Lamlar PBS ile 3 dakika yıkandı.

18. ultraView Universal DAB Detection Kit-Ventana Medical Systems, Inc.(Catalog Number: 760-500) damlatılarak 10 dakika bekletildi.

19. Lamlar musluk suyunda 5 dakika yıkandıktan sonra, Harris hematoksilen solüsyonunda 1.5-2 dakika tutularak zıt boyama yapıldı.

20. Lamlar tekrar musluk suyunda yıkandı.

21. Lamlar %5’lik amonyak solüsyonunda 15 saniye tutularak, morartma işlemine tabi tutuldu.

22. Lamlar musluk suyunda yıkandı.

23. Aqueous-Mount (Ref: AML030, Lot. 13457) kullanılarak lamel ile kapatıldı.

Histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirme yöntemi

Her tümör örneğinin birer kesiti öncelikle hematoksilen eosine ile boyanarak tümör hasarı, nekroz ve kast oranları ışık mikroskopu altında değerlendirildi (Nikon Eclipse E 600).

Çalışma blokları boyanmadan önce, özellikle yeni araştırma antikorlarının çalışıp çalışmadığını kontrol etmek amacıyla, katalogda belirtilen kontrol dokuları arşivden temin edilerek test boyama yapıldı. Bu antikorlar için nükleer boyanma özelliği esas alındı.

Her bir antikor için tüm örneklerde boyanma yaygınlığı yüzdesi belirlendi. Ayrıca boyanma yoğunluğu "0: Yok, 1: Hafif, 2: Orta, 3: Kuvvetli" şeklinde sınıflandırıldı. Bu iki değerin çarpılması ile boyanma skoru elde edildi. Tüm histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeler dijital sistem altında görüntülendi (NAVI FLUO Brighfield and Fluorescence Slide Scanner for Digital Pathology).

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Çalışmamızda elde edilen verilerin istatistiksel analizi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda kayıtlı SPSS 20.0 (Lisans No: 10240642) istatistik programı kullanılarak yapıldı.

Tümör kontrol ve tedavi grubu arasındaki arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve NO düzeyleri arasındaki farklılıklar non parametrik Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Elde edilen "p" değerleri 0.05'ten küçük olduğunda, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda; kanser kontrol ve tedavi gruplarındaki farelerin tümör dokularında arginaz enzim aktiviteleri, ornitin, nitrik oksit düzeyleri ve immünohistokimyasal olarak eNOS skorları ölçüldü. Tüm grupların serum örneklerinde ise, arginaz enzim aktiviteleri ve nitrik oksit düzeyleri saptandı.

Serum örneklerinde arginaz enzim aktiviteleri ve nitrik oksit düzeylerine ait ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 2'de gösterilmiştir. Doku örneklerinde arginaz enzim aktiviteleri, ornitin ve nitrik oksit düzeyleri, eNOS skorlarına ait ortalama ve standart sapma değerleri ise Tablo 4'te gösterilmiştir.

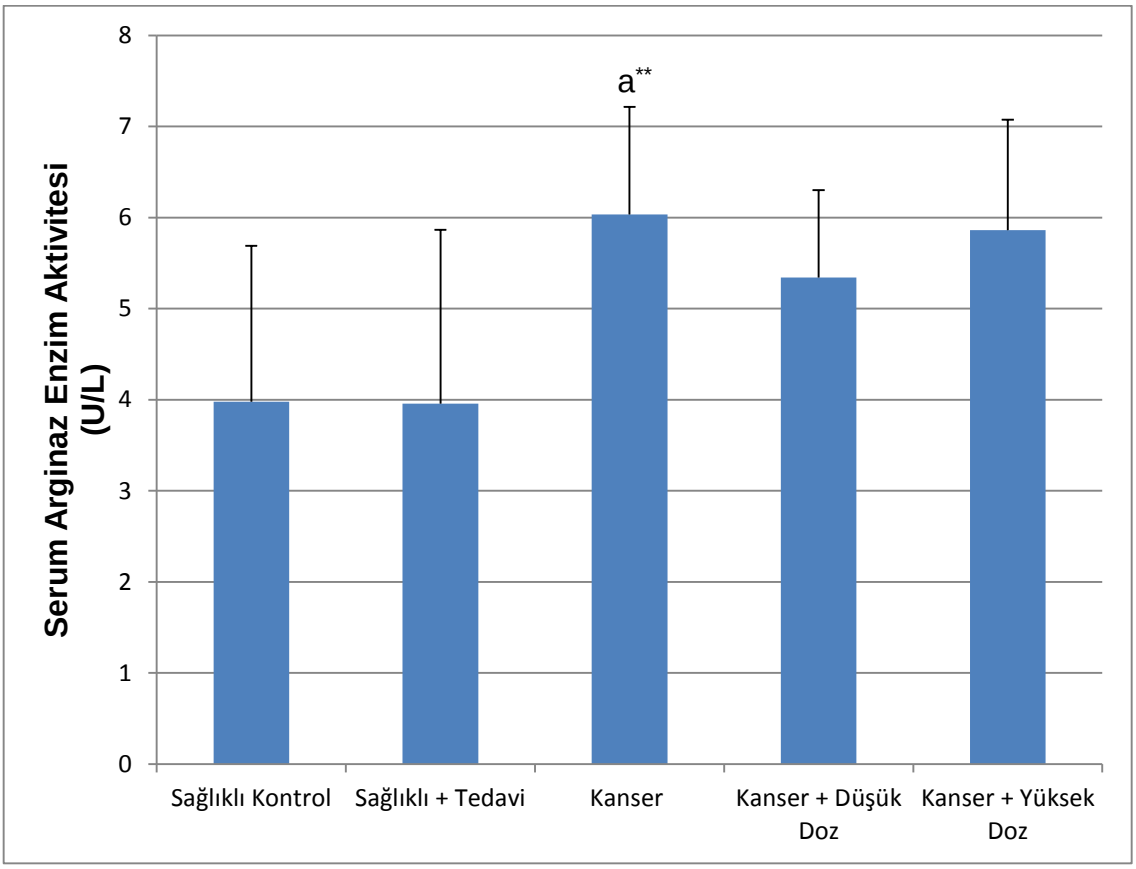
Tablo 2. Gruplara ait serum NO düzeyleri ve arginaz enzim aktiviteleri

Grup	**Serum NO Düzeyi** (mmol/L) ORT±SD	**Serum Arginaz Aktivitesi** (U/L) ORT±SD
1. Grup (n=10)	5.14±1.79	3.98±1.71
2. Grup (n=10)	3.70±0.83	3.96±1.91
3. Grup (n=9)	2.87±1.0	6.03±1.18
4. Grup (n=8)	3.91±1.69	5.34±0.96
5. Grup (n=8)	5.44±1.92	5.86±1.21

Tablo 3. Serumda çalışılan parametreler için istatistiksel karşılaştırmalar

Gruplar	**Serum Arginaz Aktivitesi**		**Serum NO Düzeyi**	
	p	z	p	Z
Grup 1 ve 2	0.971	-0.076	0.052	-1.928
Grup 1 ve 3	0.006	-2.694	0.008	-2.613
Grup 3 ve 4	0.200	-1.347	0.200	-1.347
Grup 3 ve 5	1.000	0.000	0.002	-2.983

Serum arginaz enzim aktivitelerinin tümör grubunda sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış gösterdiği saptanmıştır (p=0.006). Tedavi gruplarında EGCG tedavisinin, serum arginaz aktivitesini tümör grubuna göre düşürdüğü gözlenmiş; fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır (p>0.05) (Şekil 18).

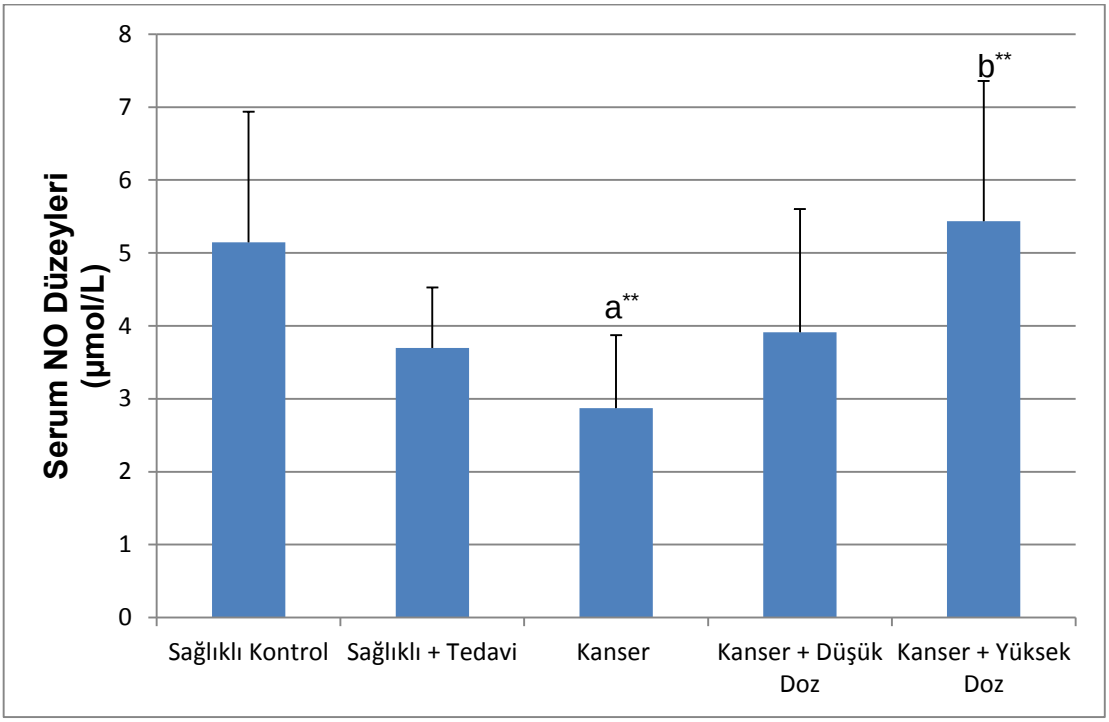


Şekil 18. Serum arginaz enzim aktiviteleri: a: Sağlıklı kontrol grubu ile, **p<0.01.

Serum nitrik oksit düzeylerinde, tümör grubunda sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma olduğu saptanmıştır (p=0.008). Düşük doz tedavi grubunda tümör grubuna göre; nitrik oksit düzeyinde artış olduğu gözlenmiş fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0.05). Yüksek doz tedavi grubunda ise EGCG tedavisinin serum nitrik oksit düzeyini tümör grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırdığı bulunmuştur (p=0.002).

Sağlıklı grup ile sağlıklı olup tedavi uygulanan grup arasında serum arginaz enzim aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0.05). Sağlıklı olup tedavi uygulanan grubun serum nitrik oksit düzeylerinde sağlıklı gruba

göre bir azalma olduğu gözlenmiş; fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır (p>0.05) (Tablo 3) (Şekil 19).



Şekil 19. Serum NO düzeyleri: a: Sağlıklı kontrol grubu ile, b: Tümör kontrol grubu ile, **p<0.01.

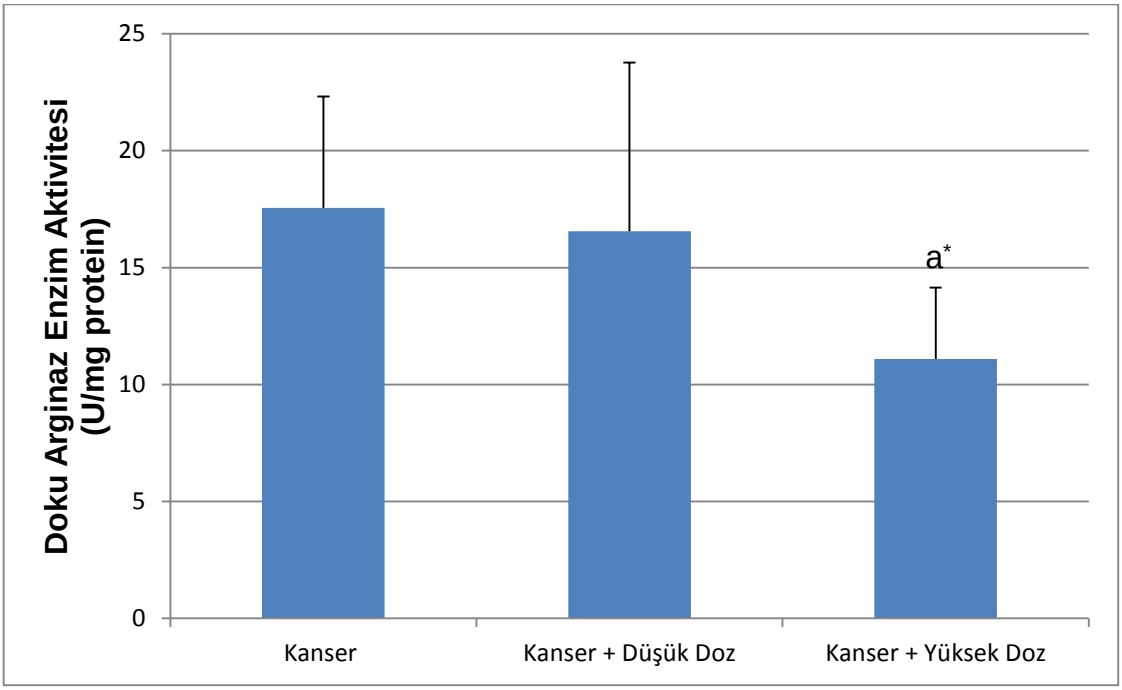
Tablo 4. Grupların doku ornitin, NO düzeyleri, eNOS skorları ve arginaz enzim aktiviteleri

Grup	**Doku Arginaz Aktivitesi** (U/mg protein) ORT±SD	**Doku Ornitin Düzeyi** (µmol/mg protein) ORT±SD	**Doku NO Düzeyi** (µmol/mg protein) ORT±SD	**Doku eNOS Skoru** ORT±SD
3. Grup (n=9)	17.55±4.76	0.054±0.015	1.17±0.23	161.67±26.92
4. Grup (n=8)	16.56±7.21	0.040±0.01	1.41±0.69	176.25±10.61
5. Grup (n=8)	11.09±3.06	0.03±0.01	1.40±0.20	176.25±10.61

Tablo 5. Dokuda çalışılan parametreler için istatistiksel karşılaştırmalar

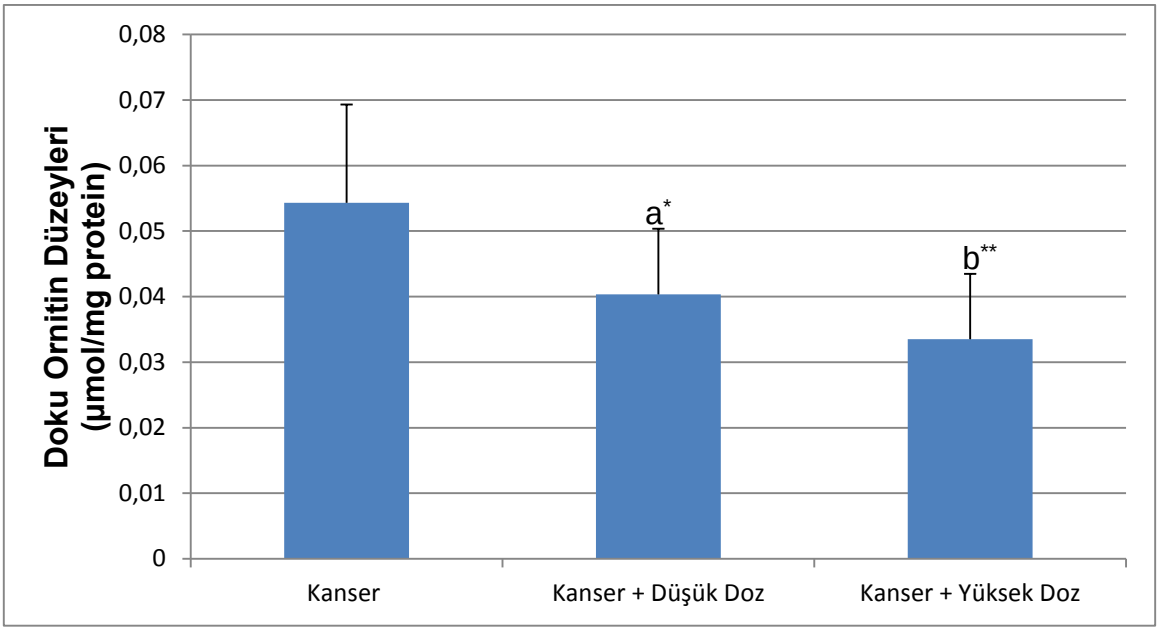
Gruplar	**Doku Arginaz Aktivitesi**		**Doku Ornitin Düzeyi**		**Doku NO Düzeyi**		**Doku eNOS Skoru**	
	p	z	p	z	p	z	p	Z
Grup 3 ve 4	0.541	-0.674	0.021	-2.267	0.481	-0.771	0.200	-1.497
Grup 3 ve 5	0.011	-2.502	0.002	-2.938	0.114	-1.641	0.200	-1.497

Doku arginaz enzim aktivitelerine bakıldığında; tümör grubunda yükselen arginaz enzim aktivitesinin EGCG tedavisi ile düşük doz grubunda azaldığı gözlenmiş fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). Yüksek doz grubunda ise azalan arginaz enzim aktivitesi, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.011$) (Tablo 5) (Şekil 20).



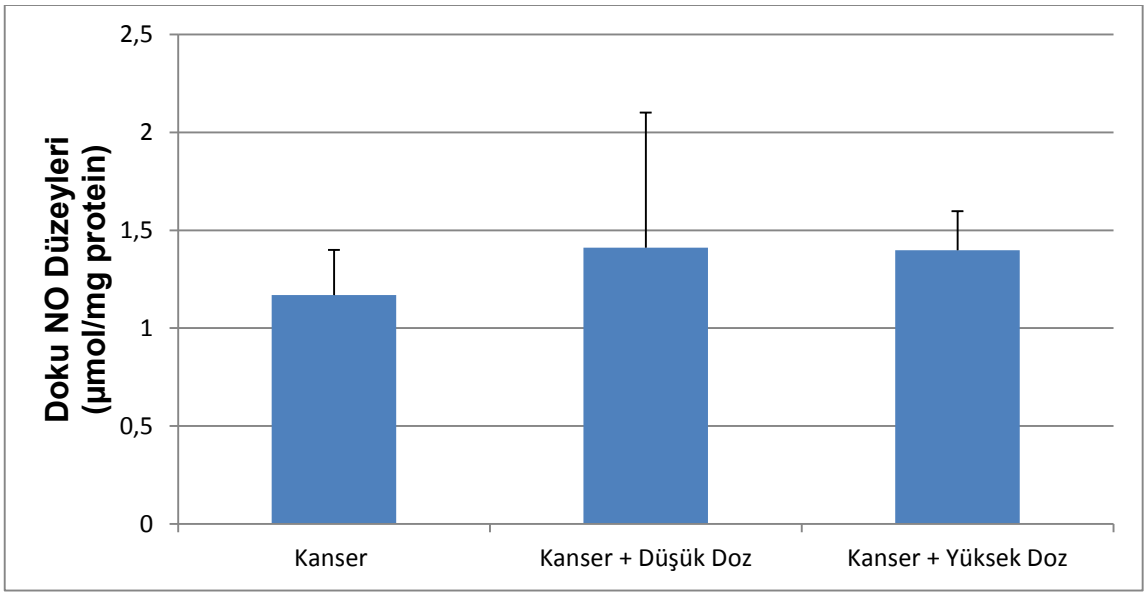
Şekil 20. Doku arginaz enzim düzeyleri: a: Tümör kontrol grubu ile, $^{*}p<0.05$.

Doku ornitin düzeylerinde ise; tümör grubunda artmış olan ornitin düzeyi, EGCG tedavisi ile her iki grupta da azalmıştır. Bu azalma, düşük ve yüksek doz tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) ($p=0.002$) (Şekil 21).



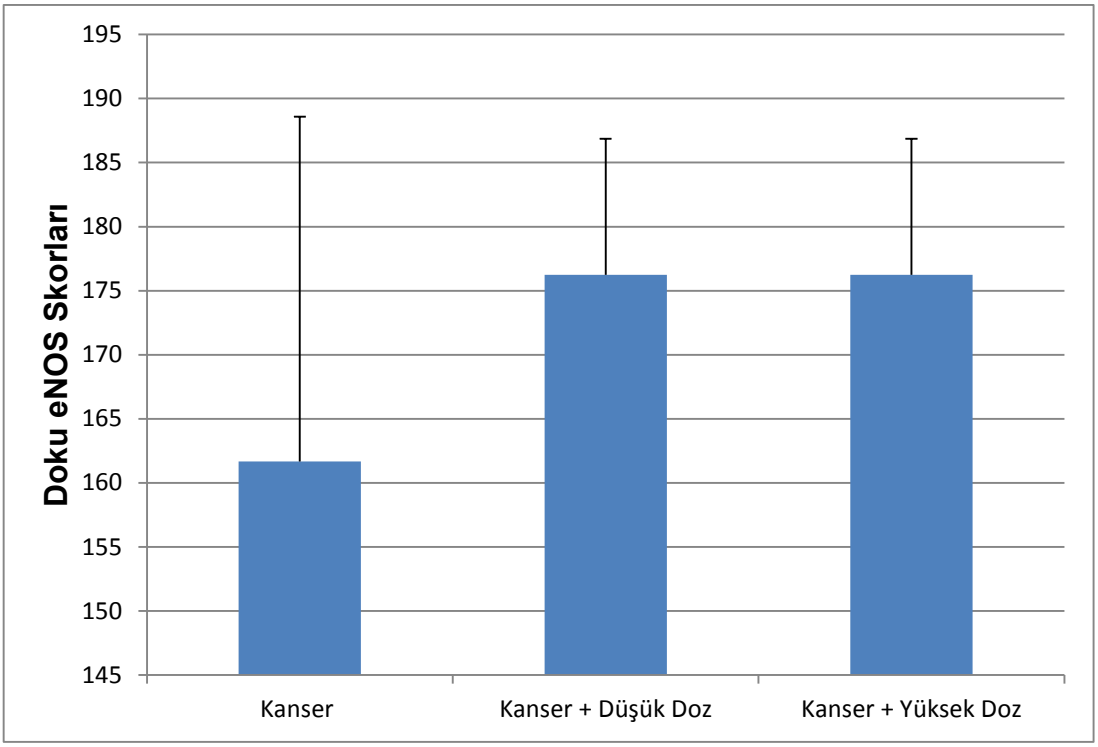
Şekil 21. Doku ornitin düzeyleri: a: Tümör kontrol grubu ile, b: Tümör kontrol grubu ile, *p<0.05, **p<0.01.

Kanser grubunda azalan nitrik oksit düzeyleri, EGCG tedavisi ile artmış, ama bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05) (Şekil 22).



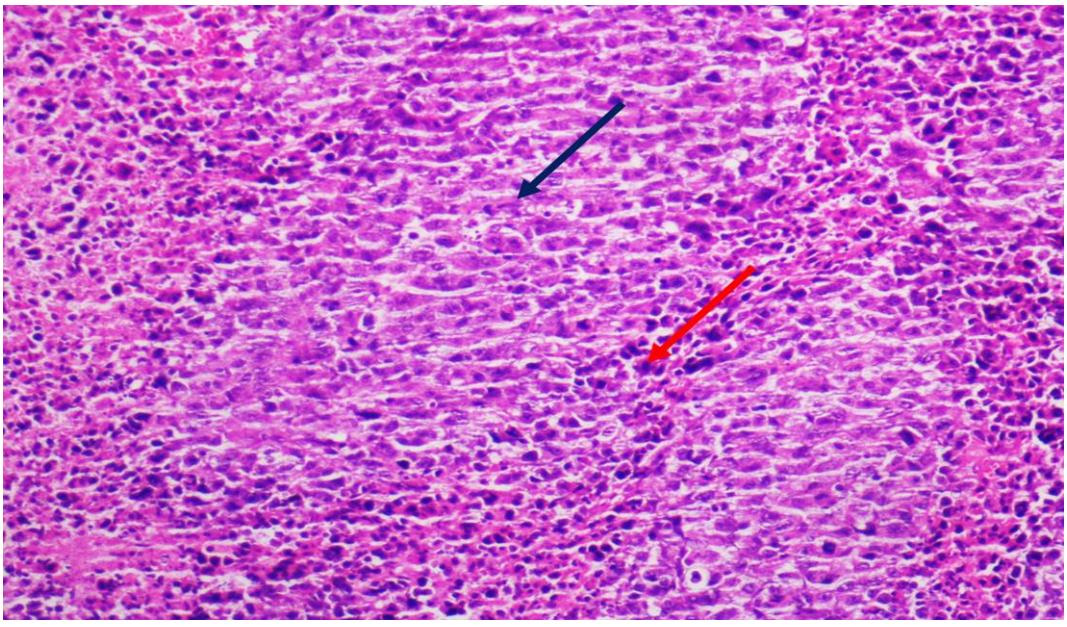
Şekil 22. Doku NO düzeyleri

Kanser grubunda azalan eNOS skoru tedavi gruplarında artış göstermiştir; fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05) (Şekil 23).

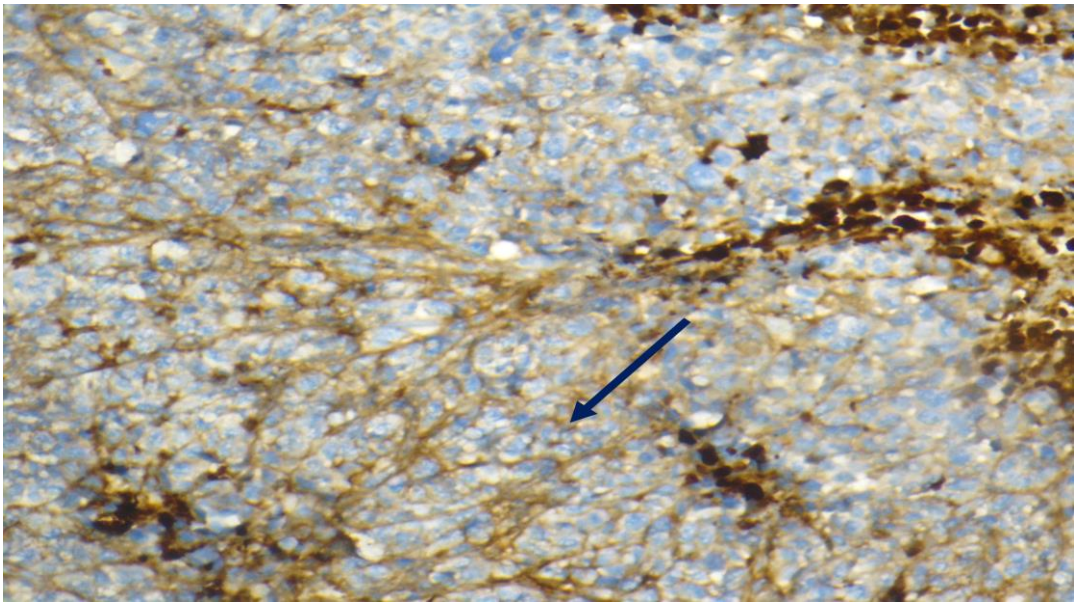


Şekil 23. Doku eNOS skorları

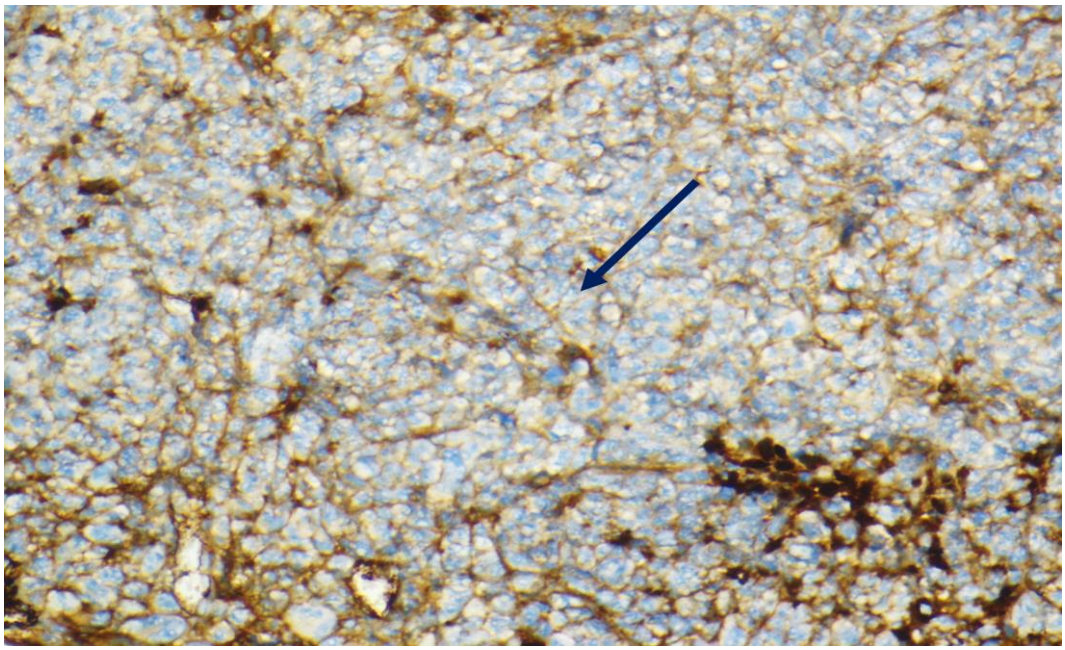
Kanser oluşturulan gruplar histopatolojik olarak immünokimyasal yöntem ile eNOS düzeyleri açısından değerlendirilmiştir. (Şekil 24-27).



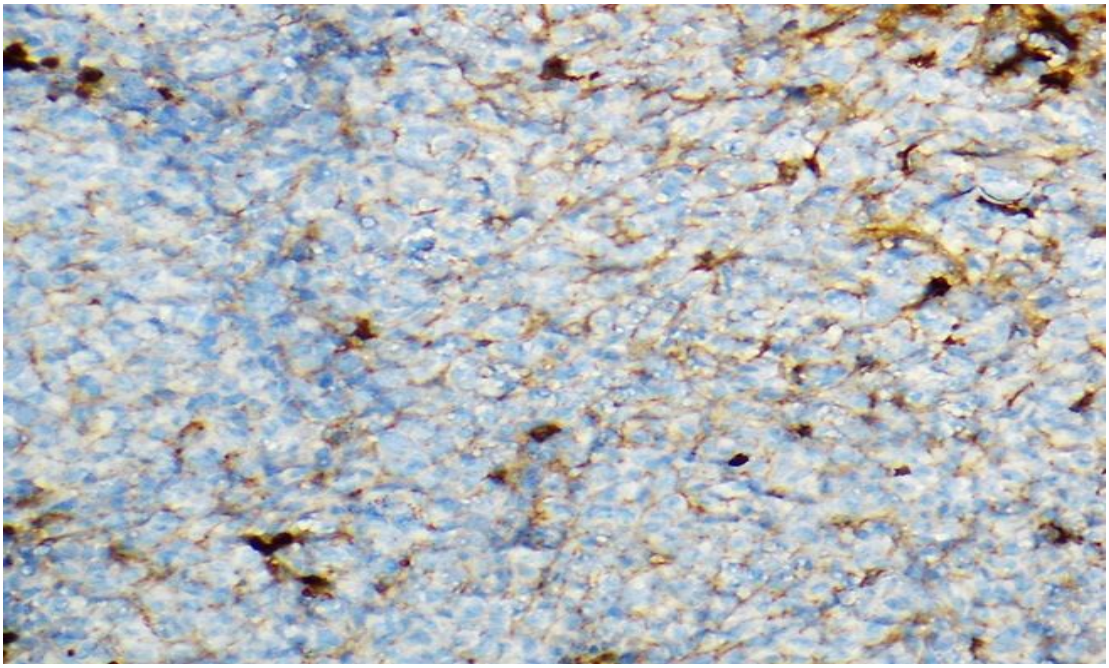
Şekil 24. Malign tümör hücreleri (siyah ok) ve nekroz (kırmızı ok)



Şekil 25. Kontrol grubu eNOS ile yaygın hafif orta dereceli boyanma (X200)



Şekil 26. Kanser + Düşük doz grubu eNOS boyama (X200)



Şekil 27. Kanser + Yüksek doz grubu eNOS boyama (X200)

TARTIŞMA

Kanser; günümüzün en önemli sağlık problemlerinden biri olarak devam eden, bir halk sağlığı sorunudur. Bunun en büyük nedeni ise sık görülmesi ve ölümcül olmasıdır (134). Yıllar içinde kansere yakalanan insan sayısının göstermiş olduğu artış, 2025 yılında kansere yakalanan insan sayısının dünya genelinde 25 milyondan fazla olacağını düşündürmektedir. Bu nedenle kanser üzerine sürekli çalışmalar yapılmakta ve yan etkilerinin daha az olduğu, daha etkili tedavi arayışları devam etmektedir (135).

Kanser bir hücre hastalığıdır. İnsan vücudu milyonlarca hücreden oluşmakta ve vücudumuz da devamlı olarak yeni hücreler üretmektedir. Yeni hücrelerin üretilmesinin amacı; büyüyebilmek, ölü hücreleri yenilemek ya da yaralanma sonucu zarar görmüş olan hücreleri onarmaktır. Kanser, kısaca hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmalarıdır. Anormal olarak çoğalmaya başlayan hücreler, bulundukları yerdeki doku ve organları işgal ederler. Hatta uzaklarında bulunan doku ve organları da işgal ederek, bu bölgelerde işlevsel bozukluklara neden olurlar. Kanser vakalarında mortalitenin fazla olması ise konunun önemini daha da arttırmaktadır (136).

Hücrelerin işlevlerini yönlendiren parçalar, genlerdir. Hücreler, genlerden aldıkları bilgi ve komutlara uyarak çoğalım gösterirler. Kansere, bozuk olan genler neden olur. Yediğimiz yiyecekler, güneş ışınlarına fazla maruz kalma ya da sigara içme gibi etmenler nedeniyle genlerin mevcut yapıları değişime uğrar. Normal genler, hücrelerin çoğalıp öleceği zamanı belirler. Bu ise, vücudumuzda sürekli olarak meydana gelen bir olaydır. Bozuk genler ise bazen hücrelerin aşırı çoğalmasına neden olurken, bazen de yok olması gereken hücrelerin ölümüne engel olur. Ölmesi

gereken hücreler ise sürekli çoğalarak tümör adı verilen kitleleri meydana getirirler (137). Tümörün tedaviye verdiği yanıtın değerlendirilmesi ve metastazların erken dönemde belirlenebilmesi amacıyla tümör belirteçleri kullanılmaktadır.

Yeşil çay ve bileşiminde bulunan kateşinlerin kanser oluşumuna karşı koruyucu etkileri olduğu öne sürülmüştür. Bu kateşinlerin en önemlilerinden biri de EGCG'dir (14). Bazı çalışmalar; ODC/RAS transjenik farelerde normal hücreler ile tümör hücreleri karşılaştırıldığında, EGCG'nin tümör hücrelerinde apoptozu uyardığını göstermiştir (119,138,139). Tümör gelişiminde EGCG tedavisinin inhibe edici etkisi olduğu tespit edilmiştir. Çeşitli çalışmalarda, yeşil çay ve polifenolik bileşenlerin ODC enzim aktivitesi ve poliamin seviyeleri üzerinde inhibe edici özelliklerinin olduğu belirtilmiştir (140,141). EGCG gibi yeşil çay polifenollerinin NF-kB aktivasyonunun inhibisyonu, Fas bağlanma, tümör nekroz faktörü α-aracılı kaynaklı sinyalizasyon yolunun aktivasyonu, G0/G1 hücre döngüsünün durdurulması, ve bağlanma ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri baskılaması dahil olmak üzere, çeşitli yollardan apoptosisi teşvik ettiği gösterilmiştir (119,139,142). Yaptığımız çalışmada; EGCG'nin, deneysel olarak oluşturulmuş meme tümöründe tedavi amaçlı kullanılarak arginaz enzim aktivitesi, ornitin, nitrik oksit düzeyleri üzerindeki etkileri araştırılan parametrelerden bazılarıdır.

Arginazın tetiklediği tepkime; üre ve ornitin şeklinde iki ürün verir. Argininden oluşan ornitin, poliaminlere dönüşür. Bu dönüşüm; akut inflamasyona cevap olmak ve hücre proliferasyonunu sağlamak içindir (143,144).

Meme kanserinde ameliyat öncesi dönemde serum arginaz aktivitesinin, hasta olmayan kadınların serum arginaz aktivitesinden 4 kat fazla olduğunu Straus ve ark. belirtmişlerdir. Bu araştırmacılar, serum arginaz aktivitesinin meme kanserinde duyarlı bir belirteç olduğunu bildirmişlerdir (63). Keleşoğlu'nun yaptığı çalışma sonucunda ise, Ehrlich asit meme tümörü oluşturulan hayvanlarda kanser grubunda arginaz enzim aktivitesinin sağlıklı gruba göre artış gösterdiği bulunmuştur (4). Çeşitli kanser türlerinde yapılan çalışmalarla serum ve doku arginaz düzeyinin arttığı bulunmuştur. Araştırmacılar arginazın kanserle yakından ilişkili olduğunu ve kanser vakaları için arginazın belirleyici bir enzim olabileceğini ileri sürmektedirler (64,145-149). Çalışmamızda da, kanser oluşturulan hayvanlarda serum ve doku arginaz enzim aktiviteleri daha önceki çalışmalara benzer olarak yüksek bulunmuştur. Bu modelde kullanılan EGCG'nin; serum arginaz aktivitesi üzerindeki etkisinin sınırlı

olduğu ancak doku arginaz düzeylerinin ise uygulanan tedavi dozuna bağlı olarak anlamlı şekilde azaldığı gözlenmiştir.

Böbrek ve meme bezini içeren diğer dokularda, argininin arginaz ile hidrolizinden ornitin oluşur. Ornitin; kollagen ve kazein gibi bazı önemli proteinleri oluşturan prolin ve hidroksiprolinin sentezinde (45,46,150), amonyum iyonu transportunda, enerji metabolizmasında ve amino asitlerin birbirine çevrilmesinde çok önemli bir ara metabolit olan glutamatın biyosentezinde kullanılmaktadır (45). Poliaminlerin (spermin, spermidin ve pütresin) öncü maddesi ornitindir. Poliaminler, hücrelerde nükleotit ve protein sentezini uyararak hücre proliferasyonunda görev alırlar. Poliaminlerin hücre büyümesi ve farklılaşmasında gerekli oldukları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (54,143). Poliaminlerin kanser gelişimi ile ilişkisi bulunmuştur (151). Poliamin düzeylerinin meme kanserinde artış gösterdiği bulunmuştur. Tümör poliamin düzeyleri ile tümörün tekrarlanabilirliği arasında pozitif bir ilişkinin var olduğu, meme kanserinde poliamin düzeylerinin biyolojik bir belirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (152). Anabilim dalımızda daha önce yapılan bir çalışmada da, kanser oluşturulan hayvanlarda, doku poliamin ve ornitin düzeyleri yüksek olarak bulunmuştur (153). Yaptığımız çalışma sonucunda, Ehrlich asit tümörü oluşturulan farelerde doku ornitin düzeylerine, uygulanan EGCG tedavisinin etkili olduğu gözlenmiştir.

Nitrik oksit sentaz (NOS), arginaz enzimi ile aynı substratı kullanır. NOS; L-arginini, nitrik oksit (NO) ve sitrüline parçalayan enzim olarak bilinir (49). Kanserde artış gösteren arginaz enzimi ve NOS, arginin için birbirleriyle yarış halindedirler (154). Arginazın; L-arginin için Km değeri 2-20 mM, NOS için Km değeri 1-20 μM'dür (155). Fizyolojik pH'da arginaz enziminin Vmax değeri, NOS enzimininkinden 1000 kat fazladır (156). Bu nedenle, bu iki enzimin L-argininin düşük konsantrasyonlarında bile onu rahatlıkla kullanılabileceğini göstermektedir (6).

Nitrik oksitin birçok biyolojik etkisi olduğu bulunmuştur (157). NO'nun tümör oluşumu mekanizması üzerine olan etkisi tam olarak bilinmemektedir. Birçok fizyolojik mekanizmada NO ve NO metabolitlerinin (nitrat, nitrit, S-nitrotiyoller, nitrozaminler ve peroksinitrit), NO'nun sitotoksik ve genotoksik etkilerini ortaya çıkarmada önemli olduğu ortaya konmuştur. Bu etkileri; mitokondrial solunumun inhibe edilmesi, DNA ve protein hasarı sonucu gen mutasyonu, protein

fonksiyonunun kaybı, nekroz ve hücre ölümü şeklindedir (158). Kanserin gelişimi üzerinde NO'nun negatif etkisinin olduğu saptanmıştır (154).

Nitrik oksit, birçok fizyolojik mekanizmanın gerçekleşmesi için gereklidir. Fakat aşırı miktarda üretimi radikalik etki gösterir. NO, organizma içinde çift yönlü etkiye neden olmaktadır (154). NO'nun, immünolojik reaksiyonda da görevi olduğu düşünülmektedir. Artmış NO'nun, (vazodilatasyon, trombosit agregasyonunun engellenmesi ve dokuların oksijenlenmesi) birçok yönden yararlı etkileri bulunmuştur (159). NO ve NO metabolitleri, tümör dokularında hücre büyümesini ve metastazı inhibe eder (160). NO'nun yüksek konsantrasyonlarında tümör gelişimini inhibe edebileceği (160), tümör hücrelerinde ise bu yolla apoptozisin indüklenebileceği belirtilmiştir (161). NO'nun immünoterapi ve kemoterapide etkili olabileceği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (157). Çalışmamızda serum NO düzeyinin sağlıklı hayvanlara göre kanser grubunda anlamlı olarak düşük bulunması, NO'nun kanser mekanizmasında olası bir rolüne işaret etmektedir. Uygulanan tedavi ile; Ehrlich asit meme tümör modelinde EGCG tedavisi, serum NO düzeylerinde uygulanan doza bağımlı bir etki göstermiştir. NO üzerindeki bu arttırıcı etki; düşük doz tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken, yüksek doz tedavide anlamlı bulunmuştur. Doku NO düzeyleri ise benzer şekilde kanserde azalmış olarak bulunurken, tedavi ile bu durum yükselme eğilimine girmiş, fakat artış anlamlı bulunamamıştır. Bu sonuç; NO'nun kanser mekanizmasında etkin bir unsur olabileceğini ve kanser oluşumunu önlemede potansiyel bir ajan olarak kullanılabilirliğini vurgulamaktadır.

Hipertansif hastalarda; çay türevi kateşin olan EGCG ile doza bağlı olarak tedavi yapıldığında, endotelyal hücrelerde eNOS değerlerinde aktivasyona cevap olarak güçlü bir artış meydana geldiği görülmektedir. eNOS aktivitesinde bir kaç dakika içinde ortaya çıkan artış mekanizmasında altta yatan neden olarak eNOS posttranslasyonel düzenleme görülmektedir (162). Ancak, kateşinlerin vasküler etkileri ile ilgili deneysel veriler tutarlılık göstermemektedir. Raporlar; kateşinlerin vazoreaktivite üzerindeki etkisinin (163) yanı sıra, asetilkolin kaynaklı endotele bağımlı damar genişlemesi inhibisyonu da olduğunu bildirmektedir (164). Verilerin tutarsızlığı, deneysel kurulum farklılıkları (inkübasyon süresi, dozu, türleri) ile açıklanabilir (165). EGCG; endotele bağımlı damar basıncının azalmasına neden olur, protein fosforilasyonunu arttırarak endotel hücrelerinde doğal eNOS aktivatörü

olarak hareket ettiği düşünülmektedir. Bu durum, çay türevli flavonoidlerin kalp ve damar hastalıkları üzerinde koruyucu etkilerini açıklayabilir (166).

Arginaz ile yarışan ve sonucunda NO oluşumuna yol açan diğer bir enzim NOS'tur. NOS, özellikle eNOS aktivitesinin artması ve azalmasına bağlı olarak NO düzeyinde de değişme kaçınılmazdır. Bu çalışmada da kanserli hayvanlarda eNOS aktivitesi azalırken ve NO düzeyi düşerken, bu durumun tedavi ile anlamlı olmasa da olumlu yönde geri döndüğü, yani yükseldiği görülmüştür. Bu sonuç da, yine daha önce ifade ettiğimiz ve önemini vurguladığımız NO üretimi ve kanser ilişkisini, eNOS üzerinden desteklemektedir.

Tümör dokusu ve serumdaki arginaz enzim aktiviteleri ile ornitin düzeyleri; meme kanserli hastalarda incelendiğinde, anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur. Bu mekanizmanın sonucu olarak poliamin biyosentezinin artacağı, bu durumun da kanserin gelişimi yönünde çalışan mekanizmayı harekete geçirebileceği çeşitli çalışmalarda ifade edilmiştir (63,146,167). Ayrıca, kanser oluşumunda koruyucu rolü olduğu bildirilen NO düzeyinin, artan arginaz enzim aktivitesine bağlı olarak azaldığı bulunmuştur. Bu durum da kanser gelişimi yönündeki mekanizmayı tamamlayan bir unsur olarak gösterilebilir (157,167). Bu çalışmada; kanser grubunda artmış ornitin düzeyleri, devamında kanser oluşumunda etkileri gösterilmiş olan poliaminleride yükseltmesi açısından bu teoriyi desteklemektedir.

Yaptığımız çalışmada; Ehrlich asit tümör modelinde tedavi amaçlı olarak kullanılan EGCG, serum arginaz aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaltmıştır. Doku arginaz düzeylerinde ise EGCG'nin artan tedavi dozuna bağlı olarak azalma gözlenmiştir. Doku ornitin düzeylerinde ise, uygulanan EGCG tedavisine bağlı olarak azalma gözlenmiştir. Ehrlich asit meme tümör modelinde EGCG tedavisi, serum NO düzeylerini doz miktarına bağlı olarak arttırmıştır. Tümör doku NO düzeyleri ve eNOS skorlarını istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttırmıştır.

Uygulanan tedavi sonrasında; tümör doku ve serum arginaz enzim aktiviteleri ile ornitin düzeylerinde azalma görülmüştür. Bunun sonucu olarak poliamin sentezinin azalması, mekanizmanın kanser gelişimini durduracak yöne kayması mümkün olabilecektir. NO düzeyinin ise azalan arginaz enzim aktivitesine bağlı olarak artması beklenen bir sonuç olarak görülmektedir. Bu çalışmada, uygulanan tedavi sonrası kanser grubunda azalan ornitin düzeyi bu teoriyi desteklemektedir.

Uygulanan tedavi süresinin yetersiz olması ve tedavi amaçlı verilen EGCG'nin uygulanan doz miktarlarının yetersiz gelmesi, çalışmanın kısıtlılıkları olarak düşünülebilir. Başka bir çalışmada, tedavi süresinin uzatılması bu mekanizmanın daha belirgin olarak ortaya çıkmasını sağlayabilecektir.

Yapılan çalışmalar; çay kateşinlerinin antioksidan, antimikrobiyal, anti-HIV, anti-mutajenik, antikanserojen özellikleri ve kalp-damar hastalıklarını önleyici etkileri olduğunu göstermiştir (15-17). Kanser tedavisinde umut verici bir madde olan EGCG'nin bu alandaki etkileri, yapılacak daha kapsamlı çalışmalar ve parametreler ile desteklenmelidir.

Meme kanserinde artan arginaz enzim aktivitesine bağlı olarak, artan ornitin ve dolayısı ile artan poliamin miktarları, diğer taraftan kanserde koruyucu etkisi bulunan NO üretiminin, azalan NOS enzim aktivitesi ile birlikte azalması, bu mekanizmaların tümünün birleştirilmesi ile toplam etkiye bağlı olarak yolağın kanser oluşumu yönüne kayması söz konusu olabilecektir.

Epigallokateşin-3-gallat tedavisi ile kanserde artan arginaz enzim aktivitesinin inhibe edilerek poliamin üretiminin azaltılması, diğer taraftan NOS üzerinden NO üretiminin arttırılması kanser tedavisinde bir strateji olarak ortaya konulabilir.

Epigallokateşin-3-gallat'ın bu mekanizma içindeki koruyucu veya tedavi edici rolü net olmamakla beraber, arginaz enzim aktivitesini baskılaması, ornitin düzeylerinde azaltıcı etki yapması, eNOS aktivitesini arttırarak NO üretimini arttırması gibi faktörlerin tümü dikkate alındığında, EGCG'nin kanser mekanizması içinde potansiyel koruyucu/tedavi edici bir molekül olma potansiyelini ortaya koymaktadır.

SONUÇLAR

Bu çalışmada; deneysel olarak geliştirilmiş meme kanserli farelerde EGCG'nin arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve NO düzeyleri ve immünohistokimyasal olarak eNOS skorları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Yapılan deneysel çalışma sonucunda;

1) Serum arginaz enzim aktivitesinin, meme kanseri kontrol grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu bulundu.

2) Tedavi gruplarında EGCG tedavisinin serum arginaz enzim aktivitesini, meme kanseri kontrol grubuna göre düşürdüğü gözlendi, fakat bu azalmanın anlamlı olmadığı saptandı.

3) Sağlıklı kontrol grubu ile sağlıklı olup tedavi uygulanan grup arasında, serum arginaz enzim aktivitesi yönünden anlamlı bir fark bulunmadığı saptandı.

4) Serum nitrik oksit düzeylerinde, meme kanseri kontrol grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalma olduğu saptandı.

5) Tedavi gruplarından düşük doz grubunda meme kanseri kontrol grubuna göre serum nitrik oksit düzeylerinde artış olduğu gözlendi, fakat anlamlı bir fark bulunamadı.

6) Tedavi gruplarından olan yüksek doz grubunda ise, EGCG tedavisinin serum nitrik oksit düzeyini meme kanseri kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttırdığı bulundu.

7) Sağlıklı olup tedavi uygulanan grupta sağlıklı kontrol grubuna göre; serum nitrik oksit düzeylerinde bir azalma olduğu gözlendi, fakat bu azalmanın anlamlı olmadığı bulundu.

8) Meme kanseri kontrol grubunda yükselen doku arginaz enzim aktivitesinin EGCG tedavisi ile düşük doz grubunda azaldığı gözlendi, ancak bu azalma anlamlı bulunmadı.

9) Epigallokateşin-3-gallat tedavisi ile yüksek doz grubunda azalan doku arginaz enzim aktivitesi anlamlı bulundu.

10) Meme kanseri kontrol grubunda artmış olan doku ornitin düzeyinin EGCG tedavisi ile tedavi gruplarında anlamlı olarak azaldığı saptandı.

11) Meme kanseri kontrol grubunda azalan nitrik oksit düzeyi EGCG tedavisi ile her iki grupta da arttı, fakat bu yükselme anlamlı bulunmadı. EGCG tedavisi ile doku nitrik oksit değerlerinin meme kanseri kontrol ve tedavi gruplarında farklılık göstermediği saptandı.

12) Meme kanseri kontrol grubunda azalan doku eNOS skoru tedavi gruplarında artış gösterdi; fakat bu artış anlamlı bulunmadı. EGCG tedavisi ile doku nitrik oksit değerlerinin meme kanseri kontrol ve tedavi gruplarında farklılık göstermediği saptandı.

13) Meme kanserinde artan arginaz enzim aktivitesine bağlı olarak, artan ornitin ve dolayısı ile artan poliamin miktarları, diğer taraftan kanserde koruyucu etkisi bulunan NO üretiminin, azalan NOS enzim aktivitesi ile birlikte azalması, bu mekanizmaların tümünün birleştirilmesi ile toplam etkiye bağlı olarak, yolağın kanser oluşumu yönüne kayması söz konusu olabilir.

14) Epigallokateşin-3-gallat tedavisi ile kanserde artan arginaz enzim aktivitesinin inhibe edilerek poliamin üretiminin azaltılması, diğer taraftan NOS üzerinden NO üretiminin arttırılması, kanser tedavisinde bir strateji olarak ortaya konulabilir. Epigallokateşin-3-gallat'ın bu mekanizma içindeki koruyucu veya tedavi edici rolü net olmamakla beraber, arginaz enzim aktivitesini baskılaması, ornitin düzeylerinde azaltıcı etki yapması, eNOS aktivitesini arttırarak NO üretimini arttırması gibi faktörlerin tümü dikkate alındığında, EGCG'nin kanser mekanizması içinde potansiyel koruyucu/tedavi edici bir molekül olma potansiyelini ortaya koymaktadır.

ÖZET

Meme kanserine yol açan nedenler tam olarak bilinmemekle birlikte dünyada kadınlar arasında yaygın olarak görülür. Kadınlarda görülen kanserlerin yaklaşık %29'unu oluşturmakta ve kansere bağlı ölümlerin de %14'üne neden olmaktadır. Arginaz enzimi ile argininden ornitin ve ardından poliaminler oluşur. Poliaminler kanser gelişimi yönünden tehlikeli moleküllerdir. Nitrik oksit sentaz enzimi ise arginaz ile aynı substratı kullanır ve yolağı nitrik oksit oluşumu yönüne çevirir. Nitrik oksit kansere karşı koruyucu bir molekül olarak bildirilmiştir. Antikarsinojenik özellikleri gösterilmiş olan epigallokateşin-3-gallat meme kanserine karşı koruyucu/tedavi edici bir ajan olabilir.

Bu çalışmada, deneysel olarak oluşturulmuş meme tümörü dokularında; arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve nitrik oksit düzeyleri ve endotelyal nitrik oksit skorları ile serum örneklerinde arginaz, nitrik oksit düzeyleri araştırılmıştır.

Meme kanserli hayvanların serumunda artmış bulunan arginaz enzim aktivitesinin epigallokateşin-3-gallat tedavisi ile birlikte azaldığı görüldüyse de bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu. Azalan nitrik oksit düzeylerinin epigallokateşin-3-gallat tedavisi ile verilen doza bağlı olarak yükseldiği saptandı. Doku arginaz enzim aktivitesi epigallokateşin-3-gallat tedavisi ile verilen doza bağlı olarak azalmıştır. Ornitin düzeyleri, tedavi gruplarında tümör gruplarına göre anlamlı olarak düşük bulundu. Epigallokateşin-3-gallat tedavisinin, doku nitrik oksit değerleri ve nitrik oksit sentaz düzeylerini arttırmasına rağmen bu artışın anlamlı olmadığı saptandı.

Kanserli dokularda artan arginaz enzim aktivitesi ve ornitin miktarlarının epigallokateşin-3-gallat tedavisi ile düşmesi yine kanserde azalan nitrik oksit sentaz aktivitesinin tedavi ile artarak nitrik oksit üretiminin yükselmesine yol açması, epigallokateşin-3-gallatın meme kanseri gelişiminde koruyucu ve/veya tedavi edici bir ajan olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Epigallokateşin-3-gallatın bulunan bu olumlu etkilerinin ileri çalışmalar ile desteklenmesi yararlı olacaktır.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, arginaz, ornitin, nitrik oksit, epigallokateşin-3-gallate.

THE POSSIBLE THERAPEUTICAL ROLE OF EPIGALLOCATECHIN-3-GALLATE IN EXPERIMENTAL BREAST CANCER

SUMMARY

Although causes of breast cancer are not fully understood, it is commonest disease amongstthe women in the world. It constitutes approximately 29% of cancers and causes 14% of cancer-related deathsin women.The arginase enzyme forms ornithine and then polyamines from the arginine. Polyamines are dangerous molecules in terms of cancer development. Nitric oxide synthase enzyme uses the same substrate as arginase and translocates nitric oxide formation. Nitric oxide has been reported as a protective molecule against cancer development. Epigallocatechin-3-gallate,anticarcinogenic properties have been demonstrated, may be a protective/therapeutic agent against breast cancer.

In this study, in the experimentally induced breast tumour tissues,arginase enzyme activity, ornithine and nitric oxide levels and endothelial nitric oxide scores; in serum samples, arginase and nitric oxide levels were investigated.

Although the increased arginase enzyme activity in the serum of animals with cancer was reduced with epigallocatechin-3-gallate treatment, this reduction was not statistically significant. Decreased nitric oxide levels were found to be elevated by epigallocatechin-3-gallate treatment in the dose basis. Tissue arginase enzyme activity was decreased by epigallocatechin-3-gallate treatment in the dose basis. Ornithine levels were significantly lower in the treatment groups while it compared

with tumour. Although epigallocatechin-3-gallate treatment increased tissue nitric oxide and nitric oxide synthase levels, this increase was not significant.

Together with the all findings ofincreased arginase enzyme activity and ornithine levels in tumour tissues were reduced with epigallocatechin-3-gallate treatment and low nitric oxide synthase activitywas increased whichleads to an increase in the nitric oxide productionwith the same treatment may indicate to potential use of epigallocatechin-3-gallate as a protective and/or therapeutic agent in the development of breast cancer. It would be useful to investigate these positive effects of epigallocatechin-3-gallate by further studies.

Key words: Breast cancer, arginase, ornithine, nitric oxide, epigallocatechin-3-gallate.

KAYNAKLAR

1. Arslan M. Kadınların meme kanseri ve kendi kendine meme muayenesi bilgi düzeyini arttırmada hemşirenin eğitici rolünün etkinliği (tez). Afyonkarahisar: Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Cerrahi Hastalıklar Hemşireliği Anabilim Dalı Enstitüsü; 2007.

2. Mooney S, Green S, Law MA. Comparison of adjuvant psyhological therapy and supportive counseling in patients with cancer. Psycho-oncology 1998;7:218-28.

3. Taşçı A. Bolu il merkezindeki aile sağlığı merkezlerine başvuran 40 yaş üstü kadınlarda ve bu merkezlerde çalışan hemşirelerde kendi kendine meme muayenesi bilgi ve uygulamalarının karşılaştırılması (tez). Bolu: Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2008.

4. Keleşoğlu G. Bir arginaz inhibitörü olan nor-NOHA'nın meme kanseri üzerine etkisi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2012.

5. Porembska Z, Luboinski G, Chrazanowska A, Mielczarek M, Magnuska J, Baranczyk-Kuzma A. Arginase in patients with breast cancer. Clin Chim Acta 2003;328(1-2):105-11.

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

7. Mutlu C, Koyutürk M, Karpuz V. Preeklamtik ve normal plasentada endotelyal nitrik oksit sentetaz immünreaktivitesinin incelenmesi. Cerrahpaşa J Med 2005;36:109-15.

8. Kuyumcu A, Düzgün PA, Özmen MM, Besler TH. Travma ve enfeksiyonlarda nitrik oksitin rolü. Ulus Travma Derg 2004;10(3):149-59.

9. Liang YC, LinShiau SY, Chen CF, Lin JK. Inhibition of cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as induction of Cdk inhibitors p21 and p27 during growth arrest of human breast carcinoma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate. J Cell Biochem1999;75:1-12.

10. Fujiki H, Suganuma M, Okabe S,Sueoka E, Suga K, Imai K, Nakachi K, Kimura S. Mechanistic findings of green tea as cancer preventive for humans. Proc Soc Exp Biol Med 1999;220:225-8.

11. Ahmad N, Mukhtar H. Green tea polyphenols and cancer; biologic mechanisms and practical implications. Nutr Rev 1999;57:78-83.

12. Singh AK, Seth P, Anthony P, Husain MM, Madhavan S, Mukhtar H, Maheshwari RK. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate inhibits angiogenic differentiation of human endothelial cells. Arch Biochem Biophys 2002;401(1):29-37.

13. Koo MWL, Cho CH. Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system. Eur J Pharmacol 2004;500:177– 85.

14. Tokaç D. Bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin oksidatif DNA hasarına etkileri (tez). Ankara: Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2007.

15. Arslanyüreği H. Epigallocatechin-gallat'ın C6 glioma hücrelerine apoptotik etkileri (tez). İstanbul: Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2009.

16. Kang WS, Lim IH, Yuk DY, Chung KH, Park JB, Yoo HS, et al. Antithrombotic activities of green tea catechins and (-)-epigallocatechin gallate. Thromb Res 1999;96:229-237.

17. Muhandiram R, Chakrabartty A, Bennick A, Wroblewski K. The molecular interaction of human salivary histatins with polyphenolic compounds. European Journal of Biochemistry 2001;268:4384-4397.

18. Topuz E, Aydıner A, Dinçer M, (Ed.). Meme kanseri. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti, 2003.

19. Kutluk T. Kanser konusunda genel bilgiler. Ankara: Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları, 1996.

20. Erhan Y, Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (ed.). Temel Patoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2000;623-35.

21. Çevik GC. Memede kitle şüphesiyle hastaneye başvuran kadınların meme kanseri ve kendi kendine meme muayenesi İle ilgili bilgi düzeyleri ve kitlenin fark edilmesinde kendi kendine meme muayenesinin etkisi (tez). Afyonkarahisar: Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Cerrahi Hastalıklar Hemşireliği ABD; 2003.

22. Rebecca LS, Kimberly DM, Ahmedin J. Cancer Statistics, 2016. CA Cancer J Clin 2016;66:7-30.

23. Brinton LA, Cook MB, McCormack V, et al. Anthropometric and hormonal risk factors for male breast cancer: male breast cancer pooling project results. J Natl Cancer Inst 2014;106.

24. Ruddy KJ, Winer EP. Male breast cancer: risk factors, biology, diagnosis, treatment, and survivorship. Ann Oncol 2013;24:1434-43.

25. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worlwide in 2012. Globocan 2012. Erişim tarihi: 10.07.2016 http://gco.iarc.fr/today/home.

26. Fidaner C, Eser SY, Parkin DM. Incidence in Izmir in 1993-1994: first results from Izmir Cancer Registry. Eur J Cancer 2001;37:83-92.

27. Ozmen V, Anderson BO. The challenge of breast cancer in low- and middle-income countries-implementing the breast health global initiative guidelines. US Oncology, Touch briefing 2008;76-79.

28. Cancer country profiles. World Health Organization, 2014.

29. Spratt JS, Tabin GR. Gross anatomy of the breast. In: Donegan WL, Spratt JS (Eds). Cancer of the breast, 4th edition. Philadelphia. London: W.B.Saunders, 1995:22-42.

30. Ünal G. Memenin cerrahi anatomisi. In: Ünal G, Ünal H. Meme hastalıkları. İstanbul: Nobel, 2001:15 (memede süt kanalları sistemi)

31. Berkarda B. Meme kanseri. İstanbul: İ.Ü Basımevi; 2000. s.5-87

32. Canbulat N. Sağlık çalışanlarının meme kanseri, kendi kendine meme muayenesi ve mammografiye ilişkin sağlık inançlarının incelenmesi (tez). Erzurum: Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Cerrahi Hastalıklar Hemşireliği Anabilim Dalı; 2006.

33. Değerli Ü, Bozfakıoğlu Y (Eds). Genel Cerrahi, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002.

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

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

36. Göksoy E. Genel cerrahi ders kitabı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, 2010:372-7.

37. Black JM, Jacobs EM. Clinical management for continuum of care, five edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia 1997.

38. Gross RE. Breast cancer: risk factors, screening and prevention. Semin Oncol Nurs 2000;16(3):176-184.

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

40. Murray RK, Granner DK, Mayes PA and Rodwell VW. Metabolism of proteins and amino acids. In: "Harper's Biochemistry". Twenty-second edition, Typopress, Lebanon;1991:267-330.

41. Powers GS and Meister T. Urea Synthesis and Ammonia Metabolism. In: Arias I, Popper H, Schachter D and Shafritz DA. The liver: Biology and Pathobiology". Raven Press, New York; 1982. p.251-63.

42. Altınışık M. Üre döngüsü. Erişim Tarihi: 21.05.2016 www.mustafaaltinisik.org.uk/8.

43. Soeters PB, Hallemeesch MM, Bruins MJ. Quantitative in vivo assesment of arginine utilization and nitric oxide production in endotoxemia. Am J Surgery 2002;183(4):480-8.

44. Onat T, Emerk K, Sözmen EY. İnsan biyokimyası. Ankara: Palme yayıncılık, 2002:100-17.

45. Jenkinson CP, Grigor MR. Rat mammary arginase: isolation and characterization. Biochem Med And Metab Biol 1994;51(2):156-65.

46. Kaysen GA, Strecter HJ. Purification and properties of arginase of rat kidney. Biochem J 1973;133(4):779-88.

47. Efron DT, Barbul A. Arginine and nutrition in renal disease. J Ren Nutr 1999;9(3):142-4.

48. Konarska L, Tomaszewski L, Rolczyk U. Studies on L-arginase in developing rat small intestine, brain and kidney. II. Effect of hydrocortisone and thyroxine. Biochem Med Metab Biol 1986;35(2):170-8.

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

50. Gershonov E, Granoth R, Tzehoval E, Gaoni Y, Fridkin M. 1-Aminocyclobutanecarboxylic acid derivatives as novel structural elements in bioactive peptides: application to tuftsin analogs. J Med Chem 1996;39(24):4833- 43.

51. Foye WO, Lemke TL and Williams DA. Principles of Medicinal Chemistry. New York, MD: Williams & Wilkins, Fourth Edition, 1995.

52. Morris SM Jr. Recent advances in arginine metabolism. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2004;7(1):45-51.

53. Tangphao O, Grossmann M, Chalon S, et al. Pharmacokinetics of intravenous and oral L-arginine in normal volunteers. Br J Clin Pharmacol 1999;47(3):261-6.

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

55. Carcillo JA. Does arginine become a "near" essential amino acid during sepsis? Critical Care Medicine 2003;31(2):657-9.

56. Milner JA. Metabolic aberrations associated with arginine deficiency. J Nutr 1985;115(4):516-23.

57. Robert K, Murray Darly K, Granner Peter A. Mayes Victor Rodwell W. Harper's Biochemistry, Londra, Appleton&Lange, 1990, p.385-91.

58. Hewson S, Clarke JT, Cederbaum S. Prenatal diagnosis for arginase deficiency: a case study. J Inherit Metab Dis 2003;26(6):607-10.

59. Maxwell AJ, Cooke JP. Cardiovascular effects of L-arginine. Curr Opin Nephrol Hypertens 1998;7(1):63-70.

60. Tapiero H, Mathe G, Couvreur GP, Tew KD. Dossier: Free amino acids in human health and pathologies. I. Arginin. Biomed Pharmacother 2002;56(9):439-45.

61. Rodriquez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, Ortiz B, Zea AH, Delgado A, et al. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-spesific T-cell responses. Cancer Res 2004;64(16):5839-49.

62. Kumar AN, Kalyankar GD. Effect of steroid hormones on age dependent changes in rat arginase isoenzymes. Exp Gerontol 1984;19(3):191-98.

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

64. Leu SY, Wang SR. Clinical significance of arginase in colorectal cancer. Cancer 1992;70(4):733-36.

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

66. Edwards AD. The pharmacology of inhaled nitric oxide. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 1995;72(2):F127-130.

67. Furchgott RF, Zawadski JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980;288(5789):373-6.

68. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature 1987;327(6122):524-6.

69. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature 1988;333(6174):664-6.

70. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med 1993;329(27):2002-12.

71. Nathan CF, Hibbs JB Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. Curr Opin Immunol 1991;3(1):65-70.

72. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger. Ann Intern Med 1994;120(3):227-37.

73. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs A. Nitric oxide: Physology, Pathophysology, and Pharmacology. Pharmacol Reviews 1991;43(2):109-42.

74. Star RA. Nitric oxide. Am J Med Sci 1993;306(5):348-58.

75. Tayeh MA, Marletta MA. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. J Biol Chem 1989;264(33):19654-8.

76. Morris SM, Billiar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. Am J Physiol 1994;266(6 Pt 1):E829-39.

77. Marin J, Rodríguez-Martínez MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. Pharmacol Ther 1997;75(2):111-34.

78. Wang XL, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. Mol Genet Metab 2000;70(4):241-51.

79. Aladağ MA, Türköz Y, Özerol İH. Nitrik oksit ve nörofizyopatolojik etkileri. T. Klin Tıp Bilimleri 2000;20:107-11.

80. Cooke JP, Dzau V. Nitric oxide synthase: Role in the genesis of vascular disease. Annu Rev Med 1997;48:489-509.

81. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. J Pathol 2003;199(1):8-17.

82. eNOS enziminin etki mekanizması. iNOS enziminin etki mekanizması. nNOS enziminin etki mekanizması. EGCG'nin moleküler yapısı. Erişim tarihi: 18.07.2016.
www.sigmaaldrich.com

83. Thiemermann C. The role of the L-arginine: nitric oxide pathway in circulatory shock. Adv Pharmacol 1994;28:45-79.

84. Kiechle FL, Malinski T. Nitric oxide: Biochemistry, pathophysiology and detection. Am J Clin Pathol 1993;100(5):567-75.

85. Tosun İ, Karadeniz B. Çay ve çay fenoliklerinin antioksidan aktivitesi. J of Fac of Agric OMU 2005;20:78-83.

86. Trevisanato SI, Kim YI. Tea and health. Nutr Rev 2000;58(1):1-10.

87. Fujimura Y, Hirofumi T. Molecular basis for the anti-cancer activity of EGCG in vivo. Handbook of Green Tea and Health Research. McKinley H, Jamieson M (Ed.). NewYork, Nova Science, 2009.

88. Gupta S, Saha B, Giri AK. Comparative antimutagenic and anticlastogenic effects of green tea and black tea: a review. Mutat Res 2002;512(1):37-65.

89. Chu KO, Wang CC, Chu CY, Rogers MS, Choy KW, Pang CP. Determination of catechin and catechin gallates in tissues bu liquid chromatography with coulometric array detection and selective solid phase extraction. J Chromatogr 2004;810:187-95.

90. Watanabe H, Kobayashi A, Yamamoto T, Suzuki S, Hayashi H, Yamazaki N. Alterations of human erythrocyte membrane fluidity by oxygen-derived free radicals and calcium. Free Radic Biol Med 1990;8(6):507-14.

91. Tas S, Sarandol E, Ziyanok S, Aslan K, Dirican M. Effects of green tea on serum paraoxonase/arylesterase activites in streptozotocin-induced diabetic rats. Nutr Res 2005;25:1061-74.

92. Lin JK, Lin CL, Liang YC, Shiau SYL, Juan IM. Survey of catechins, gallic acid, and methylxanthines in green, oolong, pu-erh, and black teas. J Agric Food Chem 1998;46:3635-42.

93. Shimizu M, Weinstein IB. Modulation of signal transduction by tea catechins and related phytochemicals. Mutat Res 2005;591(1-2):147-60.

94. Gerhauser C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. Eur J Cancer 2005;41(13):1941-54.

95. Benzie IFF, Szeto YT. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioksidant power assay. J Agric Food Chem 1999;47(2):633-36.

96. Wang H, Provan GJ, Helliwell K. Tea flavonoids: Their functions, utilization and analysis. Trends Food Sci Technol 2000;11:152-60.

97. Pastore RL, Fratellone P. Potential health benefıts of green tea (*Camellia sinensis*): a narrative review. Explore 2006;2(6):531-39.

98. Sutherland BA, Rahman RM, Appleton I. Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. J Nutr Biochem 2006;17(5):291-306.

99. Gramza A, Korczak J. Tea constituents (*Camellia sinensis L*.) as antioxidants in lipid systems. Trends Food Sci Technol 2005;16:351-58.

100. Nwuha V, Nakajima M, Tong J, Ichikawa S. Solubility study of green tea extracts in pure solvents and edible oils. J Food Eng 1999;40:161-5.

101. Mendoza-Wilson AM, Glossman-Mitnik D. Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (+)-catechin and (-)-epicatechin related to their antioxidant ability. J Mol Struct: Theochem 2006;761:97-106.

102. Dalluge JJ, Nelson BC. Determination of tea catechins. J Chromatogr A. 2000;881(1-2):411-24.

103. Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism and antioxidant functions. Crit Rev Food Sci Nutr 2003;43(1):89-143.

104. Yang CS, Lambert JD, Sang S. Antioxidative and anti-carcinogenic activities of tea polyphenols. Arch Toxicol 2009;83(1):11-21.

105. Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulatin of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. Biochem Pharmacol 2006;72(11):1439-52.

106. Khan N, Mukhtar H. Tea polyphenols for health promotion. Life Sci 2007;81(7):519–33.

107. Paschka AG, Butler R, Young CY. Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by the green tea component, (-)-epigallocatechin-3-gallate. Cancer Lett 1998;130(1-2):1-7.

108. Gupta S, Hastak K, Afaq F, Ahmad N, Mukhtar H. Essential role of caspases in epigallocatechin-3-gallate-mediated inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis. Oncogene 2004;23(14):2507-22.

109. Mittal A, Pate MS, Wylie RC, Tollefsbol TO, Katiyar SK. EGCG down-regulates telomerase in human breast carcinoma MCF-7 cells, leading to

suppression of cell viability and induction of apoptosis. Int J Oncol 2004;24(3):703-10.

110. Nihal M, Ahmad N, Mukhtar H, Wood GS. Anti-proliferative and proapoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human melanoma: possible implications for the chemoprevention of melanoma. Int J Cancer 2005;114(4):513-21.

111. Qanungo S, Das M, Haldar S, Basu A. Epigallocatechin-3-gallate induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells. Carcinogenesis 2005;26(5):958-67.

112. Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. Antioxid Redox Signal 2008;10(3):475–510.

113. Kuroda Y, Hara Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. Mutat Res 1999;436(1):69-97.

114. Nakano H, Ono K. Differential inhibitory effects of some catechin derivatives on the activities of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and cellular deoxyribonucleic and ribonucleic acid polymerases. Biochem J 1990;29(11):2841-45.

115. Vinson JA, Su X, Zubik PL, Bose P. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Fruits. J Agric Food Chem 2001;49(11):5315-21.

116. Hagerman AE, Carlson DM. Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry. Phytochemical Analysis 1998;2:689–704.

117. Ryan P, Hynes MJ. The kinetics and mechanisms of the complex formation and antioxidant behaviour of the polyphenols EGCg and ECG with iron (III). Journal of Inorganic Biochemistry 2007;101(4):585-93.

118. Kumaran VS, Arulmathi K, Srividhya R, Kalaiselvi P. Repletion of antioxidant status by EGCG and retardation of oxidative damage induced macromolecular anomalies in aged rats. Experimental Gerontology 2008;43(3):176–183.

119. Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor kappaB in cancer cells versus normal cells. Arch Biochem Biophys 2000;376(2):338-46.

120. Okabe S, Ochiai Y, Aida M, Park K, Kim SJ, Nomura T, Suganuma M, Fujiki H. Mechanistic aspects of green tea as a cancer preventive: effect of components on human stomach cancer cell lines. Jpn J Cancer Res 1999;90(7):733-39.

121. Chung LY, Cheung TC, Kong SK, Fung KP, Choy YM, Chan ZY, Kwok TT. Induction of apoptosis by green tea catechins in human prostate cancer DU145 cells. Life Sci 2001;68(10):1207–14.

122. Otsuka T, Ogo T, Eto T, Asano Y, Suganuma M, Niho Y. Growth inhibition of leukemic cells by (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of green tea. Life Sci 1998;63(16):1397-1403.

123. Hayakawa S, Saeki K, Sazuka M, Suzuki Y, Shoji Y, Ohta T et al. Apoptosis induction by epigallocatechin gallate involves its binding to Fas. Biochem Biophys Res Commun 2001;285(5):1102-06.

124. Islam S, Islam N, Kermode T, Johnstone B, Mukhtar H, Moskowitz RW et al. Involvement of caspase-3 in epigallocatechine-3-gallate-mediated apoptosis of human chondrosarcoma cells. Biochem Biophys Res Commun 2000;270(3):793-7.

125. Dirks PB, Rutka JT. Current concepts in neuro-oncology: the cell cycle--a review. J Neurosurgery 1997;40(5):1013-15.

126. Aktas O, Prozorovski T, Smorodchenko A, Savaskan NE, Lauster R, Kloetzel PM, Infante-Duarte C, Brocke S, Zipp F. Green tea epigallocatechin-3-gallate mediates T cellular NF-kappa B inhibition and exerts neuroprotection in autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 2004;173(9):5794-5800.

127. Lorenz M, Wessler S, Follmann E, Michaelis W, Düsterhöft T, Baumann G, Stangl K, Stangl V. A constituent of green tea, Epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP- dependent protein kinase-, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. J Biol Chem 2004;13:6190-95.

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

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

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

131. 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. J Immunol 1999;163:3771-7.

132. Kürkçü E. Deneysel olarak oluşturulmuş meme tümörlerinde curcuminin arginaz enzim aktivitesi, ornitin ve nitrik oksit düzeylerine etkisi (tez). Edirne: T.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı; 2008.

133. Cortas NK, Wakid NW. Determination inorganic nitrate in serum and urine by kinetic cadmium-reduction method. Clin Chem 1990;36:1440-3.

134. Dünya Sağlık Örgütü Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu, Dünya Kanser Raporu 2008. Erişim Tarihi: 14.06.2016. http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789283204237_tur_p1-104.pdf

135. TC Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Daire Başkanlığı, Türkiye Kanser İnsidansı. Erişim tarihi: 14.06.2016. http://www.kanser.gov.tr/folders/file/8iL-2006-SON.pdf

136. Kutluk T, Kars A (Eds). Kanser konusunda genel bilgiler. Ankara: Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları, 1994:26.

137. Erişim tarihi: 15.06.2016. www.cancervic.org.au/downloads/other_languages/turkish/Cancer_WhatIs.pdf

138. Lu YP, Lou YR, Xie JG, Peng QY, Liao J, Yang CS, et al. Topical applications of caffeine or (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) inhibit carcinogenesis and selectively increase apoptosis in UVB-induced skin tumors in mice. Proc Natl Acad Sci 2002;99:12455-60.

139. Yang GY, Liao J, Li C, Chung J, Yurkow EJ, Ho CT, Yang CS. Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and peroxide production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. Carcinogenesis 2000;21:2035-39.

140. Agarwal R, Katiyar SK, Zaidi SI, Mukhtar H. Inhibition of skin tumor promoter-caused induction of epidermal ornithine decarboxylase in SENCAR mice by polyphenolic fraction isolated from green tea and its individual epicatechin derivatives. Cancer Res 1992;52:3582-88.

141. Steele VE, Kelloff GJ, Balentine D, Boone CW, Mehta R, Bagheri D, Sigman CC, Zhu S, Sharma S. Comparative chemopreventive mechanisms of green tea, black tea and selected polyphenol extracts measured by in vitro bioassays. Carcinogenesis 2000;21:63-67.

142. Leone M, Zhai D, Sareth S, Kitada S, Reed JC, Pellecchia M. Cancer prevention by tea polyphenols is linked to their direct inhibition of antiapoptotic Bcl-2-family proteins. Cancer Res 2003;63:8118-21.

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

144. Matthews HR. Polyamines, chromatin structure and transcription. Bioessays 1993;15(8):561-6.

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

146. Gökmen S, Yörük Y, Yorulmaz F, Gülen Ş. Arginase and ornithine as markers in human non-small cell lung carcinoma. Cancer Biochem Biophys 1999;17:125-31.

147. Konarska L, Kolasa T, Albrecht P, Regula A. Can arginasebe a marker of the large bowel neoplasia? Acta Biochim Pol 1993;40(1):164-6.

148. 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):3008-12.

149. 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):119-27.

150. Yip MC, Knox WE. Function of arginase in lactating mammary gland. Biochem J 1972;127:893.

151. Gugliucci A. Polyamines as clinical laboratory tools. Clin Chem Acta 2004;344:23-35.

152. Kingsnorth AN, Wallace HM, Bundred NJ Dixon JM. Elevation of monoacetylated polyamines in human breast cancer. Br J Surg 1984;71(5):352-6.

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

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

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

156. Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. Ann Rev Physiol 1995;57:707-36.

157. Bonavida B, Khineche S, Huerta-Yepez S, Garban H. Therapeutic potential of nitric oxide in cancer. Drug Resist Updat 2006;9(3):157-73.

158. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. Nat Rev Cancer 2006;6:521-34.

159. Çekmen MB, Turgut M, Türköz Y, Aygün D, Gözükara EM. Nitrik oksit ve nitrik oksit sentazın fizyolojik ve patolojik özellikleri. Türkiye Klinikleri J Pediatr 2001;10:226-35.

160. Hofseth LJ, Hussain SP, Wogan GN, Harris CC. Nitric oxide in cancer and chemoprevention. Free Radic Biol Med 2003;34:955-68.

161. 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;54:2462-7.

162. Duffy SJ, Keaney JF, Jr Holbrook M, Gökçe N, Swerdloff PL, Frei B, et al. Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. Circulation 2001;104:151-6.

163. Andriambeloson E, Magnier C, Haan-Archipoff G, Lobstein A, Anton R, Beretz A, Stoclet J, Andriantsitohaina R. Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. J Nutr 1998;128:2324-33.

164. Sanae F, Miyaichi Y, Kizu H, Hyashi H. Effects of catechins on vascular tone in rat thoracic aorta with endothelium. Life Sci 2002;71:2553-62.

165. Shen JZ, Zheng XF, Wei EQ, Kwan CY. Green tea catechins evoke a phasic contraction in rat aorta via H2O2-mediated multiple-signalling pathways. Clin Uzm Pharmacol Physiol 2003;30:88-95.

166. Mario Lorenz, Silja Wessler, Elena Follmann, Wanda Michaelis, Thomas Düsterhöft, Gert Baumann, et al. A constituent of green tea, Epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent protein kinase-, and akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. J Biol Chem 2004;279(7):6190-5.

167. 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;31:1414-19.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER **Sayfa No**

Şekil 1. 2014 yılı Türkiye kanser verileri 5
Şekil 2. Memenin anatomik yapısı 6
Şekil 3. Üre döngüsü 9
Şekil 4. Karbamoil fosfat oluşumu 10
Şekil 5. Ornitinden sitrülin oluşumu 11
Şekil 6. Arginosüksinat oluşumu 12
Şekil 7. Arginin ve fumarat oluşumu 12
Şekil 8. NO'un L-argininden NOS geni tarafından sentezi 15
Şekil 9. Nitrik oksitin damar düz kasındaki fizyolojik ve farmakolojik etkileri 16
Şekil 10. eNOS enziminin etki mekanizması 17
Şekil 11. iNOS enziminin etki mekanizması 18
Şekil 12. nNOS enziminin etki mekanizması 19
Şekil 13. EGCG'nin kimyasal şekli 21
Şekil 14. Yeşil çayda bulunan majör polifenoller 22
Şekil 15. Üre standart çalışması regresyon grafiği 32
Şekil 16. Ornitin standart çalışması regresyon grafiği 34
Şekil 17. Protein standart regresyon eğrisi 36
Şekil 18. Serum arginaz enzim aktiviteleri 43
Şekil 19. Serum NO düzeyleri 44

Şekil 20. Doku arginaz enzim düzeyleri 45
Şekil 21. Doku ornitin düzeyleri 46
Şekil 22. Doku NO düzeyleri 46
Şekil 23. Doku eNOS skorları 47
Şekil 24. Malign tümör hücreleri ve nekroz 47
Şekil 25. Kontrol grubu eNOS ile yaygın hafif orta dereceli boyanma 48
Şekil 26. Kanser + Düşük doz grubu eNOS boyama 48
Şekil 27. Kanser + Yüksek doz grubu eNOS boyama 49

TABLOLAR Sayfa No

Tablo 1. Çay yaprağının kimyasal bileşimi 20
Tablo 2. Gruplara ait serum NO düzeyleri ve arginaz enzim aktiviteleri 42
Tablo 3. Serumda çalışılan parametreler için istatistiksel karşışaştırmalar 42
Tablo 4. Grupların doku ornitin, NO düzeyleri, eNOS skorları ve arginaz enzim aktiviteleri 44
Tablo 5. Dokuda çalışılan parametreler için istatistiksel karşılaştırmalar 44

ÖZGEÇMİŞ

13.10.1988 tarihinde İstanbul'da doğdum. İlköğrenimimi Zübeyde Hanım İlköğretim Okulu ve Alemdarpaşa İlköğretim Okulu'nda tamamladım. Ortaöğrenimimi Gülizar ve Zeki Obdan Lisesi'nde tamamladım. Üniversite öğrenimimi ise Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde 2013 yılında tamamladım. 2013 yılında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. 2015 yılında Trakya Üniversitesi Eğitim Fakültesi'nde Pedagojik Formasyon eğitimi aldım. Halen yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.

Yüksek lisans eğitimimde katıldığım çalışmalar:

Sönmez MB, Görgülü Y, Köse Çınar R, Kahyacı Kılıç E, Ünal A, Vardar ME. Alterations of BDNF and GDNF serum levels in alcohol-addicted patients during alcohol withdrawal. Eur J Psychiat 2016;30(2):109-118.

Sönmez MB, Köse Çınar R, Görgülü Y, Kahyacı Kılıç EE, Ünal A. Evaluation of phosphatidylethanol by ELISA for detection of excessive alcohol use compared with traditional biomarkers: a case-control study. Bulletin of Clinical Psychopharmacology; (article in press).

EKLER

Ek 1. Etik kurul raporu

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

EDİRNE

Oturum Sayısı: 2014/11 **Karar Tarihi: 10.12.2014**

KARAR NO: 2014.11.01

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Hakan ERBAŞ'ın yaptığı, Yüksek Lisans Öğrencisi Aycan ÜNAL'ın yüksek lisans tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2014/38 protokol nolu "**Deneysel olarak oluşturulmuş meme tümöründe Epigallokateşin-3-gallat'ın olası tedavi edici rolü**'' başlıklı çalışma görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Doç. Dr. Enis ULUÇAM Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☑ yok	☑ evet ☐ hayır	
Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Vet. Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivil Üye	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☑ evet ☐ hayır	
Doç. Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	-İZİNLİ-
Doç. Dr. Tevfik AKTOZ Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Yrd. Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	
Osman GÜLTEKİN Sivil Üye	☐ var ☐ yok	☐ evet ☐ hayır	-İZİNLİ-