

Meme Kanseri Hastalarda Lipid Peroksidasyonu ve Bazı Enzim Aktiviteleri Arasındaki İlişki

[The Interrelation of Lipid Peroxidation Some Enzyme Activities in Human Breast Carcinoma]

Seval Yılmaz

Sema Temizer Ozan

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya
Anabilim Dalı, ELAZIĞ

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya
Anabilim Dalı, ELAZIĞ
sevyilars@yahoo.com
Tel: +90-424-237 40 00
Fax: +90-424-238 81 93

Kayıt tarihi 21.03.2003; kabul tarihi 20.12.2003
[Received 21.03.2003; accepted 20.12.2003]

ÖZET

Meme kanseri yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olduğu için dünyadaki en önemli üçüncü kanser türüdür. Serbest oksijen radikalleri protein, lipid ve DNA içeren makromoleküllerde, membranlarda ve mitokondrilerde hasara neden olabilir. DNA hasarının karsinogeneze katkısı olduğu bildirilmektedir.

Çalışmada; meme kanseri ile oksidatif stres ve bazı enzimlerin aktiviteleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. 10 adet invaziv duktal karsinomlu hastanın tümörlü ve tümör çevresindeki sağlıklı meme dokularında malondialdehid düzeylerine, katalaz, glutatyon peroksidaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, piruvat kinaz ve arjinaz aktivitelerine bakılmıştır.

Meme tümör dokusunda malondialdehid düzeyi normal dokudakinden daha yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Tümör dokusunda katalaz, glutatyon peroksidaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, piruvat kinaz ve arjinaz aktiviteleri sağlıklı dokularla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).

Malondialdehid düzeyindeki artmanın invaziv duktal karsinomda yetersiz damarlaşmadan meydana gelen nekroz oluşumu ile ilgili olabileceği, antioksidan enzimlerdeki artışın ise tümör hücrelerinde enzim ekspresyonundaki artışa bağlı olabileceği düşünülmektedir. Meme kanserli hastaların tümör dokularındaki arjinaz aktivitesinde görülen artışın, poliamin biyosentezine substrat olarak ornitini sağlaması nedeniyle karsinogeneze önemli bir role sahip olabileceğini söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: meme kanseri, lipid peroksidasyonu, katalaz, GSH-Px, G6PD, piruvat kinaz, arjinaz

ABSTRACT

Carcinoma of the breast, the third most common cancer worldwide, accounts for the highest morbidity and mortality. Oxygen free radicals are able to cause damage to membranes, mitochondria and macromolecules including proteins, lipids and DNA. Accumulation of DNA damages has been suggested to contribute to carcinogenesis.

In the present study, the relationship between oxidative stress and some enzyme activities in breast cancer was investigated. Malondialdehyde level, catalase, glutathione peroxidase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, pyruvate kinase and arginase activities in tumor tissues and adjacent normal tissues of 10 patients with invasive ductal carcinoma were determined.

Higher malondialdehyde levels were observed in tumor tissues than noncancerous tissues ($p<0.001$). The activities of catalase, glutathione peroxidase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, pyruvate kinase, arginase in tumor tissues significantly increased compared to the control ($p<0.001$).

We suggest that the increased malondialdehyde levels may be related to the presence of necrosis in invasive ductal carcinoma resulted from insufficient vascularity, the increased antioxidant enzymes may be due to an increase in enzyme expression in tumor cells. Elevated tissue arginase activity may be responsible for the increased production of ornithine, a precursor of polyamine biosynthesis, and therefore an important factor in carcinogenesis.

Key Words: breast carcinoma, lipid peroxidation, GSH-Px, Catalase, G6PD, pyruvate kinase, arginase

GİRİŞ

Çeşitli organlarda gelişerek her yaştaki bireyleri etkileyen kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra en sık rastlanan ölüm nedenidir (1).

Yaşlanma, koroner kalp hastalıkları ve kanser başta olmak üzere birçok hastalıkta lipid peroksidasyonunun önemli rol oynadığı bilinmektedir. Lipid peroksidasyonunun ikinci bir ürünü olan malondialdehid (MDA) doku reaksiyon zincir hızının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (2, 3). Birçok çalışmada tümörlerde lipid peroksidasyonunun arttığı bildirilmiştir. Lipid hidroperoksitler doğrudan DNA zincirini kırabilir ve lipid peroksil ve alkoksil radikalleri DNA'da oksidasyona sebep olabilir (4). Okzoaldehidler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece, kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar (5).

Meme kanserli hastalarda lipid peroksidasyonundaki artış oksidatif strese karşı koruyucu olarak artmış antioksidan savunma sistemi ile dengelenmiştir. Katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) primer enzimatik savunma sistemleridir (6). Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) oksijen radikallerine karşı hücrel savunma mekanizmalarında yer alan önemli bir antioksidan enzimdir. G6PD laktasyon esnasında meme bezinde yağ asidi sentezlenmesi için gerekli bir kofaktör olan NADPH'ın üretiminde rol almaktadır (7).

Hidrojen peroksit (H_2O_2), katalaz ve GSH-Px tarafından su ve moleküler oksijene dönüştürülerek metabolize edilmektedir (6). Katalaz; kanser, diyabet, katarakt, ateroskleroz, iskemik-reperfüzyon hasarı, artrit, nörodegeneratif hastalıklar, beslenme yetersizliği ve yaşlanmayı içine alan pek çok patolojik şartlarda ortaya çıkan oksidatif strese karşı savunmada antioksidan sistemin öncelikli bir enzimidir. Substrat olarak glutatyon kullanan GSH-Px ise serbest oksijen radikalleri, peroksitler ve kanserojenlere karşı savunmada önemli bir rol oynar. Ayrıca GSH-Px lipoksigenaz ve siklooksigenaz yollarını değiştirerek tümör oluşumunda anahtar bir rol oynar. Tümörlerde H_2O_2 ve diğer hidroperoksitlere karşı enzim savunmasının ilk enzimi olan GSH-Px aktivitesinde önemli artış bildirilmiştir (8, 9).

Piruvat kinaz; adenosin difosfatın substrat düzeyinde fosforilasyonunu katalize eden glikolizin anahtar regülatör bir enzimidir. Tümör hücrelerinde karbonhidrat metabolizmasında değişiklikler gözlenmiştir (10). İyi huylu ve malin doku proliferasyonlarında piruvat kinaz aktivitesinin genellikle arttığı rapor edilmiştir. Bu da tümör hücrelerinin metabolizmasındaki enerji ve metabolitlerin sağlanması için glikolizin gerekliliğini açıklamaktadır (11).

Üre döngüsünün bir enzimi olan arjinaz; arjininin üre ve ornitine hidrolizini katalizler. Karaciğer dışı arjinazın poliamin sağlanmasında rol oynadığı ileri sürülmüştür.

Poliaminler kanser hücreleri gibi hızla bölünen ve çoğalan hücreler tarafından fazla miktarlarda sentezlenen organik katyonlardır. Arjinaz aktivitesinin bazı tip kanserlerde değiştiği gösterilmiştir (12, 13).

Çalışmanın amacı; meme kanserli hastalarda MDA, katalaz, GSH-Px, G6PD, piruvat kinaz ve arjinaz aktiviteleri ve bu aktivitelerdeki değişimin kanser gelişimindeki rolünü araştırmaktır. Bu amaçla invaziv duktal karsinom tanısı konmuş hastaların tümör ve tümör çevresindeki normal meme doku örneklerinde MDA düzeyleri ile katalaz, GSH-Px, G6PD, piruvat kinaz ve arjinaz aktiviteleri ölçülmüştür.

MATERYAL VE METOD

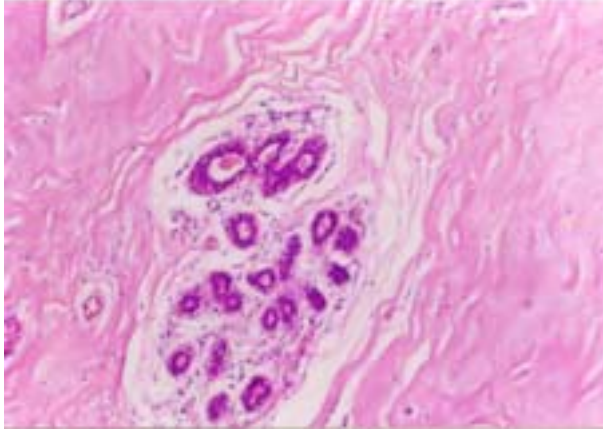
Çalışmanın materyalini; Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Genel Cerrahi Servisinden mastektomi ile alınan ve patolojik incelemeler sonucu evre II invaziv duktal karsinom tanısı konmuş yaş ortalamaları 50 ± 10 olan 10 hastanın tümör ve tümör çevresindeki sağlıklı alanlarından alınan doku örnekleri oluşturmaktadır. Çalışma grubuna dahil edilen hastaların hiç kemoterapi ya da radyoterapi görmemiş olmalarına dikkat edilmiştir. Meme doku örnekleri % 10 formalin içerisinde tespit edildikten sonra rutin takip işlemine alınmıştır. Parafin bloklardan elde edilen 4 mm kalınlığındaki kesitler Hematoksilin-Eosin ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir.

Tümör ve normal meme dokuları serum fizyolojik (% 0,9'luk NaCl) ile yıkandıktan sonra MDA tayini için % 1,15 KCl ile, GSH-Px, katalaz, G6PD, piruvat kinaz ve arjinaz aktivite tayini için Tris-HCl tamponu (50 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 7,6) ile 1:10 oranda sulandırılarak homojenize edilmiştir. Homojenat soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-5B) MDA ve katalaz tayini için 1.000xg'de 15 dakika, piruvat kinaz ve arjinaz tayini için 8.000xg'de 30 dakika, GSH-Px ve G6PD tayini için 30.000xg'de 54 dakika santrifüj edilerek süpernatant alınmıştır.

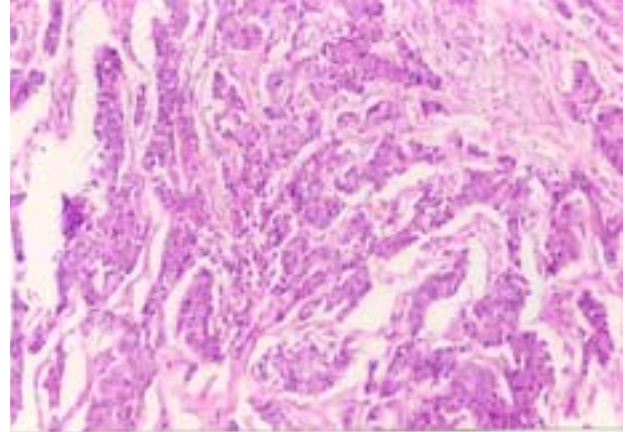
MDA düzeyi Ohkawa ve ark. (3)'nün modifiye ettiği yöntemle göre saptanmıştır. Yağ asidi peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girerek pembe renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Oluşan bu pembe renk 532 nm'de okunur.

H_2O_2 'in katalaz tarafından yıkım hızı, H_2O_2 'in 240 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak Aebi (14) yöntemi ile ölçülmüştür. GSH-Px aktivitesi NADPH'ın NADP'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans farkının 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle tayin edilmiştir (15).

G6PD aktiviteleri Beutler (16) metoduna göre ölçülmüştür. Piruvat kinaz aktivitesi fruktoz difosfat varlığında, 340 nm'de NADH'in azalan absorbans hızının ölçülmesi esasına dayanan Beutler ve ark. (17)'nün yöntemi ile çalışılmıştır. Arjinaz aktivitesi ise arjinin-arjinaz reaksiyonu



Şekil 1. Normal meme dokusunun histolojik görünümü (HEx100).



Şekil 2. İnvaziv duktal karsinomda pleomorfik, hiperkromatik nüveli hücrelerden oluşmuş tümöral yapının görünümü (HEx100).

sonucu oluşan ürenin tiyosemikarbazid diasetilmonoksim (TDMU) yöntemi ile spektrofotometrik olarak saptanmıştır (18). Protein konsantrasyonu ise Lowry (19) metoduna göre çalışılmıştır. Sonuçlar Mann-Whitney U testi uygulanarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Normal meme doku örneklerinde yağ ve bağ dokusu alanları içerisinde meme bez ve duktus yapıları saptanmıştır (Şekil 1). Tümör meme doku örneklerinde ise “stromayı invaze etmiş yer yer solid alanlara rastlanmış, yer yer de küçük ve irregüler şekilli bez yapılarını döşeyen hücrelerde pleomorfizm ve hiperkromatik hücreler görülmüştür” (Şekil 2).

Normal meme dokularında katalaz aktivitesi $7,57 \pm 3,10$ k/g protein, GSH-Px aktivitesi $0,04 \pm 0,02$ U/mg protein, G6PD aktivitesi $0,38 \pm 0,18$ U/mg protein, piruvat kinaz aktivitesi $0,57 \pm 0,55$ U/mg protein, arjinaz aktivitesi $0,39 \pm 0,04$ U/mg protein iken; tümörlü meme dokularında katalaz aktivitesi $22,57 \pm 9,62$ k/g protein, GSH-Px aktivitesi $0,14 \pm 0,01$ U/mg protein, G6PD aktivitesi $1,98 \pm 0,68$ U/mg protein, piruvat kinaz aktivitesi $5,78 \pm 2,79$ U/mg protein, arjinaz aktivitesi $2,82 \pm 0,09$ U/mg protein olarak bulunmuştur (Tablo 1, 2). MDA düzeyleri normal meme dokularında $0,37 \pm 0,07$ nmol/gr yaş doku, tümörlü meme dokularında $1,31 \pm 0,40$ nmol/gr yaş doku olarak saptanmıştır (Tablo 2). Tümör meme dokusunda lipid peroksidasyonunun, antioksidan enzimlerin, piruvat kinaz ve arjinaz aktivitelerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı görülmektedir ($p < 0,001$).

Tablo 1 Meme kanserli hastaların tümör ve tümör çevresi sağlıklı dokularında antioksidan enzim aktiviteleri

Doku Tipi	n	Katalaz (k/ g protein)	GSH-Px (U/mg protein)	G6PD (U/mg protein)
Normal	10	$7,57 \pm 3,10$	$0,04 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,18$
Tümör	10	$22,57 \pm 9,62^*$	$0,14 \pm 0,01^*$	$1,98 \pm 0,68^*$
p		*	*	*

* $p < 0,001$

TARTIŞMA

Deneyisel ve epidemiyolojik çalışmalar, kanser gelişiminin patogeneziinde serbest oksijen radikallerinin rol aldığını göstermektedir. Özellikle metal iyonlarının varlığında serbest oksijen radikalleri hücrede protein, lipid ve DNA içeren makromoleküller ile reaksiyona girerek oksidatif hasara sebep olmaktadır. DNA hasarının artmasının karsinogeneze katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür. İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan H_2O_2 membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA serbest radikallerden kolay zarar görebilen önemli bir hedeftir (4, 6).

Çalışmada meme kanser dokusunda MDA düzeyi sağlam dokudan daha yüksek bulunmuştur. İnfiltrativ duktal karsinomlu hastalarda Huang ve ark. (20) serumda, Portakal ve ark. (6), Wang ve ark. (21) meme dokusunda MDA düzeyinin önemli derecede yükseldiğini ve meme kanserine bağlı olarak serum ve dokuda oksidatif stresin arttığını bildirmişlerdir. Meme, kolon ve prostat kanserli hastalarda prooksidan-antioksidan düzeyindeki değişikliklere bağlı olarak oluşan oksidatif stresin malin hastalıklarla ilişkisi olabileceği bildirilmiştir.

Murrell (22) serbest oksijen radikalleri gibi kimyasal kanserojenlerin de meme epitelinde hasar, fibroblastik

Tablo 2 Meme kanserli hastaların tümör ve tümör çevresi sağlıklı dokularında malondialdehid düzeyleri, piruvat kinaz ve arjinaz aktiviteleri

Doku Tipi	n	Malondialdehid (nmol/ml)	Piruvat kinaz (U/mg protein)	Arjinaz (U/mg protein)
Normal	10	$0,37 \pm 0,07$	$0,57 \pm 0,55$	$0,39 \pm 0,04$
Tümör	10	$1,31 \pm 0,40^*$	$5,78 \pm 2,79^*$	$2,82 \pm 0,09^*$
p		*	*	*

* $p < 0,001$

proliferasyon, epitelyal hiperplazi, hücresele atipi ve sonuçta meme kanserine yol açabileceğini göstermiştir.

Postmenapozal dönemde meme kanserli kadınlarda MDA konsantrasyonundaki artışın tamoksifen tedavisi ile azaldığı gösterilmiştir (23). Antioksidan tüketimi ile ilişkili olan serbest oksijen türlerinin aşırı üretiminin oksidatif stres ile sonuçlandığı kabul edilmektedir (24). Kumaraguruparan ve ark. (25) meme kanserinde doku lipid peroksidasyon artışının artmış antioksidan kapasite ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Antioksidan enzimlerin arttığı kanser hücrelerinin sitotoksik lenfositler tarafından tanınmadığı tahmin edilmektedir. Meme kanserinin gelişimi ile ilişkili olarak artmış lipid peroksidasyonu ve antioksidan savunmalar tümör hücreleri için bir büyüme avantajı sunabilir.

Meme tümör hücrelerinde GSH-Px aktivitesinin normal doku ile karşılaştırıldığında belirgin olarak arttığı bulunmuştur. Daha önceki çalışmalarda da enzimin aşırı ekspresyonuna bağlı olan meme kanserli dokularda GSH-Px aktivitesinin yüksek olduğu rapor edilmiştir (25). GSH-Px aktivitesinin insan meme dokusunda (MCF-7 hücreleri) 25 kat daha yüksek olduğunu bildirilmiştir (26). Meme kanser hücrelerindeki yüksek GSH-Px aktivitesinin genomik DNA'nın artmış ekspresyonundan meydana geldiği ileri sürülmektedir. Bu nedenle meme tümör dokusunda GSH-Px aktivitesinin artması hücre proliferasyonunun "belirteci" olabilir.

Yüksek H_2O_2 konsantrasyonlarında katalaz, GSH-Px enziminden daha etkilidir. Katalaz enzimi prostat ve meme kanser dokularında belirgin olarak yüksektir. Bu artış tümör hücrelerindeki enzim ekspresyonundaki artmaya bağlı olabilir (27). Kanserlerde eritrosit süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz aktivitelerinde düşüş bildirilmiştir. Bu antioksidan enzimler lipid peroksidasyonuna aracılık eden O_2^- ve H_2O_2 'ye karşı eritrositleri korur (25). Kumaraguruparan ve ark. (8) meme kanserli hastalarda eritrosit lipid peroksidasyondaki artış ile SOD ve katalaz aktivitesindeki düşüş arasında bir ilişkinin olduğunu bildirmişlerdir.

Serbest oksijen radikallerinin tümör ilerlemesini ve başlayan hücre çoğalmasını artırabileceği, antioksidan enzimlerin tümör başlamasını ve ilerlemesini inhibe edebileceği ihtimali yüksektir (7). Antioksidan savunma sisteminin tümör meme dokusunda değiştiği, fakat tümör dokularında lipid peroksidasyonunun şekillenmesinin primer olarak önemli olduğu gözlenmiştir. MDA düzeyindeki artmanın invaziv duktal karsinomda yetersiz damarlaştırmadan meydana gelen nekroz oluşumu ile ilgili olabileceği ve kanser hücrelerinde serbest oksijen radikallerinin artmasının enzimlerin aşırı ekspresyonuna sebep olabileceği, artmış antioksidan enzim aktivitesinin de hücrelerin kanserojen ajanlara hassasiyeti ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Meme tümörlerinde piruvat kinaz ve G6PD aktiviteleri yüksek bulunmuştur. Benzer bulgular diğer kanser gruplarında da görülmektedir (6, 28, 29). Portakal ve

ark. (6) normal meme dokusunda MDA konsantrasyonunu $1,14 \pm 0,20$ nmol/mg protein, katalaz aktivitesini $137,18 \pm 15,84$ U/mg protein, GSH-Px aktivitesini $19,78 \pm 2,69$ U/mg protein, infiltrativ duktal karsinomlu hastaların meme dokusunda MDA konsantrasyonunu $4,07 \pm 0,69$ nmol/mg protein, katalaz aktivitesini $444,45 \pm 51,97$ U/mg protein, GSH-Px aktivitesini $47,35 \pm 6,58$ U/mg protein bulmuşlardır. Hilf ve ark. (28) normal meme (ışık mikroskobu ile tanı konmuş) veya fibroblastik hastalık olarak teşhis edilen örneklerde piruvat kinaz aktivitesinin $2,72 \pm 0,38$ μ mol/dakika/mg DNA, G6PD aktivitesinin $0,125 \pm 0,012$ μ mol/dakika/mg, izositrat dehidrogenaz aktivitesinin $0,303 \pm 0,022$ μ mol/dakika/mg ve heksokinaz aktivitesinin $0,048 \pm 0,008$ μ mol/dakika/mg olduğunu, memenin duktal karsinomunda ise piruvat kinaz aktivitesinin $9,84 \pm 0,64$ μ mol/dakika/mg DNA, G6PD aktivitesinin $0,288 \pm 0,020$ μ mol/dakika/mg, izositrat dehidrogenaz aktivitesinin $0,562 \pm 0,036$ μ mol/dakika/mg ve heksokinaz aktivitesinin $0,116 \pm 0,010$ μ mol/dakika/mg olduğunu bildirmişlerdir. Fibroblastik örnekler ile karşılaştırıldığında memenin duktal karsinomunda enzim aktivitelerinin yaklaşık 2-8 kat arttığını açıklamışlardır. Neoplastik dokularda piruvat kinaz aktivitesinin normal meme dokusundaki enzim aktivitesine göre yaklaşık 5 kat fazla olduğu gözlenmiştir (10). Rzymowska (30) meme kanser dokusunda katalaz ve G6PD aktivitelerinin düştüğünü, hastalığın I ve II. evresinde meme dokusunda enzim aktivitelerinde önemli bir fark olmadığını, fakat I ve III. evre arasında fark bulunduğunu bildirmiştir. Ibsen ve ark. (31) piruvat kinazın spesifik aktivitesi ile meme dokusunun malinitesi arasında bir ilişki olduğunu ileri sürmüşlerdir. Malin meme kanser dokusu daha yüksek piruvat kinaz aktivitesi gösterirken, normal meme dokusu daha düşük enzim aktivitesi göstermiştir. Bu veriler, duktal karsinomların yalnız hücre sayısındaki artışa bağlı olmayan farklı bir metabolik kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir. Kanserdeki G6PD ve piruvat kinaz aktivitelerinin normal dokulardan farklı olması, kısmen değişmiş bir gen ekspresyonu ile açıklanmıştır (10).

Arjinazın mide kanserinde dalağa ait katil hücre aktivitesini inhibe ettiği ve böylece kanser hücrelerinin yayılmasında pozitif bir rol oynadığı bildirilmiştir (32). Diğer yandan arjinazın aktive olmuş makrofajlar tarafından salgılandığı ve tümörün büyümesini engellediği ileri sürülmüştür (33). Meme tümör dokusunda arjinaz aktivitesi yüksek bulunmuştur. Bu sonuç arjinaz aktivitelerinin gastrik, kolorektal, meme, ürogenital ve prostatik kanserde arttığını ileri süren çalışmalarla tutarlıdır (12, 27, 34, 35).

Meme kanserli hastaların tümör dokusu arjinaz aktivitelerinde sağlıklı dokulardakine göre önemli bir artış olduğu ve bu artışın poliamin biyosentezini hızlandırması nedeni ile kanser gelişiminde önemli bir rol oynayabileceği gösterilmiştir. Ayrıca, doku MDA düzeyinin ve katalaz, GSH-Px, G6PD, piruvat kinaz ve arjinaz enzimlerinin meme kanserinde "belirteç" olarak görev yapabileceği söylenebilir.

Kaynaklar

1. Onat R, Emerk K. (1997) Temel Biyokimya, Saray Medikal Yayıncılık, İzmir, Cilt 2, 661-662.
2. Ueda K, Kobayashi S, Morita J, Komano T. (1985) Site-specific DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Biochim Biophys Acta.* 824, 341-348.
3. Ohkawa H., Ohishi N, Yagi K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95, 351-358.
4. Cochrane CG. (1991) Cellular injury by oxidants. *Am J Med.* 91, 23-29.
5. Oakley GG, Devanaboyina U, Robertson LW, Gupta RC. (1996) Oxidative DNA damage induced by activation of polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for PCB-induced oxidative stress in breast cancer. *Chem Res Toxicol.* 9, 1285-1292.
6. Portakal O, Ozkaya O, Inal ME, Bozan M, Sayek I. (2000) Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients. *Clin Biochem.* 33, 279-284.
7. Larner EH, Rutherford CL. (1978) Application of a microchemical technique to the elucidation of enzyme activity profiles within single human mammary tumors. *Cancer.* 41, 1863-1870.
8. Kumaraguruparan R, Subapriya R, Viswanathan Nagini S. (2002) Antioxidant profile in the circulation of patients with fibroadenoma and adenocarcinoma of the breast. *Clin Biochem.* 35, 275-279.
9. Serin E, Yılmaz E, Yılmaz S, Ünsaldı E, Durmuş AS. (1998) İskemi-reperfizyon hasarında serbest oksijen radikalleri. *Artroskopik Cerrahi.* 9, 36-39.
10. Oude Weernink PA, Rijkse G, Staal GE. (1991) Phosphorylation of pyruvate kinase and glycolytic metabolism in three human glioma cell lines. *Tumour Biol.* 12, 339-352.
11. Van Erp HE, Van Unnik JA, Rijkse G, Smits JG, Staal GE. (1991) Cellular expression of K-type pyruvate kinase in normal and neoplastic human tissues. *Cancer.* 68, 2595-2601.
12. Gökmen S, Yörük Y, Yorulmaz F, Gülen Ş. (1999) Arjinase and ornithine, as markers in human non-small cell lung carcinoma. *Cancer Biochem Biophys.* 17, 125-131.
13. Poremska Z, Luboinski G, Chrzanowska A, Mielczarek M, Magnuska J, Baranczyk-Kuzma A. (2003) Arjinase in patients with breast cancer. *Clin Chim Acta.* 328, 105-111.
14. Aebi H. (1974) Catalase. *Methods of Enzymatic Analysis.* Ed: Bergmeyer HU. Weinheim: Verlag Chemie. Vol. 2, 673-678.
15. Beutler A. (1973) *A Manual of Biochemical Methods.* Grune and Strotan, New York, 66.
16. Beutler E. (1975) Red cell metabolism. In: *A Manual of Biochemical Methods.* Grune and Strattan, New York, 67-69.
17. Beutler E, Blume KG, Kaplan JC, Löhr GW, Ramot B, Valentine WN. (1977) International committee for standardization in haematology: Recommended Methods for Red-Cell Enzyme Analysis. *Br J Haematol.* 35, 311-340
18. Geyer JW, Dabich D. (1971) Rapid methods for determination of arjinase activity in tissue homogenates. *Anal Biochem.* 39, 412-417.
19. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-275.
20. Huang Y, Sheu J, Lin T. (1999) Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. *Clin Biochem* 32, 131-136.
21. Wang M, Dhingra K, Hittelman WN, Liehr JG, Andrade M, Li D. (1996) lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DAN adducts in human breast tissues. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5, 705-710.
22. Murrell TG. (1991) Epidemiological and biochemical support for a theory on the cause and prevention of breast cancer. *Med Hypotheses* 36, 389-396.
23. Thangaraju M. (1994) Effect of tamoxifen on lipid peroxide and antioxidative system in postmenopausal women with breast cancer. *Cancer.* 74, 78-82.
24. Zachara B, Maclag A, Marchaluk E, Nowichi A. (1993) Selenium, glutathione and glutathione peroxidase in blood and tissues of breast cancer patients. In: Anke M, Meissner D, Mills CF, editors. *Trace elements in man and animals.* New York: TEMA Verlag Media-Touristik. 789-793.
25. Kumaraguruparan R, Subapriya R, Viswanathan Nagini S. (2002) Tissue lipid peroxidation and antioxidant status in patients with adenocarcinoma of the breast. *Clin Chim Acta.* 325, 165-170.
26. Doroshow JH. (1995) Glutathione peroxidase and oxidative stress. *Toxicol Lett.* 44, 45-51.
27. Halliwell B. (1991) Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med.* 91, 14-21.
28. Hilf R, Wittliff JL, Rector WD, Savlov ED, Hall TC, Orlando RA. (1973) Studies on certain cytoplasmic enzymes and specific estrogen receptors in human breast cancer and in non-malignant diseases of the breast. *Cancer Res.* 33, 2054-2062.
29. Pedersen N. (1975) The Glycolytic enzyme activity of the human cervix uteri. *Cancer.* 35, 469-474.
30. Rzynowska J. (1992) Enzyme activities in human breast tumours. *Acta Biochim Pol.* 39 (3), 289-294.
31. Ibsen KH, Orlando RA, Garratt KN, Hernandez AM, Giorlando S, Nungaray G. (1982) Expression of multimolecular forms of pyruvate kinase in normal benign and malignant human breast tissue. *Cancer Res.* 42, 888-892.
32. Wu CW, Chi CW, Ho CK, Chien SL, Lui WYP. (1994) Effect of arjinase on splenic killer cell activity in patients with gastric cancer. *Dig Dis Sci.* 39, 1107-1112.
33. Currie GA. (1978) Activated macrophages kill tumor cells by releasing arjinase. *Nature.* 273, 758-759.
34. Straus B, Cepelak I, Festa G. (1992) Arjinase, a new marker of mammary carcinoma. *Clin Chim Acta.* 210, 5-12.
35. Poremska Z, Luboinski G, Chrzanowska A, Mielczarek M, Magnuska J, Baranczyk-Kuzma A. (2003) Arjinase in patient with breast cancer. *Clin Chim Acta.* 328, 105-111.