



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE ALFA LİPOİK ASİT VE
PİPERLONGUMİNİN HÜCRE CANLILIĞINA ETKİLERİ**

Selver Çağda MERAL

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç.Dr. Görkem KISMALI**

**ANKARA
2018**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE ALFA LİPOİK ASİT VE
PİPERLONGUMİNİN HÜCRE CANLILIĞINA ETKİLERİ**

Selver Çağda MERAL

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç.Dr. Görkem KISMALI

ANKARA
2018

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Akciğer Kanseri Hücrelerinde Alfa Lipoik Asit ve Piperlonguminin Hücre Canlılığına Etkileri" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Selver Çağda MERAL

Tarih: 25.06.2018

İmza:



Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Biyokimya Anabilim Dalında
Selver Çağda MERAL tarafından hazırlanan
“Akciğer Kanseri Hücrelerinde Alfa Lipoik Asit ve Piperlonguminin Hücre
Canlılığına Etkileri” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:25.06.2018


Prof. Dr. Tevhide Sel
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı


Doç. Dr. Görkem Kısmalı
Ankara Üniversitesi
Danışman


Dr. Öğr. Üyesi Özkan Duru
Kırıkkale Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet Akan
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser Gelişimi	2
1.2. Akciğer Kanseri	8
1.2.1. Epidemiyolojisi	8
1.2.2. Etiyolojisi	10
1.2.3. Oluşumu ve Türleri	12
1.3. Antioksidanlar ve Kanser	14
1.3.1. Alfa Lipoik Asit	16
1.4. Piperlongumin	19
1.5. Amaç	21
2. GEREÇ ve YÖNTEM	22
2.1. Gereç	22
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	22
2.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler	23
2.1.3. Kullanılan Cihazlar	24
2.2. Yöntem	25
2.3. Hücre Kültürünün Hazırlanması	25
2.4. MTT Hücre Canlılık Testi	26
2.5. Hücre Lizatlarının Oluşturulması	27
2.6. Protein Miktar Tayini	27
2.7. SDS-PAGE ve Western Blot	28
2.8. İstatistik Analiz	29
3. BULGULAR	30
3.1. MTT Hücre Canlılık Testi Sonuçları	30
3.1.1. Piperlongumin Uygulamalarının A549 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	30
3.1.2. Alfa Lipoik Asit Uygulamalarının A549 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	31
3.1.3. Piperlongumin ve Alfa Lipoik Asidin Birlikte Uygulamalarının A549 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	32
3.2. Western Blot Analiz Sonuçları	33

3.2.1. Piperlongumin ve Alfa Lipoik Asidin farklı Uygulamalarının Bax ve Survivin Protein Ekspresyonları Üzerine Etkisi	33
4. TARTIŞMA	35
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	39
ÖZET	42
SUMMARY	43
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	51



ÖNSÖZ

Günümüzde akciğer kanseri dünyada en çok görülen kanser türüdür. Tüm kanser kaynaklı ölümlerin %19'unu akciğer kanseri oluşturmaktadır. Dünyadan her sene ortalama 1 milyon insan akciğer kanseri nedeniyle ölmektedir. Bilim ve teknolojik gelişmelerin son hızla ilerlediği bu günlerde hala aydınlatılmayı bekleyen bazı noktalar mevcuttur. Dünya genelinde kanser alanında çok sayıda araştırmacı tarafından oldukça kapsamlı çalışmalar yapılmasına rağmen halen cevap bekleyen birçok soru bulunmaktadır.

Geleneksel tedavilerin ve uygulamaların akciğer kanseri insidansını kontrol edememesi, yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için büyük ihtiyaç oluşturmuştur. Bu amaçla alfa lipoik asit gibi antioksidan maddeler ve piperlongumin gibi bitkilerden elde edilen doğal alkaloidler antikanser ajanlar olarak önemli adaylar olabilmektedir. Çalışmamızda akciğer kanser tedavisi çalışmalarına yeni bir bakış açısı getirmek adına piperlongumin ve alfa lipoik asidin kombinasyonu çalışılmış, akciğer kanser hücre hatlarına etkisini araştırmak adına antiproliferatif aktiviteleri incelenmiştir.

Öncelikle yüksek lisans eğitimim boyunca deneyim ve bilgi birikimleriyle bana yardım eden ve her konuda desteğini esirgemeyen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalının saygıdeğer öğretim üyelerine, sayın danışman hocam Doç. Dr. Görkem KISMALI'ya, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında yardımlarını esirgemeyen araştırma görevlileri, doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma gönülden saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu mutlu günlere erişmemi sağlayan, eşsiz destekleriyle her zaman yanımda olan ve her zaman bana inanan canım aileme... Canım eşim Öğünç MERAL'e ve biricik annem Necla GÜNAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
A549	Akciğer Kanseri Hücre Hattı
β	Beta
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ELISA	Enzyme linked immuno sorbant assay
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
BSA	Sığır Serum Albumin
FBS	Fetal Bovine Serum
kD	Kilodalton
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LA	Lipoik Asit
Mg	Magnezyum
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
μ M	Mikromolar
mA	Miliamper
mg	Miligram
ml	Mililitre
MTT	Metiltiazol difenil tetrazolyum
ng	Nanogram
nm	Nanometre
DR4	Ölüm Reseptörü 4
DR5	Ölüm Reseptörü 5

ROS	Reaktif Oksijen Türleri
°C	Santigrat Derece
cm ²	Santimetrekare
NaCl	Sodyum Klorür
SDS	Sodyum Dodesil Sulfat
SDS- PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektorforezi
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
PVDF	Poliviniliden Diflorür
PBS	Phosphate Buffered Saline
IC ₅₀	Yarı maksimal inhibisyon konsantrasyonu
%	Yüzde

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Çok Basamaklı Karsinogenez	3
Şekil 1.2. Kansere Neden Olan Faktörler	5
Şekil 1.3. Alfalipoik Asit ile Dihidrolipoik Asidin Kimyasal Yapıları	17
Şekil 1.4. R- α lipoik asit ve S- α lipoik asidin kimyasal formulleri	18
Şekil 1.5. Piperlongumin kimyasal yapısı	19
Şekil 1.6. Piper longum	20
Şekil 3.1. Piperlongumin uygulanan A549 Hücrelerinde Yüzde Hücre Canlılık Oranları (24 ve 48 saat inkubasyon)	30
Şekil 3.2. Alfa Lipoik Asit Uygulanan A549 Hücrelerinde Yüzde Hücre Canlılık Oranları (24 ve 48 saat inkubasyon)	31
Şekil 3.3. Piperlongumin ve 125 μ M alfa lipoik asit uygulanan A549 hücrelerinde yüzde hücre canlılık oranları (24 ve 48 saat inkubasyon)	32
Şekil 3.4. Piperlongumin ve 250 μ M alfa lipoik asit uygulanan A549 hücrelerinde yüzde hücre canlılık oranları (24 ve 48 saat inkubasyon)	33
Şekil 3.5. Farklı Dozlarda Piperlongumin ve Alfa Lipoik Asit Uygulanan A549 Hücrelerine Ait Blot Görüntüleri (24 saat inkubasyon)	34

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Erkek ve Kadınlarda Yaşla Akciğer Kanseri İnsidens İlişkisi	9
Çizelge 1.2. Sigara Tüketimi ile Akciğer Kanseri Riski İlişkisi	11
Çizelge 1.3. Akciğer Kanseri Histolojik Sınıflandırması	13
Çizelge 2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	22
Çizelge 2.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler	23
Çizelge 2.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	24



1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması ile ortaya çıkan ve genetik ve çevresel koşulların etkisi altında olan kompleks bir hastalıktır. Yüzden fazla kanser türü olmasına ve belli tipteki kanserler için olabildiğince standart yaklaşımlar geliştirilmesine rağmen kanser aynı zamanda kişisel bir hastalıktır. Dünya üzerindeki hiçbir insanın DNA'sı aynı olmadığı için kişilerin benzer tedavilere farklı cevaplar vermesi normaldir. Günümüzde ilerleyen teknolojinin beraberinde getirdiği sağlık sorunlarından kaçınmak için doğaya ve doğal olana dönüş eğilimi gittikçe artmaktadır. Var olan tedavilere ek olarak yeni tedavi yöntemleri geliştirilmektedir (Baykara, 2016).

Akciğer kanseri, tüm dünyada görülen önemli bir sağlık sorunu olmakla birlikte erkeklerde en sık rastlanan, kadınlarda ise meme kanserinden sonra ikinci sıradaki kansere bağlı ölüm nedenidir. Akciğer kanseri tanısı alan olguların çoğu ileri evrede yakalanması açısından da önemli bir hastalıktır (Göksel ve Akkoçlu, 2002).

Geleneksel tedavilerin ve uygulamaların akciğer kanseri insidansını kontrol edememesi, yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için büyük ihtiyaç oluşturmuştur. Bu amaçla alfa lipoik asit gibi antioksidan maddeler ve piperlongumin gibi bitkilerden elde edilen doğal alkaloidler antikanser ajanlar olarak önemli adaylar olabilmektedir. Kanser tedavisinde kemoterapi, radyasyon tedavisi gibi geleneksel yöntemlerle hastada iyileşme görülse de, çoğu hasta kötü sonuç elde etmekte ve toksik yan etkiler ortaya çıkmaktadır (Tetikçok ve ark., 2015).

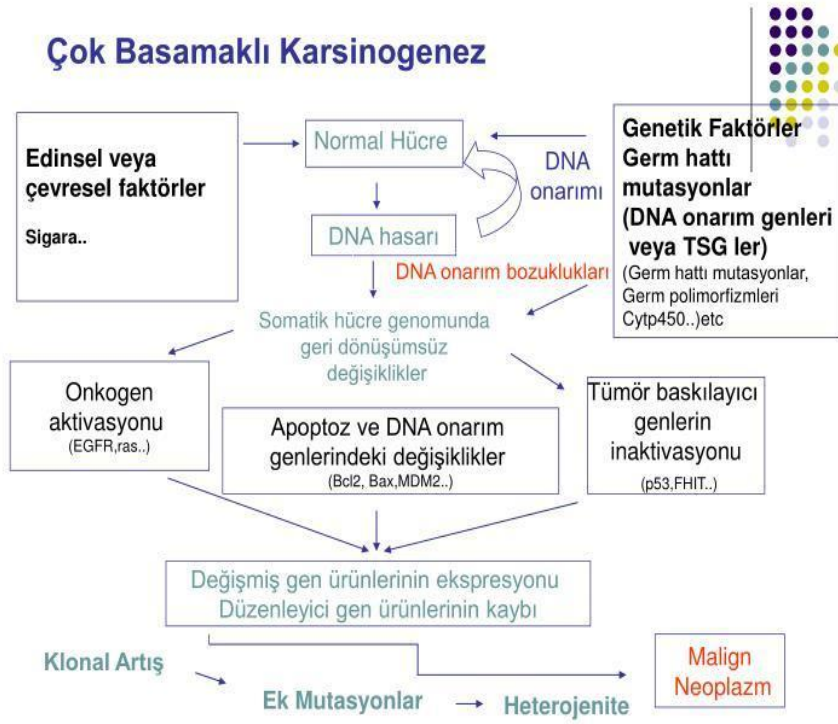
Dünya çapında Vit. E, yeşil çay v.b maddeler içeren bitkisel ilaçların kullanımının tahmini % 65 oranında yaygınlaştığı Dünya Sağlık Örgütüncü yürütülen araştırma sonucu görülmüştür. Günümüzde antikanser etkili ajanların yarısından fazlası tıbbi bitkilerden ve diğer bitkisel kaynaklardan sağlanmaktadır. Fakat hala antikanserojen etki potansiyeli keşfedilmemiş daha bir çok bitki bulunmaktadır. Sentetik ilaçların zararlı yan etkilerine maruz kalınmaması için alternatif çözüm,

alternatif tıbbi bitkiler üzerinde araştırmaların arttırılmasıdır (Cragg ve Newman, 2005; Pandey ve Madhuri, 2006 ve Rao ve ark., 2004).

1.1. Kanser Gelişimi

Yaşamımızı sŸrdŸrebilmemiz için hŸcrelerimizin sŸrekli kendini yenilemesi gereklidir. ŐmrŸnŸ dolduran hŸcreler vŸcuttan atılırlarken yerlerine yenileri gelir. Bazen hŸcreler, çevresel faktŸrlerin çok basamaklı bir sŸreci içinde, hŸcre DNA'sında ve kromozomların fonksiyonel birimleri olan genlerde oluşan değişiklikler sonucunda kontrolsŸz olarak bŸlŸnmeye başlarlar ve normalde olmaması gereken bir oluşum meydana getirirler. Buna karsinogenesis denir. Karsinogenesis; Homeostatik "feedback" mekanizmalara yanıt veren normal hŸcrelerin bu mekanizmaların kontrolŸnden çıkıp, kontrolsŸz ve spontan olarak bŸyŸyebilen ve komşu dokulara invazyon yapabilen hŸcre Őekillerine dŸnŸřmeleridir (Ulukaya, 2002). Kanser, somatik genetik hastalıkların en sık gŸrŸlen ve aynı zamanda en karmaşık olanıdır. Batı toplumlarında her Ÿ insandan birinde kanser gelişmekte ve beşte biri Ÿlmektedir. TŸm kanserler, DNA dizisindeki birtakım anormalliklerle oluşmaktadır. Kanserlerin %10-15'inin, kalıtımsal olduğu yani ebeveynlerden gelen genlerle aktarıldığı, geriye kalan %85-90'lık kısmının ise yaşam boyunca canlı hŸcrelerdeki DNA'nın, mutajenlere maruz kalması, hŸcre DNA'sındaki hafif progresif değişiklikler ve replikasyonda hatalar oluşması ile Őekillendięi dŸřŸnŸlmektedir. Bazen oluşan bu mutasyonlardan biri, içinde bulunduğu hŸcrenin bŸyŸmesini ve bu hŸcrenden tŸreyen bir kanser klonunun oluşmasına neden olur. Kanser multifaktŸriyel olup, bakterilerden viruslara, radyasyondan kalıtıma, çevresel faktŸrlerden beslenme alişkanlığına ve kimyasallara kadar birçok faktŸre bağlıdır (Futreal ve ark., 2001).

Çok Basamaklı Karsinogenez



Şekil 1.1. Çok basamaklı karsinogenez (Atabey, 2004).

Kanser etiyojisi multifaktöriyel olup etkenler şu şekilde sınıflara ayrılabilir;

1) Bedensel Özellikler:

- Genetik: Meme kanseri, lösemiler, bazı çocukluk çağı tümörleri gibi
- Hormonal nedenler: Meme, prostat, karaciğer, testis, kalınbağırsak kanseri ve bazı yumurtalık tümörleri gibi.

2) Çevresel Faktörler:

- Fiziksel Etkiler:
- Güneş ışığı: (deri kanserleri)
- Radyasyon: (lösemiler, akciğer, boğaz-yutak, yemek borusu, mide bağırsak, deri, tiroit kanserleri ile yumuşak doku tümörleri)
- Isı: Deri, yumuşak doku, yemek borusu ve yutak kanserleri
- Mekanik darbeler: Kemik ve yumuşak doku tümörleri

3) Kimyasal etkilere:

- Endüstriyel maddeler:

- Alüminyum ürünleri: Akciğer, idrar kesesi, yemek borusu, mide kanserleri.
- Ayakkabı sanayisinde kullanılan maddeler: Lösemi, sinüs tümörleri, idrar kesesi ve sindirim yolları kanserleri.
- Kömür dumanları: Deri, Akciğer ve idrar kesesi kanserleri.
- Kok kömürü ürünleri: Deri, akciğer ve böbrek
- Demir tozları: Solunum yolları, lösemi, sindirim, cinsel organlar ve boşaltım organları
- Boyalar: Akciğer, yemek borusu, mide, idrar kesesi.
- Lastik endüstrisi: İdrar kesesi, lösemi, lenfoma, akciğer, böbrek yolları, sindirim yolları, deri, karaciğer, gırtlak, beyin.
- Mobilyacılıkta kullanılan maddeler: Gırtlak ve sinüs kanserleri.

4) İlaçlar:

- Ağrı kesiciler: Böbrek ve idrar yolları
- Östrojen: Meme, döl yatağı ve testis.
- Doğum kontrol hapları: Karaciğer, döl yatağı
- Bazı kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar: Lösemi, idrar kesesi.

5) Besinler:

- Yağlı yiyecekler: Meme, kalın bağırsak
- Bazı küfler (alfatoksinler): Kalın bağırsak
- Yanmış yağlar: Meme, kalınbağırsak
- Kırmızı etten zengin diyetler: kalınbağırsak
- İyottan fakir diyet: tiroid bezi

6) Diğer kimyasal kanser yapıcı etkenler:

- Sigara: Akciğer, ağız, gırtlak, yutak, yemek borusu, mide, idrar kesesi, pankreas, böbrek, döl yolu ağzı, karaciğer
- Alkollü İçecekler: Ağız, yutak, gırtlak, yemek borusu, karaciğer, meme
- Asbestos: Akciğer, plevra, peritoneum, sindirim sistemi, gırtlak
- Benzen: Lösemi
- Kömür tozları: Deri, akciğer ve idrar kesesi

- Kömür tozu, zifti: deri, akciğer, idrar kesesi, sindirim yolları lösemi
- Madeni yağlar: Deri, idrar kesesi, sindirim ve solunum yolları
- Naftalin: İdrar kesesi, karaciğer
- Hardal gazı: Akciğer, gırtlak, yutak

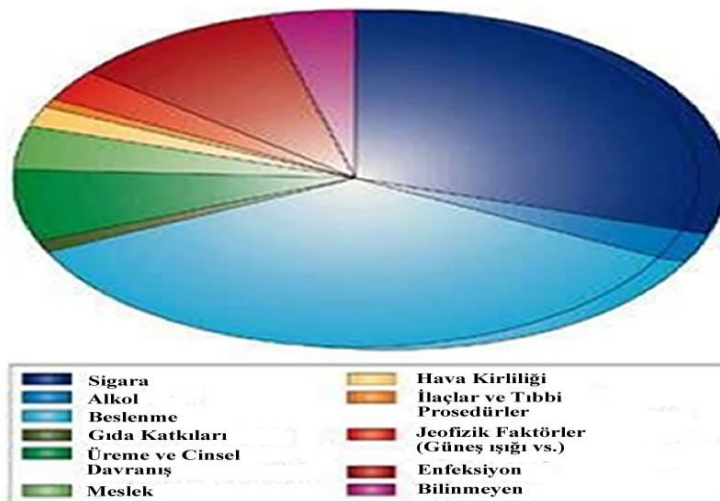
7) Virüsler, bakteriler:

- Hepatit B ve C virüsü: Karaciğer
- T gözü lösemi virüsü: Lösemi
- HP virüsü: Döl yolu ağzı, daha nadir olarak ağız, dil, gırtlak
- Helicobacter pylori: Mide

8) Diğer risk faktörleri:

- Yaş: 55 yaşın üstünde olmak: Bedenin birçok yerinde görülen kanserler
- Stres: Çeşitli dokulardaki tümörler
- Hareketsiz yaşam tarzı: Meme, kolon, diğer yerleşimler.
- Yüksek tansiyon: Meme, kolon
- İmmun sistem yetersizliği: lenfoma, karsinoma
- Cinsel ilişki: Rahim ağzı, kaposi sarkomu, anüs ve dil

şeklinde sıralanabilir.



Şekil 1.2 . Kansere neden olan faktörler (Colditz ve ark., 2006).

Kalıtım yoluyla kanser meydana gelme olasılığı çevresel faktörlere oranla çok daha azdır. Genlerin, bazı hastalıklara karşı yatkınlığa neden olup olmadıkları konusundaki araştırmalar halen devam etmektedir. Normalde tümör gelişimini önleyen tümör baskılayıcı genlerdeki bir bozukluğun, kalıtsal olarak aktarılması ve sigara gibi bir karsinojenin ilave katkısı ile bireyler kansere yatkın hale gelebilmektedirler. Meme ve yumurtalık kanseri gibi bazı kanser türlerinde, kanserin kalıtsal geçişine ait bazı genler tespit edilmiştir. Lösemiler ve bazı çocukluk çağı tümörleri (Wilms tümörü, retinoblastoma) kalıtsal özellik gösterir. Kalın bağırsakta polip gelişimine neden olan genetik yatkınlık kalın barsak kanseri gelişim riskini artırmaktadır. Her ne kadar kalın bağırsak (kolon) kanserlerinin yaklaşık %85- 90'ı doğumdan sonra meydana gelen mutasyonların eseri olsa da, geriye kalan kısmı kalıtsaldır. Çevresel olarak maruz kaldığımız birçok kimyasal madde, kansere sebep olmaktadır. İlaçlar ve yağlı yiyecekler, bazı küfler (alfatoksinler), iyottan fakir diyet, kırmızı etten zengin diyetler, yanmış yağları içeren besinler kansere sebep olan önemli çevresel faktörlerdendir. Sigara, alkol, hardal gazı, benzen, kömür tozu ve zifti, madeni yağlar, naftalin ve asbestos da diğer kimyasal kanser yapıcı etkenlerdir. Helicobacter pylori, T hücreli lösemi virüsü human papilloma virüsü gibi virüs ve bakteriler de fiziksel ve kimyasal etkenler gibi, biyolojik olarak normal karaktere sahip bir hücre kültürünü transforme ederek kanser oluşturabilirler (Yokuş ve Çakır, 2012).

Kansere sebep olan fiziksel etkenler içinde, radyasyon, ısı, güneş ışığı, mekanik darbeler bulunmaktadır. İyonize radyasyon gibi ışınımlar (x, gama ışınları, nükleer emisyonlar, Ultra viole ışınları) biyolojik makromoleküllere direkt olarak etki edebilecek yeterli intrinsic (quantum) enerjiye sahiptirler. Böylelikle biyolojik makromoleküllerden elektron kopartabilir ya da bunları pozitif yükü yükleyebilir (Yokuş ve Çakır, 2002). Bu durum ise DNA'da tek ve çift zincir kırıkları ile baz ya da şekerde modifikasyonlara sebep olur. Son yıllarda elektirikli ev aletlerinden yayılan, düşük ve yüksek frekanslı manyetik alanların da (noniyonize ışınımlar) DNA üzerinde hasar oluşturduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva ettiklerinden oldukça reaktiftirler. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan reaktif oksijen

türleridir (ROS). ROS'un kanser oluşumunun farklı evrelerine etki ettiği ve böylece kanser oluşumunda birçok roller üstlendiğine dair önemli kanıtlar vardır. Çevresel faktörlerin ve beslenme alışkanlıklarının olumlu yönde olması ise kanserlerden korunmada oldukça önemlidir. Meyve ve sebze tüketiminin akciğer, mide, meme, pankreas, kalın bağırsak, gırtlak ve yemek borusu kanserlerini önlediğine dair pek çok bilimsel bulgu vardır. ROS'un kanserogenezdeki olumsuz etkilerine karşı, meyve ve sebzelerin içermiş olduğu antioksidanlar ve posalı yapıları sayesinde koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir (Yokuş ve Çakır, 2003).

Kanser çoğu kez tek bir hastalık gibi görünse de, gerçekte hücre ve dokuları etkileyen kompleks bir hastalık grubudur. Bütün kanserlerde görülen ortak bir özelliğin, mutasyonların gen ifadesini değiştirmesi olduğu kabul edilmektedir. Genetik değişiklik replikasyonla yayıldığından dolayı karsinogenesis için hedef hücreler, dokularda sürekli yenilenen kök hücreleridir (Devereux ve ark., 1999). Tümör oluşumu, neoplastik transformasyon (genetik defektlerin gelişimiyle normal hücrenin neoplastik hücreye dönüşümü) ve neoplastik gelişim olarak ikiye ayrılır. Onkogenesis ve karsinogenesisde olayların ilk basamağını neoplastik transformasyon oluşturmaktadır (Berenblum ve ark., 1974 ve Elenbaas ve ark., 2001). Neoplastik transformasyon spontan olabileceği gibi çeşitli şekillerde indüklenerek de (baz çifti değişikliklerini, mispairing, delesyon, translokasyonları ve amplifikasyonları) oluşabilir (Devereux ve ark., 1999). Başka bir deyişle oluşan neoplastik transformasyon, DNA replikasyonunun ve tamir mekanizmalarının düzgün çalışmaması sonucu hücrelerde oluşan mutasyonların sonucudur. Mutasyonlar, büyüme kontrolünün kaybı ile sonuçlanarak, proto-onkogenler, tümör baskılayıcı genler, tümör baskılayıcı genleri düzenleyici genler ve büyümeyi kontrol eden genlerde oluşur (Hussain ve ark., 2000). Onkogenesisin ikinci basamağında yer alan neoplastik gelişme, kanser hücresinin klonal proliferasyonuna yol açarak (Devereux ve ark., 1999), önce çevre dokulara sonra da uzak dokulara yayılarak büyümesini sağlar. Sürekli proliferasyonla tümörün biyolojik davranışında malignansiye doğru giden progressif değişiklikler ortaya çıkar (Butterworth ve ark., 1992).

Kansere sebep olan etmen her ne olursa olsun, sonuçta hücrenin genetik malzemesinde bozulma meydana gelir. Tek bir gendeki mutasyondan çok, birkaç gende birden oluşan hasar (hücre sayısının artması yönünde çalışan genler onkogenler, tümör önleyici genler ve DNA onarım genleri) kanser oluşumunda rol oynamaktadır. Kanserde değişikliğe uğramış genler, normalde doku homeostasisi ve hücre büyümesini düzenleyen üç ana biyolojik yolu (hücre siklusu, apoptozis ve diferansiasyon) etkiler. Bir yolda oluşan aksamalar, bir diğerinde derin sonuçlara neden olabilir (Corn ve El-Deiry, 2002).

Kanser hücreleri genel olarak kontrolsüz büyüme ve bölünme yani hücre proliferasyonu ve bulunduğu yerden vücudun başka bir yerine yayılma yani metastaz yapabilme yeteneği olmak üzere iki farklı özelliğe sahiptir. Kontrolsüz olarak bölünen hücreler, buldukları bölgede bir kitle oluşturacak şekilde çoğalıp, bulunduğu bölge dışında yerleşme eğilimi göstermiyorsa bu tip kanserlere benign (iyi huylu) tümör, bulunduğu yerden diğer doku ve organlara yayılma eğilimi gösteriyorsa bu tip kanserlere de malign (kötü huylu) tümör adı verilir. Tüm kanser vakalarının yaklaşık %25'i infeksiyon ajanları nedeniyle oluşmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde (%26), gelişmiş ülkelere (%8) göre bu oran daha fazladır. Amerikan Kanser Derneği her yıl yaklaşık 1.9 milyon insanın infeksiyonları nedeniyle kansere yakalandığını bildirmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün tahminlere göre 2021 yılında dünyada 15 milyon yeni kanser vakası olacaktır (Kuzeyli Yıldırım ve ark., 2005).

1.2. Akciğer Kanseri

1.2.1. Epidemiyolojisi

Akciğer kanseri, 20. Yüzyılın ortalarına doğru nadir görülürken, 21. Yüzyıla

doğru özellikle sigara kullanımının yaygınlaşmasıyla beraber halk sağlığını tehdit eden bir hastalık haline gelmiştir. Günümüzde akciğer kanseri dünyada en çok görülen kanser türüdür. Tüm kanser kaynaklı ölümlerin %19'unu akciğer kanseri kaynaklıdır. Dünyadan her sene ortalama 1 milyon insan akciğer kanseri nedeniyle ölmektedir (Lozano ve ark., 2012).

Batı Avrupa ve A.B.D ülkelerinde sigaranın zararlarına karşı bilinçlenmenin artmasıyla akciğer kanseri görülme oranı 1980 yılından sonra erkeklerde azalmaya başlamıştır. Kadınlarda ise sigara kullanımındaki artış sebebiyle ülkemizde akciğer kanseri görülme oranı artmaktadır. Ülkemizde ortalama her sene 150.000 kanser vakası teşhis edilmektedir (Engin ve Özyardımcı, 2001).

Akciğer kanseri görülme sıklığı yaş arttıkça artar (Şekil 1.3). Hastaların birçoğu 50-70 yaş grubu arasındadır. Ortalama tanı 60 yaş civarındadır.

Çizelge 1.1. Erkek ve kadınlarda yaşla akciğer kanseri insidens ilişkisi (Müsellim, 2007).

Yaş	100000'de insidens	
	Erkek	Kadın
0-4	0.0	0.0
5-9	0.0	0.0
10-14	0.1	0.1
15-19	0.1	0.1
20-24	0.3	0.2
25-29	0.5	0.4
30-34	1.5	1.0
35-39	4.0	3.0
40-44	12.1	7.8
45-49	31.4	17.3
50-54	72.0	29.0
55-59	137.5	46.8
60-64	218.9	64.5
65-69	296.2	82.3
70-74	354.4	89.2
75-79	356.3	84.4
80-84	317.7	80.7

Erkeklerde ölümlerle sonuçlanan kanser vakalarında birinci sırada akciğer kanseri gelmektedir. Kadınlarda ise son zamanlarda artış gösteren akciğer kanseri, meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Akciğer kanseri genellikle metastaz evresinde tanı koyulan ve prognozu iyi olmayan hastalık türü olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde kadınlar görülme oranı artarken histolojik tip olarak özel bir farklılık bulunmamaktadır (Müsellim, 2007).

1.2.2. Etiyolojisi

Akciğer kanseri dünyada kansere bağlı ölümlerin birinci sebebidir. Akciğer kanser etiyojisinin anlaşılması hastalıktan korunmada çok önemlidir. Akciğer kanseri önlenabilir bir hastalıktır. Sigara, akciğer kanseri oluşumunun bir numaralı sorumlusudur. Önlenabilir bir faktör olan sigara tüketimi önemli oranda kısıtlanabilirse, bilinen diğer nedenlerin de önlenmesiyle akciğer kanseri bugünkü mortalite ve morbiditesinden kurtularak ender görülen bir kanser türü olabilir. Sigara dumanında 4000'i aşkın madde bulunur. Ulusal Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) sigara dumanında 50'den çok karsinojen belirlemiştir. Radon, kurşun, bizmut ve polonyum gibi bazı maddeler radyoaktif özelliktedir. Akciğer kanseriyle bağlantılı ajanlar tütün spesifik N-nitrozaminlerdir (TSNA). Akciğer kanseri olma ihtimali içilen sigara miktarı, sigara içme süresi, içilen sigaranın çeşidi ve sigaraya başlama yaşıyla ilişkilidir. Akciğer kanser hastalarının %80'i sigara tüketen insanlarda görülürken sigara kullananların sadece %20'sinde akciğer kanseri görülmektedir. Sigara kullanımı ile akciğer kanserinin tüm tiplerine yakalanma oranı artmaktadır. Aktif ya da pasif sigara kullanımına bağlı en çok görülen akciğer kanseri tipleri skuamöz ve küçük hücreli kanserlerdir. Sigara içmeyenlerde ve kadınlarda adenokanserler daha fazla görülmektedir. Yapılan çalışmalar göstermektedir ki sigara tüketimi arttıkça risk yükselmekte ve sigarayı bırakmak riski tamamen ortadan kaldırmamaktadır, ancak sigarayı bıraktıktan sonra risk azalmaktadır (Koşar, 2018).

Çizelge 1.2. Sigara tükemi ile akciğer kanseri riski ilişkisi (Akyüz, 2006).

	Relatif Risk
Hiç sigara içmeyen	1
1 paket/gün	17
1-2 paket/gün	42
>2 paket/gün	64
Sigarayı bırakmış	2-10

Pasif içicilikde de akciğer kanseri görülme riski yaklaşık 3 kat artmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada hiç sigara kullanmayan kadınlarda akciğer kanseri %19, erkeklerde %9 oranında olduğu hesaplanmıştır. Bu oran Güney Asya'ya yapılan bir çalışmada kadınlarda %80'e kadar çıkmıştır (Parkin ve ark., 2005 ve Wakelee ve ark., 2007).

Radon, tütün dumanını takiben akciğer kanserinin ikinci önemli nedenidir. Radon sadece bağımsız bir risk faktörü değildir; sigara içenlerde akciğer kanseri riskini de arttırır. Radonun kapalı alanlarda biriktiği bilinmektedir. Yer altı kaya madenlerinde, özellikle uranyum içeren maden ocaklarında artış seviyesi görülmektedir. Temelinde radon miktarı fazla olan topraklarda inşa edilen evlerde yüksek miktarda radon bulunabilir. Bir binanın yapısında, zemine yakınlığı nedeniyle bodrum katında radon konsantrasyonu en yüksek seviyededir (Sethi ve ark., 2012).

Akciğer kanseri oluşumunda en önemli etken maddelerden biri de asbesttir. Madenlerde, çimento fabrikalarında, tekstil fabrikalarında asbest maruziyeti görülmektedir ve risk artmaktadır. Asbestosiz oluşması için devamlı ve güçlü bir maruziyet gerekmektedir bu nedenle mesleki olmayan çevreye bağlı maruz kalmak durumlarında kanser asbestosiz oluşma oranı çok düşüktür (Dela Cruz ve ark., 2011).

Yapılan çalışmalarda birinci dereceden akrabalarında akciğer kanseri olan kişilerin hastalığa yakalanma oranlarının 2 kat arttırdığını göstermektedir. Tüm bu risk faktörlerinin yanında yanlış beslenme şekli, KOAH gibi bazı akciğer hastalıkları

enfeksiyonlar ve hava kirliliği gibi çevresel etkenler de akciğer kanseri riskini arttırmaktadır (Bailey-Wilson ve ark., 2004).

1.2.3. Oluşumu ve Türleri

Malign tümörler germinatif hücrelerden oluşmaktadır. Akciğer kanserinde bunlar: bronş mukozalarındaki bazal tabaka hücreleri, alveollerdeki tip 2 alveol hücreleri ve plevra endotelinde mezotel hücreleridir. Akciğer kanseri, genetik değişikliklerin birikimi ile bağlantılı olarak kanserli hücrelerin malign progresyonu ile karakterize genetik ve epigenetik değişikliklerden kaynaklanır. Çok basamaklı karsinogenez olarak adlandırılan bu süreç, akciğer hücrelerinin klonal evrimi yoluyla gelişir. Tütün dumanı veya endüstriyel kirleticilerde bulunan birçok çevresel kanserojen madde, bronşiyal veya alfa-bronşiyal epitel hücreleri için başlatıcılar olarak görev yapabilir. Bu kanserojenler genelde bronşiyal ağaçların tamamı üzerinde bir etkiye sahiptir. Solunum yolları mukozası karsinojenlere sürekli olarak maruz kalırsa epitelyal değişiklikler oluşmaya başlar. Karsinojenlerin hücre içine tutunma ve yerleşmeleri sonucunda, bazal hücrelerde hiperplazi gelişmeye başlar. Karsinojenler hücre içinde protein, lipid gibi bir çok moleküle ve DNA'ya bağlanır. Bu bağlanmanın kronikleşmesi ile genetik materyalde hasar meydana gelir. Bazal tabakada yığılma ve bütünlük kaybı görülür. Akciğer kanserlerinde, özellikle baş ve boyun bölgesi olmak üzere başka bir organ sisteminde malignite olma riski yüksektir. Sekonder primer akciğer kanserlerinin baş ve boyun bölgelerinde gelişen tümörlerle birlikteliği %5 oranındadır (Akkoçlu, 2018).

Genetik polimorfizmler ve akciğer kanseri riski üzerine yapılan araştırmalar, ksenobiyotik metabolizma, DNA tamiri ve muhtemelen nikotin bağımlılığı ile ilgili bir takım aday genleri tespit etmiştir. Bu genlerin bazı varyantlarının ve bunların kombinasyonlarının, tütüne bağlı akciğer kanseri riskini değiştirdiği gösterilmiştir. Etkileri, etnik kökene, histolojik akciğer tümör tiplerine, maruz kalıma ve diğer ev sahibi / yaşam tarzı faktörlere göre değişir. Bu karmaşıklığa bağlı olarak bugüne

kadar akciğer kanseri riski bireysel düzeyde tahmin edilememektedir (Koşar, 2018).

Skumöz hücreli karsinomlar bronş epiteli bazal membranına paralel yer alan bazal hücrelerden, küçük hücreli kanserler ise bronş mukozasındaki küçük granüllü bazal hücrelerden köken alırlar, adenokarsinomlar ise bronş epitelinin mucus salgı bezlerinden veya nadiren de olsa bronkoalveoler epitelinden köken alırlar (Akkoçlu, 2018).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organization-WHO) akciğer tümörleri histolojik sınıflandırma genel hatlarıyla aşağıdaki tablodaki gibidir.

Çizelge 1.3. Akciğer Kanseri Histolojik Sınıflandırması (Yener ve Düşmez Apa, 2004).

A) Preinvaziv Lezyonlar
B) Malign Epitelyal Tümörler
1) Skumöz Hücreli Karsinom
2) Küçük Hücreli Karsinom
<i>a) Kombine Küçük Hücreli Karsinom</i>
3) Adenokarsinom
4) Büyük Hücreli Karsinom
5) Adenoskuamöz Karsinom
6) Sarkomatoid Karsinom
<i>a) Pleomorfik Karsinom</i>
<i>b) İğsi Hücreli Karsinom</i>
<i>c) Dev Hücreli Karsinom</i>
<i>d) Karsinokarsinom</i>
<i>e) Pulmoner blastom</i>
7) Karsinoid Tümör
8) Tükrük bezi Tümörleri
<i>a) Mukoepidermoid Karsinom</i>
<i>b) Adenoid Kistik Karsinom</i>
<i>c) Epitelyal-myoepitelyal Karsinom</i>
9) Mezenkimal Tümörler
C) Benign Epitelyal Tümörler
D) Lenfoproliferatif Tümörler
E) Metastatik Tümörler
F) Sınıflandırılmayan Tümörler

Skumöz hücreli karsinom bronş epitelinde skumöz metaplazinin ilerlemesiyle oluşan, çoğunlukla sigara kullanımı ile ilişkili, genelde merkez yerleşimli malign tümörlerdir. Adenokarsinom, birçok ülkede akciğer kanserinin en

sık görülen histolojik alt tipi olan skuamöz hücreli karsinomayı geçmiştir. Çoğu vakalar sigara içenlerde görülmekle birlikte, hiç sigara içilmeyen bireylerde (özellikle kadınlarda) diğer histolojik tipteki akciğer kanserlerinden daha sık gelişir. Küçük hücreli karsinomlarda hücreler yuvarlak, oval ve iç şeklidir. Nekroz tipik olarak genişir ve mitotik sayı yüksektir. Bütün akciğer kanseri olgularının yaklaşık %14'ünü oluşturur. Genelde ileri evrede tanı koyulmaktadır. Büyük hücreli karsinom, glandüler veya skuamöz ayrımı göstermeyen, farklılaşmamış büyük nükleoluslu bir karsinomdur. Adenoskuamöz karsinom, hem skuamöz hücreli karsinom hem de adenokarsinomanın bileşenlerini gösteren ve her birinden en az %10 tümör içermektedir. Akciğer karsinoid tümörü, ender görülen bir türdür. Akciğer karsinomlarının diğer türlerine göre daha yavaş büyüme eğilimi gösterirler. Nöroendokrin hücreler adı verilen hücrelerden meydana gelirler (Yener ve Düşmez Apa, 2004).

Akciğerin sarkomatoid karsinomları küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarının (KHDAK) sarkom veya sarkom benzeri bileşen içeren ayrı bir tipidir. Ender görülen sarkomatoid karsinomlar akciğer tümörlerinin %0.3-1.3 kadarını oluştururlar (Kefel ve ark., 2008).

1.3. Antioksidanlar ve Kanser

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, kanser, 2008 yılında dünya çapında 7.6 milyon kişinin ölümüne neden olmuştur; bu tüm ölümlerin yaklaşık % 13'ünü oluşturmaktadır. 2030 yılında yaklaşık 13.1 milyon kişinin kanserden öleceği tahmin edilmektedir. Günümüzde bir insana kanser teşhisi konulma olasılığı % 40'dan fazladır (Bennett ve ark., 2012).

Kanser normal düzenleyici mekanizmalara doğru tepki vermeyen anormal hücrelerin proliferasyonu ile karakterizedir. Karsinogenez, çok aşamalı bir süreçtir.

Kanser ilerlemesinin azaltılması için önerilen yollar arasında, kanser oluşumunu teşvik edebilen biyolojik, kimyasal veya fiziksel ajanlardan kaçınılması ve optimum vücut ağırlığını korurken, sağlıklı bir sebze ve meyve diyetinin tüketimi yer alır. Doğal diyet ajanları, kanser hücrelerini baskılanması ve oksidatif stresi azaltarak kanser gelişimi riskini azaltma potansiyellerinden dolayı büyük ilgi görmektedir. Oksidatif stres, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve kanser gibi çeşitli bozuklukların ve patofizyolojik süreçlerin patogeneğinde önemli bir rol oynar. Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) veya reaktif nitrojen türlerinin (RNS) üretimi ve vücuttan uzaklaştırılması arasındaki dengesizliğin sonucudur. ROS veya RNS, eksojen ve endojen kaynaklardan üretilebilir. Aşırı ROS üretimi, nükleik asitlere, proteinlere veya lipitlere zarar veren karsinogenez ile ilişkilendirilmiştir. Karsinogenez sırasında DNA iplikçiklerinde kırıklar ve anormal DNA bağlarının oluşumu gözlenmiştir. Oksidasyon en yaygın biyolojik ve enerji üreten reaksiyon olmasına rağmen, oksidatif stres hücrelere zararlıdır, çünkü serbest radikaller ve peroksitler gibi oksidasyon ürünleri hücresel bileşenlere zarar verir, bu da çeşitli hastalıklara neden olur. DNA'daki hasar, kanser oluşumu ve ilerlemesinden sorumludur (Süleyman ve ark., 2018).

Kanser tedavisinde kemoterapinin sınırlı etkisi ve kanserlerin yüksek nüks etme oranları yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ihtiyacını göstermektedir. Kaliteli bir yaşam sürebilmenin en önemli şartlarından birisi sağlıklı beslenmedir. Son zamanlarda çok sayıda epidemiyolojik yönden yapılan çalışmada meyve ve sebze ile antioksidan tüketme ile kanser arasında ters orantılı bir ilişkiye dikkat çekmektedir. Uzmanlar tarafından kanser tedavisi sırasında ve kanseri önlemek amacıyla antioksidan tüketimi önerilmektedir (Stoner ve Mukhtar, 1995). Çalışmalarda kanserli hastalarının antioksidan seviyelerinin düşük oldukları belirlenmiştir (Glade, 1999). Antioksidanlar canlıları nitrojen türü ve reaktif oksijen gibi serbest radikal moleküllerin oksidatif zararlarına karşı koruyan kimyasal maddelerdir. Antioksidanlar, canlılardaki serbest radikallere elektron ya da hidrojen vererek nötralize ederler bu sayede plazma membranı, proteinler ve DNA üzerindeki olumsuz etkilerini önleyerek serbest radikallerin etkilerinden vücudu korumaktadırlar. Bu sayede bağışıklık sistemin uyarılmasıyla kanser hücrelerinin

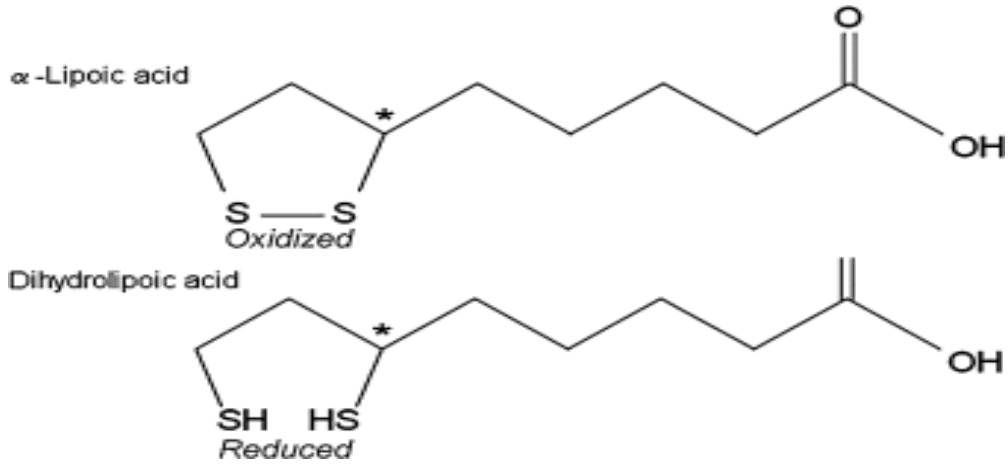
elimine edilmesi veya proliferasyonlarının bloke edilmesiyle kanserin önlenmesi mümkündür (Jayaprakasam ve ark., 2006 ve Lin ve ark., 2012).

Antioksidan savunmayla vücutta; radikal ürün üretiminin engellenmesi, üretilmiş radikal ürünlerin elimine edilmesi, oluşan hücre hasarının onarılması, sekonder radikal ürün meydana getiren reaksiyonların engellenmesi ve endojen antioksidasyonun artırılması gerçekleşir. Güçlü etkili bir antioksidan madde olan alfa lipoik asit hem suda hem de yağda çözünebildiği için evrensel antioksidan olarak kabul edilir (Karaca, 2009).

1.3.1. Alfa Lipoik Asit

Alfa lipoik asit diğer ismiyle thioctic asit vücudun düşük miktarda da olsa sentezlediği ve bazı besin maddelerinde bulunan, serbest radikallerin hasarını önleyen, yağda ve suda çözünebilen güçlü bir antioksidan maddedir. Alfa lipoik asit vücutta sentezlenmesine rağmen 1930'lu yıllara rağmen bilim insanları tarafından varlığı bilinmiyordu, 1980'li yıllarda keşfedildiğinde ise il başta vitamin olarak değerlendirilmiştir. Alfa lipoik asit mitokondriyal enzim komplekslerindeki spesifik proteinlere kovalent bağla bağlanmaktadır. Bu nedenle mitokondriyal kompleksleri çok olan dokularda bulunur. Bitkisel kaynaklardan en çok ıspanak, brokoli, domateste, hayvansal kaynaklardan ise en çok karaciğer, böbrek, kalpte bulunmaktadır (Karaca, 2009).

Alfa lipoik asidin ana rolü Krebs döngüsündeki dehidrogenaz enziminin kofaktörü olarak işlev göstermesidir. Lipoik asit ve onun indirgenmiş formu olan dihidrolipoik asit (DHA), vücutta kolay emilebildiklerinden, metalleri şelatlayarak onların negatif etkilerini indirgeyebildikleri için çok etkili antioksidan maddeler olarak tanınmaktadırlar (Packer ve ark, 1995).



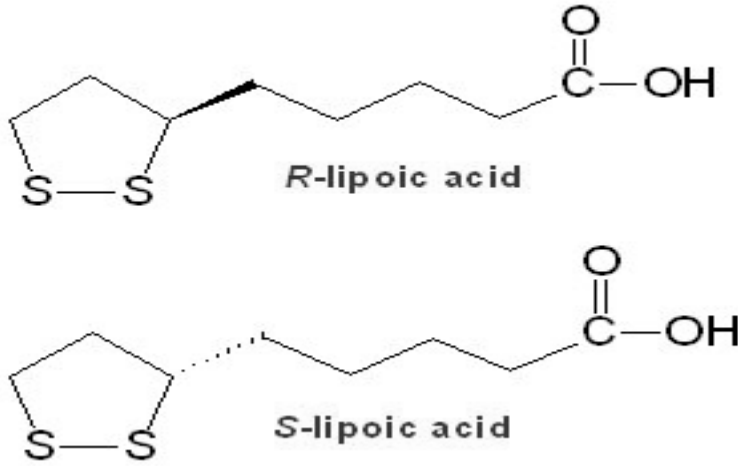
Şekil 1.3. Alfa Lipoik Asit ile Dihidrolipoik Asidin Kimyasal Yapıları (Li ve Lim, 2016).

Alfa lipoik asidin iki formu oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarıyla birbirlerine transforme olabilirler (Gözükara, 1989). Hem alfa lipoik asit hem de redükte şekli olan dihidrolipoik asidin her molekülünde iki tiol halkası bulunmaktadır (Biewenga ve ark., 1994 ve Navari-Izzo ve ark., 2002). Bu fark alfa lipoik asidin pek çok enzimin kofaktörü olarak görev yapmasını sağlamaktadır. Biyolojik yönden ikisi de aktif olmasına rağmen dihidrolipoik asit daha aktif form olarak kabul görmektedir (Bullock ve ark., 1954). Alfa lipoik asit, hipokloröz asit ve hidroksil radikal ürünlerini vücuttan elimine edebilirken, peroksil ve süperoksit radikal ürünleri üzerindeki etkinliği çok azdır. Dihidrolipoik asit peroksil radikal ürünlerini de elimine ederek lipid peroksidasyonunu engelleyebilmektedir (Coleman ve ark., 2001). Lipoik asit ve dihidrolipoik asit kurşun benzeri metal maddelerle sabit kompleksler oluşturarak vücuttaki ağır metalleri elimine etmektedirler (Navari-Izzo ve ark., 2002). Yapılan çalışmalar alfa lipoik asidin vücuttaki antioksidan görevini diyetle belli miktarda alınarak ya da metabolik yolla koenzimken gerçekleştirdiği düşündürmektedir (Navari-Izzo ve ark., 2002).

Lipoik asit ve dihidrolipoik asit vücutta hemen emilerek tüm vücuda dağılılabılır hatta kan beyin bariyerini aşabilir. İki formunun da antioksidan etkiye sahip olması, hem suda hem de yağda çözünebilmesi, başka antioksidanlarla

etkileşime girebilmesi, ağır metallerine bağlanması, serbest radikal ürünleri nötrlemesi nedeniyle nedeniyle evrensel antioksidan olarak kabul görmektedir. (Busse ve ark., 1992 ve Packer ve ark., 1995).

Alfa lipoik asidin R- α lipoik asit ve S- α lipoik asit olmak üzere iki enantiyomeri bulunmaktadır. Bu enantiyomerler aynı sayıda atom içerir, ancak moleküllerinde atomları farklı düzenlemeye sahiptirler. İki formu da izomerdir (Streper ve ark., 1997). R-enantiyomeri, S-enantiyomerden çok daha hızlıdır. Her iki formu da çalışılan alfa lipoik asidin R formunun S formuna göre daha aktif olduğu belirlenmiştir (Kagan ve ark., 1992).



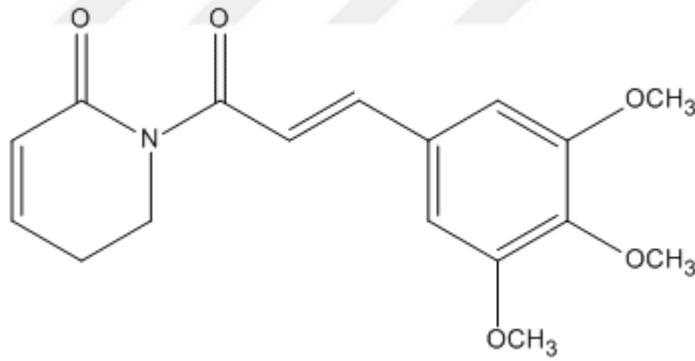
Şekil 1.4. R- α lipoik asit ve S- α lipoik asidin kimyasal formülleri (Erişim adresi: <https://themedicalbiochemistrypage.org/vitamins.php>, erişim tarihi: 25.05.2018).

Packer ve ark. (1995) bir maddenin antioksidan özelliklerini incelerken dikkat edilmesi gereken bazı noktalar olduğunu vurgulamışlardır. Bunlar; maddenin lokasyonu, metal şelatlama özelliği, biyoyararlanımı, gen ekspresyonuna etkisi, farklı antioksidan maddelerle etkileşmesi, serbest radikalleri elimine etmedeki özgülüğü ve oluşan oksidatif hasarı tamir edebilmesi şeklinde sıralanabilir. Bu özelliklerin hepsine sahip maddeler uygun antioksidan maddeler olarak değerlendirilebilir. Bu noktada lipoik asit ve dihidrolipoik asit ikilisi uygun antioksidan madde özelliklerini

en çok gösteren çift denilebilir. Bu nedenle alfa lipoik asit günümüzde evrensel antioksidan madde olarak kabul görmektedir (Han ve ark., 1997).

1.4. Piperlongumin

Piperlongumin (Piplartine, 5,6-dihidro-1-[(2E)-1-oxo-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2-propenyl]-2(1H)-pyridinone), geleneksel olarak bazı hastalıkların tedavisinde kullanılan, *Piperaceae* bitki ailesinden elde edilen doğal bir alkaloiddir. Hintli iki kimyager olan Atal ve Banga piperlonguminin kimyasal yapısını 1963 yılında açıklamışlardır (Aodah ve ark., 2016).



Şekil 1.5. Piperlongumin (4, piperlongumine, 5,6-dihidro-1-[(2E)-1-oxo-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2-propenyl]-2(1H)-pyridinone kimyasal yapısı (Meegan ve ark., 2017).



Şekil 1.6. Piper longum (Erişim adresi: http://gernot-katzers-spice-pages.com/engl/Piper_lon.html, erişim tarihi: 25.05.2018).

Piperlongumin ayurvedik tıp alanında Asya kıtasında özellikle Hindistan ve Güney Amerikada bazı tümörleri, sıtma, bronşit, astım ve öksürük gibi hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır. Piperlonguminin kanserle mücadelede kullanımına ait çalışmalar son yıllarda giderek artmakta ve olumlu sonuçlar yayımlanmaktadır (Chatterjee ve Dutta, 1963 ve Zhang ve ark., 2012).

Piperlongum özellikle de kök kısımları tedavi amaçlı olarak malaria tedavisinde, solunum yolu enfeksiyonlarında, viral kaynaklı hepatitlerde v.s kullanılmaktadır. Piperlongumin son yıllarda umut verici antikanser aktiviteleri çalışmaları ile ilgi konusu haline gelmiştir. Kanser hücrelerine karşı selektif sitotoksitate göstermesinin yanı sıra diğer antikanser ilaçlara kıyasla göğüs, kolon ve osteosarkom kanser hücreleri üzerinde daha yüksek antikanser etki gösterdiği yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur. Brezilya ulusal onkoloji merkezi tarafından yapılan çalışmalarda, kanser tedavisinde kullanımı öngörülen doğal, sentetik yada yarısentetik maddelerin incelendiği çalışmada, toplam 5166 madde içerisinde en aktif maddelerden biri olarak piperlongumin seçilmiştir (Costa-Lotufu ve ark., 2010).

1.5. Amaç

Alfa lipoik asit günümüzde evrensel antioksidan olarak kabul gören, vücudun düşük miktarda da olsa sentezlediği ve bazı besin maddelerinde bulunan, serbest radikallerin hasarını önleyen, yağda ve suda çözünebilen güçlü bir antioksidan maddedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, lipoik asidi potansiyel bir antikanser ajanı yönünden ele almış ve LA'nın göğüs, tiroid ve kolon kanseri gibi çeşitli kanser türlerinden hücre proliferasyonunu inhibe edebileceğini ve kanser hücre hatlarında apoptosisi artırabileceğini göstermiştir. Piperlongumin, Piper bitkisinden elde edilen, geleneksel tıpta çeşitli hastalıklarla mücadelede kullanılan, son yıllarda umut vaat eden antikanser etkileri sağlayan düşük dozlarda bile tümör hücreleri üzerinde sitoksisite gösteren ve sağlıklı hücelere zarar vermeyen doğal bir alkaloid maddedir. Bu çalışmada alfa lipoik asit ve piperlonguminin ayrı ayrı ve birlikte kullanımının akciğer kanseri hücrelerinde antiproliferatif etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

Tez çalışması Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal madde adı	Üretici firma	Katalog numarası
A549 hücre hattı	ATCC	CCL-185
FBS	Lonza	DE14-802E
Tripsin/EDTA	Lonza	BE17-161E
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Lonza	12-604F
Gentamisin Sülfat	Lonza	17-518Z
Tris	Fisher	BP152-1
Glisin	Fisher	BP381-1

Çizelge 2.1. (Devam). Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.

SDS	Fisher	BP166-500
PBS	Lonza	BE17-516F
Alfa Lipoik Asit	Acros Organics	138720050
Piperlongumin	Sigma	SML0221
MTT	Sigma-Aldrich	M-2128
Trypan Blue Solution	Fluka	93595
Mycozap antifungal spray	Lonza	VZA-2001

2.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemeler Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler.

Sarf malzeme adı	Üretici firma	Katalog numarası
Serolojik Pipet, 1 ml	SARSTEDT	86.1251.001
Serolojik Pipet, 5 ml	SARSTEDT	86.1253.001
Santrifüj Tüpü, 15 ml	SARSTEDT	62.554.502
Santrifüj Tüpü, 50 ml	SARSTEDT	62.547.254
Hücre Kültürü Flaskı, 25 cm ²	SARSTEDT	83.3910.002
Hücre Kültürü Flaskı, 75 cm ²	SARSTEDT	83.1813.002
96 kuyucuklu plaka	SARSTEDT	83.1835
Cryo tüp	Sigma	V7884
Lam	Marienfeld	C100000

Çizelge 2.2. (Devam). Çalışmada kullanılan sarf malzemeler.

Lamel	Marienfeld	C911040
Pipet ucu, 1000µl	Biohit	791004
Pipet ucu, 200 µl	FL medical	28052
Pipet ucu, 10µl	Biohit	790011F
Steril Filtre (0.45 µm)	Orange Scientific	1520014
Santrifüj tüpü, 2 ml	SARSTEDT	72.694.006
Pudrasız Nitril Eldiven	Perfectouch	30153

2.1.3. Kullanılan cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Çizelge 2.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Çalışmada kullanılan cihazlar.

Cihaz adı	Üretici firma	Katalog numarası
Steril Güvenlik Kabini	Holten	1,8
İnvert Mikroskop	Olympus	CKX41
Floresan Mikroskop	Leica	CME
CO ₂ 'li İnkubatör	Sanyo	MCO-18AIC
Kırık Buz Makinesi	Frocchetti	AF-100
Derin Dondurucu (-80°C)	Sanyo	MDF-03386S
Elektroforez – Western Blot Sistemi	BIO-RAD	Mini Protean Tetra Cell
Saf Su Cihazı	Millipore	Synergy 185
Su banyosu	Nüve	BM402
ELISA Okuyucu	Tecan	Sunrise
Otomatik Pipetler, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Gilson	Pipetman
Görüntüleme Sistemi	Kodak	Gel Logic 200

Çizelge 2.3. (Devam). Çalışmada kullanılan cihazlar.

Santrifüj, Yüksek Hızlı, Soğutmalı	Sigma	3K30
Güç kaynağı	BIO-RAD	PowerPac Basic
Vorteks	Biosan	Biovortex VI
Hassas terazi	Shimadzu	AUW320

2.2. Yöntem

2.2.1. Hücre kültürünün hazırlanması

Tez çalışmasında akciğer kanser hücre hattı olan A549 hücre hattı (ATCC: CCL-185) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan hücre hattı için DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besiyeri kullanıldı. Hücreler % 10 Fetal Dana Serumu (FBS) ve 50 mg/l Gentamisin sülfat içeren DMEM besiyeri içerisinde 37 °C'de % 5 CO₂ varlığında hücre kültürü inkubatoründe üretildi. Üretilen hücrelerin canlılıkları, çoğalma hızları ve morfolojik yapıları her gün invert mikroskop ile takip edildi. Hücrelerin besiyerleri hücre canlılıklarının ve çoğalma hızlarının invert mikroskop ile takip edilmesi doğrultusunda hücrelerin gereksinimlerine bağlı olarak 2-3 günde bir değiştirildi.

Yeterli yoğunluğuna ulaşan hücrelere ait besiyerleri uzaklaştırılarak hücreler bir kere Ca ve Mg tuzları içermeyen steril PBS ile yıkandı. Hücreler yıkandıktan sonra üzerlerine 1:250 Tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 8-10 dakika hücre kültürü inkubatoründe hücrelerin yüzeyden ayrılması beklendi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı gözlemlendikten sonra üzerlerine besiyerleri eklenerek tripsin nötralize edildi. Daha sonra hücreler santrifüj tüplerine aktararak 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant steril şartlarda uzaklaştırıldıktan sonra peletin üzerine uygun miktarda % 10 Fetal Dana Serumu (FBS) ve 50 mg/l Gentamisin sülfat içeren DMEM besiyeri konularak pipetlenerek hücre süspansiyonu

oluşturuldu. Oluşturulan hücre süspansiyonu yeni flasklara bölünerek pasajlandı.

Tez çalışmasında kullanılan A549 akciğer hücre hattının üretimi ve pasajlanması esnasında kontaminasyonu önlemek amacıyla tek kullanımlık steril pipetler ve filtre kapaklı steril hücre kültürü flaskları kullanıldı. Bütün işlemler hücre kültürü laboratuvarında ve steril güvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi.

2.2.2. MTT hücre canlılık testi

Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT), tetrazolyum tuzlarından biri olup metabolik aktivitenin ölümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. MTT testinin çalışma prensibi, temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu (MTT: sarı) kullanarak formazan (mor) boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin kolorimetrik olarak lmlmesine dayalıdır.

MTT hücre canlılık testi 96 kuyucuklu plaklarda gerçekleştirilmiştir. 75 cm²'lik flasklarda yeterli yoğunluğa (%70-%80) ulaşan hücreler Tripsin-EDTA zltisi eklenerek hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Hücreler santrifüj tüplerine aktarılarak 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant steril şartlarda uzaklaştırdıktan sonra peletin üzerine uygun miktarda % 10 Fetal Dana Serum (FBS) ve 50 mg/l Gentamisin sülfat içeren DMEM besiyeri pipetlenerek hücre süspansiyonu oluşturuldu. Oluşturulan hücre süspansiyonundan her kuyucukta 5×10⁴ hücre/100 l homojen olacak şekilde ekildi. Kuyucuklara ekilen hücreler 37 C'de, %5 CO₂'li inkubatorde bir gün bekletildi. Hücrelerin her kuyucukta yeterli yoğunluğa ulaştığı görüldükten sonra, kuyucuklara kaplanan hücrelerin üzerindeki besiyerleri uzaklaştırılarak çeşitli konsantrasyonlarda piperlongumin ve alfa lipoik asit içeren besiyerleri uygulandı.

Uygulama gerçekleştirildikten 24 ve 48 saat sonra ilgili plaklar etüvden

çıkarıldı ve üzerlerindeki besiyerleri uzaklaştırıldı. Besiyerleri uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyucuğa 100 µl MTT çözeltisi (90 µl besiyeri + 10 µl 5mg/ml MTT) eklendi ve 4 saat 37 °C'de, %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda bütün kuyucuklara 100 µl % 10'luk SDS çözeltisi eklendi ve 12 saat inkübe edildi. Hücrelerin canlılık ölçümü spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda yapıldı.

2.2.3. Hücre lizatlarının oluşturulması

Hücreler 75 cm²'lik flasklarda üretilip yeterli yoğunluğa (%70-%80) ulaştıkları tespit edildikten sonra besiyerleri uzaklaştırılarak Ca ve Mg tuzları içermeyen PBS ile bir kere yıkandı. Yıkanan hücrelerin üzerine belirlenen konsantrasyonlarda piperlongumin ve alfa lipoik asit çözeltileri eklenerek 24 saat etüvde inkübasyona bırakıldılar. İnkübasyon sonucunda belirlenen konsantrasyonlarda piperlongumin ve alfa lipoik asit çözeltileri içeren besiyerleri uzaklaştırılarak hücrelerin üzerlerine Tripsin-EDTA çözeltisi ilave edilerek 8-10 dakika hücre kültürü inkübatöründe hücrelerin yüzeyden ayrılması beklendi. Hücreler santrifüj tüplerine alınarak 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelet üç kez PBS çözeltisi ile yıkandı. PBS çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra hücreler lizis tamponu ile lize edildi.

2.2.4. Protein miktar tayini

Hücrelerden elde edilen lizatların protein miktar tayinleri Antharavally ve ark. (2009) bildirdikleri yöntemle gerçekleştirildi. Yöntem gerçekleştirilirken 96 kuyucuklu mikropalakaların kuyucuklarına örnek ve standartlardan 10 µl konuldu. Bunların üzerine 150 µl 660 nm protein assay çözeltisi eklenerek reaksiyona girmesi için oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Ölçüm ELISA okuyucuda 660 nm'de

gerçekleştirildi. Standart olarak 125, 250, 500, 1000 ve 2000 µg/ml konsantrasyonlarında sığır serum albümini (BSA) kullanıldı. Örnekler ve standartlar üç tekrarlı çalışıldı.

2.2.5. SDS-PAGE ve Western Blot

SDS-PAGE metodunu gerçekleştirmek için gerekli olan jel cam plakalar arasında hazırlanmıştır. Bunun için cam plakalar etanolle temizlenmiş ve cam plakalar arasında boşluk oluşturacak spacer ile birlikte düzeneğe yerleştirilmiştir. Düzeneğin sızdırmazlık testi yapıldıktan sonra önce %12,5'lik resolving jel ve daha sonra stacking jel hazırlanıp dökülmüş ve tarak yerleştirilmiştir. Jelin donmasını takiben jeller elektroforez işleminin gerçekleşeceği elektoroforez tankına alınmış ve tarak çıkartılmıştır. Her bir kuyucuğa 20 µl (20 µg protein içeren) örnek ve bir kuyucuğa 10 µl protein marker yüklenmiştir. Örnekler stacking jel kısmını geçene kadar olan süre zarfında 10 mA, geçtikten sonra ise 20 mA akım uygulanmış ve jel yürütme işlemi tamamlanmıştır. SDS-PAGE işlemi uygulanırken 11 kD ile 245 kD arasındaki molekül ağırlıklı proteinleri içeren standart (Biolabs, Kat No: P7712S) kullanılmıştır.

SDS-PAGE işlemi sonucunda jeller cam plakalar arasından çıkarılarak distile suda 15 dakika boyunca yıkanmıştır. Western blot işlemine geçilmeden önce jel boyutlarında PVDF membran kesilerek 5-6 saniye metanolde bekletilerek aktive edilmiş daha sonra diğer blotlama materyalleri ile birlikte towbin bufferla (25 mM Tris, 192 mM Glisin, 20 % Metanol, pH 8,3) ıslatılmışlardır. Blotlama kasetleri arasında blotlama kağıdı, PVDF membrane, jel ve tekrar blotlama membranı olacak şekilde yerleştirilmiştir. Blotlama kasetleri tanka yerleştirilerek 200 mA akımda 2 saat boyunca blotlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Blotlama işlemi bittikten sonra membranlar blocking bufferda (20 mM Tris, 150 MM NaCl, % 0,1 Tween-20, % 3

Sığır Serum Albumini) 4°C’de bir gece boyunca bekletilmiştir. Bir gece bekletilen membranlar daha sonra aktin (Cell Signaling, Kat No: 8457L), bax (Cell Signaling, Kat No: 2772S) ve surviving (Cell Signaling, Kat No: 2808S) primer antikorlarında oda sıcaklığında 2 saat boyunca çalkalayıcıda inkube edilmiştir. Primer antikorlarda inkube edilen membranlar daha sonra yıkama çözeltisi (0,5 M Tris, 1,5 M NaCl, 0,5 % Tween-20, pH 7,4) ile 3 x 15 dakika çalkalayıcıda yıkanmıştır. Yıkanan membranların üzerine sekonder antikor (Invitrogen, Biotin-xx goat anti-rabbit) konularak çalkalayıcıda 2 saat inkube edilmiştir. Tekrar yıkama çözeltisi ile 3 x 15 dakika çalkalayıcıda yıkandıktan sonra membranların üzeri tamamen kaplanacak şekilde konjugat (Invitrogen, Qdot 625 streptavidin) uygulandı. Western blot analizi sonucu görüntüleme sistemi (Kodak, Gel Logic 200) kullanılarak Kodak Molecular Imaging Software (v. 4.0.1) programı ile değerlendirildi.

2.2.6. İstatistik Analiz

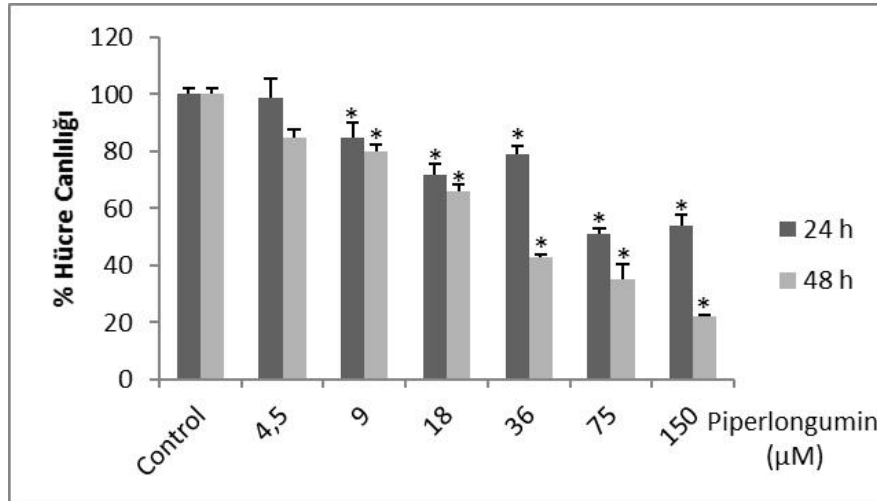
Değişkenler arası farklılığın istatistiksel açıdan kontrolü tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Gruplar arası farklılığın anlamlı bulunduğu değişkenler için ileri aşama (post-hoc) testi olarak Duncan testi’nden yararlanıldı. Tüm istatistiksel analizler minimum % 5 hata payı ile incelendi. İstatistiksel analizler yapılırken SPSS 21 paket programından yararlanıldı.

3. BULGULAR

3.1. MTT Hücre Canlılık Testi Sonuçları

3.1.1. Piperlongumin uygulamalarının A549 hücre canlılığı üzerine etkisi

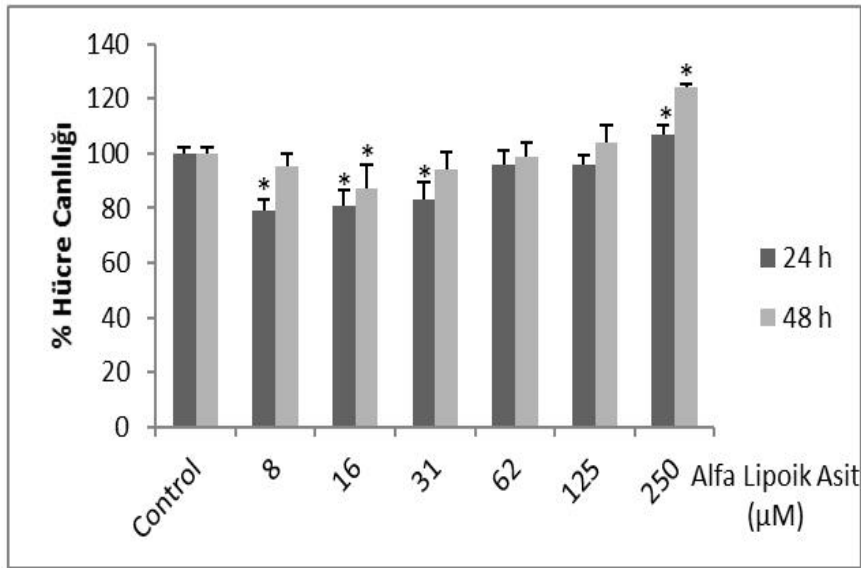
Yapılan çalışmada A549 hücrelerine 0, 4.5, 9, 18, 36, 75 ve 150 μM konsantrasyonlarda piperlongumin uygulanmış ve 24,48 saat inkubasyona bırakılan A549 hücrelerinin hücre canlılık testi MTT canlılık testi ile belirlenmiştir. Kontrol (0 μM) grubunda hücre canlılığı %100 kabul edilmiş ve diğer gruplara ait hücre canlılık değerleri oransal olarak ortalama absorbans değerlerinden hesaplanmıştır. Buna göre 24 saatlik inkubasyonda 4.5, 9, 18, 36, 75 ve 150 μM konsantrasyonlar için hücre canlılık oranları sırasıyla 99, 85, 72, 79, 51, 54 (%) belirlenirken, 48 saatlik inkubasyonda sırasıyla 85, 80, 66, 43, 35, 22 (%) olarak belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonda piperlongumin uygulamalarının A549 hücre canlılığı üzerine etkisi Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Piperlongumin uygulanan A549 hücrelerinde yüzde hücre canlılık oranları (24 ve 48 saat inkubasyon).

3.1.2. Alfa lipoik asit uygulamalarının A549 hücre canlılığı üzerine etkisi

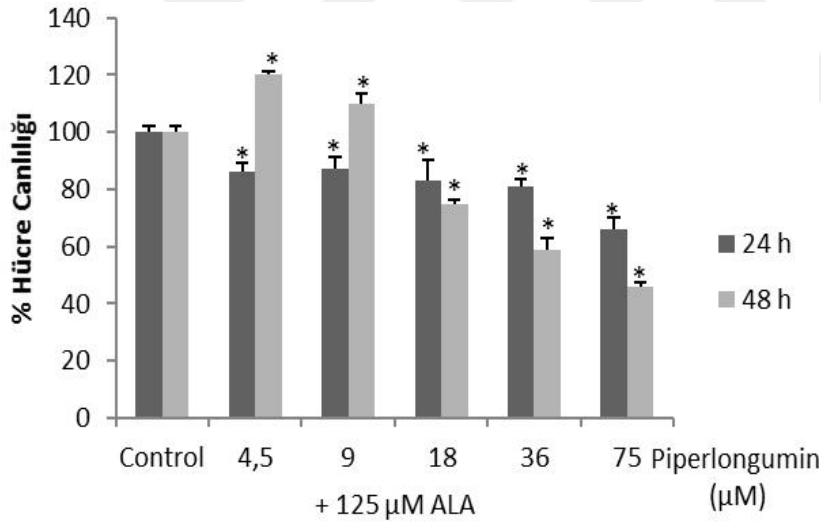
Çalışmada A549 hücrelerine 0, 8, 16, 31, 62, 125 ve 250 μM konsantrasyonlarda alfa lipoik asit uygulanmış ve 24,48 saat inkubasyona bırakılan A549 hücrelerinin hücre canlılık testi MTT canlılık testi ile belirlenmiştir. Kontrol (0 μM) grubunda hücre canlılığı %100 kabul edilmiş ve diğer gruplara ait hücre canlılık değerleri oransal olarak ortalama absorbans değerlerinden hesaplanmıştır. Buna göre 24 saatlik inkubasyonda 8, 16, 31, 62, 125 ve 250 μM konsantrasyonlar için hücre canlılık oranları sırasıyla 79, 81, 83, 96, 96, 107 (%) belirlenirken, 48 saatlik inkubasyonda sırasıyla 95, 87, 94, 99, 104, 124 (%) olarak belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonda piperlongumin uygulamalarının A549 hücre canlılığı üzerine etkisi Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Alfa lipoik asit uygulanan A549 hücrelerinde yüzde hücre canlılık oranları (24 ve 48 saat inkubasyon).

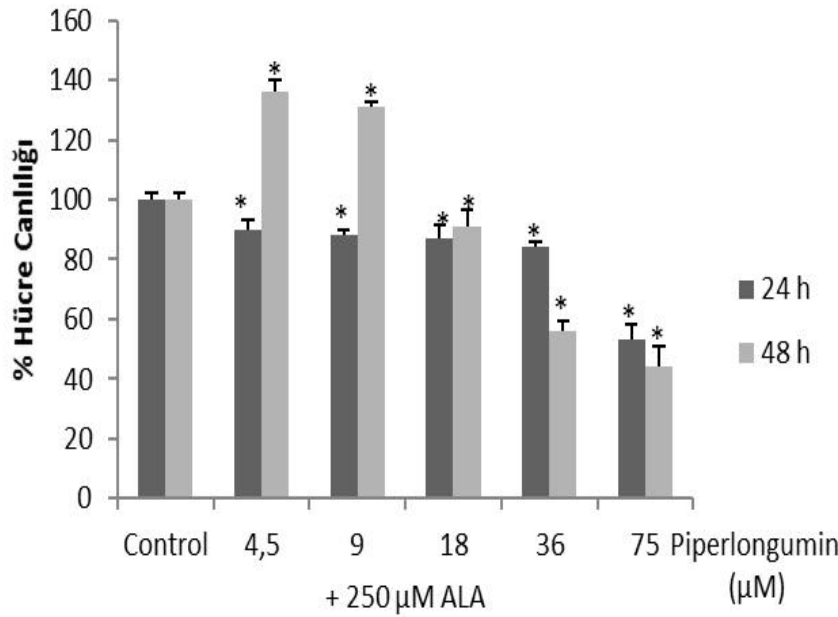
3.1.3. Piperlongumin ve alfa lipoik asidin birlikte uygulamalarının A549 hücre canlılığı üzerine etkisi

Çalışmada 0, 4.5, 9, 18, 36, 75 μM piperlongumin ile birlikte 125 ve 250 μM alfa lipoik asit uygulanmış ve 24,48 saat inkubasyona bırakılan A549 hücrelerinin hücre canlılık testi MTT canlılık testi ile belirlenmiştir. Kontrol (0 μM) grubunda hücre canlılığı %100 kabul edilmiş ve diğer gruplara ait hücre canlılık değerleri oransal olarak ortalama absorbans değerlerinden hesaplanmıştır. Buna göre 24 saatlik inkubasyonda 4.5, 9, 18, 36, 75 μM piperlongumin ile birlikte 125 μM alfa lipoik asit uygulamalarında hücre canlılık oranları sırasıyla 86, 87, 83, 81, 66 (%) olarak, 48 saatlik inkubasyonda ise hücre canlılık oranları sırasıyla 120, 110, 75, 59, 46 (%) olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.3. Piperlongumin ve 125 μM alfa lipoik asit uygulanan A549 hücrelerinde yüzde hücre canlılık oranları (24 ve 48 saat inkubasyon).

Bununla beraber 24 saatlik inkubasyonda 4.5, 9, 18, 36, 75 μM piperlongumin ile birlikte 250 μM alfa lipoik asit uygulamalarında hücre canlılık oranları sırasıyla 90, 88, 87, 84, 53 (%) olarak, 48 saatlik inkubasyonda ise hücre canlılık oranları sırasıyla 136, 131, 91, 56, 44 (%) olarak belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonda piperlongumin ile alfa lipoik asidin birlikte uygulamalarının A549 hücre canlılığı üzerine etkisi şekil 3.3. ve 3.4.'de gösterilmiştir.



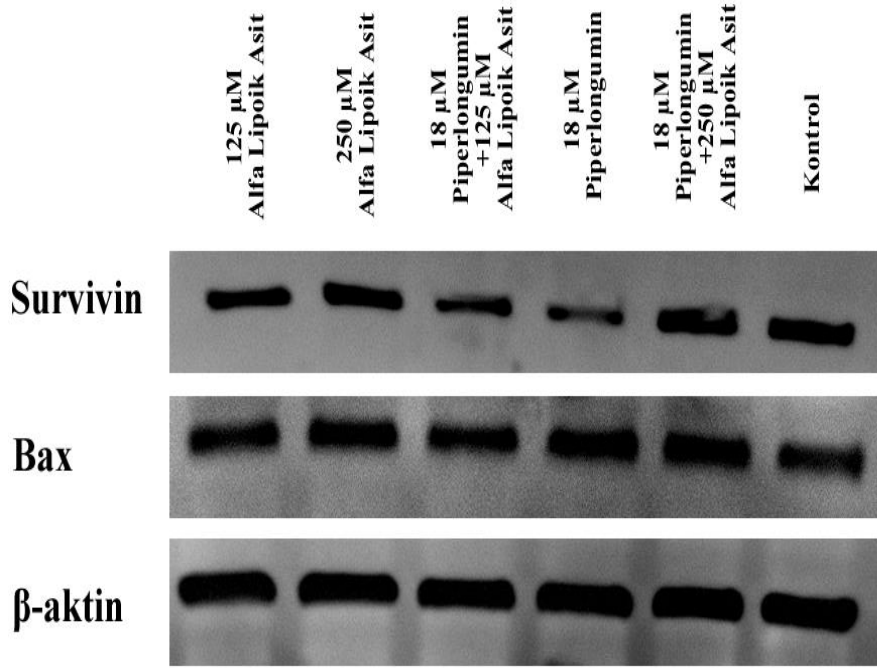
Şekil 3.4. Piperlongumin ve 250 µM alfa lipoik asit uygulanan A549 hücrelerinde yüzde hücre canlılık oranları (24ve 48 saat inkubasyon).

3.2. Western Blot Analiz Sonuçları

3.2.1. Piperlongumin ve alfa lipoik asidin farklı uygulamalarının bax ve survivin protein ekspresyonları üzerine etkisi

Hücelere farklı dozlarda uygulanan piperlongumin, alfa lipoik asit ve piperlongumin ile alfa lipoik asidin kombinasyonları sonucunda hücrelerdeki bax ve survivin protein ekspresyon düzeyleri western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Bunun için hücelere 125 ve 250 µM alfa lipoik asit, 18 µM piperlongumin ve 18 µM piperlongumin ile 125 ve 250 µM alfa lipoik asit kombinasyonları 24 saatlik inkubasyon ile uygulanmıştır. Uygulama ile bax protein ekspresyonu düzeylerinde bir değişim gözlemlenmezken survivin protein ekspresyon düzeyi 18 µM

piperlongumin uygulaması sonucu azalmıştır. Hücrelere farklı dozlarda uygulanan piperlongumin, alfa lipoik asit ve piperlongumin ile alfa lipoik asidin kombinasyonları sonucunda hücrelerdeki bax ve survivin protein ekspresyon düzeylerine ait western blot görüntüleri Şekil 3.5.'de verilmiştir.



Şekil 3.5. Farklı dozlarda piperlongumin ve alfa lipoik asit uygulanan A549 hücrelerine ait western blot görüntüleri (24 saat inkubasyon).

4. TARTIŞMA

Kanser normal düzenleyici mekanizmalara doğru tepki vermeyen anormal hücrelerin proliferasyonu ile karakterizedir. Kanser gelişimini tanımlamak için kullanılan bir terim olan karsinogenez, kontrolsüz hücrelerin oluşması, gelişmesi ve ilerlemesinden oluşan çok aşamalı bir süreçtir. DNA hasarı ile birlikte oluşan ve gelişen anormal hücreler çoğalmaya başlar ve ilerleme aşamasında bu anormal hücrelerde malign hücrelerin oluşumuna yol açan başka değişiklikler meydana gelir (Bennett ve ark., 2012).

Doğal ürünler antikanser ilaç keşfinde önemli rol oynamakla birlikte çok sayıda doğal ürünün potansiyel antikanser etkilerinin olduğu kanıtlanmıştır. Son yıllarda yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar ile antioksidanların ve doğal alkaloidlerin birçok kanser hücresi üzerine antiproliferatif etkisinin olduğu ortaya konmuştur. Doğal bir alkaloid olan piperlongumin özellikle apoptozisi uyararak birçok kanser türünde antikanser özellik gösterirken bir antioksidan olan alfa lipoik asit ile ilgili son yıllarda antikanser aktiviteleri üzerine birçok çalışma yapılmıştır (Damnanovic ve ark., 2014; Du ve Tang, 2014 ve Lu ve ark., 2012).

Akciğer kanseri tedavisi çoklu ilaç direnci ve bunların olumsuz yan etkileri nedeniyle oldukça güç olup doğal ürünlerden elde edilen moleküller akciğer kanserinin tedavisinde güçlü etkilere sahiptir. Birçok doğal ürünün akciğer kanserinin iyileştirilmesine yönelik olarak kullanılmasına ait çalışmalar mevcuttur (Adonis, 2017).

Piperlongumin, yapılan pek çok çalışma ile anti-tümör aktivitesi kanıtlanmış biyoaktif bir moleküldür. Piperlonguminin sitotoksitesinin arkasındaki moleküler mekanizmalar hala açıklığa kavuşturulmaya çalışılırken, yapılan çalışmalar kanser hücrelerinde ROS üretimini indüke ederek toksik etkisini gösterdiğini ve pancreas

kanseri ve melanoma gibi çeşitli kanser türlerinde DNA hasarını artırarak hücre ölümüne neden olduğu gösterilmektedir. Sağlıklı hücrelerde IC50 değeri, kanserli hücrelere oranla daha yüksektir.

Yapılan çalışmalar piperlonguminin, hematolojik kanserler, pankreas, prostat ve idrar kesesi kanseri hücre hatlarında oldukça düşük dozlarda dahi etkisini göstermiştir. En önemlisi nokta ise, etkinliğini gösterdiği düşük dozlarda dahi sağlıklı hücre hatlarında sitotoksik etkisinin hiç olmadığını ya da çok az olduğunu göstermektedir. (Adams ve ark., 2012; Bezerra ve ark., 2005, 2007, 2008a; Bokesch ve ark., 2011; Duh ve ark., 1990a, 1990b; Golovine ve ark., 2013; Jyothi ve ark., 2009; Kong ve ark., 2008; Lin ve ark., 2007; Raj ve ark., 2011). Çalışmamızda, daha önce farklı hücre hatlarında yapılan çalışmalara paralel olarak piperlongumin molekülü akciğer kanser hücre hattında da değişen dozlarda antiproliferatif etki göstermiştir.

Yapılan çalışmalarda piperlonguminin anti-apoptotik proteinlerin sentezlenmesini inhibe ettiği, buna rağmen bazı pro-apoptotik gen ürünlerinin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu çalışmaların önemli tarafı, kanserli hücrelerde bu etkiler görülmesine rağmen, aynı dozlar uygulandığında sağlıklı hücre hatlarında bu etkiler görülmemiştir (Raj ve ark., 2011). Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre piperlongumin uygulanan akciğer hücre hattı hücrelerinde apoptozis inhibitör proteini olan survivin'in ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, lipoik aside potansiyel bir antikanser ajanı yönünden ele almış ve LA'in göğüs, tiroid ve kolon kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde hücre proliferasyonunu inhibe edebileceğini göstermiştir (Damnajanovic ve ark., 2014 ve Li ve ark., 2015). Lipoik asidin meme, kolon, akciğer ve hematolojik kanser hücre hatlarında apoptozisi arttırdığı belirtilmektedir (Alpay ve ark., 2016 ve Kono ve ark., 2012). Son çalışmalar lipoik asidin antiproliferatif etkisinin, piruvat dehidrojenazın aktivasyonuna bağlı olabileceğini ve böylece aerobic glikolizin baskılanmasını ve hücre ölümünün indüklenebileceğini göstermektedir (Feuerecker ve ark., 2012).

Kanser hücreleri hızlı bölündükleri için sağlıklı hücrelerden daha fazla demir ihtiyacına sahiptirler. Dolayısıyla kanser hücreleri demirin azalmasına duyarlıdırlar. Bu durum kanser tedavileri için yeni bir yöntem olarak değerlendirilmektedir. Lipoik asit, kanser tedavisinde metal şelatlama özelliğine sahip olduğundan dolayı önemli etki mekanizmasına sahip olabileceği düşünülmektedir (Ou ve ark., 1995).

Lipoik asit kanser adjuvant tedavisinde diğer ilaçlarla kombine olarak kullanılabilir. Birçok antikanser ilaç, ROS oluşumuna sebep olur. Hem alfa lipoik asit hem de dihidrolipoik asidin tümör hücreleri üzerindeki inhibitör etkilerinden ayrı olarak, antikanser ajanları tarafından üretilen serbest radikalleri ve ROS'ları temizleyebildikleri bildirilmiştir (Biewenga ve ark., 1997).

Lipoik asit, tümör hücreleri üzerindeki inhibitör etkiyi arttırmak ve antikanser ajanları tarafından üretilen ROS'dan korunmak amacıyla sistemik antikanser tedavisine bir destek olarak düşünülmektedir. Ancak, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre alfa lipoik asidin akciğer kanser hücre hattı üzerine düşük dozlarda antiproliferatif etki gösterdiği, artan dozlarda ise proliferatif etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

Kanser tedavisinde hem ilaç yan etkilerinden sakınmak hem de direnç gelişimini engellemek için birden fazla ilaç kombinasyon halinde uygulanmaktadır. Sarkoma tümörü bulunan farelerde 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarında uygulanan piperlongumin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada piperlonguminin tümör boyutunu küçülttüğü ve bu etkisinin bir antikanser ilacı olan 5-FU ile birlikte kullanıldığında daha da arttığı görülmüştür (Bezerra ve ark., 2008). Transgenik farelerde meme kanseri tedavisinde piperlongumin kullanımının araştırıldığı bir çalışmada, iki hafta süreyle i.p uygulanan piperlonguminin tümör dokusunda öncelikle vaskülarizasyonu azalttığı ve daha sonra da tümör dokusunda küçülmeyi sağladığı görülmüştür.

Piperlongumin ile antioksidan madde olan N-asetil sistein'in birlikte uygulandığı hücrelerde, apoptozisin görülmemesi de piperlonguminin etkisini ROS üzerinden gösterdiğine kanıttır (Parkinson ve ark., 2011; Raj ve ark., 2011). Kanser

hücrelerinde bu etki görülmesine rağmen, piperlongumin normal hücrelerde ROS seviyesini yükseltmemektedir.

Çalışmamızda piperlongumin ile alfa lipoik asidin beraber kullanımında tek başına olan uygulamalara göre antiproliferatif etki göstermediği gözlemlenmiştir. Bununla beraber tek başına piperlongumin uygulamasının apoptozis inhibitör proteini olan survivin'in ekspresyonunda azalmaya neden olurken alfa lipoik asit ve piperlonguminin beraber uygulandığı durumlarda survivin ekspresyonunda bir değişime rastlanmamıştır.

Yaptığımız çalışmada piperlongumin ve alfa lipoik asidin antiproliferatif etkisi incelenmiştir. MTT hücre canlılık test sonuçlarına göre piperlongumin ve alfa lipoik asidin tek başlarına ve birlikte kullanımlarında değişik dozlara bağlı olarak antiproliferatif özelliklerinde farklılık gözlemlenmiştir. Piperlonguminin tek başına kullanımında düşük dozlarda bile antiproliferatif etki gözlenirken alfa lipoik asit uygulamalarında düşük dozlarda antiproliferatif etki gözlemlenirken, yüksek dozlarda proliferatif etki görülmüştür. Piperlongumin ve alfa lipoik asidin beraber kullanımında ise tek başına uygulamalara göre antiproliferatif etki azalmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser, dünya çapında morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerinden biridir. Devam eden küresel demografik ve epidemiyolojik çalışmalar, önümüzdeki on yıllarda, özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde, giderek artan bir kanser ölüm oranı ve 2025'in başlarında yıllık olarak 20 milyonun üzeri yeni kanser vakası beklenmektedir. Kanser tedavisinde cerrahi rezeksiyon, kemoterapi ve radyasyon terapisi de dahil olmak üzere çeşitli sınırlamaları olan stratejiler uygulanmaktadır. Son zamanlarda ilgi, tümörlerin önlenmesi ve tedavisinde hedefe yönelik anti-kanser ilaçlar olarak kabul edilen doğal ürünler ve monoklonal antikor tabanlı biyolojik ajanlar üzerine yoğunlaşmıştır.

Mevcut antikanser ajanlara (kemoterapi ajanları) karşı direnç gelişimi, yeni antikanser ajanlar için bir araştırma alanı yaratmaktadır. Bununla birlikte, normal hücreler üzerinde etki göstermeden ya da en az toksik etkiyle anormal hücrelerin çoğalmasını seçici olarak inhibe edebilecek yeni bir ajanın geliştirilmesi oldukça güçtür. Bu nedenle, kanser kemoterapisi ilaç endüstrisi için çok önemlidir ve çeşitli kanser tipleri üzerinde antikanser aktivite gösterme olasılığı bulunan yeni kemoterapötik ajanların geliştirilmesi üzerinde çalışmalar halen devam etmektedir. Yeni ilaç geliştirme uzun pahalı karmaşık bir süreçtir. Son 10-15 yıl içerisinde yeni ilaç geliştirmelerine harcanan bütçe yaklaşık bir milyar dolar olarak rapor edilmiştir.

Bir alkaloid olan piperlongumin, *Piper longum Linn* bitki türlerinden elde edilir. Bugüne kadar anti-platelet agregasyonu, antibakteriyel ve insektisid, anti-aterosklerotik, anksiyolitik / antidepresan , antidiyabetik ve anti-inflamatuvar gibi birçok biyolojik etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda piperlongumin etken maddesinin onkoloji alanında kullanılmasına yönelik çalışmalar hızla artmakta ve umut verici sonuçlar yayınlanmaktadır.

Lipoik asit klinikte ilk kez amanita mantarı zehirlenmelerinin tedavisinde kullanılmıştır. Aynı araştırmacılar kliniğe gelen nöropatik şikayetlerin tedavisinde de

lipoik asit kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Yapılan diğer çalışmalarda lipoik asidin diğer antioksidanların okside formlarını azaltarak daha güçlü bir antioksidan etki sağladığı, metal bağlayıcı ajan olarak görev yaptığı, nükleer faktör kappa B (NFkB) ve insülinin sinyal yollarında düzenlemeler yaptığı, aterosklerotik plak oluşumunu önlediği, endotel disfonksiyonu ve egzersiz sonrasındaki oksidatif stresi azalttığı yayınlanmıştır.

Yaptığımız çalışmada, piperlongumin ve alfa lipoik asidin A549 akciğer kanseri hücre hattında antiproliferatif ve apoptotik etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak;

- Hücre canlılık testi sonuçlarına göre piperlongumin ve alfa lipoik asidin tek başlarına ve birlikte kullanımlarında doza bağlı olarak antiproliferatif özellik gösterdiği,
- Piperlonguminin tek başına kullanımında düşük dozlarda bile antiproliferatif etki gösterirken alfa lipoik asit uygulamalarında düşük dozlarda antiproliferatif etki gözlemlenirken, yüksek dozlarda proliferatif etki gösterdiği,
- Piperlongumin ve alfa lipoik asidin birlikte kullanımında ise tek başına uygulamalara göre antiproliferatif etkinin azaldığı ve bunun nedeninin piperlonguminin sitotoksik etkisini oksidatif stresi artırarak gerçekleştirdiği ve alfa lipoik asidin antioksidan özelliği ile piperlonguminin etkisini baskıladığı,
- Bax protein ekspresyonu düzeylerinde bir değişim gözlemlenmezken survivin protein ekspresyon düzeyi 18 µM piperlongumin uygulaması sonucu azaldığı, survivin proteininin antiapoptotik proteinler ailesinin üyesi olması nedeniyle bu proteinin ekspresyonundaki azalmanın apoptotik hücre ölümü yolağının aktive olmasının sonucu olabileceği,
- Küçük bir doğal molekül olan ve son yıllarda yapılan çalışmalar ile sağlıklı hücrelerde sitotoksik etkisinin olmadığı/çok düşük olduğu ortaya konulmuş olan piperlongumin molekülünün, antioksidanlar ile birlikte kullanımının piperlonguminin etkisini azaltacağı yada tamamen ortadan kaldıracağı sonucuna varılmıştır.

Piperlonguminin hangi yollardan hücre ölümünü tetiklediğini ortaya koymak amacıyla detaylı çalışmaların yapılması, in vivo kanser modellerinde bu

molekölün tek başına ve mevcut kemoterapi ajanları ile kombine kullanımının etkilerinin incelenmesinin piperlonguminin potansiyel kemoterapi ajanı olarak kullanımı konusunda yol gösterici olacaktır.



ÖZET

Akciğer Kanseri Hücrelerinde Alfa Lipoik Asit ve Piperlonguminin Hücre Canlılığına Etkileri

Alfa lipoik asit serbest radikallerin hasarını önleyen, yağda ve suda çözünebilen güçlü bir antioksidan maddedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, lipoik aside potansiyel bir antikanser ajanı yönünden ele almış ve alfa lipoik asidin çeşitli kanser türlerinde hücre proliferasyonunu inhibe edebileceğini ve kanser hücre hatlarında apoptozisi artırabileceğini göstermiştir. Piperlongumin, yapılan pek çok çalışma ile anti-tümör aktivitesi kanıtlanmış ve düşük dozlarda bile sağlıklı hücrelere zarar vermeden, tümör hücreleri üzerinde antiproliferatif etki gösteren doğal bir alkaloid maddedir. Bu çalışma, akciğer kanser hücrelerinde alfa lipoik asit ve piperlonguminin kombine kullanımının yararını incelemek için yapılmıştır.

Çalışmada A549 akciğer kanser hücrelerine değişen konsantrasyonlarda piperlongumin ve/veya alfa lipoik asit uygulanmış, hücre canlılıkları MTT testi ile ortaya konmuştur. Bununla beraber uygulanan bazı konsantrasyonlarda apoptozis ile ilgili olan bax ve survivin proteinlerinin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre piperlongumin düşük dozlarda bile antiproliferatif etki gösterirken alfa lipoik asit düşük dozlarda antiproliferatif yüksek dozlarda ise proliferatif etki göstermiştir. Beraber uygulamalarda ise alfa lipoik asidin piperlonguminin antiproliferatif etkisini inhibe ettiği görülmüştür. Western blot sonuçlarına göre bax protein düzeylerinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Apoptozis inhibitor proteini olan survivinin ekspresyonu ise piperlongumin uygulanan hücrelerde düşmüş fakat alfa lipoik asit ile beraber piperlongumin uygulananlarında bir değişiklik gözlenmemiştir.

Elde edilen veriler ışında piperlonguminin akciğer kanser hücreleri üzerinde güçlü antiproliferatif etkisi olduğu görülmüştür. Alfa lipoik asit ile uygulamalarında piperlonguminin antiproliferatif etkisinin azaldığı görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: A549 hücre hattı, Akciğer kanseri, Alfa lipoik asit, Piperlongumin.

SUMMARY

Effect of Alpha Lipoic Acid and Piperlongumine on Cell Viability in Lung Cancer Cells

Alpha lipoic acid is fat and water soluble antioxidant that prevent damage from free radicals. Recent studies suggested that lipoic acid has anticancer potential and may inhibit cell proliferation in various types of cancer and may increase apoptosis in cancer cell lines. Many studies showed that piperlongumine, a natural alkaloid, has antitumor activity and has antiproliferative effect on tumor cells without harming healthy cells even at low doses. The purpose of this study is to investigate the effect of alpha lipoic acid and piperlongumine in lung cancer cells.

In this study A549 lung cancer cells treated with various concentration of piperlongumine and alpha lipoic acid. Cell viability was determined by MTT assay. Also bax and survivin protein expression levels were determined. According to the results piperlongumine has antiproliferative effect even at low doses, whereas alpha lipoic acid has proliferative effect at low doses and antiproliferative effect at high doses. Also our results showed that alpha lipoic acid inhibits the antiproliferative effect of piperlongumine. According to western blot results bax expressions were found unaltered. Survivin, an apoptosis inhibitor protein, expressions were decreased in piperlongumine treated cells but no significant change was observed in piperlongumine+alpha lipoic acid treated cells.

In the present study we found that piperlongumine has strong antiproliferative effect on lung cancer cells. Despite that alpha lipoic acid has inhibits antiproliferative effect of piperlongumine.

Keywords: A549 cell line, Alpha lipoic acid, Lung cancer, Piperlongumine.

KAYNAKLAR

- ADAMS DJ, DAI M, PELLEGRINO G, WAGNER BK, STERN AM, SHAMJÍ AF, SCHREIBER SL (2012). Synthesis, cellular evaluation, and mechanism of action of piperlongumine analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109 (38)**: 15115–15120.
- ADONIS M (2017). Prevention, Diagnosis, and Treatment of Lung Cancer, London: IntechOpen.
- ANTHARAVALLY BS, MALLIA KA, RANGARAJ P, HANEY P, BELL PA (2009). Quantitation of proteins using a dye–metal-based colorimetric protein assay. *Analytical Biochemistry*, **385(2)**: 342-345.
- AKKOÇLU A. Akciğer Kanseri. Erişim Adresi: [http://file.toraks.org.tr/TORAKSFD23NJKL4NJ4H3BG3JH/meslekikurslar-2-ppt-pdf/Atilla_Akkoclu.pdf]. Erişim Tarihi: 23/04/2018.
- AKYÜZ MF (2006). Evre III B 64 Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri Hastada Eş Zamanlı ve Ardışık Kemoradyoterapinin Karşılaştırmalı Yıllık Cevap Oranları. Erişim Adresi: [http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/pdf/radyasyon_onkolojisi/dr_mehmet_fatih_akyuz.pdf]. Erişim Tarihi: 10.02.2018.
- ALPAY M, YURDAKOK-DİKMEN B, KISMALI G, SEL T (2016). Antileukemic effects of piperlongumine and alpha lipoic acid combination on Jurkat, MEC1 and NB4 cells in vitro. *J Cancer Res Ther*, **12**: 556-560.
- AODAH A, PAVLIK A, KARLAGE K, MYRDAL PB (2016). Preformulation Studies on Piperlongumine. *Plos One*, **11(3)**: 1-16
- ATABEY N (2004). Akciğer Kanserinin Moleküler Temeli. Erişim Adresi: [http://documents.tips/download/link/akciger-kanserinin-molekueler-temeli]. Erişim Tarihi: 27/04/2016.
- BAİLEY-WILSON JE, AMOS CI, PINNEY SM (2004). A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25. *Am J Hum Genet*; **75**: 460-474.
- BAST A, HAENEN GRMM (2002). The toxicity of antioxidants and their metabolites. *Environmental toxicology and Pharmacology*, **11(3-4)**: 251-258.
- BAYKARA O (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bil Derg*, **3(5)**: 154-165.

- BENNETT LL, ROJAS S, SEEFELDT T (2012). Role of Antioxidants in the Prevention of Cancer. *J Exp Clin Med*, **4(4)**: 215-222.
- BERENBLUM I, BURGER M, KNYSZYŃSKI A (1974). Inhibition of radiation-induced lymphatic leukemia in C57BL mice by 19S alpha-2-globulin (alpha 2-MG) from human blood serum. *Radiation Research Society*, **60(3)**: 501-505.
- BEZERRA DP, PESSOA C, MORAES MO, SILVEIRA ER, LIMA MA, ELMIRO FJ, COSTALOTUFO LV (2005). Antiproliferative effects of two amides, piperine and piplartine, from Piper species. *Z. Naturforsch*, **60(7-8)**: 539-543.
- BEZERRA DP, MILITÃO GC, CASTRO FO, PESSOA C, MORAES MO, SILVEIRA ER, LIMA MA, ELMIRO FJ, COSTA-LOTUFO LV (2007). Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. *Toxicol. In Vitro*, **21 (1)**: 1-8.
- BEZERRA DP, CASTRO FO, ALVES AP, PESSOA C, MORAES MO, SILVEIRA ER, LIMA MA, ELMIRO FJ, ALENCAR NM, MESQUITA RO, LIMA MW, COSTA-LOTUFO LV (2008). In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. *J. Appl. Toxicol*, **28 (2)**: 156-163.
- BIEWENGA G, DE JONG J, BAST A (1994). Lipoic acid favors thiolsulfinate formation after hypochlorous acid scavenging: a study with lipoic acid derivatives. *Arch Biochem Biophys*, **312**: 114-20.
- BIEWENGA GP, HAENEN GR, BAST A (1997). The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol*, **29**: 315-331.
- BOKESCH HR, GARDELLA RS, RABE DC, BOTTARO DP, LINEHAN WM, MCMAHON JB, MCKEE TC (2011). A new hypoxia inducible factor-2 inhibitory pyrrolinone alkaloid from roots and stems of Piper sarmentosum. *Chem. Pharm. Bull*, **59 (9)**: 1178-1179.
- BULLOCK MW, BROCKAMANN JA, PATTERSON EL, PIERCE JV (1954). Macchi M.E., Proposed structures for protogen-A and protogen_B. *J. Am. Chem Soc*, **76**: 1827-1828.
- BUSSE E, ZIMMER G, SCHOPOHL B, KORNUBER B (1992). Influence of alpha-lipoic acid on intracellular glutathione in vitro and in vivo. *Arzneimittelforschung*, **42**: 829-831.
- BUTTERWORTH DM, JONES AW, KOTTECHA B (1992). Salivary duct carcinoma: report of a case and review of the literature. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, **420(4)**: 371-374.

- CHATTERJEE A, DUTTA CP (1963). The structure of piperlongumine, a new alkaloid isolated from the roots of Piperlongum. *Sci. Cult*, **29**: 568–570.
- COLDITZ GA, SELLERS TA, TRAPIDO E (2006). Epidemiology - identifying the causes and preventability of cancer? *Nat Rev Cancer*, **6(1)**: 75-83.
- COLEMAN MD, EASON RC, BAILEY CJ (2001). The therapeutic use of lipoic acid in diabetes: a current perspective. *Environ Toxicol Pharmacol*, **10**: 167-172.
- CORN PG, EL-DEIRY WS (2002). Derangement of growth and differentiation control in oncogenesis. *Bioessays*, **24(1)**: 83-90.
- COSTA-LOTUFO LV, MONTENEGRO RC, ALVES APNN, MADEIRA SVF, PESSOA C, MORAES MEA, MORAES MO (2010). The contribution of natural products as source of new anticancer drugs: studies carried out at the national experimental oncology laboratory from the Federal University of Ceará. Ver. *Virtual Quím*, **2 (1)**: 47–58.
- CRAGG GM, NEWMAN DJ (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol*, **100**: 72–9.
- DAMNAJANOVIC I, KOCIC G, NAJMAN S, STOJANOVIC S (2014). Chemopreventive potential of alpha lipoic acid in the treatment of colon and cervix cancer cell lines. *Bratisl Lek Listy*, **115**: 611- 616.
- DELA CRUZ CS, TANOUE LT, MATTHAY RA (2011). Lung Cancer: epidemiology, etiology and prevention. *Clin Chest Med*, **32**: 605-644.
- DEVEREUX TR, RISINGER JI, BARRETT JC (1999). Mutations and altered expression of the human cancer genes: what they tell us about causes. *IARC Sci Publ*, **146**: 19-42.
- DU J, TANG XL (2014). Natural products against cancer: a comprehensive bibliometric study of the research projects, publications, patents and drugs. *J Cancer Res Ther*, **1**: 27-37.
- DUH CY, WU YC, WANG SK (1990a). Cytotoxic pyridone alkaloids from the leaves of Piper aborescens. *J. Nat. Prod*, **53 (6)**: 1575–1577.
- DUH CY, WU YC, WANG SK (1990b). Cytotoxic pyridone alkaloids from Piper aborescens. *Phytochemistry*, **29 (8)**: 2689–2691.
- ELENBAAS B, SPIRIO L, KOERNER F, FLEMING MD, ZIMONJIC DB, DONAHER JL, POPESCU NC, HAHN WC, WEINBERG RA (2001). Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev*, **15(1)**: 50-65.
- ENGİN K, ÖZYARDIMCI N (2001). Akciğer kanserleri. tanı ve tedavide temel ilkeler ve uygulamalar. İstanbul: Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd. Şti. 50-56.

- FEUERECKER B, PIRSIG S, SEIDL C, AICHLER M, FEUCHTINGER A, BRUCHELT G AND SENEKOWITSCH-SCHMIDTKE R (2012). Lipoic acid inhibits cell proliferation of tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther*, **13**: 1425-1435.
- FUTREAL PA, KASPRZYK A, BIRNEY E, MULLIKIN JC, WOOSTER R, STRATTON MR (2001). Cancer and genomics. *Nature*, **409**: 850-852.
- GLADE MJ (1999). Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997. *Nutrition*, **15(6)**: 523-6.
- GOLOVINE KV, MAKHOV PB, TEPER E, KUTIKOV A, CANTER D, UZZO RG, KOLENKO VM (2013). Piperlongumine induces rapid depletion of the androgen receptor in human prostate cancer cells. *Prostate*. **73 (1)**: 23–30.
- GÖKSEL T, AKKOÇLU A (2002). Turkish Thoracic Society, Lung and Pleural Malignancies Study Group. Pattern of lung cancer in Turkey, 1994-1998. *Respiration*, **69**: 207-10.
- GÖZÜKARA EM (1989). Biyokimya. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi yayınları, Malatya, 845-848.
- HAN D, HANDELMAN G, MARCOCCI L, SEN CK, ROY S, KOBUCHI H, FLOHE L, PACKER L (1997). Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cysteine utilization. *Biofactors*, **6**: 321-338.
- HUSSAIN SP, AMSTAD P, RAJA K, AMBS S, NAGASHIMA M, BENNETT WP, SHIELDS PG, HAM AJ, SWENBERG JA, MARROGI AJ, HARRIS CC (2000). Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Res*, **60**: 3333-3337.
- JAYAPRAKASAM BJ, VANISREE M, ZHANG Y (2006). Impact of alkyl esters of caffeic and ferulic acids on tumor cell proliferation cyclooxygenase enzyme and lipid peroxidation. *J Agric Food Chem*, **54**: 5375–5381.
- JYOTHI D, VANATHI P, GOWRI PM, RAO VRS, RAO JM, SREEDHAR AS (2009). Diferuloylmethane augments the cytotoxic effects of piplartine isolated from Piper chaba. *Toxicol. In Vitro*, **23 (6)**: 1085–1091.
- KAGAN VE, SHVEDOVA A, SERBINOVA E (1992). Dihidrolipoic acid-a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. Reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals. *Biochem pharmacol*, **44**: 1637-1649.
- KARACA EG (2009). Lipoik Asit: Evrensel Antioksidan. *AKÜ-Fen Bilimleri Dergisi*, **8(1)**: 231-245

- KEFEL M, YILDIZ L, AYDIN O, UZUN O, KANDERMİR B (2008). Sarcomatoid carcinomas of the lung: Report of three cases. *Türk Patoloji Dergisi*, **24(1)**: 64-68.
- KONG EH, KIM YJ, KIM YJ, CHO HJ, YU SN, KIM KY, CHANG JH, AHN SC (2008). Piplartine induces caspase-mediated apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. *Oncol. Rep*, **20 (4)**: 785–792.
- KONO Y, INOMATA M, HAGIWARA S, HIRATSUKA T, SUZUKI K, KOGA H, SHIRAIISHI N, NOGUCHI T, KITANO S (2012). Antiproliferative effects of a new α -lipoic acid derivative, DHL-HisZnNa, in HT29 human colon cancer cells in vitro. *Expert Opin Ther Targets*, **16**: 103-109.
- KOŞAR F. Akciğer Kanseri. Erişim Adresi: [http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/sb/per/belge/akciger_kanseri.pdf]. ErişimTarihi: 15.05.2018
- KUZEYLİ YILDIRIM Y, UYAR M, FADILLIOĞLU Ç (2005). Kanser Ağrısı ve Yaşam Kalitesine Etkisi. *Ağrı*, **17(4)**: 17-22.
- LI BJ, HAO XY, REN GH, GONG Y (2015). Effect of lipoic acid combined with paclitaxel on breast cancer cells. *Genet Mol Res*, **14**: 17934-17940.
- LI Y, LIM S (2016). Preparation of aqueous alpha-lipoic acid dispersions with octenylsuccinylated high amylose starch. *Carbohydrate Polymers*, **140**: 253-259.
- LIN Z, LIAO Y, VENKATASAMY R, HIDER RC, SOUMYANATH A (2007). Amides from Piper nigrum L. with dissimilar effects on melanocyte proliferation in vitro. *J. Pharm. Pharmacol*, **59 (4)**: 529–536.
- LIN HP, KUO LK, CHUU CP (2012). Combined treatment of curcumin and small molecule inhibitors suppresses proliferation of A549 and H1299 human non-small-cell lung cancer cells. *Phytother Res*, **26**: 122–126
- LOZANO R, NAGHAVI M, FOREMAN K (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, **380**: 2095-128.
- LU JJ, BAO JL, CHEN XP, HUANG M, WANG YT (2012). Alkaloids Isolated from Natural Herbs as the Anticancer Agents. *Evid Based Complement Alternat Med*, **2012**: 485042.
- MEEGAN AJ, NATHWANI S, TWAMLEY B, ZISTERER DM, O'BOYLE NM (2017). Piperlongumine (piplartine) and analogues: Antiproliferative microtubule-destabilising agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **125**: 453-463.

- MÜSELLİM B (2007). Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi. Erişim Adresi: [\[http://www.ctf.edu.tr/stek/pdfs/58/5809.pdf\]](http://www.ctf.edu.tr/stek/pdfs/58/5809.pdf). Erişim Tarihi:10/04/2018.
- NAVARI-IZZO F, QUARTACCI MF, SGHERRI C (2002). Lipoic acid:a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiol Biochem*, **40**: 463-470.
- OU P, TRITSCHLER HJ, WOLFF SP (1995). Thioctic (lipoic) acid: a therapeutic metal-chelating antioxidant? *Biochem Pharmacol*, **50**: 123-126.
- PACKER L, WITT E, TRITSCHLER HJ (1995). α -Lipoic acid as a biological antioxidant. *Science Direct-Free Radical Biology & Medicine*, **19(2)**: 227-250.
- PANDEY G, MADHURI S (2006). Medicinal plants: better remedy for neoplasm. *Indian Drugs*, **43**: 869-74.
- PARKIN DM, BRAY F, FERLAY J (2005). Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin*, **55**: 74-108.
- PARKINSON EI, HERGENROTHER PJ (2011). Runaway ROS as a selective anticancer strategy. *Chem Med Chem*, **6 (11)**: 1957-1959.
- RAJ L, IDE T, GURKAR AU, FOLEY M, SCHENONE M, LI X, TOLLIDAY NJ, GOLUB TR, CARR SA, SHAMJI AF, STERN AM, MANDINOVA A, SCHREIBER SL, LEE SW (2011). Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. *Nature*, **475 (7355)**: 231-234.
- RAO KVK, SCHWARTZ SA, NAIR HK, AALINKEEL R, MAHAJAN SCHAWDA R (2004). Plant derived products as a source of cellular growth inhibitory phytochemicals on PC-3M, DU-145 and LNCaP prostate cancer cell lines. *Curr Sci.*, **87**: 1585-8.
- SETHI TK, EL-GHAMRY MN, KLOECKER GH (2012). Radon and Lung Cancer. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*, **10(3)**: 157-164.
- STONER GD, MUKHTAR H (1995). Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J Cell Biochem Suppl.*, **22**: 169-80.
- STREPPER RS, HENRIKSEN EJ, JACOB S, HOKAMA JY, DONOVAN LF, TRITSCHLER HJ (1997). Differential effects of lipoic acid stereoisomers on glucose metabolism in insulin-resistant skeletal muscle. *Am. J. Physiol*, **273**: E185-E191.
- SÜLEYMAN H, GÜL V, ERHAN E (2018). Oksidatif Stres ve Doku Hasarı. *Erzincan Tıp Dergisi*, **1(1)**: 1-4.

TETİKÇOK R, ÖZÇETİN M, ÇELTEK YILDIZ N, OKTAY G, ÜNLÜ U, ŞENGÜL M (2015). Lipoik asit. *Çağdaş Tıp Dergisi*, **5(3)**: 206-209.

ULUKAYA E. (2002). Erişim Adresi
[http://biyokimya.uludag.edu.tr/Lecture_Cancer_2002.pdf]. Erişim Tarihi:
08/05/2018.

WAKELEE HA, CHANG ET, GOMEZ SL (2007). Lung cancer in never smokers—
a different disease. *Nat Rev Cancer*, **7**: 788-790

YENER NA, DÜŞMEZ APA D (2014). Akciğer Kanserinde Morfolojik Tanı ve
Sınıflama. *Trd Sem*, **2**: 281-289

YOKUŞ B, ÇAKIR DÜ (2002). İnvivo Oksidatif DNA Hasarı Biyomarkeri; 8-
Hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, **5**:
535- 43.

YOKUŞ B, METE N (2003). Oksidatif DNA hasarı. *Klinik Laboratuar Araştırma
Dergisi*, **7(2)**: 51-64.

YOKUŞ B, ÇAKIR DÜ (2012). Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*,
1(2): 7-18

ZHANG P, HUANG QI, HUA ZC (2012). Advances in studies on pharmacological
effects of piperlongumine. *Chinese Tradit. Herbal Drugs*, **43 (1)**: 201–204.

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: Selver Çağda MERAL
Doğum tarihi: 14.07.1989
Doğum yeri: Antalya
Medeni hali: Evli
İletişim: Ankara İl Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü
Gıda ve Yem Şube Müdürlüğü Yenimahalle/Ankara
cagdacamlidag@gmail.com
0507 921 61 89

II. Eğitimi

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2014-2018
Lisans: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 2006-2013
Lise: Hacı Dudu Mehmet Gebizli Lisesi, 2003-2006

III. Ünvanları

Veteriner Hekim, 2013

IV. Mesleki Deneyimi

06/2012-09/2012 LARA ANTALYA HAYVAN HASTANESİ (Antalya)
- Stajyer Veteriner Hekim
08/2015-05/2017 KIZILÖREN İLÇE GIDA TARIM ve
HAYVANCILIK MÜDÜRLÜĞÜ - Veteriner Hekim
05/2017- ANKARA İL GIDA TARIM ve HAYVANCILIK
MÜDÜRLÜĞÜ - Veteriner Hekim