

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**POTANSİYEL mPGES-1 İNHİBİTÖRLERİNİN
ANTİKANSEROJEN ETKİLERİNİN A549
HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Eren DEMİRPOLAT**

**Danışman
Doç. Dr. M. Betül AYCAN**

Doktora Tezi

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TDK-2013-4297 nolu
proje ile desteklenmiştir.**

**Ağustos 2014
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Eren DEMİRPOLAT

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Potansiyel mPGES-1 İnhibitörlerinin Antikanserojen Etkilerinin A549 Hücrelerinde Araştırılması”adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Eren DEMİRPOLAT

Danışman

Doç. Dr. M. Betül AYCAN

Anabilim Dalı Başkanı

Doç. Dr. M. Betül AYCAN

Doç. Dr. M. Betül AYCAN danışmanlığında **Eren DEMİRPOLAT** tarafından hazırlanan ‘‘**Potansiyel mPGES-1 İnhibitörlerinin Antikanserojen Etkilerinin A549 Hücrelerinde Araştırılması**’’ konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Eczacılık Farmakoloji** Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 18.07.2014

JÜRİ

Danışman : Doç. Dr. M. Betül AYCAN (ERÜ Eczacılık Farmakoloji AD)

Üye : Prof. Dr. Aydın ERENMEMİŞOĞLU (ERÜ Tıp Farmakoloji AD)

Üye : Doç. Dr. Nalan İMAMOĞLU (ERÜ Eczacılık Temel Bilimler AD)

Üye: : Yrd. Doç. Dr. Nergiz Hacer TURGUT (Cumhuriyet Üni. Eczacılık Farmakoloji AD)

Üye : Yrd. Doç. Dr. İpek İffet BOŞGELMEZ (ERÜ Eczacılık Farmasötik Toksikoloji AD)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

.....

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora sürecim boyunca her konuda bana destek olup rehberlik eden danışmanım ve anabilim dalı başkanımız Doç. Dr. M. Betül Aycan' a, fakültemizdeki laboratuvar imkanlarının oluşturulmasını sağlayan dekanımız Prof. Dr. Müberra Koşar' a, iş yükümü hafifletme ve deneylerimde destek olma anlamında anabilim dalındaki çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Ayşe Kübra Karaboğa, Arş. Gör. Alim Hüseyin Dokumacı ve Arş. Gör. Ayça Çakmak' a, deney tekniklerini öğrenmem konusundaki katkılarından dolayı fakültemiz öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Ahmet Cumaoğlu' na, oda arkadaşlarım Arş. Gör. Burcu Ünlü Endirlik' e ve Arş. Gör. Güzide Şatır Başaran' a ve tez süreci boyunca çalışmam konusunda beni motive ederek desteklerini esirgemeyen annem Neriman Demirpolat, babam Halil Demirpolat, abim Özgü Demirpolat, yengem Başak Demirpolat ve yeğenim Halil Tuna Demirpolat' a çok teşekkür ederim.

Eren DEMİRPOLAT

Kayseri, Ağustos 2014

POTANSİYEL mPGES-1 İNHİBİTÖRLERİNİN ANTİKANSEROJEN ETKİLERİNİN A549 HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI

Eren DEMİRPOLAT

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Eczacılık Farmakoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Ağustos 2014

Danışman: Doç. Dr. M. Betül AYCAN

KISA ÖZET

Çalışmamızda A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde *Zingiber officinale*'de bulunan 6-gingerol ile 6-shogaolün antikanser etkileri ve bu etkilerinin mPGES-1 (mikrozomal prostaglandin E₂ sentaz 1), β -catenin, GSK3 β (glikojen sentaz kinaz 3 β) yolağı üzerinden oluşup oluşmadığı araştırıldı. A549 hücrelerine 24 saat boyunca IL-1 β (interlökin 1 β) uygulanarak mPGES-1 enzimi indüklendi. Deneyler hem IL-1 β ' ya maruz kalan hem de maruz kalmayan hücrelerde yürütüldü. Kurkumin bilinen doğal bir mPGES-1 inhibitörü olduğundan çalışmada pozitif kontrol olarak kullanıldı ve 6-gingerol ile 6-shogaolün etkileri kurkuminle kıyaslandı. Öncelikle A549 hücrelerinin büyüme profili çıkarıldı. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ve gerçek zamanlı hücre analizi (GZHA) deneyleriyle moleküllerin sitotoksik etkileri araştırıldı. Büyüme profili deneyi sonucunda IL-1 β uygulanan hücrelerde uygulanmayanlara göre hücre proliferasyon hızının arttığı tespit edildi. Bu deneylere göre kurkumin ile 6-shogaolün sitotoksik etkili olduğu görüldü. 6-shogaol için 24 sa IC₅₀ değeri 62 μ M bulundu. IC₅₀ değeri etrafında belirlenen dozlarda ise moleküllerle 24 sa inkübasyondan sonra western blot ile mPGES-1, GSK3 β , p-GSK3 β , β -catenin protein düzeyleri ve RT-PCR (real time polimeraz zincir reaksiyonu) ile aynı parametreler için mRNA düzeyleri ölçüldü. Bunlar sonucunda IL-1 β ' lı hücrelerde mPGES-1, p-GSK3 β , β -catenin protein ve mRNA düzeylerinin yükseldiği, GSK3 β düzeylerinin ise düştüğü görüldü (p<0,05/p<0,001). Ayrıca kurkumin ve 6-shogaol için IL-1 β ' nın ilgili proteinlerin düzeyinde yapmış olduğu değişimlerin geriye çevrildiği gözlenirken; 6-gingerol bu açıdan etkisiz bulundu. Meydana gelen değişimlerin PGE₂ düzeyleri ile ilişkili olup olmadığının anlaşılması için PGE₂ düzeyleri, hücrelerin indüklenmesinden başlayarak farklı zamanlarda alınan örneklerde ölçüldü. Buna göre PGE₂ düzeyinin IL-1 β uygulanan hücrelerde uygulanmayanlara göre yükseldiği; ancak bu etkinin zamanla azaldığı gözlemlendi. 6-shogaol ve kurkuminin antikanser etkilerinin PGE₂ düzeyini düşürerek gösterdiği düşünüldü. Buna dayanarak 6-shogaolün özellikle 240 μ M, kurkuminin ise 100 μ M konsantrasyonda etkili olduğu ve 6-shogaolün mPGES-1 ile β -catenin inhibisyonu özellikleri açısından küçük hücreli akciğer kanseri tedavisi için potansiyel bir aday olabileceği gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: 6-gingerol, 6-shogaol, A549, IL-1 β , kurkumin,

INVESTIGATING ANTICANCEROGENIC EFFECTS OF THE POTENTIAL mPGES-1 INHIBITORS IN A549 CANCER CELL LINE

Eren DEMİRPOLAT

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Department of Pharmacology

Doctorate Thesis, August 2014

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. M. Betül AYCAN

ABSTRACT

In our study we investigated the anticancer effects of 6-gingerol and 6-shogaol from *Zingiber officinale*. Also we aimed to see the anticancer effect is dependent on whether mPGES-1 (microsomal prostaglandine E₂ synthase 1), β -catenin and GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β) pathway or not. A549 cells are incubated with IL-1 β (interleukin 1 β) for 24 hours in order to make cell's mPGES-1 enzyme induced. Experiments are performed both on IL-1 β and non IL-1 β group. Curcumin from *Curcuma longa*, a natural compound that is known for its mPGES-1 inhibitory effect, is used as a positive control. Effects of 6-gingerol and 6-shogaol is compared with that of curcumin. Firstly, cell proliferation assay for A549 profiling was carried out. Then, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and RTCA (real time cell analysis) assay were performed to determine the cytotoxicity of molecules. As a result of cell profile assay, cells exposed to IL-1 β proliferate faster than non IL-1 β ones and 24 hrs IC₅₀ for 6-shogaol was determined as 60 μ M. Concentration around this IC₅₀ value were used to perform western blot protein and RT-PCR mRNA analyses. Measurement was performed after 24 hrs incubation with molecules to determine mPGES-1, GSK3 β , p-GSK3 β , β -catenin protein and mRNA levels. Protein and mRNA levels of mPGES-1, p-GSK3 β , β -catenin were higher and GSK3 β was lower in IL-1 β group ($p < 0,05/p < 0,001$). While the effects of curcumin and 6-shogaol on these parameters were against the IL-1 β 's effect, 6-gingerol was not effective. To see the relationship of these changes with PGE₂, levels of PGE₂ was measured in samples which were taken in different time points from the beginning of incubation process. According to the assay, PGE₂ was higher in IL-1 β group but this effect was time dependent and decreased in a while. It is observed that 6-shogaol and curcumin showed their anticancer effect via lowering PGE₂ levels. As a result of the assays, we saw that 6-shogaol showed as much anticancer effect as curcumin and it is thought that 6-shogaol might be a potential candidate in non small cell lung cancer treatment because of its mPGES-1 and β -catenin inhibitory effects.

Keywords: 6-gingerol, 6-shogaol, A549, curcumin, IL-1 β

İÇİNDEKİLER

POTANSİYEL mPGES-1 İNHİBİTÖRLERİNİN ANTİKANSEROJEN ETKİLERİNİN A549 HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI

Sayfa no

İÇ KAPAK	I
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	II
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	III
KABUL ONAY SAYFASI	IV
TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
KISALTMALAR	X
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	XIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. KANSER OLUŞUMU	7
2.2. KANSER HÜCRELERİNİN KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİ	10
2.2.1. Kontrolsüz Çoğalma	10
2.2.1.1. Çoğalma İçin Kendi Kendine Sinyal Üretebilme	11
2.2.1.2. Büyüme Karşıtı Sinyallere Karşı Duyarsızlık	12
2.2.1.3. Apoptoza Direnç	12
2.2.1.4. Telomeraz Ekspresyonu	13
2.2.1.5. Anjiyogenez	14
2.2.2. Yeniden Farklılaşma ve Fonksiyon Kaybı	14
2.2.3. İnvazyon ve Metastaz	14
2.3. ANTİKANSEER AJANLARLA TEDAVİDE GENEL İLKELER	16
2.4. AKCİĞER KANSERİ	18
2.4.1. Tarihçe ve Genel Bilgi	18
2.4.2. Akciğer Kanseri Patolojik Sınıflandırma	19
2.4.2.1. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri	19
2.4.2.2. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri	20
2.5. ARAŞIDONİK ASİT YOLAĞI VE PROSTAGLANDİNLER	22

Sayfa no

2.5.1. Eikozanoidlerin Fizyolojik Etkileri.....	24
2.5.2. Prostaglandin E ₂ Üretimi ve Etkileri	26
2.5.3. PGE ₂ Reseptörleri	29
2.5.4. COX-2' nin Kanserdeki Rolü ve PGE ₂ İle İlişkisi	31
2.5.4.1. Apoptozdan Kurtulma ve COX-2/PGE ₂	33
2.5.4.2. Kendi Kendine Büyüme Sinyali Oluşturabilme ve COX-2/PGE ₂	33
2.5.4.3. Büyüme Karşıtı Sinyallere Karşı Duyarsızlık ve COX-2/PGE ₂	34
2.5.4.4. Sürekli Çoğalabilme Potansiyeli ve COX-2/PGE ₂	34
2.5.4.5. Anjiyogenez ve COX-2/PGE ₂	35
2.5.4.6. İnvazyon, Metastazis ve COX-2/PGE ₂	35
2.5.4.7. Antitümör Bağışıklık Yanıtından Kurtulma ve COX-2/PGE ₂	36
2.6. PGE ₂ ’ NİN, β - CATENİN ve GSK3 β İLE İLİŞKİSİ	36
2.7. <i>Zingiber officinale</i>	37
2.8. <i>Curcuma longa</i>	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM	43
3.1. A549 HÜCRE HATTI HAKKINDA BİLGİ	43
3.1.1 A549 hücrelerinin temin edilmesi ve bakımı	43
3.2. GZHA BÜYÜME PROFİLİ DENEYİ	45
3.3. DENEY GRUPLARI VE IL-1 β İLE mPGES-1 İNDÜKSİYONU	47
3.4. MTT CANLILIK DENEYİ GENEL DOZ TARAMA ve IC ₅₀ BELİRLEME	49
3.5. GZHA CANLILIK DENEYİ	53
3.6. LOWRY İLE PROTEİN MİKTAR TAYİNİ VE WESTERN BLOT DENEYİ	54
3.7. RNA İZOLASYONU VE qRT-PCR DENEYİ	64
3.8. PGE ₂ MİKTAR DENEYİ	69
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	70
4. BULGULAR.....	71
4.1. GZHA BÜYÜME PROFİLİ DENEYİ	71
4.2. MTT CANLILIK DENEYİ GENEL DOZ TARAMA ve IC ₅₀ BELİRLEME	72
4.3. GZHA CANLILIK DENEYİ.....	74
4.4. LOWRY İLE PROTEİN MİKTAR TAYİNİ VE WESTERN BLOT DENEYİ	78
4.5. qRT-PCR DENEYİ.....	87
4.6. PGE ₂ MİKTAR DENEYİ	90
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	94
6. KAYNAKLAR	102
ÖZGEÇMİŞ	111

KISALTMALAR

13-PGR	:15 keto-prostaglandin - Δ 13- redüktaz
15-PGDH	:15 prostaglandin dehidrogenaz
Akt	:Protein kinaz B
APS	:Amonyum persülfat
AR	:Amfiregülin
ATCC	:Amerikan tipi kültür koleksiyonu
ATP	:Adenozin tri fosfat
bFGF	:Temel fibroblastik büyüme faktörü
BRCA1,2	:Breast cancer early onset gene 1,2
BSA	:Sığır serum albumini
cAMP	:Siklik adenozin monofosfat
CDK	:Siklin bağımlı kinaz
CI	:Hücre endeksi
cPGES	:Sitozolik prostaglandin E sentaz
cPLA ₂	:Fosfolipaz A ₂
COX	:Siklooksijenaz
CXR4	:Kemokin reseptörü alttip 4
CYP450	:Epoksijenaz, sitokrom P450
DAG	:Diaçil gliserol
DHFR	:Dihidrofolat redüktaz
DMEM	:Dulbecco' nun modifiye edilmiş eagle besiyeri
DMSO	:Dimetil sülfoksit
DNA	:Deoksiribonükleik asit
Dsh	:Dishevelled
EET	:Epoksieikozatrienoik asitler
EGFR	:Endotelyal büyüme faktörü reseptörü
ELISA	:Enzyme linked immunosorbent assay
ERK	:Ekstrasellüler sinyal ile regüle olan kinaz
F	:Forward

FBS	:Fetal sığır serum
FDA	:Amerikan İlaç ve Gıda İdaresi
Fz	:Frizzled
GDP	:Güanozin di fosfat
GSH	:Glutasyon
GSK3 β	:Glikojen sentaz kinaz 3 β
GTP	:Güanozin tri fosfat
GZHA	:Gerçek zamanlı hücre analizi
HIF-1	:Hipoksiyle indüklenebilen faktör-1
HPETE	:Hidroperoksi eikozatetraenoik asit
HPV	:İnsan papilloma virüsü
HRP	:At keşanesi peroksidaz enzimi
IC ₅₀	:İnhibitör konsantrasyon %50
IGF-1	:İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL-1 β	:İnterlökin 1 β
IL-8	:İnterlökin-8
IP ₃	:İnozitol trifosfat
LOX	:Lipoksijenaz
LPS	:Lipopolisakkarit
LT	:Lökotrien
MDA	:Malondialdehit
MMP-2	:Matriks metalloproteinaz 2
mPGES-1	:Mikrozomal prostaglandin E sentaz 1
mPGES-2	:Mikrozomal prostaglandin E sentaz 2
MTT	:MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MYC	:Miyelositomatozis
Na ₃ VO ₄	:Sodyum ortovanat
NF κ B	:Nükleer faktör kappa
NR4A2	:Nükleer reseptör protein alt aile 4 grup A üye 2
NSAID	:Non steroidal antienflamatuar ilaç
NSCLC	:Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri

PA	:Plazminojen aktivatörleri
PDGF	:Platelet türevi büyüme faktörü
PGHS	:Prostaglandin H sentaz
PGE ₂	:Prostaglandin E ₂
PGE-M	:PGE ₂ metaboliti
PGH ₂ , PGG ₂	:Prostaglandin H ₂ ve G ₂
PI3K	:Fosfatidilinozitol 3-kinaz
PIP ₂	:Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat
PKA	:Protein kinaz A
PKC	:Protein kinaz C
PMSF	:Fenil metil sulfonil florür
PPAR δ	:Peroksizom proliferatörleri ile aktive olan reseptör delta
PTEN	:Fosfat-tensin homologu
PVDF	:Poliviniliden florür
R	:Reverse
RGS	:G-protein sinyalleme bölgesi
ROS	:Reaktif oksijen türevleri
RPMI 1640	:Roswell Park Memorial Institute 1640
RTCA	:Real time cell analysis
RT-PCR	:Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SCLC	:Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
SDS	:Sodyum dodesil sülfat
TBST	: Tris tween tamponu çözeltisi
TEMED	:Tetrametil etilen diamin
TGF β	:Transforme eden büyüme faktörü β
TNF- α	:Tümör nekroz faktör α
TXA ₂	:Tromboksan A ₂
VEGF	:Vasküler endotelial büyüme faktörü

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa no

Tablo 2.1. Onkogenler ve onlara karşı geliştirilen ilaçlar	9
Tablo 2.2. G-protein alt üniteleri ve efektörleri	30
Tablo 3.1. Jel dökme formülü	61
Tablo 3.2. Western blot kuyuları yükleme şeması	62
Tablo 3.3. Primer ve Sekonder antikor hazırlama şeması	62
Tablo 3.4. cDNA karışım formülü	68
Tablo 3.5. qRT-PCR karışım formülü	68
Tablo 4.1. Lowry sonucuna göre jele yüklemek için hesap örneği	78
Şekil 2.1. Kanseri hücrelerinin karakteristik özellikleri	16
Şekil 2.2. Prostaglandin asidin yapısı	23
Şekil 2.3. Araşidonik asit yolağı ve eikozanoid örnekleri	24
Şekil 2.4. PGE ₂ reseptörleri ve sinyal yolağı	29
Şekil 2.5. Prostaglandin reseptörleri ve efektör makromoleküller	30
Şekil 2.6. PGE ₂ 'nin EP ₂ reseptörü üzerinden kanserdeki etki mekanizması	36
Şekil 2.7. 6-gingerol ve 6-shogaol moleküler yapı	39
Şekil 2.8. Kurkumin Moleküler Yapı	42
Şekil 3.1. A549 hücrelerinin görünümü	43
Şekil 3.2. Hücre kültüründe kullanılan temel cihazlar	44
Şekil 3.3. Hücre pasajlama şeması	45
Şekil 3.4. Xcelligence bileşenleri	46
Şekil 3.5. GZHA için hücre ekim şeması	47
Şekil 3.6. MTT genel doz tarama ekim	51
Şekil 3.7. MTT deneyi	52
Şekil 3.8. GZHA e-plaka ekim	54
Şekil 3.9. Lowry metoduyla protein tayini	57
Şekil 3.10. Western blot aparatları	61

Sayfa no

Şekil 3.11. Transfer sandviç modeli	61
Şekil 3.12. Protein-Antikor bağlanması	63
Şekil 3.13. PCR döngüsünde yer alan aşamalar	65
Şekil 3.14. qRT-PCR hidroliz prob ışıma mekanizması	66
Şekil 4.1. A549 Hücresi Büyüme Profili.....	71
Şekil 4.2. MTT Deneyi A549IL1 β (-) genel doz tarama.....	72
Şekil 4.3. MTT Deneyi A549IL1 β (+) genel doz tarama.....	72
Şekil 4.4. A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) için MTT IC50 belirleme deneyi	73
Şekil 4.5. 6-shogaol Sigma plot grafiği.....	74
Şekil 4.6. GZHA A549IL1 β (-) 6-gingerol	74
Şekil 4.7. GZHA A549IL1 β (+) 6-gingerol	75
Şekil 4.8. GZHA A549IL1 β (-) 6-shogaol	75
Şekil 4.9. GZHA A549IL1 β (+) 6-shogaol	76
Şekil 4.10. A549IL1 β (-) GZHA	76
Şekil 4.11. A549IL1 β (+) GZHA	77
Şekil 4.12. GZHA cihazı 6-shogaol IC50 değeri	78
Şekil 4.13. Röntgen görünümü ve Image J hesabı örneği	79
Şekil 4.14. A549IL1 β (-) hücrelerinde mPGES-1 protein düzeyi	79
Şekil 4.15. A549IL1 β (-) hücrelerinde mPGES-1 protein bantları	80
Şekil 4.16. A549IL1 β (+) hücrelerinde mPGES-1 protein düzeyi	80
Şekil 4.17. A549IL1 β (+) hücrelerinde mPGES-1 protein bantları	80
Şekil 4.18. A549IL1 β (-) hücrelerinde β -catenin protein düzeyi	81
Şekil 4.19. A549IL1 β (-) hücrelerinde β -catenin protein bantları.....	81
Şekil 4.20. A549IL1 β (+) hücrelerinde β -catenin protein düzeyi	82
Şekil 4.21. A549IL1 β (+) hücrelerinde β -catenin protein bantları	82
Şekil 4.22. A549IL1 β (-) hücrelerinde GSK3 β protein düzeyi	83
Şekil 4.23. A549IL1 β (-) hücrelerinde GSK3 β protein bantları	83

Sayfa no

Şekil 4.24. A549IL1 β (+) hücrelerinde GSK3 β protein düzeyi	84
Şekil 4.25. A549IL1 β (+) hücrelerinde GSK3 β protein bantları.....	84
Şekil 4.26. A549IL1 β (-) hücrelerinde p-GSK3 β protein düzeyi	85
Şekil 4.27. A549IL1 β (-) hücrelerinde p-GSK3 β protein bantları	85
Şekil 4.28. A549IL1 β (+) hücrelerinde p-GSK3 β protein düzeyi	86
Şekil 4.29. A549IL1 β (+) hücrelerinde p-GSK3 β protein bantları	86
Şekil 4.30. A549IL1 β (-) hücrelerinde mPGES-1 mRNA düzeyleri	87
Şekil 4.31. A549IL1 β (+) hücrelerinde mPGES-1 mRNA düzeyleri	88
Şekil 4.32. A549IL1 β (-) hücrelerinde β -catenin mRNA düzeyleri	88
Şekil 4.33. A549IL1 β (+) hücrelerinde β -catenin mRNA düzeyleri	89
Şekil 4.34. A549IL1 β (-) hücrelerinde GSK3 β mRNA düzeyleri	89
Şekil 4.35. A549IL1 β (+) hücrelerinde GSK3 β mRNA düzeyleri	90
Şekil 4.36. PGE2 standart eğri 4 parametrelili eğriye uygun	91
Şekil 4.37. PGE2 standart eğri doğrusal hale getirilmiş.....	91
Şekil 4.38. IL-1 β sonrası ve molekül uygulaması öncesi PGE2	92
Şekil 4.39. A549IL1 β (-) hücrelerinde 12. ve 24. sa PGE2 miktarı	92
Şekil 4.40. A549IL1 β (+) hücrelerinde 12. ve 24. sa PGE2 miktarı	93

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, vücut hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde çoğalıp, anormal formlarla vücutta dağılmasıdır. Kardiyovasküler rahatsızlıklar gelişmiş ülkelerde en önemli ölüm sebebini oluştururken; kanser ikinci sırada gelmektedir ve ömrü boyunca her üç kişiden birine kanser tanısı konmaktadır (1). Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'na ait olan GLOBOCAN projesi ile 28 farklı kanserin 184 farklı ülkedeki insidansı, mortalitesi ve prevelansı ile ilgili veriler toplanmaktadır. Bu veriler sadece 15 yaş üzerindeki insanları kapsamaktadır ve 2012 verilerine göre dünya'da 14.1 milyon kanser vakası bulunmaktayken; kanser sebebiyle 8,2 milyon kişi yaşamını yitirmiştir. Dünya genelinde en çok görülen kanser tipi tüm kanser vakalarının % 13' ünü oluşturmakla birlikte, 1.8 milyon kişide görülen akciğer kanseridir. Bunu meme ve kolorektal kanser izlemektedir. 2012 yılında, akciğer kanseri 1,6 milyon kişinin ölümüne sebep olmuş ve kansere bağlı ölümler içerisinde de % 19,4' lük oranla birinci sırada yer almıştır (2). Türkiye Kanser İstatistikleri 2014 yılı raporuna göre 2009 yılında Türkiye'de tüm yaş grupları için erkeklerde 10,000' de 66 (erkeklerde kanser vakalarının % 25' i) ile akciğer kanseri, kadınlarda ise 10,000' de 40,6 (kadınlardaki kanser vakalarının % 23,4' ü) ile meme kanseri en çok görülen kanser tipidir. Diğer ülkelerle kıyaslandığında ülkemizde tütüne bağlı kanserler çok sık görülmektedir ve her yıl 150.000 yeni kanser vakasının 100.000' i tütüne bağlı olarak oluşmaktadır. 0-14 yaş arası çocukluk çağı kanserlerinde ise en çok lenfoma görülmektedir (3). İstatistik verileri kanserin ne denli önemli bir rahatsızlık olduğunu ortaya koymaktadır.

Kanser, malign neoplazma ve malign tümör ifadeleri birbirlerinin yerine kullanılabilir. Hem benign hem de malign tümörlerde kontrolsüz çoğalma olayı görülürken, malign

tümörler farklılaşma, normal hücre fonksiyonunu yitirme, dokuda invaze olma ve farklı dokulara metastaz açısından daha risklidir. Hücrelerin bu anormal karakteristikleri, kalıtsal veya kazanılmış mutasyonlara bağlı olarak, gen ekspresyonundaki değişimlerden kaynaklanmaktadır (1). Kanseri tedavisi, cerrahi girişim, radyoterapi ve kemoterapi olarak üç ayrı yaklaşımla yapılmaktadır. Tedavinin başarısı ise kanser tipine ve gelişmişlik derecesine bağlı olarak değişiklik gösterir. Kemoterapi tek başına veya diğer yaklaşımlara ek olarak kullanılabilir. Enfeksiyon hastalıklarının kemoterapötiklerle başarılı bir şekilde tedavi edilebilmesi, kanserin de kimyasal ajanlarla tedavi edilebileceği düşüncesini doğurmuştur; ancak patojen mikroorganizmalar hem kalitatif hem de kantitatif olarak insan hücrelerinden farklı özelliklere sahipken; kanser hücreleri ile sağlıklı hücreler pek çok açıdan birbirine benzemektedir. Dolayısıyla, biyokimyasal farklılıklara dayanarak ilaç geliştirme olanağı diğer kemoterapötik ilaç gruplarına göre daha zordur. Antineoplastik tedavide ideal olan hastanın ve konağın sağlıklı hücrelerine zarar vermeksizin sadece kanser hücrelerine etki eden tedavi sağlayabilmektir; ancak günümüzde kullanılan kanser ilaçlarının pek çoğu kanser hücreleri dışında, kıl folikülü, barsak ve kemik iliği hücresi gibi hızlı çoğalma yeteneğine sahip sağlıklı hücreleri de etkilemektedir. Aynı zamanda ilaçların teratojenik, mutajenik ve karsinojenik etkileri bulunmaktadır (4). Bu eksikliklerden dolayı, kanser tedavisinde yeni yaklaşımlara ve daha seçici ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Kanseri hücrelerinin apoptoza karşı rezistans göstermesi, telomeraz ekspresyonunun artması, hücrelerin mutasyona uğrayarak farklılaşması ve her kanser hücresinin birbirinden farklı karaktere sahip olması, tümörle ilişkili kan damarı oluşumunun artması gibi olaylar kanser tedavisinde aşılmayı bekleyen sorunlardır. Bu sorunları aşmak için anjiyogenez ve metalloproteinaz inhibitörleri, antisense oligonükleotitler, gen tedavisi gibi yeni yaklaşımlar üretilmiştir. Bunlar arasında bizim çalışmamıza da konu olan prostaglandin E₂ (PGE₂) antagonistleri ve PGE₂ üreten mikrozomal-sitozolik enzimlerin inhibitörleri bulunmaktadır.

Araşidonik asit yolağında siklooksijenaz (COX) enzimleri veya diğer adıyla prostaglandin H sentaz (PGHS) aracılığıyla öncül prostaglandinler (PGH₂ ve PGG₂) üretilmektedir. PGE₂ de mikrozomal prostaglandin E sentaz 1, 2 (mPGES-1, mPGES-2) ve sitozolik prostaglandin E sentaz (cPGES) aracılığıyla öncül prostaglandinlerden üretilir (5). Bilindiği gibi prostaglandinler biyolojik olarak hücrede aktif olan lipid medyatörlerdir. PGE₂ ise ağrı, ateş ve enflamatuvar yanıttan en çok sorumlu tutulan

prostaglandindir. PGE_2 'nin EP_{1-4} olmak üzere 4 adet reseptörü bulunmaktadır ve bunlardan EP_1 , ağrı duyumsanmasından sorumluyken; $\text{EP}_{2,4}$ kanseri indükleyen β -catenin, matriks metalloproteinaz 2 (MMP-2) gibi mekanizmalarla ilişkilendirilmiştir (6). Özellikle β -catenin hücre içinde artışı ile hücre çoğalmasının hızlandığı görülmüştür ve bir onkogen olarak etki gösterdiği düşünülmektedir (7). β -catenin önemli bir aktivatörü ise PGE_2 'dir ve bu etkisini SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde yapılan çalışmalarda EP_1 , EP_2 , EP_4 reseptörleri aracılığıyla gösterdiği düşünülmektedir (8). Normalde β -catenin hücre içinde glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK3 β) tarafından sürekli fosforillenerek yıkılır ve belli bir düzeyin altında kalarak transkripsiyon faktörü özelliğini gösteremez; ancak GSK3 β 'nin PGE_2 aracılığıyla inaktivasyonu hücre içindeki β -catenin düzeylerini artırarak karsinogenezin hızlanmasına sebep olur (7).

Glutatyona bağımlı olarak çalışan mPGES-1'in ekspresyonu, normal dokularda belli bir düzeyde tutulurken; akciğer, böbrek ve üreme ile ilişkili organlarda neredeyse yok denecek kadar az eksprese edilmektedir. Bununla beraber interlekin 1 β (IL-1 β), tümör nekroz faktör α (TNF- α), ve lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenebilme özelliğine sahip bir enzimdir ve COX-2 ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir (5). Kanser hücrelerinde hem COX-2 hem de mPGES-1 enzimi indüklenmekte ve karsinogenez hızlanmaktadır. Hatta PGE_2 'nin COX-2 indüksiyonunu, PGE_2 reseptörü üzerinden sağladığı gözlenmiştir (9).

Düzenli olarak kullanılan tezgah üstü non steroid anti enflamatuar ilaçların (NSAID) kolon kanseri riskini % 43, meme kanserini % 25, akciğer kanserini % 28, prostat kanserini % 27 oranında azalttığı gözlenmiştir. COX-2 ekspresyonunun ve PGE_2 biyosentezinin indüklenmesinin mutagenesis, mitogenezis, anjiyogenezis, metastazis, apoptoz inhibisyonu ve T-B lenfositlerin azalmış antineoplastik aktivitesiyle seyreden bağışıklık sisteminin baskılanması gibi karsinogenezin en temel faktörlerini etkilediği düşünülmektedir (10). Dolayısıyla hücrede sentezlenen PGE_2 miktarının artması ile karsinogenezin hızlanması arasında doğru orantılı bir ilişki bulunmaktadır. PGE_2 reseptörlerinin antagonize edilmesinin veya sentezinden sorumlu enzimlerin inhibisyonu sonucunda hücre çoğalmasının yavaşlayacağı ve kanser karakteristiklerinin azalabileceği düşünülmekle beraber; ileride mPGES-1 inhibitörlerinin yeni bir ilaç grubu olabileceğine dair bir fikir öne sürülmüştür (4). Öyle ki, Merck Frosst araştırmacıları MF-63 adında mPGES-1 inhibisyonu sağlayan sentetik bir madde üretmişler ve bu maddenin insan tam kanında yapılan deneylerinde şimdiye kadar üretilen en potent mPGES-1 enzim

inhibitörü olduğu görülmüştür. Pfizer araştırmacıları ise aynı amaca yönelik olarak PF9184' ü sentezlemişlerdir (5). mPGES-1 inhibitörü olarak sentezlenen MK 886 isimli molekülün aynı zamanda mPGES-1 protein ekspresyonunu azalttığı bulunmuştur (11). Bununla beraber selektif COX-2 inhibitörlerinden selekoksib ve rofekoksible ilgili kanser üzerine klinik faz çalışmaları devam etmektedir ve kanser kemoterapisinde faydalı olabileceği sonucuna varılmıştır. Özellikle idrarlarında PGE₂ metaboliti PGE-M (11a-hidroksi-9,15-diokso2,3,4,5-tetranor-prostan-1,20-dioik asit) düzeyi yüksek olan hastaların COX-2 inhibitörleri ile fayda sağlayabileceği sonucuna varılmıştır (12). Dolayısıyla kanser kemoterapisinde COX-2 inhibitörleri kadar PGE₂ antagonistleri veya enzim inhibitörleri de kıymetli olabilir. PGE₂ ile ilgili sadece sentetik moleküller üzerinde çalışılmamış aynı zamanda, doğal kökenli açılfloroglusinol yapısındaki *Myrtus communis*' ten mirtukommulon, Guttiferae türlerinden garsinol A549 akciğer kanseri hücrelerinde ve *Curcuma longa*' daki polifenolik kurkumin molekülleri insan tam kanında yürütülen enzim inhibisyonu deneylerinde PGE₂ düzeyini düşürmektedirler. Bu etkilerini ise mPGES-1 inhibisyonu yaparak gösterdikleri düşünülmektedir (13). Dolayısıyla hem sentetik türevlerin hem de özellikle potansiyel olarak PGE₂ düzeyini düşürmesi beklenen doğal kökenli moleküllerin kanser üzerindeki etkileri araştırılmaya değerdir. Bu potansiyel moleküller arasında *Zingiber officinalis*' in (zencefil) aktif maddelerinden 6-gingerol ve 6-shogaol de bulunmaktadır; çünkü ekstre halinde uygulanan zencefilin etkisinin, PGE₂ düzeylerini zaten azalttığı bilinen indometazin ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğu saptanmıştır (14). Dolayısıyla zencefilin içindeki aktif maddelerin kanser hücrelerine PGE₂ üzerinden etkileri ve bunların hangi mekanizmalar üzerinden oluştuğu araştırılmaya değerdir.

Yukarıda anlatılanlar ışığında çalışmamızda küçük hücreli olmayan akciğer adenokarsinoma hücrelerinde (A549) normalde eksprese olan mPGES-1, öncelikle IL-1 β uygulanarak indüklenmiş ve 6-gingerol ile 6-shogaolün, pozitif kontrol kurkumin ile karşılaştırılarak moleküler mekanizmalar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) hücre sitotoksisite deneyi yapılmıştır. Sitotoksisite deneyine paralel olarak hücre canlılığı gerçek zamanlı analizi (GZHA) gerçekleştirilmiştir. Sitotoksisite deneyleri sonucunda elde edilen inhibitör konsantrasyon % 50 (IC₅₀) kullanılarak belirlenen konsantrasyonlarda, sitotoksik etki mekanizmasını aydınlatmak amacıyla β -catenin, GSK3 β ve mPGES-

1 üzerinden western blot ile protein düzeyleri; kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile mRNA düzeyleri ölçülmüştür. IL-1 β ' ya maruz kalan hücrelerde hem COX-2 hem de mPGES-1 enziminin indüklenmesi ve buna bağlı olarak PGE₂ üretiminin ve hücre proliferasyon hızının artması, sonuçta kanserogenezin şiddetlenmesi beklenmektedir. Çalışılan hücre kanser hücresi olduğundan çoğalmanın hızı yüksek olsa da, IL-1 β uygulanan hücrelerde uygulanmayanlara göre çoğalma hızının daha yüksek olması beklenebilir. Sitotoksik etki gösteren moleküller ise kontrol grubuyla kıyaslandığında canlılığı azaltmalıdır. Doza bağımlı bir azalma meydana geldiğinde ise ortaya bir IC₅₀ değeri çıkmaktadır. Moleküler mekanizma araştırılırken bu IC₅₀ değeri etrafında belirlenen dozlar kullanılmaktadır. β -catenin, GSK3 β ve mPGES-1 deoksiribonükleik asitten (DNA) kodlanmaktadır. Öncelikle mRNA' lar daha sonra ise ribozomlarda protein olarak aktif formları üretilmektedir. Araştırılan molekülün bu parametrelerin protein ve mRNA düzeyleri üzerindeki etkisi, eğer anlamlı bir sonuç varsa, sitotoksik etkileriyle ilişkilendirilebilmektedir. Onkogen özellikteki β -catenin, aktif haldeki GSK3 β tarafından yıkılırsa hücre çoğalma hızı ve kanser karakteristikleri yavaşlamaktadır. Çalışmada IL-1 β uygulanan hücrelerde mPGES-1 ve β -catenin protein düzeylerinin artması, GSK3 β düzeylerinin azalması beklenmektedir. GSK3 β fosforile olarak deaktive olmakta ve artık β -catenini fosforilleyerek hücre içinde yıkılmasını sağlama işlevini yitirmektedir. Bu olayların ise temelde indüklenen mPGES-1 enziminin hücre ortamına daha fazla PGE₂ sunulmasıyla sağlandığı öngörülmektedir. mRNA düzeylerinin ise eğer post translasyonel mekanizmalar yoksa protein düzeyindeki değişimle paralel olarak değişmesi beklenir. Dolayısıyla ortamda ne kadar çok mRNA varsa o kadar çok protein üretilmelidir; ancak ortamda proteinin yıkılmasını önleyen başka mekanizmalar çalışıyorsa o zaman mRNA düzeyi yükselmediği halde protein düzeylerinin yüksek çıkabileceği öngörülebilir. Dolayısıyla protein düzeyleri ile mRNA düzeyleri arasında her zaman paralel bir değişim olması beklenmeyebilir. Tüm mekanizmaların PGE₂ düzeyine bağlı olarak gerçekleşip gerçekleşmediğini görmek için hücrelerde enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemiyle PGE₂ düzeyleri ölçülmüş ve protein, mRNA, canlılık sonuçlarıyla karşılaştırılarak ortak bir çıkarımda bulunulmaya çalışılmıştır. Deneylerin tamamı hem IL-1 β uygulanmış hem de uygulanmamış A549 hücrelerinde yapılmış ve gruplar arası değişim birbiriyle karşılaştırılmıştır. Uygulanan moleküllerin kanseri tetikleyen IL-1 β ' nın etkisini kontrol grubuna göre, PGE₂ miktarını azaltarak, onkogen β -catenin protein-mRNA düzeylerini

azaltarak, aktif GSK3 β protein-mRNA düzeylerini artırarak, mPGES-1 protein-mRNA düzeylerini azaltarak elimine etmesi beklenmektedir. Çalışmada kanser hücrelerinin IL-1 β ile indüksiyonu sonucunda kanser karakteristiğinin şiddetlendirilmesi sağlanmıştır ve bu deney modeli özellikle mPGES-1 inhibitörlerinin etkisinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada mPGES-1 inhibitörü olması nedeni ile ve antikanserojen etki gösterdiği bilinen kurkumin molekülünden yola çıkılarak, yapıcı ona benzerlik gösteren ve potansiyel mPGES-1 inhibitörü olabileceği düşünülen *Zingiber officinale*' nin aktif maddeleri olan 6-gingerol ve 6-shogaolün küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleri üzerindeki antikanserojen etkinlikleri ve etki mekanizması yolağının aydınlatılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KANSER OLUŞUMU

Normal bir hücre, DNA' sında meydana gelen bir veya birden çok mutasyon sonucunda kontrolsüz olarak çoğalma yeteneğine sahip kanser hücresine dönüşebilmektedir. Bu mutasyonlar kalıtsal olarak kazanılabileceği gibi, aynı zamanda insan papilloma virüsü gibi (HPV) patojenlere veya asbest, sigara dumanı yan ürünleri gibi karsinojenlere maruz kalınması sonucunda oluşabilir (1). Kalıtsal olarak kanser oluşumuna ise verilebilecek en güzel örnek meme kanseridir. Tümör baskılayıcı özelliğe sahip olan breast cancer early onset (BRCA1, BRCA2) genlerinden birinin eksikliği durumunda meme kanseri oluşumu için risk artmaktadır (15). Bununla birlikte karsinogenezis karmaşık, birden çok aşama barındıran bir süreçtir ve bu süreçte genellikle birden fazla gen üzerinde mutasyon görülürken; hormonlar, ko-karsinojenler ve tümör gelişimini artıran etkilere gibi epigenetik faktörler sürece dahil olmaktadır. Epigenetik faktörler kendileri kanser oluşturmazsa da, kanser oluşumuna yol açan mutasyonların meydana gelmesini tetikleme özelliğine sahiptir. Genetik değişimleri iki ana kategoriye ayırmak gerekirse, bunlar: (1)

a. Protoonkogenlerin onkogenlere aktivasyonu: Protoonkogenler normalde hücre bölünmesi, apoptozis ve farklılaşma gibi olayları yönetir; ancak bu genler viral veya karsinojen etkenlerle onkogenlere dönüşürse kanserleşme yönünde malign değişimler meydana gelir. Onkogen aktivasyonu sonucunda kanser oluşumu tetiklenmektedir (1). Yaklaşık olarak 30 adet tümör süpresör gen ve 100 kadar dominant onkogen tanımlanmıştır. Bunlar üzerinde meydana gelen nokta mutasyonları, gen

amplifikasyonları ve kromozomal yeniden düzenleme gibi olaylara, virüsler ve kimyasal karsinojenler sebep olabilmektedir (1,16).

* Kromozomal yeniden düzenleme; kromozomal çevrilme ve translokasyon kanser hücrelerinde görülen tipik sitogenetik anormalliklerdendir. Bunlar sonucunda onkogen transkripsiyonu artar veya düzenlemesi bozulabilir. Prostat kanserinde gen füzyonu, hedef gen üzerinde aktif olan ve promotöre sahip gen ile onkogenik aktiviteye sahip gen arasında meydana gelir. B ile T hücre kanserinde ise en yaygın mekanizma, translokasyon sonucunda miyelositomatozis (MYC) deregülasyonudur ve en çok Burkitt lenfomada rastlanır (17). Myeloid kanserler ve yumuşak doku sarkomalarında ise gen füzyonu daha yaygın olarak görülmektedir (16).

* Mutasyonlar; bir onkogen mutasyon ile aktive edildiğinde, kodlamakta olduğu proteinin yapısı ve aktivitesi değişmektedir. Onkogenlerde pek çok mutasyon meydana gelebilir. Örneğin, guanozin nükleotit bağlama özelliğine ve intrinsik guanozin trifosfat aktivitesine sahip olan RAS onkogeninin 12,13 ve 61. kodonlarında meydana gelen mutasyonlar sonucunda, RAS geni artık her durumda aktif olan ve sürekli olarak sinyal iletimini devam ettiren bir protein kodlamaya başlar. Sinyalleme devam etmesi sonucunda hücre büyümesi devamlı tetiklenir (16). RAS genindeki mutasyonlar özellikle çevresel karsinojenlerle ilişkilendirilmiştir. KRAS mutasyonları daha çok akciğer, kolon ve pankreas kanserlerinde sık görülürken; NRAS genelde akut myeloid lösemi ve myelodisplastik sendromda görülür. BRAF geninin nokta mutasyonları ise melanomaların % 59' unda, kolorektal kanserlerin % 18' inde, karaciğer kanserlerinin % 14' ünde ve gliomaların % 11' inde görülür. Çoğu BRAF mutasyonunda 599. pozisyonundaki valin, glutamik asit ile yer değiştirir ve buna bağlı olarak MAP kinaz kaskadını kontrolsüz biçimde stimüle etme yeteneğine sahip BRAF proteini oluşur. BRAF proteininin kinaz bölgesi değişime uğrar. BRAF' ın bu etkisinden dolayı BRAF inhibitörleri araştırılmış ve klinik çalışmalar sonucunda melanoma tedavisi için vemurafenib ruhsat almıştır (18).

* Gen amplifikasyonu; genellikle tümör gelişimi sırasında görülen gen amplifikasyonuna güzel bir örnek metotreksata dirençli akut lenfoblastik lösemideki dihidrofolat redüktaz (DHFR) genidir. DHFR' de meydana gelen amplifikasyon sonucunda onkogenlerin amplifikasyonu gerçekleşir. Kanser hücrelerinde amplifiye olan onkogenlere MYC, siklin D1, endotelial büyüme faktör reseptörü (EGFR) ve RAS örnek olarak verilebilir.

MYC küçük hücreli akciğer, meme, özofagus, serviks, ovaryum, baş ve boyun kanserlerinde amplifiye olurken; siklin D1' in lenfomada amplifikasyonu artar. EGFR, glioblastoma, baş ve boyun kanserinde amplifiye olur. Aynı zamanda EGFR gen ailesine dahil olan HER2/neu' da amplifikasyon meme kanserinin kötü prognoza sebep olur (16). Bundan dolayı özellikle HER2/neu' nun üretimin arttığı meme kanseri olgularında, bu onkogenin ürününe karşı geliştirilmiş monoklonal antikor trastuzumab ve pertuzumab etki gösterebilmektedir (19).

Tablo 2.1. Onkogenler ve onlara karşı geliştirilen ilaçlar (20)

Protoonkogen	Ürün	Kanser	İlaç
IGF gibi büyüme faktörleri	Büyüme faktörleri	Prostat, meme, kolorektal	Araştırma aşamasında
EGF/ HER2	HER2 (reseptör tirozin kinaz)	Meme	Trastuzumab
EGFR	EGFR	Baş, boyun, kolorektal	Setuksimab
VEGF	VEGF	Meme, kolorektal, böbrek	Bevasizumab
VEGFR, B-raf	VEGFR, B-raf	Böbrek	Sorafenib
PGDF	PGDF(reseptör tirozin kinaz)	Kronik myeloid lösemi	Imatinib
c-ras	Ras proteinleri	Tüm tümörlerin % 30' unda	Klinik fazda
BCR/ABL	abl tirozin kinaz	Kronik myeloid lösemi	Imatinib
c-src	Sitoplazmik tirozin kinaz	Meme, pankreas, kemik	Araştırma aşamasında
JAK, Lck		Lösemi	
c-jun/c-fos	Transkripsiyon faktörleri (Jun, Fos, Myc)	Kolorektal	
c-myc		Akciğer, Nöronal doku	

b. Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu: Sağlıklı hücreler normalde malign değişimleri baskılama özelliği taşıyan tümör baskılayıcı-süpresör genlere sahiptir. Bu genlerin mutasyon sonucunda fonksiyonlarını kaybetmeleri karsinogenez olayında kritik olaylardan biridir (1). Fonksiyon kaybı için hücrede bulunan her iki fonksiyonel kopyada mutasyon olması gerekmektedir. Dolayısıyla mutasyonlar hücre için kalıcı hale gelir. Tümör baskılayıcı proteinlere örnek verecek olursak:

* *Cdk İnhibitörleri*, tüm ökaryot hücrelerde bulunan protein kinazlardır ve hücre siklusunu düzenlemekle görevlidirler. Etkilerini siklin proteinine bağlanarak gösterirler. Protein kinaz aktivitesi siklin-CDK kompleksinde optimum düzeydedir. Serin ve treoninleri fosforile etmektedirler. Bilinen 9 alt tipi vardır ve ilk dördü CDK₁₋₄ doğrudan hücre siklusu üzerinde etki gösterirler ve hücre siklusunun ilerlemesini sağlayarak hücre bölünmesine yardımcı olurlar. Cdk inhibitörleri ise bölünme sırasında, DNA hasarı tespit edilirse, genelde G₁ evresinde siklin-CDK kompleksine bağlanarak hücre siklusunun ilerlemesini durdururlar. INK4 ve CIP/KIP olmak üzere iki ana aileden oluşurlar. CDK inhibitörlerinin mutasyonel inaktivasyonu sonrasında hücre siklusu üzerinde regülasyon

bozulur ve kontrolsüz çoğalmanın önündeki engel kalkar. p16 geni tarafından kodlanan CDK inhibitörleri kanser hücreleri için mutasyon hedefidir. Bu gendeki delesyon sonucunda p16' nın inaktivasyonu pankreas kanseri olgularının % 75' inde, glioblastomanın % 40-70' inde, özofagus kanserinin % 50' sinde, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin % 20' sinde görülür. p16 inaktivasyonu siklin-CDK kompleksinin aktivasyonunun artmasına sebep olur (21). Bu da daha sonradan anlatılacağı üzere, Rb' nin fosforile edilerek inaktivasyonuna yol açar. CDK inhibitörleri kanser tedavisinde iyi bir hedef olarak görüldüğünden CDK2,7,9 inhibitörlerinden, faz I çalışmalarını tamamlamış SNS-032 ve faz I aşamasında olan roskovitin gibi moleküller üretilmiştir (22).

*p53, tümör formasyonunu durdurma yeteneğine sahip önemli bir proteindir ve akciğer, kolon, meme kanseri gibi en ölümcül üç kanser tipinde kendisini kodlayan p53 geni silinmiş durumdadır. Bu durum ise hücre çoğalmasının artması, apoptozun azalması ve sonuçta tümör oluşmasına yol açar. p53, DNA hasarı stresine bağlı olarak p21 Cdk inhibitör genini aktive etme ve apoptozu indüklemeye şeklinde iki farklı mekanizma aracılığıyla, tümör oluşumunu inhibe eder. p53' ün fonksiyon gösteremediği durumda ise p21 artık hücrede üretilmemekte ve apoptoz sinyali çalışmamaktadır. p53 geninin silinmediği durumlarda, hücrede bulunan mdm2 ve mdmX gibi p53 inhibitörlerinin etkisini ortadan kaldırılarak, p53' ün yeniden aktive edilebileceğinin gözlemlendiği çalışmalar bulunmaktadır. Özellikle sarkoma, melanoma, glioma gibi kanser tiplerinde mdm2 düzeylerinin yükseldiği görülmüştür (23).

2.2. KANSER HÜCRELERİNİN KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİ

2.2.1. Kontrolsüz Çoğalma

Kemik iliği veya gastrointestinal sistem epitel hücreleri gibi sağlıklı hücreler, normalde devamlı bir şekilde ve hızlı çoğalma özelliğine sahiptir. Genel olarak kanser hücrelerinin bu sağlıklı hücelere göre çoğalma hızları daha yüksektir. Örneğin; Burkitt lenfomada kanser hücrelerinin çoğalma hızı çok yüksektir. Kanser hücreleri, kontrolsüz çoğalmayı ve doku büyümesini önleyen regülasyon mekanizmalarından kurtulmaktadırlar. Çoğalma yeteneği açısından düşünüldüğünde kanser hücrelerini, sağlıklı hücrelerden ayıran en önemli özelliklerden biri kontrolsüz çoğalmadır. Hücrelerin kontrolsüz çoğalma yeteneği kazanmasında aşağıda belirtilen hücresel sistemlerdeki mutasyonlar önemlidir: (1)

- * Büyüme faktörlerine ait reseptörler ve sinyal yolları,
- * Siklinler, siklin bağımlı kinaz (CDK) gibi hücre siklusu düzenleyicileri,
- * Anormal hücrelerin yok edilmesinden sorumlu apoptoz sistemi,
- * Telomeraz ekspresyonu,
- * Tümör aracılığıyla meydana gelen anjiyogenezeden dolayı o bölgede bulunan kan damarları,

Potansiyel olarak yukarıda bahsedilen genleri kodlayan genler onkogen veya tümör baskılayıcı gen olarak değerlendirilebilir; ancak bunların tamamı kanser oluşumunda eşit derecede rol oynayamayabilirler. Asıl anlaşılması gereken nokta ise, kanserin oluşumu için genellikle birden fazla değişimin birarada meydana gelmesidir (1).

2.2.1.1. Çoğalma İçin Kendi Kendine Sinyal Üretebilme

Normal hücreler istirahat halinden çoğalma durumuna geçebilmek için mitojenik büyüme sinyallerine ihtiyaç duyarlar. Bu sinyaller hücreler arasında difüze olabilen büyüme faktörleri, ekstrasellüler matriks proteinleri, hücre hücre adezyon/etkileşim moleküllerinin bağlanabildiği transmembran reseptörler aracılığıyla iletilmektedir. Normalde sağlıklı hücreler bu sinyaller olmadan kendi başına çoğalamamaktadır. Kanser hücrelerindeki pek çok onkogen ise bir şekilde bu büyüme sinyallerini taklit edebilmektedir. Büyüme sinyallerine olan ihtiyaç sağlıklı hücreleri kültüre ederken gözlenebilmektedir, bu hücreler ancak difüzyon özelliğine sahip uygun mitojenik faktörler verilirse çoğalabilmektedir. Kanser hücreleri ise aksine kendi doğal ortamındaki sinyallemeye ihtiyaç duymadan kendi sinyallerini oluşturarak çoğalabilmektedir. Hücre içine sinyal aktarımı sağlayan yüzey reseptörleri tümör oluşumu sırasında deregülasyona uğrayabilirler ve kanser hücrelerinin de hedefi konumundadırlar (24). Büyüme sinyali reseptörleri genelde sitoplazmik uçlarında tirozin kinaz aktivitesine sahiptir ve bu aktivite çoğu zaman kanserde indüklenmektedir. Reseptör upregülasyonu ise normalde hücrenin duyarlı olmadığı sinyallere karşı bile duyarlılık kazanmasını sağlamaktadır. Daha önceden bahsedildiği gibi HER2/neu reseptörü meme kanserinde upregüle olmaktadır. Büyüme faktörü reseptörlerinin aşırı derecede upregülasyonu sonrası, bu reseptörler ligandan bağımsız olarak aktive olabilme yeteneği kazanabilmekte ve kendi başlarına sinyal iletimi yapabilmektedirler (25).

2.2.1.2. Büyüme Karşıtı Sinyallere Karşı Duyarsızlık

Normal bir dokuda hücrenin istirahat halinde kalabilmesi ve hücre homeostazının sağlanabilmesi için birden çok antiproliferatif sinyal bulunur. Bunlar hem çözünebilir formda hem de çevre hücrelerin ekstrasellüler matriks yüzeyinde bulunabilirler ve sinyal, hücre yüzeyinde bulunan reseptörler aracılığıyla aktarılır (24). Antiproliferatif sinyaller hücre çoğalmasını iki mekanizma ile bloke edebilir: hücreler aktif çoğalma halinden istirahat haline (G_0)' a sokulabilirler veya hücreler postmitotik faza sokulduktan sonra özgül bir şekilde farklılaşmaları sağlanabilir. Yeni oluşan hücreler bu antiproliferatif sinyallemeden etkilenmezler ve aslında hücrelerin antiproliferatif sinyalden etkilenmeleri hücre biyolojik saatle ilişkilidir. Buna dayanarak hücreler G_1 fazındayken çoğalmaya, istirahat halinde kalmaya veya postmitotik faza girmeye karar verirler. Moleküler düzeyde antiproliferatif etkiler genellikle retinoblastoma protein ve ona benzeyen p107 ile p130 üzerinden yürütülür. Hipofosforile haldeki pRb, hücreyi G_1 ' den S evresine geçiren E2F transkripsiyon faktörünün fonksiyonunu değiştirerek etki eder. pRb yolağının bozulması sonucunda E2F etkinliği artar ve hücre çoğalmaya başlarken aynı zamanda hücrenin G_1 evresine girmesini önleyen antiproliferatif sinyallere karşı da duyarsızlaşır. Transform eden büyüme faktörü β (TGF β), pRb' nin fosforilasyonunu önleyerek hücrenin dolaylı yoldan G_1 evresine girmesine engel olmaktadır, aynı zamanda pRb fosforilasyonunu sağlayan siklin:siklin bağımlı CDK komplekslerini bloke etmektedir. Kanser hücrelerinde ise TGF β reseptör downregülasyonu veya mutant/fonksiyonel olmayan reseptör üretilmesi ile pRb sinyal iletimi kesilebilir. Aynı zamanda TGF β sinyalini alt yollara ileten Smad4 yapımı bozulmuş olabilir (25).

2.2.1.3. Apoptoza Direnç

Tümör hücresinin bir hücre popülasyonu oluşturabilmesi sadece hızlı çoğalma ile değil; aynı zamanda yıpranan hücre sayısı ile alakalıdır. Yıpranma olayında rol oynayan apoptoz, programlanmış hücre ölümüdür ve bu sistemi yöneten genlerdeki mutasyonlar kanser oluşumunu tetiklemektedir. Normal hücrelerin neredeyse tamamında apoptoz sistemi mevcuttur ve sensörler ile efektörler olarak iki ana bileşenden oluşur. Sensörler hücre iç-dış ortamının sağlığına bağlı olarak, hangi hücrenin yaşayıp hangi hücrenin öleceğine karar verildikten sonra apoptotik ölümüne ait efektörlerin çalışmasını sağlarlar. Hücre içi sensörler DNA hasarı, onkogenler nedeniyle anormal sinyal iletimi ve hipoksi gibi durumlarda hücre ölüm yolağını çalıştırabilirler (25). Apoptoz sinyali ile ilgili en

önemli hücrel yapı proapoptotik sinyallere sitokrom c salarak yanıt veren mitokondridir ki, sitokrom C apoptozun en potent katalizörüdür. Aynı zamanda bcl-2 ailesine dahil olan proapoptotik Bax, Bak, Bid, Bim ile antiapoptotik Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W da apoptozda rol oynar. p53, tümör süpresör proteini ise apoptozu Bax düzeyini artırarak tetikler ve Bax bilindiği üzere mitokondriden sitokrom c salınmasını sağlar. Kaspazlar apoptozun en önemli efektörleridir. Kaspaz 8 ve 9, FAS gibi ölüm reseptörleri veya sitokrom C aracılığıyla aktive edilebilmektedir.

Kanser hücrelerinde apoptoza karşı direnç farklı mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Bunlardan en yaygını p53 tümör süpresör geninin mutasyonu ve sonucunda fonksiyonel olmayan p53 proteini üretilmesidir. Mutant p53 varlığında DNA hasarı artık hücre tarafından algılanamadığından apoptoz başlatılamamaktadır ve bu durum tüm kanserlerin neredeyse % 50' sinde görülmektedir.

Aslında kanser hücrelerinin apoptoza karşı direnç kazanması en ayırt edici özellikleridir. Bu direnç ise sonuç olarak ya proapoptotik faktörlerin inaktivasyonu veya antiapoptotik faktörlerin aktivasyonu sonucunda gerçekleşmektedir (1).

2.2.1.4. Telomeraz Ekspresyonu

Telomerler kromozomların ucunda bulunan DNA tekrarları şeklinde yapılardır ve kromozomu degradasyon, yeniden düzenleme ve diğer kromozomlarla füzyon gibi olaylardan koruyarak genomik stabilite sağlamaktadırlar. Normalde DNA replikasyonundan sorumlu DNA polimeraz enzimi DNA' nın en ucunda bulunan nükleotitleri kopyalayamamaktadır. Bununla birlikte kromozomların ucunda bulunan genlerin kaybı telomerler tarafından önlenmektedir (26). Her hücre bölünmesi sırasında ise telomerlerin bir kısmı bozulur ve telomer kaybı devam ettikçe fonksiyonlarını yitirirler. Bu aşamada DNA replikasyonu durur ve hücre yaşlanır. Aynı zamanda kritik düzeyde kısalan telomerler DNA hasarı yanıtı oluşturarak, p53 ile tetiklenen G1/S hücre siklusu baskılanması olayının başlamasına sebep olurlar (27). Kök hücreler, kemik iliği hücreleri, gastrointestinal epitel hücreleri hızlı çoğalma yeteneğine sahiptir ve bu hücrelerde telomerlerin yeniden yapılandırılmasını sağlayan telomeraz enzimi bulunur. Telomeraz enzimi revers transkriptaz özelliğine sahiptir ve kısalan telomerlerin yeniden uzatılmasını sağlar (26). Sağlıklı somatik hücrelerin % 95' inde bu enzim eksprese edilmezken; ileri evre kanser hücrelerinde telomeraz enzimi eksprese edilmeye başlar ve

sonrasında kanser hücrelerinin ölümsüzlük kazanmasında rol oynar (1). Normalde kök hücrelerde bulunan telomeraz enzimi, yaşlanmayla meydana gelen telomer kaybını giderecek özelliğe sahip değildir. Telomeraz yeni bir ilaç hedefi olarak görülmüştür ve telomeraz inhibitörü kuarfloksin klinik faz II aşamasındayken, imetelsat veya diğer adıyla GRN163L faz I aşamasındadır (27).

2.2.1.5. Anjiyogenez

Hücrenin kontrolsüz çoğalmasına aracılık eden olaylar dışında, özellikle katı tümörlerde çoğalmanın gerçekleşebilmesi için dokunun kanlanma derecesi önem kazanır. 1-2 mm çapındaki tümörler ihtiyacı olan besin kaynaklarını difüzyon aracılığıyla sağlayabilirler; ancak daha sonra büyümek için anjiyogenez aracılığıyla yeni kan damarlarının oluşmasına ihtiyaç duyar. Anjiyogenez olayı, gelişmekte olan tümör tarafından üretilen büyüme faktörleri aracılığıyla yönetilir (1). En tipik olanı vasküler endotelial büyüme faktörüdür (VEGF), buna ek olarak anjiyogenez olayında, plazminojen aktivatörleri (PA), MMP'ler, MMP inhibitörleri, temel fibroblastik büyüme faktörü (bFGF), TGF β , platelet türevi büyüme faktörü (PDGF) anjiyogenez regülasyonunda rol oynar (28). Anjiyogenez, kanser hücrelerinin kanlanması için önemli olduğundan bir ilaç hedefi olarak görülmüş ve COX-2 seçici inhibitör selekoksibin bu olayı inhibe ettiği gösterilmiştir (29).

2.2.2. Yeniden Farklılaşma ve Fonksiyon Kaybı

Normal hücrelerin dokuda çoğalması olayı farklılaşmamış kök hücrelerin bölünmesi ve kardeş hücre meydana gelmesiyle başlar. Bu kardeş hücreler farklılaşarak olgunlaşırlar ve dokuda fonksiyon görebilen hücreler haline dönüşürler. Örneğin, fibroblastlar olgunlaştıklarında, ekstrasellüler matriksi düzenleme yeteneğine sahipken; olgunlaşmış kas hücreleri artık kasılabilme özelliğine sahip olurlar. Sadece belli bir noktaya kadar farklılaşmalarını tamamlama olayı kanser hücrelerinin ana karakteristik özelliklerinden biridir, tamamıyla farklılaşarak normal fonksiyon gösterebilir hücreler haline dönüşemezler ve sonuçta çok daha hızlı çoğalan, kötü prognoz gösteren hücreler haline alırlar (1).

2.2.3. İnvazyon ve Metastaz

Sağlıklı hücreler normalde olması gerekenden farklı bir dokuda bulunmazlar. Bu olay, organ-doku büyümesi veya farklılaşma sırasında hücreler arasında bir takım özel, temasa dayalı iletişim mekanizmaları kurulması sonucunda sağlanır. Bu mekanizmalar sayesinde

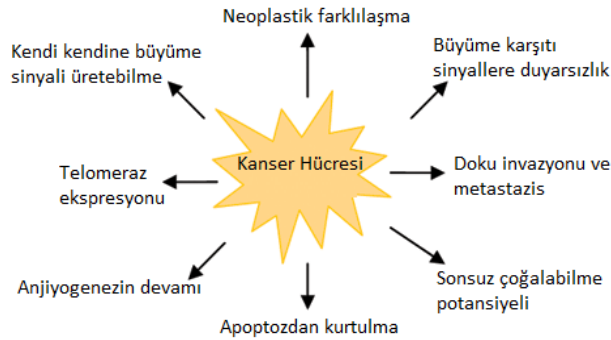
hücreler apoptozdan korunarak yaşamlarına devam edebilirler. Diğer hücreler ile iletişimi kopan hücreler ise apoptozla programlı ölüme uğrarlar. Örneğin, rektuma ait normal mukozal epitel hücreleri devamlı olarak çoğalsa da, sadece epitel hücreleri olarak kalırlar ve epitel dokunun parçası olurlar. Buna karşılık kanserleşmiş rektal mukoza hücresi, rektum veya diğer gastrointestinal organları istila eder. Kanser hücreleri mutasyonlar aracılığıyla sadece, normal hücrelerin birarada tutunmasını sağlayan fonksiyonlarını yitirmekle kalmaz; aynı zamanda ekstrasellüler matriksi yıkarak bulunduğu dokudan kurtulmasını sağlayan matriks metalloproteinaz gibi enzimler üretirler. Kanser hücrelerinin köken aldığı doku dışında diğer dokularda bulunmasına metastazis denir. Metastaz olayının ilk aşaması ise kanser hücrelerinin köken aldığı dokuyu kaplaması yani invazyondur (30).

Metastaz olayında daha önceden kanserleşmiş dokudan (primer tümör) serbestleşen hücreler, kan damarları veya lenf dolaşımı aracılığıyla diğer dokulara ulaşır ve oradaki dokularda kanser (sekonder tümör) oluşturur. Metastaz olayı, kanser tedavisinde büyük bir problemdir. Çoğu kanser olgusunda morbidite ve mortaliteden sorumludur. Daha önceden bahsedildiği üzere aslında, normal hücrelerin dokudan kopması, antiapoptotik faktörlerin ortadan kalkması sebebiyle ölümlerine sebep olur. Metastaz olan kanser hücreleri ise sağlıklı hücrelerin yapısal fonksiyonlarını düzenleyen mekanizmalardan kurtulacak şekilde mutasyona uğramışlardır ve dokunulmaz bir özelliğe sahiplerdir. Aynı zamanda tümörün beslenmesi için oluşturulan yeni damarlar metastaz olayına aracılık etmektedir (1).

Akciğer, kemik ve beyin kanseri gibi dokularda sekonder tümör oluşumu diğerlerine göre daha çok oluşmaktadır. Örneğin, meme kanseri hücreleri çok miktarda kemokin reseptörü alttip 4 (CXCR4) üretir ve kemokin üreten hücreler bu reseptörleri tanıyarak, özellikle bu bölgelerde birikirler (1).

İnvazyon olayına aracılık eden değişimler/mutasyonlar özellikle hücre hareketliliğinden sorumlu olanlardır. Bunlara c-Met, EGF, Ras proteinleri ve fosfat-tensin homoloğu (PTEN) örnek verilebilir. Karsinomaların, % 10 ile % 40 kadarı mezenkimal hareketlilik gösterirler ve bu tip hareketlilikten AP1 ile SMAD2 sorumludur. Genellikle, c-Met gibi bir protein kinazın aktivasyonu ise olayın başlangıcıdır. Amipsi harekette ise, kanser hücreleri çok hızlı şekilde hareket etmektedirler. Özellikle katı tümörlerin mezenkimal hareket yapmadıkları saptanmıştır. Amipsi harekette ise lökositlerin migrasyonu ile

benzer mekanizmalar kullanılır. Tam olarak bilinmese de PTEN, hücrenin ne yönde hareket edeceğini belirlemektedir. Kollektif hareketlilikte ise MMP' ler kendilerinden sonra hareket edecek hücreler için bir yol açarlar. Tek hücre hareketliliğinden ayrı olarak bu tip hareketlilikte adherent kavşaklar kaybedilmemiş olmalıdır. Kanser hücreleri hareket tipleri arasında geçiş yapabilmektedirler. Genel olarak ekstrasellüler proteinlerin inhibisyonu mezenkimal hareketliliğin önüne geçilebilir; ancak hücre hareketliliği tam olarak engellenemez; çünkü kanser hücresi amipsi veya yuvarlak formda hareketliliğe geçiş yapar. β_1 integrinlerin inhibisyonu ise kollektif hareketlilikten amipsi hareketliliğe geçişe sebep olur ki, kollektif hareketlilik matriks adezyonuna ihtiyaç duymamaktadır (31).



Şekil 2.1. Kanser hücresinin karakteristik özellikleri (32)

2.3. Antikanser Ajanlarla Tedavide Genel İlkeler

Sitotoksik ilaç tanımı, herhangi bir hücreyi öldüren veya ona zarar veren tüm ilaçlar için kullanılabilir; ancak pratikte, hücre bölünmesi olayını inhibe eden ve dolayısıyla kanser tedavisinde yararlı olan ilaçlar için kullanılmaktadır. Hızlı çoğalma özelliğine sahip lenfoma hücrelerinin tedavisinde, sitotoksik ilaçlar terapötik dozlarda verildiklerinde sayısal olarak sadece belli bir oranda hücreyi öldürmektedirler. Örneğin, sitotoksik ilaç hücreleri % 99,99 oranda öldürebilen bir dozda, 10^{11} sayıda kanser hücresine verilse bile, bu durumda hala ortamda 10^4 sayıda malign hücre kalacaktır. Bundan dolayı tedavi planlanırken, kanser hücrelerinin neredeyse tamamının öldürülmesi hedeflenir; çünkü mikroorganizmalara karşı yapılan tedavinin aksine geriye kalan hücreler kanser hastalarında bağışıklık sisteminin etkisiyle öldürülemeyebilir (1).

Kanser tedavisindeki önemli zorluklardan biri ise teşhis konulduğu sırada aslında kanserin ilerlemiş olmasıdır. Kanser tek bir hücreden köken aldığı ve başlangıç

sırasında çoğalma olayının üstselsel olarak yürüdüğü düşünülebilir ve bu olay ikiye katlama zamanı (doubling time) olarak adlandırılır. Örneğin, ikiye katlama zamanı Burkitt lenfomada 24 saatken, lenfoma tipine göre 2 hafta ve memeli hücre tipine göre 3 aya kadar varabilmektedir. 2 cm çapında ve yaklaşık olarak 10^9 hücreden oluşan bir tümör dokusunda 30 adet ikiye katlanma gerçekleşmiş olması beklenir. Böyle bir tümör analiz prosedürüne uygun olarak tespit edilip tanısı konulabilir boyutta değildir ve rahatlıkla gözden kaçabilir. Tümörün mevcut hali üzerine 10 bölünme daha gerçekleşirse hasta için ölümcül sonuçlar doğurabilecek bir hal alabilir ve katı tümörse, çapının 20 cm' yi bulması beklenir (1). Gerçek hayatta ise böyle devamlı bir üstselsel çoğalma söz konusu değildir. Akciğer, uterus ve mide gibi pek çok katı tümörde çoğalma hızı tümör büyüdükçe düşmektedir; ancak bu durum beyaz kan hücresi kanseri için geçerli değildir. Çoğalma hızındaki azalma büyük ihtimalle tümörün kendisine sağlanan kan miktarına oranla daha fazla büyümesinden ve kısmen her hücrenin aynı derecede çoğalmamasından kaynaklanmaktadır. Katı tipteki kanser hücrelerinin üç ayrı hücre grubuna sahip olduğu düşünülebilir. Bunlardan ilki, sürekli olarak bölünmeye devam eden hücreler; ikincisi G_0 fazında bulunup mevcut halinde bölünmeyen ancak bölünme potansiyeline sahip olan hücreler; üçüncüsü ise artık çoğalmayan ancak tümör hacmine katkıda bulunan hücrelerdir. Mevcut sitotoksik ilaçlara karşı duyarlılığı olanlar ise birinci tip, yani sürekli olarak bölünen hücrelerdir ki, bunlar katı bir tümörün neredeyse % 5' ini oluşturur. Bölünmesi durmuş üçüncü tip hücreler tedavi açısından problem teşkil etmez; ancak G_0 evresinde kalmış hücreler hem sitotoksik ilaçlara duyarlı değildir hem de tekrardan sürekli çoğalabilen tipteki hücrelere dönüşebilme yeteneğine sahiptirler.

Sitotoksik ilaçlar gibi günümüzdeki çoğu antikanser ilaç, kanser hücresinin sadece bölünebilme özelliğini etkilemektedir ve invazyon, metastazis, hücre fonksiyon kaybı gibi olaylar üzerinde seçici etkiler göstermemektedir. Genellikle, antiproliferatif etki hücre siklusunun S fazı üzerinde etkiler oluşmasını sağlar ve DNA hasarı sonucunda apoptozis başlar. Etki mekanizmalarından kaynaklandığı üzere sitotoksik ajanların az veya çok kemik iliği baskılanması (myelosupresyon) ve buna bağlı olarak bağışıklık yanıtının azalması, yara iyileşmesi olayının azalması, saç dökülmesi (alopesi), oral mukozanın dahil olduğu gastrointestinal epitel hücre hasarı, çocuklarda büyümenin baskılanması, teratojenite gibi toksik etkilere yol açması beklenmektedir. Bazı durumlarda ise bu ilaçların kendileri kanserojen özellik gösterebilir. Hızlı hücre ölümü

sonucunda artmış pürin metabolizması ve ürat böbrek tübüllerinde birikerek böbrek yetmezliğine yol açabilir. Bu ilaçların spesifik toksik etkileri yanında genel olarak birçoğu hastada uyunç sorunu yaratabilir, bulantı ve kusma gibi etkiler yapar. Kanser rahatsızlığının tedavisinde yeni moleküllere ihtiyaç duyulmakla birlikte, potansiyel ilaç hedefleri üzerinde araştırmalara devam etmektedir.

2.4. AKCİĞER KANSERİ

2.4.1. Tarihçe ve Genel Bilgi

Akciğer kanseri, kansere bağlı ölümler içinde dünya genelinde birinci sıradadır ve her yıl 1 milyon kişi akciğer kanseri nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Tedavideki gelişmelere rağmen, 5 yıllık hayatta kalma süresi akciğer kanserli hastalar için % 15 civarındadır (33).

100 yılı aşan bir sürenin bilgi birikimi sonucunda akciğer kanseri patogenezi detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Çevresel karsinojenler ve genler ile kanser arasında ilişki kurulmaya çalışılmış, sonrasında akciğer kanseri klinik karakterlerine göre sınıflara ayrılmıştır. Aynı zamanda hastalığın altında yatan hücresel-moleküler genetik değişimler son 25 yılda daha iyi anlaşılmıştır (34).

100 yıl öncesinde akciğer kanserinin sebebi bilinmiyordu. Özellikle maden yataklarında çalışan işçilerin radon gazına maruz kalmaları olayının akciğer kanseri gelişimi ile ilişkilendirilmesi ise 20. yüzyılın başlarında yapılmıştır.

Günümüzden yüzyıllar önce tütün kullanılmaktaydı; ancak sanayi devrimi sonrasında sigara üretimi ticari olarak hız kazanmış ve sonrasında kullanımı yaygınlaşmıştır. Akciğer kanseri vakalarının neredeyse tamamında sigara içme öyküsü bulunması bulgusundan yola çıkılarak 1920' lerde sigara ile akciğer kanseri arasında ilişki olabileceği sonucunda varılmıştır.

1943 yılında ise asbestin akciğer kanserine yol açtığı konusunda bilimsel bir ortak kanıya varılmıştır. Asbest fabrikalarının yaptırmış olduğu fare çalışmalarında asbestin kanseri tetiklediği bulunsa da bu sonuçların yayınlanmadığı öne sürülmüştür. Sigara ve asbestin akciğer kanseri ile ilişkisi çok erken gösterilmiş; ancak bu çalışmaların sonuçlarına dayanarak önlem alınması gecikmiş ve insanların bu maddelere maruziyeti artmıştır. Sonrasında ise, ağır metaller ve petrokimyasalların ek çalışmalarla endüstriyel ve çevresel maruziyet sonucunda akciğer kanserine yol açtığı bulunmuştur. Virüs kaynaklı akciğer kanseri konusunda çalışmalar yapılmış ve HPV, akciğer kanseriyle ilişkilendirilmiştir.

Ayrıca p53 genindeki mutasyonların akciğer kanseri patogeneğinde rol oynadığı bulunmuştur (34).

Sigara içmek akciğer kanserinin en yaygın sebeplerinden biridir. Risk kişinin sigaraya başlama yaşına, içme sıklığına ve süresine bağlı olarak artmaktadır. Sigara içen bireylerde sigara içmeyenlere göre risk 10 kat fazladır. Bunun dışında, sigara yan dumanına, radon, arsenik, asbest, nikel, polisiklik hidrokarbon ve hava kirliliğine maruz kalmakla birlikte meme, göğüs gibi bölgelerden radyasyon tedavisi almak da risk faktörleri arasında sayılmaktadır (35).

2.4.2 Akciğer Kanseri Patolojik Sınıflandırma

Akciğer kanseri patolojik olarak, küçük (SCLC) ve küçük hücreli olmayan (NSCLC) tip şeklinde ikiye ayrılmıştır.

2.4.2.1. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri

NSCLC en sık görülen ve ölümcül olan akciğer kanseri tipidir. Akciğer kanserlerinin yaklaşık % 85-90' ını oluşturur. Skuamöz, geniş hücreli, adenokarsinoma olarak üç alttipi bulunur. Herbir tip farklı büyüme ve yayılma şekillerine sahiptir ve mikroskop altındaki görünümüne göre sınıflandırılmışlardır. Bunlardan skuamöz ve adenokarsinoma en malign tipte olanlardır. Akciğer kanseri invazyon yapmadan önce hiperplazi, metaplazi, displazi ve karsinoma *in situ* gibi morfolojik evrelerden geçmektedir. Displazi ve karsinoma *in situ* aşamasında hücreler invazyona çok yatkındır (36).

* Skuamöz hücre kanseri, akciğer kanseri olgularının yaklaşık % 25-30' u bu tiptedir. Kanser skuamöz hücreler içinde oluşmaya başlar. Hücreler ince, uzun şekilli ve balık pulu görünümüne sahiptir. Epidermoid karsinoma olarak da adlandırılır (36).

* Geniş hücreli kanser, akciğer kanserlerinin % 10-15' i bu tiptedir. Kanser akciğerin herhangi bir yerinde oluşabilir, hücreler çok hızlı çoğalır ve yayılır. Geniş hücreli nöroendokrin tipi küçük hücreli kanserle benzerlik göstermektedir (36).

* Adenokarsinoma, akciğer kanserlerinin yaklaşık % 40' ı bu tiptedir. Kanser, alveol hücreleri içinde oluşmaya başlar ve mukus gibi maddeler salabilirler. Özellikle sigara içenlerde ve sigarayı bırakmış kişilerde rastlanır; ancak aynı zamanda hiç sigara içmemiş kişilerde de en çok görülen tiptir. Kadınlarda erkeklere göre daha sık rastlanır. Akciğerin

dış dokularında çoğalırlar ve genellikle akciğer dışı dokulara yayılmadan önce tanısı yapılmaktadır. Diğer tiplere göre hastalardaki prognoz daha iyidir (36).

Bu tip kanserin öldürücü olmasının en önemli sebebi ilaç rezistansıdır. İlaç rezistansı ile ilgili yapılan prelinik çalışmaların sonucuna göre bazı mutasyonlar ve ilaç rezistansı ile ilişkisi tanımlanmıştır. EGFR mutasyonu taşıyan hastalarda erlotinibe yanıt % 58 civarındadır. Bundan dolayı Amerikan İlaç ve Gıda Bakanlığı (FDA) tarafından, EGFR mutasyonuna sahip küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisinde erlotinib ilk tercih ilacı olarak belirlenmiştir. Bununla beraber hücre yaşamı ve sağ kalımıyla ilgili 12 ayrı yolak bulunmaktadır. Bunlardan sadece bir tanesinin hedef olarak seçilmesi tedavi başarısı açısından kısıtlayıcı olabilir; bundan dolayı farklı yolları etkileyen kombine tedavi yoluna gidilmesi en iyisidir. EGFR dışında ALK gen translokasyonlarının akciğer kanserinde sıkça görüldüğü ve bu değişime sahip olan hastaların da krizotinib ile tedaviye % 57 oranında olumlu yanıt verdiği görülmüştür. Akciğer kanseri için diğer hedefler ise ROS1, RET, HER2, PIK3CA ve CTNNB1 (β -catenin) mutasyonlarıdır. Akciğer kanseri hastalarında yapılan klinik çalışmalar sonucunda en çok EGFR ve KRAS' da mutasyon tespit edilmiştir. Hastalarda genlere dayalı tedavi bireyselleştirilmesi olayı klinik uygulamada tam olarak yapılamamakla beraber, sinyal yolları hakkındaki bilgi gün geçtikçe artmaktadır (37). Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin mutasyonlara dayanan yeni bir sınıflandırmaya tabii tutulması konusunda tartışmalar devam etmektedir (33).

2.4.2.2. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

SCLC, tüm Dünya' da akciğer kanserlerinin % 15' ini oluşturmaktadır ve daha önceden bahsedildiği gibi hücreler çok kısa sürede ikiye katlanabilmektedirler. NSCLC' ye göre çok daha agresiftir, hızlı çoğalır ve invazyon-metastaz yeteneği yüksektir. Özellikle lenf nodlarına yayılım çok sıktır, karaciğer, kemik, adrenal bezler ve beyin gibi dokulara yayılabilir. Hücreler kemoterapiye ve radyoterapiye karşı hassastır. Tedaviye başlanmadığı takdirde birkaç hafta içerisinde ölüm meydana gelebilir. Hastalık sınırlı hastalık veya yaygın hastalık gibi anatomik özelliğine göre iki ayrı gruba ayrılmıştır. Sınırlı hastalıkta kanser sadece bir hemitoraksta bulunur ve radyasyon ile tedaviye duyarlıdır. Kemoterapi ve radyasyon kombine tedavisi sonrası hayatta kalma süresi 16-24 ay kadardır. Yaygın hastalıkta ise kemoterapi sonrası bu süre 7-12 ay kadardır. Bu hastalarda radyasyon tedavisi palyatif ilkelerle yapılsa da, beyin metastazının azaldığı ve

genel yaşam süresinin uzadığı görülmüştür, bu durum küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde aynı değildir ve daha etkin tedavi rejimlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla beraber son yıllarda küçük hücreli akciğer kanserinin moleküler biyolojisini anlamaya yönelik pek çok çalışma yapılmıştır. Diğer kanser çalışmalarında olduğu gibi anormal düzeyde üretilen proteinler ve hücre proliferasyonu, siklusu, apoptozu ve anjiyogenezi ile ilgili sinyal yolları üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Aynı zamanda immün mekanizmaları harekete geçirebilecek tedaviler konusunda çalışmalar mevcuttur (38).

Imatinib, fenilaminodipimidin türevidir ve PGDF reseptörü, c-kit ve bcr-abl kinaz hibridinin tirozin kinaz bölgesini hedef alır. Normalde gastrointestinal tümörlerde ve lösemide kullanılırken, SCLC' de c-kit overekspresyonu olduğundan denenmeye karar verilmiştir; ancak yapılan faz II çalışmalarında ne kanser hücrelerini öldürme ne de hasta yaşam süresini uzatma açısından başarılı bulunmuştur. Bu başarısızlık c-kit ekspresyonun artmasına rağmen, aslında etkin formun overeksprese olan değil mutant c-kit' e bağlı olmasına bağlanmıştır ve ilaç dozunun artırılması tavsiyesinde bulunulmuştur (38).

Geftinibin EGFR' yi hedef alarak SCLC' de etkin olabileceği düşünülmüş; ancak NSCLC' ye göre SCLC' de bu reseptör daha az eksprese olduğundan molekül etkili olamamıştır (38).

İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) reseptör tirozin kinazın ekspresyonu SCLC gibi pek çok kanserde artmaktadır. Bu reseptör kemoterapiyle indüklenmiş apoptozun etkisini fosfotidilinozitol 3-kinaz (PI3K)-Akt yolağının aktivasyonunu sağlayarak azaltmaktayken, hücrenin invazyon ve metastaz yeteneği artar. Bundan dolayı ilaç hedefi olarak görülmüş ve Amgen tarafından üretilen AMG 479, Pfizer tarafından üretilen CP571,871 molekülünün klinik faz çalışmasıyla araştırmalarına devam edilmektedir (38).

Src kinaz pek çok büyüme faktörü ile ilişkilendirilmiş bir hücre içi sinyalleyicisidir. Dasatinib ve AZD 0530 bu enzimin inhibitörüdür ve *in vitro* olarak etkili bulunmuşlardır. Şu an faz II aşamasında çalışmaları devam etmektedir. Danatinib nonselektif bir inhibitördür ve src ailesinden kinazlar, c-kit, PDGFR- β ile bcr-abl proteinlerini inhibe etmektedir. Bcr-abl proteini üzerindeki etkilerinden dolayı SCLC tedavisinde faydalı olabileceği düşünülmektedir (38).

Anjiyogenez inhibisyonu sağlamak için matriks metalloproteinaz inhibitörleri kullanılmaktadır. SCLC' de anjiyogenez inhibitörü olarak marimastat ve tanmostat için

klirik çalışmalar yapılmış; ancak etkinlikleri grlmemiştir. Talidomidin ise faz III çalışmalarında yaşam süresinin uzadığına dair çalışmalar mevcutken; bunu doğrulayamayan çalışmalar da mevcuttur. Anjiyogenezdeki nemi daha önce anlatılan VEGF ise tedavi hedefleri arasında bulunmaktadır.

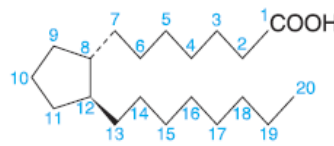
2.5. ARAşIDONİK ASİT YOLAğI VE PROSTAGLANDİNLER

Membran lipitleri eikozanoidlerin üretimi için depo görevi görmektedir. Eikozanoidler, prostaglandinler, prostasiklin, tromboksan A₂, lökotrienler, lipoksinler ve hepoksinler gibi araşidonat metabolitleri hücrede depolanmazlar. Pek çok hücre tarafından fiziksel, kimyasal ve hormonal uyarı ile ail esterazların aktivasyonu sonucunda üretilirler. Araşidonik asit yolağı pek çok biyoaktif molekülün üretiminden sorumludur ve bu moleküller enflamasyondan kansere kadar pek çok patolojide rol oynamaktadır (39). Bu yolakta üretilen prostaglandinlere ve lkotrienlere eikozanoidler denir. Araşidonik asit siklooksijenaz, lipoksijenaz (LOX) ve epoksijenazlarla (CYP450) metabolize edilebilir. COX-1 ve 2 araşidonik asit yolağının ilk basamağında yer almaktadır. COX-3 izoformu da tanımlanmıştır; ancak COX-3'n COX aktivitesi göstermediği ve prostaglandin üretme aktivitesinin olmadığı düşünülmektedir. COX aracılı prostanoidler, prostaglandinler ve tromboksanlar biyolojik olarak aktif lipit medyatrleridir. Damar tonusunun düzenlenmesi, enflamatuvar yanıt, gastrik koruyuculuk gibi etkileri vardır. Prostanoidler aynı zamanda artritler, kalp rahatsızlıkları ve pulmoner hipertansiyonla ilişkilendirilmiştir (40).

Prostaglandinlerin retimi büyük lde araşidonik asit salınımına bağlıdır. Kimyasal ve fiziksel uyarı, grup IV fosfolipaz A₂'nin (cPLA₂) Ca⁺² bağımlı bir şekilde membrana translokasyonunu sağlar ve enzim membran fosfolipitlerinin (fosfotidilkolin ve fosfotidilinozitol) sn-2 ester bağını hidrolize ederek ortama araşidonik asidin salınmasını sağlar. Stimlasyonunun olmadığı durumlarda ortama çok az araşidonik asit salınır. Hücrede bulunan indüklenebilir PLA₂ araşidonik asit üretiminin aşırı derecede indüklendiği durumlarda üretime katkıda bulunur. Ortamdaki araşidonik asit, siklooksijenazlar, lipoksijenazlar ve CYP'ler aracılığıyla hızla okside ürünlere dönüştürülür (39).

COX diğer adıyla PGHS, demir içeren bir enzimdir ve iki reaksiyonu katalizler. 1) bis oksijenasyon ile araşidonik asidi PGG₂'ye 2) PGG₂'yi de hidroperoksidad reaksiyonu

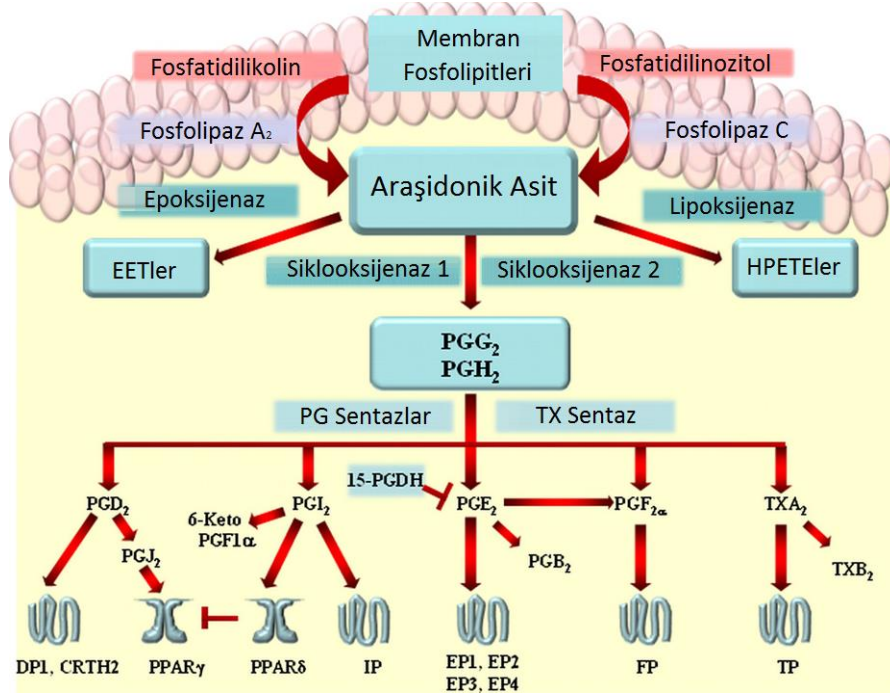
ile 15-hidroperoksit formu olan PGH_2 ' ye dönüştürür. Prostaglandinler prostanoik asit yapısında moleküllerdir ve 20 karbonludurlar. (Şekil 2.2) Örnek olarak; bu öncül prostaglandinlerden daha sonra mPGES-1 aracılığıyla PGE_2 gibi diğer prostaglandinler üretilir. Genel olarak COX-1 enzimi pek çok dokuda eksprese edilip, fizyolojik dengenin korunmasıyla ilişkiliyken; COX-2 üretimi böbrek ve santral sinir sistemi gibi dokularla kısıtlıdır; ancak ağrı, enflamasyon, kanser, ateş gibi patolojik durumlarda sitokinler, büyüme faktörleri ve proenflamatuvar uyarı ile indüklenebilmektedir (41). Enflamasyon ve kanserde oluşan prostaglandinlerin ana kaynağı ise COX-2' dir.



Şekil 2.2. Prostanoik asitin yapısı (39)

LOX aracılığıyla araşidonik asitten hidroperoksi eikozatetraenoik asit (HPETE) üretilir. 5-LOX, enflamasyon yanıtının oluşması ve gelişmesinde önemli rol oynayan lökotrienlerin (LT) üretimini sağlar. Eozinofil, mast hücresi, polimorfonükleer lökosit ve monosit gibi hücreler aktive edildiğinde 5-LOX nükleer membrana göç ederek kendisini aktive eden proteinle birleştikten sonra (FLAP) lökotrien sentezi yapılmaya başlanır. FLAP bu olay için elzemdir; çünkü 5-LOX' a araşidonik asit sunma özelliği taşır. 5-LOX öncelikle araşidonik asidi 5 nolu karbonundan okside ederek HPETE oluşturur, daha sonra lökotrien hidrolaz ile HPETE' den lökotrienler üretilir (39).

CYP2C ve CYP2J aracılığıyla araşidonik asitten epoksieikozatrienoik asitler (EET) üretilir. Farmakolojik, genetik ve beslenmeyle ilgili faktörlere bağlı olarak CYP biyosentezi değişebilir. EET' ler kardiyovasküler ve renal fonksiyonun sağlanmasında önemli rollere sahiptir. Endotel hücrelerde sentez edilirler ve düz kaslardaki Ca^{+2} bağımlı K^+ kanallarını aktive ederek vazodilatasyona aracılık ederler. Bu kanalların aktivasyonu ile hücrede hiperpolarizasyon ve sonuçta vazodilatasyona bağlı olarak kan basıncı düşüşü gerçekleşir. EET' lerin aynı zamanda koroner dolaşımda endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör gibi davrandığı düşünülmektedir (39).



Şekil 2.3. Araşidonik asit yolağı ve eikozanoid örnekleri (40)

2.5.1. Eikozanoidlerin Fizyolojik Etkileri

* *Kardiyovasküler sistem*, prostaglandinler biyolojik olarak aktif lipitlerdir. PGE₂ damar yataklarında vazodilatasyon yaparak kan basıncının düşmesine sebep olur; eğer olaya PGD₂ dahil olursa, ciltte kızarıklık, burun tıkanıklığı oluşur ve hipotansiyon şiddetlenir. PGI₂ damar düz kaslarında gevşeme yaparak hipotansiyona sebep olur ve aynı zamanda iv olarak verilirse refleks taşikardi yapar. Bu etki açısından PGE₂' den 5 kat daha potenttir. PGE₂ iv yoldan verildiğinde akciğerde inaktive edilir ve bundan dolayı hipotansif etkisi PGI₂' den 4-8 kat daha düşüktür. PGE₁ ve PGE₂ kapiller permeabilityi artırır. Cilt içine enjekte edilmeleri halinde histamin gibi Lewis' in üçlü cevabına sebep olurlar. Bu etkilerini post kapiler venüllerin permeabilitesini artırarak gösterirler. Tromboksan A₂ (TXA₂) ise etkili bir vazokonstriktördür. Lökotrien C₄ ve D₄ ise damar içi sıvı hacmiyle beraber kardiyak kontraktiliteyi azaltarak hipotansiyona sebep olur (39,42).

* *Trombositler*, PGE₂ düşük konsantrasyonlarda trombosit agregasyonunu artırırken; yüksek konsantrasyonlarda tam tersi etki görülür. PGI₂ ve PGD₂ trombosit agregasyonunu azaltırlar. TXA₂ ise özellikle trombositlerdeki COX-1 aracılığıyla üretilmektedir ve trombosit agregasyonunun güçlü bir indükleyicisidir. Diğer

trombositler için pıhtılaşma sinyali amplifiye eder. Bu etkisi ise kendisine zıt çalışan PGI_2 aracılığıyla ortadan kaldırılır (39,42).

* Bronşlar, PGI_2 genel olarak akciğer damar yatağında oluşurken; PGE_1 ile PGE_2 esas olarak bronşlarda oluşur ve bronş düz kaslarını gevşeterek bronkodilatasyon yaparlar. $PGF_{2\alpha}$ bronkokonstriksiyona sebep olur. Bu etkisinden dolayı abortus sağlamak amacıyla kullanılabilir (39,42).

* Enflamasyon ve bağışıklık, eikozanoidler enflamasyon ve bağışıklık yanıtında önemli rol oynar. Lökotrienler genel olarak proenflamatuar, lipoksinler antienflamatuar iken; prostanooidler her iki etkide de rol oynamaktadır. LTB_4 polimorfonükleer lökosit, eozinofil ve monosit aktivasyonu yapan potent bir kemotaktik ajandır. Yüksek konsantrasyonlarda lökositlerin agregasyonu ve degranülasyonuna sebep olarak superoksit oluşumunu artırır. Nötrofillerin damar endotel hücrelerine yapışmasını ve onların transendotelial migrasyonunu artırır. Makrofajlar ve lenfositlerden proenflamatuar sitokinlerin salınmasını artırır. Prostaglandinler genel olarak lenfosit fonksiyonunu ve proliferasyonunu inhibe ederler, bağışıklık yanıtını baskırlar. PGE_2 , B lenfositlerin antikor salınan plazma hücrelerine dönüşümünü önleyerek, humoral antikor yanıtını baskırlar. Aynı zamanda, T lenfositlerin mitojen ile aktive edilmiş proliferasyonlarını inhibe eder. PGD_2 , mast hücrelerinden salınır. Eozinofiller için potent bir kemoatraktandır ve lenfositlerin migrasyonunu indükler (43).

* Böbrek ve üriner sistem, prostaglandinler, böbrek kan akımını değiştirerek ve doğrudan böbrek üzerindeki etkileri aracılığıyla, böbrekte su ve tuz atılımını etkilerler. PGE_2 ve PGI_2 köpek renal arterine doğrudan verilmiş ve kan akımının arttığı, diürezis, natriürezis, kalürezis gibi olayların şiddetlendiği görülmüştür; glomerüler filtrasyon hızında değişim olmamıştır. TXA_2 kan akımını azaltırken aynı zamanda glomerüler filtrasyon hızını düşürür. PGE ' ler vazopresin hormonu ile indüklenen su reabsorpsiyonunu inhibe ederler. PGE_2 , klorür reabsorpsiyonunu henlenin kalın çıkan bölümünde inhibe etmektedir. PGI_2 , PGD_2 ve PGE_2 böbrek korteksinde renin sekresyonunu artırır. Bu etkilerini ise granüler jukstaglomerüler hücrelere doğrudan etki ederek göstermektedirler (39,43).

* Göz, $PGF_{2\alpha}$, iris sfinkter kasının konstriksiyonunu artırır ve göz üzerindeki genel etkisi, aköz humör akımını artırarak introküler basıncını azaltması şeklindedir. PGF agonistlerinden latanoprost açık açılı glokom tedavisinde kullanılmaktadır ki, bu rahatsızlığın siliyer gövdedeki pigmentli epitellerdeki COX-2 ekspresyonunun kaybına bağlı olduğu düşünülmektedir (39,43).

* Santral sinir sistemi, sinir sistemi üzerinde en etkin prostaglandinler PGE_2 ve PGD_2 ' dir. Endojen ve ekzojen pirojenlerin tetiklemiş olduğu ateş PGE_2 tarafından yönetilmektedir. Ekzojen olarak verilen $PGF_{2\alpha}$ ve PGI_2 ateşi indükler; ancak pirojenlerle oluşan ateşte rol oynamazlar. Prostaglandinler hem periferik hem de santral olarak ağrı olayında rol oynarlar. Fosfolipaz A_2 ve COX-2 sentezi bölgesel olarak enflamasyon yerinde arttığından dolayı PGE_2 sentezi de artar. PGE_2 ve PGI_2 periferik sinir sonlanımlarında ağrı uyarısını nosiseptörlerin eşiğini düşürerek artırır. Merkezi olarak, PGE_2 omurilikteki ağrı iletimi ile ilişkili nöronal yolların eksitabilitesini artırır. Hiperalejiye aynı zamanda LTB_4 de katkıda bulunur. Enflamasyon sırasında bu eikozanoidlerin salınması aynı zamanda ağrı iletim sisteminde amplifikasyona sebep olmaktadır. COX-2 inhibitörlerinin özellikle Alzheimer, Parkinson ve epilepsi hastalıklarının profilaksisinde kullanımlarıyla ilgili klinik çalışmalar devam etmektedir.

* Endokrin sistem, bazı endokrin dokular prostaglandinlere yanıt verirler. PGE_2 , dolaşımda bulunan adrenokortikotropik hormon, büyüme hormonu, prolaktin ve gonadotropinlerin miktarını arttırmaktadır. Aynı zamanda fertilizasyon sırasında ve ovulasyondan sonra gerekli olan oosit olgunlaşmasını pozitif feedback mekanizmasını etkileyerek artırır. LOX metabolitlerinden 12-HETE adrenal korteksten salınan aldosteronu artırır (39,43).

* Kemik, prostaglandinler kemik metabolizmasında önemli role sahiptir. PGE_2 osteoblastik ve osteoklastik etkisi ile kemik oluşumunu ve rezorpsiyonunu stimüle eder. Eikozanoidler sayılan tüm bu etkilerini reseptörleri üzerinden gösterirler. Dolayısıyla reseptör yaygınlığı dokuya bağlı olarak fizyolojik yanıtta rol oynayan eikozanoidlerin etkinliklerini açıklamaktadır.

Prostaglandinler lokal olarak oluştukları bölgede etki ederler. Tüm prostaglandin reseptörleri G protein aracılı reseptörlerdir ve G_s , G_i , G_q gibi alt ünitelere sahiptir. Bu alt ünitelerin ilişkili olduğu fosfolipaz C ve adenilil siklaz aracılığıyla aktiviteleri düzenlenir ve sinyal alt kademelere iletilir (39,43).

2.5.2. Prostaglandin E_2 Üretimi ve Etkileri

PGE_2 ağrıdan, ateşten ve enflamatuvar yanıtta en çok sorumlu tutulan medyatördür. Üretimi araşidonik asidin COX-1,2 ile PGG_2 ve PGH_2 ' ye dönüşümüne ve PGH_2 ' nin de prostaglandin E sentaz enzimi aracılığıyla izomerizasyonuna bağlıdır (5). mPGES-1, mPGES-2 ve cPGES olmak üzere üç izoformu bulunur. mPGES-1 glutatyona bağımlı

olarak çalışan, IL-1 β , TNF- α , ve LPS ile indüklenebilme özelliğine sahip bir enzimdir ve COX-2 ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir (5, 13).

PGES gen ailesinden üretilen proteinler PGE₂ sentezinden sorumlu ana sentazlardır ve bunlar PTGES1, PTGES2, PTGES3 adındaki üç farklı gen tarafından mPGES-1, mPGES-2, cPGES olarak kodlanır. mPGES-1 MAPEG (eikozanoid ve glutatyon metabolizmasıyla görevli membranla ilişkili protein) ailesinin bir üyesidir. MAPEG ailesindeki diğer enzimler gibi mPGES-1 de enzimatik aktivitesini göstermek için kofaktör olarak redükte GSH' a (glutatyon) ihtiyaç duymaktadır (44). PGE₂ sentezinde ana rolü oynayan enzim mPGES-1' dir (45). mPGES-1 inhibisyonu ile belli bir dereceye kadar mPGES-2 ve cPGES enzimleri PGE₂ üretimini sürdürebilirler (13). Bundan dolayı PGE₂ reseptör antagonistlerinin PGE₂ etkinliğinin azaltılması amacıyla kullanılması mümkündür (44).

PGE₂ düzeyleri aynı zamanda 15 prostaglandin dehidrogenaz (15-PGDH) enzimi ve 15 keto-prostaglandin - Δ 13- redüktaz (13-PGR) tarafından kontrol edilmektedir. 15-PGDH, PGE₂' nin 15 hidroksil grubunu okside ederek PGE₂' yi yıkmaktadır. Bu enzimler PGE₂' nin biyolojik aktivitesini elimine ederler. IL-1 β , COX-2 ekspresyonunu upregüle ederken; aynı zamanda 15 PGDH enziminin ekspresyonunu downregüle eder. Böylece PGE₂ yıkılımı azalırken; aynı zamanda mPGES-1' in substratı artırıldığından ortamdaki PGE₂ miktarı artar. İki yönlü bir artış sağlanır. 15-PGDH ekspresyonunun kolon karsinogenezinde azaldığı tespit edilmiştir. (46).

mPGES-1, COX-2 ile indüklenabilir ve beraber çalışırlar. mPGES-2 ve cPGES konstitütif olarak üretilir ve fonksiyonel olarak COX-1 ile beraber çalışarak PGE₂' nin bazal düzeyinin sağlanmasında etkilidir. mPGES-1, glutatyona bağımlı olarak çalışırken; mPGES-2 ve cPGES aktiviteleri için glutatyona ihtiyaç duymaz (46).

mPGES-1 ekspresyonu normal dokularda belli bir düzeyde tutulurken; akciğer, böbrek ve üreme organlarında neredeyse yok denecek kadar az eksprese edilmektedir. Bununla beraber proenflamatuar sinyallerle indüklenebilme özelliğine sahiptir (47).

PGE₂, biyoaktif bir lipittir ve enflamasyondan kansere pek çok olayda biyolojik aktiviteye sahiptir ve etkisini EP₁, EP₂, EP₃, EP₄ olarak adlandırılan reseptörleri aracılığıyla meydana getirir. İlk üçünün selektif antagonistleri sırasıyla, 17-fenil-omega-trinor-PGE₂, butaprost ve enprostildir. Sulproston hem EP₁ hem EP₃ blokorüdür. EP₁' ler hücre içi Ca⁺² düzeyini yükseltirler ve PGE₁' in düz kas kasıcı etkisine aracılık ederler. EP₂' ler ise adenilil siklazı artırarak, PGE₂' nin düz kas gevşetici etkisine aracılık ederler. EP₃

reseptörler aracılığıyla düz kas kasılması, nöromedyatör salıverilmesinin inhibisyonu ve adipositlerde lipolizin inhibisyonu gibi çeşitli etkilere aracılık ederler. EP₄' ler adenilil siklazı stimüle ederek, vazodilatasyon ve T lenfosit inhibisyonu yapar (42).

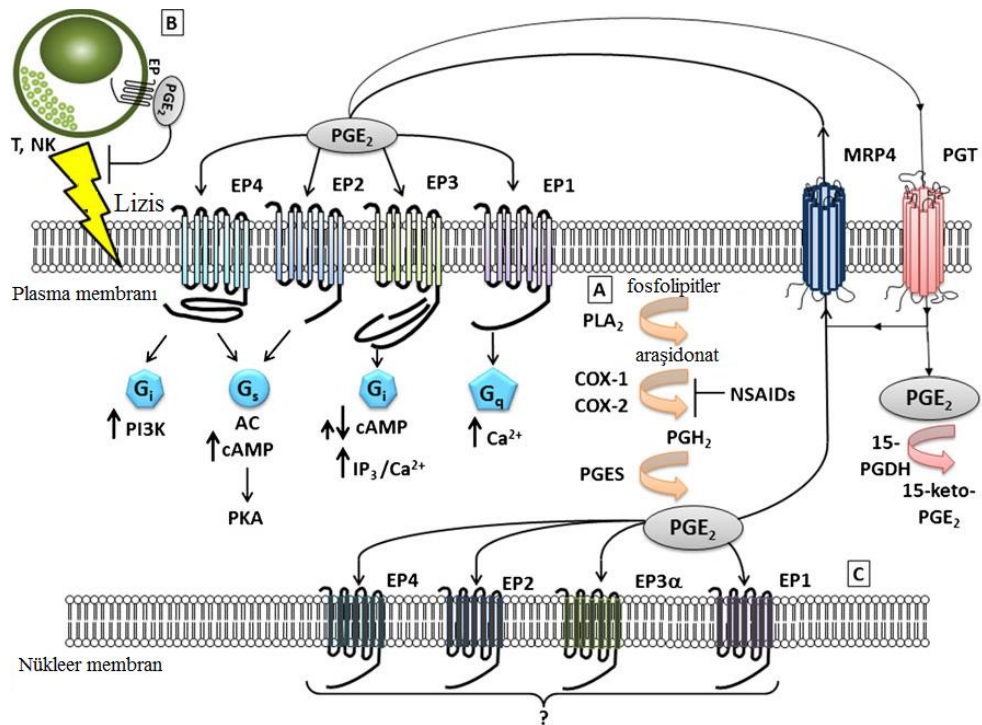
* Proenflamatuar etkiler, enflamatuar yanıtın başlangıç aşamasında PGE₂ ve PGI₂ vazodilatör özelliklerinden dolayı, nötrofil, makrofaj ve mast hücrelerinin kanla ilgili dokuya taşınmasını kolaylaştırarak şişlik ve ödem oluşmasını sağlarlar. PGE₂, duyu nöronlarını uyararak ağrı duyumsamasını artırır ve preoptik bölgedeki nöronlar üzerinden pirojenik etki yapar. PGE₂' nin enflamasyondaki etkisi, mPGES-1 geni pasif hale getirilmiş farelerde yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu farelerin genel olarak enflamasyon uyaranlarına karşı dirençli olduğu görülmüştür ve kollajen ile indüklenen artrit, lipopolisakkarit ile indüklenen kemik kaybı, antijen ile indüklenen pençe ödemi gibi olaylar daha az görülmüştür. Kollajen ile indüklenmiş çalışmadaki enflamasyona karşı direnç farelerin tip II kollajene karşı antikor üretememesine bağlanmış ve bu da PGE₂' nin bağışıklık sistemindeki rolüyle ilişkilendirilmiştir. Karagen ile indüklenen pençe ödeminde, lökosit migrasyonunu, ödem salgısını azalttığı görülmüş ve bu olay PGE₂' nin vasküler permeabilitesi üzerindeki rolüyle ilişkilendirilmiştir (48).

* Antienflamatuar etkiler, PGE₂ birkaç mekanizma üzerinden paradoksik olarak antienflamatuar etki göstererek doku tamirini hızlandırmaktadır. Yapılan çalışmalara göre, enflamasyonun son aşamasında, COX-2' nin farmakolojik olarak inhibisyonu ile karaciğer, akciğer ve kolon gibi dokuların iyileşmesi olayını engellemektedir (49). PGE₂' nin IL-2' yi ve T hücreler üzerindeki IL-2 reseptör ekspresyonunu inhibe ettiği düşünülmektedir. IL-2 inhibisyonu ile T hücre proliferasyonu ve aktivasyonu azalmaktadır (50).

* Yara iyileştirici etki, doku tamiri enflamasyon olayının son aşamasıdır. mPGES-1 geni pasifleştirilmiş farelerin asetik asitle indüklenen gastrik ülserasyonda, yara iyileşmesi olayının yavaşladığı ve aynı zamanda bu hayvanlarda çok daha ciddi yaralar meydana geldiği görülmüştür (51). COX-1 aracılığıyla üretilen PGE₂ gastrik mukozanın bütünlüğünü sağladığından koruyucu özelliğe sahiptir. Bununla ilişkili olarak, NSAİ ilaçlarla beraber ciddi gastrointestinal yan etkiler oluşabilmektedir. Bu etkiler prostaglandin E analogu misoprostol ile tedavi edilebilmektedir (6).

2.5.3. PGE₂ Reseptörleri

Prostaglandin hücre yüzeyi reseptörleri G protein kapılı reseptör ailesindendir. G proteinler membranı 7 kez kateden α heliksine, bir adet hücre dışı N terminal uca, bir adet hücre içi C ucuna ve membranın her iki tarafında 3 adet kıvrıma sahiptir. Bu reseptörler, hücre dışından gelen sinyalleri hücre içine ileten, heterotrimerik G proteinleri ile çiftlenmişlerdir. Heterotrimerik G proteinlerinin α , β ve γ olmak üzere üç alt ünitesi bulunur. Bu üç alt ünite inaktif durumdayken $G\beta\gamma$ şeklinde monomer ve G_α şeklinde birarada bulunurlar. Heterotrimerler α alt ünitesi sekansına ve sinyal aktivitesine göre G_{as} , G_{ai} , $G_{aq/11}$ ve $G_{a12/13}$ olarak 4 gruba ayrılır. Ligand aktivasyonu sonrasında G_α ünitesindeki guanozin di fosfattan (GDP) guanozin tri fosfat (GTP) oluşumu katalizlenir. Böylece G_α ünitesinin, $G\beta\gamma$ ' ya afinitesi azalır ve birbirlerinden ayrılırlar. Bunun sonucunda G_α ve $G\beta\gamma$ üniteleri ayrı ayrı alt yolaktaki efektörlerle etkileşebilirler (52). PGE₂ reseptörleri farklı hücrel lokalizasyon, dokusal ve biyokimyasal özellik gösterir.



Şekil 2.4. PGE₂ reseptörleri ve sinyal yolağı

EP₁, G_q aracılıdır ve hücre içi kalsiyum düzeyini artırmakla beraber protein kinaz C (PKC) aktivasyonunu sağlar. Hücre içi kalsiyum düzeyini Ca⁺² ile aktive olan reseptörler ve G_q ya da G₁₁ aracılığıyla olmak üzere iki ayrı mekanizma ile artırır. EP₁ aktivasyonu

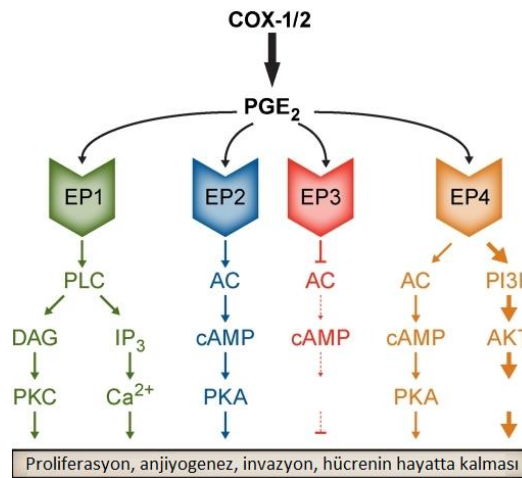
ile Gq aracılı fosfolipaz C aktivasyonuna bağılı olarak ekstrasellüler ve intrasellüler kaynaklı olmak üzere, hücre içindeki Ca^{+2} düzeyi artırılır. Phosphatidilinozitol 4,5-bifosfat (PIP_2), fosfolipaz C tarafından yıkılır ve inozitol trifosfat (IP_3) ve diaçil gliserol (DAG) oluşur. IP_3 endoplazmik retikulum kaynaklı (intrasellüler) Ca^{+2} un sitoplazmaya salınmasını sağlar; DAG protein kinaz C' yi aktive eder ve o da hücre yüzeyinde bulunan Ca^{+2} kanallarını fosforilleyerek etkinleştirdikten sonra hücre dışı kaynaklı (ekstrasellüler) Ca^{+2} hücre içine alınır.

Tablo 2.2. G-protein alt üniteleri ve efektörleri (53)

Alt ünite	Efektörler
<i>G_s</i>	Adenilil siklaz, cAMP artışı, PKA
<i>G_i</i>	PI3K, adenilil siklaz, cAMP' de azalış
<i>G_q</i>	Fosfolipaz C, artmış kalsiyum, PKC, rho GTPAazlar
<i>G_{α12}</i>	Rho GTAazlar
<i>G_{βγ}</i>	PI3K, fosfolipaz C, iyon kanalları

EP_2 , $\text{G}_{\alpha s}$ aracılığıyla adenilil siklazın aktivitesini artırır. Adenilil siklaz adenosin tri fosfattan (ATP) siklik adenosin monofosfat (cAMP) sentezlenmesini artırır. cAMP de protein kinaz A' nın (PKA) aktifleşmesini sağlar. EP_4 , EP_2 ' nin aksine $\text{G}_{\alpha i}$ aracılığıyla PI3K' yi aktive eder. $\text{G}_{\alpha i}$ ' den dolayı EP_4 cAMP/PKA sinyal yolağının etkinliğini azaltır.

EP_3 reseptörünün ise I, II, III, IV, -e ve -f olmak üzere 6 alttipi bulunur. Bunlar $\text{G}_{\alpha i}$, $\text{G}_{\alpha s}$, $\text{G}_{\alpha q}$ ve $\text{G}_{\alpha 12/13}$ gibi farklı aracı proteinlere sahiptir. Genel olarak cAMP oluşumunu inhibe etmektedirler.



Şekil 2.5. Prostaglandin reseptörleri ve efektör makromoleküller

G protein kapılı reseptörlerin genel olarak sadece hücre yüzeyinde bulunduğu düşünülse de bu reseptörlerin aynı zamanda nükleer membran yüzeyinde olabileceğine dair artan bir kanı bulunmaktadır. Prostanoid sentezi için gereken fosfolipaz A₂, mPGES-1 ve COX-2 gibi enzimler aynı zamanda nükleusta bulunmaktadır. Dolayısıyla PGE₂ doğrudan nükleusta sentezlenip, aynı şekilde nükleusta bulunan EP₁, EP₂, EP_{3α} ve EP₄ reseptörlerine bağlanarak etki gösterebilmektedir ki bu reseptörlerin varlığı farklı doku ve hücre çeşitlerinde gösterilmiştir; ancak hücre membranındaki reseptörlerden daha farklı etkilere sahip olduğu düşünülmektedir. Örneğin, hücre membranında bulunan EP₃, cAMP' yi azaltarak ani bir vazomotor etki oluştururken; nükleer EP₃ reseptörü cAMP veya IP₃ gibi bir ikincil haberci kullanmadan gen regülasyonunu değiştirebilmektedir. Nükleer EP₁ reseptörlerinin meme kanseri hücrelerinde eksprese olduğu immüno histokimyasal metodlarla gösterilmiştir (53).

2.5.4. COX-2' nin Kanserdeki Rolü ve PGE₂ ile İlişkisi

PGE₂' nin tümör promotör etkileri bulunmaktadır. Bu sonuca NSAI ilaçların kanserdeki rolünü aydınlatmak için yapılan, kemirgenler üzerindeki çalışmalardan ve klinik araştırmalardan ulaşılmıştır. Özellikle kolorektal kanserlerde COX-2 ekspresyonunun arttığı ve günlük düşük doz aspirin kullanımıyla kolorektal kanser riskinin % 50' ye kadar azaldığı yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır (54). Aspirinin bu etkisi büyük ihtimalle, NSAI ilaçların COX enzimleri üzerinde yapmış olduğu inhibisyona bağlı olarak alt yolaklardaki prostaglandinleri ve PGE₂' yi azaltmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. EP₄ reseptörünün kolon kanserinde PGE₂ aracılı hücre proliferasyonundan sorumlu ana reseptör olduğu düşünülmektedir (6). Selektif COX-2 inhibitörü kullananlarda önemli derecede kansere karşı koruyuculuk gözlenirse de; ilaçların oluşturduğu kardiyovasküler yan etki riski özellikle yüksek dozlarla ilişkili olarak artmaktadır (40).

COX ekspresyonunun kanserdeki rolünün sinyal yolağındaki prostanoidler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu düşünce epidemiyolojik çalışmalarla desteklenmiştir. Yapılan çalışmalarla COX ekspresyon düzeylerinin normal hücrelerden farklı olduğu bulunmuştur. COX-2 enziminin ekspresyonunun artması aynı zamanda sinyal yolağında görevli diğer enzimlerin düzeylerinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Sinyal yolağında görevli enzimlerin ekspresyonu arttıkça, COX enzimlerinin de düzeylerinin arttığı düşünülmektedir. Bundan hareketle araşidonik asit yolağının alt bölümlerinde görevli yapılara yönelik antikanser ilaçların geliştirilmesine çalışılmaktadır. Sonuçta bu alt

yolaklarda COX enziminin düzeyini spesifik olarak artıran protanoidlerin hedef alınmasıyla genel COX inhibisyonu sonrası oluşan kardiyovasküler yan etkiler önlenirken, antikanser etkinliğin devam ettirilebilme imkanı olabilir.

Düzenli olarak kullanılan tezgah üstü NSAI ilaçların kolon kanseri riskini % 43, meme kanserini % 25, akciğer kanserini % 28, prostat kanserini % 27 oranında azalttığı gözlenmiştir. COX-2 ekspresyonunun ve PGE₂ biyosentezinin indüklenmesinin mutagenesis, mitogenezis, anjiyogenezis, metastazis, apoptoz inhibisyonu ve T-B lenfositlerin azalmış antineoplastik aktivitesiyle seyreden bağışıklık sisteminin baskılanması gibi karsinogenezin en temel faktörlerini etkilediği düşünülmektedir. COX-2' nin sürekli ekspresyonu ile kanser oluşumu ve ilerlemesinin şu mekanizmalarla gerçekleştiği düşünülmektedir:

- 1) MDA (malondialdehit) ve ROS (reaktif oksijen türevleri)' ların artması ile mutagenesis,
- 2) PGE₂ üretiminin ve diğer kanser oluşumunu artıran prostaglandinlerin sentezinin artması ile örneğin EGFR gibi hücre içi mitojenik sinyallerin uyarılması ile mitogenezis,
- 3) VEGF ve PDGF (platelet derived büyüme faktörü) artması ile anjiyogenezis,
- 4) Matriks metalloproteinaz enzimlerinin üretiminin artırılması yoluyla invazyon,
- 5) Sfingomyelinin seramide dönüşümünü sağlayan araşidonik asidin tükenmesi ve Bcl-2 geninin stimülasyonu ile beraber BAX geninin inhibisyonu sonucunda anti apoptotik,
- 6) T ve B lenfositlerinin üretiminin inhibisyonu ile antineoplastik etkinin azalması aracılığıyla kanser oluştuğu düşünülmektedir (10).

EP₂ reseptörü pasif hale getirilmiş olan fareler üzerinde yapılan çalışmada, farelerde kontrol grubuna göre COX-2 ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. Aynı şekilde EP₂ reseptörü upregüle eden farelerde deri kanseri geliştiği görülmüştür. Bundan dolayı COX-2 indüksiyonunun EP₂ aracılığıyla PGE₂ tarafından yönetildiği düşünülmüştür (55).

COX-2 aracılı antikanser etki günümüzde klinik faz çalışmalarıyla araştırılmaktadır. Bu çalışmalara baş ve boyun kanserinde kemoradyasyona ek olarak verilen COX-2 inhibitörü selekoksibin etkisi (Clinical Trial ID: NCT00603759, gönüllü almakta), pankreas kanserli hastalarda siklooksijenaz inhibitörlerinin mevcut tedaviye ek olarak antikanser etkisi (Clinical Trial ID: NCT01111591 gönüllü almakta), sınıf 2 ve 3 uterus kanserli hastalarda selekoksibin etkisine dair pilot bir çalışma (clinical trial ID: NCT00231829, beklemede),

karboplatine ek olarak verilen selekoksibin önceden tedavi almış ovaryum kanserli hastalardaki etkisi (clinical Trial ID: NCT01124435) gibi çalışmalar örnek olarak verilebilir. Karboplatine ek olarak selekoksible yapılan çalışma sonucunda, COX-2 inhibitörü selekoksibin, karboplatinin etkisini artırdığı gözlenmiştir; ancak COX-2 inhibitörü ilaçlardan fayda sağlayabilecek kanserli hastaların seçilmesinde idrarlarındaki PGE₂ metaboliti PGE-M düzeylerinin önemli bir biyoişaretçi olabileceğine değinilmiştir (12). Dolayısıyla COX-2 inhibisyonu kadar mPGES-1 inhibisyonunun önemli olabileceği düşünülebilir. mPGES-1 delesyonunun sağlandığı farelerde kolorektal kanser oluşumunu sağlayan azoksimetan uygulamasından sonra kanser oluşumunda normal farelere göre % 66' lık bir azalma olduğu tespit edilmiştir (56).

2.5.4.1. Apoptozdan Kurtulma ve COX-2/PGE₂

Apoptoz mekanizmasındaki bozukluk hücrelerin hayatta kalması veya ölümü arasında değişen patolojik sonuçlar doğurmaktadır; ancak kanser hücreleri için özellikle hücre ölümünün gerçekleştirilememesi büyük bir sorundur ve malign oluşumların meydana gelmesine sebep olur. COX-2/PGE₂ yolağının PGE₂ reseptörleri aracılığı ile apoptozu, otokrin ve parakrin şekilde düzenlediği düşünülmektedir. Mekanizmalar tam belli olmamakla birlikte, hücre tipi gibi bir faktöre dayanarak farklılık gösterebilmekte ve COX-2 aşırı ekspresyonunun apoptozun intrinsik yolağını etkilediği düşünülmektedir. COX-2/PGE₂, Ras-MAPK/ERK yolağı üzerinden antiapoptotik BCL-2 düzeylerini artırmaktadır. Aynı zamanda hücrenin hayatta kalmasını sağlayan PI3K/AKT, ERK, cAMP/PKA, EGFR yolları üzerinde etkisi bulunmaktadır. Mekanizma tam olarak aydınlatılmamış olsa da, özellikle kolorektal kanserde hücrelerin hipoksik durumdan kurtulabilmeleri PGE₂ Ras/MAPK yolağına bağlanmaktadır. EP₄ reseptörünün kanserde upregüle olması durumu, COX-2/PGE₂/EP₄ yolağının hücre ölüm mekanizmalarının inhibe edilmesi ile ilişkilendirilmesine yol açmıştır (24).

2.5.4.2. Kendi Kendine Büyüme Sinyali Oluşturabilme ve COX-2/PGE₂

Hücrenin büyümesi olayı, büyüme faktörleri ve sitokinlerin dahil olduğu kompleks mekanizmalarla yönetilmektedir. Bu mekanizmalardaki düzensizliğin kontrolsüz hücre çoğalması ve çevredeki etkenlere yanıt vermeme ile karakterize olmakla birlikte, kanser oluşumu ve gelişiminde önemli bir rolü olduğuna inanılmaktadır. Mutasyona uğrayarak fonksiyonu değiştiği düşünülen mekanizmalar Ras-MAPK ve PI3K/AKT yollarıdır ki; bunlar hücre büyümesi, çoğalması ve hayatta kalma gibi olayları yönetirler. KRAS ve

BRAF mutasyonları, Ras/MAPK yolağının aşırı derecede aktivasyonuna sebep olmaktadır. PGE₂, bu mutasyonlara sebep olmasa da, onları kopya ederek Ras/MAPK ve PI3K/AKT sinyal yolaklarını tetiklemekte ve tümör gelişimini artırmaktadır. Kanser hücresinin hipoksiye girdiği durumlarda, hipoksiyle indüklenen faktör-1 (HIF-1), COX-2 ekspresyonunu ve PGE₂ üretimini artırarak hücrenin yaşamda kalmasını Ras/MAPK sinyali üzerinden sağlamaktadır (24).

2.5.4.3. Büyüme Karşıtı Sinyallere Karşı Duyarsızlık ve COX-2/PGE₂

Normal fizyolojik şartlar altında, apoptoz ve büyümeye yönelik sinyallere ek olarak hücre homeostazını sağlamak için büyüme karşıtı sinyaller bulunmaktadır. Bu mekanizmalardan biri, TGFβ'ın, c-Myc süpresyonu ve siklin bağımlı kinaz inhibitörlerini aktive ederek, hücrenin G₁ evresine girişini önlemesidir. COX-2 ekspresyonunun artması ve COX-2/PGE₂ sinyalinin şiddetlenmesi sonucunda hücredeki TGFβ reseptörlerinin downregüle olduğu bulunmuştur. Bunun sonucunda hücrenin G₁ evresine girerek çoğalması önünde engel bulunmaması anlamına gelmektedir.

Kolon kök hücreleri normalde yüksek proliferasyon hızına sahip hücrelerdir; ancak her zaman çoğalma fazında bulunmazlar, hücre siklusunun belli bir aşamasından sonra farklılaşarak fonksiyonel hücreler haline gelirler; ancak kolorektal kanser durumunda WNT yolağı ile β-cateninin aşırı derecede aktivasyonu hücrelerin normal farklılaşma programını bozar ve sürekli çoğalma aşamasında kalmalarına sebep olur. Yapılan çalışmalarla COX-2/PGE₂ yolağının β-catenin aktivasyonu sağladığı bulunmuştur. Hatta APC/β-catenin yolağında varolan mutasyonlar sonucunda artmış sinyalin PGE₂ ile şiddetlendirilmesinin kanser oluşumunda rol oynayabileceği düşünülmektedir (24).

2.5.4.4. Sürekli Çoğalabilme Potansiyeli ve COX-2/PGE₂

Hücrelerin kendilerini yenileme ve sürekli çoğalabilme potansiyeli genel olarak kök hücrelerin tipik bir özelliği iken, patolojik açıdan düşünüldüğünde kanser hücrelerine de aittir. Özellikle kolon kanserinde kök hücrelerin APC/β-catenin mutasyonlarına bağlı olarak kanser hücrelerine dönüştüğü düşünülmektedir. Tüm kolon kanserlerinin % 80'inde tümör baskılayıcı özellikteki APC geninde kayıp söz konusudur ve APC'nin bu etkisini β-catenini baskılayarak gösterdiği düşünülmektedir. β-catenin ise sinyali WNT ligandı aracılığıyla iletmektedir. COX-2/PGE₂ sinyali EP₂ reseptörü aracılığıyla WNT aktivasyonu sağlamaktadır. Bu olay iki ayrı yoldan ilerlemektedir. Birincisi, AKT ile normalde β-cateninin parçalanmasını sağlayan GSK3β'nin yıkılması; ikincisi ise β-

catenin/TCF sinyalinin aktivasyonudur. COX-2/PGE₂ sinyali böylece kanser hücrelerinin sonsuz çoğalabilme potansiyelini artırmakta ve kök hücre benzeri karakteristik kazanmasını sağlamaktadır (24).

2.5.4.5. Anjiyogenez ve COX-2/PGE₂

Kanser sürecinde tümör dokusunun gelişebilmesi için dokunun kan yolu ile beslenmesine gerek vardır ve bu da anjiyogenez aracılığıyla yeni kan damarları oluşturulması ile sağlanır. Damar oluşumundan sorumlu ana büyüme faktörü ise VEGF' tir. Kanser hücrelerindeki COX-2 ekspresyonu artışı ile VEGF ve fibroblast büyüme faktörünün arttığı bulunmuştur. COX-2 enzimin bu proanjiyogenik etkileri NSAI ilaçlarla inhibe edilebilmektedir ve *in vitro* ortamda hücre proliferasyonunun, migrasyonun ve vasküler tüp formasyonunun inhibe olduğu görülmüştür. NSAI ilaçların anjiyogenez üzerindeki etkileri ortama PGE₂ eklenmesi ile giderilebilmektedir. Buna uygun olarak PGE₂' nin aynı zamanda kolon kanseri hücrelerinde HIF-1 üzerinden VEGF ekspresyonunu azalttığı gözlenmiştir. EP₂ reseptörü bulunmayan hayvanlarda yapılan çalışmalarda VEGF indüksiyonunun olmadığı gözlenmiştir (24).

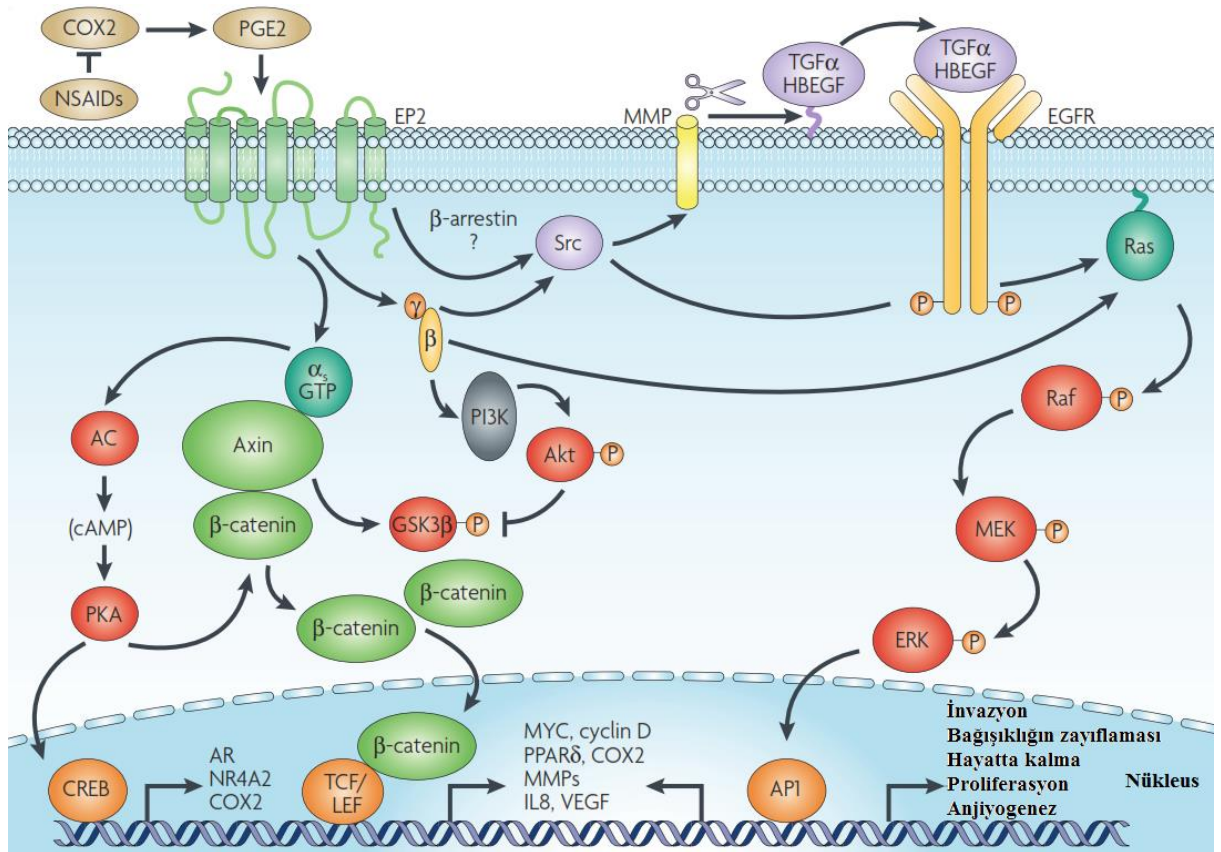
2.5.4.6. İnvazyon, Metastazis ve COX-2/PGE₂

Kanser vakalarındaki yüksek mortalitenin ana sebeplerinden biri kanser hücrelerinin dokuda invazyonla yayılması ve uzak dokulara metastaz yapmasıdır. Kanser hücresinin, metastaz için mevcut bulunduğu dokudan ayrılması, ekstrasellüler matrikse yayılması ve hareketlilik kazandıktan sonra lenf veya kan damarları aracılığıyla göç etmesi gerekir. Doğal olarak hücrenin tekrardan damardan dokuya geçerek ilgili bölgede kolonize olması beklenir. COX-2' nin ekspresyonunun arttığı kolon kanseri gibi durumlarda hücreler adeziv özelliklerini kontrol ederek ve matriks metalloproteinaz aktivitesini artırarak invazyonu sağlayabilmektedir. Bunun da PI3K sinyal yolağıyla sağlandığı düşünülmektedir; ancak PGE₂' ye bağlı invazyon ve motilitenin sağlanması için Src aracılı EGF transaktivasyonu gerekmektedir. Buna ek olarak PGE₂ tarafından, hücre hücre kontağının kaybını sağlamakla ilişkilendirilen, c-Met aktivasyonu yine EGFR üzerinden artırılmaktadır. c-Met aktivasyonu ile β -catenin'in nükleer birikimi artmaktadır, yani transkripsiyon faktörü olarak etkinliği yükselmektedir (24).

2.5.4.7. Antitümör Bağışıklık Yanıtından Kurtulma ve COX-2/PGE₂

Kanserin karakteristik özelliklerinden biri bağışıklık yanıtından kurtulma olayıdır. Normalde CD8⁺ T hücreler tümör spesifik antijenler aracılığıyla tümör hücrelerini lize edebilme yeteneğine sahiptir; ancak kanser hastalarında bu antitümör bağışıklık sisteminin çalışmadığı veya kanser hücrelerinin bir şekilde bundan kaçtığı düşünülmektedir. PGE₂'nin immün sistemi üzerindeki modülatör etkilerinden yola çıkarak indüklenmiş COX-2 üretimine bağlı COX-2/PGE₂ sinyalinin bu olayda rol oynayabileceği düşünülebilir. PGE₂ antijen sunan dendritik hücrelerden salınan sitokinlerin düzeylerini değiştirdiği ve CD8⁺ T hücrelerinin aktivasyonunu azalttığı bulunmuştur (24).

2.6. PGE₂'NİN, β -CATENİN ve GSK3 β İLE İLİŞKİSİ



Şekil 2.6. PGE₂'nin EP₂ reseptörü üzerinden kanserdeki etki mekanizması (57)

PGE₂ reseptörlerinden EP₂, G α_s aracılığıyla adenilil siklazın aktivitesini ve dolayısıyla hücre içi cAMP düzeyini artırır. cAMP bağımlı PKA aktive olur ve CREB fosforilasyonu artar. Kolon kanseri hücrelerinde PGE₂, β -catenini artırır. PGE₂'nin EP₂'ye bağlanması ile sadece α ünitesi değil $\beta\gamma$ ünitesi de sinyali iletir ve PI3K üzerinden protein kinaz B'yi

(Akt) uyarır. G α s ünitesi, G-protein sinyalleme bölgesi (RGS) aracılığıyla aksine bağlanır ve aynı zamanda Akt' yi PKA aracılığıyla uyarır. Aksine bağlanma sonrasında kompleksten GSK3 β salınır ve GSK3 β , Akt tarafından fosforillenerek inaktive edilir (58). Böylece, β -catenin GSK3 β tarafından fosforillenerek yıkılması önlenir ve hücre içindeki miktarı, hücre çekirdeğine gidişi ve transkripsiyon faktörü olarak etkisi artırılmış olur. CREB ile amfıregülin (AR), nükleer reseptör protein alt aile 4 grup A üye 2 (NR4A2), COX-2; β -catenin ile MYC, siklin D, peroksizom proliferatörleri ile aktive olan reseptör delta (PPAR δ), COX-2, MMPs, interlökin-8 (IL-8), VEGF ekspresyonu artırılmış olur. EP₂ aynı zamanda Src üzerinden matriks metalloproteinazları çalıştırarak membrandan, TGF α ' nın ve AR' nin hücre membrandan salınmasını sağlar. AR ve TGF α , EGFR' ye bağlanarak sırasıyla Ras, Raf, MEK, ERK aktivasyonunu sağlar ve API aracılığıyla ekspresyonu artırarak hücrede proliferasyon, bağışıklık yanıtının baskılanması, hücrenin hayatta kalması, invazyon, anjiyogenez gibi olaylara aracılık eder (57). Dolayısıyla kanser tedavisinde önemli bir hedef konumunda olabilir.

EP aktivasyonu ile karsinogenezin hızlanması EGFR, PKC ve bir transkripsiyon faktörü olan β -catenin ile ilişkilendirilmiştir. β -catenin onkogen olarak fonksiyon gösterdiği düşünülmektedir. β -catenin üretiminin artışı ile hücre çoğalmasının hızlandığı görülmüştür. Ortamda Wnt bulunmadığı durumda GSK-3 β , β -catenini devamlı fosforiller ve fosforillenen β -catenin hücre içinde yıkılır ve belli bir miktarın altında kalır. Wnt Fz' ye (frizzled) bağlandığında, reseptörü dishevelled (Dsh), membrana yerleşir. GSK3 β , Fz tarafından aktifleştirilen Dsh ile inhibe edilir. Böylece β -catenin ortamda miktarı artar ve çekirdeğe giderek fonksiyon gösterir (7). β -catenin önemli bir aktivatörü PGE₂' dir ve bu etkisini nöroblastoma hücresi SH-SY5Y' de yapılan çalışmalarda EP₁, EP₂ ve EP₄ reseptörleri aracılığıyla gösterdiği düşünülmektedir. PKA, fosfolipaz C, fosfatidilinozitol 3 kinaz, PKC aktivasyonunun bu etkide önemli rol oynadığı düşünülmektedir (8).

2.7. *Zingiber officinale*

Zingiber officinale veya diğer adıyla zencefil, tropik-sub tropik Zingiberacea ailesinden gelmektedir. Kökeni Güney Doğu Asya' ya dayanır ve Dünya' nın pek çok köşesinde kültürü yapılan bir bitkidir. Tarihte hem baharat olarak hem de tıbbi amaçlarla kullanılmıştır. Zencefil çok yıllık bir bitkidir, kökü yumru şeklindedir, gövdesi diktir, etrafı yapraklarla çevrilmiştir ve 0,6-1 m kadar uzunluğa erişir. Kökü taze, kurutulmuş toz, dilimlenip şuruba katılmış, kristalize şeker halinde veya çaya aroma katma gibi

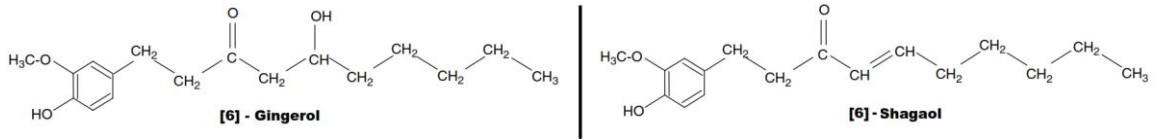
şekillerde tüketilmektedir. Pek çok ülkede, özellikle Hindistan ve Çin’ de taze zencefil sebze ve et yemeklerinde baharat olarak kullanılır. Toprak altında kalan kök kısmı ise Asya, Hindistan ve Arap ülkelerinde antik çağlardan beri tıbbi amaçlarla kullanılmıştır. Çin’ de 2500 yılı aşkın bir süredir, baş ağrısı, bulantı ve soğuk algınlığında kullanılmıştır. Batı ülkelerinde ise artrit, romatolojik durumlar ve kas rahatsızlıklarında kullanılmaktadır. Bu özelliklerinden ve enflamatuvar rahatsızlıklardaki etkilerinden dolayı Amerika ve Avrupa’ da takviye gıda olarak pazarlanmıştır. Güney Doğu Asya ülkelerinde yaygın olarak kullanımından dolayı bu bölgede yaşayan insanlarda kolon, gastrointestinal, prostat, meme ve diğer kanser türlerinin görülme sıklığı batı ülkelerinde yaşayanlara göre daha azdır. Bitkinin içinde bulunan fenolik bileşiklerin kansere karşı koruyucu etkileri *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir. Bu bileşiklerin, hücre transformasyonunu, proliferasyonunu ve enflamasyonunu baskıladığı; aynı zamanda anjiyogenez ve metastaz üzerinde etkileri olduğu düşünülmektedir. Zencefilde bulunan aktif bileşikler genel olarak, antienflamatuvar, antimutajen ve antioksidan özelliklere sahiptir (59).

Zencefilin ağızda ve burunda bıraktığı hisse bakılarak uçucu ve uçucu olmayan şekilde iki ana grupta kimyasal içerdiği söylenebilir (59).

Uçucu yağlar. seskiterpen hidrokarbonlardan zingiberen (% 35), kurkumen (% 18) ve farnesen (% 10) bileşimindedir. Bisabolon ve b-seskielandren daha az düzeydedir ve az miktarda olmak üzere 40 çeşit monoterpenoid hidrokarbonları barındırır. Bunlara 1,8-sineol, linalol, borneol, neral ve geraniol örnek olarak verilebilir. Bu uçucu yağlar özellikle zencefilin tadına ve aromasına katkıda bulunmaktadır (60).

Uçucu olmayan bileşenler. arasında gingerol, shogaol ve ağızda sıcaklık hissi yaratan zingeron gibi biyoaktif moleküller bulunur. Gingeroller kimyasal olarak birbirlerinin homologlarıdır ve dallanmamış alkil zincirlerinin uzunluğuna göre tanımlanmaktadırlar. Buna ek olarak shogaoller bir seri homolog bileşiklerden oluşur ve gingerollerin dehidrate formlarıdır. Kurutulmuş zencefilin keskin tadından sorumlu olanlar bunlardır. Paradol ise gingerole benzer yapıdadır ve shogaolun hidrojenasyonu ile oluşur (60).

Bu iki ana fraksiyon dışında zencefil, ekstrakte edilebilen oleorezinler, yağlar, mum, karbonhidrat, vitamin ve mineraller gibi yapılar barındırır. Ayrıca potent bir proteolitik enzim olan zingibain içerir (60).



Şekil 2.7. 6-gingerol ve 6-shogaol moleküler yapı (59)

Zencefilin tıbbi amaçla kullanılan kısmı köküdür. İçermiş olduğu gingeroller 6-gingerol, 8-gingerol ve 10-gingerol şeklindeyken; shogaoller aynı şekilde 6, 8 ve 10 şeklinde bulunurlar. Zencefil kökünden elde edilen moleküller *in vitro* ve hayvan deneylerinde denenmişlerdir. İnotropik, antitrombotik, antioksidan, antimigren, antilipidemik, antiemetik gibi farmakolojik özellikleri bulunmaktadır. Aynı zamanda tükürük, safra ve gastrik salgılarını artırmaktadır (60).

Antiemetik etki, zencefil içindeki gingerol ve shogaolun bu etkiden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Etki mekanizması ise ne nystagmus yanıtına ne de vestibüler stimülasyona bağlıdır. Çoğu antiemetiğin santral sinir sistemi üzerindeki etkisinin aksine, zencefilin etkisinin lokal olarak gastrointestinal sistem üzerinde olduğu düşünülmektedir (60).

Antienflamatuvar etki, özellikle COX ve 5-lipoksijenaz inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak lökotrien ve prostaglandin sentezi azalmaktadır (60).

Diğer etkiler, barsak tonusu ve peristaltik hareketliliği artırmaktadır. Bağışıklık sistemini uyarmakta ve plateletlerin agregasyonunu inhibe etmektedir (60).

Klinik faz çalışmaları, zencefilin en çok yol tutması, postoperatif bulantı, kusma, osteoartrit ve gastrointestinal motilite üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Kurutulmuş zencefil kökü içeren Zintona preparatı yaklaşık 1470 kişinin katıldığı çalışmada yol tutması etkisini gözlemek için yolculuktan önce insanlara 500 mg dozunda verilmiştir ve yol tutmasında etkili olduğu görülmüştür. Benzer bir çalışma çocuklarda tekrarlanmış ve zencefilin dimenhidrata göre daha etkin olduğu görülmüş, yan etkiler ise daha az oluşmuştur. WS 1540 preparatı zencefilin kurutulmuş köklerini içermektedir ve gastrointestinal motiliteyi artırdığı yapılan klinik çalışmalarla tespit edilmiştir. Eurovita eskre 33 ise osteoartritte denenmiş ve ibuprofene göre ağrıyı azaltma ve hareketliliği artırma açısından daha düşük etkili; plaseboya göre ise daha yüksek etkili bulunmuştur. Postoperatif bulantı açısından ise metoklopramid ile karşılaştırmalı olarak araştırmalar

sonucunda zencefil grubunda bulantı ve kusma insidansının daha az olduğu görülmüştür (61).

Zencefil komisyon E tarafından özellikle iştah kaybı, yol tutması ve dispepsi şikayetlerinde kullanılmak üzere onaylanmıştır. Halk arasında buna ek olarak astrenjan, ekspektoran ve karminatif olarak da kullanılmaktadır. Çin tıbbında soğuk algınlığı, bulantı, kusma ve nefes darlığı tedavisinde kullanılmaktayken; Hint tıbbında anoreksiya, dispepsi semptomları ve farenjit tedavisinde kullanılır (60).

Gebeliğe bağlı sabah bulantısında kullanımı komisyon E tarafından kontraendike ilan edilmiştir. Safra asidi salınımını artırdığından safra taşı olanlarda ve aynı zamanda tromboksan sentaz inhibisyonu yaptığından hemoraji riski taşıyan hastalarla antikoagülan tedavi alanlarda kullanılmamalıdır (60).

Tavsiye edilen dozlarda verildiğinde herhangi bir yan etki oluşmadığı görülmüştür; ancak günlük 6 g kadar verilen zencefilin gastrik ülser riskini artırabileceği düşünülmektedir. Hipersensitivite reaksiyonuna bağlı olarak dermatit görülebilmektedir (61).

Toksisite çalışmalarına göre zencefilde bulunan 6-gingerol ve 6-shogaolün LD₅₀ değeri 250 ve 680 mg/kg arasındadır. Çok yüksek dozlarda kardiyak aritmi ve santral sinir sistemi depresyonu oluşturmaktadır. Normalde antiemetik olarak günlük 0,5-2 g, dispepsi için 2-4 g, taşıt tutması için yolculuktan 30 dk önce 1g, romatoid artritte ise 1-2 g kurutulmuş kök şeklinde kullanımı önerilmektedir. (61).

2.8. *Curcuma longa*

Curcuma longa (sinonim *Curcuma domestica*) veya zerdeçal Hindistan' da çok eski bir geçmişe sahiptir ve Ayurvedik tıbbın önemli bir parçasıdır. Bundan dolayı hint safranı olarak adlandırılır. Çok yıllık bir bitkidir. Hindistan dışında Çin, Tayvan, Japonya, Endonezya gibi ülkelerde yaygın olarak kültürü yapılsa da; zerdeçal ihtiyacı uluslararası olarak Hindistan tarafından karşılanmaktadır. Zencefil gibi Zingiberaceae ailesine aittir ve Çince' de zerdeçala sarı zencefil de denmektedir (62).

Halk arasında sindirim sistemine yardımcı olmak için koleretik olarak kullanılmaktadır. Hindistan' ın Ayurvedik farmakopesinde, Japonya' nın bitkisel ilaçlar kodeksinde ve Çin' in farmakopesinde resmi olarak yer alan bir bitkidir. Batı' da özellikle sindirim sisteminden kaynaklı gaz, şişkinlik, iştah kaybı gibi rahatsızlıklarda ve karminatif olarak

kullanılır. Topikal olarak ülsere, yaralara, ekzemaya ve enflamasyonlu bölgeye; taze sıkılmış su şeklinde veya toz halinde olmak üzere pek çok şekilde kullanılabilir. Ayurvedik tıpta ise antienflamatuar ve antiartritik etkilerinden dolayı kullanılmaktadır. Hatta COX inhibitörlerinin daha ucuz, daha az yan etkili ve doğal bir formu olduğu düşünülmektedir (62).

Zerdeçal kökleri parmak şekilli ve çoğunlukla yumru görünümüne sahiptir, yaklaşık 1,2 m boyundadır. Toprak altı gövdesi suda kaynatılıp, 5-10 dk güneşte kurutulduktan sonra elde edilen preparatları aktiftir ve % 3' ten daha az disinnamoilmetan türevi (bunlar kurkumin olarak hesaplanır) içermemektedir (63).

İçerik. a ve b- turmeron, a-kurkumen, zingiberen gibi uçucu yağ özelliğine sahip seskiterpenleri % 3 ile 7,2 arasında içermektedir. % 3 ile 5 arasında kurkuminoidleri barındırır ve bunlar arasında en çok bulunanı kurkumindir. Bunun dışında mineral, vitamin, karoten, jelatinize nişasta ve polisakkaritler ihtiva etmektedir (63).

Etkiler. komisyon E tarafından koleretik etkinliğinin deneysel olarak gösterildiği belirtilirken; kolesistokinetik ve anti enflamatuar amaçlarla kullanılabilir (63).

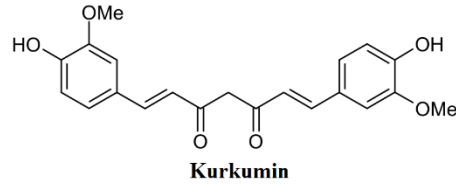
Zerdeçal antienflamatuar ve sitotoksik etkilere sahip bir bitkidir. İçeriğindeki kurkumin, ortamdaki prostasikline dokunmadan antitrombotik etkiler göstermektedir. Eterli ekstresi ise trombositlerdeki araşidonik asit kaynaklı platelet agregasyonunu inhibe etmiştir. Ayrıca deneysel olarak antioksidan, antimutajen ve antikanser etkileri görülmüştür. Topoizomeraz I ve II inhibitörü özelliği göstermektedir. Antihepatotoksik ve antibakteriyel etkileri bulunmaktadır (62).

Kullanım. komisyon E tarafından özellikle dispepsi durumlarında kullanımı onaylanmıştır. Almanya standart lisansı ise zerdeçalın çay infüzyonu olarak bu şikayet için kullanılmasını önermektedir. Çin farmakopesinde göğüs ve karın ağrısında kullanımının faydasından bahsedilmektedir (62).

Safra yolu tıkanıklıklarında kullanımı tavsiye edilmemektedir. Bilinen yan etkileri ve ilaç etkileşimleri yoktur ve gebelikte kullanılmaması gerekmektedir. Kurutulmuş kökü 1,5-3 g düzeyinde oral olarak ve infüzyon halinde kullanılabilir (63).

Kurkuminin A549 akciğer kanseri hücrelerinde yapılan çalışmalar doğrultusunda COX-2 ve mPGES-1 protein ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. IL-1 β ile indüklenen A549

hücrelerinden ultrasantrifüj ile mPGES-1 elde edilmiş ve PGE₂ oluşum reaksiyonunu katalizleyen mPGES-1' in kurkumin tarafından IC₅₀ 0,2-0,3 µmol/L düzeyinde olacak şekilde inhibe edildiği bulunmuştur.



Şekil 2.8. Kirkumin Moleküler Yapı (64)

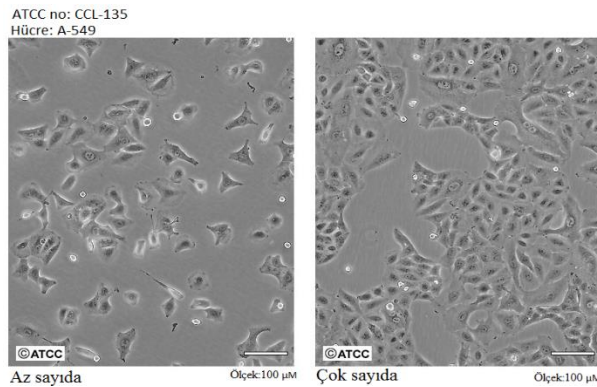
Kendisiyle karşılaştırılan resveratrol, koniferil alkol, eugenol, rosmarinik asit gibi moleküler açıdan kurkuminle yakın ilişkili moleküllerin mPGES-1 inhibisyonu yapmadığı gözlenmiştir. Aynı çalışmada LPS ile muamele edilen insan tam kanı testinde COX-2 aracılı PGE₂ oluşumu kurkumin tarafından azaltılmıştır. COX-2/PGE₂ sinyalinin kanserdeki rolü düşünüldüğünde kurkuminin antikanser ve antienflamatuar etkisinin mPGES-1 inhibisyonuna dayanabileceği sonucuna varılmıştır (64).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. A549 HÜCRE HATTI HAKKINDA BİLGİ

A549 hücreleri adenokarsinomik insan alveoler bazal epitel hücreleridir. İlk kez 1972 yılında D. J. Giard ve arkadaşları tarafından 58 yaşındaki erkek hastanın akciğer kanseri dokusundan izole edilmiştir. Yaklaşık 1000 jenereasyon boyunca kültüre edilmişler ve hücrelerin ölümsüz olduğu sonucuna varılmıştır. Hücre yüksek miktarda lesitin ve doymamış yağ asidi sentezleme yeteneğine sahiptir ve hücrenin fosfolipit membranı kaynağını bunlar oluşturmaktadır (65).

Hücreler tek yüzeyde yapışarak çoğalmaktadır ve ikiye katlanma zamanı yaklaşık olarak 22 saattir.



Şekil 3.1. A549 hücrelerinin görünümü (66)

3.1.1. A549 hücrelerinin temin edilmesi ve bakımı

A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (CCL-185) hücresi ATCC' den satın alınmıştır. Bir adet kreo tüp içinde gelen (59681573) hücre 1ml' lik dondurma çözeltisi

içinde $9,6 \times 10^5$ sayıdadır ve üretici tarafından dondurulmadan önce % 94,6 canlılıktadır. ATCC' den çıkışında hücre 80. pasajındadır. ATCC tarafından önerilen besiyeri, F12K besin karışımı içeren Kaighn modifiyeli Ham (Gibco 21127)' dir. Besiyeri içerisinde L-glutamin bulunduğundan komple besiyeri hazırlarken haricen L-glutamin konmamıştır. Besiyeri karışımına Kaighn F12 % 89, FBS (Biochrom S 0415) % 10, penisilin streptomisin (sigma P4333) % 1 oranında karıştırılmıştır. FBS' ye ısı ile inaktivasyon işlemi yapılmamıştır. Besiyerleri 50 ml' lik porsiyonlar şeklinde günlük taze şekilde ihtiyaç duyulacak kadar hazırlanmıştır. Hücre çalışmaları sırasında sınıf II biyolojik materyal kabin (Safe Fast Elite) içinde steril bir şekilde çalışılmış ve inkübatörle (New Brunswick 170R) beraber kabinin bakımları düzenli bir şekilde yapılarak kontaminasyon riskinin en az düzeye indirilmesine çalışılmıştır. Çalışma boyunca hücrelerde kontaminasyona rastlanmamıştır.

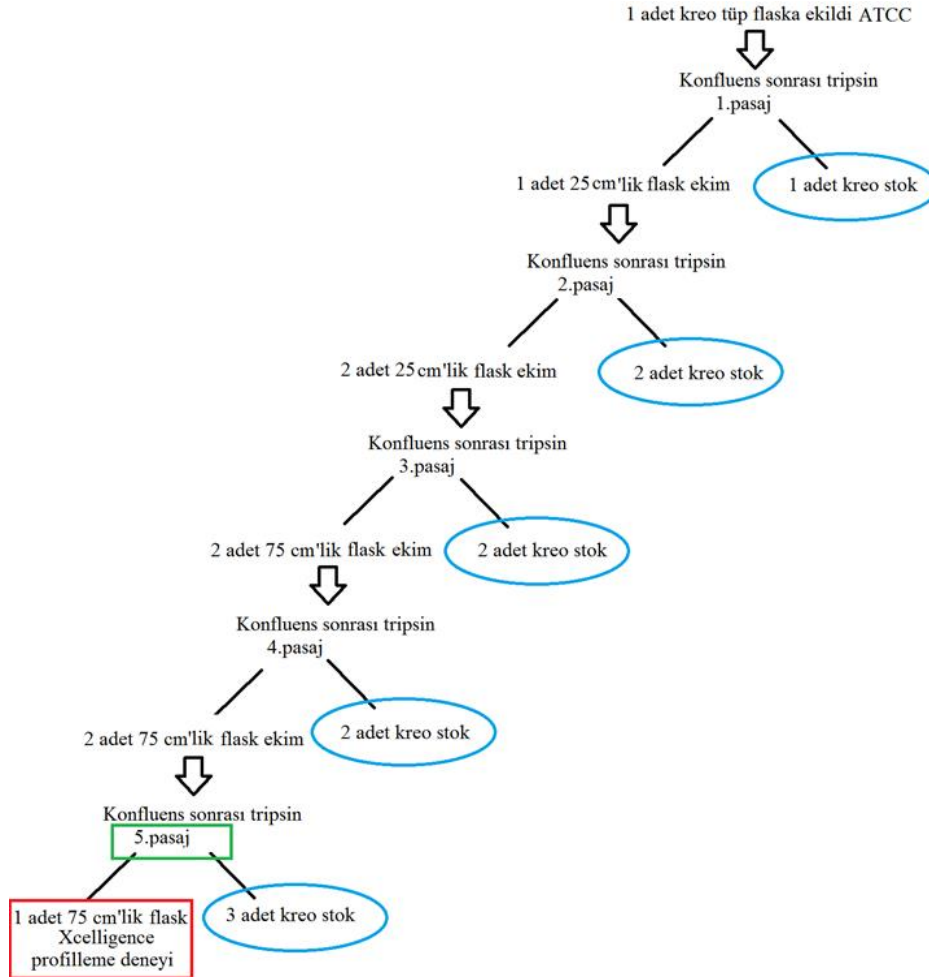


Şekil 3.2. Hücre kültüründe kullanılan temel cihazlar

a. Sınıf II kabin, b. CO₂ İnkübatör, c. Flask, besiyeri ürünleri, d. Steril pipet gibi sarf ürünleri

A549 hücreleri 37°C' lik su banyosunda çözüldükten sonra firma tavsiyesine göre 1:10 şeklinde komple besiyeri ile dilüe edilmiştir. Daha sonra hücre, 1000 rpm devir hızında 5 dk boyunca santrifüj edilerek kalan pellet 1 ml komple besiyerinde dağıtılarak 25 cm² lik flaska ekilmiş ve inkübatöre kaldırılmıştır. Deneylere başlamadan önce hücrelerin her pasajından farklı sayıda stok alınarak dondurulmuştur. 5. pasaj hücrelerle Xcelligence GZHA deneyi hücre büyümesi profili çıkarılmış ve deneylerde kullanılacak hücre sayısı,

besiyeri miktarı, deney sürelerinin uzunluğu gibi konularda fikir sahibi olunmaya çalışılmıştır.



Şekil 3.3. Hücre pasajlama şeması

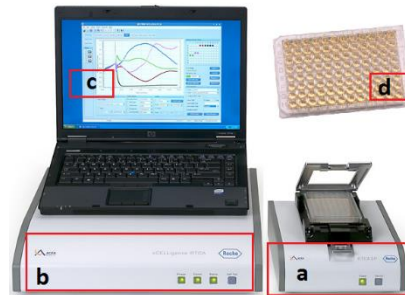
3.2. GZHA BÜYÜME PROFİLİ DENEYİ

Nanopartikül sitotoksosite araştırmaları genel olarak MTT temelli deneyler üzerinde yürütülmektedir. Hücre empedansı ölçümüne dayanan GZHA kolorimetrik prensiplere dayalı sitotoksosite testlerinin dezavantajlarına sahip değildir. Deney esası, yapışan tipteki hücrelerin mikroelettrot kaplı yüzeye yapıştıklarında empedansta meydana getirdikleri değişimin ölçülmesine dayanmaktadır. Bu da herhangi bir boya ve kimyasal kullanmadan hücrelerin mevcut durumu hakkında gerçek zamanlı olarak bilgi edinilmesini sağlamaktadır. Ölçümlerle toksik maddeye maruz kalan hücrenin yapışkanlığı, proliferasyonu ve morfolojisi üzerinde fikir sahibi olunması sağlanır (67).

GZHA, 96' lık altın plaka, cihaz istasyonu ve analiz ünitesi olarak üç ana bileşene sahiptir. 96' lık e-plaka karbondioksitli inkübatörde bulunan cihaz istasyonuna elektronik olarak bağlanmaktadır. Cihaz istasyonu inkübatör dışında bulunan analiz ünitesine bağlıdır. Sistemden e-plate' ye sabit akımlı elektrik sağlanmaktadır ve her bir mikro kuyudaki empedans değişimi bireysel olarak sistem analiz ünitesinde 10 kHz, 25 kHz ve 50 kHz olarak üç farklı frekansta okunmaktadır. Ölçülen empedans (Z), $Z = R + jX$ formülüyle otomatik olarak analog parametresine, rezistansa (R) dönüştürülmektedir (68). Bu formülde X, reaktansı; j ise gözlemsel bileşeni temsil eder. Rezistans daha sonra analiz ünitesi aracılığıyla hücre endeksi (CI) olarak adlandırılan birimsiz bir değere çevrilir. Hücre endeksi ise aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır (68).

$$CI = \max_{i=1, \dots, N} \left[\frac{R_{cell}(f_i)}{R_b(f_i)} - 1 \right]$$

Formüldeki $R_{cell}(f_i)$ değeri, hücreler yüzeye bağlandığı anda mikroeletrodun frekansa bağımlı direnciyken, $R_b(f_i)$ ise elektroda hiç hücre bağlanmamışken ölçülen dirençtir. N ise ölçüm alınan frekans noktalarıdır. Burada $N=3$ tür. $R_{cell}(f_i)$ ve CI değeri birbiriyle doğru orantılıdır. Dolayısıyla $R_{cell}(f_i)$ değerindeki artış daha büyük CI oluşmasına sebep olurken; doğal olarak düştüğünde de CI azalır. CI' daki artış, hücre sayısının, adezyonunun veya yaygınlığın artışından kaynaklanmaktadır. CI' daki azalma ise hücre ölümünden veya tutunan hücrelerin morfolojik değişimlerinden dolayı daha az yaygın olmasından kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla deneydeki yorum CI üzerinden yapılmaktadır. MTT deneylerindeki gibi test bileşiğinin uygulandığı kuyuların CI değeri kontrol CI' sına bölünerek % canlılık gibi bir sonuca varılabilmektedir (68).



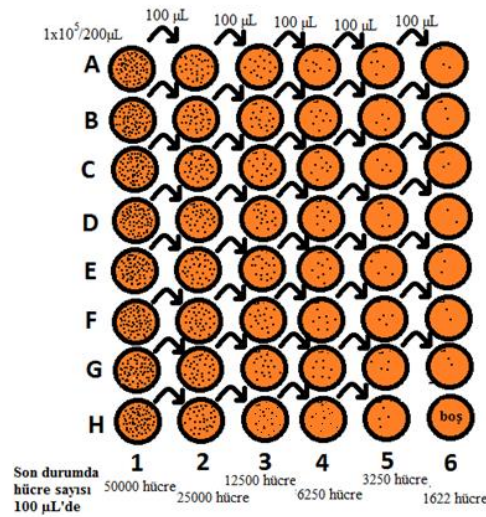
Şekil 3.4. Xcelligence bileşenleri

a. Cihaz istasyonu, b. Analiz ünitesi, c. Bilgisayarlı yazılım, d. E-plaka

Deney Grupları:

* 50.000 – 25.000 – 12.500 - 6250 - 3125 - 1622 hücre içeren kuyular

A549 hücrelerinin 5. pasajında öncelikle GZHA kullanılarak profillemeye deneyi yapılmıştır. Hücrelerin istenilen sayıda çoğaltılmasından sonra, sayımları için tripan mavisi metodu ile çalışan Innovatis Cedex Xs cihazı kullanılmıştır. Elde edilen hücre sayısı/ml verilerine dayanarak hücreler 8 tekrarlı olarak 50.000 hücre, 25.000 hücre, 12.500 hücre, 6250 hücre, 3125 hücre, 1622 hücre sayılarında e-plakanın her bir kuyucuğuna 100 μ L hacminde ekilmiştir. Ekim için plakanın solundan sağına doğru 100 μ L hacmindeki mikro pipetle hücrelere seri dilüsyon uygulanmıştır. Kuyular arasında aktarım yapılırken, pipetajla homojen karışım elde edilmesi sağlanmıştır. Besiyerinden kaynaklanan hücre endeksi değişiminin kontrolü için hücre içermeyen besiyeri kuyusu kontrol olarak kullanılmıştır. GZHA yazılımı aracılığıyla her 15 dk' da bir hücre endeksi ölçülecek ve 50 saat boyunca devam edecek şekilde cihaz kurulmuştur. Hücre büyüme profili elde edildikten sonra deney sonlandırılmıştır.



Şekil 3.5. GZHA için hücre ekim şeması

Öncelikle 2,3,4,5,6 nolu sütunlarda kuyuların tamamına 100 μ L besiyeri konmuştur. 1 nolu kuyulara $1 \times 10^5/200 \mu\text{L}$ olacak şekilde hücreler ekilmiştir. 1' den 2' ye bu hücrelerin 100 μ L' si aktarılmıştır. Daha sonra 2' den 3'e 100 μ L aktarılmıştır. Bu şekilde 6. sütuna kadar devam edilmiştir. 6H' ye hücre içermeyen komple besiyeri eklenmiştir.

3.3. DENEY GRUPLARI VE IL-1 β İLE mPGES-1 İNDÜKSİYONU

mPGES-1 enziminin mRNA' sı, A549 ve HeLa hücrelerinde yüksek derecede eksprese edilirken; plasenta, uterus ve testis hücrelerinde ise orta düzeyde eksprese edilmektedir. A549, özellikle IL-1 β ile COX-2 enzimi indüklenmiş halde bir hücre modeli olarak kullanılmaktadır ve IL-1 β varlığında çoğalmaya devam edebilmektedir. IL-1 β ile mPGES-1 enziminin indüklendiği ve mPGES-1' in de kanser için potansiyel bir hedef

olduğu bilinmektedir (69). IL-1 β ' nın fibroblast hücrelerinde sadece mPGES-1' i indüklediği, mPGES-2 ve cPGES düzeylerini değiştirmedeği düşünülmektedir (70).

MTT, GZHA sitotoksisite, western blot, qRT-PCR deneylerinin yapılabilmesi için öncelikle A549 hücrelerinin IL-1 β ile indüksiyonu yapılmıştır. Deneyler hem IL-1 β uygulanarak mPGES-1 enzimi indüklenmiş hücrelerde hem de IL-1 β uygulanmamış hücrelerde yapılmıştır.

Deney Grupları:

*** A549 hücresi (mPGES-1 indüklenmemiş halde), A549IL1 β (-) olarak ifade edilecektir.** IL-1 β uygulanmayan hücrelerdir.

*** IL-1 β ile A549 hücresinde mPGES-1'i indüklenmiş grup, A549IL1 β (+) olarak ifade edilecektir.**

A549 hücrelerinin 5. pasajı stoktan alınmış ve 37°C' lik su banyosunda buz kristalleri yok olana kadar bekletilerek çözülmüştür. Kreolar standart olarak 1 ml dondurma çözeltisinde dondurulduğundan, dimetil sülfoksit (DMSO) toksisitesini azaltmak için 9 ml komple besiyeri içine yavaşça eklenmiştir. Böylece donma sırasında % 5 olan DMSO oranı % 0.5' e düşürülmüştür. Daha sonra hücreler santrifüj ile çöktürülmüş ve DMSO içeren besiyeri atıldıktan sonra 1 ml taze besiyeri ile süspande edilmiş ve 75 cm²' lik flaska 10 ml besiyeri ile beraber ekilmiştir. Hücreler flask içinde % 80-90 doluluğa ulaştıktan sonra sayım yapılarak 2 ayrı 75 cm²' lik flaska 2.5 x 10⁶ sayıda olacak şekilde bölünmüştür. Bu hücrelere öncelikle komple besiyeri içinde yapışmaları için 24 saat kadar süre verilmiştir. Aynı gün, IL-1 β (Biovision 4128-10) 10 μ g steril distile suda çözülmüştür ve 1 ng/ μ L olacak şekilde porsiyonları hazırlanarak -20°C' de stoklanmıştır. Hücreler yapıştıktan sonra flaskların üzerinden eski besiyerleri atılmış ve IL-1 β uygulaması yapılacak olan grup üzerine IL-1 β konsantrasyonu 1 ng/ml olacak şekilde 10 ml besiyeri konmuştur ve A549IL1 β (+) grubu olarak işaretlenmiştir. İndüksiyon yapılmayan hücrelerin flaskına ise IL-1 β içermeyen komple besiyeri konarak A549IL1 β (-) grubu oluşturulmuştur. İndüksiyonda her iki grup için de % 2 FBS içeren komple besiyeri kullanılmıştır. Hücreler inkübatöre kaldırılarak 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda her iki grubun flaskları üzerinden % 2' lik FBS içeren besiyeri uzaklaştırılmış ve tripsinize edilerek hücre sayım cihazında sayılmışlardır. Buradan elde edilen verilere dayanarak hücreler MTT ve GZHA gibi canlılık deneyleri ve qRT-PCR mRNA izolasyonu için 96' lık plakalara, western blot için 6' lık plakalara,

PGE₂ miktarı ölçümü için 24' lük plakalara dağıtılmıştır. Ekilecek hücre sayısına GZHA profillemeye deneyinden elde edilen veriler kullanılarak karar verilmiştir.

3.4. MTT CANLILIK DENEYİ GENEL DOZ TARAMA ve IC₅₀ BELİRLEME

Hücre kültürü modelleri bileşiklerin hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini veya doğrudan sitotoksitesini görmek için sıkça kullanılmaktadır. Canlılık testlerinin esası, hücre tipinden bağımsız olarak deney sonucunda kaç adet hücre kaldığına dayanmaktadır. MTT, WST-1, tripan mavisi, alamar mavisi, SRB gibi pek çok metod bu amaçla kullanılmaktadır. Genel olarak hücrenin yaşamsal fonksiyonları üzerinden ölçüm yapılan bu metodlardan MTT, mitokondrial aktivite üzerinden hücre canlılığının saptanmasında kullanılmaktadır (71). MTT pozitif yük taşıdığından hücre içine doğrudan penetre olabilme yeteneğine sahiptir. Canlı hücrelerde metabolik faaliyetler devam ettiğinden MTT molekülü hücre içinde formazana dönüştürülmekte ve formazan 570 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir. Hücreler öldüğündeyse, MTT' yi formazana çevirebilme yeteneğini kaybettikleri için ve canlı hücrenin bulunmadığı kuyucuklarda renk oluşması beklenmemektedir. MTT molekülü NADH veya ona benzer bir redükleyici ajandan elektron transfer edilmesiyle formazana dönüşmektedir. Eski literatüre göre spesifik mitokondriyal enzimler aracılığıyla MTT' nin redüklendiği düşüncesi (72), MTT' nin hücredeki mitokondriyal enzimlerin fonksiyonunu ölçtüğü şeklinde yanlış bir inanişe yol açmıştır (73).

Formazan tuzu hücreler içerisinde ve hücre yüzeyine yakın bölgelerde çözünemeyen bir yapı olarak kalmaktadır. Bu çözünmeyen kristallerin çözünebilir hale getirildikten sonra absorbansının ölçülmesi gerekmektedir. Formazanı çözmek, rengi kalıcı hale getirmek, buharlaşmayı azaltmak ve fenol kırmızısı ile etkileşimi önlemek için farklı metodlar kullanılabilir. Asidik izopropanol, DMSO, dimetilformamid, sodyum dodesil sülfat (SDS) veya deterjan kompleksi gibi çözücüler bunun için uygundur (74).

MTT eklenmesinden hemen sonra bazı hücrelerde fizyolojik değişimler oluşabilir. MTT hücre proliferasyonunu değil hücre metabolik aktivitesini ölçen bir yöntemdir ve hücre proliferasyonu ile karıştırılmamalıdır. MTT toksisitesi hücrelere eklenen MTT konsantrasyonuna bağlı olarak görülür. Dolayısıyla MTT konsantrasyonu ayarlanarak toksisite minimum düzeye getirilebilir. Aynı zamanda ortamda meydana gelen formazan kristali de hücre membranını parçalayarak toksik etki gösterebilir.

MTT sonuçları, test ürünü uygulanmış kuyuların absorbansının, test ürünü uygulanmamış olanlara (kontrol) bölünmesi ile değerlendirilmekte ve % canlılık üzerinden yorum yapılmaktadır. Sigma plot gibi programlar kullanılarak eğer canlılıktaki düşüş konsantrasyona bağlı şekilde yeterince düzgün gerçekleşmiş ise tutarlı bir IC₅₀ değeri hesaplanabilmektedir. Bu değer ilacın etkin konsantrasyonu olarak yorumlanmaktadır ve ileride yapılacak moleküler çalışmalarda doz belirlenmesi için bir göstergedir.

Genel Doz Tarama için Deney Grupları:

- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde sadece besiyeri uygulanmış grup (Kontrol grubu)
- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde kurkumin 100 μ M uygulanmış grup (Pozitif kontrol)
- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M 100 μ M, 1000 μ M gingerol uygulanmış grup (Gingerol grubu)
- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M 100 μ M, 1000 μ M shogaol uygulanmış grup (Shogaol grubu) olmak üzere toplamda 96 kuyu,

GZHA hücre analizi deney sonuçlarına göre 96' lık bir plakaya 12.500 hücre dağıtılmasının uygun olacağına ve 200 μ L' lik bir besiyeri ortamının bu sayıdaki hücre için 48 saat boyunca ve belki daha fazla yeterli olduğu kanaatine varıldığından hücre ekimine bu veriye uygun olarak devam edilmiştir.

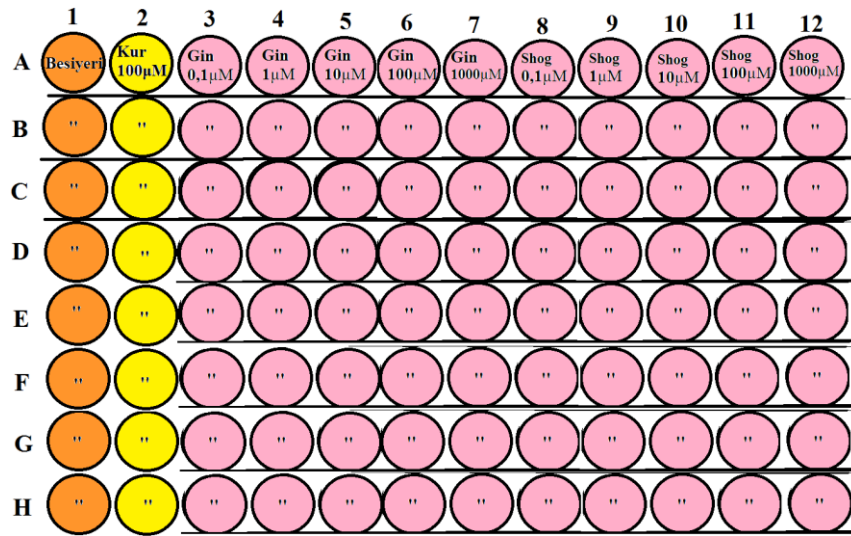
A549 hücrelerinde 6-gingerol ve 6-shogaol için logaritmik dozlarda tarama yapılmıştır. Moleküllerin IC₅₀ değeri hücre tipine göre değişiklik göstermektedir ve deneylerin yürütülmesinde ilk aşamayı oluşturmaktadır.

Kurkumin, gingerol ve shogaol için stok konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Kurkumin (Merck 820354) öncelikle 0.1 M stok olacak şekilde % 100 DMSO içinde çözülmüştür. Tüm deneyler için kurkumin stoğu her zaman taze bir şekilde ilaç uygulanacağı gün hazırlanmıştır. 6-gingerol (Sigma G1046) 10 mg' ın tamamı 0,1 M olacak şekilde % 100' lük DMSO' da çözülmüştür. Daha sonra porsiyonlanarak -20°C' ye kaldırılmıştır. 6-shogaol (Fluka 39303) 10 mg için, 6-gingerole yapılan işlemlerin aynısı yapılmıştır. 6-gingerol katı, 6-shogaol ise sıvı halde ve her ikisi 10 mg kadar olduğundan maddelerden kayıp olmaması için DMSO' daki çözünürlükleri göz önünde bulundurularak maddelerin tamamı tek seferde çözündürüldükten sonra porsiyonlanarak deneylere başlanmadan önce -20°C' ye kaldırılmıştır. 6-gingerol ve 6-shogaol porsiyonları ise dondurulduğundan tüm

deneyler için çalışma sabahı çözündürülmüş ve ihtiyaç duyulan konsantrasyonlarda besiyeri ile seyreltilmiştir.

Hücrelere 3.3. bölümünde belirtildiği gibi hücrelere IL-1 β ile mPGES-1 indüksiyonu yapıldıktan sonra 96' lık plakaların her bir kuyucuğunda 12.500 hücre/100 μ L olacak şekilde % 10' luk FBS içeren komple besiyeri içerisinde dağıtım işlemi yapılmıştır. İndüksiyon yapılmayan hücreler de aynı hücre sayısında plakalara dağıtılmıştır.

Hücreler dağıtıldıktan sonra flask yüzeyine tutunmaları için 1 gece beklenmiş ve çalışma sabahı, pozitif kontrol olarak kurkumin, 0.1 M stoktan 100 μ M olacak şekilde komple besiyeri ile dilüe edilmiştir. 6-gingerol ve 6-shogaol için, 0.1 M stoktan 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M 100 μ M, 1000 μ M konsantrasyonları elde etmek için komple besiyeri ile dilüsyon yapılmıştır. Plakalarda bulunan eski besiyeri atılmış sonrasında moleküller 100 μ M hacminde yukarıda belirlenen konsantrasyonlarda 8 tekrarlı olarak uygulanmıştır. Kontrol grubuna ise 8 tekrarlı olarak sadece besiyeri uygulanmıştır. Test molekülleri ile 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.

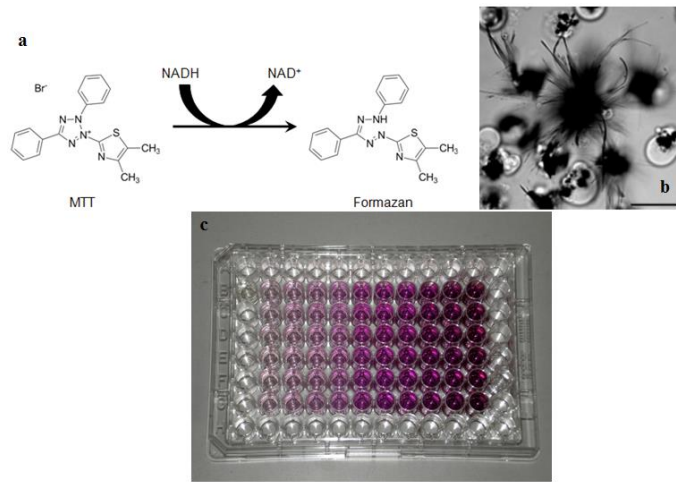


Şekil 3.6. MTT genel doz tarama ekim

1 nolu sütuna kontrol olarak besiyeri, 2 nolu sütuna Kurkumin, 3-7 nolu sütuna Gingerol, 8-12 nolu sütuna Shogaol 8 tekrarlı olarak eklenmiştir. Her kuyuda 12.500 hücre bulunmaktadır.

MTT solüsyonu 5 mg/ml olacak şekilde PBS' de (Sigma D8662) çözölmüştür. Sonrasında steril filtreden geçirilmiştir. İlaçlarla 24 saat inkübe olan hücrelerin üzerinden besiyeri uzaklaştırılmış ve 90 μ L taze besiyeri eklenmiştir. Sonrasında 5 mg/ml MTT stoğundan her kuyucuğa 10 μ L eklenerek kuyuların son hacmi 100 μ L' ye ve MTT solüsyonu ise 0.5 mg/ml konsantrasyona düşürölmüştür. Bu işlemten sonra plaka, çalkalama cihazında 5 dk inkübe edilerek MTT' nin besiyeri ile karışması sağlanmıştır. Hücrelerin MTT ile 4

saat boyunca inkübe olmaları sağlanmıştır ve sonrasında MTT' li besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin metabolik faaliyetleri sonucunda oluşan formazan tuzunun çözünmesi için % 100' lük DMSO' dan her bir kuyucuğa 100 μ L eklenmiştir. Mikroplaka okuyucu (Biotek Synergy HT, Gen5) kullanılarak absorbans 570 nm' de okunmuştur. Canlılık sonuçları sadece besiyeri uygulanan kontrol grubuna bölündükten sonra % canlılık olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.7. MTT deneyi

a. Formazan oluşumu, **b.** Formazan kristallerinin kültürdeki görünümü **c.** Okuma öncesi görünüm (96' lık plakanın en sağında canlılık yüksekken; sola doğru doza bağımlı olarak canlılık azalmış)

IC₅₀ Belirleme için Deney Grupları:

- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde sadece besiyeri uygulanmış grup (Kontrol grubu)
- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde kurkumin 100 μ M uygulanmış grup (Pozitif kontrol)
- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde 12.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M 100 μ M, 200 μ M gingerol uygulanmış grup (Gingerol grubu)
- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde 12.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M 100 μ M, 200 μ M shogaol uygulanmış grup (Shogaol grubu) olmak üzere toplamda 96 kuyu,

Genel doz tarama deneyi sonuçlarına göre etki görülen konsantrasyonlar için doz aralığı genişletilmiş ve IC₅₀ saptamak için yeniden MTT deneyi yapılmıştır. IC₅₀ saptamak için daha önce belirtilen MTT prosedürüne uyularak bu sefer, kurkumin pozitif kontrol olarak 100 μ M konsantrasyonda, 6-gingerol ve 6-shogaol ise 12.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M şeklinde stoklarından hazırlanarak ekim şemasında belirtildiği gibi 8 tekrarlı olarak uygulanmıştır. Bu deney verisine göre 6-shogaol ve 6-gingerol için IC₅₀ değeri

Systat Sigma plot programı kullanılarak hesaplanmıştır. Deneyler hem A549IL-1 β (-) hem de A549IL-1 β (+) deney gruplarında gerçekleştirilmiştir.

3.5. GZHA CANLILIK DENEYİ

GZHA için Deney Grupları:

- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde sadece besiyeri uygulanmış grup (Kontrol grubu)
- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde kurkumin 100 μ M uygulanmış grup (Pozitif kontrol)
- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M gingerol uygulanmış grup (Gingerol grubu)
- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M shogaol uygulanmış grup (Shogaol grubu) olmak üzere toplamda 80 kuyu,

MTT genel doz tarama ve IC₅₀ deneylerinde elde edilen veriler moleküller üzerinde bir ön fikir sahibi olunmasını sağlamıştır. Bu verilere dayanarak moleküllerin etkilerinin gerçek zamanlı olarak görülebilmesi amacıyla Xcelligence cihazında GZHA deneyi yapılmıştır. Hücrelerin büyüme profili 3.2. bölümünde anlatılan şekilde belirlenmiş ve böylece hücre endeksleri ve büyüme davranışları hakkında fikir sahibi olunmuştur. Moleküllerin uygulama saati de yine bu deneyden elde edilen verilerle belirlenmiştir.

Hücrelerin 5. pasajı çözülüp kültüre edildikten sonra indüksiyon işlemiyle A549IL-1 β (-) ve A549IL-1 β (+) deney grupları oluşturulmuştur. E-plaka 96 kuyucuğunun yatay olarak ilk yarısına A549IL-1 β (-) hücreleri, ikinci yarısına ise A549IL-1 β (+) hücreleri 12,500 hücre/100 μ L olacak şekilde ekilmiştir. A549IL-1 β (+) hücreleri büyüme profili izlenerek yaklaşık 23 saat sonra A549IL-1 β (+) ve A549IL-1 β (-) hücre gruplarına kurkumin 100 μ M olarak; 6-gingerol ve 6-shogaol ise 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M olarak 100 μ L hacminde uygulanmıştır. Kontrol grubuna sadece besiyeri uygulanmıştır. 6-gingerol ve 6-shogaol konsantrasyonları ise MTT deneyinden elde edilen IC₅₀ değerini içinde barındıracak şekilde seçilmiştir. Moleküller uygulandıktan sonra hücreler üzerindeki etkisi 72 saat boyunca izlenmiştir. Cihaz yazılımı aracılığıyla 24, 48, 72 sa sonundaki IC₅₀ değerleri hesaplanmış; ancak sonuçların tutarlılığı açısından 24 sa verileri kullanılmıştır. Sonuçlar deney gruplarının hücre endeksinin kontrol grubu hücre endeksine bölünüp % canlılık şeklinde elde edildikten sonra yorumlanmıştır.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	A549 (12500)	A549 (12500) Juncumin 100.00uM	A549 (12500) Gingerol 25.00uM	A549 (12500) Gingerol 50.00uM	A549 (12500) Gingerol 100.00uM	A549 (12500) Gingerol 200.00uM	A549 (12500) Shogaol 25.00uM	A549 (12500) Shogaol 50.00uM	A549 (12500) Shogaol 100.00uM	A549 (12500) Shogaol 200.00uM
B	A549 (12500)	A549 (12500) Juncumin 100.00uM	A549 (12500) Gingerol 25.00uM	A549 (12500) Gingerol 50.00uM	A549 (12500) Gingerol 100.00uM	A549 (12500) Gingerol 200.00uM	A549 (12500) Shogaol 25.00uM	A549 (12500) Shogaol 50.00uM	A549 (12500) Shogaol 100.00uM	A549 (12500) Shogaol 200.00uM
C	A549 (12500)	A549 (12500) Juncumin 100.00uM	A549 (12500) Gingerol 25.00uM	A549 (12500) Gingerol 50.00uM	A549 (12500) Gingerol 100.00uM	A549 (12500) Gingerol 200.00uM	A549 (12500) Shogaol 25.00uM	A549 (12500) Shogaol 50.00uM	A549 (12500) Shogaol 100.00uM	A549 (12500) Shogaol 200.00uM
D	A549 (12500)	A549 (12500) Juncumin 100.00uM	A549 (12500) Gingerol 25.00uM	A549 (12500) Gingerol 50.00uM	A549 (12500) Gingerol 100.00uM	A549 (12500) Gingerol 200.00uM	A549 (12500) Shogaol 25.00uM	A549 (12500) Shogaol 50.00uM	A549 (12500) Shogaol 100.00uM	A549 (12500) Shogaol 200.00uM
E	549IL1Beta 12500	549IL1Beta 12500 Juncumin 100.00uM	549IL1Beta 12500 Gingerol 25.00uM	549IL1Beta 12500 Gingerol 50.00uM	549IL1Beta 12500 Gingerol 100.00uM	549IL1Beta 12500 Gingerol 200.00uM	549IL1Beta 12500 Shogaol 25.00uM	549IL1Beta 12500 Shogaol 50.00uM	549IL1Beta 12500 Shogaol 100.00uM	549IL1Beta 12500 Shogaol 200.00uM
F	549IL1Beta 12500	549IL1Beta 12500 Juncumin 100.00uM	549IL1Beta 12500 Gingerol 25.00uM	549IL1Beta 12500 Gingerol 50.00uM	549IL1Beta 12500 Gingerol 100.00uM	549IL1Beta 12500 Gingerol 200.00uM	549IL1Beta 12500 Shogaol 25.00uM	549IL1Beta 12500 Shogaol 50.00uM	549IL1Beta 12500 Shogaol 100.00uM	549IL1Beta 12500 Shogaol 200.00uM
G	549IL1Beta 12500	549IL1Beta 12500 Juncumin 100.00uM	549IL1Beta 12500 Gingerol 25.00uM	549IL1Beta 12500 Gingerol 50.00uM	549IL1Beta 12500 Gingerol 100.00uM	549IL1Beta 12500 Gingerol 200.00uM	549IL1Beta 12500 Shogaol 25.00uM	549IL1Beta 12500 Shogaol 50.00uM	549IL1Beta 12500 Shogaol 100.00uM	549IL1Beta 12500 Shogaol 200.00uM
H	549IL1Beta 12500	549IL1Beta 12500 Juncumin 100.00uM	549IL1Beta 12500 Gingerol 25.00uM	549IL1Beta 12500 Gingerol 50.00uM	549IL1Beta 12500 Gingerol 100.00uM	549IL1Beta 12500 Gingerol 200.00uM	549IL1Beta 12500 Shogaol 25.00uM	549IL1Beta 12500 Shogaol 50.00uM	549IL1Beta 12500 Shogaol 100.00uM	549IL1Beta 12500 Shogaol 200.00uM

Şekil 3.8. GZHA e-plaka ekim

Şemada e-plaka görülmektedir. Plakanın üst 40 kuyucuğuna A549 hücreleri A549IL-1 β (-) ve alt 40 kuyucuğuna ise A549IL1 β (+) hücre grubu her kuyuya 12.500 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 1. sütuna kontrol olarak besiyeri, 2 nolu sütuna kurkumin, 3-6. sütunlara gingerol ve 7-10. sütunlara shogaol 25,50,100,200 μ M ekilmiştir.

3.6. LOWRY İLE PROTEİN MİKTAR TAYİNİ VE WESTERN BLOT DENEYİ

Protein blotlama 1970' lerin sonuna doğru kullanılmaya başlanmıştır. Bir takım özel antikorlar kullanılarak proteinlerin saptanması için kullanılmaktadır. Yöntemde kompleks bir protein karışımı elektroforez ile birbirinden ayrılmakta, bir membrana aktarılmakta ve daha sonra radyoetiketli antikorlar aracılığıyla proteinler işaretlenmektedir. Bu yöntem temel olarak işaretleme ve hibridizasyon mantığına dayanmaktadır. Yöntemin DNA için geliştirilene Southern blotlama, RNA için geliştirilene Northern blotlama ve protein için olanına da Western blotlama ismi verilmiştir. Metod ile proteinler membrana doğrudan uygulanarak dot blotlama yapılabilirken; mikro ölçekli protein sekanslama ve aminoasit analiz tekniklerinin gelişmesinin katkısıyla, karışımlar içindeki protein bileşimi saflaştırılabilmekte ve birbirinden ayrıştırılabilmektedir (75). Metoda, proteinleri molekül büyüklüğüne bağlı olarak ayırıştırma (elektroforez), katı bir desteğe/membrana aktarma (transfer), proteini uygun primer ve sekonder antikorlar ile işaretleme ve sonrasında görüntüleme olmak üzere dört ana işlem uygulanmaktadır (76).

Yöntemde kullanılan protein karışımı için hücrelerin içinde bulunan tüm proteinlerin ekstre edilip lizat olarak hazırlanması gerekir. Bu işlem, proteinlerin denatüre olarak kaybını önlemek için soğuk bir ortamda ve proteaz inhibitörlerinin varlığında yapılmalıdır. Dokular hücrelere göre daha kompleks yapılar olduğundan homojenizasyon

gibi mekanik bir yöntemle önce öğütülmeli ve gerekiyorsa protein ekstresini elde etmek için sonikasyon yapılmalıdır (76).

Western Blot için Deney Grupları:

- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde sadece besiyeri uygulanmış grup (Kontrol grubu)
- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde kurkumin 100 μ M uygulanmış grup (Pozitif kontrol)
- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde 40 μ M, 80 μ M, 160 μ M, 320 μ M gingerol uygulanmış grup (Gingerol grubu)
- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde 30 μ M, 60 μ M, 120 μ M, 240 μ M shogaol uygulanmış grup olmak üzere toplamda 24 adet kuyu,

Ölçülen parametreler: β -catenin, GSK3 β , p-GSK3 β , mPGES-1, β -actin proteinleri

Moleküllerin MTT ve GZHA canlılık deneyi sonuçlarına göre elde edilen IC₅₀ verileri ışığında western blot deneyinde kullanılacak konsantrasyonlara karar verilmiştir. Moleküllerin etki mekanizmasının anlaşılabilmesi için β -catenin, GSK3 β , p-GSK3 β , mPGES-1 protein miktarlarında meydana getirdiği değişiklikler araştırılmıştır. Normalizasyon amacıyla β -actin kullanılmıştır.

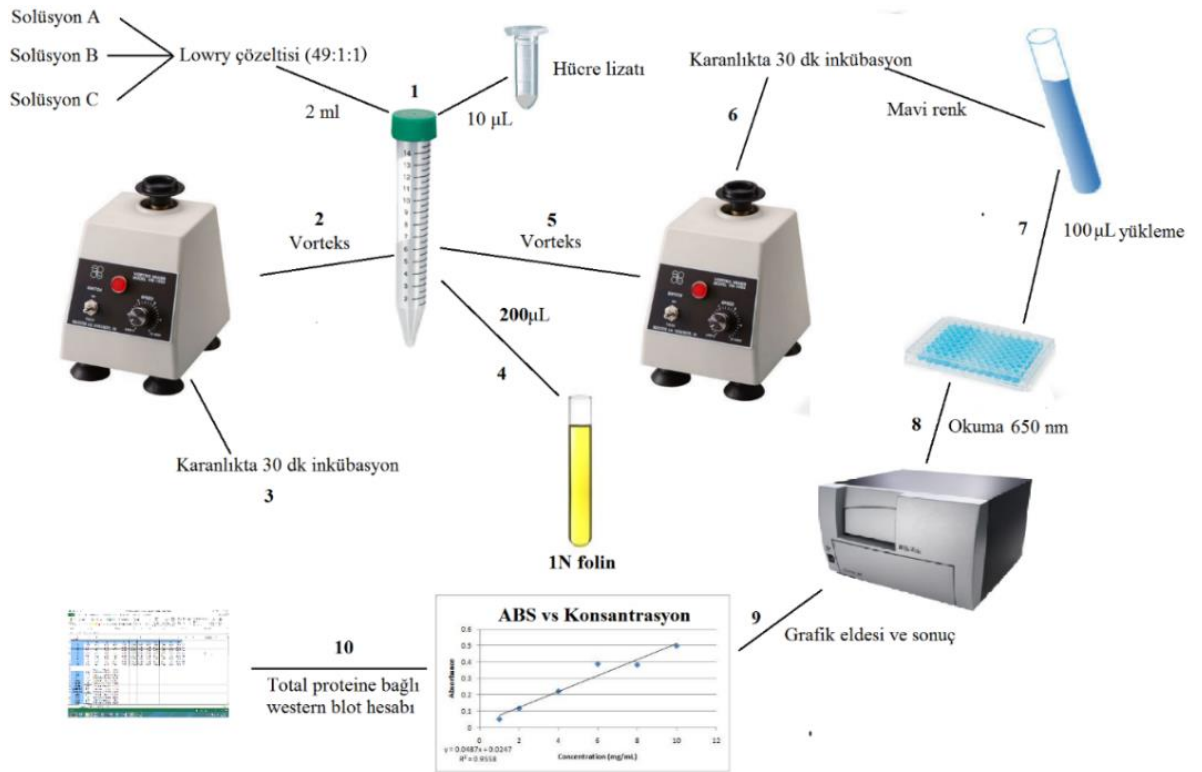
3.3. bölümünde anlatılan şekilde A549IL-1 β (-) ve A549IL-1 β (+) deney grupları oluşturulmuştur. Western blot deneyinde protein izolasyonu gerektiğinden hücreler her kuyuda 1 x 10⁶ hücre/1 ml olacak şekilde 6' lık plakalara ekilmiştir. Hücrelerin yüzeye tutunması beklendikten sonra eski besiyeri uzaklaştırılmış ve kurkumin 100 μ M; gingerol 40, 80, 160 ve 320 μ M; shogaol ise 30, 60, 120 ve 240 μ M olacak şekilde 1ml hacminde hücrelere uygulanmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra hücrelerden protein izolasyonu işlemine geçilmiştir.

Molekülleri içeren besiyeri ortamdan uzaklaştırılmış ve hücreler soğuk PBS ile yıkandıktan sonra hücre kazıyıcı ile plaka yüzeyinden kazınarak alınmış ve çöktürülen hücre pelletinin üzerine protein izolasyonunu sağlayan ripa çözeltisinden (Santa Cruz sc-24948) 100 μ L eklenmiştir. Ripa çözeltisi proteinlerin yıkılmasını önleyen proteaz inhibitörü, fenil metil sulfonil florür (PMSF), sodyum ortovanadat (Na₃VO₄) ve aynı zamanda hücrenin parçalanmasına yardımcı olan yüzey aktif ajanlar içermektedir. Çözeltide 970 μ L ripa tamponu, 10 μ L PMSF, 10 μ L Na₃VO, 10 μ L proteaz inhibitörü eklendikten sonra hücreler pipetajla çözelti içinde dağıtılmışlar ve bu aşamadan sonra

lizatlarla ilgili her türlü işlem buz altında veya +4°C altında yürütülmüştür. Hücreler ultrasonikatör yardımıyla sonike edildikten sonra mikrosantrifüj cihazında +4°C' de 15.000 rpm' de 10 dk santrifüj edilmiş ve proteinlerin süpernatantta toplanması sağlanmıştır. Süpernatant iki ayrı porsiyon halinde 0,5 mL' lik ependorflara aktarılmıştır. 100 µL' lik lizatların toplam protein düzeyleri ise Lowry yöntemiyle ölçülmüştür. Kalan lizatlar ise -80°C' de dondurulmuşlardır.

Lowry metodu ile protein ölçümü için kullanılacak çözeltiler günlük taze olarak hazırlanmıştır. Solüsyon A için Na₂CO₃ (14,30g/100mL) ve NaOH (2,85g/100 mL), solüsyon B için Cu₂SO₄ (14,2mg/1mL), solüsyon C için C₄H₄Na₂O₆ (20mg/1mL) kullanılmıştır. B ve C' den 500' µL' şer, A' den ise 49 mL oranıyla Lowry çözeltisi karışımı yapılmıştır ve manyetik karıştırıcıda (Heidolph mr hei-standart) çalkalanarak homojen hale getirilmiştir. 15 mL' lik santrifüj tüplerine 2 mL Lowry çözeltisi konmuş ve üzerine 10 µL hücre lizatından eklenmiştir. Vorteks cihazı (Wise Mix) ile karıştırıldıktan sonra 30 dk boyunca karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. 2 N Folin çözeltisi (Sigma F9252) 1:1 distile su ile karıştırılarak 1 N Folin çözeltisi hazırlanmış ve süre sonunda her santrifüj tüpüne 200 µL eklenmiştir. 30 dk kadar karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Protein standardı olarak 1.25 µg/µL, 2.5 µg/µL, 5 µg/µL ve 10 µg/µL konsantrasyonlarında sığır serum albümin (BSA) kullanılmıştır. Protein standartlarına örneklerle aynı anda yukarıda anlatılan işlemler yapılmıştır. İnkübasyonlar bittikten sonra tüm örnekler 96' lık plakaya yüklenmiştir ve 650 nm dalga boyunda oluşan mavi renklerin absorbansı ölçülmüştür. Protein standartlarından elde edilen doğru denklemi kullanılarak her örnekteki toplam protein miktarı hesaplanmıştır.

Örneklerdeki toplam protein konsantrasyonunu belirlenerek her bir örnekten eşit miktarda protein alınması sağlanmıştır. Toplam protein ölçümü, western blot deneyinde bulunan jelin her bir kuyusuna eşit miktarda protein yüklenmesine olanak sağladığından, deney için önemli bir aşamadır (76).



Şekil 3.9. Lowry metoduyla protein tayini

Lowry deneyi sonucuna göre her örneğin protein konsantrasyonu $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ cinsinden bulunmuştur. Bu hesap kullanılarak western blot analizi için her kuyuya yüklenecek proteine göre hücre lizatından alınması gereken hacim bulunmuştur ve western blot aşamasına geçilmiştir. Western blot için çözeltiler aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır.

Jel Çözeltileri.

* Yığınlama jeli çözeltisi 4X (0.5 M Tris % 0,4 SDS pH 6.8) için, 3.0275 g Tris baz (Fluka 93349), 0.2 g SDS (Sigma L3771) bir miktar distile suda çözöldü daha sonra 50 mL' ye tamamlandı. pH' ı 6,8' e ayarlandı.

* Ayırma jeli çözeltisi 4X (1.5 M Tris % 0.4 SDS pH 8.8) için, 9.09 g Tris baz, 0.2 g SDS bir miktar distile suda çözöldükten sonra 50 mL' ye tamamlandı. pH' ı 8.8' e ayarlandı.

* SDS çözeltisi % 10 için, 10 g SDS bir miktar suda çözöldü ve 100 mL' ye tamamlandı.

* % 30 Akrilamid-poliakrilamid çözeltisi için, 29 g akrilamid (Sigma 01696) ve 1 g bis akrilamid (Applchem A3636) bir miktar suda çözöldü ve daha sonra 100 mL' ye tamamlandı.

* % 10 Amonyum persülfat (APS) çözeltisi, 100 mg APS (Fluka A3678) tartılarak 1 mL distile su içinde çözüldü ve taze olarak hazırlandı.

* Tetrametil etilen diamin (TEMED) (Sigma T9281), hazır olarak satın alınmıştır.

Western blotta örnekler belli bir por büyüklüğüne sahip jel sistemine yüklenmekte ve elektroforezle bu jel içerisinde proteinler elektriksel alan varlığında birbirinden ayrıştırılmaktadır. Jel sistemi ise ayırıcı (seperating) ve yığınlama (stacking) olarak iki ayrı jelden oluşur. Üstte bulunan yığınlama jeli asidik (6.8) pH' dadır ve akrilamid konsantrasyonu düşüktür, dolayısıyla porları büyük bir jeldir. Örneklerin jele uygulanabilmesi için kuyulara sahiptir. Kuyu oluşmasını sağlayan taraklar ise genelde 10 adet kuyu içerir; ancak farklı tipleri de mevcuttur. Kuyu sayısı bir seferde analiz edilebilecek örnek sayısını belirlemektedir. Proteinler bu jelde çok az ayrışır ancak; daha çok göç ederler. Aynı zamanda bantların ince ve keskin şekilde ayırıcı jele geçmelerini sağlama özelliğine sahiptir. Alttaki jel ise bazik (8.8) pH' dadır ve poliakrilamid konsantrasyonu daha yüksektir. Ayırıcı jellerin porları daha küçüktür. Proteinler molekül büyüklüğüne göre birbirinden ayrışır ve küçük molekül ağırlığına sahip olanlar daha fazla sürüklenerek jelin alt kısmına kadar giderken; büyük molekül ağırlıklı olanlar jelde daha fazla tutularak daha az sürüklenirler (77).

Örnek Yükleme Tamponu,

* Örnek yükleme tamponu 6X için, 7 mL 4X yığınlama çözeltisi, 3,6 mL gliserol (Sigma G5516), 1 g SDS, çok az miktarda bromfenol mavisi (Sigma B0126) eklendi. Öncelikle diğer maddeler konuldu ve kaynama sırasında çözeltiye son olarak mavi renk katan bromfenol mavisinden çok az miktarda eklenerek renklendirme yapıldı. Örnek çözeltisi soğuduktan sonra porsiyonlanarak -20°C' de saklandı.

* β -merkapt etanol (Sigma M6250), hazır olarak satın alınmıştır. Toksik bir molekül olduğundan örnek yükleme çözeltisine son aşamada % 4 olacak şekilde eklenmiştir ve örnek yükleme çözeltisi, lizata eklenmeye hazır hale getirilmiştir.

Yükleme çözeltisinde bulunan gliserol proteinlerin kuyuların içine rahatça uygulanmasını sağlar. Bromfenol mavisi gibi bir boya protein ayrıştırılması işlemi sırasında proteinlerin ne kadar yol katettiğinin görülmesine olanak verir. Örnekler yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra ısıtılarak denatüre edilir; ancak sülfid köprüleri korunur. Proteinlerin

denatüre edilmesi ile aminoasitlerin artık kazanmış oldukları (-) yükün nötrale olmaması ve elektriksel alanda proteinin yürütülmesi sağlanmış olur.

Elektroforez çözeltisi.

* 10X yürütme çözeltisi için, 6,055 g Tris baz ve 28,82 g glisin (Sigma G8898) bir miktar suda çözöldü ve 200 mL' ye tamamlandı.

* 1X yürütme çözeltisi için, 10X yürütme çözeltisinden 100 mL alınıp üzerine % 10' luk SDS' ten 10 mL eklendi ve 1L' ye tamamlandı.

Jele yüklenen proteinler denatürasyon sırasında negatif yük kazanırlar, dolayısıyla elektroforez sırasında western blot tankına akım uygulandığında proteinler (-) yükten (+) yüke doğru hareket ederler. Akımın tank sistemi içindeki iletimi ise içinde SDS bulunan elektroforez çözeltisi sayesinde gerçekleştirilir (77).

Transfer Çözeltisi.

* 10X yürütme çözeltisinden 100 mL alınarak üzerine bir miktar suyla beraber 200 mL metanol (Merck 1060092511) eklendi ve 1L' ye tamamlandı.

Protein karışımı elektroforez ile ayrıştırıldıktan sonra jelde bulunan proteinler poliviniliden florür (PVDF) veya nitroselülozdan yapılmış bir membrana aktarılırlar. PVDF membranlar nitroselüloz membrana göre dayanıklılığı, afinitesi, mekanik olarak destek olma ve saklanabilme özelliğı daha yüksektir. Tek dezavantajı ise görüntüleme sırasında kirlilik bulunmasıdır ve bu yüzden membran iyi yıkanmalıdır.

Membran yıkama çözeltisi

* TBS için, 9 g NaCl ve 2,42 g Tris baz bir miktar suda çözöndü, 1L' ye yakın bir hacme kadar distile su ile dilüe edildikten sonra pH' ı 7,4' e ayarlandı ve 1L' ye tamamlandı. Transfer sonrasında blokajda, antikorların hazırlanmasında ve membranın ara aşamalarda yıkanmasında kullanılmak üzere Tween 20 (Sigma P2287) ile 1 µL/mL olacak şekilde karıştırılarak TBST halinde kullanılır.

Membranın yıkanması işlemi ortamdaki bağlanmamış antikorun uzaklaştırılması ve görüntüleme sırasında kirliliğın oluşmaması açısından önemlidir; ancak membran çok uzun süre yıkama halinde bırakılırsa antikorlardan elde edilen ışıma azalacaktır (78).

TBST aynı zamanda blokaj çözeltisi, primer ve sekonder antikor çözeltilerinin hazırlanması gibi aşamalarda çözücü olarak kullanılabilir.

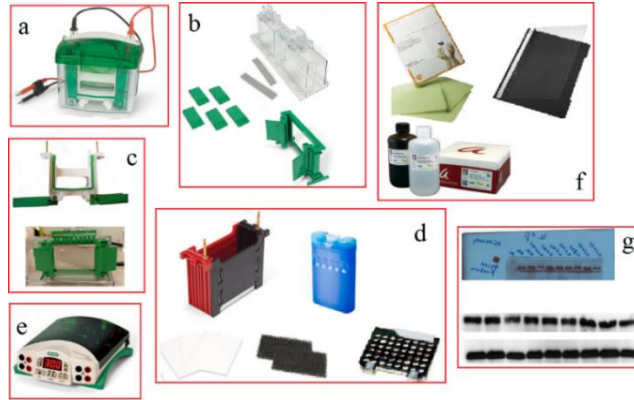
Blokaj çözeltisi

500 mg yağsız süt tozu (Sigma 70166) 10 mL TBST içinde çözülmüştür ve % 5' lik blokaj çözeltisi elde edilmiştir.

Transfer sırasında proteinlerin bant halinde ayrılmasından dolayı membran üzerinde protein içermeyen boşluklar oluşur. Boşlukların giderilebilmesi ve antikorların bu bölgelere bağlanmasının önlenmesi için spesifik olmayan proteinler kullanılır. Bu işleme blokaj denir ve en çok BSA ile yağsız süt tozu proteininin % 5' lik çözeltileri kullanılır. Süt tozu ucuz olduğundan daha çok tercih edilmektedir. Blokaj sayesinde görüntüleme sırasında kirlilik oluşumunun azaltılması mümkündür.

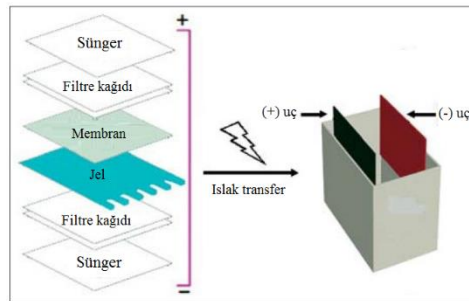
Western blot aşamaları

Western blot deneyleri Biorad Tetracell miniprotean (Şekil 3.10.) cihazında yapılmıştır ve firmanın önerdiği formüle göre jel dökülmüştür. Araştırılan tüm proteinler için ayırıcı jel % 10, yığınlama jeli ise % 5 akrilamid oranında dökülmüştür. Biorad western blot aparatının kullanım kılavuzuna göre %10' luk jel tablo 3.1' deki bileşenler kullanılarak hazırlanmıştır. Ayırıcı ve yığınlama jeli iki ayrı tüpte hazırlanmıştır. Tüpler içine distile su, akrilamid/bis, jel ve SDS çözeltisi karıştırılmış, son olarak jelin donmasını sağlayan APS ve TEMED eklenmesinin ardından hızlı bir şekilde camlar arasına ayırıcı jel dökülmüştür. Jelin hava ile temasını kesmek ve üst yüzeyini düzeltmek için 1 mL 1-bütanol (Sigma B7906) yavaşça eklenmiştir. Jelin donması beklendikten sonra butanol dökülmüş ve camlar arasındaki jel distile su ile yıkanarak butanol iyice uzaklaştırılmıştır. Kaba filtre kağıdı ile jel yüzeyi kurulanmış ve hızlı bir şekilde yığınlama çözeltisine APS ile TEMED eklenip ayırıcı jel üzerine yığınlama çözeltisi dökülmüştür. Tarak yerleştirilerek kuyuların oluşması için jel polimerleşmeye bırakılmıştır. Tarakta toplam 10 adet kuyu bulunmaktadır. Dolayısıyla bir jelde maksimum 10 yükleme yapılabilir. Jel, duruma göre ya western blot yapılacağı gün taze olarak hazırlanmış veya bir gün öncesinden hazırlanarak gerekli koruma koşullarına uyularak +4°C' de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.10. Western blot aparatları

a. Tank, b. Jel dökme, c. Elektroforez, d. Transfer, e. Güç kaynağı, f. Görüntüleme, g. Bantlar



Şekil 3.11. Transfer sandviç modeli (76)

Tablo 3.1. Jel dökme formülü

%	Distile su (mL)	Akrilamid/Bis (mL)	Yığınlama/Ayırıcı Jel çözeltisi (mL)	%10 SDS (mL)
5 (Yığınlayıcı)	5,7	1,7	2,5	0,1
10 (Ayırıcı)	4,1	3,3	2,5	0,1

Ayırıcı jel için, %10 APS: 50 µL TEMED: 5 µL Yığınlama jeli için, %10 APS: 50 µL TEMED: 10 µL

Jeller hazırlandıktan sonra hücre lizatlarından western blot için örnek hazırlama işlemine geçilmiştir. Birbirinden farklı deneylerde olmak üzere β -catenin (92 kDa) proteini için kuyulara 20, 30, 50 µg; GSK3 β (46 kDa) ve p-GSK3 β (46 kDa) için 50 µg, mPGES-1 (16 kDa) için 20, 30, 50 µg düzeyinde protein yüklenmiştir. Hücre lizatlarından hesaplanan miktarlar ependorf tüp içerisinde sonra örnek yükleme çözeltisiye karıştırılmıştır. Isıtıcı kuru blokta (Bioer) proteinler 95°C’ de 5 dk boyunca ısıtılarak denatüre edilmiş ve (-) yükle yüklenmişlerdir. Sonrasında ependorflar buza gömülerek 10 dk boyunca dinlenmeye bırakılmıştır. Bu 10 dk’ lık sürede jeller elektroforez aparatı içine yerleştirilmiş ve elektroforez çözeltisiyle tank doldurulmuştur. Tarak çıkarılarak kuyulara yükleme işlemine başlanmıştır. Western blot deneyi için deney grupları her zaman aşağıdaki sırayla yapılmıştır. İlk kuyuda her zaman geniş aralıklı markır (Santa cruz sc-2361) bulunmaktadır (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Western blot kuyuları yükleme şeması

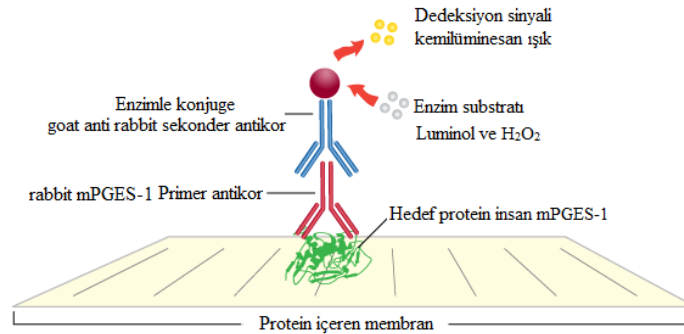
1.kuyu	2.kuyu	3.kuyu	4.kuyu	5.kuyu	6.kuyu	7.kuyu	8.kuyu	9.kuyu	10.kuyu
Markır	A549IL1 β (-) kontrol	A549IL1 β (+) kontrol	Kurkumin 100 μ M	Gingerol 80 μ M	Gingerol 160 μ M	Gingerol 320 μ M	Shogaol 30 μ M	Shogaol 60 μ M	Shogaol 120 μ M

Elektroforez 80V' ta başlatılmıştır ve protein bantlarının hareketi markır ile örneklerin maviliğinden izlenerek, proteinler ayırıcı jele geçtiğinde 100V' a çıkarılmıştır. Yaklaşık 1-1,15 sa sonra bantlar jelin alt kısmına ulaşmış ve elektroforez durdurulmuştur. Jel elektroforez aparatından çıkarılmış, camlar açılmadan önce üzerindeki elektroforez çözeltisi distile su ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Sonrasında camlar açılmış ve jelin yığınlama bölümü kesilerek atılmıştır. Transfer için PVDF membran (6x8cm en,boy) kesilmiş ve 10 sn boyunca % 100 metanolde bekletilerek aktive edilmiştir. Transfer aparatına ait sünger, transfer kağıdı, jel ve membran transfer çözeltisiyle doyurulduktan sonra sandviç yapılmıştır. Aparatın siyah ucuna göre sırasıyla sünger, filtre kağıdı, jel, membran, filtre kağıdı yerleştirildikten sonra, filtre kağıdı üzerine bastırılarak jel ile membran arasında hava kabarcığı kalmamasına özen gösterilir (Şekil 3.11). Sünger konduktan sonra aparat tanka yerleştirilmiş ve transfer çözeltisi eklenmiştir. Bir önceki aşamada kullanılan elektroforez çözeltisi alınarak tekrar kullanılmak üzere +4°C' ye kaldırılmıştır. Tank bol distile su ile yıkanarak içindeki elektroforez çözeltisi durulanmıştır. Transfer çözeltisi tankın yarısına kadar doldurulmuş ve içine transfer sandiviciyle beraber buz aküsü yerleştirildikten sonra tamamına kadar transfer çözeltisi ile doldurulmuştur. 2 sa boyunca 250 mA akımda transfere bırakılmıştır. Bu süre şiddetli veya düşük şiddetli transfere göre değişebilmektedir. Transfer bitmeye yakın taze bir şekilde % 5' lik süt tozu çözeltisi TBST içinde hazırlanmıştır. Transfer süresi dolduktan sonra sandiviç açılmış ve membran ters çevrilerek 10 cm' lik cam petriye aktarılır aktarılmaz, üzerine % 5' lik süt tozu çözeltisi eklenerek 1.5 sa çalkalayıcıda blokaja bırakılmıştır. Blokaj bitmeye yakın primer antikorlar hazırlanmıştır. Birbirinden ayrı yapılan deneyler için primer ve sekonder antikorlar tablodaki gibi dilüe edilmiştir.

Tablo 3.3. Primer ve Sekonder antikor hazırlama şeması

Hayvan türü	Protein	Konsantrasyon	Çözücü	Marka
Tavşan/rabbit	β -catenin	1:2000	TBST	Sigma C2206
Tavşan/rabbit	GSK3 β	1:500	TBST	Cell Signaling 9336
Tavşan/rabbit	p-GSK3 β	1:500	TBST	Cell Signaling 9315
Tavşan/rabbit	mPGES-1	1:500	TBST	Cayman 160140
Tavşan/rabbit	β -actin	1:1000 veya 1:2000	TBST	Cell Signaling 4970
Tavşana karşı keçi/ Goat anti rabbit	Sekonder antikor	1:10.000	TBST	Jackson İmmunoresearch 111-035-144

Blokaj çözeltisi membran üzerinden uzaklaştırılır uzaklaştırılmaz, primer antikor hazırlanmış ve petri kabı parafilm ile kaplandıktan sonra +4°C' lik soğuk odadaki çalkalayıcıda (IKA KS 130) tüm gece inkübasyona bırakılmıştır. Bir gün sonra petriler +4°C odasından alınmış ve petride bulunan primer antikor bir enjektör yardımıyla tekrar kullanılmak üzere temiz bir santrifüj tüpüne aktararak +4°C' de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.12. Protein-Antikor bağlanması

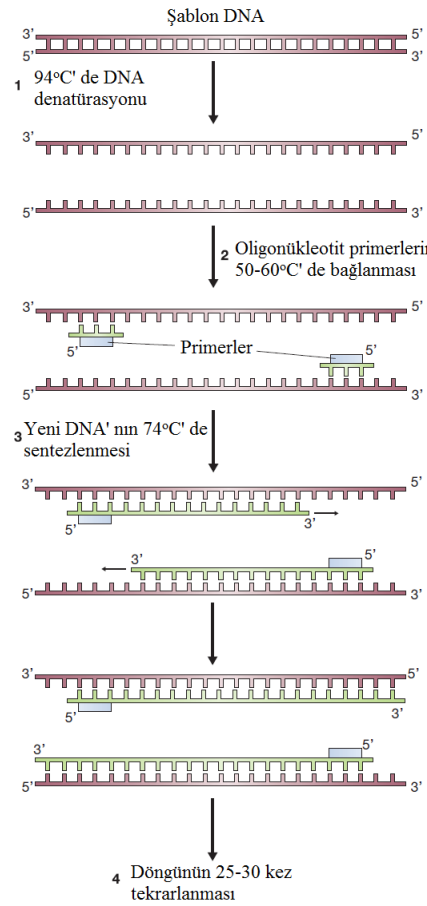
Membranın kurumasına fırsat vermeden TBST ile yıkama işlemine geçilmiş ve çalkalayıcıda 10 dk boyunca TBST ile 3 kez yıkama yapılmıştır. Yıkama bittikten sonra petrideki TBST uzaklaştırılmış ve sekonder antikor uygulanmıştır. Petri parafilm ile sarılarak çalkalayıcı üzerinde 2 sa boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda sekonder antikor petriden uzaklaştırılmış ve 3 x 10 dk boyunca TBST ile yıkama işlemi yapılmıştır. 3. yıkama içerisinde ECL çözeltisi (Santa Cruz sc-2048) 1:1 oranında 1mL olarak karıştırılmış ve görüntüleme işlemi karanlık odada yapılmıştır. Membran üzerine ECL uygulandıktan sonra maviye duyarlı röntgen ile görüntü alınmıştır. Filmin banyo işlemi ise developer ve fiksör ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bantlar Image J programı aracılığıyla analiz edilmiştir. Aynı membranda β -actin bantlarının görüntülenmesi işleminde ise görüntüledikten sonra membran 3 x 10 dk boyunca yıkanmış ve primer antikorla bir gece veya 6 sa inkübasyon, yıkama, sekonder antikor, yıkama, görüntüleme ve yazılım aracılığıyla analiz işlemleri sırasıyla diğer proteinlerdeki gibi yapılmıştır. Deney sonuçları β -actin ile normalizasyon sonrasında kontrole göre % değişim şeklinde yorumlanmıştır.

3.7. RNA İZOLASYONU VE qRT-PCR DENEYİ

PCR, DNA molekülünün istenen bölgesinin seçici bir şekilde çoğaltılması işlemidir. İstenen bölgenin DNA üzerindeki sınırları bilindiği sürece DNA' nın herhangi bir kısmı çoğaltılabilmektedir. Çoğaltma işlemi için DNA molekülünün bir zincirine oligonükleotitlerin hibritleştirilmesi gerekir. Bu oligonükleotitler reaksiyonda primer olarak kullanılırlar ve görevleri istenilen bölgelerin sınırlarını belirlemektir. Çoğaltma işlemi genellikle *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen DNA polimeraz I enzimi (Taq DNA Pol I) ile yapılmaktadır. Bu bakteri yüksek sıcaklıklarda yaşayabilen termofilik bir bakteridir. Dolayısıyla DNA polimeraz dahil bakteri enzimlerinin tamamı PCR reaksiyonunun gerçekleştirildiği yüksek sıcaklıklarda bile aktivitesini korur, denatüre olmazlar (79).

Bir PCR deneyindeki temel basamaklara aşağıda yer verilmiştir (80):

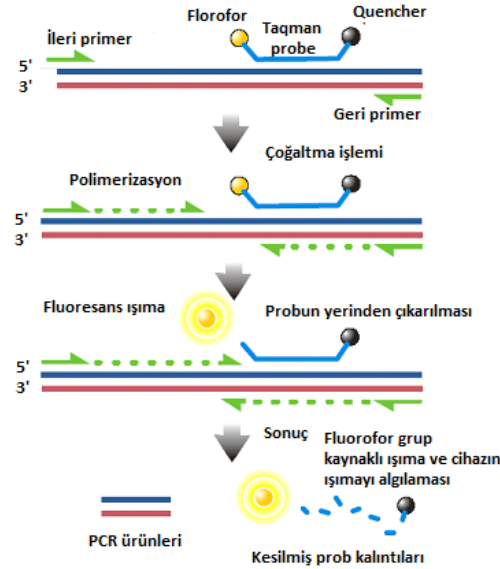
- * Karışımın sıcaklığı 94°C' ye çıkarılır. Bu sıcaklıkta ikili sarmal DNA molekülünü bir arada tutan hidrojen bağları kırılır ve molekülün denatüre olması sağlanır.
- * Karışım 50-60°C' ye soğutulur. Her bir molekülün iki ipliği bu sıcaklıkta birbiriyle tekrar birleşir; ancak birçoğu birleşmez; çünkü karışım, spesifik pozisyonlarda DNA moleküllerine bağlanan oligonükleotit ya da primer denilen çok fazla kısa DNA molekülleri içermektedir. Dolayısıyla hibritleşme olayı birbirinden ayrılmış olan uzun DNA' lar arasında olmak yerine; uzun DNA' lar ile primerler arasında meydana gelir.
- * Sıcaklık 74°C' ye çıkarılır. Bu sıcaklık karışımda bulunan Taq DNA polimeraz için optimum çalışma sıcaklığıdır. Taq DNA polimeraz her bir primer ucuna bağlanır ve kalıp DNA molekülüne komplementer olan yeni DNA ipliklerini sentezler. Başlangıçtaki iki DNA yerine artık 4 adet istenen DNA bölgesi meydana gelir.
- * Sıcaklık tekrar 94°C' ye çıkarılır. Bununla dört adet DNA ipliği oluşumu ile biten döngüden sonraki döngü başlar ve denatürasyon, bağlanma, sentez, denatürasyon aşamalarının 25 kez veya daha fazla tekrarlanmasından sonra başlangıçtaki iki DNA molekülünün hedef bölgesi yaklaşık 50 milyon kadar sayıda kopyalanır. DNA kopyası 2ⁿ şeklinde artmaktadır.



Şekil 3.13. PCR döngüsünde yer alan aşamalar (79)

Gerçek zamanlı yani qRT-PCR' da DNA çoğaltılması işleminin mekanizması PCR' daki gibi olmakla birlikte kullanılan cihazlar daha farklıdır ve bu yöntem aracılığıyla DNA hem çoğaltılmakta hem de aynı zamanda miktarı ölçülebilmektedir. Dolayısıyla kantitatif bir metoddur. Bu işlem her döngü sonrasında PCR ürününe entegre edilen fluoresans işaretçiler kullanılmasıyla mümkün olmaktadır. Fluoresans ışımının çokluğu eksponansiyel çoğaltma sırasında ortamda bulunan PCR ürünüyle (amplikonla) doğru orantılıdır. Fluoresans işaretçiler çoğaltma işlemi sırasında çift zincirli DNA veya primerlere entegre olabilmektedir. Bunlara, örnek olarak hidroliz (Taqman) prob verilebilir. Prob DNA polimerazın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesine göre çalışır. Polimeraz enzimi DNA' yı çoğaltma işlemi sırasında probu bağlanmış olduğu bölgeden kesip çıkarmaktadır. DNA üzerine bağlı olduğunda, probun 3' ucunda bulunan quencher bölgesi ışımaya oluşmasını önler; kesildikten sonra quencher etkisinden kurtulan ve 5' ucunda yer alan florofor sayesinde ışımaya oluşur. Çoğaltma işlemi süresince fluoresans

ışımadaki değişim, hem termal döngü sağlama hem ölçüm yapma özelliğinin bir araya getirildiği qRT-PCR cihazlarında yapılmalıdır (79, 80).



Şekil 3.14. qRT-PCR hidroliz prob ışıma mekanizması

Eğer başlangıçta ortama konan hedef DNA fazla miktarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir ışıma doğal olarak daha erken bir döngüde alınacaktır. Eğer DNA miktarı az ise bu durumda ışıma daha ileri döngülerde algılanacaktır. Işımanın algılandığı nokta eşik değer ve algılandığı döngü sayısı da eşik değer döngüsü (C_t) olarak tanımlanmaktadır. C_t ortamda meydana gelen reaksiyon sonucunda oluşan floresans ışıma miktarının eşik değerini aşması ile elde edilebilir. Dolayısıyla bu eşik değer bir önceki satırda değinildiği gibi çok çabuk aşılabiliyorsa PCR reaksiyonu başlatılırken ortama hedef DNA' lardan fazla miktarda konmuş demektir. C_t ile ortama ilk konan DNA miktarı ters orantılıyken, elde edilen ışıma miktarı ile ortama ilk konan DNA miktarı doğru orantılıdır (79, 80).

Western blot ile DNA' nın son ve fonksiyonel ürünü olan proteinlerin miktarı ölçülebilenken; qRT-PCR ile proteinlerin üretiminde görevli mRNA düzeyleri ölçülebilmektedir. Bunun için hücrelerden veya dokudan total mRNA elde edilmesi gereklidir. Hücrelerden RNA elde edilmesi işlemi Triazol ve hücre parçalama kitleri ile yapılabilmektedir. RNA ortamdaki ribonükleazlar tarafından kolayca parçalandığından bu kitlerin içinde RNAaz inhibitörleri bulunur ve buna ek olarak çalışma sırasında kontaminasyon sorununa dikkat etmek gerekmektedir. Western blottaki mantıkla, hücrelerden elde edilen total RNA karışımı içinden belli miktarda RNA alınarak oligo ve

random primerler varlığında konvansiyonel PCR ile bu mRNA' lara komplementer olarak sentezlenen cDNA' lar üretilebilir. cDNA sentezi revers transkriptaz enzimi sayesinde yapılabilmektedir. Bilindiği gibi revers transkriptaz enzimi RNA virüslerinin DNA sentezi yaparak konakçı DNA' sına entegre olması işleminde ilk aşamadır ve virüslerin yaşam döngüsünde elzemdir. mRNA karışımından elde edilen cDNA' lar hücrede bulunan tüm mRNA' lar tek tek şablon alınarak üretildiğinden bir cDNA karışımı halindedir ve örneğin mPGES-1 cDNA' sı da diğer tüm protein cDNA' ları ile beraber bu karışım içindedir. PCR sisteminde ortama herhangi bir DNA şablonu eklenerek çoğaltılması mümkün olduğundan, bu mRNA' lardan elde edilen cDNA karışımı qRT-PCR' da kullanılabilir. Spesifik primerler kullanılarak sadece istenilen cDNA' ların seçici olarak çoğaltılması ve kantitatif olarak ölçülmesi qRT-PCR sistemi ile mümkün kılınmıştır. Ölçümü yapılan cDNA' lardan yola çıkarak dolaylı olarak mRNA düzeyleri hakkında yorum yapılabilmektedir. Normalizasyon ise western blottaki gibi β -actin, GAPDH gibi bir gen bölgesi sonucuna göre yapılmaktadır; ancak DNA çoğalması işlemi 2ⁿ şeklinde gerçekleştiğinden üssel olarak hesaplama yapılmakta ve kontrole göre araştırılan mRNA' nın kaç kat değişim yaptığı şeklinde yoruma gidilmektedir.

qRT-PCR için Deney Grupları

- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde sadece besiyeri uygulanmış grup (Kontrol grubu)
- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde kurkumin 100 μ M uygulanmış grup (Pozitif kontrol)
- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde 80 μ M, 160 μ M, 320 μ M gingerol uygulanmış grup (Gingerol grubu)
- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde 60 μ M, 120 μ M, 240 μ M shogaol uygulanmış grup olmak üzere toplamda 16 adet kuyu,

Ölçülen parametreler: β -catenin, GSK3 β , p-GSK3 β , mPGES-1, β -actin RNA miktarları 3.4. bölümünde anlatılan şekilde A549IL-1 β (-) ve A549IL-1 β (+) deney grupları oluşturulmuştur. Hücreler 96' lık plakalara 25.000 hücre/100 μ L olarak dağıtılmışlardır. Yapıştıktan sonra eski besiyeri uzaklaştırılmış ve yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda moleküller uygulanarak 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. RNA izolasyonu için kit (Roche Cell Lysis Kit) kullanılmıştır. Kit prosedürüne göre optimum sonuç için 30.000 adet hücre/kuyu olacak şekilde 96' lık plakalarda çalışılması önerilmektedir. Bir kuyu için kit lizis tamponundan 39,5 μ L, RNAaz inhibitöründen 0,5 μ L karıştırılmıştır. Moleküllerle 24 sa inkübasyon sonrasında eski besiyeri uzaklaştırılmış ve her kuyuya 40

μ L RNA izolasyon çözeltisinden konmuştur. 5 dk oda sıcaklığında inkübasyondan sonra RNA karışımı içeren çözelti ependorfalara alınarak vakit kaybetmeden cDNA sentezi işlemine geçilmiştir. cDNA sentez reaksiyonu için aşağıda yer alan formül kullanılmıştır.

Tablo 3.4. cDNA karışım formülü

H ₂ O	6,9 mL	DNTP oligo nükleotit mix	2 μ L
Random hekzamer primer	1 μ L	DTT	1 μ L
Oligo DT primer	1 μ L	RT enzimi	1,1 μ L
RT buffer	4 μ L	DNAaz	0,5 μ L
RNAaz inhibitörü	0,5 μ L	RNA karışımı	2 μ L
1 reaksiyon toplamda 20 μ L olarak ayarlanmıştır			

Tüm örnekler için 1 reaksiyon fazlası düşünülerek karışım yapılmış ve bu karışımdan 18' er μ L olacak şekilde 0,5 mL' lik PCR tüplerine dağıtım yapılmış ve üzerine 2 μ L RNA eklenmiştir.

cDNA sentezi PCR termal döngü sağlayan cihazda (Biorad thermal cycler) 10 dk 29°C, 60 dk 48°C, 5 dk 85°C' de gerçekleştirilmiş ve sonrasında cihaz +4°C' de beklemeye alınmıştır. cDNA' lar -20°C' de dondurulmuş ve ertesi gün qRT-PCR deneylerine başlanmıştır.

qRT-PCR için Roche katalog deneyleri kullanılmıştır ve tüm parametreler için aynı sıcaklık döngüsü uygulanarak 2 aşamalı amplifikasyon yapılmıştır. qRT-PCR cihazı (Roche Light Cycler Nano) program aracılığıyla preinkübasyon için 95°C' de 10 sn 1 döngü ve amplifikasyon için 95°C' de 10 sn, 60 °C' de 30 sn, 72 °C' de 1 sn olmak üzere 45 döngü, soğutma için ise 40 °C olacak şekilde kurulmuştur. qRT-PCR reaksiyon karışımı ise Tablo 3.5 belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. mPGES-1 için forward (F) 5'-CACAGCCTGGTGATGAG C-3' reverse (R) 5'-CCGCTTCCCAGAGGATCT-3'; GSK3 β için F 5'-GATTCCCAGACGCCTGTTAC-3' ve R 5'-CTCGCTTCCTTCCTTCCTTT-3'; β -actin için F 5'-CCTGTACGCCAACACAGTGC-3' ve R 5'-ATACTCCTGCTTGCTGATCC-3'; β -catenin için F 5'-AAAATGGCAGTGCGTTTAG-3' ve R 5'-TTTGAAGGCAGTCTGTCGTA-3' primerleri kullanılmıştır.

Tablo 3.5. qRT-PCR karışım formülü

H ₂ O	10 μ L
Parametre RT ready assay (20X)	1 μ L
Master mix (5X)	4 μ L
cDNA	5 μ L
1 reaksiyon için toplamda 20 μ L	

Tüm örnekler için 1 reaksiyon fazlası düşünülerek karışım yapılmış ve bu karışımdan 15' er μ L olacak şekilde PCR tüplerine dağıtım yapılmış ve üzerine 5 μ L cDNA eklenmiştir

qRT-PCR' da kullanılan designer assay paketi içerisinde master mix, PCR derecesinde su ve primerlerle beraber prob içeren parametre çözeltisi bulunmaktadır. İçerisinde

Taqman hidroliz prob ve FAM boyası bulunmaktadır. qRT-PCR cihazında bir seferde maksimum 32 adet örnekle ile çalışma olanağı bulunmaktadır ve buna göre her seferinde iki adet parametre ve bunları normalize etmek için β -actin ölçülmüştür. Herhangi bir kontaminasyon olup olmadığının kontrolü ise cDNA içermeyen negatif kontrol tüpleriyle yapılmıştır. β -catenin, GSK3 β , p-GSK3 β , mPGES-1 parametreleri ölçüldükten sonra β -actin ile normalizasyon sonrasında hesap için 3 aşağıdaki formül kullanılmıştır. Deney sonuçları kontrole göre % değişim şeklinde yorumlanmıştır.

$$\% \text{ Değişim} = \frac{\frac{-(C_t \text{ hedef}) - (C_t \text{ hedef housekeeping})}{2}}{\frac{-(C_t \text{ kontrol}) - (C_t \text{ kontrol housekeeping})}{2}} \times 100$$

3.8. PGE₂ MİKTAR DENEYİ

PGE₂ Miktar Deneyi İçin Gruplar

- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde sadece besiyeri uygulanmış grup (Kontrol grubu)
- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde kurkumin 100 μ M uygulanmış grup (Pozitif kontrol)
- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde 40 μ M, 80 μ M, 160 μ M, 320 μ M gingerol uygulanmış grup (Gingerol grubu)
- * A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücrelerinde 30 μ M, 60 μ M, 120 μ M, 240 μ M shogaol uygulanmış grup (Shogaol grubu) olmak üzere toplamda 24 adet kuyu,

3.4. bölümünde anlatılan şekilde A549IL-1 β (-) ve A549IL-1 β (+) deney grupları oluşturulmuştur ve 24' lük plakalara $2,5 \times 10^5$ hücre/500 μ L olacak şekilde her kuyuya ekim yapılmıştır. Hücrelerin yapışması beklendikten sonra eski besiyeri değiştirilmiş ve moleküller uygulanmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra hücrelerin üzerinde bulunan besiyerinden örnek alınmıştır. Hücrelerin besiyeri ortamına vermiş oldukları PGE₂' nin miktarının ölçümü ise PGE₂ kiti (Cayman Express PGE₂ 500141) ile yapılmıştır.

PGE₂, çok hızlı bir şekilde metabolize edildiğinden kendisinin doğrudan ölçümü yerine PGE₂ metabolitlerinin ölçülmesi yoluna gidilmiştir. Kit çalışma prensibi de PGE₂' nin metabolitleri üzerinden ölçüm yapılmasına dayanmaktadır. Kit tüm PGE₂ metabolitlerini tek bir stabil türeve dönüştürmekte ve Elisa yöntemine göre ölçümünü sağlamaktadır. Plaka' ya yıkama işlemi yapılarak ortamdaki bağlanmamış re ajanlar uzaklaştırılmakta ve asetilkolinesteraz substratı olan Ellman reaktifi eklenerek sarı renk oluşması

sağlanmaktadır. Bu renk maksimum absorbandsını 412 nM’ de yapmaktadır. Renkteki koyuluğun şiddeti ise PGE₂ tracer ile orantılıdır ve bu da PGE₂ tracer ile ortamda bulunan PGE₂ miktarına bağlıdır. Dolayısıyla oluşan sarı renk ne kadar az ise ortamda o kadar çok PGE₂ bulunmaktadır. Hesapta ise PGE₂ standardı kullanılmıştır ve ortama 1000 pg/mL, 500 pg/ml, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,3 pg/mL, 15,6 pg/mL ve 7,8 pg/mL olacak şekilde eklenmişlerdir. Ortama sırasıyla 50 µL tampon, 50 µL örnek, 50 µL PGE₂ tracer, 50 µL PGE₂ monoklonal antikoru konmuştur. Bu aşamda belirtildiği gibi örnekte bulunan PGE₂ ile PGE₂ tracer, ortama en son eklenen PGE₂ antikoru bağlanmak için yarışır. Örnekte ne kadar çok PGE₂ varsa PGE₂ tracer da antikora o kadar az miktarda bağlanır. Bu aşamada bağlanma gerçekleşmesi için plaka 60 dk boyunca çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Sonrasında tüm plaka içeriği boşaltılmış ve 5 kez yıkama çözeltisiyle yıkanmıştır. Üzerinde asetilkolinesteraz enzimi konjuge edilmiş PGE₂ tracerın bağlanma derecesi ise asetilkolinesteraz substratı Ellman reaktifinden 200 µL eklenip 1,5 sa saat çalkalayıcıda inkübe edilmesiyle ölçülmüştür. Standart PGE₂’ lerin ölçülmesiyle çizilen standart eğrinin denklemi hesapta kullanılmış ve kontrole göre % değişim şeklinde yorum yapılmıştır.

Hücre kültüründen örnekler, IL-1β uygulanıp 24 sa indüksiyondan hemen sonra, moleküller uygulanmadan önce, moleküller uygulandıktan 12 sa ve 24 sa sonra alınmıştır. 12 sa ve 24 sa örnekleri için ayrı plakalarda çalışılmıştır. Aynı plaka içinden öncelikle 12. ve sonrasında 24. saatte örnek alınmamıştır; çünkü kit ile konsantrasyon ölçüldüğünden kuyu içindeki PGE₂’ nin konsantrasyonunun değişebileceği düşünülmüştür.

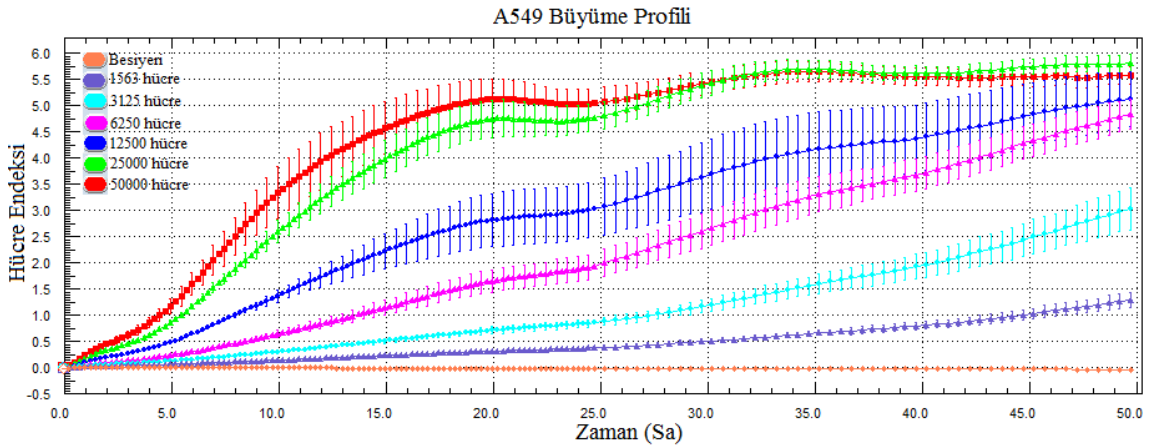
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler için deneylere uygun olarak farklı yöntemler kullanılmıştır ve moleküllerin etkisinin anlamlılığı kontrol grubuna göre karşılaştırılmıştır. Analizler Systat Sigma plot v12.0 programı kullanılarak yapılmıştır. MTT genel doz tarama deneyi için Kruskal-Wallis ANOVA ve karşılaştırma için Dunn yöntemi uygulanmıştır. MTT IC₅₀ deneyi içinse Kruskal-Wallis ANOVA ve karşılaştırma için Holm-Sidak testi yapılmıştır.

Western blot ve qRT-PCR deneyleri için student t-testi ile Mann-Whitney U testi yapılmış ve her grup kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Tüm istatistiksel analizlerin ortalama anlamlılığı % 95 olup, farklılıklar p<0,001 veya p<0,05 şeklinde öneli olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

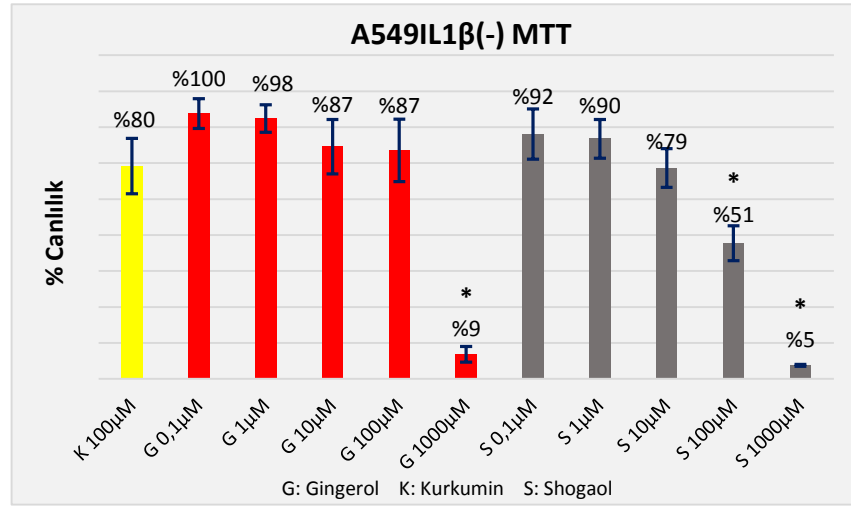
4.1. GZHA BÜYÜME PROFİLİ DENEYİ



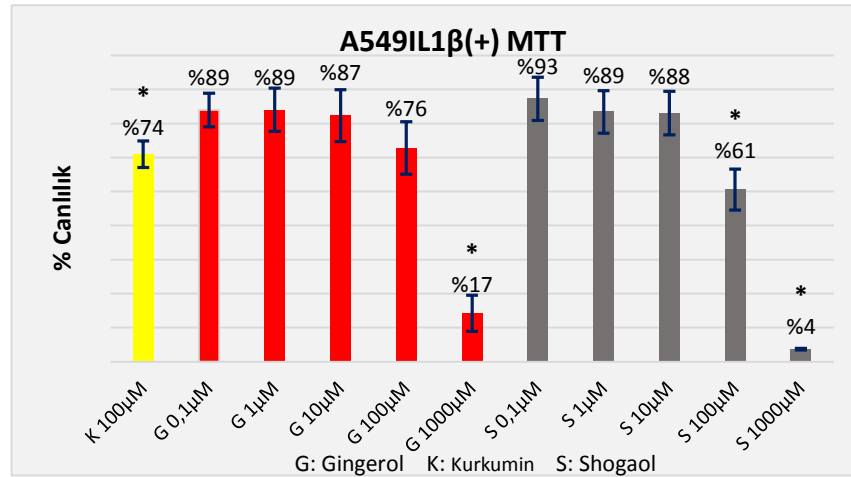
Şekil 4.1. A549 Hücresi Büyüme Profili

Hücre büyüme profilinin çıkarılması için, A549 hücrelerinin 5. pasajında 1563, 3125, 6250, 12.500, 25.000, 50.000 hücre ile 8 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Profil incelendiğinde hücrelerin çok hızlı bir şekilde tutundukları ve CI değerlerinin yüksek olduğu görülmüştür. Besiyeri ortamının ise 200 μ L olması durumunda deneyin bu sayıdaki hücre ile 50 sa ve daha fazla sürdürülebileceği sonucu çıkmaktadır. 24 saatlik bir süre sonunda 12.500 sayıdaki hücrenin CI değeri yaklaşık olarak 3 civarındadır. 50 saat sonunda ise bu değerin 5' i aştığı görülmektedir. 25.000 ve 50.000 sayıdaki hücre ise büyüme açısından ilk 20 sa sonunda artık platoya ulaşmıştır ve plaka kuyusunda hücrelerin çoğalabileceği alan kalmadığı anlaşılmaktadır. Aynı zamanda hücre endeksinin 30. saatten sonra neredeyse değişmediği görülmüştür. 96' lık plakalarda yüzey alanının 0,3 cm² olduğu göz önüne alınırsa 12,500 hücrenin en uygun hücre sayısı olabileceği düşünülmüştür.

4.2. MTT CANLILIK DENEYİ GENEL DOZ TARAMA ve IC₅₀ BELİRLEME



Şekil 4.2. MTT Deneyi A549IL1β(-) genel doz tarama
12500 hücrede 24 saat sonundaki veriyi göstermektedir. Gruplar kontrole göre % değişim olarak verilmiştir.
Anlamlılık değeri * p<0,05

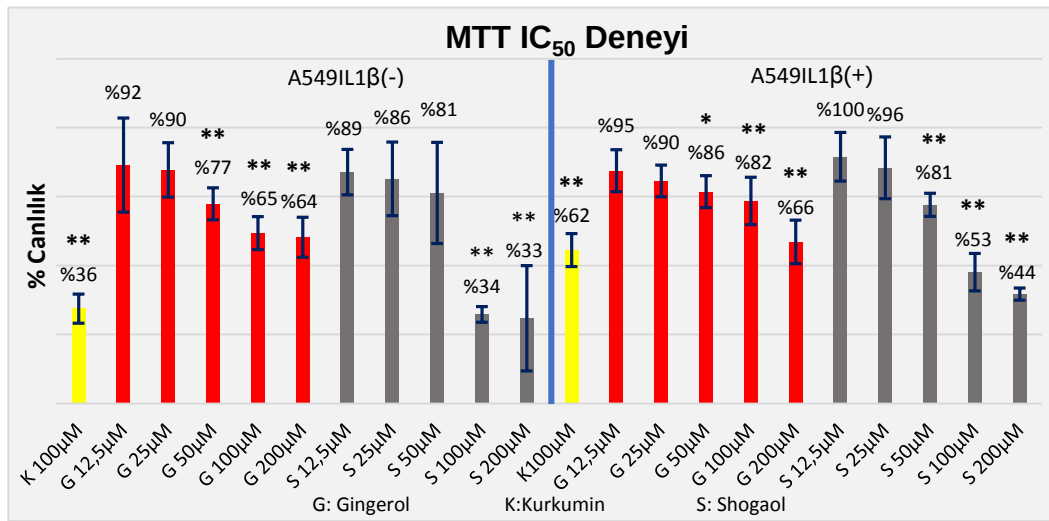


Şekil 4.3. MTT Deneyi A549IL1β(+) genel doz tarama
12500 hücrede 24 saat sonundaki veriyi göstermektedir. Gruplar kontrole göre % değişim olarak verilmiştir.
Anlamlılık değeri * p<0,05

MTT deneyi öncelikle doz tarama şeklinde 8 tekrarlı olarak yapılmıştır. Buna göre kurkumin 100 μM konsantrasyonda hem A549IL1β(-) hem de A549IL1β(+) hücrelerinde % 20-25 kadar canlılığı azaltmıştır (p<0,05). 6-gingerol için ise her iki hücre grubunda küçük dozlarda anlamlı bir düşüş olmazken, sadece 100 μM ve 1000 μM konsantrasyonda canlılıkta azalma görülmüştür. 6-shogaol her iki hücre grubunda tüm konsantrasyonlarda 6-gingerole göre canlılığı daha fazla düşürmüştür. 100 μM konsantrasyondaki 6-shogaol, aynı konsantrasyondaki kurkumine göre daha etkilidir; ancak 6-shogaolün genel olarak

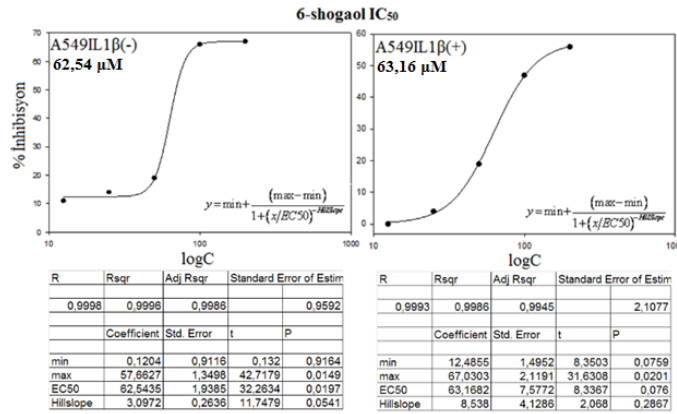
sitotoksik etkisi A549IL1 β (-) hücrelerinde A549IL1 β (+) e göre daha yüksektir ve 100 μ M için canlılıkta anlamlı bir düşüş vardır ($p<0,05$).

Genel doz tarama deneyinde canlılıktaki düşüş; moleküller hakkında bir ön bilgi edinilmesini sağlasa da, IC₅₀ değerini tam hesaplayabilmek için etkinliğin görüldüğü 100 μ M ve 1000 μ M arasını kapsayacak şekilde tekrar MTT deneyi yapılmıştır. 1000 μ M konsantrasyonu çok yüksek olduğundan 100, 200, 300, 500 μ M gibi konsantrasyonlar yerine 100 ile 1000 μ M arasına sadece 200 μ M eklenmiştir.



Şekil 4.4. A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) için MTT IC₅₀ belirleme deneyi 12,500 hücrede 24 saat sonundaki veriyi göstermektedir. Gruplar kontrole göre % değişim olarak verilmiştir. Anlamlılık değeri * $p<0,05$ ve ** $p<0,001$ ’ dir.

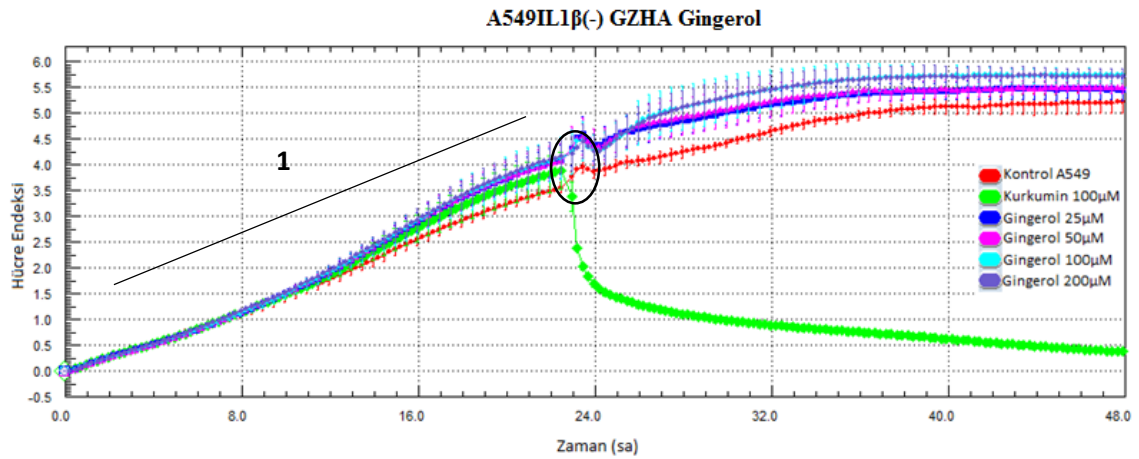
IC₅₀ belirleme deneyine göre, kurkumin A549IL1 β (-) hücrelerinde canlılığı % 64 ve A549IL1 β (+) hücrelerinde ise % 38 kadar düşürmüştür ($p<0,001$). Kurkuminin etkisinin A549IL1 β (+) hücrelerinde daha az olduğu görülmüştür. 6-shogaol ise kurkumine kıyasla her iki hücre grubunda 100 μ M konsantrasyon için daha etkindir ve canlılığı azaltıcı etkisi doza bağımlı bir şekilde gerçekleşmiştir ($p<0,001$). 6-gingerol ise genel doz tarama deneyinin aksine doza bağımlı bir şekilde canlılığı düşürse de, bu oran % 50’ nin altında değildir. Bundan dolayı sadece 6-shogaol için Sigma plot ile IC₅₀ değeri hesaplanmıştır. Buna göre 6-shogaolun A549IL1 β (-) hücreleri için 24 sa IC₅₀ değeri 62,5 μ M iken; A549IL1 β (+) hücreleri için 63,2 μ M bulunmuştur.



Şekil 4.5. 6-shogaol Sigma plot grafiği

4.3. GZHA CANLILIK DENEYİ

A549IL1β(-) ve A549IL1β(+) hücrelerinde 6-gingerol

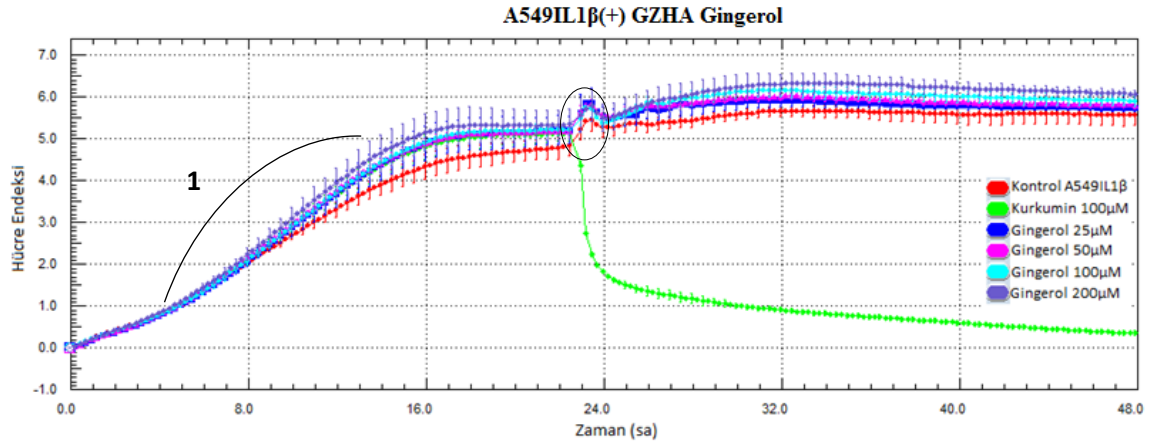


Şekil 4.6. GZHA A549IL1β(-) 6-gingerol

Deney 12,500 hücrede uygulanmış ve moleküle 24 sa'lık inkübasyon sonrasındaki veriyi göstermektedir. Kontrol A549 olarak kırmızı renktedir. Moleküllerin uygulandığı nokta yuvarlak içine alınmıştır.

Şekil 4.6'da A549IL1β(-) hücrelerinin ilk 24 saatlik profiline bakıldığında (1 nolu bölüm) hücrelerin neredeyse 45°'lik bir açıyla sabit bir hızla çoğaldığı görülmektedir. Aynı zamanda 24. sa sonunda hücre endeksinin 3,5 civarında olduğu tespit edilmiştir.

GZHA deney sonucuna göre A549IL1β(-) hücrelerinin büyüme profili izlenmiş ve yaklaşık 24. saatte moleküllerin uygulaması yapılmıştır. 24. saatten sonra kurkumin, 6-gingerol ve 6-shogaol uygulaması yapılarak bu moleküllerin etkisi gözlenmiştir. 6-gingerol için kırmızıyla gösterilen besiyeri uygulanmış kontrole göre CI' da herhangi bir düşüş görülmemekle beraber; yeşil renkle gösterilen kurkumin 100 μM konsantrasyonda ortama eklenir eklenmez CI hızlı bir şekilde düşmüştür.



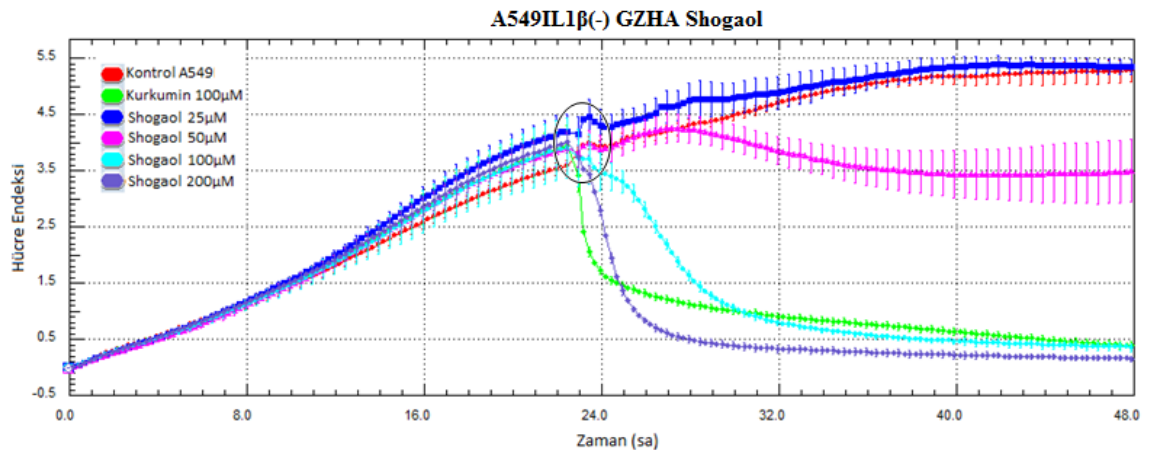
Şekil 4.7. GZHA A549IL1β(+) 6-gingerol

Deney 12,500 hücrede uygulanmış ve moleküle 24 sa' lik inkübasyon sonrasındaki veriyi göstermektedir. Kontrol A549IL1β olarak kırmızı renktedir. Moleküllerin uygulandığı nokta yuvarlak içine alınmıştır.

A549IL1β(+) hücrelerinin ilk 24 saatlik profilinde (1 nolu bölüm) IL-1β etkisiyle hücre büyümesinin hızlandığı ve bir plato oluşturduğu (Şekil 4.7) görülmektedir. Aynı zamanda hücre endeksinin 5 civarında olduğu gözlenmiştir.

24. saatten sonra 6-gingerol ve kurkumin 100 μM için A549IL1β(+) hücre grubundaki profil, A549IL1β(-) grubuyla hemen hemen aynıdır. Kurkumin 100 μM konsantrasyonda ortama konduğu andan itibaren CI hızlı bir şekilde düşmüştür. Kurkuminin hem A549IL1β(-) hem de A549IL1β(+) hücre grubunda çok etkin olduğu görülmektedir. 6-gingerolde ise her iki hücre grubunda canlılığı azaltma yönünde bir etki gözlenmemiştir.

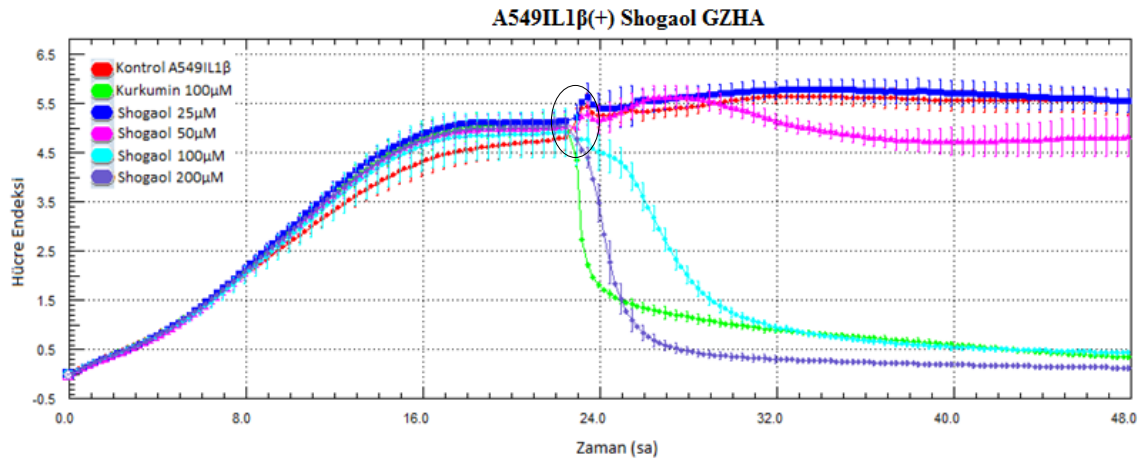
A549IL1β(-) ve A549IL1β(+) hücrelerinde 6-shogaol



Şekil 4.8. GZHA A549IL1β(-) 6-shogaol

Deney 12,500 hücrede uygulanmış ve moleküle 24 sa' lik inkübasyon sonrasındaki veriyi göstermektedir. Kontrol A549 olarak kırmızı renktedir. Moleküllerin uygulandığı nokta yuvarlak içine alınmıştır.

Şekil 4.8’ de 6-shogaol, A549IL1 β (-) hücre grubu düşünüldüğünde 50, 100, 200 μ M için kontrole göre hücre endeksini azaltmıştır. Hücre endeksini düşürme hızı kurkumin 100 μ M’ a göre daha yavaş olsa da sonuçta CI’ yı kurkumin kadar çok düşürmüştür. 6-shogaol 25 μ M konsantrasyonunda ise CI neredeyse kontrol grubuna paralel seyretmiştir.

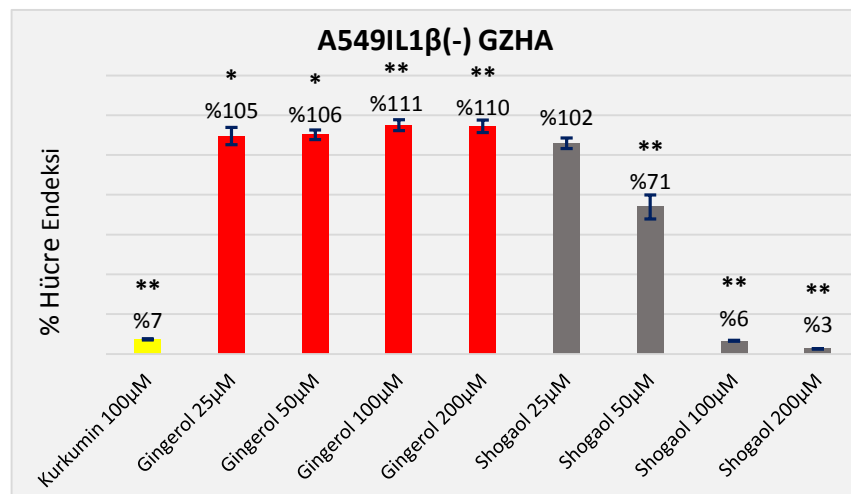


Şekil 4.9. GZHA A549IL1 β (+) 6-shogaol

Deney 12,500 hücrede uygulanmış ve moleküle 24 sa’ lik inkübasyon sonrasındaki veriyi göstermektedir. Kontrol A549IL1 β olarak kırmızı renktedir. Moleküllerin uygulandığı nokta yuvarlak içine alınmıştır.

6-shogaol A549IL1 β (+) hücrelerinde 50, 100 ve 200 μ M konsantrasyonlarında hücre endeksini azaltmıştır. Bu etki 100 ve 200 μ M için kurkumine benzer derecededir. Genel olarak 24 saatten sonraki profillere bakıldığında 6-shogaol, A549IL1 β (-) ve A549IL1 β (+) hücre gruplarında benzer şekilde etki göstererek hücre endeksini düşürmüştür.

A549IL1 β (-) hücrelerinde moleküllerin etkisi GZHA

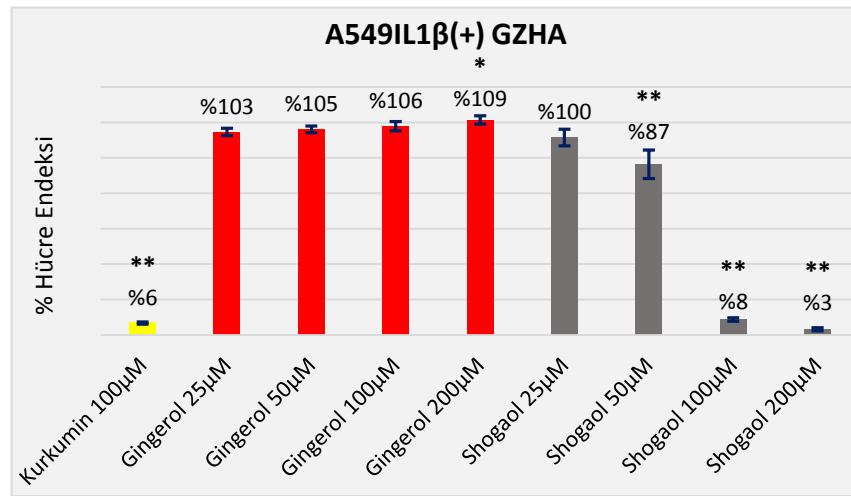


Şekil 4.10. A549IL1 β (-) GZHA

12,500 hücrede yürütülen deney için moleküller uygulandıktan 24 sa sonra oluşan hücre endeksleri A549IL1 β (-) kontrol grubuna göre % normalizasyon yapılmıştır. Anlamlılık değeri * $p < 0,05$ ve ** $p < 0,001$ ’ dir.

Moleküller uygulandıktan 24 sa sonraki CI değerlerine bakıldığında (Şekil 4.10), A549IL1 β (-) hücre grubu için kurkumin 100 μ M' da CI % 7' ye düşmüştür ($p<0,001$). 6-gingerol neredeyse doza bağımlı bir şekilde % 11' e kadar hücre canlılığını artırmıştır ($p<0,001$). 6-shogaol ise 50, 100, 200 μ M için doza bağımlı bir şekilde hücre endeksini düşürmüştür ($p<0,001$). 100 ve 200 μ M konsantrasyonda ise etkinlik kurkumin kadar yüksektir.

A549IL1 β (+) hücrelerinde moleküllerin etkisi GZHA



Şekil 4.11. A549IL1 β (+) GZHA

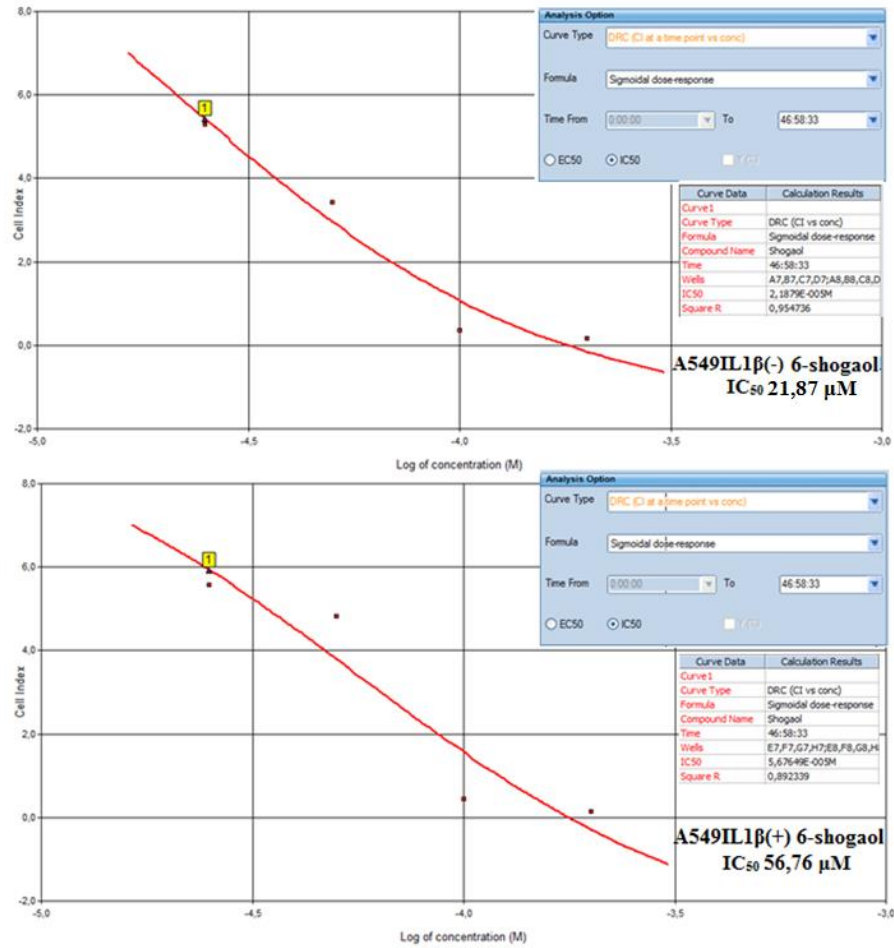
12,500 hücrede yürütülen deney için moleküller uygulandıktan 24 sa sonra oluşan hücre endeksleri A549IL1 β (s) kontrol grubuna göre % normalizasyon yapılmıştır. Anlamlılık değeri * $p<0,05$ ve ** $p<0,001$ ' dir.

Moleküller uygulandıktan 24 sa sonraki CI göz önüne alındığında (Şekil 4.11), A549IL1 β (+) hücre grubu için 6-gingerol doza bağımlı bir şekilde % 9' a kadar hücre canlılığını artırmıştır ($p<0,05$). Kurkumin 100 μ M' da hücre endeksini % 6' ya kadar düşürmüştür ($p<0,001$). 6-shogaol 50, 100, 200 μ M için doza bağımlı bir şekilde hücre endeksini düşürmüştür ($p<0,001$) ve A549IL1 β (-) hücre grubunda olduğu gibi A549IL1 β (+) hücre grubu için en etkin olduğu konsantrasyonlar 50 ve 100 μ M' dır.

GZHA cihazı yazılımı aracılığıyla 24 sa' lik IC₅₀ değeri sitotoksik etki gösteren 6-shogaol için hesaplatılmıştır ve buna göre A549IL1 β (-) hücreleri için IC₅₀ değeri 22 μ M, A549IL1 β (+) için 56,76 μ M bulunmuştur.

MTT ve GZHA deneylerinden elde edilen IC₅₀ değerlerine dayanarak β -catenin, GSK3 β , p-GSK3 β , mPGES-1 protein düzeylerinin ölçüldüğü western blot deneyinde, mRNA düzeylerinin ölçüldüğü qRT-PCR deneyinde ve PGE₂ miktarının ölçüldüğü deneyde 6-

gingerol için 80, 160, 320 μM ; 6-shogaol için 60, 120, 240 μM konsantrasyonları belirlenmiştir.



Şekil 4.12. GZHA cihazı 6-shogaol IC_{50} değeri

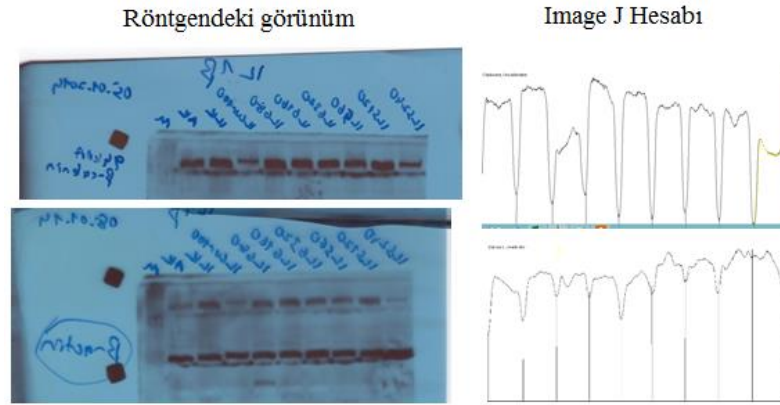
4.4. LOWRY İLE PROTEİN MİKTAR TAYİNİ VE WESTERN BLOT DENEYİ

Lowry sonucuna göre her örnek için protein miktarları hesaplanmış ve western blot deneyine geçilmiştir. Örnek hesaplama tablo 4.1.' de yer almaktadır. Deneyler üç farklı lizatta ve 9 grupta gerçekleştirildiğinden tüm Lowry sonuçlarına yer verilmemiştir.

Tablo 4.1. Lowry sonucuna göre jele yüklemek için hesap örneği

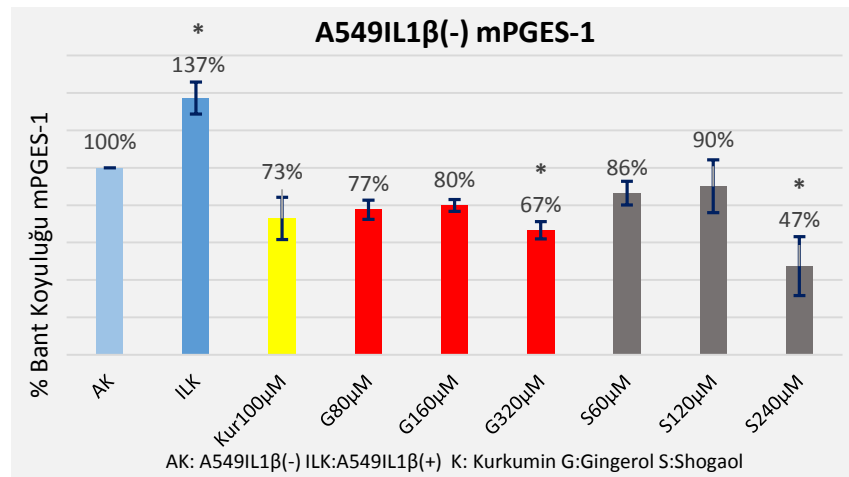
Örnek	Protein Konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	30 μg için (μL)	1,2 örnek 36 μg için (μL)	Yükleme tamponu (6x) için (μL)	Toplam hacim (42 μg)	1 kuyuya yüklenecek hacim (30 μg) (μL)
Kontrol	2,2	13,64	16,36	2,73	19,09	15,91
Kurkumin 100 μM	2	15,00	18,00	3,00	21,00	17,50
Gingerol 80 μM	2,4	12,50	15,00	2,50	17,50	14,58
Gingerol 160 μM	2,6	11,54	13,85	2,31	16,15	13,46

Western blot deneyleri yapıldıktan sonra elde edilen röntgenlerdeki bantların koyuluğu Image J programı aracılığıyla hesaplanmıştır.



Şekil 4.13. Röntgen görünümü ve Image J hesabı örneği

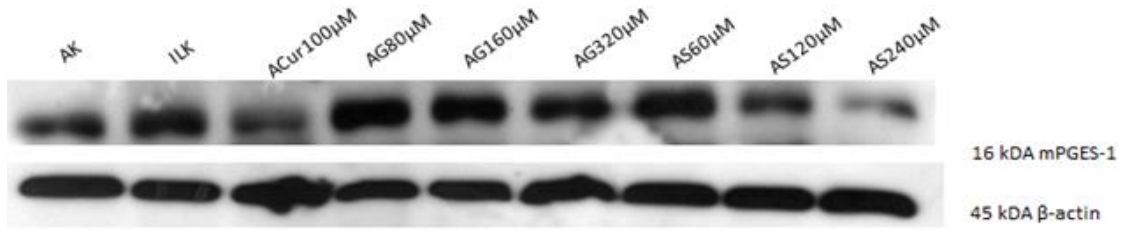
mPGES-1 A549IL1 β (-) için sonuçlar.



Şekil 4.14. A549IL1 β (-) hücrelerinde mPGES-1 protein düzeyi

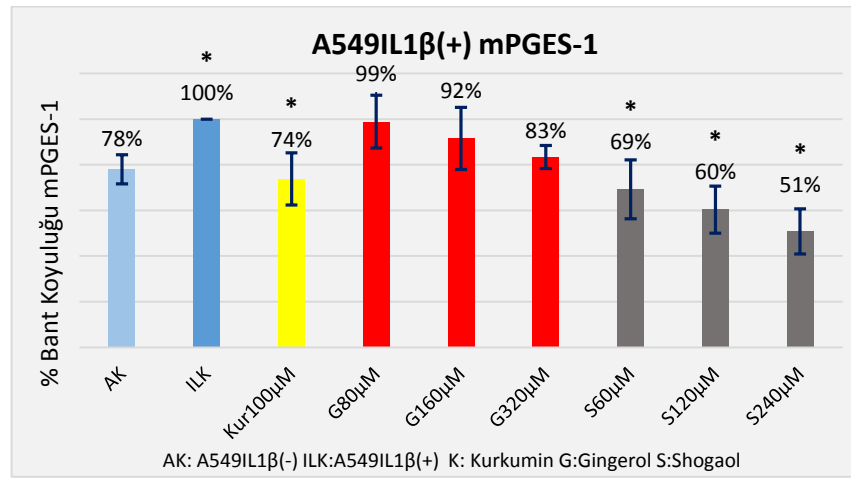
1x10⁶ hücre/1mL ortamda moleküllerle 24 sa inkübasyon sonrası veriyi göstermektedir. Veriler AK' ya normalize edilmiştir. Anlamlılık değeri *p<0,05' dir. AK: A549IL1 β (-) kontrol ILK: A549IL1 β (+) kontrol

IL-1 β uygulanan hücrelerde (ILK), IL-1 β uygulanmayanlara (AK) göre mPGES-1 protein düzeyi % 37 civarında artmıştır (p<0,05). A549IL1 β (-) hücre grubu için kurkumin 100 μ M konsantrasyonda mPGES-1 protein miktarını % 27 düşürmüştür. 6-gingerol ise neredeyse doza bağımlı bir şekilde 80, 160 ve 320 μ M konsantrasyonda protein miktarını azaltmıştır. Aynı durum 6-shogaol için de geçerlidir. Bu anlamda en etkin madde ve konsantrasyon 6-shogaol 240 μ M' dir (p<0,05).



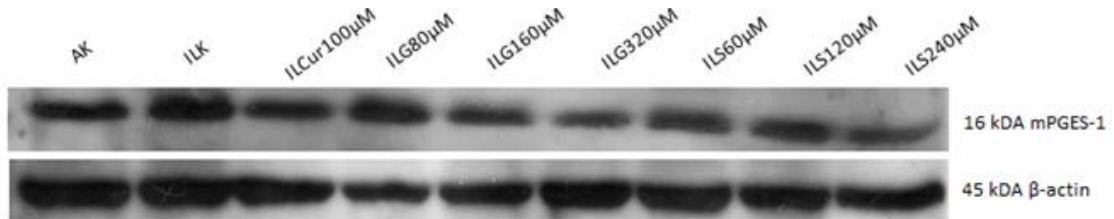
Şekil 4.15. A549IL1 β (-) hücrelerinde mPGES-1 protein bantları
A: A549IL1 β (-) hücre grubu için kontrol ILK: A549IL1 β (+) hücre grubu için kontrol

mPGES-1 A549IL1 β (+) için sonuçlar,



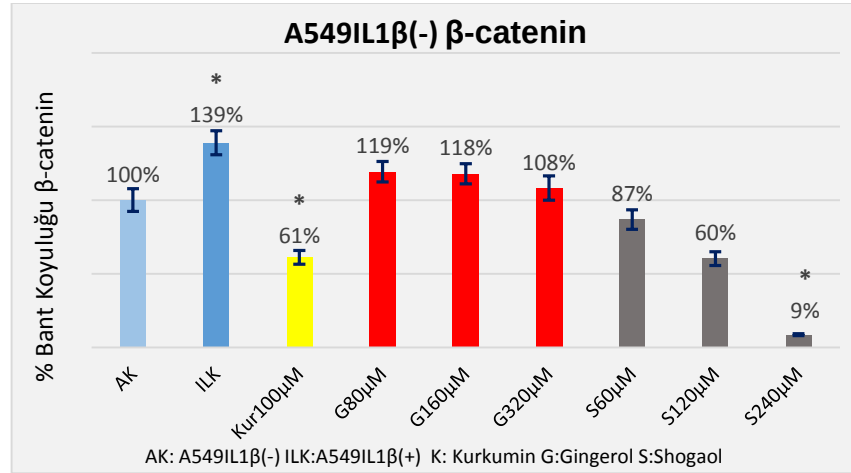
Şekil 4.16. A549IL1 β (+) hücrelerinde mPGES-1 protein düzeyi
1x10⁶ hücre/1mL ortamda moleküllerle 24 sa inkübasyon sonrası veriyi göstermektedir. Veriler ILK' ya normalize edilmiştir. Anlamlılık değeri *p<0,05' dir. AK: A549IL1 β (-) kontrol ILK: A549IL1 β (+) kontrol

IL-1 β uygulanan grupta uygulanmayan gruba göre mPGES-1 düzeyi yükselmiştir (p<0,05). A549IL1 β (+) hücrelerinin kontrol grubuna kıyasla, kurkumin mPGES-1 düzeyini düşürmüştür (p<0,05). 6-gingerol ise mPGES-1 düzeyini yükseltmiş, 6-shogaol ise doza bağımlı bir şekilde etki göstermiştir. A549IL1 β (-) hücrelerinde olduğu gibi A549IL1 β (+) hücrelerinde mPGES-1 proteini düzeyini düşürme açısından 6-shogaolün en etkin konsantrasyonu 240 μ M' dır (p<0,05).



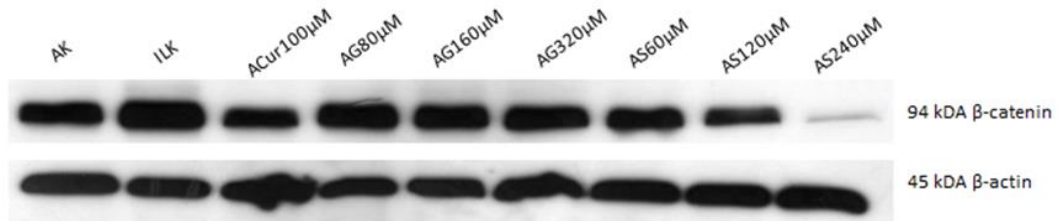
Şekil 4.17. A549IL1 β (+) hücrelerinde mPGES-1 protein bantları
A: A549IL1 β (-) hücre grubu için kontrol ILK: A549IL1 β (+) hücre grubu için kontrol

β -catenin A549IL1 β (-) için sonuçlar.



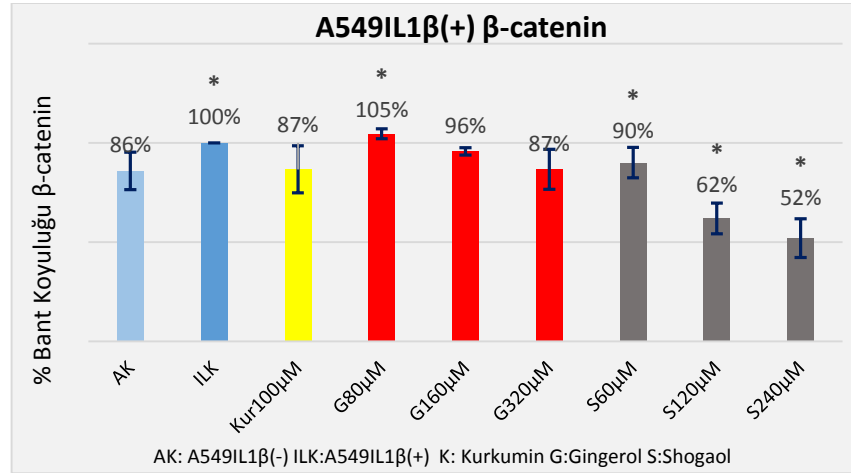
Şekil 4.18. A549IL1 β (-) hücrelerinde β -catenin protein düzeyi 1×10^6 hücre/1mL ortamda moleküllerle 24 sa inkübasyon sonrası veriyi göstermektedir. Veriler AK' ya normalize edilmiştir. Anlamlılık değeri * $p < 0,05$ ' dir. AK: A549IL1 β (-) kontrol ILK: A549IL1 β (+) kontrol

IL-1 β uygulanan hücrelerde β -catenin düzeyi uygulanmayanlara göre % 39 kadar yükselmiştir ($p < 0,05$). Kurkumin 100 μ M için kontrol grubuna göre bir düşüş gerçekleşmiştir ($p < 0,05$). 6-gingerol ise β -catenin düzeylerini artırmıştır. 6-shogaol ise doza bağımlı olarak β -catenin düzeylerini düşürmüştür. 240 μ M' lık konsantrasyonunda bu etkisi en yüksek düzeydedir ($p < 0,05$).



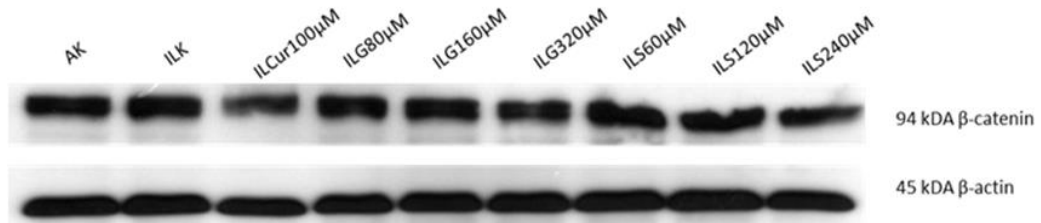
Şekil 4.19. A549IL1 β (-) hücrelerinde β -catenin protein bantları
A: A549IL1 β (-) hücre grubu için kontrol ILK: A549IL1 β (+) hücre grubu için kontrol

β-catenin A549IL1β(+) için sonuçlar.



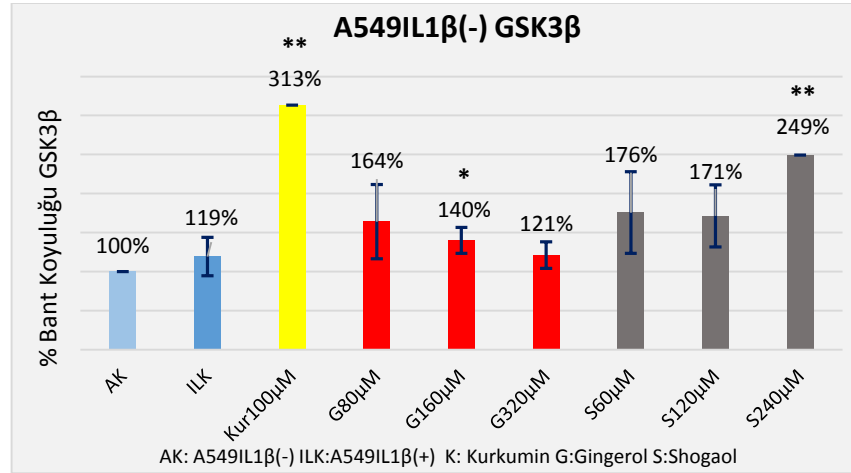
Şekil 4.20. A549IL1β(+) hücrelerinde β-catenin protein düzeyi 1×10^6 hücre/1ml ortamda moleküllerle 24 sa inkübasyon sonrası veriyi göstermektedir. Veriler ILK' ya normalize edilmiştir. Anlamlılık değeri * $p < 0,05$ ' dir. AK: A549IL1β(-) kontrol ILK: A549IL1β(+) kontrol

A549IL1β(+) hücre grubu için kurkumin β-catenin düzeylerini azaltmıştır; 6-gingerol ise $80 \mu\text{M}$ ' da % 5 kadar artırırken ($p < 0,05$); 160 ve $320 \mu\text{M}$ için % 13' e kadar düşüş söz konusudur. 6-shogaol ise doza bağımlı bir şekilde β-catenin protein miktarını düşürmüştür ($p < 0,05$). β-catenin protein düzeylerini azaltma açısından en etkin madde 6-shogaol ve konsantrasyon $240 \mu\text{M}$ ' dır.



Şekil 4.21. A549IL1β(+) hücrelerinde β-catenin protein bantları
A: A549IL1β(-) hücre grubu için kontrol ILK: A549IL1β(+) hücre grubu için kontrol

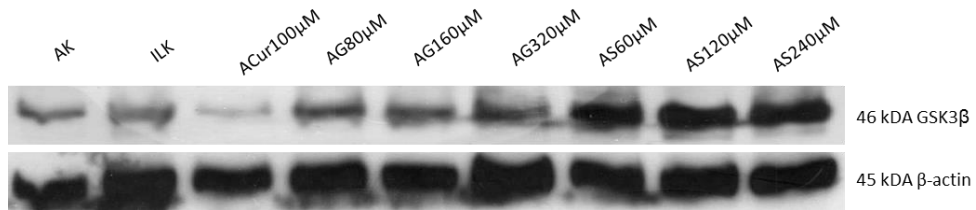
GSK3 β A549IL1 β (-) için sonuçlar,



Şekil 4.22. A549IL1 β (-) hücrelerinde GSK3 β protein düzeyi

1x10⁶ hücre/1ml ortamda moleküllerle 24 sa inkübasyon sonrası veriyi göstermektedir. Veriler AK' ya normalize edilmiştir. Anlamlılık değeri *p<0,05 ve **p<0,001' dir.

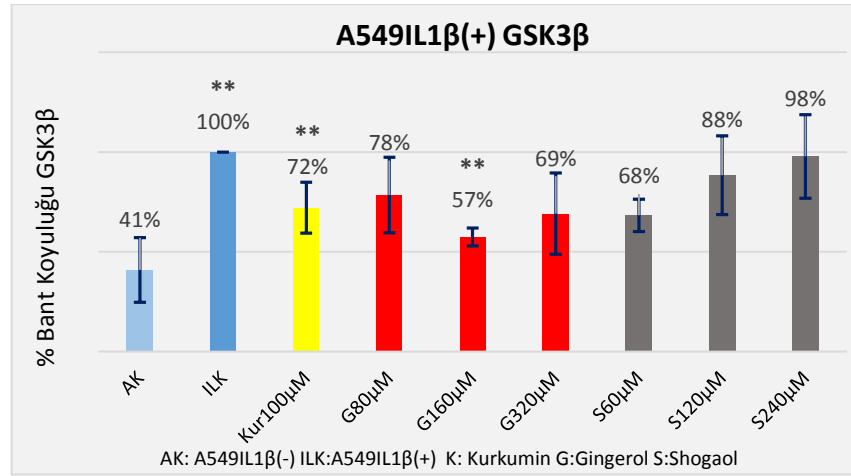
IL-1 β uygulanan grupta uygulanmayan gruba göre total GSK3 β protein düzeyleri yükselmiştir. Tüm maddeler total GSK3 β protein düzeylerini artırmış ve bu anlamda en etkin madde olarak 100 μ M konsantrasyondaki kurkumin bulunmuştur (p<0,001). 6-shogaol tüm konsantrasyonları için GSK3 β ' yı artırmış olsa istatistiksel olarak anlamlılık 240 μ M konsantrasyonunda gözlenmiştir (p<0,001). 6-gingerol ise dozla ters orantılı olarak GSK3 β protein düzeyini artırmıştır. Buradaki veri toplam GSK3 β miktarını, yani aktif GSK3 β ile beraber inaktif haldeki fosforile GSK3 β ' nın toplamını göstermektedir.



Şekil 4.23. A549IL1 β (-) hücrelerinde GSK-3 β protein bantları

A: A549IL1 β (-) hücre grubu için kontrol ILK: A549IL1 β (+) hücre grubu için kontrol

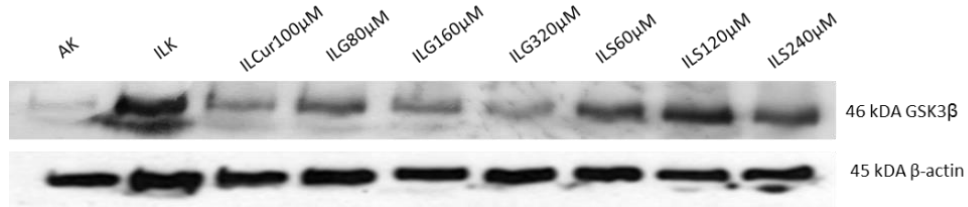
GSK3 β A549IL1 β (+) için sonuçlar.



Şekil 4.24. A549IL1 β (+) hücrelerinde GSK3 β protein düzeyi

1x10⁶ hücre/ml ortamda moleküllerle 24 sa inkübasyon sonrası veriyi göstermektedir. Veriler ILK' ya normalize edilmiştir. Anlamlılık değeri ** p<0,001' dir. AK: A549IL1 β (-) kontrol ILK: A549IL1 β (+) kontrol

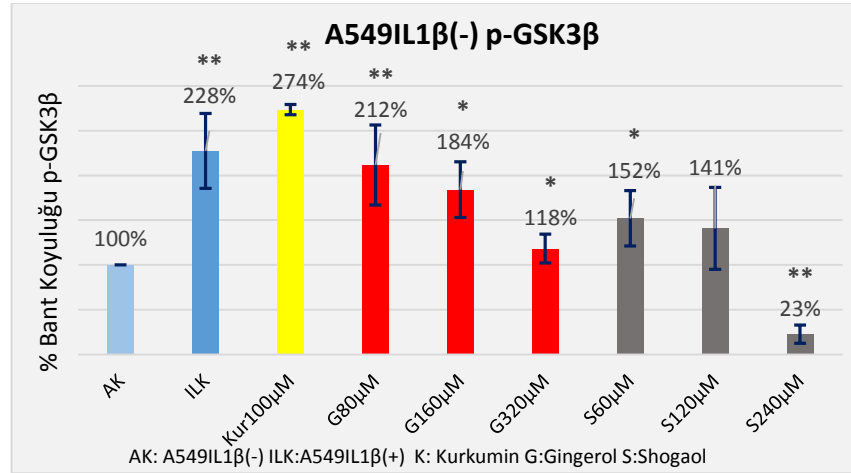
IL-1 β uygulanan grupta uygulanmayan gruba göre total GSK3 β protein düzeyleri yükselmiştir (p<0,001). A549IL1 β (+) hücrelerinde ise tüm maddeler total GSK3 β protein düzeylerini düşürmüştür. IL-1 β uygulanan hücrelerde uygulanmayanlara göre tam zıt bir etki oluşmuştur; ancak GSK3 β düzeyini en az düşüren 240 μ M' daki 6-shogaol olduğu görülse de istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenmemiştir. 6-gingerol 160 μ M' da ve kurkumin 100 μ M' da GSK3 β düzeylerinde düşüş meydana getirmiştir (p<0,001). Bir önceki grafikteki (Şekil 4.22) gibi buradaki veri toplam GSK3 β miktarını, yani aktif GSK3 β ile beraber inaktif haldeki fosforile GSK3 β ' nın toplamını göstermektedir.



Şekil 4.25. A549IL1 β (+) hücrelerinde GSK-3 β protein bantları

A: A549IL1 β (-) hücre grubu için kontrol ILK: A549IL1 β (+) hücre grubu için kontrol

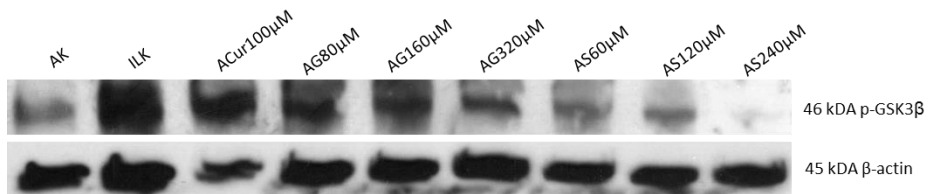
p-GSK3 β A549IL1 β (-) için sonuçlar.



Şekil 4.26. A549IL1 β (-) hücrelerinde p-GSK3 β protein düzeyi

1x10⁶ hücre/1ml ortamda moleküllerle 24 sa inkübasyon sonrası veriyi göstermektedir. Veriler AK' ya normalize edilmiştir. Anlamlılık değeri *p<0,05 ve ** p<0,001' dir. AK: A549IL1 β (-) kontrol ILK: A549IL1 β (+) kontrol

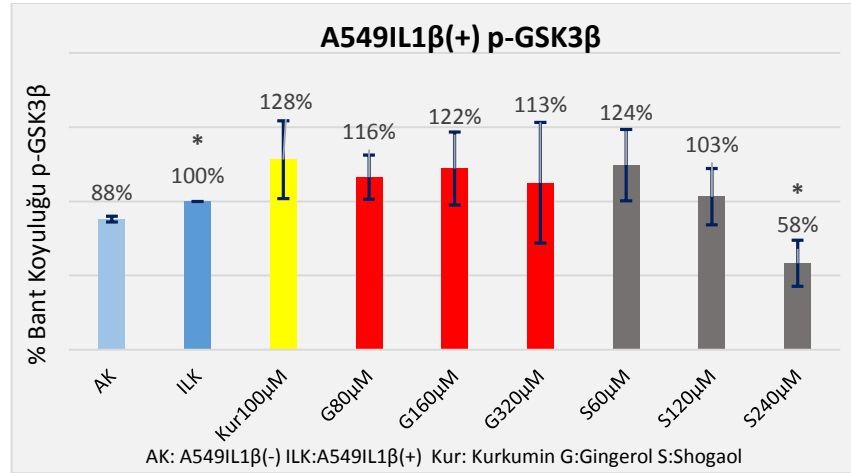
p-GSK3 β protein düzeyi IL-1 β uygulanan hücrelerde uygulanmayanlara göre yükselmiştir (p<0,001). 6-shogaol, 240 μ M konsantrasyonda p-GSK3 β protein düzeyini en çok düşüren molekül (p<0,001) iken, kurkumin 100 μ M (p<0,001), 6-gingerol ise tüm konsantrasyonlarda protein düzeylerini yükseltmiştir. Kurkumin, 6-gingerol ve 6-shogaol GSK3 β ' nin fosforilasyonunu bir miktar artırarak inaktivasyona yol açsa da 6-shogaol 240 μ M konsantrasyonda p-GSK3 β protein miktarı azalmıştır (p<0,001).



Şekil 4.27. A549IL1 β (-) hücrelerinde p-GSK3 β protein bantları

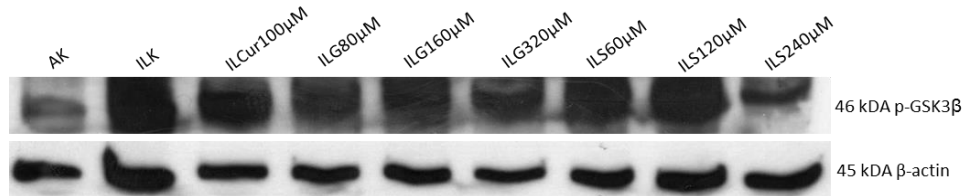
A: A549IL1 β (-) hücre grubu için kontrol ILK: A549IL1 β (+) hücre grubu için kontrol

p-GSK3 β A549IL1 β (+) için sonuçlar.



Şekil 4.28. A549IL1 β (+) hücrelerinde p-GSK3 β protein düzeyi 1×10^6 hücre/1ml ortamda moleküllerle 24 sa inkübasyon sonrası veriyi göstermektedir. Veriler ILK' ya normalize edilmiştir. Anlamlılık değeri * $p < 0,05$ ' dir. AK: A549IL1 β (-) kontrol ILK: A549IL1 β (+) kontrol

A549IL1 β (+) hücreleri için tüm moleküller p-GSK3 β düzeyini artırmış; ancak 6-shogaol 240 μ M konsantrasyonda p-GSK3 β düzeyini düşürmüştür ($p < 0,05$).



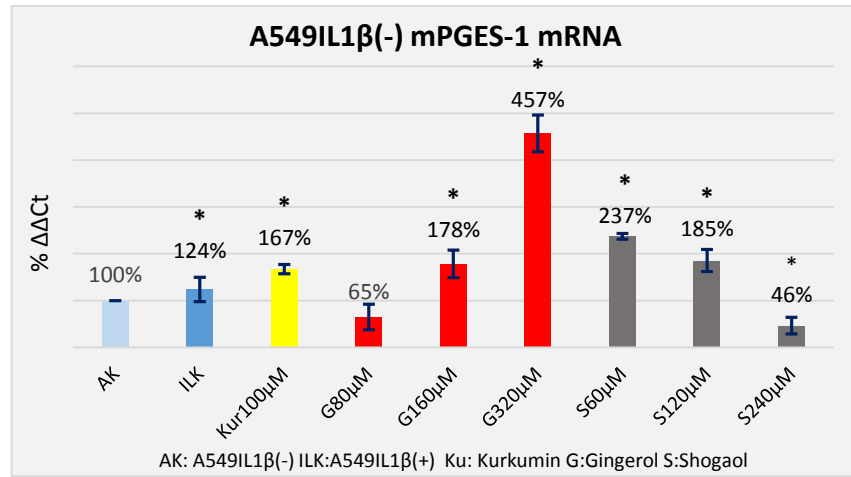
Şekil 4.29. A549IL1 β (+) hücrelerinde p-GSK3 β protein bantları
A: A549IL1 β (-) hücre grubu için kontrol ILK: A549IL1 β (+) hücre grubu için kontrol

Western blot genel sonuçları göz önünde bulundurulduğunda IL-1 β uygulanan hücrelerde uygulanmayanlara göre mPGES-1, β -catenin, GSK3 β , p-GSK3 β düzeyleri yükselmiştir. 6-shogaol 240 μ M konsantrasyonda kontrole göre her iki deney grubunda da, mPGES-1, β -catenin ve p-GSK3 β protein düzeylerini azaltmış, total GSK3 β düzeyini ise artırmıştır.

4.5. qRT-PCR DENEYİ

Hücrelerden mRNA izolasyonu yapılmış ve bu mRNA' lar cDNA' ya dönüştürüldükten sonra mPGES-1, β -catenin, GSK3 β , p-GSK3 β cDNA' ları şablon olarak kullanılarak qRT-PCR deneyleri yapılmıştır.

mPGES-1 A549IL1 β (-) için sonuçlar.



Şekil 4.30. A549IL1 β (-) hücrelerinde mPGES-1 mRNA düzeyleri

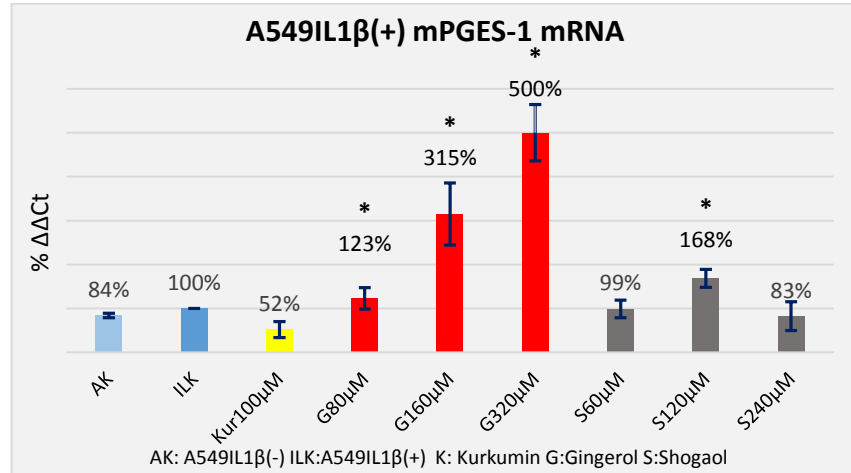
25000 hücre/100 μ L ortamda moleküllerle 24 sa inkübasyon sonrası veriyi göstermektedir. Veriler AK' ya normalize edilmiştir. Anlamlılık değeri *p<0,05 ve ** p<0,001' dir. AK: A549IL1 β (-) kontrol ILK: A549IL1 β (+) kontrol

A549IL1 β (+) hücrelerde A549IL1 β (+)’ lara göre mPGES-1 mRNA düzeyleri % 24 civarında yükselmiştir (p<0,05). Bu veri mPGES-1 protein düzeyinin artışıyla paraleldir. 6-gingerol doza bağımlı bir şekilde mPGES-1 mRNA düzeylerini artırmıştır (Şekil 4.30). Düşük konsantrasyonda mRNA düzeyini düşürürken; yüksek konsantrasyonlarda artışa sebep olmuştur. Artış anlamında en yüksek etkinlik 320 μ M için gözlenmiştir (p<0,05); ancak bu veri mPGES-1 protein düzeyleri ile paralellik göstermemektedir. 6-shogaol 240 μ M konsantrasyonda mPGES-1 protein düzeylerini (Şekil 4.14) azalttığı gibi mRNA düzeylerinde de düşüşe sebep olmuştur (p<0,05). Kurkumin 100 μ M’ da mPGES-1 proteini üzerindeki etkisine zıt olarak mRNA miktarında artışa sebep olmuştur (p<0,05).

mPGES-1 A549IL1 β (+) için sonuçlar.

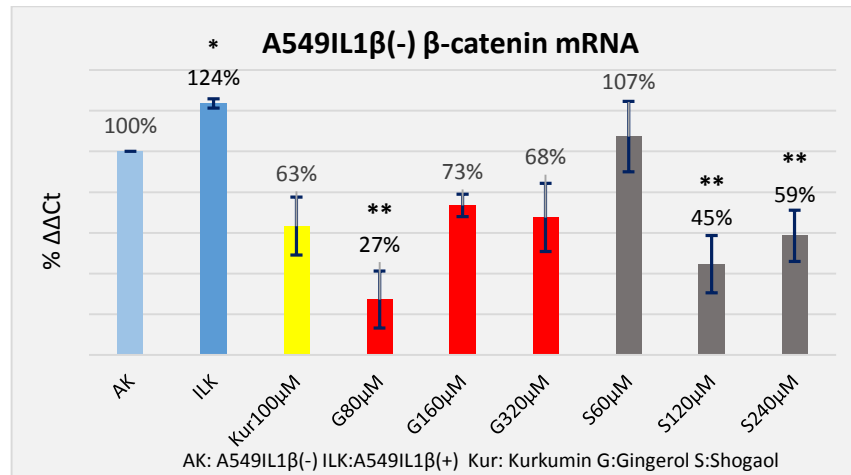
mPGES-1 mRNA düzeyleri 6-gingerol tarafından doza bağımlı bir şekilde yükseltilmiştir (p<0,05). 6-shogaol 240 μ M ve kurkumin 100 μ M konsantrasyonda mRNA düzeylerini

azaltırken; kurkumin 6-shogaole göre daha etkindir. Protein düzeyleri üzerindeki etkileri ile mRNA düzeyleri üzerindeki etkileri birbirine paraleldir. 6-gingerol ise doza bağımlı bir şekilde mRNA düzeylerini A549IL1 β (+) hücreleri için artırmıştır ($p<0,05$).



Şekil 4.31. A549IL1 β (+) hücrelerinde mPGES-1 mRNA düzeyleri 25,000 hücre/100μL ortamda moleküllerle 24 sa inkübasyon sonrası veriyi göstermektedir. Veriler ILK' ya normalize edilmiştir. Anlamlılık değeri * $p<0,05$ ' dir. AK: A549IL1 β (-) kontrol ILK: A549IL1 β (+) kontrol

β-catenin A549IL1β(-) için sonuçlar.

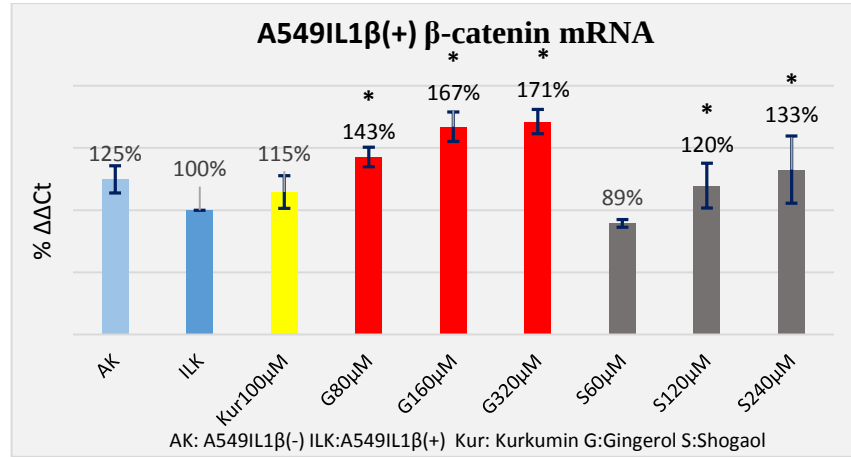


Şekil 4.32. A549IL1 β (-) hücrelerinde β-catenin mRNA düzeyleri 25000 hücre/100μL ortamda moleküllerle 24 sa inkübasyon sonrası veriyi göstermektedir. Veriler AK' ya normalize edilmiştir. Anlamlılık değeri * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ' dir. AK: A549IL1 β (-) kontrol ILK: A549IL1 β (+) kontrol

IL-1 β uygulanan hücrelerde uygulanmayanlara göre (Şekil 4.32) β-catenin mRNA düzeyleri yükselmiştir ($p<0,05$). Bu veri A549IL1 β (+) hücrelerdeki β-catenin protein düzeylerinin artışı (Şekil 4.18) ile paraleldir. 6-shogaolün 60 μM konsantrasyonu dışında, moleküllerin tamamı β-catenin düzeyini azaltmıştır. Kurkumin 100 μM' da ve 6-shogaol

için ($p<0,05$) protein düzeyinde meydana gelen değişim ile mRNA üzerindeki değişim birbirine paraleldir.

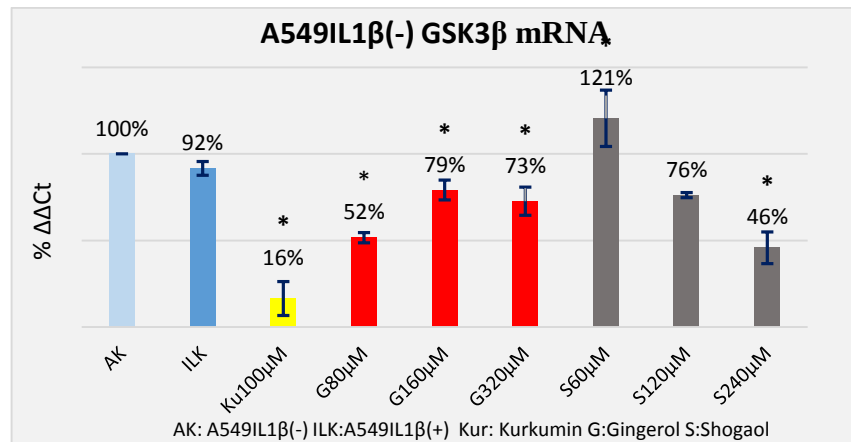
β -catenin A549IL1 β (+) için sonuçlar.



Şekil 4.33. A549IL1 β (+) hücrelerinde β -catenin mRNA düzeyleri 25,000 hücre/100 μ L ortamda moleküllerle 24 sa inkübasyon sonrası veriyi göstermektedir. Veriler ILK' ya normalize edilmiştir. Anlamlılık değeri * $p<0,05$ ' dir. AK: A549IL1 β (-) kontrol ILK: A549IL1 β (+) kontrol

A549IL1 β (+) hücre grubunda ise A549IL1 β (-) grubunun aksine tüm moleküller β -catenin mRNA düzeyini artırmıştır. 6-shogaol ve kurkuminin β -catenin protein düzeyini azaltıcı etkilerine rağmen, bu moleküllerin varlığında hücrede β -catenin mRNA düzeyleri kontrole göre yükselmiştir.

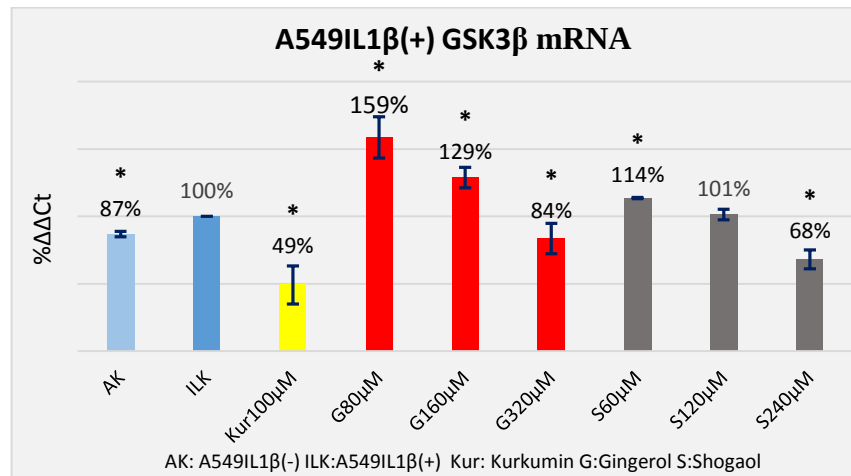
GSK3 β A549IL1 β (-) için sonuçlar.



Şekil 4.34. A549IL1 β (-) hücrelerinde GSK3 β mRNA düzeyleri 25,000 hücre/100 μ L ortamda moleküllerle 24 sa inkübasyon sonrası veriyi göstermektedir. Veriler AK' ya normalize edilmiştir. Anlamlılık değeri * $p<0,05$ ' dir. AK: A549IL1 β (-) kontrol ILK: A549IL1 β (+) kontrol

IL-1 β uygulanan hücrelerde uygulanmayanlara göre GSK3 β mRNA düzeyi, protein miktarlarındaki etkinin tersine azalmıştır. GSK3 β mRNA düzeylerinin kurkumin ve 6-shogaol tarafından azaltılması, aynı moleküllerin protein miktarını artırmaları ile ters bir etkidir ($p<0,05$).

GSK3 β A549IL1 β (+) için sonuçlar.



Şekil 4.35. A549IL1 β (+) hücrelerinde GSK3 β mRNA düzeyleri 25,000 hücre/100 μ L ortamda moleküllerle 24 sa inkübasyon sonrası veriyi göstermektedir. Veriler ILK' ya normalize edilmiştir. Anlamlılık değeri * $p<0,05$ ' dir. AK: A549IL1 β (-) kontrol ILK: A549IL1 β (+) kontrol

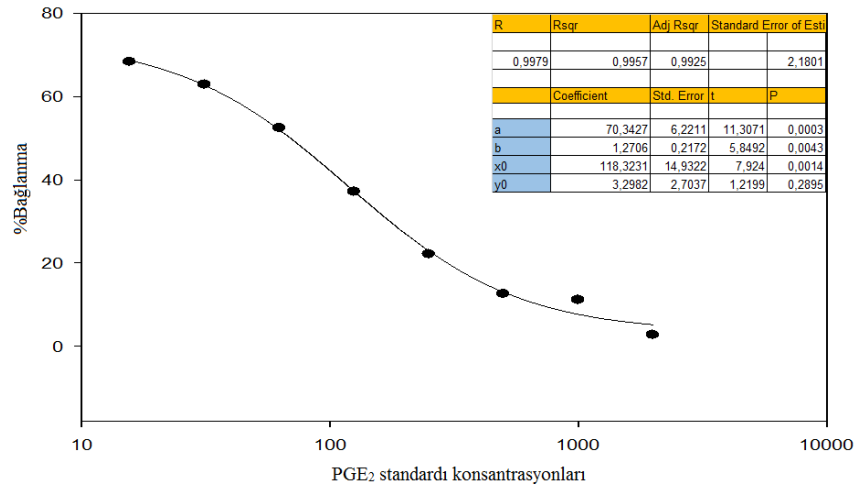
A549IL1 β (+) hücrelerinde mRNA düzeyleri kurkumin ile 6-shogaol için kontrole göre daha düşük bir seviyededir ve GSK3 β protein düzeyindeki etkileri bu sonuçla paralellik göstermektedir.

qRT-PCR verilerine genel olarak bakıldığında IL-1 β uygulaması ile hücrelerde mPGES-1 ve β -catenin mRNA düzeyleri artmış, GSK3 β düzeyleri ise düşmüştür. Bu veri IL-1 β ' nın mPGES-1 ve β -catenin için protein miktarında yapmış olduğu değişimle paralel olmasına rağmen GSK3 β için tam tersi bir durum söz konusudur.

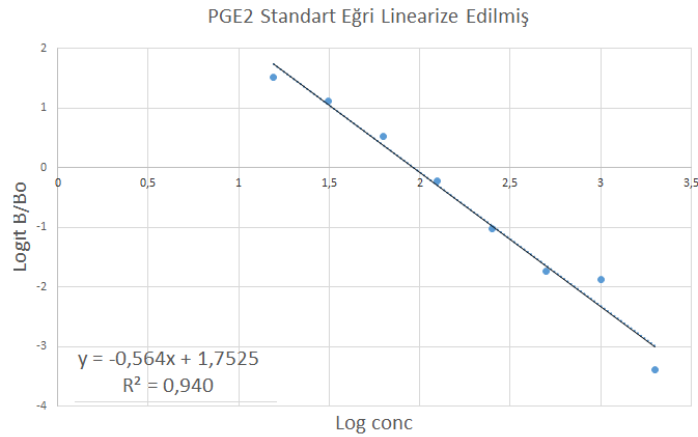
4.6. PGE₂ MİKTAR DENEYİ

PGE₂ miktarı için hücrelerin bulunduğu kuyulardan örnek alınmıştır. Örnekler, 3.3 bölümündeki gibi IL-1 β uygulanıp 24 saatlik inkübasyondan sonra, moleküller uygulanmadan hemen önce ve uygulandıktan sonra 12. ve 24. saatte alınmıştır. IL-1 β inkübasyonundan sonra besiyeri uzaklaştırılıp hücreler plakalara dağıtılmıştır. Moleküller uygulanmadan önce hücreler için bir yapışma zamanı tanınmış ve eski

besiyeri uzaklaştırılarak moleküller taze besiyerinde uygulanmıştır. Hücreler üzerinden uzaklaştırılan besiyerinde PGE₂ miktarı ölçülmüştür. Dolayısıyla bu veri hücrelerin yapıştığı ana kadar olan PGE₂ miktarını yansıtmaktadır. Bundan dolayı bulgularda verilen PGE₂ değerleri kümülatif verileri değil örneklerin alındığı andaki PGE₂ miktarlarını göstermektedir.



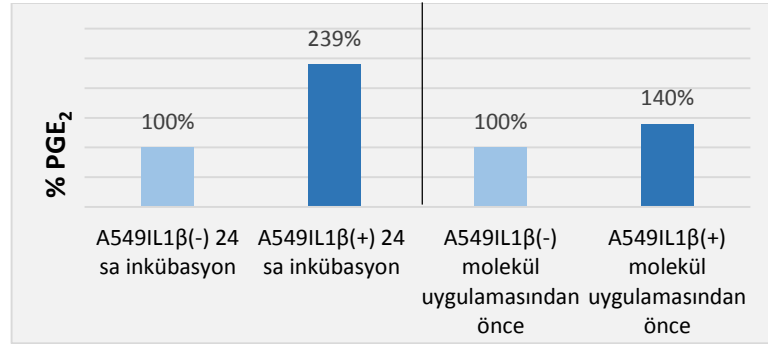
Şekil 4.36. PGE₂ standart eğri 4 parametrelili eğriye uygun
Eğri $r^2=0,9979$, $a=70,435$; $b=1,2706$; $x_0=118,32$; $y_0=3,29$



Şekil 4.37. PGE₂ standart eğri doğrusal hale getirilmiş
Eğri $r^2=0,940$ $y = -0,5564x + 1,753$

PGE₂ hesabı PGE₂ standart eğrisi ile yapılmıştır. Eğri öncelikle 4 parametrelili eğriye uygun olarak çizdirilmiş (Şekil 4.36) sonra logit transformasyon ile doğrusal (Şekil 4.37) hale çevrilmiştir.

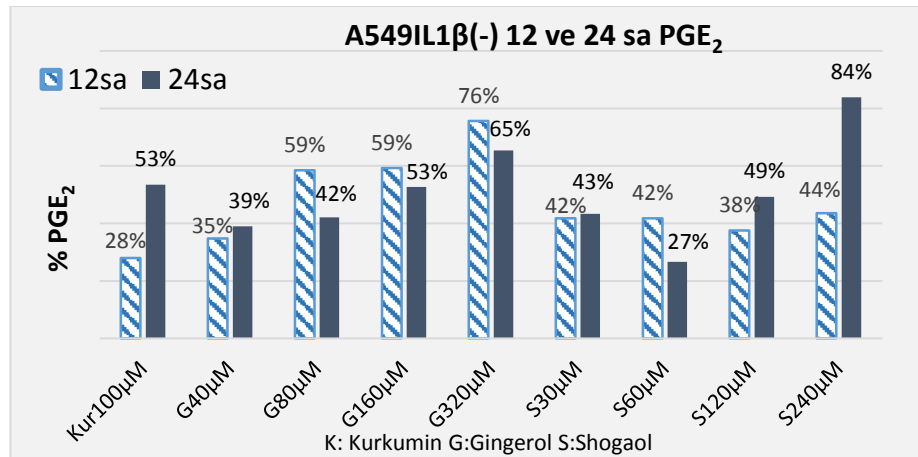
IL-1 β İnkübasyonundan sonra PGE₂ miktarı.



Şekil 4.38. IL-1 β sonrası ve molekül uygulaması öncesi PGE₂

Hücrelerin mPGES-1 enzimi ile indüklenme işlemi 75cm² lik flasklarda (2,5x10⁶hücre/10ml) yapılmıştır ve besiyeri uzaklaştırılırken alınmış örnekte ölçülen PGE₂, hücrelerin IL-1 β uygulandıktan sonra 24 saat boyunca üretmiş oldukları PGE₂ miktarını göstermektedir. Daha önce belirtildiği üzere A549IL1 β (-) hücelere IL-1 β uygulanmamıştır ve A549 hücreleri kendi başına PGE₂ üretmişlerdir. A549IL1 β (+) hücreler A549IL1 β (-) hücrelerine göre indüklenme süreci boyunca, % 139 daha fazla PGE₂ üretmişlerdir. Bu hücreler 24' lük plakalara (2,5x10⁵hücre/500 μ L) dağıtılmış ve moleküller uygulanmadan hemen önce alınan örnekten elde edilen veri, hücrelerin yapışana kadar ortama salmış oldukları PGE₂ miktarını göstermektedir. Buna göre A549IL1 β (+) hücreleri A549IL1 β (-) hücrelerine göre % 40 daha fazla PGE₂ üretmişlerdir (Şekil 4.38).

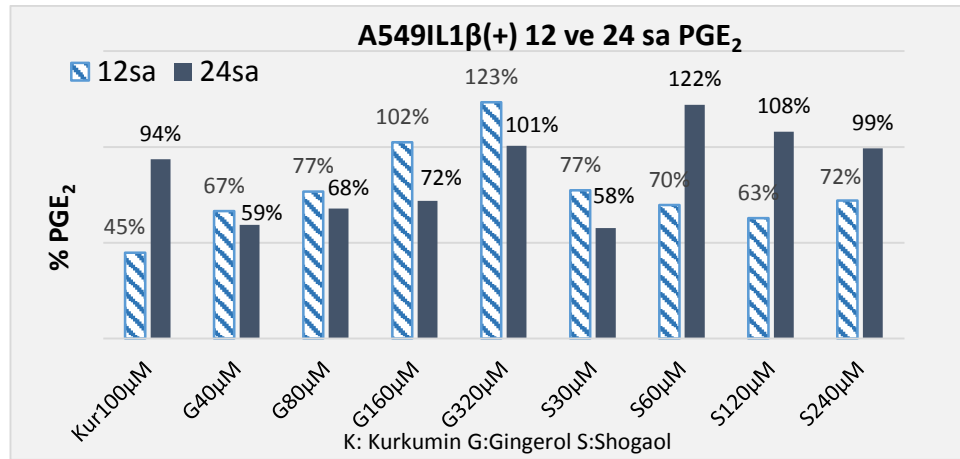
A549IL1 β (-) hücrelerinde moleküllerin 12 sa ve 24 sa sonunda PGE₂ üzerine etkisi



Şekil 4.39. A549IL1 β (-) hücrelerinde 12 ve 24. sa PGE₂ miktarı
Sonuçlar A549IL1 β (-) kontrole göre normalize edilmiştir

Moleküllerle 12 saatlik inkübasyon sonrasında A549IL1 β (-) hücrelerinde tüm moleküller kontrole göre PGE₂'yi azaltmışlardır; ancak 6-shogaol ve 6-gingerol için doza bağımlı bir etki görülmemektedir. Kurkuminin ve 240 μ M'da 6-shogaolün etkisinin 24. saat sonunda 12. saate göre azaldığı görülmüştür.

A549IL1 β (+) hücrelerinde moleküllerin 12 sa ve 24 sa sonunda PGE₂ üzerine etkisi



Şekil 4.40. A549IL1 β (+) hücrelerinde 12 ve 24. sa PGE₂ miktarı
Sonnular A549IL1 β (+) kontrole göre normalize edilmiştir

A549IL1 β (+) hücrelerinde moleküllerle 12 sa'lık inkübasyon sonucunda 6-gingerolün 320 μ M konsantrasyonu dışında tüm moleküllerde PGE₂ düzeyleri azalmıştır; ancak moleküllerin bu etkisi doza bağımlı değildir.

A549IL1 β (+) hücrelerinde 24. saat verileri göz önüne alındığında PGE₂ düzeyleri 6-shogaol için sadece 30 μ M konsantrasyonda düşerken; diğer dozlarda yükselmiştir. Kurkumin ve 6-gingerolde ise 24. saat sonunda genel olarak 12 saatlik verilerle paralel bir etki vardır. Kurkuminin etkisi 24. saat sonunda 12. saate göre azalmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser tüm Dünya’da kardiyovasküler rahatsızlıkların ardından gelen en ölümcül ikinci hastalıktır. Akciğer kanseri ise tüm kanser vakaları içinde en sık görülenidir. Morfolojisine göre SCLC ve NSCLC olarak ikiye ayrılmaktadır. Daha iyi tedavi sağlayabilmek amacıyla kanser moleküler mekanizmaları üzerinde çalışmalar yapılarak hastalığın daha iyi anlaşılmasına çalışılmaktadır. Örneğin, EGFR mutasyonu taşıyan hastalarda erlotinib ile tedavide % 58 oranında fayda sağlanmıştır. Ayrıca, akciğer kanserinde mutasyona uğrayan β -catenin’in yeni bir tedavi hedefi olabileceğine inanılmaktadır. Dolayısıyla β -catenin düzeylerinin düşürülmesi ile antikanser etki elde edilebilir. β -catenin’in önemli bir aktivatörü ise EP₂ reseptörleri üzerinden etki eden PGE₂’dir. β -catenin normalde hücre içinde GSK3 β enzimi tarafından sürekli fosforillenerek yıkılır ve dolayısıyla aktif GSK3 β varlığında hücre çoğalmasını tetikleyemez; ancak GSK3 β ’nın PGE₂ aracılığıyla başlatılan mekanizmalarla fosforillenmesi inaktivasyonuna sebep olur ve fonksiyonunu yitirmesi sonucunda, ortamda β -catenin miktarı artar. Kanser hücrelerinin malignitesi artar. Dolayısıyla hücrede PGE₂ miktarının azaltılmasına bağlı olarak β -catenin düzeylerinin düşürülmesi sonucunda antikanser etki oluşabilir. PGE₂ düzeyinin azaltılması üretiminden en çok sorumlu tutulmasıyla beraber, kanser için potansiyel bir hedef olan mPGES-1 enziminin inhibisyonu ile sağlanabilir ve ilaç firmaları bu düşünceden yola çıkarak enzimi doğrudan inhibe etmeye yönelik olarak bilinen en güçlü mPGES-1 inhibitörü, MF-63’ü ve aynı etkiyi gösteren MK-886’yı sentezlemişlerdir (11,81). Dolayısıyla mPGES-1 inhibitörlerinin kanser için potansiyel bir ilaç grubu olabileceği düşünülmektedir.

mPGES-1 inhibitörlerinin sentezlenmesinden önce inhibitörler için mPGES-1 ile benzer bağlanma bölgeleri taşıyan COX-2 enzimini inhibe eden selekoksib, rofekoksib, sulindak sülfid gibi moleküllerin kanser tedavisinde faydalı olduğu bulunmuştur (82); ancak COX-2 inhibitörleri kanseri baskılama özelliğine sahip olsa da, bu ilaç grubu klinik anlamda endişelere yol açmıştır. Rofekoksib ile yapılan adenoma oluşumunu önleme klinik çalışmasında (APPROVe) bazı kardiyovasküler yan etkiler gözlenmiştir. Selektif COX-2 inhibitörü alanlarda myokard enfarktüsü ve felç geçirme riski artmakla beraber enfarktüs sonrasında hayatta kalma oranının azaldığı tespit edilmiştir. Bunun sebebi de protrombotik özelliğe sahip TxA₂ gibi eikozanoidlerin üretimindeki dengesizliğe bağlanmıştır (44). Dolayısıyla mPGES-1 inhibitörleri, sadece mPGES-1 üzerinden etki gösterdiğinden, TxA₂ gibi eikozanoidlerin üretiminde daha az dengesizlik oluşturması beklenebilir. Bundan yola çıkarak mPGES-1 knockoutu sonucunda araşidonik asit yolağında yeni düzenlemelerin olup olmadığı ve PGE₂ dışındaki prostaglandinlerin bundan nasıl etkilendiği konusunda çalışmalar yapılmıştır. mPGES-1 knockout farelerde prostasiklin düzeylerinin yükseldiği; ancak bununla beraber tromboksan düzeylerinin normal aralıklarda seyrettiği gözlenmiştir. Antiagregan prostasiklin/agregan tromboksan oranının antiagregan tarafına kaydığı ve mPGES-1 inhibisyonuyla kardiyovasküler yan etkilerin COX-2 inhibitörlerine göre daha az görülmesi beklenmektedir. Normalde PGH₂'nin prostaglandin sentezleyen diğer enzimler tarafından daha fazla kullanılması beklendiğinden, mPGES-1 knockoutlu farede PGE₂ dışındaki prostaglandinlerin daha fazla üretilmesi gerekir; ancak Cheng et al (83) yaptığı çalışmada böyle bir olay gözlenmemiştir. Prostaglandinlerin üretimindeki değişimlerin dokuya spesifik oluşup oluşmayacağı ise belli değildir. Dolayısıyla A549 hücrelerinde PGE₂ düzeylerini azaltan 6-shogaol için diğer prostaglandinlerin düzeyinin değişmesi beklenmemektedir; ancak bunu kesin olarak açıklığa kavuşturmak için diğer prostaglandinlerin düzeyinin ölçülmesi önerilebilir.

mPGES-1, COX-2 ile ortak bir şekilde çalışmakla birlikte özellikle kolon ve akciğer kanserinde düzeylerinin yükseldiği bilinmektedir (84). COX-2 ve mPGES-1 ile kotransfekte edilen insan böbrek embriyonik HEK-293 hücreleri fareye subkutan olarak enjekte edildikten sonra büyük ve iyi derecede damarlanmış tümörler oluştuğu görülmüştür. İnsan kolon kanseri hücresi HCA-7' nin mPGES-1 inhibitörleri veya antisense oligonükleotitleri varlığında hücre çoğalması azaltılırken; mPGES-1

ekspresyonunun artması ile hücre çoğalması artmıştır (85). PGE₂ düzeylerini düşüren 6-shogaol ise A549 hücreleri için canlılığı azaltmıştır ve sitotoksik etkisine PGE₂ ile beraber mPGES-1 protein düzeylerini azaltması yardımcı olmuş olabilir ve kurkuminle kıyaslandığında bu anlamda daha etkindir. Aynı durum 6-gingerol için söylenememektedir. PGE₂ düzeyleri 6-gingerol tarafından düşürüldüğü görülmüş; ancak canlılık azalmamıştır. Bu da 6-shogaolün sitotoksik etkisinde sadece PGE₂'nin rol oynamadığını düşündürmektedir.

mPGES-1 enzimi IL-1 β , LPS, TNF α ile indüklenebilen bir enzimdir ve indüklenmesi sonucunda PGE₂ üretiminin artması beklenmektedir.

A549 hücreleri, IL-1 β ve TNF- α varlığında COX-2 ekspresyonu ve PGE₂ üretimini artırarak yanıt verir. Hücredeki COX-2 ekspresyonu deksametazon ile baskılanabilmektedir (86). A549 hücrelerinde IL-1 β varlığı COX-2 ile beraber mPGES-1 indüklenmesine yol açmıştır. mPGES-1 glutatyona bağımlı olarak çalışmaktadır ve LTC₄ gibi bir sisteinil lökotrien verildiğinde PGES aktivitesinin IC₅₀ 5 μ M dozda baskılandığı görülmüştür. Glutatyonsuz ortamda PGE₂ üretilmediği tespit edilmiştir (86). Çalışmamızda, NSCLC tipindeki A549 hücrelerinin 1 ng/ml konsantrasyonda IL-1 β 'ya 24 sa boyunca maruz kalması sonucunda bu bulgularla paralel olarak mPGES-1 protein düzeyleri ve onun ürünü olan PGE₂ yükselmiştir. Bu enzimin mRNA düzeylerinin IL-1 β tarafından artırılması, mPGES-1 protein miktarının artışında mRNA'nın doğrudan rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Bununla beraber GSK3 β protein düzeyinin düşmesine paralel olarak mRNA düzeyinin de azalması, IL-1 β tarafından GSK3 β protein düzeyinde meydana getirilen değişimin GSK3 β mRNA düşüşüne bağlı olduğunu düşündürmektedir. p-GSK3 β düzeyleri ise IL-1 β varlığında artmıştır. Dolayısıyla ortamda aktif GSK3 β miktarı IL-1 β tarafından hem total GSK3 β düzeyinin azaltılması ile hem de GSK3 β 'nın fosforillenerek inaktive edilmesine bağlı olarak azaltılmıştır. Bundan yola çıkarak normalde GSK3 β tarafından fosforillenerek yıkılan β -catenin miktarı hücre içinde artmış ve MTT ile GZHA deneylerinde IL-1 β uygulanan hücrelerin proliferasyonundaki artışın ortamda miktarı artan β -catenin aracılığıyla gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmüştür. Hem A549IL1 β (+) hücrelerde PGE₂ üretimi mPGES-1 protein düzeyleri yüksek seyretse bile zamana bağımlı olarak azalmaktadır. En çok PGE₂ üretimi daha indüksiyon aşamasında görülürken, hücrelerin dağıtılması ve moleküllerin uygulanmasından hemen önce alınan örneklerde PGE₂, IL-1 β uygulanmayan gruba göre

hala yüksek olduğu görülse de, indüksiyon aşamasındaki kadar çok değildir. Buna dayanarak IL-1 β 'nın mPGES-1 üzerindeki etkisinin zamanla azaldığı veya mPGES-1' in substrat olarak kullandığı PGH₂ ve PGG₂'yi tüketmiş olabileceği sonucuna varılabilir. Substratları sağlayan COX-2 enziminin protein düzeylerine bakılması bu durum hakkında fikir sahibi olunmasını sağlayabilir. Bununla birlikte kurkuminin antienflamatuvar ve antikanser etkinlik gösterdiği ve bu etkiyi arasıdonik asit yolağını etkilemesi sonucunda oluşturduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda COX-2 mRNA ekspresyonunu ise azaltmaktadır. COX-1 düzeylerinin ise kurkumin tarafından etkilenmediği görülmüştür (13,87). En az kurkumin kadar etkin olan 6-shogaolün ise COX-1 ve COX-2 üzerine olan etkileri araştırılmaya değerdir.

NS-398 antienflamatuvar bir ajan olan nimesulidin türevi olarak Japonlar tarafından sentezlenmiştir ve COX-2'ye seçiciliği COX-1'e göre 2000 kat kadardır. Rofekoksibe göre 2 kat, selekoksibe göre 5 kat kadar daha fazla COX-2 seçiciliği mevcuttur; ancak biyoyararlanım problemleri bulunmaktadır ve hepatotoksik metabolitleri bulunmaktadır (44, 88). Dolayısıyla 6-shogaol ile yapılacak çalışmalarda izole hücre kültürü yerine deney hayvanı modelleri molekülün sistemik etkisini görmek açısından daha faydalı olacaktır. Molekülün araştırılan yolak üzerinde etkinliği vardır; ancak genel toksisitesi hakkında daha fazla bilgi sahibi olunabilir.

Çalışmamızda 6-shogaol ve 6-gingerolün mPGES-1 inhibisyonu yaptığı bilinen kurkumin ile karşılaştırılması sonucunda hücreler üzerinde benzer etkilerin oluşup oluşmadığı araştırılmıştır. A549IL1 β (-) hücreleri için, kurkumin beklendiği gibi mPGES-1 protein düzeylerini azaltmıştır; ancak mPGES-1 mRNA düzeylerinin kurkumin varlığında yükselmesi, proteindeki azalmanın mRNA'dan bağımsız olarak gerçekleştiğini düşündürmektedir. β -catenin protein ve mRNA düzeylerinin aynı anda azaltılması ise proteindeki değişimin mRNA'daki azalış ile ilişkili olarak meydana gelmiş olabilir. Aynı zamanda β -catenin protein miktarında görülen düşüş GSK3 β protein düzeylerinin kurkumin tarafından artırılmasına bağlı olarak gerçekleşmiş olabilir; ancak beklenmedik bir şekilde GSK3 β fosforilasyonu artmıştır. β -catenin düzeyindeki düşüş göz önüne alındığında total GSK3 β artışı, p-GSK3 β artışından daha fazla gerçekleşmiş olabilir. PGE₂ düzeyleri 12. ve 24. sa sonunda kurkumin tarafından azaltılmıştır. PGE₂'deki bu düşüş kurkuminin hem mPGES-1 enzim inhibitörü olmasından hem de mPGES-1 protein düzeylerini azaltmasından kaynaklanıyor olabilir. LPS ile indüklenen HL-60

hücresinde yapılan bir çalışmada ise gingerol analoglarının PGE₂ üretimini COX-2 mRNA indüklenmesini inhibe ederek azalttığı tespit edilmiştir (89). Kurkumin aynı zamanda COX-2 mRNA düzeylerini düşürmektedir.

A549IL1 β (-) hücreleri için 6-gingerol ise mPGES-1 protein düzeyini azaltmış; ancak mRNA düzeylerini yükseltmiştir. β -catenin, GSK3 β , p-GSK3 β protein düzeyleri ise artmıştır. 6-gingerol 12 sa ve 24 sa sonunda PGE₂ düzeylerini düşürmüştür. 6-gingerol mPGES-1 protein düzeyini artırsa bile mPGES-1 aktivitesini azaltmış olabilir; bundan dolayı PGE₂ miktarı 12. ve 24. saat sonunda kontrole göre daha azdır, ancak PGE₂' nin 6-gingerol tarafından azaltılması olayının antikanser etkinlikte rol oynamadığı görülmüştür. A549IL1 β (+) hücrelerinde ise sonuçlar A549IL1 β (-) hücrelerindekiyle benzemekle birlikte GSK3 β protein ve mRNA düzeyi azalmıştır. 6-gingerolün A549IL1 β (+) hücrelerinde antikanser etki göstermediği görülmüştür.

A549IL1 β (-) hücreleri için 6-shogaol özellikle 240 μ M konsantrasyonda mPGES-1 ile β -catenin protein ve mRNA düzeylerini birbirine paralel olarak azaltmıştır. mPGES-1 ve β -catenin protein düzeylerindeki değişim doğrudan mRNA düzeylerinin azaltılmasına bağlı gerçekleşmiş olabilir. GSK3 β protein düzeyi ise 6-shogaol tarafından yükseltilmiş; ancak mRNA düzeyi düşmüştür. GSK3 β fosforilasyonunun azaltıldığı ise protein düzeyleri üzerinden tespit edilmiştir. Buna ek olarak 12. sa ve 24. sa PGE₂ miktarı 6-shogaol tarafından azaltılmıştır. Hücre proliferasyonunu azaltıcı etkisi ise 60 μ M civarında bir IC₅₀ hesaplanarak gösterilmiştir. 6-shogaol için tüm bu veriler göz önüne alındığında molekül antikanser etkisini mPGES-1, GSK3 β , β -catenin yolağı üzerinden gösteriyor olabilir. Bu etkinin oluşmasında hem PGE₂' nin azaltılması hem de GSK3 β üzerinden β -catenin düzeyinin azaltılması rol oynamış olabilir. Aynı zamanda 6-shogaolun, β -catenin protein ve mRNA düzeylerini doğrudan düşürmüş olabileceği sonucu çıkarılabilir. Dolayısıyla NSCLC için yeni bir tedavi hedefi olarak görülen β -catenin ve mPGES-1 inhibisyonu için potansiyel bir adaydır. A549IL1 β (+) hücrelerinde sonuçlar 240 μ M için A549IL1 β (-) hücrelerindekiyle paralel olmakla birlikte β -catenin mRNA düzeyleri azalmıştır. 6-shogaol varlığında, IL-1 β ile indüklenmiş hücrelerde β -catenin protein düzeylerinin düşmesi hücreler tarafından mRNA miktarı artırılarak kompanse edilmeye çalışılıyor olabilir. Bununla birlikte 6-shogaol, her iki hücre grubunda PGE₂ düzeylerini azalttığından potansiyel bir mPGES-1 inhibitörüdür ve veriler göz önüne alındığında en az kurkumin kadar etkilidir.

mPGES-1 knockout farelerde kolon kanserini indükleyen organa özgül azoksimetan tedavisi sonrasında kolon adenomasının oluşumu belirgin şekilde baskılanmıştır. Aynı zamanda hücre içinde biriken β -catenin düzeylerinde azalma görülmüştür. β -catenin kanser oluşumunda önemli rol oynadığı düşünülmekle beraber β -catenin alt yolağında yer alan c-myc, siklin D1 gibi hedefler konusunda daha fazla araştırılma yapılmasına ihtiyaç vardır (56). Bizim çalışmamızda özellikle 6-shogaol için β -catenin düzeylerinin azaldığı gözlenmiştir ve bu etkinin PGE_2 üzerinden yönetilen GSK3 β aracılığıyla gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmüştür; ancak PGE_2 düzeyini azaltan 6-gingerol için β -catenin düzeyinin artması, GSK3 β ve β -catenin üzerinde sadece PGE_2 'nin değil başka mekanizmaların var olabileceğini ve bunların 6-shogaol tarafından etkilenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Aynı zamanda zencefilin kanser profilaksisine katkı sağlayabileceği sonucuna varılabilir.

IL-1 β genel olarak mPGES-1, β -catenin, GSK3 β , p-GSK3 β açısından beklenen şekilde etki etmiştir. mPGES-1, β -catenin protein düzeyleri artmış ve bununla beraber p-GSK3 β düzeyi artmıştır; ancak IL-1 β ile PGE_2 düzeyinin artışının zamana bağımlı olduğu görülmüş ve bundan dolayı etkinin zamanla azaldığı sonucuna varılmıştır. Hücrelerin IL-1 β ile indüklenmesinden sonra tripsinize edilmesi bu olayda negatif bir rol oynamış olabilir. IL-1 β etkisinin zamana bağımlı olup olmadığı indükleme protokolünden tripsinleme işleminin çıkarılarak, IL-1 β dahil tüm maddelerin tek bir plaka içinde birbirini takip edecek şekilde hücreler tripsinlenmeden uygulanması yoluyla denemeye alınabilir.

Moleküller uygulandıktan sonra genel olarak 24 saatlik veriler kullanılmıştır. Moleküllerin mPGES-1, β -catenin, GSK3 β ilişkisi düşünüldüğünde özellikle GZHA deneylerinde kurkumin ve 6-shogaol gibi çok hızlı bir şekilde hücre canlılığını düşüren moleküller uygulandıktan sonra, akut etkiyi görmek açısından protein, mRNA, PGE_2 örnekleri 24 saat yerine 2 ve 4 saat gibi daha kısa zaman dilimleri içinde alınabilir. Bu noktalarda alınan örneklerde mRNA ve protein düzeylerinin paralel olarak değişip değişmediği gözlenebilir; çünkü 24 saat sonunda kanser hücresi moleküllerin etkilerine karşı mekanizmalar geliştirmiş olabilir. Aynı zamanda kurkumin ve 6-shogaolün sitotoksik etkisinin kanser hücrelerine karşı seçici olup olmadığının gözlenmesi için deneyler aynı zamanda sağlıklı akciğer epitel hücrelerinde yürütülebilir. Buna ek olarak moleküllerin protein düzeylerini artırma azaltma etkisi yanında enzim fonksiyonunu nasıl etkilediği 'enzim inhibisyonu testleriyle araştırılabilir. Moleküller enzimin protein

düzeylerini artırıp, aynı anda enzimin katalizlediği reaksiyonları inhibe etme özelliğine sahipse, bu durumda moleküllerin enzim üzerindeki net etkisi açısından farklı sonuçlara ulaşılabilir.

Ha et al yaptığı çalışmada 6-shogaol maddesinin BV-2 mikrogliya hücrelerinde enflamatuar yanıt üzerindeki etkisine bakılmış ve COX-2, MAPK, nükleer faktör kappa (NFκβ) ekspresyonunun down regüle olduğu, PGE₂ düzeyinin azaldığı ve 6-shogaol maddesinin antienflamatuar etkinlik gösterdiği sonucuna varılmıştır (90). 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol maddeleri lipopolisakkarit ile indüklenmiş enflamatuar yanıtı sahip RAW 264.7 hücresinde Dugasania et al PGE₂ üretimini doza bağımlı bir şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir (91). LPS ile indüklenen HL-60 hücrelerinde Jolad et al tarafından yapılan çalışmada *Zingiber officinalis* ekstresi karışımı denenmiş ve ekstrenin PGE₂ üretimini indometazinle karşılaştırılabilir kadar iyi derecede inhibe ettiği gösterilmiştir (14). Bizim çalışmamızda A549 hücrelerinde PGE₂ düzeylerinin 6-shogaol, 6-gingerol ve kurkumin tarafından azaltıldığı gözlenmiştir. Zencefil ekstrsinde bulunan gingerol ve shogaolün PGE₂ düzeylerini azalttığı görölse de kanser hücreleri üzerinde 6-shogaolün 6-gingerole ve kurkumine göre daha etkin olduğu tespit edilmiştir.

EP reseptörleri ve COX-2' nin ekspresyonunun özofagus adenokarsinomunda arttığı gözlenmiştir. COX-2 haricinde PGE reseptörlerinden EP₂ ve EP₄' ün de Barrett ile ilişkili adenokarsinomunda önemli hedefler olabileceği vurgulanmıştır (92, 93). Aynı zamanda hem COX-2 inhibisyonunun hem de EP₂ antagonizminin, anjiyogenezi ve tümör invazyonunu, tümörlerin çoğalma olayında önemli role sahip ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü sistemini baskılaması ile inhibe ettiği düşünülmektedir (94). Dolayısıyla 6-shogaol' ün PGE₂ azaltıcı etkisinden dolayı farklı kanser hücre hatlarında birden çok mekanizma üzerinden etkili olabileceği düşünülebilir. PGE₂' nin EP₄ üzerindeki etkisinin azaltılması ile akciğer kanseri invazyonunun azaltılabileceği sonucuna varılmıştır (95). Akciğer kanseri hücrelerinde invazyon modelleri oluşturarak 6-shogaolün etkisi araştırılabilir.

Yeni bir molekül olarak PC3 ve DU145 hücrelerinde denenilen PKF118-310' un hücre proliferasyonu ile beraber Wnt/β-catenin sinyalini inhibe ettiği gösterilmiştir. Wnt/β-catenin yolağı PGE₂ aracılığıyla tetiklenmektedir. Bu yolağın anormal çalışması sonucunda hücre proliferasyonu ve apoptozu düzenleyici rollerinden dolayı tümör gelişiminin tetiklendiği bilinmektedir. Bu yolda Wnt3A gibi ligandlar bulunsa da PGE₂'

nin etkisinin GSK3 β üzerinden oluştuğu bilinmektedir (82). Dolayısıyla hem doğrudan Wnt/ β -catenin yolağını inhibe edebilecek yeni sentezlenmiş PKF118-310 hem de PGE₂ etkisini azaltacak mPGES-1 inhibitörleri veya EP reseptör antagonistleri antikanser etkinlik oluşturabilir. Bizim çalışmamızda ise 6-shogaolün β -catenin protein düzeylerini etkin bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir.

PGE₂ analogu ve EP₂ agonisti butaprost, özofagus skuamöz hücrelerinde hücre çoğalmasını ve ERK (ekstrasellüler sinyal ile regüle olan kinaz) fosforilasyonunu artırmaktadır. Aynı çalışmada EGFR fosforilasyonunun ise artmadığı görülmüştür. PGE₂ ve EP₂' nin etkisini protein kinaz C/ERK sinyal yolağı aktivasyonunu sağlayarak ve bu yolağın alt basamaklarında yer alan AP-1, fos, jun ve c-myc gibi büyüme ile ilişkili genleri etkileyerek gösterdiği düşünölmektedir (96). Dolayısıyla 6-shogaolün aynı yolak üzerindeki etkisine A549 hücrelerinde bakılabilir.

Kawamori et al EP₁ geninin deneysel olarak bozulduğu ve azoksimetan ile indüklenerek oluşturulan kanser modelinde, kanser görölme sıklığının, büyüklüğünün ve çeşitliliğinin belirgin derecede azaldığı gözlenmiştir (97). EP₂ geninin deneysel olarak bozulduğu çalışmada çeşitlilik, büyüklük, anjiyogenez ve VEGF ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiş; ancak EP₁ knockout yapılması sonucunda herhangi bir antikanser etki görölmemiştir. EP₂ knockout' u sonucunda COX-2 ekspresyonunun baskılandığı ve önemli bir sonuç olarak PGE₂' nin EP₂ üzerinden COX-2 ekspresyonunu arttırdığı bulgusuna varılmıştır (9). Dolayısıyla mPGES-1 enzim inhibisyonu sağlayabilecek inhibitörlerle beraber, PGE₂ reseptör antagonistlerinin kanser tedavisinde faydalı olabileceğı düşünölebilir.

Sonuç olarak 6-gingerol ve 6-shogaolün A549 hücreleri üzerinde antikanser etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada, 6-shogaolün hücre proliferasyonunu en az kurkumin kadar azalttığı ve bu etkisini de mPGES-1, β -catenin ve GSK3 β ' nin dahil olduğu yolak üzerinden gerçekleştirdiğı ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. mPGES-1 inhibitörleri ve PGE₂ antagonistleri özellikle PGE₂ metabolitlerinin arttığı kanser tiplerinin tedavisi için potansiyel bir hedef olarak görölmele birlikte 6-shogaol iyi bir adaydır.

6. KAYNAKLAR

1. Rang H P, Dale M M, Ritter J M, et al. Drugs used for the treatment of infections, cancer and immunological disorders, Anticancer drugs, In: Rang and Dale's Pharmacology (7th ed), Elsevier Churchill Livingstone, Spain, 2012: p 673-687.
2. IARC Press Release, Latest world cancer statistics, World Health Organization Report N°223, France, 2013: p 1-3.
3. Gültekin M., Boztaş G., Türkiye Kanser İstatistikleri, T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Türkiye, 2014: p 19-27.
4. Kayaalp O, Kanser Kemoterapisinin Esasları ve Antineoplastik İlaçlar, In: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji (12. baskı), Pelikan Yayıncılık, Ankara, 2009: p 315-342.
5. Shiroa T., Takahashia H, Kakiguchi K et al. Synthesis and SAR study of imidazoquinolines as a novel structural class of microsomal prostaglandin E₂ synthase-1 inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2012; 22(1): 285-288.
6. Hata A N, Breyer R M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: Multiple roles in inflammation and immune modulation. Pharmacology & Therapeutics 2004; 103(2): 147-166.
7. Berthon A, Martinez A, Bertherat J et al. Wnt/ β -catenin signalling in adrenal physiology and tumour development. Molecular and Cellular Endocrinology. 2012; 351(1): 87-95.

8. Lee E O, Shin Y J, Chong Y H. Mechanisms involved in prostaglandin E₂-mediated neuroprotection against TNF- α : possible involvement of multiple signal transduction and β -catenin/T-cell factor. *Journal of Neuroimmunology* 2004; 155(1–2): 21-31.
9. Sonoshita M, Takaku K, Sasaki N et al. Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP₂ in Apc716 knockout mice. *Nature Medicine* 2001; 7: 1048-1051.
10. R E Harris. Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. *Inflammopharmacology* 2009; 17: 55-67.
11. Li Y Q, Yin S M, Nie D N et al. MK886 inhibits the proliferation of HL-60 leukemia cells by suppressing the expression of mPGES-1 and reducing prostaglandin E₂ synthesis. *Int J Hematol* 2011; 94: 472-478.
12. Legge F, Paglia A, D'Asta M et al. Phase II study of the combination carboplatin plus celecoxib in heavily pre-treated recurrent ovarian cancer patients. *BMC Cancer* 2011; 11(214): 1-9.
13. Koeberle A, Haberle E-M, Rossic A et al. Discovery of benzo[g]indol-3-carboxylates as potent inhibitors of microsomal prostaglandin E₂ synthase-1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2009; 17(23): 7924-7932
14. Jolad S H, Lantz E C, Solyom A M et al. Fresh organically grown ginger (*Zingiber officinale*): composition and effects on LPS-induced PGE₂ production. *Phytochemistry* 2004; 65: 1937-1954.
15. Kurian A W, Hare E E, Mills M A et al. Clinical Evaluation of a Multiple-Gene Sequencing Panel for Hereditary Cancer Risk Assessment. *Journal of Clinical Oncology* 2014; 32(11): 1-9.
16. Croce C M. Oncogenes and Cancer. *Molecular origins of cancer* 2008; 358 (5): 502-511.
17. Kato G J, Dang G V. Function of the c-Myc protein. *The FASEB Journal* 1992; 3065-3072.
18. Johansson C H, Brage S E. BRAF inhibitors in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 2014; 142: 176-182.

19. Harbecka N, Beckmann M W, Rody A et al. HER2 dimerization inhibitor pertuzumab- mode of action and clinical data in breast cancer. *Breast Care* 2013; 8: 49-55.
20. Weinstein I B, Joe A K. Mechanisms of Disease: oncogene addiction a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nature Clinical Practice Oncology* 2006; 3(8): 448-457.
21. Assis L V M, Locatelli J, Isoldi M C. The role of key genes and pathways involved in the tumorigenesis of Malignant Mesothelioma. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014; 1845: 232-247.
22. Pitts M T, Davis S L, Eckhardt S G et al. Targeting nuclear kinases in cancer: Development of cell cycle. *Pharmacology & Therapeutics* 2014; 142: 258-269. kinase inhibitors
23. Selivanova G. Wild type p53 reactivation: From lab bench to clinic. *FEBS Letters* 2014; In Press.
24. Greenhough A, Smartt H J M, Moore A E et al. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 2009; 30 (3): 377-386.
25. Hanahan D, Weinberg R A. The Hallmarks of Cancer. *The Cell* 2000; 100: 57-70.
26. Jesus B B, Blasco M A. Telomerase at the intersection of cancer and aging. *Trends in Genetics*, 2013; 29(9): 513-520.
27. Mocellin S, Pooley K A, Nitti D. Telomerase and the search for the end of cancer. *Trends in Molecular Medicine* 2013; 19(2): 125-133.
28. Cathcart M C, Gately K, Cummins R et al. Thromboxane synthase expression and correlation with VEGF and angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014; 1842: 747-755.
29. Kang K B, Wang T T, Woon C T et al. Enhancement of glioblastoma radioresponse by a selective COX-2 inhibitor celecoxib: inhibition of tumor angiogenesis with extensive tumor necrosis. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 2007; 67(3): 888-896.
30. Friedl P, Alexander S. Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity. *Cell* 2011; 147: 992-1003.
31. Sahai E. Mechanisms of cancer cell invasion. *Current Opinion in Genetics & Development* 2005; 15: 87-96.

32. Oliveira P A, Colaço A, Chaves R et al. Chemical carcinogenesis. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 2007; 79 (4): 593-616.
33. Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2011; 12: 175-180.
34. Miller Y E. Pathogenesis of Lung Cancer 100 Year Report. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33: 216-223.
35. Langevin S. M. Kratzke R. A. Kelsey K et al. Epigenetics of lung cancer. *Translational Research*; In Press: 2014; 1-17.
36. WEB_1 (2014). National Cancer Institute resmi sitesi. [http:// www.cancer.gov/cancertopics/types/ lung](http://www.cancer.gov/cancertopics/types/lung) (20.04.2014).
37. Rosell R, Bivona T G, Karachaliou N. Genetics and biomarkers in personalisation of lung cancer treatment. *Lancet* 2013; 382: 720-731.
38. Abidin A Z, Garassino M C, Califano R et al. Targeted therapies in small cell lung cancer: a review. *Ther Adv Med Oncol* 2010; 2(1): 25-37.
39. Brunton L. L. Lipid-derived autacoids: eicosanoids and platelet-activating factor, In: Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics McGraw-Hill Companies, USA, 2008: p 417-427.
40. Cathcart M C, O'Byrne K J, Reynolds J V et al. COX-derived prostanoid pathways in gastrointestinal cancer development and progression: Novel targets for prevention and intervention. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1825: 49-63.
41. Murakami M, Kudo I, Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. *Progress in Lipid Research* 2004; 43: 3-35.
42. Kayaalp O, Eikzanoidler (Araşidonik asid metabolitleri) ve diğer otakoidler, In: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji (12. baskı), Pelikan Yayıncılık, Ankara, 2009: p 1281-1298.
43. Ricciotti E, FitzGerald G A, Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31: 986-1000.
44. Nakanishi M, Gokhale V, Meuillet E J et al. mPGES-1 as a target for cancer suppressionq A comprehensive invited review "Phospholipase A2 and lipid mediators". *Biochimie* 2010; 92: 660-664.
45. Xu D, Rowland S E, Clark P et al. MF63 [2-(6-Chloro-1*H*-phenanthro[9,10-*d*]imidazol-2-yl)- isophthalonitrile], a Selective Microsomal Prostaglandin E

- Synthase-1 Inhibitor, Relieves Pyresis and Pain in Preclinical Models of Inflammation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2008; 3: 754-763.
46. Nakanishi M, Rosenberg D W. Multifaceted roles of PGE₂ in inflammation and cancer. *Semin Immunopathol* 2013; 35: 123-137.
 47. Wang D, Buchanan F G, Wang H et al. Prostaglandin E₂ Enhances Intestinal Adenoma Growth via Activation of the Ras-Mitogen Activated Protein Kinase Cascade. *Cancer Research* 2005; 65: 1822-1829.
 48. Kojima F, Kapoor M, Yang L et al. Defective Generation of a Humoral Immune Response Is Associated with a Reduced Incidence and Severity of Collagen-Induced Arthritis in Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 Null Mice. *Journal of Immunology* 2008; 180: 8361-8368.
 49. Gilroy D W, Colville-nash P R, Willis D et al. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nature medicine* 1999; 5: 698-701.
 50. Kalinski P. Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E₂. *Journal of Immunology* 2012; 188: 21-28.
 51. Ae T, Ohno T, Hattori Y et al. Role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in the facilitation of angiogenesis and the healing of gastric ulcers. *AJP-Gastrointest Liver Physiol* 2010; (299): 1139-1146.
 52. Irannejad R, Zastrow M V. GPCR signaling along the endocytic pathway. *Current Opinion in Cell Biology* 2014; 27: 109-116.
 53. Reader J, Holt D, Fulton A. Prostaglandin E₂ EP receptors as therapeutic targets in breast cancer. *Cancer Metastasis* 2011; 30: 449-463.
 54. Sostres C, Gargallo J, Lanas A. Aspirin, cyclooxygenase inhibition and colorectal cancer. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2014; :5(1): 40-49.
 55. Ansariy K M, Sungy Y M, He G et al. Prostaglandin receptor EP₂ is responsible for cyclooxygenase-2 induction by prostaglandin E₂ in mouse skin. *Carcinogenesis* 2007; 28(10): 2063-2068.
 56. Masako N, Montrose D.C, Clark P et al. Genetic deletion of mpges-1 suppresses intestinal tumorigenesis. *Cancer Research* 2008; 68,9: 3251-3259.
 57. Dorsam R T, Gutkind J S. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature Reviews Cancer* 2007; 7: 79-94.

58. Castellone M D, Teramoto H, Williams B O et al. Prostaglandin E2 Promotes Colon Cancer Cell Growth Through a Gs-Axin-*b*-Catenin Signaling Axis. *Science* 2005; 310(5753): 1504-1510.
59. Shukla Y, Singh M. Cancer preventive properties of ginger: A brief review. *Food and Chemical Toxicology* 2007; 45: 683-690.
60. Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C et al. PDR for Herbal Medicines. E-PDR Medical Economics Company 2000: p 339-342.
61. Barrett M. The Handbook of Clinically Tested Herbal Remedies Volume 1. The Haworth Herbal Press Binghamton 2004: p 493-508.
62. American Botanical Council. Therapeutic Guide To Herbal Medicines, Commission E Monographs 1999; p: Turmeric root chapter.
63. Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C et al. PDR for Herbal Medicines. E-PDR Medical Economics Company 2000: p 775-776.
64. Koeberle A, Northoff H, Werz O. Curcumin blocks prostaglandin E2 biosynthesis through direct inhibition of the microsomal prostaglandin E2 synthase-1. *Molecular Cancer Therapeutics* 2009; 8(8): 2348-2355.
65. Lieber M, Smith B, Szakal A et al. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* 1976; 17(1): 62-70.
66. WEB_2. (2014). ATCC resmi sitesi.
http://www.lgcstandardsatcc.org/products/all/CCL185.aspx?geo_country=tr#characteristics (29.04.2014).
67. Pana T, Khare S, Ackah F et al. In vitro cytotoxicity assessment based on KC50 with real-time cell analyzer (RTCA) assay. *Computational Biology and Chemistry* 2013; 47: 113-120.
68. Moe B, Gabos S, Fang Li X. Real-time cell-microelectronic sensing of nanoparticle-induced cytotoxic effects. *Analytica Chimica Acta* 2013; 789: 83-90.
69. Jakobsson P J, Thore'N S, Morgenstern R et al. Identification of human prostaglandin E synthase: A microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Biochemistry* 1999; 96: 7220-7225.

70. Gunji Y, Sato T, Kanaji N et al. Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 Is Induced In Lung Fibroblasts By IL-1 β And Turns Over. American Thoracic Society 2012 International Conference. s 2012, San Francisco, California.
71. Celis E J. Cytotoxicity and Cell Growth Assays. In: Cell Biology A Laboratory Handbook (3rd ed), Elsevier Academic Press, 2006: s 315-324.
72. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983; 65(1-2): 55-63.
73. Riss T L, Moravec R A, Niles A L et al. Cell Viability Assays. In: Assay Guidance Manual. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences 2013; s e-kitap.
74. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J Immunol Methods. 1986; 89(2): 271-277.
75. Shewry P R, Fido R J. Protein Blotting: Principles and Applications. In: Molecular Biomethods Handbook, Humana Press, Bristol, UK 1998: p 435-444.
76. Mahmood T, Yang P C, Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. N Am J Med Sci. 2012; 4(9): 429-434.
77. Osborne C, Brooks S A. SDS-PAGE and Western Blotting to Detect Proteins and Glycoproteins of Interest in Breast Cancer Research. In: Methods in Molecular Medicine Breast Cancer Research Protocols (120th ed), Humana Press Inc, Totowa, 2006: p 217-229.
78. Taylor S C, Posch A. The Design of a Quantitative Western Blot Experiment. BioMed Research International 2014; 2014: 1-8.
79. T.A. Brown. The Basic Principles of Gene Cloning and DNA Analysis. In: Gene Cloning and DNA Analysis (5th ed), Wiley-Blackwell, UK, 2006: p 3-12.
80. Robert E. Farrell Jr. cDNA Synthesis, In: RNA Methodologies (4th ed), Elsevier, USA, 2010: p 367-384.
81. Côté B, Boulet L, Brideau C et al. Substituted phenanthrene imidazoles as potent, selective, and orally active mPGES-1 inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2007; 17(24): 6816-6820.

82. Lu W, Tinsley H N, Keeton A et al. Suppression of Wnt/ β -catenin signaling inhibits prostate cancer cell proliferation. *European Journal of Pharmacology* 2009; 602: 8-14.
83. Cheng Y, Wang M, Yu Y et al. Cyclooxygenases, microsomal prostaglandin E synthase-1, and cardiovascular function. *Clin Invest.* 2006; 116(5): 1391-1399.
84. Van Rees B P, Sivula A, Thor'en S et al. Expression of microsomal prostaglandine synthase-1 intestinal type gastric adenocarcinoma and in gastric cancer cell lines. *International Journal of Cancer* 2003; 107(4): 551-556.
85. Kamei D, Murakami M, Nakatani Y et al. Potential Role of Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 in Tumorigenesis Received for publication, December 31, 2002, and in revised form. *The Journal of Biological Chemistry* 2003; 278(21): 19396-19405.
86. Mitchell JA, Belvisi MG, Akarasereenont P et al. Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. *Br J Pharmacol* 1994; 113(3): 1008-1014.
87. Lev-Ari H, Strier L, Kazanov D et al. Celecoxib and Curcumin Synergistically Inhibit the Growth of Colorectal Cancer Cells. *Clinical Cancer Research* 2005; 11(18): 6738-6744.
88. Thoreen S, Jakobsson PJ. Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells Inhibition by NS-398 and leukotriene C4. *European Journal Biochemistry.* 2000; 267: 6428-6434.
89. Jolad S D, Lantz R C, Chen G J et al. Commercially processed dry ginger (*Zingiber officinale*): Composition and effects on LPS-stimulated PGE₂ production. *Phytochemistry* 2005; 66: 1614-1635.
90. Ha S K, Moona E, Ju M S et al. 6-Shogaol, a ginger product, modulates neuroinflammation: A new approach to neuroprotection. *Neuropharmacology* 2012; 63(2): 211-223.
91. Dugasania S, Pichikac M R, Nadarajahc V D et al. Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. *Journal of Ethnopharmacology* 2010; 127: 515-520.

92. Jime' Nez P, Piazuolo E, Cebrian C et al. Prostaglandin EP2 receptor expression is increased in Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2010; 31: 440-451.
93. Piazuolo E, Jime' Nez P, Strunk M et al. Effects of selective PGE2 receptor antagonists in esophageal adenocarcinoma cells derived from Barrett's esophagus. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 2006; 81: 150-161.
94. Iwamoto J, Mizokami Y, Takahashi K The Effects of Cyclooxygenase2–ProstaglandinE2 Pathway on Helicobacter pylori -Induced Urokinase-Type Plasminogen Activator System in the Gastric Cancer. *Journal compilation Helicobacter* 2008; 13: 174-182.
95. Dohadwala M, Batra R K, Luo J et al. Autocrine/Paracrine Prostaglandin E2 Production by Non-small Cell Lung Cancer Cells Regulates Matrix Metalloproteinase-2 and CD44 in Cyclooxygenase-2-dependent Invasion. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(52): 50828-50833.
96. Ka Kei Wu W, Jao Yiu Sung J, Wa Lee C et al. Cyclooxygenase-2 in tumorigenesis of gastrointestinal cancers: An update on the molecular mechanisms. *Cancer Letters* 2010; 295: 7-16.
97. Kawamori T, Kitamura T, Watanabe K et al. Prostaglandin E receptor subtype EP(1) deficiency inhibits colon cancer development. *Carcinogenesis* 2005; 26(2): 353-7.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Eren Demirpolat

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 23 Mart 1987

Medeni durumu: Bekar

Tel: 0536 326 79 17

email: erendemirpolat@yahoo.com

Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD 38039
Talas/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Kayseri	2010
Lise	Nuh Mehmet Baldöktü Anadolu Lisesi Kayseri	2005

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2011-Halen	Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD	Araştırma Görevlisi
2011-2014	DEKAM İyi Klinik Uygulama Merkezi	Klinik araştırma Eczacısı

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

1- Demirpolat E, Aycan Y M B. Bioequivalence and Pharmacogenetics. Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine 2013; 11(4): 288-294