

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN PROSTAT KANSER HÜCRE KÜLTÜRÜNDE
MATRİKS METALLOPROTEİNAZ ENZİM EKSPRESYONUNUN DÜZENLENMESİNDE NF-kB
SİNYALİZASYONUN ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

Farmakoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans
Tezi

Ecz. Deniz ÖĞÜT

Danışman
Doç. Dr. Buket REEL
Yrd. Doç. Dr. Ceren G. KORKMAZ

İZMİR
2013

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN PROSTAT KANSER HÜCRE KÜLTÜRÜNDE
MATRİKS METALLOPROTEİNAZ ENZİM EKSPRESYONUNUN DÜZENLENMESİNDE NF-kB
SİNYALİZASYONUN ROLÜNÜN İNCELENMESİ**

Farmakoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans
Tezi

Ecz. Deniz ÖĞÜT

Danışman
Doç. Dr. Buket REEL
Yrd. Doç. Dr. Ceren G. KORKMAZ

İZMİR
2013

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

Adı Soyadı

İmza

Danışman: Doç. Dr. Buket REEL

.....

Üye: Prof. Dr. Zeliha Kerry

.....

Üye: Prof. Dr. Şule Kalkan

.....

Yedek Üyeler:

Prof. Dr. Levent H. Üstünes

.....

Doç. Dr. Nergiz Murat

.....

Yüksek Lisans Tezinin Kabul Edildiği Tarih :

ÖNSÖZ

Anabilim dalımızın ve fakültemizin her türlü imkanından faydalanmamı sağlayan, yeni ve eski dönem AbD başkanlarımız Sayın Prof. Dr. Zeliha KERRY ve Prof. Dr. Levent ÜSTÜNES hocalarıma,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel, teknik bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, eğitimime değerli katkılar sağlayan ve destekleri için kendilerine minnet duyacağım saygıdeğer tez danışmanı hocalarım Doç. Dr. Buket REEL ve Yrd. Doç. Dr. Ceren G. KORKMAZ'a,

Tez çalışmalarım boyunca bana her ne koşulda olursa olsun desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimleri ile örnek olan ve beni motive eden sevgili ağabeyim; Dr. Ecz. Mehmet ARUN'a,

İmmünohistokimya çalışmaları ile tezime farklı bir boyut kazandıran Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AbD'nin saygıdeğer öğretim üyesi Doç. Dr. Bekir Uğur ERGÜR ve Araş. Gör. Dr. Serap Cilaker MICİLİ'ya,

Hücre kültürü çalışmalarlarım için laboratuvarının tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Fakültemiz Toksikoloji AbD'nin saygıdeğer hocası Prof. Dr. Hande Gürer ORHAN ile hücre kültürü konusunda bilgi ve deneyimlerinden faydalandığımız Eczacılık Fakültesi Dekanlığı Hücre Kültürü Laboratuvarı sorumlularından Doç. Dr. Petek Ballar KIRMIZIBAYRAK'a,

Gerek teknik bilgi ve malzeme yardımlarıyla destek veren, gerekse pozitif enerjileri ile bana ilham veren EBİLTEM'de görev yapan Sayın Prof. Dr. Kemal S. Korkmaz hocama ve AbD'imizdaki sevgili ablalarım Yrd. Doç. Dr. Yasemin Tulum ERAÇ ile Arş. Gör. Dr. Çiğdem Selli KARAKAYA'ya,

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince, bana her konudaki yardımları için, E.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AbD'da bulunan tüm değerli hocalarım ve çalışma arkadaşlarıma,

Gerek eczacılık eğitimimde gerekse sosyal hayatımda tüm olumlu ve olumsuz olaylarda eksikliklerini hiç hissetmediğim, her konuda desteklerini aldığım sevgili yol arkadaşlarım Uzm. Ecz. Mustafa KOTMAKÇI, Ecz. İsmail ÖZTÜRK ve Cansu ÇAPA'ya,

Maddi manevi tüm güçlüklerle karşı her zaman yanımda olan, beni özveri ile yetiştiren, haklarını asla ödeyemeyeceğimi bildiğim sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürler...

*Ecz. Deniz Öğüt
İzmir- 2013*

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
TABLolar DİZİSİ	v
ŞEKİLLER DİZİSİ	vii
KISALTMALAR LİSTESİ	x
1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER	1
1.1. GİRİŞ	1
1.2. GENEL BİLGİLER	3
1.2.1. <i>PROSTAT KANSERİ</i>	3
1.2.1.1. Kanser ve Epidemiyolojisi	3
1.2.2. <i>Prostat Yapısı</i>	4
1.2.3. <i>Prostat Kanser ve Epidemiyolojisi</i>	6
1.2.4. <i>Prostat Kanser Teşhisi ve Etkeninin Belirlenmesine İlişkin Çalışmalar</i>	10
1.2.4.1. PSA ve Prostat Kanser	10
1.2.4.2. İnflamasyon ve Prostat Kanser	11
1.2.4.2.1. İnflamasyon ile Prostat Kanser Teşhisinin Zorluğu	13
1.2.4.3. Enfeksiyon Ajanları ve Prostat Kanser	14
1.2.4.3.1. Oksidatif Hasara Bağlı İnflamasyon ve Prostat Kanser	15
1.2.4.4. Sitokinler ve Prostat Kanser	16
1.3. EKSTRASELÜLER MATRİKS YIKIMI VE MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR	17
1.3.1. <i>Ekstrasellüler Matris (ESM)</i>	17
1.3.2. <i>Matris Metalloproteinazlar (MMP'LER)</i>	18
1.3.2.1. MMP'lerin Yapısı	19
1.3.3. <i>MMP Türleri</i>	22
1.3.3.1.1. Jelatinaz A (MMP-2):	24
1.3.3.1.2. Jelatinaz B (MMP-9):	24
1.3.3.1.3. Nötrofil Kollajenaz (MMP-8):	26
1.3.3.1.4. Stromelisin 2 (MMP-10):	27
1.3.4. <i>MMP Aktivitesinin Düzenlenmesi</i>	27
1.3.4.1. Transkripsiyonel Düzenleme	28
1.3.4.2. Pro-enzimin Aktivasyonu Aşamasında Düzenleme	29
1.3.4.3. MMP Enzim Aktivitesinin İnhibisyonu	31
1.3.4.3.1. TIMP'ler (Matris Metalloproteinaz Doku İnhibitörleri)	31
1.3.4.3.2. α2-makroglobulin	32
1.3.4.3.3. Tetrasiklinler	32
1.3.4.3.4. Sentetik MMP İnhibitörleri	32
1.3.5. <i>Matris Metalloproteinazlar ve Kanser İlişkisi</i>	35
1.3.5.1. Kanserde MMP'lerin Üretimi	37
1.3.5.2. Kanser Tiplerine Göre Öne Çıkan MMP'ler	38
1.3.6. <i>Matris Metalloproteinazlar ve Prostat Kanser Arasındaki İlişki</i>	40
1.3.7. <i>Onkolojide Terapötik Hedef Olarak MMP'ler</i>	40
1.4. TETRASİKLİNLER VE KANSER TEDAVİSİ	42
1.4.1. <i>Tetrasiklinler</i>	42
1.4.1.1. Tetrasiklinlerin Etki Mekanizması	43
1.4.1.2. Tetrasiklinlerin Yan Etkileri	44
1.4.1.3. Tetrasiklinlerin Farmakokinetiği	45
1.4.1.4. Tetrasiklinlerin Günlük Tedavide Kullanımları	45
1.4.1.5. Doksisiklin	46
1.4.2. <i>Onkolojide Terapötik olarak Tetrasiklinler: Pre-Klinik Çalışmalar</i>	47
1.4.3. <i>Onkolojide Terapötik Amaçlı Tetrasiklinler: Klinik Deneyler</i>	49
1.4.4. <i>Doksisiklinin MMP'ler ve Kanserle İlişkisi</i>	51
1.5. NF-κB (NÜKLEER FAKTÖR KAPPA B)	52

1.5.1. Yapısı, Fonksiyonu ve Düzenlenmesi	53
1.5.1.1. NF-kB Ailesi	53
1.5.1.2. IκB (inhibitör Kappa B / NF-kB inhibitörü) Protein Ailesi	55
1.5.1.3. IKK (IκB Kinaz) Protein Ailesi	56
1.5.2. NF-kB Sinyal Yolağı	56
1.5.3. NF-kB Sinyal Yolağının Önemi	62
1.5.4. NF-kB ve KANSER İLİŞKİSİ	64
1.5.4.1. Onkojenezde NF-kB Ekspresyonu	67
1.5.4.2. NF-kB'nin Onkoproteinler ile Regülasyonu	68
1.5.4.3. Onkojenezde NF-kB'nin Proliferasyon ve Apoptozdaki Rolü	71
1.5.4.4. NF-kB İnhibisyonu ile Kanserden Korunma ve Kanser Tedavisi	73
1.5.5. NF-kB ve MMP İlişkisi	76
1.5.5.1. Prostat Kanserinde NF-kB Aracılı MMP'lerin Etkileri	78
2. GEREÇ VE YÖNTEM	79
2.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ	79
2.1.1. Hücre Kültürü Protokolü	79
2.1.1.1. Hücrelerin Dondurulması ve Çözündürülmesi	79
2.1.1.2. Hücrelerin Yetiştirilmesi ve Pasajlanması	81
2.1.1.3. Hücre Sayımı	82
2.1.1.4. Starvasyon İşlemi	83
2.1.1.4.1. %2'lik Starvasyona Alma	83
2.1.1.4.2. %0,5'lik Starvasyona Alma	83
2.1.1.5. LPS ile İndüksiyon	83
2.1.1.6. Doksisisiklin Uygulaması	84
2.2. HÜCRELERİN GRUPLANDIRILMASI VE DENEYE ALINMASI	84
2.2.1. BİRİNCİ SERİ DENEYLER (TRİPAN MAVİSİ İLE BOYAMA ve ZİMOGRAFI YÖNTEMİ İLE KONSANTRASYON BELİRLENMESİ)	85
2.2.1.1. LPS Konsantrasyonunun Belirlenmesi	85
2.2.1.2. Doksisisiklin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	86
2.2.2. İKİNCİ SERİ DENEYLER (JELATİN ZİMOGRAFI)	87
2.2.2.1. Hücrelerin İzolasyonu	87
2.2.2.2. Protein İzolasyonu	88
2.2.2.3. Protein Konsantrasyonu Ölçümü	88
2.2.2.4. Jelatin Zimografi İncelemeleri	89
2.2.3. ÜÇÜNCÜ SERİ DENEYLER (WESTERN BLOT)	92
2.2.3.1. Western Blot İncelemeleri	93
2.2.4. DÖRDÜNCÜ SERİ DENEYLER (İMMÜNOHİSTOKİMYA)	98
2.2.4.1. İmmünohistokimyasal İncelemeler	98
2.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	100
3. BULGULAR	101
3.1. UYGUN KONSANTRASYON BELİRLEME ÇALIŞMALARI	101
3.1.1. TRİPAN MAVİSİ İLE HÜCRE SAYIMI ve PROLİFERASYONUN BELİRLENMESİ	101
3.1.1.1. Farklı Konsantrasyonlarda LPS İndüksiyonun Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi	101
3.1.1.2. Farklı Konsantrasyonlarda Doksisisiklin Uygulamasının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi	102
3.1.1.3. Etkili LPS Konsantrasyonuna Karşı Farklı Konsantrasyonlarda Doksisisiklin Uygulamalarının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri	104
3.1.2. JELATİN ZİMOGRAFI YÖNTEMİ İLE YAPILAN KONSANTRASYON BELİRLEME ÇALIŞMALARI	105
3.1.2.1. Farklı LPS Konsantrasyonlarının Jelatinazlara Etkisi	105
3.1.2.2. Farklı Doksisisiklin Konsantrasyonlarının Jelatinazlara Etkisi	105
3.1.2.3. Etkili LPS Konsantrasyonuna Karşı Uygulanan Farklı Doksisisiklin Konsantrasyonlarının Jelatinazlara Etkisi	106
3.2. JELATİN ZİMOGRAFI ANALİZLERİ	107
3.3. WESTERN BLOT ANALİZLERİ	109
3.3.1. NF-kB EKSPRESYONU	109
3.3.2. IκB-α EKSPRESYONU	111
3.3.3. p-IκB-α EKSPRESYONU	113

3.3.4. Ikb Kinaz- β (IKK- β) EKSPRESYONU	114
3.3.5. MMP-9 EKSPRESYONU	116
3.3.6. MMP-2 EKSPRESYONU	117
3.3.7. MMP-8 EKSPRESYONU	119
3.3.8. MMP-10 EKSPRESYONU	120
3.4. İMMÜMOHİSTOKİMYASAL ANALİZLER	122
3.4.1. NF-kB EKSPRESYONU	122
3.4.2. p-IkB- α EKSPRESYONU	123
3.4.3. IKK- β EKSPRESYONU	126
3.4.4. MMP-9 EKSPRESYONU	128
3.4.5. MMP-8 EKSPRESYONU	130
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	132
4.1. NF-kB VE KANSER İLİŞKİSİ	132
4.2. LPS'İN PROLİFERATİF ETKİSİ	134
4.3. LPS'İN MMP'LERE ETKİSİ	135
4.4. LPS'İN NF-kB YOLAĞINA ETKİLERİ	137
4.5. LPS'İN NF-kB ARACILI MMP'LERE ETKİLERİ	140
4.6. DOKSİSİKLİNİN PROLİFERASYONA ETKİSİ	144
4.7. DOKSİSİKLİNİN MMP'LERE ETKİSİ	147
4.8. DOKSİSİKLİNİN NF-kB YOLAĞINA ETKİLERİ	150
4.9. DOKSİSİKLİNİN NF-kB ARACILI MMP'LERE ETKİLERİ	152
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	154
6. ÖZET	157
7. ABSTRACT	159
8. KAYNAKLAR	160

TABLÖLAR DİZİSİ

Tablo 1.1: Kanserin belirgin özellikleri	3
Tablo 1.2: MMP enzimlerinin substrat özgüllüğüne göre sınıflandırılması	23
Tablo 1.3: Jelatinazların salıverilmesini etkileyen faktörler	25
Tablo 1.4: Sentetik MMP inhibitörlerinin sınıflandırılması	33
Tablo 1.5: Klinik denemeleri süren ikinci kuşak sentetik MMP'ler	34
Tablo 1.6: NF-kB gen/protein ailesinin sınıflandırılması.....	54
Tablo 1.7: NF-kB'nin alt üniteleri ve temel özellikleri	55
Tablo 2.1: Hücre kültürü uygulamalarında kullanılan gereçler.	80
Tablo 2.2: PC-3 hücrelerinin yetiştirileceği kültür ortamının hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler ve oranları.	81
Tablo 2.3: Fosfat tamponu (phosphate buffered saline-PBS) hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler.	82
Tablo 2.4: Protein ekstraksiyon tamponu hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler.	88
Tablo 2.5: Jelatin zimografi yöntemi için kullanılan aygıtlar.	90
Tablo 2.6: Jelatin zimografide poliakrilamid jellerin hazırlanması için gerekli çözelti, kimyasal maddeler (10 ml için).	91
Tablo 2.7: Jelatin zimografi yöntemi için kullanılan tamponlar, çözeltiler, kimyasal maddeler.	92
Tablo 2.8: Western blotta poliakrilamid jellerin hazırlanması için gerekli çözelti, kimyasal maddeler (10 ml için).	95
Tablo 2.9: Western blot yöntemi için kullanılan tamponlar, çözeltiler, kimyasal maddeler.....	96
Tablo 2.10: Western blot yöntemi için kullanılan antikorlar ve görüntüleme ajanı.	97
Tablo 2.11: Western blot yöntemi için kullanılan aygıt ve gereçler.....	98
Tablo 2.12: İmmünohistokimya yöntemi için kullanılan antikorlar ve boyalar.	100
Tablo 3.1: LPS'in farklı konsantrasyonları ile 24 saat süreli indüksiyonlar sonunda belirlenen hücre sayıları.	102
Tablo 3.2: Doksisisiklinin farklı konsantrasyonları ile 24 saat süreli inkübasyonlar sonunda belirlenen hücre sayıları.	103
Tablo 3.3: Eş zamanlı olarak LPS (0.5 µg/ml) indüksiyonu ve farklı konsantrasyonlarda doksisisiklinin 24 saat süre ile inkübasyonu sonunda hesaplanan hücre sayıları.	104

Tablo 3.4: 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklinin (5µg/ml) rölatif MMP-9 aktivite değerleri.....	109
Tablo 3.5: Eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklin (5 µg/ml) uygulamalarının NF-kB ekspresyon düzeyine etkisi.	110
Tablo 3.6: Eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklin (5 µg/ml) uygulamalarının IκB-α ekspresyon düzeyine etkisi.....	112
Tablo 3.7: Eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklin (5 µg/ml) uygulamalarının p-IκB-α ekspresyon düzeyine etkisi.....	113
Tablo 3.8: Eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklin (5 µg/ml) uygulamalarının IKK-β ekspresyon düzeyine etkisi.	115
Tablo 3.9: Eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklin (5 µg/ml) uygulamalarının MMP-9 ekspresyon düzeyine etkisi.....	116
Tablo 3.10: Eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklin (5 µg/ml) uygulamalarının MMP-2 ekspresyon düzeyine etkisi.....	118
Tablo 3.11: Eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklin (5 µg/ml) uygulamalarının MMP-8 ekspresyon düzeyine etkisi.....	119
Tablo 3.12: Eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklin (5 µg/ml) uygulamalarının MMP-10 ekspresyon düzeyine etkisi.....	121
Tablo 3.13: Kontrol, doksisisiklin, LPS ve LPS + doksisisiklinin uygulandığı PC-3 hücre gruplarında NF-kB immünopozitivitesine özgü skor değerleri.....	123
Tablo 3.14: Kontrol, doksisisiklin, LPS ve LPS + doksisisiklinin uygulandığı PC-3 hücre gruplarında p-IκB-α immünopozitivitesine özgü skor değerleri.	125
Tablo 3.15: Kontrol, doksisisiklin, LPS ve LPS ile doksisisiklinin birlikte uygulandığı PC-3 hücre gruplarında IKK-β immünopozitivitesine özgü skor değerleri.....	127
Tablo 3.16: Kontrol, doksisisiklin, LPS ve LPS + doksisisiklinin uygulandığı PC-3 hücre gruplarında MMP-9 immünopozitivitesine özgü skor değerleri	129
Tablo 3.17: Kontrol, doksisisiklin, LPS ve LPS + doksisisiklinin uygulandığı PC-3 hücre gruplarında MMP-8 immünopozitivitesine özgü skor değerleri.	131

ŞEKİLLER DİZİSİ

Şekil 1.1: Prostat yapısı	5
Şekil 1.2: Prostatın bölümleri.....	5
Şekil 1.3: Yaşa bağlı olarak prostat kanseri gelişimi.....	6
Şekil 1.4: Amerikan Sağlık Örgütü'nün 2008 yılında yaptığı test sonuçlarına göre dünya üzerindeki ülkelerin prostat kanseri insidansı ve mortalitesi	8
Şekil 1.5: 2005 yılında Türkiye'de en sık görülen 10 kanser çeşidi	9
Şekil 1.6: Normal prostattan prostat kanserine kadar geçen süreçte oluşan değişiklikler	11
Şekil 1.7: MMP enzimlerinin moleküler yapısı	21
Şekil 1.8: MMP'lerin üç boyutlu temel yapısı	21
Şekil 1.9: MMP enzim aktivitesinin düzenlenmesi	28
Şekil 1.10: MMP'ler için hücre yüzeyi ile ilişkili aktivasyon kaskadı.....	30
Şekil 1.11: Tetrasiklinin kimyasal formülü.....	43
Şekil 1.12: Doksisiklinin kimyasal formülü.	47
Şekil 1.13: LPS, TNF ve IL-1 ile uyarılabilen klasik NF-kB yolağı ve inhibitörleri	57
Şekil 1.14: Farklı reseptör aracılı klasik ve alternatif NF-kB sinyal yolağı.	59
Şekil 1.15: Farklı indüksiyon ajanları ile klasik ve alternatif NF-kB sinyal yolağı	60
Şekil 1.16: TNF- α aracılı anti-apoptotik ile apoptotik etkinin oluşumu ve alternatif NF-kB sinyal yolağının klasik yolağa etkisi.....	61
Şekil 1.17: Onkogenjenlerce uyarımda ve kanser kemo ve radyorezistansında NF-kB'nin rolü	64
Şekil 1.18: NF-kB'nin yapısal aktivasyonu ile ilişkili olan farklı kanser türleri	65
Şekil 1.19: Kanser oluşum ve gelişiminden sorumlu tutulan NF-kB'nin hedef genleri	66
Şekil 1.20: LPS aracılı sinyal iletimi sonucunda etkilenen gen aileleri ve NF-kB sinyal yolağına etki eden proteinler	69
Şekil 1.21: TNF ve diğer uyarımlarla gerçekleşen NF-kB indüksiyonunun apoptozu baskılayan genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu yönetmesi.....	71
Şekil 1.22: LPS uyarımına bağlı PI3K ve AKT yolağı aktivasyonunun aracılık ettiği NF-kB aktivasyonu ve MMP-9 ekspresyonu.....	77
Şekil 3.1: LPS'in farklı konsantrasyonları ile 24 saat süreli indüksiyonlar sonunda belirlenen hücre sayıları	102

Şekil 3.2: Doksisisiklinin farklı konsantrasyonları ile 24 saat süreli inkübasyonlar sonunda belirlenen hücre sayıları	103
Şekil 3.3: Eş zamanlı olarak LPS (0.5 µg/ml) indüksiyonu ve farklı konsantrasyonlarda doksisisiklinin (µg/ml) 24 saat süre ile inkübasyonu sonunda belirlenen hücre sayıları	104
Şekil 3.4: PC-3 hücre hattında 24 saat süre ile uygulanan farklı konsantrasyonlardaki LPS'in jelatinaz ekspresyon ve aktiviteleri üzerindeki etkisi	105
Şekil 3.5: PC-3 hücre hattında 24 saat süre ile ve farklı konsantrasyonlarda uygulanan doksisisiklin'in jelatinaz ekspresyon ve aktiviteleri üzerine etkisi	106
Şekil 3.6: Eş zamanlı 24 saat süreli uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve farklı konsantrasyonlarda doksisisiklinin PC-3 hücrelerindeki jelatinaz ekspresyon ve aktiviteleri üzerine etkisi	107
Şekil 3.7: Eş zamanlı 24 saat süreli uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve/veya doksisisiklinin (5µg/ml) PC-3 hücrelerindeki jelatinaz ekspresyon ve aktiviteleri üzerine etkisi.	108
Şekil 3.8: PC-3 hücre hattında 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklinin (5µg/ml) MMP-9 aktivitesi üzerine etkileri.....	109
Şekil 3.9: PC-3 hücre hattında eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklinin (5µg/ml) NF-kB ekspresyonu üzerine etkisi ve temsili western blot görüntüsü.....	111
Şekil 3.10: PC-3 hücre hattında eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklinin (5µg/ml) IκB-α ekspresyonu üzerine etkisi ve temsili western blot görüntüsü.....	112
Şekil 3.11: PC-3 hücre hattında eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklinin (5µg/ml) p-IκB-α ekspresyonu üzerine etkisi ve temsili western blot görüntüsü.....	114
Şekil 3.12: PC-3 hücre hattında eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklinin (5µg/ml) IKK-β ekspresyonu üzerine etkisi ve temsili western blot görüntüsü.....	115
Şekil 3.13: PC-3 hücre hattında eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklinin (5µg/ml) MMP-9 ekspresyonu üzerine etkisi ve temsili western blot görüntüsü.....	117

Şekil 3.14: PC-3 hücre hattında eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklinin (5µg/ml) MMP-2 ekspresyonu üzerine etkisi ve temsili western blot görüntüsü.....	118
Şekil 3.15: PC-3 hücre hattında eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklinin (5µg/ml) MMP-8 ekspresyonu üzerine etkisi ve temsili western blot görüntüsü.....	120
Şekil 3.16: PC-3 hücre hattında eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklinin (5µg/ml) MMP-10 ekspresyonu üzerine etkisi ve temsili western blot görüntüsü.....	121
Şekil 3.17: (A) Kontrol, (B) doksisisiklin, (C) LPS (D) LPS + doksisisiklinin uygulandığı PC-3 hücre gruplarında NF-kB immünpozitivitesi için belirlenen temsili görüntüler	123
Şekil 3.18: (A) Kontrol, (B) doksisisiklin, (C) LPS ve (D) LPS + doksisisiklinin uygulandığı PC-3 hücre gruplarında p-IkB-α immünpozitivitesi için belirlenen temsili görüntüler	125
Şekil 3.19: (A) Kontrol, (B) doksisisiklin, (C) LPS ve (D) LPS + doksisisiklinin uygulandığı PC-3 hücre gruplarında IKK-β immünpozitivitesi için belirlenen temsili görüntüler.....	127
Şekil 3.20: (A) Kontrol, (B) doksisisiklin, (C) LPS ve (D) LPS + doksisisiklinin uygulandığı PC-3 hücre gruplarında MMP-9 immünpozitivitesi için belirlenen temsili görüntüler	129
Şekil 3.21: (A) Kontrol, (B) doksisisiklin, (C) LPS ve (D) LPS + doksisisiklinin uygulandığı PC-3 hücre gruplarında MMP-8 immünpozitivitesi için belirlenen temsili görüntüler	131

KISALTMALAR LİSTESİ

AP-1	Aktivatör Protein -1 (Activator Protein 1)
BAFF	B-hücreleri Aktive Edici Faktör (B-Cell Activating Factor)
BPH	Benin Prostat Hiperplazisi (Benign Prostate Hyperplasia)
CD40L	CD40 Ligand (CD40 Ligand)
c-IAP	Hücreler Apoptoz Proteinini İnhibitörü (Cellular Inhibitor of Apoptosis)
CMT	Kimyasal Olarak Modifiye Edilmiş Tetrasiklin (Chemically Modified Tetracycline)
COX	Siklooksijenaz (Cyclooxygenase)
CT-FBS	Kömürle İşlem Görmüş Fötal Sığır Serum (Charcoal Treated Fetal Bovine Serum)
DBD	DNA Bağlanma Bölgesi (DNA Binding Domain)
DD	Ölüm Bölgesi (Death Domain)
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Ortamı (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DU145	Androjen Bağımsız İnsan Prostat Kanseri Beyin Nodu Metastatik Hücreleri (Androgen-Insensitive Human Prostate Cancer Cell Lines Derived From Brain Metastasis)
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (Ethylenediaminetetraacetic Acid)
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)
ELISA	Enzim İlişkili İmmünsorbent Analizi (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
EMMPRIN	Ekstraselüler Matriks Metalloproteinaz İndükleyici (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer)
EMSA	Elektroforetik Jel Kayma Tekniği (Electrophoretic Mobility Shift Assay)
ERK	Ekstraselüler Sinyal-Düzenleyici Kinaz (Extracellular Signal-Regulated Kinase)
ESM	Ekstraselüler Matriks (Extracellular Matrix)
FADD	Fas-Bağımlı Ölüm Domaini (Fas-Associated Protein with Death Domain)

FBS	Fötal Sığır Serumı (Fetal Bovine Serum)
FEV1	Zorlu Bir Ekspirasyonun 1 Saniyesinde Çıkarılan Gaz Volümü (Forced Expiratory Volume1)
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast Growth Factor)
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü (Hepatocyte Growth Factor)
IκB	NF-κB İnhibitörü (Inhibitor of NF-κB)
IKK	IκB Kinaz (IκB Kinase)
IL	İnterlökin (Interleukin)
IL1α	İnterlökin 1 Alfa (Interleukin 1 Alpha)
IL1β	İnterlökin 1 Beta (Interleukin 1 Beta)
ICC	İmmunositokimya (Immunocytochemistry)
IHC	İmmunohistokimya (Immunohistochemistry)
ISH	<i>In situ</i> Hibridizasyon (<i>In situ</i> Hybridization)
JNK	C-Jun NH2-Terminal Kinazı (C-Jun NH2-Terminal Kinase)
LNCaP	Androjene Duyarlı Prostat Kanseri Lenf Nodu Metastatik Hücresi (Androgen-Sensitive Human Prostate Cancer Cell Lines Derived From Lymph Node Metastasis)
LPS	Lipopolisakkarit (Lipopolysaccharide)
MAPK	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz (Mitogen-Activated Protein Kinase)
MBP	Miyelin Bazlı Protein (Myelin Basic Protein)
MCP-1	Monosit Kemotaktik Protein-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1)
MEKK	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz ERK'nin Kinazı (MAP3K) (MAP Kinase Kinase Kinase)
MMP	Matriks Metalloproteinaz (Matrix Metalloproteinase)
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit (Messenger Ribonucleic Acid)

NF-kB	Nükleer Faktör Kappa B (Nuclear Factor Kappa B)
NIK	NF-kB-İndükleyici Kinaz (NFkB Inducing Kinase)
NSAID	Steroid Olmayan Anti-inflamatuvar İlaçlar (Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs)
OAL	Oküler Adneksal Lenfoma (Ocular Adnexal Lymphoma)
PAI-1	Plazminojen Aktivatör İnhibitörü-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1)
PBS	Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate Buffered Saline)
PC-3	Androjene Duyarsız Prostat Kanseri Kemik Metastazı Hücresi (Androgen-İnsensitive Human Prostate Cancer Cell Lines Derived From Bone Metastasis)
PCA	Prostat Kanseri (Prostate Cancer)
PI3K	Fosfatidil İnoзит 3-Kinaz (Phosphatidylinositide 3-kinase)
PIA	Proliferatif İnflamatuvar Atrofi (Proliferative Inflammatory Atrophy)
PIN	Prostatik İntraepitelyal Neoplazi (Prostatic Intraepithelial Neoplasia)
PKC	Protein Kinaz C (Protein Kinase C)
PMA	Forbol Miristat Asetat (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate)
PMSF	Fenil Metil Sülfonil Florür (Phenylmethylsulfonyl Fluoride)
PSA	Prostat Spesifik Antijen (Prostate-Specific Antigen)
PVDF	Polivinilidenflorür (Polyvinylidene Fluoride)
RH	Rel Homolojisi (Rel Homology)
RIP	Reseptör İnteraktif Protein (Receptor-Interacting Protein)
ROS	Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygene Species)
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time Polymerase Chain Reaction)
SR	Serbest Radikal
TBP	TATA Bağlayan Protein (TATA Binding Protein)

TGFβ	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (Transforming Growth Factor Beta)
TIMP	MMP Doku İnhibitörü (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases)
TLR	Toll Benzeri Reseptör (Toll Like Receptor)
TNF-R	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü (Tumor Necrosis Factor Receptor)
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör-Alfa (Tumor Necrosis Factor-Alpha)
TRADD	TNF-Reseptör İlişkili Ölüm Domaini (TNF-Receptor Associated Death Domain)
TRAF	TNF-Reseptör İlişkili Faktör (TNF-Receptor Associated Factor)
Tβ-R	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta-Reseptörü (Transforming Growth Factor Beta Receptor)
Ub	Ubikitin (Ubiquitin)
uPA	Ürokinaz-Tip Plazminojen Aktivatörü (Urokinase-Type Plasminogen Activator)
uPAR	Ürokinaz-Tip Plazminojen Aktivatörü Reseptörü (Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor)
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
α1-AT	α1-Antitripsin/α1-Proteinaz İnhibitörü (α1-Antitripsin/α1-Proteinase Inhibitor)

BÖLÜM I

1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

1.1. *GİRİŞ*

Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) elastin, kollajen ve proteoglikanlar gibi ekstraselüler matriks (ESM) proteinlerini yıkıma uğratan, Zn^{+2} ve Ca^{+2} 'a bağımlı, 24 farklı endopeptidazdan oluşan bir enzim ailesidir (159,183). MMP'ler yara iyileşmesi, kemiğin yeniden yapılanması, uterus ve meme dokusu fizyolojik fonksiyonları, ovülasyon, embriyojenez, embriyo implantasyonu, laktasyon, organojenez gibi fizyolojik süreçlerde yer aldığı gibi aynı zamanda inflamasyon, tümör hücresinin invazyonu ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de rol oynarlar (25,93,229). MMP aktivitesinin kontrolünde spesifik doku inhibitörleri olan TIMP'ler (Tissue inhibitors of metalloproteinases) anahtar role sahiptir. Bundan başka $\alpha 2$ -makroglobulin, anti-kollajenaz aktiviteli serum C-reaktif proteini (5), heparin, tetrasiklinler ve sentetik inhibitörler de aktif MMP inhibitörleri arasında yer alırlar (183).

Tetrasiklinler bakteriyel protein sentezini inhibe eden ve antibiyotik olarak etki gösteren ilaçlar olarak tanınmaktadır. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar, tetrasiklinlerin bu etkilerinin yanında birçok hücresel fonksiyonu etkileyen çok yönlü ilaçlar olduğunu açığa çıkarmıştır (81). Doksisisiklin ve diğer tetrasiklin türevlerinin matriks metalloproteinaz (MMP) inhibisyonu ile damarlarda intima kalınlaşmasını azalttığı, (15,107,136) aortik anevrizma (42,215), periodontal hastalık (17) ve artritte doku yıkımını azalttığı (87,209), tümör hücre invazyonu, tümör metastazı (72,196,197) ve tümör anjiojenezini inhibe ettiği (214) gösterilmiştir. İn vitro olarak osteosarkom ve endotel hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, meme karsinom hücreleri, osteosarkom hücreleri ve makrofajlarda apoptoza neden olduğu (81) ve kondrositlerin matriks sentezini azalttığı gösterilmiştir (72). Tetrasiklin türevlerinden biri olan doksisisiklin, birçok hücresel fonksiyonu etkilemesi nedeniyle araştırmacılar için bugüne kadar

hep ilgi çekici bir ilaç olmuştur. Bunda doksisisiklinin ucuz ve güçlü bir tetrasiklin türevidir olmasının da rolü vardır.

NF-kB, hemen hemen hayvan hücrelerinin tümünde bulunan, kompleksleşmiş protein yapısında bir transkripsiyon faktör ailesidir. Stres, sitokinler, serbest radikaller, ultraviyole radyasyon, okside LDL ve bakteriyel veya viral antijenler gibi uyarılar sonucunda meydana gelen hücresel yanıt süreçlerinde rol oynar. İmmün yanıtın düzenlenmesi, inflamasyon, otoimmün hastalıklar, septik şok, viral enfeksiyon ve kalp hastalıklarında olduğu gibi NF-kB'nin aynı zamanda kanser sürecinde de kritik role sahip olduğu belirlenmiştir. NF-kB'nin kanserin önemli basamaklarından proliferasyon, anjiyogenez, metastaz, tümör invazyonu, inflamasyon ve apoptozun baskılanması ile ilişkili genlerin transkripsiyonel aktivasyonlarını modüle ettiği bilindiği için, NF-kB yolağının bloke edilmesinin tümör hücrelerinin antitümör ajanların aktivasyonuna daha duyarlı hale gelmelerine veya proliferasyonunda azalmaya neden olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, NF-kB aktivasyonunu baskılama kapasitesine sahip ajanların, kanseri inhibe etme potansiyeli olduğu ve kanser tedavisinde umut verdiği düşünülmektedir (142). Bunun yanı sıra yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda NF-kB'nin prostat dahil bazı kanser türlerinde MMP ekspresyon ve aktivasyonlarındaki artışa aracılık ettiği de gösterilmiştir (65, 102, 119). Bu bulgular kanser gelişiminin önlenmesinde NF-kB'yi bir klinik hedef haline getirmektedir.

Önceki çalışmaların ışığında bu tezde androjenden bağımsız insan prostat kanseri kemik metastazı hücreleri olan PC-3'de, bir MMP inhibitörü olarak yaygın kabul gören doksisisiklin varlığında ve yokluğunda çeşitli MMP'lerin (MMP-2, MMP-8, MMP-9 ve MMP-10) ekspresyonlarının ve bu MMP ekspresyonları üzerinde NF-kB sinyalizasyonunun olası düzenleyici rolünün incelenmesi amaçlanmıştır.

1.2. GENEL BİLGİLER

1.2.1. PROSTAT KANSERİ

1.2.1.1. Kanser ve Epidemiyolojisi

Kanser, anormal hücrelerin yayılması ve kontrolsüz olarak büyümesi ile karakterize edilmiş, başta endüstrileşmiş toplumlar olmak üzere dünyanın pekçok ülkesinde en büyük halk sağlığı problemlerinden biri olarak görülen hastalık grubudur (142). 2000 yılında dünya çapında yapılmış bir çalışmaya göre, kanserle ilgili olarak 10 milyon yeni vaka, 6 milyon ölüm ve kanserle yaşayan 22 milyon insan tespit edilmiştir. Bu profil farklı toplumlarda büyük ölçüde değişmektedir ve elde edilen veriler bu değişimin sebebi olarak önlenbilmesi mümkün olabilen çevresel faktörleri ve farklı yaşam tarzını göstermektedir. Bu şartlar altında istatistiksel olarak bakıldığında, artan ve yaşılanan dünya nüfusuyla doğru orantılı olarak 2020 yılında yeni vaka sayısının 15 milyon ve ölüm sayısının da 10 milyon olması beklenmektedir (170). 2008 yılında Jemal ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre ise, kanser sebebiyle her yıl yaklaşık 8 milyon insanın öldüğü belirtilmiş ve bu sayının 2030 yılında 12 milyona ulaşacağı öngörülmüştür (109).

Kanser metastaz patojenezi, spesifik olarak ve ardışık gerçekleşen bir dizi basamaktan meydana gelir (Tablo 1.1). Bunlar tümör hücre proliferasyonu, anjiyojenez, invazyon, intravazasyon, dolaşımda sağ kalım, endotel hücrelerine adezyon (tutunma), ekstrasvazasyon ve farklı organlarda büyümedir (69, 101).

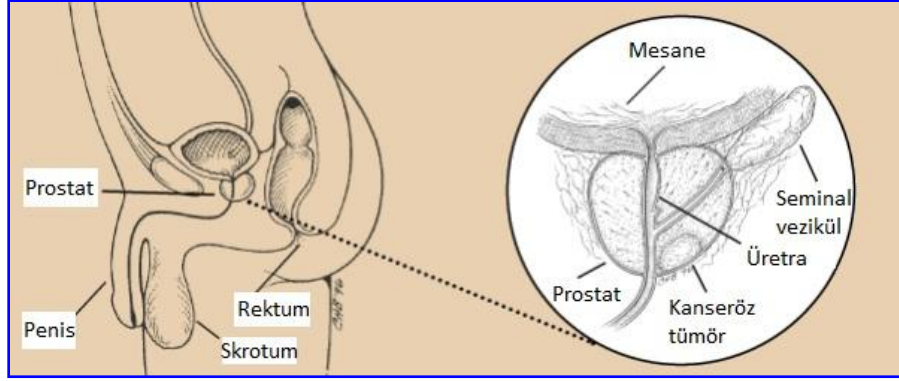
Tablo 1.1: Kanser belirlen özellikleri (12).

- Kendine yeter derecede proliferatif büyüme sinyalleri oluşturur.
- Büyümeyi inhibe edici sinyallere karşı duyarsızdır.
- Apoptozdan uzaklaşma görülür.
- Sınırsız replikasyon potansiyeline sahiptir.
- Anjiyojenez uyarılır.
- İnvazyon ve metastaz uyarılır.

Kanser gen mutasyonlarının progresif dizileri ve epigenetik farklılıkları, doku homeostazisi ve normal hücre kontrolünü sağlayan anahtar role sahip süreçleri bozarak, kanser progenitör hücrelerinin malign şekle dönüşmelerini sağlar. Ek olarak genomik kararsızlık yaygın olmasa bile ilerlemiş tümörlerin özelliklerinden biridir. Bu yüzden, kanser araştırmalarında önemli bir konu da kompleks kanser genotipleriyle bağlantılı olarak oluşan kanserle ilişkisi olmayan farklılaşmalardan kansere sebep olan mutasyonların ayırt edilebilmesidir. Malign hücrelerin bu intrinsik değişimlerine ek olarak, tümör gelişimi ve progresyonundan çoğunlukla inflamasyonun eşlik ettiği malign hücre etrafındaki mikroçevrenin de sorumlu olduğu düşünülür. Bu inflamatuvar mikroçevre pek çok kanserin doğal oluşumu ve progresyonunda anahtar role sahip olduğu için, araştırmacılar hızla ilaca direnç geliştiren ve mutasyona uğrayan malign hücreyle mücadele etmek yerine, tümörün oluşturduğu inflamatuvar bileşenleri hedeflemeyi daha uygun bir terapötik yaklaşım olarak görmüşlerdir (12). Erken teşhis edilebilir olması ve farklı tedavi seçenekleri bulunması nedeni ile son yıllarda mortalite oranında azalma olsa da günümüzde pek çok kanser türüne karşı hala tam etkili bir tedavi bulunamamıştır (12).

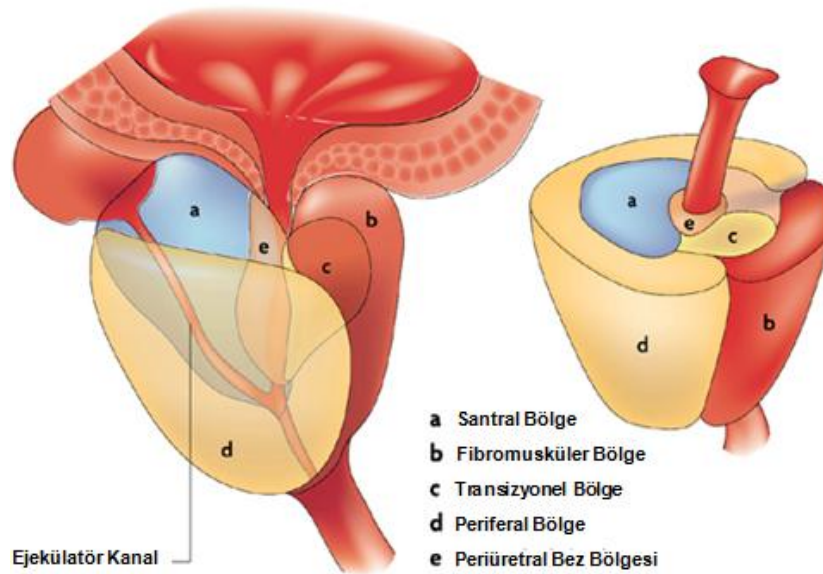
1.2.2. PROSTAT YAPISI

Prostat, yalnızca erkeklerde bulunan, ceviz büyüklüğünde bir bezdir. Yaşlı hastalarda bu bez daha geniş yapıda olabilir. Vücutta rektumun önünde, üriner mesanenin altında yer alır. Prostatın görevi, semen içerisindeki sperm hücrelerini koruyan ve besleyen bir çeşit sıvı üretmek ve böylelikle semeni daha akışkan hale getirmektir. Prostatın hemen arkasındaki seminal vezikül bezler ise semen için gerekli olan sıvının çoğunluğunu üretmekten sorumludur. Prostatın merkezi boyunca yer alan üretranın ise idrar ve semenin penisin dışına taşınmasında görevli tüpsü yapı olduğu bilinmektedir (Şekil 1.1). Prostat temel olarak 5 farklı bölümde incelenebilmektedir (Şekil 1.2).



Şekil 1.1: Prostat yapısı (175) .

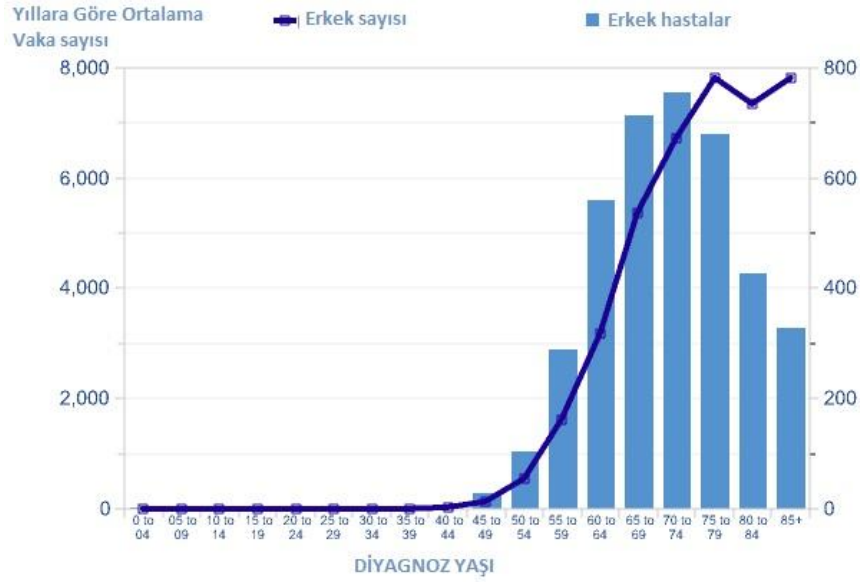
Prostat, doğumdan önce gelişmeye başlar. Puberte dönemi boyunca hızlı bir şekilde gelişir ve yetişkinlik döneminde androjen adı verilen erkeklik hormonlarının regülasyonu ile ya yavaşça büyür ya da aynı boyutta kalır. Vücuttaki temel androjen testosteron, testislerde üretilir. 5- α -redüktaz adı verilen enzim, testosteronu dihidrotestosterona (DHT) çevirir. DHT, prostat büyümesini kontrol eden temel hormondur. Prostat, erkeklik hormonları vücutta bulunduğu sürece, yetişkin erkeklerde aynı boyutta kalır veya yavaşça büyür (175) .



Şekil 1.2: Prostatın bölümleri (49) .

1.2.3. PROSTAT KANSERİ VE EPİDEMİYOLOJİSİ

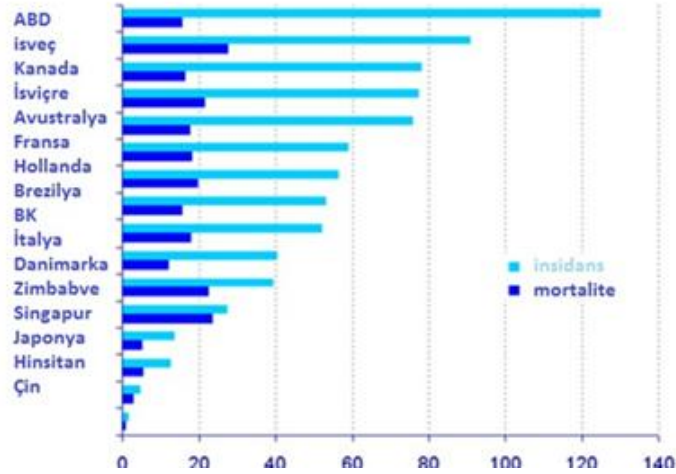
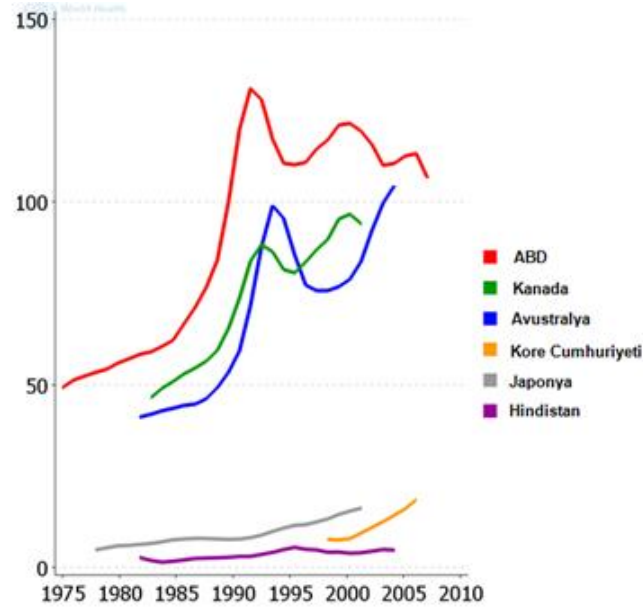
Prostat kanseri özellikle modern toplumlarda erkeklerde önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olan, patolojisinde yer alan mekanizmaların henüz tam olarak aydınlatılamadığı ve bu nedenle de tedavisi tam olarak başarılamayan bir kanser türüdür. Prostat kanseri sıklıkla kemiğe metastaz yapar ve morbiditeden büyük oranda bu metastaz sorumlu tutulur (6). Batı ülkelerindeki erkeklerde en yaygın kanser türü olarak gösterilmekle beraber, Amerika'da kanserden ölümler arasında (yaklaşık 30.000 kişi ile) ikinci sıraya yerleşmiş durumdadır (49, 99). Tüm dünyadaki erkekler için ise dördüncü en sık görülen kanser olarak gösterilmektedir. Dünya çapında elli yaşını aşkın erkek popülasyonunda bu oran gün geçtikçe hızla artmaktadır (49).



Şekil 1.3: Yaşa bağlı olarak prostat kanseri gelişimi (177).

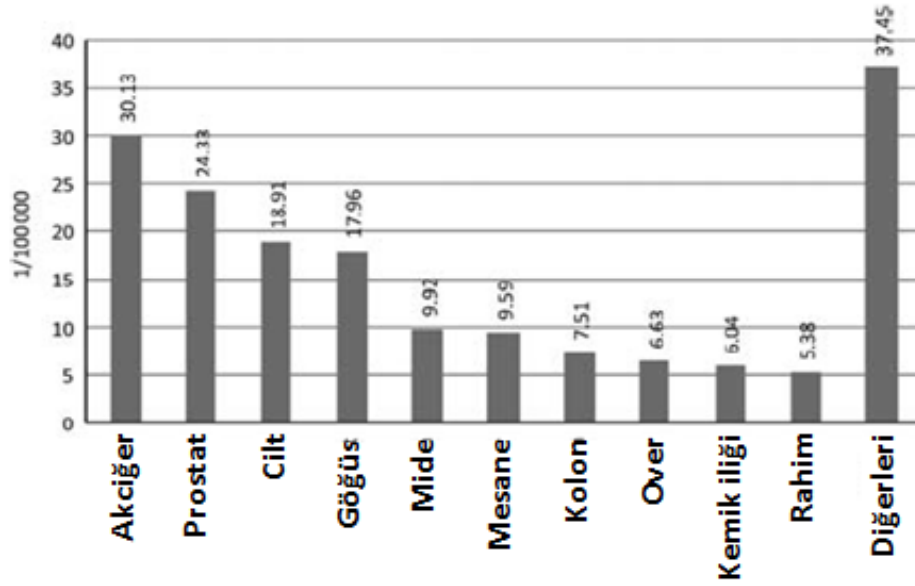
Prostat kanseri insidansı ve mortalitesi farklı ırk, etnik grup ve ülkeden ülkeye göre çok farklılık göstermektedir (38). Prostat kanseri insidansı ve mortalite oranlarının, siyahi amerikalılarda asyalılara göre 50-60 kat daha fazla olmasına karşın batılılaşma sürecine bağlı

olarak Çin gibi doğu ülkelerinde geçmiş yıllara kıyasla bu oranda ciddi artış görüldüğü bildirilmiştir (şekil 1.4). Bu yüzden prostat kanserinin patolojisinin hem kalıtsal hem de çevresel faktörlerin birleşiminden oluştuğuna karar verilmiştir (100). Diğer kanserlerde olduğu gibi kalıtsal etkisinin somatik genetik ve epigenetik faktörlerin bir araya gelmesi sonucunda gelişebileceği de belirtilmiştir (49). Prostat kanseri gelişiminde etkili olduğu düşünülen ileri yaş, genetik, temel, etnik özellikler (99) ve bozulmuş androjen metabolizması gibi farklı risk faktörleri kesin olarak tanımlanmıştır (38, 92). Bunların dışında diyet, fiziksel aktivite, seksüel faktörler, meslek yaşamı, hormonlar, vazektomi, inflamasyon ve obezite gibi diğer faktörlere ilişkin çalışmalar da bulunmaktadır (99). Androjen biyosentez/metabolizması, karsinogenez metabolizması, DNA onarımı ve kronik inflamasyon yolaklarındaki pek çok genetik farklılık araştırılıyor olsa da henüz tam bir sonuca varılamamıştır. Çevresel ve genetik faktörler arasındaki etkileşime bağlı olan prostat kanserinin bu etkileşimlerinin daha iyi anlaşılabilmesi için iyi planlanmış epidemiyolojik araştırmalara gereksinim vardır (99).



Şekil 1.4: Amerikan Sağlık Örgütü'nün 2008 yılında yaptığı test sonuçlarına göre dünya üzerindeki ülkelerin prostat kanseri insidansı ve mortalitesi (Çizgi grafik insidansı gösterirken, bar grafikler hem insidans hem de mortaliteyi bildirmektedir. Barlardaki rakamlar, 100.000 kişiyi temsil etmektedir) (176) .

Kanser insidansı ve mortalitesi pek çok gelişen ülkede olduğu gibi Türkiye’de de artmaktadır. Türkiye Sağlık Bakanlığı’nın Kanser Kontrol Departmanı’nın 2005 verilerine göre Türkiye’de en sık rastlanan ilk 5 kanser tipi içinde prostat kanseri 2. sırada yer almaktadır (Şekil 1.5) (234) . Prostat kanserinin Türkiye ölçeğindeki insidansının bu denli ön sıralarda yer alması, araştırmacıların bu hastalığa olan ilgisini artırmıştır.



Şekil 1.5: 2005 yılında Türkiye’de en sık görülen 10 kanser çeşidi (Barların üzerindeki rakamlar, toplam kanser sayısına oranla % populasyon değerlerini temsil etmektedir) (234) .

Son yıllarda yapılan tedavi seçenekleri arasında, lokalize halde bulunan prostat kanserli hastalar için radikal prostatektomi, kriyo-ablasyon tedavisi, ışın tedavisi ve brakiterapi bulunmaktadır. Lokalize prostat kanseri olan ancak kanser gelişerek ileri düzeyli veya metastazik yapılı bir hal almasını engellemek amacıyla ise androjen ablasyon tedavisi ve kemoterapi yapılmaktadır. Lokalize haldeki ilerlemiş ve uzak bölgelere metastaz yapmış prostat kanserli erkeklerde, günümüz tedavi yaklaşımları ancak palyatif olarak yarar sağlamaktadır (110). Erken teşhis ve geleneksel tedavide son yıllardaki gelişmelere rağmen prostat

kanserinin seyri hala değiştirilememiştir. Prostat kanserinin bu patolojik seyri metastaz yapması, androjenden bağımsız bir hal alması ve kemoterapiye dirençli hale gelmesi şeklinde sınıflandırılabilir. Mevcut tedavi yöntemlerinin sınırları nedeniyle, hem lokalize şekilde ilerlemiş hem de metastatik durumda olan prostat kanserinin her ikisine karşı yeni tedavi yaklaşımlarına acil olarak gereksinim duyulmaktadır (110) .

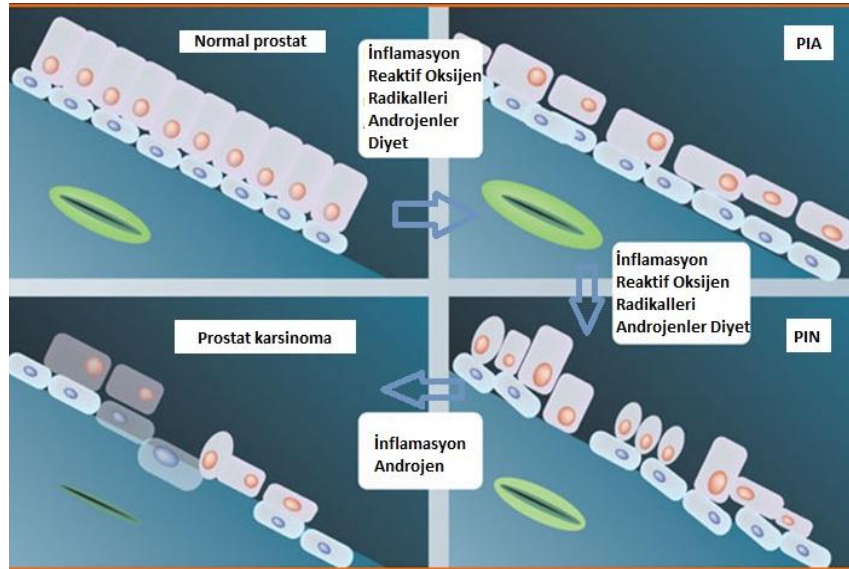
1.2.4. PROSTAT KANSERİ TEşHİSİ VE ETKENİNİN BELİRLENMESİNE İLİşKİN ÇALIşMALAR

1.2.4.1. PSA ve Prostat Kanseri

İlk defa prostat dokusuna spesifik "Prostat Spesifik Antijen" (PSA) isimli bir proteinin varlığından 1979 yılında bahsedilirken, PSA'nın (seminal sıvı ve prostat dokusu hariç) prostat kanserli hastaların serumlarında da arttığı 1980 yılında gösterilmiştir. Günümüzde yaygın olarak kullanılan serum PSA düzeyi ölçümü ise ilk kez 1980 yılında gerçekleştirilmiştir (63) . Prostat kanalı epitel hücreleri tarafından salıverilen PSA'nın klinikte değerlendirilen bir parametreye dönüşmesinden sonra, prostat kanserli hastaların teşhis sayısında artış meydana gelmiştir. Prostat kanseri varlığında serum PSA değerinin yüksek olduğunun anlaşılmaması nedeniyle PSA önemli bir tümör belirteci haline gelmiştir. Ancak bu belirtecin prostat dokusuna özgü bir antijen olmasına karşın prostat kanserine özgü olmadığı anlaşılmıştır. Bu nedenle prostat kanseri dışında "Benign Prostat Hiperplazisi" (BPH), "Prostatik İntraepitelyal Neoplazi" (PIN) veya prostatit olan hastalarda da PSA'nın yüksekliği saptanabilmektedir. Otopsi verilerine göre 50 yaşındaki bir erkekte yaşam boyunca prostat kanseri gelişme riski ortalama %42 olup, klinik olarak bunun saptanma oranı %17,8 olarak bildirilmektedir. Yüksek serum PSA değerlerine sahip hastaların sadece %38'inde prostat kanseri tespit edildiği bildirilmiştir (45, 63) .

1.2.4.2. İnflamasyon ve Prostat Kanseri

Prostat kanserinde kronik ve akut infiltratların her ikisini de içeren pek çok lezyon, histolojik olarak atrofik epitelyum veya epitelyal odaksal atrofi ile birlikte gelişir. Benzer şekilde, epitelyal odaksal atrofik alanlar yaşlanmış prostatta yaygındır ve genelde periferik bölgenin etrafında geniş bir şekilde oluşur. Normal epitelyum ile kıyaslandığında, odaksal atrofik lezyonlarda proliferasyona uğramış epitel hücrelerinde artış gözlenir. Bu odaksal atrofik lezyonlar genelde "Proliferatif İnflamatuvar Atrofi" (PIA) olarak da anılmaktadır (48). Bu terim, prostatın her atrofik lezyonunda, artmış inflamatuvar hücre görülemeyebileceğini belirtmek için tanımlanmıştır. PIA ile adenokarsinom arasında geçiş olabileceğini gösteren morfolojik pek çok çalışma yapılmıştır (48, 151, 160). PIA ve/veya ilerlemiş PIN (Prostatik İntraepitelyal Neoplazi) içeren proliferatif atrofi süreçleri arasında sıkça geçişler olabildiğini gösteren çalışmalar olmuştur (46, 48, 179) (Şekil 1.6). PIA ve proliferatif atrofinin ikisinde de somatik genetik değişiklikler olduğunu gösteren kanıtlar olsa da, pek çok PIA ve proliferatif atrofi lezyonu klonal genetik değişimleri barındırmamaktadır (48).



Şekil 1.6: Normal prostattan prostat kanserine kadar geçen süreçte oluşan değişiklikler (199).

Prostatın transizyon bölgesinde oluşan BPH (Benign Prostat Hiperplazisi), prostat kanserinde hala tartışmalı olan bir belirteçtir (46). Prostat hacmindeki artışla birlikte, miksiyonun başlamasında gecikme, idrar akışında zayıflama ve mesanede rezidüel idrar kalması gibi çeşitli problemler ortaya çıkar. Prostatın büyümesi temel olarak fibromusküler stromadaki hücrelerin büyüme ve gelişiminin artmasına dayanır. Fakat bu durum üretranın sıkıştırılmasına da neden olan inflamatuvar süreçten de kaynaklanmaktadır. BPH'si olan pek çok hastadan alınan doku örneklerinin belirgin olarak fazla sayıda kronik inflamatuvar hücrelerden oluşan alanlar içermekte olduğu görülmüş ve üriner semptom şiddeti ile intraprostatik inflamasyon arasında korelasyon olabileceği fikri öne sürülmüştür (53, 105). BPH ile yapılan hemen hemen tüm çalışmalarda, epitelyum atrofik olarak görülmekte ve transizyon bölgesinde PIA'nın oluşabileceğine işaret edilmektedir (48). Ancak prostat büyümesi ve inflamasyon arasındaki ilişkiyi gösterebilecek altta yatan kesin bir mekanizma belirlenememiştir. Bununla birlikte, makrofajlar ve lenfositlerin aktivasyonu ile sitokinlerin sekresyonunun bu büyümede önemli rol oynadığı gösterilmiştir (208).

Prostat kanserinde anahtar rol oynadığı anlaşılan farklılaşmış pek çok molekülün PIA lezyonlarında da görüldüğü belirtilmiştir. Örneğin, prostat tümör süpresör genlerinden NKX3.1 (205), p27'yi kodlayan CDKN1B (46, 223) ve PTEN'e (Fosfataz ve Tensin Homoloğu) (48) ilişkin protein sentezlerinin odaksal atrofi lezyonlarında tamamen baskılandığı saptanmıştır. Bu genler, normal prostat epitelinde yüksek oranda eksprese edilirken, prostat kanseri veya PIN'de ya azalır ya da tamamen kaybolmuştur. Buna ek olarak, karsinomda genetik olarak karşılık geldikleri lokuslardan bir allel sıklıkla silinmiştir ve hücre kültüründe bu genlerin her birinin aşırı ekspresyona zorlanması ile, prostat kanser hücrelerinin büyümesinin azalması sağlanmıştır. Hayvan modellerinde de bu genlere karşılık gelen alellerden birinin veya ikisinin bozulması sonucunda prostat hiperplazisi, PIN ve/veya invaziv karsinom geliştiği görülmüştür (1, 48).

Vücutta meydana gelen inflamatuvar durumlarda, inflamasyonun meydana geldiği dokuda histopatolojik değişikliklerin ortaya çıktığı bilinmektedir. Bu amaçla inflamatuvar prostat hastalıkları ile PSA ve prostat kanseri ilişkisi araştırılmaya başlanmıştır. Prostat kanseri nedeni ile opere edilen hastaların patoloji örneklerinde tümör tarafından infiltre edilmemiş bölgelerde, multifokal akut ve kronik inflamasyon alanları gözlenmiştir (45, 63, 219) .

Inflamasyonun kanser patojenezini;

- I. Hücre ve genom hasarı oluşumu,
 - II. Hasarlı hücrelerin yerini almak üzere yeniden oluşan hücrelerde proliferasyonunun tetiklenmesi,
 - III. Hücreleri replikasyon, anjiojenez ve doku onarımı yapması için uyarıcı sitokinlerin ortamda çoğalması
- yollarıyla etkileyebileceği düşünülmektedir (45, 168) .

1.2.4.2.1. **İnflamasyon ile Prostat Kanseri Teşhisinin Zorluğu**

Konakçı bağışıklık sistemi ve inflamatuvar cevabın kanser gelişimi ile ilişkisi önceden beri biliniyor olsa da prostatik inflamasyon ile prostat kanseri arasındaki ilişkiyi test etmek oldukça güçtür. Çünkü, 40-79 yaş arası erkeklerin %9'unda semptomatik prostatit bulunmasına karşın, asemptomatik prostatite neredeyse tüm prostat biyopsi ya da rezeksiyon örneklerinde rastlanılabilmektedir. Dolayısı ile gerçek anlamda inflamasyonsuz bir kontrol grubunun olmadığı düşünülmektedir. Ayrıca, farklı coğrafik bölgelerdeki insanların prostat kanseri insidansı, prevalansı, başlama yaşı ve doğal seyri bilinmediğinden, semptomatik prostatit ile prostat kanseri arasındaki ilişki toplum çalışmalarında test edilememiştir. Epidemiyolojik çalışmalar açısından bir diğer sıkıntı da, semptomatik prostatitli olguların prostat inflamasyonu olmayan erkeklere göre daha fazla doktora gitme, daha yüksek PSA düzeylerine sahip olma ve bu sebeple bu hastalara daha fazla biyopsi yapılma olasılığının bulunmasıdır. Bu nedenle artmış

gibi görünen prostat kanseri insidansı, aslında sadece daha fazla olgunun daha erken yakalanmasına bağlı olarak gerçekleşebilmektedir. Dolayısı ile semptomatik prostatiti olan olgularda var olan kanserlerin çoğu saptanmakta iken, asemptomatik olgularda bu kanserlerin önemli bir bölümü gizli kalmaya devam ediyor olabilmektedir. Ayrıca, asemptomatik prostatit olgularının çoğunda altta yatan patojen etken bilinmemektedir (168, 219) .

1.2.4.3. Enfeksiyon Ajanları ve Prostat Kanseri

1950'li yıllarda seksüel olarak aktarılan karsinojenik ajanların, farklı ülkelerde ve farklı yaşam tarzlarındaki insanlar üzerinde prostat kanseri oranlarında farklılıklara sebep olduğunu savunan çalışmalar olmuş ve prostat kanseri ile seksüel olarak aktarılan enfeksiyonlar arasındaki ilişkiyi incelemek üzere pek çok epidemiyolojik çalışma yapıldığı belirtilmiştir (168) . Mikrobiyal aktivatörlerin, maligniteye sebep olabilecek akut ve kronik inflamatuvar süreçlere yardımcı olabileceği görülmüştür. Örneğin, *Helicobacter pylori* ile mide kanseri ve mide lenfoması arasındaki ilişki bunu desteklemiştir. Klamidyanın ateroskleroz, bronşial astma, multipl skleroz ve belirgin şekilde üretrit ile prostatta inflamasyon oluşturduğu tartışılan konular arasında yer almıştır (122) . Prostat kanserinde, gonore, sifiliz, insan papilloma virusü, herpes simpleks virusü, (8 serolojisi, IL-6 aracılığıyla inflamasyonu uyardığı için) insan herpes virusü gibi inflamasyona neden olan bazı enfeksiyöz ajanların da etiyolojide rol oynayabileceği öne sürülmüş olsa da (168) yapılan araştırmalarda buna sebep olan bir organizma bulunamamıştır. Bu yüzden yapılan retrospektif çalışmalar sonrasında, cinsel yolla bulaşanlar gibi enfeksiyona yol açan mikroorganizmalardan ziyade, kronik enfeksiyona karşı ortaya çıkan inflamatuvar olayın prostat kanseri ile ilişkili olabileceği tezi savunulmuştur. Bununla birlikte prostat inflamasyonunun, histolojik benign prostat hiperplazisi ve prostat kanseri gelişimine katkıda bulunduğuna dair moleküler veriler gittikçe artmaktadır (45, 63, 219) .

1.2.4.3.1. Oksidatif Hasara Bağlı İnflamasyon ve Prostat Kanseri

Kronik ve yineleyen inflamasyonla oluşan DNA oksidatif hasarı ve diğer hücresel bileşenler, inflamasyonlu prostat kanseriyle bağlantılı olabilmektedir. Enfeksiyona bağlı olarak oluşan inflamasyon hücrelerinde, mikroorganizmaları yok etmek üzere programlanmış (süperoksit, hidrojen peroksit, reaktif oksijen ve yüksek aktiviteli nitrojen peroksit formuna dönüşebilen peroksinitrit gibi) çeşitli toksik bileşikler üretilir. Bu bileşikler, inflamasyon alanındaki konak hücrelerinin DNA'ları üzerine doğrudan girişim yapabilmekle birlikte, bu hücrelerdeki (serbest radikal zincir reaksiyonunu başlatacak lipid gibi) toksik diğer bileşiklerle de etkileşime girebilirler. Oksidatif hasar oluşturan bileşiklerin oluşturduğu hasar devamlı olursa, konakçı hücrelerde ölüm ya da DNA hasarı ve mutasyon oluşturur (45). Hücrelerdeki mutasyonlar sonucunda, GSTP1 geni üzerindeki CpG adacıklarının üzerinde oluşan hipermetilasyonla (GSTP1 bloklanması), oksidan ve elektrofilik karsinogenlere karşı yapılan savunma mekanizmasında bir bozukluğun olması durumunda, inflamatuvar alandaki prostat hücrelerinin neoplastik değişimlere ve kanser gelişimine neden olan oksidatif genom hasarına duyarlı hale geldikleri savunulmuştur. Bu varsayım, antioksidan ve antiinflamatuvar ilaçların alımına bağlı olarak prostat kanseri insidansının azaltıldığını gösteren epidemiyolojik çalışmalarla da desteklenmiştir (45, 219). “ α -Tokoferol, β -Karoten Kanser Önleme” çalışması sırasında yapılan bir olgu-kontrol araştırması, prostat kanseri riskini arttıran oksidatif hasardan hücreleri koruyan Mn-SOD (Mangenez-Süperoksit dismutaz) adlı mitokondriyal enzimi kodlayan genin Ala 16 Val alelinin yüksek prostat kanseri riski ile ilgili olduğunu göstermiştir (219). Bir başka olgu-kontrol çalışmasında oksidatif genom hasarını onaran bir enzimi (DNA'nın okside haldeki 8-oksi-guanini düzelten “glikozilaz/AP liyaz”) kodlayan hOGG1 isimli genin bazı çeşitlerinin de artmış prostat kanseri riski ile ilişkili olduğu saptanmıştır. (45, 219).

İnflamasyonun en önemli araçlarından biri olan COX-2'un ekspresyonundaki up-regülasyonun karsinogenezdeki temel basamaklardan biri olduğu düşünülmektedir. Bir dizi

çalışmada prostat kanseri dokusunda COX-2 mRNA ve protein ekspresyonunun artmış olduğu saptanmıştır. Karsinogenez sürecinde önemli bir role sahip olduğunu düşündürecek şekilde, COX-2 ekspresyonundaki artışın Bcl-2 ekspresyonunu artırdığı ve apoptozu azalttığı gösterilmiştir. Bu bilgilerin doğal bir sonucu olarak COX-2 inhibisyonu ile prostaglandin sentezini önleyen ilaçların kanser gelişimini engelleyici etkileri olabileceği fikri doğmuş ve bu konuda çeşitli araştırmalar yapılmıştır. NSAID'ların prostat kanseri gelişimini engelleme konusundaki rollerine ilişkin epidemiyolojik veriler kesin olmamakla beraber düzenli ibuprofen veya aspirin kullanımının prostat kanseri riskini %66 oranında azalttığı yönünde çalışmalar vardır (219). PIA lezyonlarının prostat kanserinin öncülleri olabileceğini gösteren önemli veriler elde edilmiştir. PIA lezyonları çoğu zaman doğrudan PIN ya da prostat kanseri odaklarının hemen yanında yer almaktadır. Bundan başka söz konusu lezyonlar prostat kanseri gelişimi açısından önemli olabilecek moleküler değişiklikleri de göstermektedirler. Prostat kanserlerinin %20 kadarında mevcut olan p53 gen mutasyonları, PIA lezyonlarının %5,3'ünde saptanmıştır. 8. kromozomun sentromerik bölgesindeki DNA dizilerinin sayısal artışı prostat kanserlerinin %6'sında, PIA lezyonlarının ise %4'ünde ortaya çıkmaktadır (219).

1.2.4.4. Sitokinler ve Prostat Kanseri

İnflamasyon, prostatında büyüme gözlenen hastalardan alınan patolojik doku örneklerinde sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Prostat büyümesi ile inflamasyon arasındaki ilişkiye özgü kesin mekanizma henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, makrofajların veya lenfositlerin aktivasyonu ve sitokinlerin ekspresyonunun bu süreçte önemli role sahip olabileceği düşünülmektedir. Makrofajlarda olduğu gibi, prostat epitel hücrelerinin de inflamasyon sürecini tetikleyen proinflamatuvar sitokinleri salıverme özelliğine sahip olması bu fikri desteklemektedir (105). İnflamatuvar sürecin bir parçası olan sitokinlerin prostat kanserindeki rolü üzerinde yapılan çalışmalarda ise en çok IL-6 hakkında veri elde edilmiştir. IL-6 ve reseptörünün düzeyleri insan prostat kanseri dokusunda, organa sınırlı hastalıkta bile, normal prostat

dokusuna oranla çok daha yüksektir ve IL-6 reseptör ekspresyonu proliferasyon ile doğru orantılıdır. Ayrıca prostat kanserli erkeklerde özellikle de hormona yanıt vermeyen olgularda IL-8, IL-1 β , TNF- α gibi pro-inflamatuvar sitokinler ile IL-4 ve IL-10 gibi anti-inflamatuvar sitokinlerin düzeylerinin de arttığı gösterilmiştir (47, 219) .

1.3. **EKSTRASELÜLER MATRİKS YIKIMI VE MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR**

1.3.1. **EKSTRASELLÜLER MATRİKS (ESM)**

Ekstrasellüler matriks (ESM), organizmalara sadece yapısal destek sağlamakla kalmayıp aynı zamanda hücre proliferasyonu, farklılaşması, migrasyonu, adezyonu ile doku morfogenezi gibi pekçok biyolojik aktivitede görev alan, yapısında proteinler ve proteoglikanlar içeren, karmaşık ve dinamik bir oluşumdur (5, 133) . ESM, hücrelerin özel fonksiyonları gerçekleştirmesi için kendilerini yönlendirecek hücre içi sinyalleme yolları ile direkt ya da indirekt olarak etkileşmesini sağlar. Matriks ile hücreler arasında meydana gelen bu etkileşmeler organizmanın normal gelişimi ve fonksiyonu için kritik rol oynar. Örnek olarak vasküler ESM, integrin moleküllerinin kardiyomiyositler, endotel hücreleri ve düz kas hücrelerinin yüzeyinde bulunan integrin reseptörlerine bağlanmasını sağlayarak hücre fonksiyonları değiştiren sinyaller gönderir. Böylece hücreler, sitozolik sinyal iletim yollarını direkt olarak aktive edebilir. ESM'e bağlanma sonucunda sinyal oluşmazsa hücreler apoptoza uğrar. Bunun yanı sıra, matriks çok sayıda büyüme faktörünü bağlayarak hücrelerden gelen sinyalleri tutar ya da hücrelere gönderir. Bu şekilde indirekt sinyalleme yollarını aktive ya da inhibe eder (183) .

Hücre-matriks etkileşmeleri ESM bileşenlerinin hidrolizinden sorumlu olan proteolitik enzimler (ekstrasellüler proteazlar) tarafından düzenlenir. Bu enzimler ESM yapısının bileşimini ve bütünlüğünü düzenleyerek matriks molekülleri tarafından oluşturulan sinyallerin kontrolü, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve ölümünde de temel rol oynar (75, 147) . Ekstrasellüler

proteazların bu kadar çok fonksiyona sahip olmaları onları potansiyel terapötik hedefler haline getirmektedir. Bu enzim sistemlerinin içinde matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) önemli bir grubu oluşturmaktadır (61) .

1.3.2. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR (MMP'LER)

Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) elastin, kollajen ve proteoglikanlar gibi ekstraselüler matriks proteinlerini yıkıma uğratan, merkezinde Zn^{+2} atomu barındıran ve aktiviteleri için Ca^{+2} 'a bağımlı olan, 24 farklı endopeptidazdan oluşan bir enzim ailesidir (159) . Nötral pH'da aktiftirler ve multigenik bir endopeptidaz ailesidirler (226) . Türlerine göre fibroblastlar, osteoblastlar, kondrositler, endotel hücreleri, makrofajlar, nötrofiller, vasküler düz kas hücreleri, T lenfositler, trombositler, keratinositler, epitel hücreleri, mezanşimal hücreler, trofoblastlar, osteoblastlar gibi oldukça çeşitli hücre tipi tarafından proenzim olarak eksprese edilirler (74, 159, 183) . Bununla birlikte bazı enzimlerin özel hücre tipleriyle ilişkili olduğu da bilinmektedir. Örneğin MMP-2 (jelatinaz A) ve MMP-9 (jelatinaz B)'nin öncelikli substratı bazal membranındaki tip-IV kollajen olduğu için bu enzimlerin genellikle endotelial hücrelerde ve stromal fibroblastlar, makrofajlar ve tümör hücreleri gibi başka hücrelerde de eksprese edildikleri bilinmektedir (226) .

Organizmada fizyolojik olayların sürdürülmesinde MMP aktivitesi ile onların spesifik endojen doku inhibitörleri (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases - TIMP) ekspresyonu arasında sürekli bir denge söz konusudur (126) . MMP'ler ve TIMP'ler normal dokularda düşük düzeyde eksprese edilirler ve birçok süreçte birlikte rol oynarlar. Yara iyileşmesi, kemiğin yeniden modellenmesi, anjiyogenez, endometriyal siklus, ovülasyon, embriyogenez, embriyo implantasyonu, laktasyon, organ morfojenezi gibi fizyolojik süreçlerle birlikte inflamasyon, tümör hücrelerinin invazyonu ve metastaz gibi patolojik süreçler yer alırlar (25, 159, 229) .

Kanserde ESM, tümör dokusunun büyümesi ve tümör hücrelerinin metastazını önlemek için bir primer bariyer görevi yapar. MMP'ler ise, malign tümörlerin bu bariyeri aşmak için kullandıkları yıkıcı enzimler olarak görev alırlar (5) .

1.3.2.1. MMP'lerin Yapısı

MMP'ler çeşitli ortak yapısal özelliklere sahiptirler. Yapılarında predomain, prodomain, katalitik bölge, menteşe bölgesi, hemopeksin/vitronektin benzeri bölge olmak üzere temel olarak 5 bölge içerirler (125, 147, 225) .

1. Predomain: N terminalinde yer alan, predomain olarak tanımlanan, enzimi salgılanma için etiketleyen ancak daha sonra uzaklaştırılan ve latent enzimde bulunmayan sinyal peptid dizisidir. 80 ila 90 adet aminoasit içeren, aminoterminal propeptididir (5, 183, 198) .

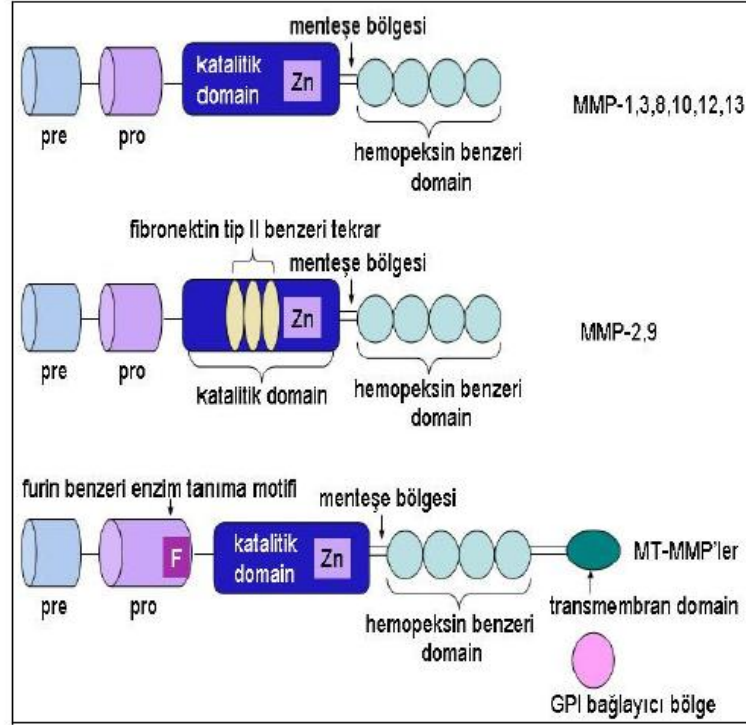
2. Prodomain: Bu bölgede bulunan sistein rezidüleri, enzimin latent formunun korunmasında rol oynar. Prodomainin ayrılması, inaktif proenzimin aktif forma dönüşmesini sağlar (159, 183) .

3. Katalitik Bölge: Çinko bağlayan bölgedir. Ek olarak yapısal çinko ve kalsiyum iyonu içerir. 170 aminoasit bulundurur (155) . Bu bölge stabilite ve enzimatik aktivitenin oluşması için gereklidir (147, 159, 183) . Jelatinaz enzimleri (MMP-2 ve MMP-9) bu bölümde 3 tane fibronektin tip II benzeri ilave domain bulundururlar. Bu kısım jelatin ve kollajene yüksek afinite ile bağlanmayı sağlayarak proteolitik aktiviteyi artırır, ayrıca elastolitik aktivite için de esansiyeldir (156, 157, 183) .

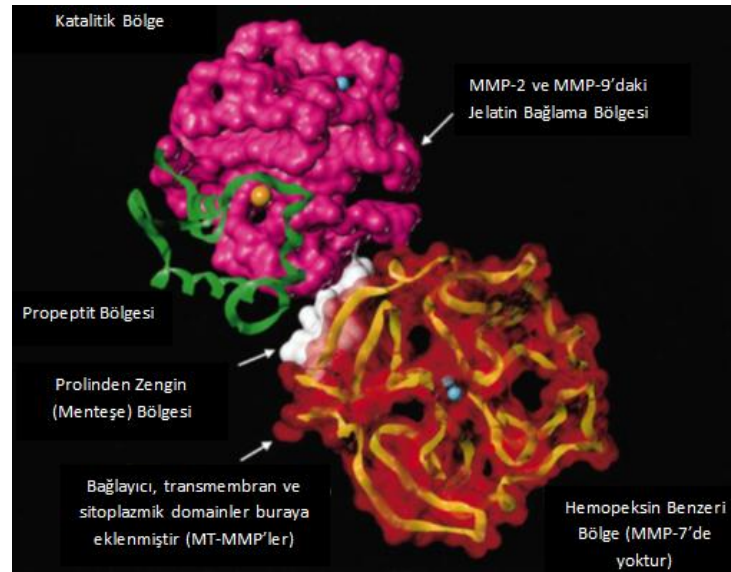
4. Menteşe Bölgesi: Katalitik bölge ile hemopeksin benzeri bölgeyi birbirine bağlayan, menteşe görevi gören, 5 ila 10 aminoasitlik bölgedir. Prolinçe zengindir. MMP-7 ve MMP-26'da bulunmaz (125, 157, 210) .

5. Hemopeksin Benzeri Bölge: Hem bağlayan moleküllere dizin benzerliği nedeniyle, hemopeksin olarak adlandırılmıştır. Bu bölge, N ve C terminallerini bağlayan disülfid bağı içerir ve 200 kadar aminoasit bulundurur (155). Matrilisin 1 (MMP-7) ve MMP-26 dışında tüm metalloproteinazlarda bulunur. Bu bölgenin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte substrat spesifitesini sağlama ya da plazminojen aktivatör ürokinaz sistemine analog olma özelliği ile, hücre yüzey reseptör alanını tanıma fonksiyonu gösterdiği ileri sürülmektedir. Ayrıca endojen doku inhibitörleri olan TIMP'lerin, jelatinaz grubu MMP'lere (MMP-2 ve MMP-9'a) ve MMP-13'e bağlanması ile ilişkilendirilmiştir (5, 147, 183, 239) .

Bu genel yapının dışında Jelatinaz A ve B; katalitik bölgelerinde fibronektinin kollajen bağlayan bölgesi ile ilişkili olan ve diğer matriks metalloproteinaz enzimlerinde bulunmayan, sisteinden zengin jelatin bağlayan bir ekstra domain (3 adet fibronektin tip-2 benzeri domain) içerir (5, 147, 183) . MMP'nin temel yapılarına ek olarak, MMP-9'da prolinden zengin 54 adet aminoasit bulunur ve bu dizi kollajen V'te bulunan $\alpha 2$ -zincirine benzerlik gösterir (147) . Membran tipi metalloproteinazlar (Membrane-Type MMP, MT-MMP), Stromelisin 3 (MMP-11), MMP-23 ve MMP-28; furin benzeri enzimlerce tanınmalarını sağlayan ve pro-domain ile katalitik domain arasında yer alan 10 aminoasitlik bir "furin benzeri enzim tanıma motifi" içerirler. MT-MMP'ler, salgılanma öncesi bu motifi tanıyan proteazlar ile aktive edilirler. Ayrıca MT-MMP'lerden bazıları (MT1-,MT2- ,MT3- ve MT5-MMP) C terminalinde transmembran domain içerirken bazıları da (MT4- ve MT6-MMP) glikozilfosfatidilinozitol (GPI) bağlayıcı bölge içerir (125, 183, 225) (Şekil 1.7).



Şekil 1.7: MMP enzimlerinin moleküler yapısı (125, 183, 225) .



Şekil 1.8: MMP'lerin üç boyutlu temel yapısı (147) .

1.3.3. MMP T RLER 

Yeni  yelerin katılımı ile sürekli genişleyen bu enzim ailesinin bugüne dek klonlanmış ve sekanslanmış 66'dan fazla  yesi bulunmaktadır. Bunlardan insanlarda sentez edilen 24 adet MMP türü olduğu saptanmıştır (Tablo 1.2). Bu  yeler substrat özgüllüğüne göre **kollajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, membran tipi MMP'ler (MT-MMP'ler) ve diğerleri** olmak üzere 5 alt grupta sınıflandırılmıştır. Diğerleri grubunda yer alan MMP-7 (matrilisin 1) ve MMP-26 (matrilisin 2)'nin **matrilisinler** adı ile anıldığı 6. bir gruptan söz eden sınıflandırma da bazı kaynaklarda yer almaktadır (155, 183) . En yaygın olarak kullanılan sınıflandırma şekli "substrat özgüllüğüne göre" yapılan sınıflandırmadır. Bununla birlikte "molekül ağırlıklarına göre" veya "yapılarına göre" yapılan sınıflandırmalar da kullanılmaktadır (183) .

Tablo 1.2: MMP enzimlerinin substrat özgüllüğüne göre sınıflandırılması (155, 183) .

Grup adı	Tanımlayıcı isim	Numara	Temel substrat
Kollajenazlar	Interstisyel kollajenaz	MMP-1	Kollajen Tip I, II, III, VII ve X, jelatin, PG
	Nötrofil kollajenaz	MMP-8	Kollajen Tip I, II, III, PG
	Kollajenaz-3	MMP-13	Kollajen Tip I, II, III
	Kollajenaz-4	MMP-18	Kollajen I
Jelatinazlar	Jelatinaz A	MMP-2	Jelatin, kollajen IV, V, VII, X, XI, elastin
	Jelatinaz B	MMP-9	Jelatin, kollajen IV, V, XIV, elastin, PG
Stromelisinler	Stromelisin 1	MMP-3	PG, laminin, FN, jelatin, kollajen III, IV, IX ve X
	Stromelisin 2	MMP-10	PG, laminin, FN, jelatin, kollajen III, IV, IX ve X
	Stromelisin 3	MMP-11	PG, laminin, elastin, entaktin, tenaskin, versikan, jelatin, kollajen III, IV, IX, X
Membran tipi MMP'ler (MT-MMP'ler)	MT1-MMP	MMP-14	Kollajen I, II, III, FN, laminin, VN
	MT2-MMP	MMP-15	Agrekan, FN, laminin, tenaskin
	MT3-MMP	MMP-16	Kollajen III, FN, jelatin
	MT4-MMP	MMP-17	Jelatin
	MT5-MMP	MMP-24	PG
	MT6-MMP	MMP-25	Kollajen IV, fibrin, FN, jelatin
Diğerleri	Matrilisin1	MMP-7	Serin proteaz inhibitörleri
	Metaloelastaz	MMP-12	Kollajen I, IV, elastin, FN, jelatin, laminin, VN
	RASI-1	MMP-19	Kollajen IV, entaktin, FN, jelatin, laminin, tenaskin
	Enamelisin	MMP-20	Agrekan, amelogenin
	X-MMP	MMP-21	Tanımlanmamıştır.
	CA-MMP	MMP-23	Tanımlanmamıştır.
	Matrilisin 2	MMP-26	Kollajen IV, FN, jelatin, VN
	CMMP (Horoz)	MMP-27	Tanımlanmamıştır.
	Epilisin	MMP-28	Tanımlanmamıştır.

PG: Proteoglikan, FN: Fibronektin, VN: Vitronektin.

1.3.3.1.1. **Jelatinaz A (MMP-2):**

Doku ya da hücre tipine göre değişmekle birlikte, latent formu 72 kDa, aktif formu 66 kDa molekül ağırlığındadır (198). Keratinositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, kondrositler, osteoblastlar, monositler gibi birçok hücreden olduğu gibi ve transforme olmuş hücrelerden de salıverilirler. Akciğerlerde bronş epitel hücreleri, bronş düz kas hücreleri ve fibroblastlar MMP-2 üretir (112, 233). Jelatini, kollajeni (Tip I, IV, V, VII, X, XI, XIV), elastini, fibronektini, laminini (5, 158), agrekanı, versikani, proteoglikana bağlı proteini, α 1-antitripsin/ α 1-proteinaz inhibitörü (α 1-AT), miyelin bazlı protein (MBP) ve TNF prekürsörünü, MMP-1 ve MMP-9'u yıkıma uğratar (26). MMP-2 aynı zamanda tip 1 kollajeni yıkarak ESM'in yeniden modellenme olayında önemli rol üstlenir (166, 228). MMP-2 çözünür halde iken MMP-1 ve diğer kollajenazlara göre daha zayıf kollajenolitik aktivite gösterir. Çünkü proMMP-2 hücre yüzeyine yerleşmiştir ve MT-MMP'ler tarafından aktive edilir. ProMMP-2 perisellüler alanda birikebilir ve lokal kollajenolitik aktiviteye neden olabilir. Dolayısı ile MMP-2'ler kollajenazların parçalamış olduğu küçük kollajen fragmanlarını yıkıma uğratarak birlikte aktivite göstermiş olurlar. Çünkü bu fragmanlar vücut ısısında denatüre olurlar (154). MMP-2'ler TIMP-2, -3, -4 ve α 2 makroglobulin tarafından inhibe edilirler (43, 84). MMP-2 ekspresyonunun kolon (211), pankreas (64), meme (213), over (173), prostat (217) ve akciğer (130) tümör dokusunda arttığı saptanmış ve söz konusu MMP kötü prognoz faktörü olarak değerlendirilmiştir.

1.3.3.1.2. **Jelatinaz B (MMP-9):**

Doku ya da hücre tipine göre değişmekle birlikte, latent formu 92 kDa, aktif formu 84 kDa molekül ağırlığındadır (64). MMP-9, jelatin ve tip IV bazal membran kollajeni için substrat özgülüğü gösterir. Ayrıca MMP-9 kollajenleri (Tip III, V, VII, X, XIV) (26), elastini (64) (26, 62), fibronektini (5, 26, 198), agrekanı, versikani, proteoglikan bağlı proteini, entaktini, α 1-AT, MBP ve TNF prekürsörünü (26) de yıkıma uğratar. Organizmada gelişim, doku

yenilenmesi ve inflamasyondan sorumludur (5). MMP-9 geninin promotor bölgesinin varsayılan AP-1 (-533, -79), NF-kB (-600), Sp1 (-558), ve PEA3 (-540) olmak üzere 4 adet bağlanma bölgesi vardır (194). Bu bağlanma bölgelerinden biri veya bir kaçı aracılığıyla (Ras gibi) onkojenler, (FGF-2, EGF, HGF gibi) büyüme faktörleri ve (TNF- α gibi) sitokinler tarafından MMP-9 ekspresyonu düzenlenir (91, 93, 97, 124, 204, 235). Buna karşın MMP-9 ekspresyon ve/veya aktivitesi TIMP-1,-3,-4 ve α 2-makroglobulin tarafından inhibe edilir (24). Makrofaj, mast hücresi, lenfosit, eozinofil ve nötrofil gibi pek çok inflamatuvar hücre, LPS aracılığıyla MMP-9'un ve TNF- α , IL-8, granülosit koloni sitümüle edici faktör gibi diğer inflamatuvar medyatörlerin üretimi ve/veya saliverilmesinden sorumludur (140). Bahsedilen faktörlerin yanında jelatinaz saliverilmesini etkileyen başka faktörler de mevcuttur (Tablo 1.3).

Tablo 1.3: Jelatinazların saliverilmesini etkileyen faktörler (111).

Aktive Edici Faktörler			İnhibe Edici Faktörler
Hücre Yüzeyinde Etkili Faktörler	Kimyasal Ajanlar	Diğerleri	
Kalsiyum iyonoforu A23187	Lipopolisakkarid	Onkogenler	Retinoik asit
Konkanavalin A	Kolsişin	TNF	Glukokortikoidler
Kristaller	C-AMP	Otokrin ajanlar	Östrojen
Ürat	Mitomisin-C	Fibroblastların yaşlanması	Projesteron
Hidroksiapatit	Pentoksifilin	İnterlökin 1	Adenovirüs-5EIA geni
Kalsiyum pirofosfat	Forbol diesterleri	Epidermal büyüme faktörü	
İntegrin reseptör antikor	Prostaglandin E	Trombosit büyüme faktörü	
Polihidroksietilmetakrilat	Trifluoprazin	Virüs aracılı farklılaşma	
Fagositoz	UV ışını		

1.3.3.1.3. Nötrofil Kollajenaz (MMP-8):

Doku ya da hücre tipine göre değişmekle birlikte, 75 kDa molekül ağırlığında proenzimdir ve aktif formu 58 kDa molekül ağırlığındadır (5). Tip I, II, III, (5), VII, VIII, X (I > III) kollajeni, jelatini, agrekanı, α 1-AT'yi, fibronektini yıkar (26). Nötrofillerce üretilir ve diğer kollajenazlardan farklı bir gen tarafından türetilir. Nötrofil kollajenazda, interstisyel kollajenazda (MMP-1) bulunmayan altı glikozilasyon sahası vardır ve bu nedenle nötrofil kollajenaz artmış glikozilasyondan sorumlu tutulur (5).

Farklı doku ve hücre hatlarında yapılan çalışmalarda MMP-8 düzeyinin LPS (lipopolisakkarit) ile nasıl değiştiği gösterilmiş olsa da prostat kanseri hücre hattı PC-3'de LPS'in MMP-8 üzerindeki etkisi henüz incelenmemiştir. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, MMP-8 geni silinmiş farelerde TNF- α ile akut hepatit oluşumuna karşı normal farelere kıyasla belirgin düzeyde koruma geliştirdiği gözlenmiştir. MMP-8 geni silinen farelerde, hepatosit nekroz ve apoptoz düzeyinde azalmaya bağlı olarak ölüm oranı azalmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda, sitokinlerle uyarılan MMP-8'in akut karaciğer yetmezliğinde esansiyel bir role sahip olabileceği ileri sürülmüştür (224). Hanemaaijer ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise, romatoid sinovial fibroblast ve epitel hücrelerinde TNF- α ve PMA'nın (forbol miristat aseatat) MMP-8 mRNA ve protein düzeylerinde artış oluşturduğu ve bu artışın doksisisiklin ile inhibe edilebildiği gösterilmiştir (94). İnsan tam kanında *ex vivo* olarak yapılmış bir çalışmada *Porphyromonas gingivalis* kaynaklı LPS ile indüklenen MMP'ler (MMP-8, -9) ve pro-inflamatuvar mediyatörlerin (IL-1 β , IL-6, IL-8) ekspresyonlarında tetrasiklin, doksisisiklin ve kimyasal olarak modifiye edilmiş tetrasiklin-3 (CMT-3) ile sitokin sekresyonunda farklı derecede azalma yaptığı bulunmuştur. Bununla birlikte aynı çalışmada LPS'le muamele edilmiş tam kan örneklerinin MMP-9 ve MMP-8 sekresyonunda herhangi bir değişiklik oluşturmadığı da savunulmuştur (22). Nötrofil hücreleri üzerinde yapılan bir başka çalışmada, LPS stimülasyonu ile MMP-7, MMP-9'a ek olarak MMP-8

ekspresyonunda da belirgin artış meydana geldiği görülmüştür (201). İnsan jinnival fibroblastlarında yapılan bir çalışmada da LPS ile MMP-1, MMP-2 ve MMP-8 aktivasyonlarının arttığı belirtilmiştir (121).

1.3.3.1.4. **Stromelisin 2 (MMP-10):**

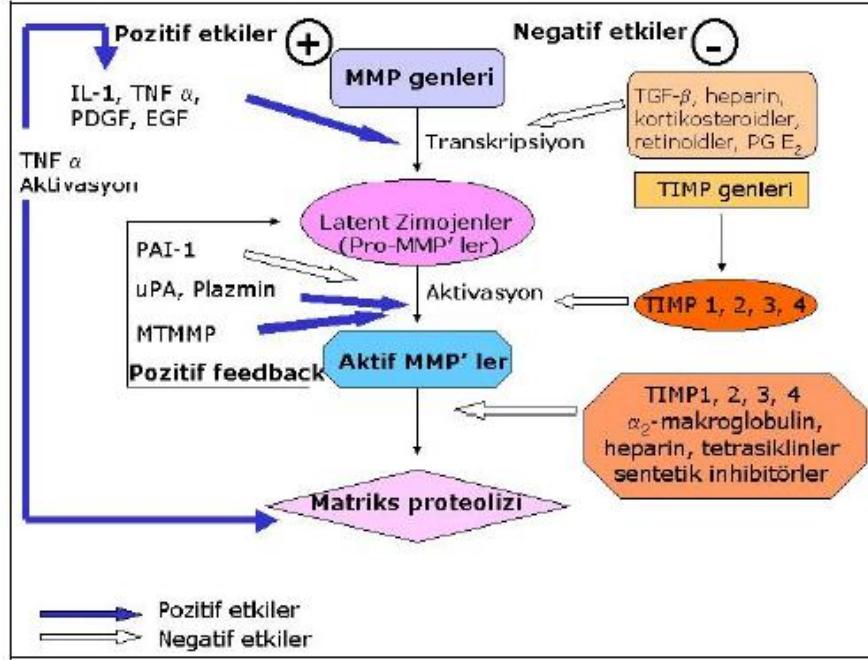
Doku ya da hücre tipine göre değişmekle birlikte, latent formu 57 kDa, aktif formu 46 kDa molekül ağırlığındadır (5). Substratları fibronektin, jelatin, kollajenler (tip III, IV, V), kazein, agrekan, elastin, proteoglikan bağlı protein, MMP-1, MMP-8' dir (26). "Transin 2" olarak da bilinen ve insan tümörlerinden kopyalanan bu molekülün, aminoasid dizilimi, büyüklüğü ve substrat spesifitesi stromelisin 1 ile benzer özellikler taşımakla birlikte, farklı genler tarafından türetildikleri belirtilmektedir (5).

Günümüzde farklı hücre hatlarında MMP-10 ekspresyon düzeyinin LPS ile nasıl değiştiğini gösteren az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunlardan Reel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, insan monosit hücrelerinde LPS uyarımıyla mRNA düzeyinde MMP-1, MMP-10 ve MMP-14 üzerinde güçlü, MMP-9 ve TIMP-1'de ise daha zayıf şekilde stimülasyon gerçekleştirdiği belirtilmiştir (184). Ancak prostat kanseri hücre hattı PC-3'lerdeki MMP-10 ekspresyon düzeyine LPS indüksiyonunun etkilerini değerlendiren herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır.

1.3.4. **MMP AKTİVİTESİNİN DÜZENLENMESİ**

MMP'ler ESM'in yıkımında esansiyel rol oynar. MMP'lerin tümü preproenzim olarak sentezlenir ve inaktif latent zimojen form olan pro-enzim formunda salgılanır. Latent zimojenlerin aktivasyonu, hücre içinde, hücre yüzeyinde veya ekstrasellüler aralıkta pek çok faktör aracılığıyla meydana gelebilir (183). MMP'lerin proteolitik aktivitelerinin temel olarak 3

basamakta düzenlendiği bilinmektedir. Bunlar **transkripsiyon**, **pro-enzimin aktivasyonu** ve **enzim aktivitesinin inhibisyonu** aşamalarıdır (183) , (Şekil 1.9).



Şekil 1.9: MMP enzim aktivitesinin düzenlenmesi (55, 183) .

1.3.4.1. Transkripsiyonel Düzenleme

MMP gen ekspresyonu tümör nekroz faktör-alfa (Tumor Necrosis Factor-Alpha, TNF-α), interlökin-1 (Interleukin-1, IL-1) gibi inflamatuvar sitokinlerle, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (Platelet Derived Growth Factor, PDGF) ve epidermal büyüme faktörü (Epidermal Growth Factor, EGF) gibi birçok büyüme faktörü, hormonlar, tümör promoterleri ve onkojen ürünleri gibi çeşitli ajanlar ile stimüle edilir (5, 183) (Şekil 1.9). Transforme edici (dönüştürücü) büyüme faktörü-β (Transforming Growth Factor-Beta, TGF-β), heparin, kortikosteroidler, retinoidler, prostaglandin E₂ (Prostaglandin E₂, PGE₂) ve diğer eikozanoidler ise MMP gen transkripsiyonunu inhibe ederler (183) .

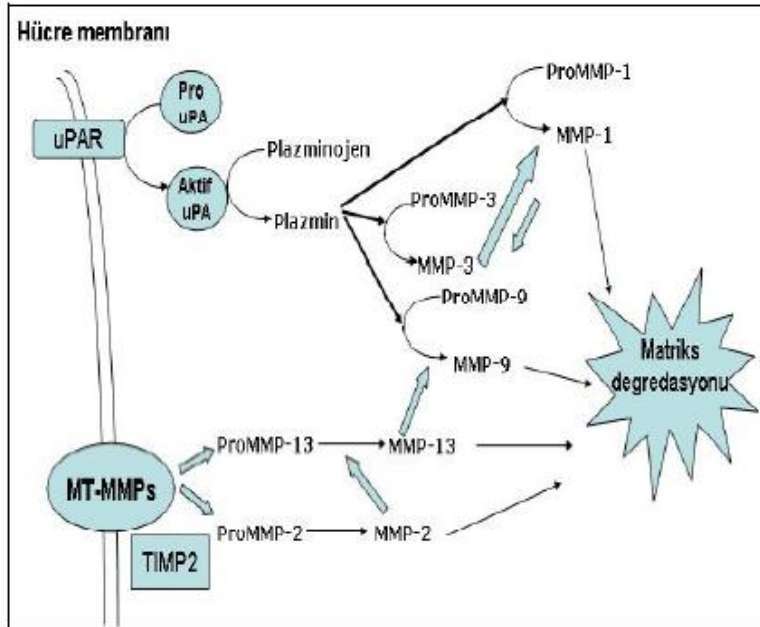
Bazı büyüme faktörlerinin, protoonkojen ürünler olarak bilinen *c-fos* ve *c-jun*'un MMP ekspresyonunu indüklediği düşünülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, bu proteinler transkripsiyon faktörleri olarak gösterilmekte ve TRE (TPA Responsive Element, TPA cevap elementi) olarak bilinen bir spesifik DNA sekansını tanımlayan veya AP-1 (Activator Protein-1, aktivatör protein 1) bağlanma bölgesi olarak sunulan spesifik DNA sekansını tanımlayan heterodimerik kompleksler yaptıkları belirtilmektedir. Yapılan sekans tanımlanmaları sonucunda tavşan ve insan stromelisin ve insan interstisyel kollajenaz genlerinde TRE ve AP-1 bağlanma bölgelerinin olduğu görülmüştür (5). Bu bilgileri destekler nitelikte çeşitli hücre kültür çalışmaları bulgularında, *c-fos* ve *c-jun* metalloproteinaz gen ekspresyonunun önemli regülatörleri olarak tanımlanmışlardır. (183,226). Ayrıca kollajenaz gen ekspresyonunun glukokortikoidler ile inhibisyonunun, TRE/AP-1 bağlanma bölgesinde meydana geldiği ve bu etkiye *c-fos* ya da *c-jun*'un aracılık ettiği bildirilmiştir (5, 226).

1.3.4.2. Pro-enzimin Aktivasyonu Aşamasında Düzenleme

MMP'ler sentez edildikten sonra inaktif "pro-enzim" formunda salıverilirler. Latent formda bulunan MMP molekülleri, prodomain etrafında katlanmıştır ve korunmuş olarak bulunan PRCGVDPV bölgesindeki sistein rezidüleri çinko molekülü ile bir kompleks yapmıştır. MMP aktivatörleri molekülde çinko ile etkileşimi bozarak ve proteolitik reaksiyona eşlik edecek olan çinkoyu serbestleştirerek MMP latent molekülünde bir konformasyonel değişikliğe yol açarlar. PRCGVDPV sekansını içeren aminoterminal pro- bölgesi uzaklaştırılmış olan aktif MMP, otoproteoliz yeteneğine sahiptir. Latent molekülün aktif enzime dönüşümü MMP aktivitesinin düzenlendiği bir sonraki aşama olan proteinaz kaskadı aktivasyonunu da içerir (5, 147, 183).

Latent MMP'ler; organik civa bileşenleri, şelasyon yapıcı ajanlar ve proteazlar gibi bazı in-vitro ajanlarla aktive edilebilse de (5), MMP'lerin temel endojen aktivatörü "plazmin"dir. Çeşitli hücrelerde (endotel hücresi, monosit-makrofaj, düz kas hücresi) eksprese edilen "ürokinaz-tip

plazminojen aktivatörü"nın (uPA) aktif formunun plazminojeni plazmine dönüştürdüğü ve oluşan plazminin pro-MMP'leri aktive ettiği kabul edilmektedir (Şekil 1.10). uPA ekspresyonunun ise steroid hormonlar, hücrel onkojenler, sitokin ve büyüme faktörleri aracılığıyla düzenlendiği gösterilmiştir. "Plazminojen aktivatör inhibitörü-1" (PAI-1), uPA üzerinde inhibitör etkilidir ve MMP'lerin plazmin aracılı aktivasyon kaskadı ile zıt yönde etkileşir. uPA aracılı aktivasyon kaskadında bir MMP'nin aktivasyonu, diğer bir MMP'nin aktivasyonuna yol açar, aktiflenen enzim bir diğer MMP'yi aktive edecek şekilde pozitif bir döngü oluşturur (Şekil 1.10). Bu şekilde plazmin pro- formdaki MMP-1, MMP-3 ve MMP-9'u aktif formuna dönüştürür. Daha sonra MMP-3, pro-MMP-1'i MMP-1'e dönüştürür, MMP-1 de pro-MMP-9'u aktif formuna dönüştürebilir. MT-MMP'ler de diğer MMP'lerin özellikle MMP-2'nin aktivatörüdürler. Oluşturdukları proteolitik aktivasyon plazminojen/plazmin aktivatör sistemine benzer şekilde hücre yüzeyinde gerçekleşir. Diğer yandan MMP-2 ve MMP-9 (jelatinazlar) aktive olmuş doku makrofajları tarafından üretilen serbest radikal (SR)'lerin etkisiyle ESM içinde kendiliğinden de aktive olabilir (13, 183) .



Şekil 1.10: MMP'ler için hücre yüzeyi ile ilişkili aktivasyon kaskadı (13, 183) .

1.3.4.3. MMP Enzim Aktivitesinin İnhibisyonu

MMP aktivitesinin kontrolünde spesifik doku inhibitörleri olan TIMP'ler anahtar rol oynarlar (5,147). Bundan başka α 2-makroglobulin, anti-kollajenaz aktiviteli serum C-reaktif proteini (5), heparin, tetrasiklinler ve sentetik inhibitörler de aktif MMP inhibitörleri arasında yer alırlar (183).

1.3.4.3.1. TIMP'ler (Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitorleri)

TIMP'ler, bağ dokusu metabolizmasının düzenlenmesinde temel olan proteinlerdendir. Pek çok dokuda ve vücut sıvısında bulunurlar. MMP'lere irreversibl ve non-kovalent biçimde bağlanarak latent enzim formunun aktivasyonunu ve katalitik aktivitenin sürdürülmesini de inhibe ederler. Böylece, organizmada fizyolojik olayların sürdürülmesinde MMP aktivitesi ile onların spesifik endojen doku inhibitörleri olan TIMP'ler arasında sürekli bir denge söz konusu olur (56,126,183).

İnsanlarda TIMP-1, 2, 3 ve 4 olmak üzere bugüne dek tanımlanmış 4 adet TIMP türü bulunmaktadır. TIMP'ler de MMP'ler gibi vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, kan hücreleri, bağ dokusu hücreleri ve makrofajlar tarafından sentez edilirler. TIMP'ler kendi aralarında kıyaslandığında, MMP aktivitesini inhibe etme yönünden benzerlik göstermekle beraber, matriksteki lokalizasyonları ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi yönünden farklılıklar içerirler. Ayrıca değişik MMP türlerine göre de özgüllük gösterirler. Örneğin; Jelatinaz A (MMP-2) tercihen TIMP-2 ile, Jelatinaz B (MMP-9) ise TIMP-1 ile inhibe edilir (183).

MMP'ler ve TIMP'ler, normal dokularda düşük düzeyde eksprese edilirler ve kemiğin yeniden modellenmesi, anjiyojenez, inflamasyon, apoptoz, immün cevap gelişimi gibi birçok biyolojik süreçte rol oynarlar. MMP ekspresyonu, gen transkripsiyonunu etkileyen faktörlerin etkisi altındaki çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullarda gelişen doku yeniden modellenmesi

sırasında artar. Bu sırada MMP'lerin üretimi TIMP'lerin üretimini aşabilir. Böylece MMP'ler ve TIMP'ler arasındaki denge bozulur (183). Dengenin MMP yönünde bozulması bu enzimlerin, esansiyel olarak, aşırı matris yıkımına neden olarak doku hasarı, inflamasyon, tümör invazyonu, metastaz, anjiyogenez ve malign hücre proliferasyonu gibi önemli patolojik süreçlere katılmasına neden olur (56, 73, 159).

1.3.4.3.2. α 2-makroglobulin

Aktif MMP inhibitörlerinden biri olan α 2-makroglobulin yüksek molekül ağırlıklı bir serum proteindir ve aktif MMP-2'ye bağlandığında onun total molekül ağırlığını arttırarak hareket yeteneğini kısıtlar, inhibitör etkinliğinin sıvı fazda gerçekleştiği ileri sürülmektedir (183).

1.3.4.3.3. Tetrasiklinler

Tetrasiklin analogları, non-selektif MMP inhibitörleri olarak kabul edilebilir (Tablo 1.4). MMP molekülünün Zn^{+2} içeren aktif bölgesine bağlanarak enzimde yapısal değişikliğe yol açtığı ve enzimin aktivitesini kaybetmesine neden oldukları düşünülmektedir (183). Bu grupta yer alan doksisisiklinin; uzun yarı ömürlü, ucuz olması yanında, MMP ekspresyon ve aktivitesi ile kanser hücre proliferasyonu inhibisyonunda potent özelliklere sahip olması nedeniyle araştırmalarda en çok kullanılan ajanlardan biri olduğu bilinmektedir (72).

1.3.4.3.4. Sentetik MMP İnhibitörleri

Son yıllarda peptid ve non-peptid yapıda sentetik MMP inhibitörleri de üretilmiştir (Tablo 1.4). Bu inhibitörler en çok kanser tedavisinde olmak üzere kardiyovasküler hastalıklar, artrit, psöriyazis, peridontal hastalık ve makula dejenerasyonu gibi farklı hastalıkların tedavisinde denenmiştir (183).

Tablo 1.4: Sentetik MMP inhibitörlerinin sınıflandırılması (183) .

Sınıfı	Sentetik inhibitörün Adı	Selektivite
Peptido-mimetik	BB-94 (Batimastat)	MMP-1, 2, 3, 7, 9
	BB-2516 (Marimastat)	MMP-1, 2, 7, 9
Non-peptido-mimetik	AG3340 (Prinomastat)	MMP-2, 3, 9, 13
	Ro 32-3555 (Trocade)	MMP-1, 2, 3, 9, 13
	RS-130 830	MMP-1, 2, 3, 7, 13
	BAY 12-9566 (Tanomastat)	MMP- 2, 3, 9
	BMS-275291 (Rebimastat)	MMP- 2, 9
	CP-471 358	MMP- 2, 3, 8, 9, 12, 13, 14
	CGS-27023A (MMI-270)	MMP-1, 2, 3, 7, 9
Köpek Balığı Kartilaj Ekstresi	AE-941 (Neovastat)	MMP-1, 2, 7, 9, 12, 13
Sentetik Tetrasiklin Türevi	COL-3 (Metastat)	MMP-2, 9
	Doksisiklin (Periostat)	MMP-1

Sentetik MMP inhibitörlerinden BB-94 (batimastat), BB-2516 (marimastat), Ro 32-3555 (Trocade), RS-130 830, BAY 12-9566, CGS-27023A (MMI-270)'nın etkinliklerinin yetersiz olması veya istenmeyen etkileri nedeniyle klinik denemelerine son verilmiştir (183) . Bununla birlikte, hala deney aşamasında olan ve ikinci kuşak olarak adlandırılan MMP sentetik inhibitörlerinin de mevcut olduğu bilinmektedir (183) (Tablo 1.5).

Tablo 1.5: Klinik denemeleri süren ikinci kuşak sentetik MMP'ler (183) .

Tedavi Alanı	Sentetik İnhibitör	Faz	Firma	Mekanizma
Akne	Dermostat	Faz II	Collagenex	Kollajenaz inhibitörü
Artrit	CPA-926	Faz II	Kureha Chemical Sankyo	MMP inhibitörü
	DPC-333	Faz II	Bristol Myers Squibb	MMP ve TNF konvertaz inhibitörü
Ateroskleroz, Peridontit	Periostat	Başlangıç	Collagenex	MMP-1 inhibitörü
Kanser	S-3304	Faz II	Shionogi	Jelatinaz ve MMP-14 inhibitörü
	Rebimastat	Faz II	Cltech Bristol Myers Squibb	Jelatinaz inhibitörü
	CMT-3	Faz II	Collagenex NIH	Kollajenaz inhibitörü
	CP-471358	Faz I	Pfizer	MMP-2 inhibitörü
Kanser/Psöriazis	Neovastat	Faz III	Aeterna Laboratories	Kollajenaz, Jelatinaz inhibitörü, VEGF reseptör-2 antagonisti
Konjestif Kalp Yetmezliği ve Artrit	ONO-4817	Faz I	Ono	MMP-8 ve MMP-13 inhibitörü

1.3.5. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR VE KANSER İLİŞKİSİ

Kanser progresyonu büyüme, migrasyon, invazyon, metastaz ve anjiyogenez içeren kompleks ve çok basamaklı bir süreçten meydana gelir. Bu basamakların her biri, hiperplastik bir hücrenin gelişerek farklı bölgelere metastaz yapabilen gerçek bir tümör olabilmesi için kritik öneme sahiptir. Bu basamaklar, MMP'ler gibi pekçok genin etkileşimi ile düzenlenir (146) .

Malign hücreler invazyon ve metastaz yapma kapasitelerine sahip hücrelerdir. Kanser invazyonunda, ekstrasellüler matriksin ve bazal membranın yıkılması, non-neoplastik doku yeniden oluşum sürecinde olduğu gibi önemli rol oynar. Bu parçalanma çeşitli ekstrasellüler proteolitik enzimlerin birlikte görev alması ile gerçekleştirilir. Bu enzimler matriksi parçalayan proteazlar olarak bilinirler ve bu grupta "Serin Proteaz Ailesi" ile birlikte "Matriks Metalloproteinaz Ailesi" (MMP'ler) yer almaktadır (5, 146) . Bu enzimlerin aktivitesi, **proenzim aktivatörleri** (uPA, MT-MMP'ler), **spesifik inhibitörler** (PAI'ler, TIMP'ler) ve **hücre yüzey reseptörleri** (uPAR) ile düzenlenmektedir. Matriks parçalanmasını ise üç değişken arasındaki denge belirler. Bunlar sırasıyla; ekstrasellüler matriks komponentlerinin üretimi, proteinaz üretimi, proteinaz inhibitörlerinin üretimidir (5) .

Geçmiş yıllarda MMP'lerin rolleri hakkındaki bilgiler, kanser gelişimi sürecinde endotel hücrelerinin ekstrasellüler matriksinden migrasyonu kolaylaştırması ile sınırlı iken, günümüz çalışmaları MMP'lerin sadece ekstrasellüler matriksi yıkıma uğratmadığını göstermektedir. Bu özelliklerinin yanında MMP'ler, hücre yüzeyinde bir tümör mikroçevresi oluşturmaktan da sorumlu tutulmaktadırlar. Bu oluşumu üç şekilde gerçekleştirirler:

1. Endotel hücrelerinden adezyon için gerekli, kollajenli bazal membranın matrikriptik bölgeleri MMP aktivitesi ile ortaya çıkartılır.

2. MMP'nin ekstraselüler matriksi yıkması ile, BFGF (Basic Fibroblast Growth Factor - Bazik fibroblast büyüme faktörü) ve VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor, Vasküler endotel büyüme faktörü) gibi tümör büyüme faktörlerinin saliverilmesi gerçekleşir.

3. Son olarak, MMP aktivitesi çeşitli antianjiyojenetik faktörlerin salverilmesine sebep olur. Bu faktörler arasında, MMP spesifik doku inhibitörleri, spesifik olmayan proteaz inhibitörü, α 2-makroglobülin ve ekstraselüler matriksten tümör invazyonu ile anjiyojenez oluşumunu sınırlayan, membrana gömülü, reversiyonu uyaran sisteince zengin Kazal Motif içeren protein (RECK - Reversion-inducing-Cysteine-rich protein with Kazal motifs) vardır.

Etkin bir tümör mikroçevre oluşumunun gerçekleşmesi için, bu kuvvetler arasında uyumlu bir denge bulunması gerekir (186).

Tümör dokularında, tümör progresyonu ile birden fazla MMP aile üyesinin (MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-11, MT1-MMP) ekspresyonunun pozitif korelasyon gösterdiği pek çok hayvan deneyi ve klinik çalışmada gösterilmiştir. Ek olarak, aktif hale gelen MMP'lerin total MMP düzeyine oranı, özellikle MMP-2 için, tümör agresifliği ile orantılı bulunmuştur. Çok sayıda yapılmış prelinik çalışmaya göre, kanser metastazından korunmak için MMP aktivitesinin hedeflenmesinin bir seçenek olabileceği öngörümüştür (239). Ancak bu görüşün aksini savunan ve MMP'lerin kanser progresyonunun pek çok aşamasında yararlı ve koruyucu etkiye sahip olabileceğini gösteren çalışmalar da olmuştur. Bu çalışmalardan bazıları, erken evrede kanserle ilişkili olarak arttığı bilinen MMP'lerin öngörüselsel ve/veya hastalık prognozuna ilişkin bir markır olarak kullanılabileceğini, ekstraselüler matriksin yeniden yapılandırılması ile integrinler aracılığıyla proliferasyonun indirekt olarak düzenleyici etkiye sahip olduğunu, özellikle bir ölüm proteini olan Fas ligand'ın (FasL) MMP-7 ile üretilmesine bağlı olarak kanser hücrelerinde apoptozun oluşturabileceğini, MMP-8'in erken evrede tümör gelişimini önleyici etkili olabileceğini belirtmiştir (146).

1.3.5.1. Kanserde MMP'lerin Üretimi

1990 yılı öncesinde onkogen transfer edilmiş hücreler, kanser hücre hatları ve deneysel tümör modelleri ile yapılmış pek çok çalışmanın sonucuna göre, MMP'lerin üretiminden insan tümörlerine ait kanser hücrelerinin sorumlu olduğu kabul edilmiştir. Ancak 1990 yılında Basset ve arkadaşlarının tümör hücrelerinin etrafının, yine kendileri gibi tümör hücreleri ile değil de stromal fibroblastlar ile sarılı olarak bulunduğunu ortaya çıkarması ile bu konu daha da irdelenir hale gelmiştir. Başka araştırmacıların da ovaryum, prostat, akciğer, kolorektal, göğüs kanseri gibi insan kanser türleri dışında, özellikle invaziv kanser hücrelerinin bitişiğindeki stromal fibroblastlarda MMP-1, MMP-2, MMP-3 ve MT1-MMP mRNA lokalizasyonunun gösterildiği benzer çalışmalar bu fikri desteklemiştir (239). Bu bilgilerden hareketle, kanser invazyon sürecinde stromal hücrelerin aktif olarak rol almakta olduğu kabul edilmiş ve insan kanserlerinde tümör ile infiltre olmuş stromal hücrelerde matriksi degrade eden proteaz sistemin komponentlerinin (serin proteaz ailesi ve matriks metalloproteinaz ailesi (MMP'ler) üyelerinin) varlığı gösterilmiştir (5). Sonuç olarak kanser gelişimindeki pek çok aşama için gerekli olduğu anlaşılan MMP'lerin ekspresyonunun düzenlenmesinde, mikroçevrede bulunan tümör hücreleri ile stromal hücreler arasındaki iletişimin kritik rol oynadığı anlaşılmıştır (143,146). Bu fikri destekler nitelikte, metastaz yapma kapasitesi olan invaziv yapıdaki prostat kanser hücrelerinin de yine yakınlarındaki stromal hücreler ile etkileşim içinde çalışarak birlikte ürettikleri MMP'ler aracılığıyla ekstraselüler matriksin yıkımından sorumlu olduğu gösterilmiştir (56). Kolorektal kanser dokularında ise MMP-9'un tümör hücreleri veya fibroblastlardan çok inflamatuvar hücrelerde (nötrofil ve makrofajlarda) lokalize olduğu gösterilmiştir. Spesifik antikorlarla yapılan immüno-lokalizasyon çalışmaları neticesinde MMP'lerin (özellikle MMP-9 ve MMP-2 için) stromal hücrelerden sentezlendiği ve tümör hücrelerinin ise MMP'ye özel bağlanma bölgelerine sahip olduğu fikrini güçlendirmiştir. Örneğin, MMP-9'un hücre yüzeyindeki "kollajen tip 4" komponentlerine ve CD-44'e bağlandığı, MMP-2'nin ise "αvβ3 integrin"lere bağlandığı

bulunmuştur. Bu nedenle, tümör hücrelerinin stromal MMP-2'ler için bir reseptör gibi işlediği düşünülmüştür (239) .

Tümörde stromal hücrelerce aktive edilen MMP'lerin oluşumu ile ilgili bir açıklama da Biswas ve arkadaşları tarafından 1995 yılında "Ekstraselüler Matriks MetalloPRoteinaz İNdükleyici" (EMMPRIN)'nin keşfi ile yapılmıştır. EMMPRIN, kanser hücreleri tarafından yüksek miktarda üretilen bir intrensek plazma membran glikoproteinidir. Bu glikoprotein, lokal fibroblastları MMP-1, MMP-2 ve MMP-3 sentezlemeleri için uyarır. Tümör hücre invazyonuna sebep olacak olan ekstraselüler matriksin ve bazal membranın lokal yıkımını fibroblastları uyararak kontrol eden EMMPRIN, bu sayede tümör hücreleri ile fibroblastlar arasında ilişki kurar. Akciğer ve göğüs kanser dokusu ile ilgili bir çalışmada, kanser hücrelerinde EMMPRIN ekspresyonunun normal epitel hücrelere kıyasla kat kat fazla olduğu gösterilmiştir. Bundan dolayı kanser tedavisinde EMMPRIN inhibitörlerinin de önümüzdeki yıllarda önemli hale gelmesi beklenmektedir. İnflamatuvar hücreler ve fibroblastlardan MMP'lerin üretimi ile ilgili genel kuraldan farklı olarak MMP-7'lerin, stromal hücreler yerine insan kanser dokusunda bulunan neoplastik epitel hücrelerden üretildiği bildirilmiştir (239) .

1.3.5.2. Kanser Tiplerine Göre Öne Çıkan MMP'ler

Kanser tiplerinin metalloproteinazlarla ilişkisini gösteren çalışmalar mevcuttur:

İnterstisyel kollajenaz (MMP-1); meme, beyin, mide, baş boyun kanserlerinde saptanmıştır. Kolorektal kanserlerde *in situ* hibridizasyon (ISH) tekniği ile eozinofil ve fibroblastlarda artmış MMP-1 izlenimi, bazal hücre karsinomlarında ISH ve immunositokimyasal (ICC) yöntemle stromal hücrelerde artmış MMP-1 izlenimi saptanmıştır. Mide kanserinde ISH sinyalleri tümör stromasının makrofaj ve fibroblast benzeri hücrelerinde lokalize olmuştur (5) .

Gelatinaz A (MMP-2); kolon, pankreas, mesane, prostat, deri karsinomlarında, meme ve over kanserinde ve hemen hemen tüm kanser tiplerinde tümör stromasına lokalize olarak izlenir. Prostat kanserinde neoplastik epitel dokusunda, hipofarinks ve pankreas kanserinde ise hem neoplastik epitel hem de tümör stromasında görülmesi ender rastlanan durumlardır (5) .

Gelatinaz B (MMP-9); kolorektal kanserde, akciğer, mesane, mide kanserinde ve derinin yassı hücreli karsinomlarında makrofajlarda saptanmıştır. Hepatosellüler karsinomda artmış MMP-9 düzeyleri bildirilmiştir (5) .

Stromelisin 1 (MMP-3) ve Stromelisin 2 (MMP-10); baş boyun yassı hücreli karsinomlarında, bazal hücreli kanserde, pankreas, mide, kolon ve prostat kanserinde saptanmıştır (5) .

Stromelisin 3 (MMP-11); baş, boyun, mide, kolorektum, pankreas, karaciğer, akciğer, böbrek, deri ve prostat kanserinde stromada artmıştır, neoplastik epitelde ise lokalizasyonu saptanmamıştır. İnvaziv meme kanserinde *in situ* meme kanserinden daha fazla olması ve kolorektal kanserde izlenim verirken benign kolon adenomunda olmaması nedeni ile giderek artan miktarlarının tümörün invaziv olma potansiyeli ile doğru orantılı olduğu söylenebilir (5) .

Matrilisin (MMP-7); mide, meme, prostat, ve kolorektal kanserde artar. Tüm tümör hücrelerinde bu artış neoplastik hücrede saptanmaktadır. Kolorektal kanserde artmış matrilisin düzeyleri tümörün geç evresi ile ilişkilidir. Bazal hücreli karsinomların atipik malign tümörler oldukları ve metastaz yapmadıkları bilinmektedir ve bu tümörlerde matrilisin düzeyinde artış olmayışı matrilisinin tümör gelişiminde önemli bir rolü olduğunun kanıtıdır (5) .

Membran tipi MMP'ler (MT-MMP'ler); jelatinaz A aktivasyonunda rol alır ve bu aktivasyon tümör hücrelerinin göçü için önemli olabilir. MT-MMP'ler mRNA ve proteini mide

kanserinde neoplastik bölgede saptanmıştır. Kolon, meme, baş boyun kanserinde ise MT-MMP1 stromada saptanmıştır (5) .

TIMP'ler; kolorektal kanserlerde TIMP1'in hem proteini hem de mRNA'sı stromadaki fibroblastlarda görülür. Hastalığın ilerlemesi ile düzeylerinin arttığı bildirilmiştir. Karsinomlarda benign adenomlardan, adenomlarda da normal mukozada olduğundan daha fazla oranda saptanmıştır. Artan miktarların tümörün invaziv olma özelliği ile doğru orantılı olduğu söylenebilir (5) .

1.3.6. **MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR VE PROSTAT KANSERİ ARASINDAKİ İLİŞKİ**

Malign tümör dokularında, özellikle MMP-2 ve MMP-9'un ekspresyonunun arttığını gösteren çalışmalar daha 90'lı yılların başında yapılmıştır (180) . Bunu destekler nitelikte, König ve arkadaşlarının yaptığı prostat kanserli ve benign prostat hiperplazili dokularda inflamasyon sürecinde rol oynayan enzimlerin, kemokinlerin ve kemokin reseptörlerinin rolüyle ilgili bir çalışmada, bu dokulardan izole edilen proteinlerde MMP-2 ve MMP-9'un ekspresyonlarının belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir (122) . 2001'de Dong ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise prostat kanserinin MMP ekspresyonları üzerinde pek çok çalışma yapıldığına değinilmiştir. Özellikle MMP-2 (jelatinaz-A), MMP-9 (jelatinaz-B), MMP-7 (matrilisin) ve MT1-MMP (MMP-14)'ün prostat kanserinde ekspresyon düzeyinin arttığı, bunlara karşı TIMP-1 ve TIMP-2 düzeylerinin ise azaldığı belirtilmiştir (56) .

1.3.7. **ONKOLOJİDE TERAPÖTİK HEDEF OLARAK MMP'LER**

İlaç endüstrileri, kanser hücrelerini öldürecek ilaçların geliştirilmesi konusunda araştırmalarını 1960'lı yıllardan günümüze kadar sürdürmeye devam etmiştir. (Testiküler kanser, lenfoma, lösemi gibi) belli başlı kanser tiplerinin tedavisinde önemli sayılabilecek gelişmeler yapılmış olsa da, bunlara göre kıyaslama yapıldığında (akciğer, gastrointestinal ve prostat kanseri gibi) daha yaygın olan insan kanserlerinde standart sitotoksik kemoterapiye

direnç hala sürmektedir. Kanser tedavisinin bu alanındaki düş kırıklığı, diğer tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır (239) .

Medikal onkolojinin mevcut araçları, tümör tipleri için uygulanan pek çok aktif antikanser ajandan oluşmaktadır. Ancak bunlardan hiçbirinin ideal denilebilecek ve her kanser türünde geniş yelpazede kullanılabilecek aktif bir kanser ilacı olduğu söylenememektedir. Pek çok ilaç küçük bir terapötik aralığa sahiptir ve malign hücre ile normal hücreleri çok zor ayırt eder. Bu problem ilaca gelişen direnç ve takibinde tekrarlayan nükslerin oluşması nedeniyle gün geçtikçe daha içinden çıkılmaz hale gelmektedir. Son yıllarda dikkatler özellikle, anormal hücre büyümeleri ve sağ kalımı gerçekleştiren sinyal yollarına etki eden, hedefe özgü yeni moleküler terapötikler üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu gelişmeler, sistemik toksisiteyi azaltıldığı bilinen ve daha spesifik olan ilaçlarla ilgili ümit vermektedir. Bunlardan bazıları, mikroarraylerin kullanıldığı gen-ekspresyon profili belirleme, DNA sekanslama ve gen sayısı farklılıkları için genom görüntüleme gibi kanser genetiği ve kanser genomu ile ilgili çalışmalarla ilgili yeni yaklaşımlara dayanan stratejilerdir. Spesifik kanserlerin tedavisi için moleküler olarak hedeflenmiş terapinin en güzel örnekleri, ErbB-2-/Her-2 pozitif göğüs kanseri için antikor tabanlı tedavide kullanılan "Herceptin" ve Bcr-Abl-pozitif kronik myeloid lösemi için kullanılan bir kinaz inhibitörü olan STI571 (imatinib)' dir (12) .

MMP'ler ilgili olarak yapılan gelişmelere bakıldığında ise, 90'lı yılların sonuna doğru MMP'lerin metastaz ve anjiyogenez gibi kanserin önemli basamaklarında işlev gösterdiğinin anlaşılması üzerine MMP inhibitörleri geliştirme ve uygulama çalışmaları da hız kazanmıştır (239) . MMP inhibitörleri üzerindeki bu iyimser havanın oluşmasında, deney hayvanları ve model sistemlerden oluşan prelinik çalışmaların büyük rolü vardır (43,230,239) . Ancak MMP'ler, kanser tedavisinde geliştirilen pek çok kemoterapötik ajan için hedef haline gelse de (95,132,186) günümüzde klinik olarak elde edilmiş başarıları sınırlıdır ve konu hala

araştırılmaya devam edilmektedir. Bu konuda en umut verici ilaçlardan biri olan, tetrasiklin olmayan MMP inhibitörü *Marimastat (BB-2516)*'ın, hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda mide kanserinde etkili sonuçlar verebileceği gösterilse de bu çalışma hala faz 1 aşamasındadır. Bunun yanında aynı çalışmada glioblastoma, pankreas, küçük hücreli olmayan akciğer, küçük hücreli akciğer ve ovaryum kanserli hastalarda marimastat denenmiş ancak aynı etki alınamamıştır. Diğer bir MMP inhibitörü, Bifenil türevi *Tanomastat* ise küçük hücreli akciğer ve pankreas kanserlerinde çok düşük düzeyde etki gösterebilmiştir (186) .

Ümit vaad eden başka bir ilaç grubu, tetrasiklin, doksisisiklin ve minosiklinin de dahil olduğu tetrasiklin ailesidir. Bu ilaç grubu, günümüze kadar sadece antibiyotik etkilerinden dolayı kullanılagelse de, mitokondriyel fonksiyonlar üzerindeki etkilerinin keşfedilmesinden sonra yeni kullanım alanları olduğu bildirilmiştir. Bu bileşiklerin tümör orijinli pek çok hücre hattına karşı sitostatik ve sitotoksik aktiviteleri gösterilmiştir. Bu etkinin gerekçesi olarak, tetrasiklin ve kimyasal olarak modifiye edilmiş tetrasiklinlerin pek çok MMP aktivitesini inhibe etmesi (193) düşünülmüş ancak henüz kesin bir açıklama yapılamamıştır.

1.4. **TETRASİKLINLER VE KANSER TEDAVİSİ**

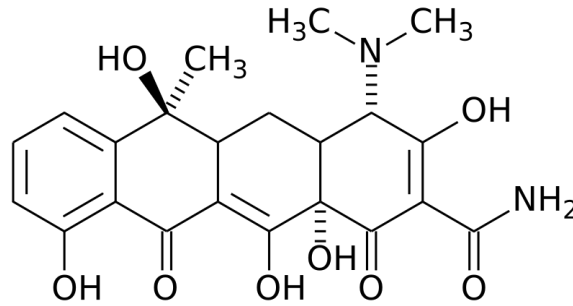
1.4.1. **TETRASİKLINLER**

Streptomyces aureofaciens'den 1948'de izole edilen tetrasiklinler grubundan ilk antibiyotik olan klortetrasiklinin bulunmasından sonra, 1953'de klortetrasiklinin dehalojenizasyonu ile tetrasiklinler izole edilerek tedaviye sokulmuştur. Diğer *streptomyces* türlerinden izolasyonla ya da yarı sentetik yollarla da değişik tetrasiklin türevleri elde edilmiştir.

I. Kuşak tetrasiklinler (Orta yarı ömürlüler): Klortetrasiklin, oksitetrasiklin, tetrasiklin, limesilin, demeklosiklin. Doğal ekstraksiyonla elde edilirler.

II. Kuşak tetrasiklinler (Uzun yarı ömürlüler): Doksisiklin, minosiklin, metilensiklin. Yarı sentetik antibiyotiklerdir.

Tetrasiklinler naftasenkarboksamid türevi bileşiklerdir. Yapılarında dört halka içerdiklerinden tetrasiklin adını almışlardır. Hepsinde karboksamid ortak yapısı bulunur. R, R1, R2 ve R3 pozisyonuna farklı yan dalların gelmesiyle birbirlerinden ayrılırlar (54).



Şekil 1.11: Tetrasiklinin kimyasal formülü.

1.4.1.1. Tetrasiklinlerin Etki Mekanizması

Tetrasiklinler bakteriyostatik etkili maddelerdir, tetrasiklinlerin bakteriyostatik etkisi bakteri hücreesindeki ribozomların 30 S alt ünitelerine reverzibl bir şekilde bağlanarak, protein sentezi inhibisyonu ile meydana gelmektedir (36,54). Prokaryotik protein sentez mekanizmasının ökaryotik mitokondrininki ile benzerlik göstermesi nedeniyle, tetrasiklinler memeli hücrelere ait mitokondriyel protein sentezi ile de girişim yapabilmektedir. Farklı memeli hücrelerinin tetrasiklinlere olan selektif geçirgenliği, bu ajanların hücre proliferasyonunun durdurulmasında ve malign durumun tedavisinde kullanılabileceği hipotezini desteklemiştir (193).

Günümüzde yapılan son çalışmalar, doksisiklin ve diğer tetrasiklin türevlerinin güçlü MMP inhibitörü olduklarını, antibiyotik etkileri dışında birçok hücresel fonksiyonu etkileyen çok yönlü ilaçlar olduğunu göstermiştir (81). Kimyasal olarak modifiye edilmiş tetrasiklinler ile yapılan

alışmalar antibiyotik ve anti-MMP etkisinin molekülün farklı bölgelerinden kaynaklandığını göstermiştir. Buna göre tetrasiklinlerin antibiyotik etkilerinin A halkasının karbon-4 pozisyonundaki dimetilamino grubunda, anti-MMP aktivitelerinin ise karbon-12 hidroksil ve karbon-11 karbonil oksijen grubunda bulunduğu söylenmiştir (14) (Şekil 1.12).

Tetrasiklinlerin anti-MMP aktivitesine dayanılarak yapılan çalışmalarda doksisisiklin ve diğeri tetrasiklin türevlerinin damarlarda intima kalınlaşmasını azalttığı, (15,107,136) aortik anevrizma (42,215), periodontal hastalık (17) ve artritte doku yıkımını azalttığı (87,209), tümör hücre invazyonu, tümör metastazı (72,196,197) ve tümör anjiogenezini inhibe ettiği (214) gösterilmiştir. İn vitro olarak osteosarkom ve endotel hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, meme karsinom hücreleri, osteosarkom hücreleri ve makrofajlarda apoptoza neden olduğu ve kondrositlerin matriks sentezini azalttığı gösterilmiştir (72). Aynı zamanda, tetrasiklinlerin makrofajlar ve mezenkimal hücrelerdeki nitrik oksit sentezi için mRNA'nın destabilizasyonunu ve salıverilmesini inhibe ettiği, tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ve reaktif oksijen türevlerini azalttığı bildirilmiştir (81).

1.4.1.2. Tetrasiklinlerin Yan Etkileri

1- *Gastrointestinal Bozukluklar*: Sindirim mukozasına iritan etkisi sonucu bulantı kusma ve diyare oluşabilir.

2- *Karaciğer Bozuklukları*: Yüksek dozda oral ve özellikle parenteral tetrasiklin uygulanması durumunda ağır sarılık tablosu geliştiğı bildirilmiştir.

3- *Böbrek Bozuklukları*: Böbrek hastalarında protein sentezini inhibe ederek ve bir katabolik etki oluşturarak üremi tablosunu ağırlaştırabilir. Doksisisiklinin böbrekler üzerine yan etkisi I. kuşak tetrasiklinlerden daha düşüktür.

4- *Dişlerin Renklenmesi*: Yeni diş gelişmesi olan çocuklarda tetrasiklinlerin kullanılması dişlerde kalıcı renk bozulmasına ve mine hipoplazilerine neden olur. Diş ve kemiklerde tetrasiklin-kalsiyum ortofosfat kompleksi oluşturarak birirmektedir (54) .

1.4.1.3. **Tetrasiklinlerin Farmakokinetiği**

Oral verilişlerinden sonra doksisisiklin ve minosiklin (%90-100) dışındaki tetrasiklin türevleri sindirim kanalından genellikle düzensiz ve tam olmayan (%60-70) bir absorpsiyona uğrarlar. Sindirim kanalından tetrasiklinlerin başlıca absorbe olduğu yerler, mide ve ince barsaklardır. Karaciğerde metabolize olurlar. Başlıca eliminasyon organı böbreklerdir (54) .

1.4.1.4. **Tetrasiklinlerin Günlük Tedavide Kullanımları**

Tedavide kullanılan antibiyotikler içinde tetrasiklinler en geniş spektrumlu olanlardır. Günümüzde tetrasiklinlerin başlıca endikasyonları Atipik pnömoni, Chlamydia, Mycoplasma, Brucella ve Riketsiya gibi mikroorganizmalardan meydana gelen enfeksiyonlarla sınırlanmıştır (54, 193) . Ancak diğer antibiyotiklerin alerji oluşması durumlarında duyarlılık testi yapılarak, sıradan enfeksiyonlara karşı da kullanılabilirler. Diğer taraftan, ender görülen fakat ağır seyreden antraks, kolera, amerikan riketsiozu, sıçan ısırığı, veba, tularemi ve tifus gibi enfeksiyonlarda tetrasiklinler öncelikli antibiyotiklerdir. Özellikle minosiklinin akne tedavisinde birkaç ay kullanıldığında oldukça etkili olduğu ve doksisisiklinin ise daha geniş bir kullanıma sahip olduğu bilinmektedir (54, 193) .

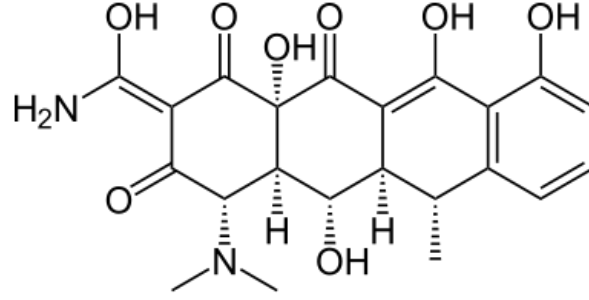
Doksisisiklin, akut Q ateşi, komplike olmayan genital *Chlamydia trachomatis* enfeksiyonu gibi hastalıkların tedavisinde primer basamak olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Bunun yanında, penisiline direnç kazanmış *Streptococcus pneumoniae* vakasında olduğu gibi antibiyotik dirençli veya antibiyotiğe duyarlılığın azaldığı, birinci basamak tedavi sonrasında kullanılabilirler (193) .

1.4.1.5. Doksisisiklin

Doksisisiklin, metal iyonlarını şelatlayabilen, geniş spektrumlu yarı sentetik bir tetrasiklin türevi antibiyotik olarak bilinmektedir. Ancak günümüzde antibiyotik özelliğinin yanı sıra, MMP sentez ve aktivitesi, IL-1 sentezi, aktif B hücrelerinin fonksiyonları, aktif makrofajların oluşturduğu LPS aracılı nitrik oksit sentezi, kültüre edilmiş kondrosit hücrelerindeki kollajen sentezi gibi çok sayıda hücresel fonksiyon üzerinde inhibitör etkileri olduğu da belirtilmektedir. (206). MMP inhibitörü özelliğinin daha iyi olması, uzun yarı ömürlü olması, ucuz ve potent olması gibi özellikleri nedeniyle doksisisiklin diğer pek çok tetrasiklinin diğer türevlerine göre üstün bir ilaç olarak görülmektedir (139).

Doksisisiklin, farmasötik formulasyonlarda genel olarak iki kimyasal formda kullanılır. Bunlardan biri **monohidrat**, diğeri ise **hiklat** formudur. Monohidrat, bir molekül su ile hidrate olmuş baz molekülüdür ve kapsül formülasyonları ile kullanılacağı zaman suda çözündürülen oral toz süspansiyonların hazırlanmasında kullanılır. Hiklat ise su ve etanol ile solvasyona uğramış hidroklorik asit tuzudur (220).

Doksisisiklin Hiklat (Doksisisiklin hidroklorür henietanolat hemihidrat) açık sarı renkte kristalize bir tozdur. 30 derecenin altındaki oda sıcaklığında ve hava geçirmeyen sıkıca kapalı kaplarda saklanmalıdır. Işıktan korunmalıdır. İngiliz Farmakopesi (BP)'ye göre çözünürlükleri: Su ve metil alkolde serbestçe çözünür; alkolde az çözünür; pratik olarak eter ve kloroformda çözünmez; alkali hidroksitleri ve karbonatlarının çözeltisinde çözünür. Amerikan Famakopesi (USP)'ye göre çözünürlükleri: Suda çözünür, alkolde hafif çözünür, pratik olarak kloroform ve eterde çözünmez, alkali hidroksitleri ve karbonatlarının çözeltisinde çözünür. %1'lik çözeltisinin pH'sı 2-3 arasındadır. USP'ye göre enjektabl çözeltisinin pH'sı 1.8-3.3 arasındadır (220).



Şekil 1.12: Doksisiklinin kimyasal formülü.

1.4.2. ONKOLOJİDE TERAPÖTİK OLARAK TETRASİKLİNLER: PRE-KLİNİK ÇALIŞMALAR

Tetrasiklinlerin MMP'lere karşı aktiviteleri olabileceğini düşündüren ilk bulgular, Golub ve arkadaşlarının 1983'te minosiklin ile yaptığı "deneysel olarak oluşturulan Tip 1 diyabette, hızlandırılmış periodontitis'te kollajenik enzimlerin aktiviteleri" deneyi ile ortaya çıkmıştır. Minosiklinde alınan sonuçlar sonrası, antimikrobiyal etkileri olmayan ancak kollajenaz inhibitörü etkileri olan **CMT-1** (4-dedimethylamino tetracycline – 1987'de) (138,186) ve **COL- 3** (6-deoxy 6-demethyl 4-dedimethylamino tetracycline – 1991'de) (83,186) gibi tetrasiklinlerin yeni kimyasal türevleri oluşturulmuştur.

MMP inhibitörlerinden biri olan COL-3'ün, C8161 melanoma hücrelerinde ve insan neonatal sünnet derisi fibroblast'larında MMP-2 ve -9'u inhibe ettiği gösterilmiştir. Bunun dışında, BPH-1, DU-145, PC-3 ve FHS-733 gibi kanser hücre hatlarının büyümesinde de inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir (178,186). İlginç şekilde, COL-3'ün, fosfolipaz A₂'ye karşı aktivitesi ve nitrik oksit sentazı da inhibe edebilme kapasitesinin olduğu bulunmuştur (171,186). Metastatik prostat kanserinin sıçan modelleri üzerinde COL-3'ün anti-tümör ve anti-metastatik etkisiyle ilgili olarak yapılan bir çalışmada, kontrole karşı COL-3'ün %27 ila 35 arasında primer tümör büyümesini, %58'e kadar oranda da metastazı azalttığı belirlenmiştir (139).

Tetrasiklinlerin anti-onkogenik özelliklerinin mekanizmasının, mitokondriyal protein sentezini inhibe etme yeteneğine sahip bileşiklerle ilişkili olduğu düşünülmüştür. Prokaryotlarda, tetrasiklinler, aminoasit t-RNA'nın ribozoma bağlanmasını önleyerek bakteriyostatik bir etki gösterir (193). Tetrasiklinlere farklı hücrelerin selektif geçirgenliğine bağlı olarak oluşan spesifik sitostatik aktiviteleri test edilmiş ve doksisisiklinin sıçanın ilaca geçirgen T hücre lösemilerindeki tümör hücre proliferasyonunu inhibe edici özelliğe sahip olduğu tespit edilirken, geçirgen olmayan eritroid ve B lenf hücrelerinde ise etkisinin olmadığı gözlenmiştir (193). İn vitro olarak insan renal ve prostat karsinom hücrelerinde de tetrasiklinlerin sitostatik etkiye sahip olduğu, hatta uzun süreli tedavi sonrasında da sitotoksik etki gösterdikleri bulunmuştur (186, 193).

Tetrasiklinlerin sitostatik etkilerini fibroblastlarda ve sarkom hücrelerinde gösterdiği ve hücre döngüsünün G1 fazında blokasyonuna bağlı olarak bu hücrelerde proliferasyonu durdurucu etkiye sahip oldukları belirlenmiştir (193).

İN vitro olarak yapılmış pek çok yeni çalışma, tetrasiklinlerin mezotelyom, osteosarkom, göğüs kanseri ve prostat kanseri hücrelerindeki sitotoksik etkilerini kanıtlar nitelikte sonuçlar elde etmiştir (58, 70, 72, 190, 193). Bu deney sonuçlarının tümünde tetrasiklin ve iki türevinin (Doksisisiklin, Minosiklin) sitotoksik etkili olduğu anlaşılrsa da, doksisisiklinin insan adenokarsinom hücre hatları üzerindeki etkisinin diğerlerine kıyasla daha fazla olduğu bulunmuştur (58, 193). Bununla birlikte doksisisiklin ile sitotoksik tedavi sonrasında prostat ve renal karsinom hücrelerinde DNA fragmentasyonu oluşması, apoptozun göstergesi olarak ifade edilmiştir (70, 72, 193).

Tüm bu bulgular, tetrasiklinlerin antibiyotik amaçlı kullanımlarının dışında, klinikte anti-neoplastik tedavide de etkili olabileceklerine dair fikir vermektedir.

1.4.3. ONKOLOJİDE TERAPÖTİK AMAÇLI TETRASİKLİNLER: KLİNİK DENEYLER

Tetrasiklin aracılı kanser inhibisyonunun incelemek üzere yapılan insan klinik deneyleri ilk olarak 2001 yılında Rudek ve arkadaşları tarafından COL-3 ile yapılmıştır. Bu deney, refrakter solid tümörlerde maksimum-tölere edilebilir dozun ve doz kısıtlayıcı toksisitenin belirlendiği faz 1 klinik çalışması olarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmadan alınan temel sonuçlarla beraber elde edilen ikinci sonuç, VEGF, MMP-2 ve MMP-9'un dolaşımdaki serum düzeylerinin hastalığın ilerleyişi ile doğru orantılı olacak şekilde değişmesi olmuştur. Bu deney, 36 mg/m²/gün dozla başlanan COL-3'ün artan dozlarının verildiği refrakter solid tümörlü 35 hastayla yapılmıştır ve 98 mg/m²/gün dozundan büyük dozlarda "kutanöz fototoksosite"nin oluşmaya başladığı görülmüştür. Bol miktarda güneş-koruyucusu ile 70 mg/m²/gün olarak COL-3 uygulanan hastaların ise tutarlı olarak bu yan etkiyi tolere edebildikleri belirlenmiştir (191). Bunun yanında dozdan bağımsız olarak az miktarda minör toksisitenin de oluşabildiği tespit edilmiştir. Bunlar: Anemi, kabızlık, baş dönmesi, yükselmiş karaciğer fonksiyon test sonuçları, ateş, baş ağrısı, bulantı ve kusma, periferik ve merkezi nörotoksiteler ve üç olguda ilaca bağlı lupus'tur (191). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, yine Rudek ve arkadaşları tarafından yapılan faz 2 çalışmalarında, 36 mg/m²/gün doz olarak uygulanan COL-3'ün hemanjiyoendoteliyomu, Sertoli-Leydig hücre tümörleri ve fibrosarkomu olan hastaların MMP-2 serum düzeylerinde anlamlı bir azalma oluşturduğu saptanmıştır (186). Syed ve arkadaşlarının, Rudek ile eş zamanlı olarak yaptıkları faz 1 çalışmalarında benzer sonuçlar elde ettikleri görülse de bu araştırmacılar faz 2 çalışmalarının sonucunda COL-3 dozunu 50 mg/m²/gün olarak önermişlerdir (212). Rudek ve Syed'den sonra pek çok farklı kanser türünde yapılan tetrasiklin çalışmalarında da hastaların MMP düzeylerini belirgin olarak azalttıkları görülse de bu sonuçlar, hastalığın seyri ile orantılı şekilde gelişmemiştir (186). Renal hücre kansinomu üzerinde Huie ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, doksisisiklin ile interferon-α kombinasyonunun toksisite ve etkinliği değerlendirilmiştir. Gerek yüksek oranda eksprese olan

MMP'lerin tümörün metastatik potansiyelinden sorumlu olması, gerekse yüksek vasküler bir yapı göstermesi nedeniyle, renal hücre karsinomunun tetrasiklin ile tedaviye uygun olduğu düşünülmüştür. Ancak 17 hasta üzerinde yapılan 5 aylık çalışma sonucunda yeterli yanıt alınamamıştır. Bu hastalardan sadece 4'ünde hastalık kontrol altına alınabilmiş ancak hiçbir hastada hastalığın tamamen geriye döndüğü gösterilememiştir (103).

Kanser tedavisinde tetrasiklinlerin MMP inhibitörü veya immünomodilatör yönünü değerlendirmek için MMP aktiviteleri üzerindeki araştırmalar günümüze kadar geniş çapta devam etmiştir. Bu araştırmalardan en başarılı olanlardan biri de "Bakteriyel ilişkili Marjinal Alan Lenfoması" tedavisinde kullanıldığı çalışmadır. *Chlamydia psittaci* DNA'sının "Oküler Adenoksal Lenfoma" (OAL)'da %80 oranında mevcut olduğu bilinmektedir. Bu yüzden *Chlamydia psittaci*, hastalığın malignitesinde etken organizma olarak kabul edilmiştir. Ferreri ve arkadaşları, 9 OAL hastasını doksisisiklin ile tedavi etmiş ve biri dışında tüm hastalarda hastalığın gerilediğini duyurmuşlardır. Bu deney sonucunda, OAL hastalığının birinci basamak tedavisinde doksisisiklinin kullanılabileceği fikri ortaya atılmıştır (67). Daha sonra bu deneyin devamı olarak aynı grubun yaptığı sonraki çalışmada *C. Psitacci* DNA'sının Doksisisiklin ile tedaviye cevaptaki etkisi değerlendirilmiştir. Sonuç olarak doksisisiklinin, antimikrobiyal etkiden bağımsız bir mekanizma aracılığıyla hem *C. Psitacci* DNA pozitif OAL hastalarında hem de *C. Psitacci* DNA negatif OAL hastalarında etkili bir tedavi yöntemi olacağı önerilmiştir (68).

Doksisisiklin ile fareler üzerinde yapılan bir in-vivo çalışmada göğüs ve pankreas kanserinin kemik metastazı üzerinde tümör gelişimini belirgin olarak azalttığı gösterilmiş olsa da, son dönemde klinik çalışma olarak bu kanserler üzerinde hiçbir veri elde edilmemiştir (59).

Tüm bu araştırmalar tetrasiklinlerin kabul edilebilir yan etkileriyle birlikte tümör anjiyojeneziyi inhibe etme mekanizmaları bakımından kemoterapötik ajanlar içinde değerli bir ilaç grubu olma potansiyeline sahip olduklarını göstermektedir. Preklinik çalışmalar,

tetrasiklinlerin ilgili tümör MMP'lerinin birçoğunu inhibe etme yeteneğine sahip olduklarını göstermektedir. Ancak günümüzde çok az sayıda klinik çalışmada aynı etki gösterilebilmiştir (186) .

1.4.4. **DOKSİSİKLİNİN MMP'LER VE KANSERLE İLİŞKİSİ**

Doksisisiklin, antibiyotik aktivitesinin yanında MMP sentezini inhibe ederek tümör tedavisinde kullanılabileceği bilinen ve dental tedavide FDA tarafından onaylanmış tek MMP inhibitörü olan ilaçtır (200,218) . Periodontik tedavideki olumlu etkilerinin yanı sıra (82) meme kanserinde MMP-2 ve -9'un jelatinolitik aktivitesini, proliferasyonu, kemiğe metastazı azalttığı bilinmektedir (71,193). Ayrıca Rubins ve arkadaşları doksisisiklinin malign mezoteliyal proliferasyonu inhibe edebileceğini savunmuş (190), Onoda ve arkadaşları ise doksisisiklinin kolorektal hücre hatlarındaki invazyonu inhibe ettiğini göstermişlerdir (165) . Prostat kanserinde ise tümör hücresinin proliferasyonunu, invazyonunu ve metastazını inhibe ettiği gösterilmiştir (139) . Tüm bu bilgiler ve artan veriler doğrultusunda, doksisisiklinin MMP-2 ve -9 inhibisyonu yaptığı bilinmekte ve iyi bir MMP inhibitörü olduğu düşünülmektedir.

Günümüzde metastatik hastalıkların tedavisi için doksisisiklin kullanılan deneyler sınırlandırılmış olsa da doksisisiklinin primer kanser çeşitlerinden cilt metastazları üzerindeki etkinliğini kanıtlayan küçük bir çalışma mevcuttur. Japonya'da 7 hasta üzerinde yapılan bu çalışmada, doksisisiklinin intratümoral olarak uygulanması sonucunda, 6 hastada histolojik olarak düzelme görülmüştür. Ancak bu deney tekrarlanmamıştır (164,186) .

Doksisisiklinin antimikrobiyal dozunun altında bir doz uygulaması ile tedavi edilmesi ile ilgili olarak, "lenfanjiyomiyomatoz"lu 66 yaşında bir hastadaki dramatik hastalık gelişimi incelenmiştir. Bu hastalık, akciğer fonksiyonlarının artan şekilde kaybına neden olan akciğer parankimasını parçalayan anormal düz kas proliferasyonu ile karakterizedir. Ayrıca üreme çağındaki kadınlarda etki gösterme eğiliminde olan nadir bir akciğer hastalığı olarak

bilinmektedir (96). Akciğer dokusunda gerçekleşen bu parçalanmanın, benzer mekanizma ile gerçekleşen tümör invazyonunda olduğu gibi, MMP-2 düzeyindeki aşırı artıştan kaynaklandığı savunulmuştur. Bu çalışmanın sonucunda da FEV1 değeri (zorlu bir ekspirasyonun 1. saniyesinde çıkarılan gaz volümü değeri) 0.48 (yaklaşık %21) olan hastanın, 6 aylık (maksimum 100mg ile) tedavisi sonrasında bu değerinin 0.91'e yükseldiği (tahminen %35) gösterilmiştir. Bu artış hastanın konuşmasında düzelme ve yaşam kalitesinde belirgin bir iyileşme göstermesi ile birlikte gerçekleşmiştir. Lenfanjiyomiyomatoz malignan bir hastalık olmasa da, bu çalışma klinik olarak doksisisiklinin MMP aktivesini inhibe ederek hastalık gelişimini kontrol altına aldığı görülmüştür anlamında değerli bir çalışma olmuştur (153). Ayrıca bu çalışma ile, doğru sistem uygulandığı zaman tetrasiklinlerin antimikrobiyal olmayan özelliklerinin gerçekten terapötik yarara sahip olabileceği de gösterilmiştir.

Tüm bu bilgilere rağmen Doksisisiklin'in MMP inhibisyon mekanizması hala kesin olarak anlaşılmamıştır. Ancak yapılan çalışmalar doğrultusunda, kesin olmamakla beraber doksisisiklinin bu etkisini şu mekanizmalardan biri aracılığı ile gerçekleştiriyor olabileceği düşünülmüştür:

- Doğrudan enzimle ilişkili Zn^{+2} veya Ca^{+2} 'ya bağlanarak aktif bölgeyi bloke ediyor olabilir.
- Aktivasyon esnasında proenzimi, parçalanmaya yatkın hale getiren yapısal değişikliklere indüklüyor olabilir.
- MMP mRNA transkripsiyonu inhibe ediyor olabilir.
- Ya da ekstrasellüler aktivasyon sırasında pro-MMP zimojeni parçalıyor olabilir (81).

1.5. ***NF-kB (NÜKLEER FAKTÖR KAPPA B)***

Hücre ölümünü yöneten sinyal yolları, normal doku gelişimi, homeostaz ve hücre fonksiyonları için kritik öneme sahiptir. Önemli patolojik durumlarda, hücre yaşamı ve ölümü arasındaki hassas dengenin regülasyonu bozulur. Dengesi bozulan hücrelerin ölmesi

durumunda dejenerasyon, immün yetersizlik ve kısırlık gibi rahatsızlıklar baş gösterirken, diğer taraftan daha az sayıda hücre ölümünün meydana gelmesi durumunda ise otoimmün hastalıklardan kansere kadar değişen farklı grup hastalıklar meydana gelebilmektedir (60). Hücrelerin yaşam ile ölümü arasında belirleyici role sahip bu denli önemli regülatörlerinden biri de NF-kB sinyal yolağıdır.

NF-kB; stres, sitokinler, serbest radikaller, UV radyasyon, okside LDL, bakteriyel ya da viral antijenler gibi çeşitli uyarılara karşı verilen hücresel yanıt ve inflamasyon ile ilişkilendirilen, neredeyse bütün hayvan hücre tiplerinde bulunan, bir transkripsiyon faktörü ailesinin kompleks proteinidir (142). Sitoplazma içinde inhibitör alt ünitesi I κ B ile birlikte inaktif halde bulunur. İnflamatuvar medyatörlerin "I κ B Kinaz"ı (IKK) N terminalinden fosfatlayarak aktive etmesi sonucunda NF-kB sinyal yolağının aktivitesi tetiklenir. Aktive olan IKK, I κ B'nin ubiquitinasyonuna, sonrasında da yıkımına yol açar. Böylece kompleksten serbestleşen NF-kB alt ünitesi nükleusa transloke olarak mRNA transkripsiyonunu teşvik eder (12). NF-kB bu mekanizma ile, hücre proliferasyonu, anjiyogenez, metastaz, tümör gelişimi, inflamasyon ve apoptozun baskılanması gibi kanser patojenezine önemli katkı sağlayan çeşitli hücresel süreçlerle ilgili genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu modüle eder (3, 142). Bu nedenle NF-kB sinyal yolağının anormal şekilde düzenlenmesi, pek çok kanser türünün gen ekspresyonunun gözlenmesi ve kansere karşı uygulanan kemoterapi ile radyoterapiye direnç gelişiminden sorumlu tutulmaktadır (12, 21).

1.5.1. YAPISI, FONKSİYONU VE DÜZENLENMESİ

1.5.1.1. NF-kB Ailesi

Memelilerde, NF-kB ailesinin 5 üyesi vardır. Bunlar; RelA (p65), RelB, c-Rel (Rel), NF-kB1 (p50; prekürsörü p105) ve NF-kB2 (p52; prekürsörü p100)'dir. Bu proteinler homo- ve heterodimerik kompleksler halinde bulunurlar (Tablo 1.6). Rel/NF-kB transkripsiyon faktörlerinin tüm üyeleri, amino terminal bölgelerinde "**kappa B**" DNA bağlanma bölgesi olarak bilinen

("Rel Homoloji Bölgesi" (RHD) de denilen), spesifik, yüksek derecede korunmuş, ortak bir DNA bağlanma/dimerizasyon bölümü taşır (142,174). Rel proteinleri, transaktivasyon özelliklerine ve sentezlenme şekillerine göre kendi içlerinde de temel olarak iki sınıfa ayrılırlar. Bunlardan ilki, RelA(p65), RelB ve c-REL proteinlerinden oluşur. Bu proteinler, olgunlaşmış şekilde sentez edilir. Amino terminallerinde DNA'ya bağlanmanın kontrol edilmesi ile dimerizasyondan sorumlu olan ve karboksil terminallerindeki transkripsiyon aktifleyici bölgeleri için gerekli olan RHD bölümü taşır. İkincisi ise NF-kB1(p105) ve NF-kB2(p105)'ten meydana gelir. Bu proteinler, büyük prekürsörler (p105 ve p100) olarak sentez edilirler. Amino terminalinde bulunan RHD'ye ilave olarak C terminallerinde "**Ankyrin Tekrar Dizileri**" taşırlar. Ubikitin aracılı proteolitik süreçle bu bölgeler yıkıma uğrar ve olgun DNA bağlanma bölgeleri (p50 ve p52) oluşur. Bu yeni ürünler de RHD bölgeleri taşırlar ancak transkripsiyon aktifleyici bölgeleri yoktur (174).

REL Homoloji Bölgesi: **5'-GGGRNYYYCC-3'**

(R: türü belirtilmemiş pürin; Y: türü belirtilmemiş pirimidin; ve N: nükleotid'tir) (3, 142).

Tablo 1.6: NF-kB gen/protein ailesinin sınıflandırılması (142).

	Sınıf I		Sınıf II		
Gen	NF-kB1	NF-kB2	RELA	RELB	REL
Protein	NF-kB1	NF-kB2	RelA	RelB	c-Rel
Diğer Adı	p105→p50	p100→p52	p65	IREL, I-REL	C-Rel
Entrez	4790	4791	5970	5971	5966
HUGO	7794	7795	9955	9956	9954
OMIM	164011	164012	164014	604758	164910
RefSeq	NM_003998	NM_002502	NM_021975	NM_006509	NM_002908
UniProt	P19838	Q00653	Q04206	Q01201	Q04864
Lokusları	Chr.4 q24	Chr.10 q24	Chr.11 q13	Chr.19 q13.2 – 19 q13	Chr.2 p13 – p12

Entrez, Biyoteknoloji Bilgisi Ulusal Merkezi'ndeki (NCBI) doğa bilimleri veritabanı numarası; **HUGO**, İnsan genom projesi numarası; **OMIM**, insana ait On-line Mendel Kalıtım Numarası;

RefSeq, Protein, RNA, DNA gibi sekansların yer aldığı, farklı organizmalara ait özet veritabanı kodu; **UniProt**, (Evrensel Protein Kaynağı) protein bilgilerinin yer aldığı katalog kodu. **Lokusları**, gen allellerinin yer aldığı kromozom ve p/q bölümleri.

Tablo 1.7: NF- κ B'nin alt üniteleri ve temel özellikleri (142) .

NF- κ B Protein Alt Ünitesi	Protein Boyutu	Aminoasit Sayısı
p50	50 kDa	940 aa
p52	52 kDa	
p65 (RelA)	65 kDa	551 aa
RelB	68 kDa	582 aa
c-Rel	69 kDa	587 aa

Tüm omurgalılarda, Rel proteinleri homodimer veya heterodimer olarak görülebilirken, RelB proteini yalnızca heterodimer formunda bulunur. NF- κ B terimi genel bir ifade olsa da en belirgin Rel/NF- κ B kompleksi olan ve dimer halde bulunan p50-RelA (p50-p65) heterodimeri için de spesifik olarak kullanılır (142) .

1.5.1.2. I κ B (İnhibitör Kappa B / NF- κ B inhibitörü) Protein Ailesi

I κ B proteinleri ailesinin 7 adet üyesi vardır: I κ B a (I κ B- α), I κ B b (I κ B- β), I κ B g (I κ B- γ), I κ B e (I κ B- ϵ), I κ B z (I κ B- ζ), Bcl-3, Cactus. Bu gruba inhibitör özellikteki prekürsör proteinler olan p100 ve p105'te dahil edilebilmektedir. p100 ve p105 proteinleri, NF- κ B dimerinin dimerizasyon domainine bağlanarak uzun silindirler oluşturan 5 ila 7 arasında değişen ankyrin tekrarlarının varlığı ile karakterize edilirler (3, 142) .

I κ B'nin kristalografik yapısı gereği, p65-p50 veya p65-c-Rel dimerlerini bağladığı bilinmektedir. Bu bağlanma gerçekleştiğinde, I κ B proteinlerinin sadece p65'in "Nükleer Lokalizasyon Sekansı"nı (NLS) maskeleyebildiği görülürken p50 proteinlerinin NLS'sinin ise erişilebilir halde kaldığı görülmüştür. NLS, I κ B-NF- κ B kompleksinin nükleus ile sitoplazma

arasında devamlı olarak gidiş gelişinden sorumludur. Sitozol ve nükleus arasındaki bu dinamik denge, I κ B'nin aktif IKK tarafından spesifik olarak fosforilasyonu ve sonrasında parçalanmaya uğramasıyla değişir (142) .

Farklı tür I κ B'ler NF- κ B proteinlerine bağlanır ve böylece oluşan yeni molekülün genellikle sitoplazma içinde kalması sağlanmış olur. Ancak istisnai olarak I κ B ailesinin bir üyesi olan Bcl-3, NF- κ B'nin p50 ve p52 alt ünitelerine bağlandığı zaman yeni molekülün transkripsiyonunu ve nükleusa lokalizasyonu uyarır (9, 142) .

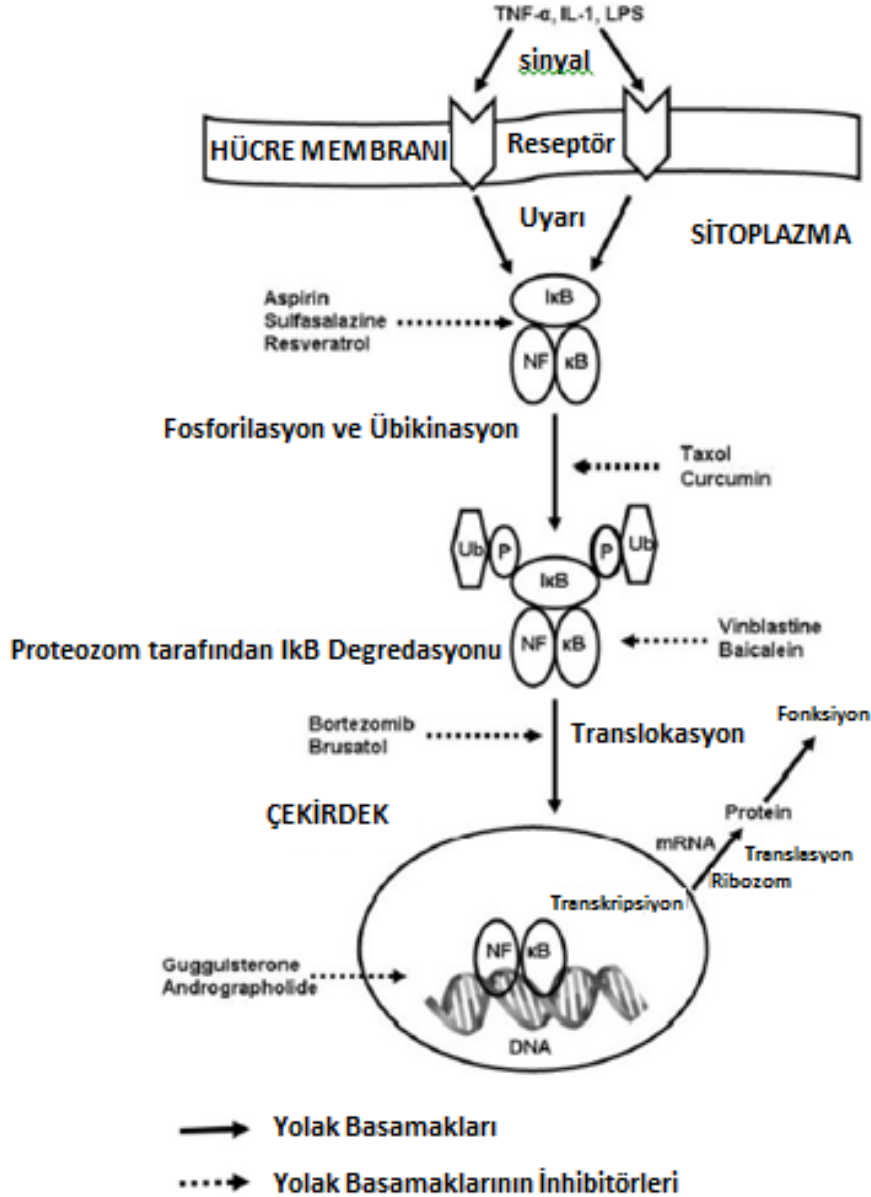
1.5.1.3. IKK (I κ B Kinaz) Protein Ailesi

IKK, IKK- α ve IKK- β olmak üzere iki katalitik alt üniteden ve NEMO(IKK- γ) adlı bir regülatör alt üniteden oluşur. Alt üniteleri kodlayan genlerin ayrı ayrı inhibisyonuna ilişkin yapılmış çalışmalar sonucunda, IKK- β ve NEMO(IKK- γ)'nın özellikle klasik NF- κ B yolağının aktivasyonu için gerekli olduğu ancak IKK- α 'nın bu yolda esansiyel bir rol oynamadığı belirlenmiştir. Buna karşılık alternatif yolda RelB-p50 ve RelB-p52'nin aktivasyonu için kesinlikle IKK- α 'ya ihtiyaç duyulduğu, ancak IKK- β ve NEMO(IKK- γ)'nın önemli bir rolünün olmadığı gösterilmiştir (2, 12) .

1.5.2. NF- κ B SİNYAL YOLAĞI

NF- κ B, iki temel yolak aracılığıyla düzenlenerek aktivite gösterir. Bunlardan birincisi, **Klasik (Kanonik) Yolak**'tır. Bu yolda temel olarak RelA-p50 dimeri yer alır. RelA-p50 dimeri, uygun stimülasyon olana kadar sitoplazmada I κ B ailesinin inhibitör proteinleri ile birleşik halde bulunur (12, 106) . Stres, serbest radikaller, UV radyasyon, okside LDL, viral antijenler, TNF- α ve IL-1 gibi inflamatuvar sitokinler, LPS gibi bakteriyel antijenler, B ve T hücrelerinin aktivasyonu gibi çeşitli uyarılarla hücrelerin uyarılması sonucunda aktivasyon gerçekleşir (8, 142, 195) . İnflamatuvar medyatörler IKK'yi N terminalinden fosforile ederek aktive eder. Bu sinyal, NF- κ B'nin kontrolünde birincil basamağı oluşturan inhibitör protein olan I κ B'nin spesifik serin

rezidülerinin (serin 32 ve 36) IKK tarafından fosforilasyonu ile devam eder. Daha sonra IκB'nin sırasıyla ubiquitinasyonu, sonrasında da proteozomlarda yıkımı gerçekleşir. Böylece kompleksten serbestleşen NF-κB alt ünitesi nükleusa transloke olarak ilgili gen mRNA'sının transkripsiyonunu teşvik eder (12, 20, 106) .

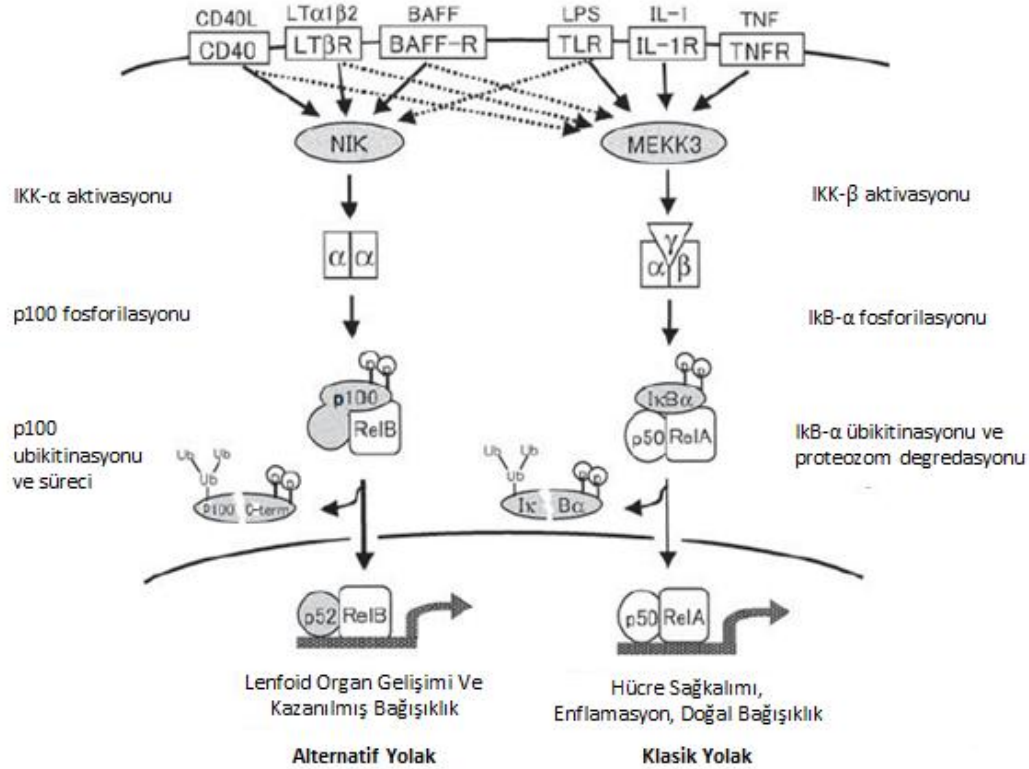


Şekil 1.13: LPS, TNF ve IL-1 ile uyarılabilen klasik NF-κB yolu ve inhibitörleri (142) .

İkinci yolak, **Alternatif (Kanonik Olmayan) Yolak**'tır. AFF(TnFSF13B), BAFF(B-hücreci Aktive Edici Faktör), CD40 Ligandı, LT β (Lenfotoksin Beta) gibi TNF süper ailesine ait daha sınırlı sayıda sitokin tarafından uyarımı gerçekleşir (37, 39). Bu yolak, klasik yolaktan farklı olarak, daha üst basamaklarında "NF-kB İndükleyici Kinaz" (NIK) içerir. NIK, fosforilasyonu sağlar ve RelB'nin temel inhibitörü olan p100'ün 26S proteozom bağımlı sürecini yönlendiren IKK- α 'yı aktifler. Bu sayede, serbestleşen RelB-p52 ve RelB-p50 nükleusa transloke olur ve DNA'ya bağlanır (50, 51, 232). Elimine edilecek I κ B'ler ubiquitin ligaz mekanizması ile belirlenir. Ubiquitin ligaz mekanizması, önce I κ B'nin poliubikitinasyonunu daha sonra da parçalanmasını sağlar (115, 142) (Şekil 1.14).

Klasik yolakta olduğu kadar alternatif yolağın aktivasyonu da IKK kompleksi ve onun alt üniteleri tarafından I κ B inhibitör proteinlerinin fosforilasyonuna dayanmaktadır. Klasik yolak için primer inhibisyon işlevini I κ B- α yaparken, alternatif yolak için bu işlevden p100 prekürsör protein sorumlu tutulur (12, 79) (Şekil 1.14).

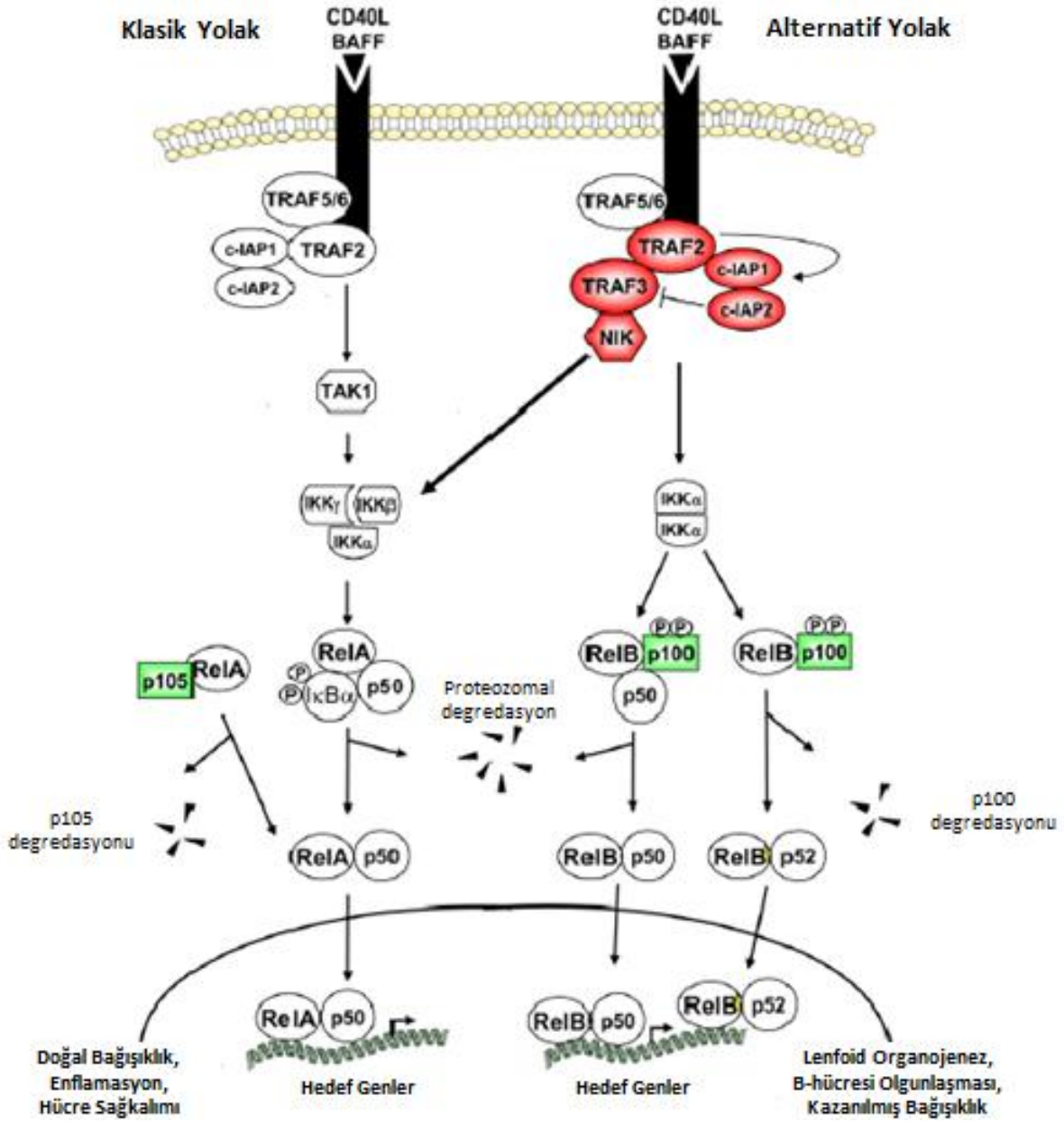
Alternatif yolağın işlevi ile ilgili şimdiye kadar yapılan tüm çalışmalardan çıkarılan en önemli sonuç, B hücrelerinin olgunlaşması, sağ kalım, sekonder lenfoid organların gelişimi, organizasyonu ve fonksiyonunda kritik role sahip olduklarının belirlenmesi şeklinde olmuştur (20).



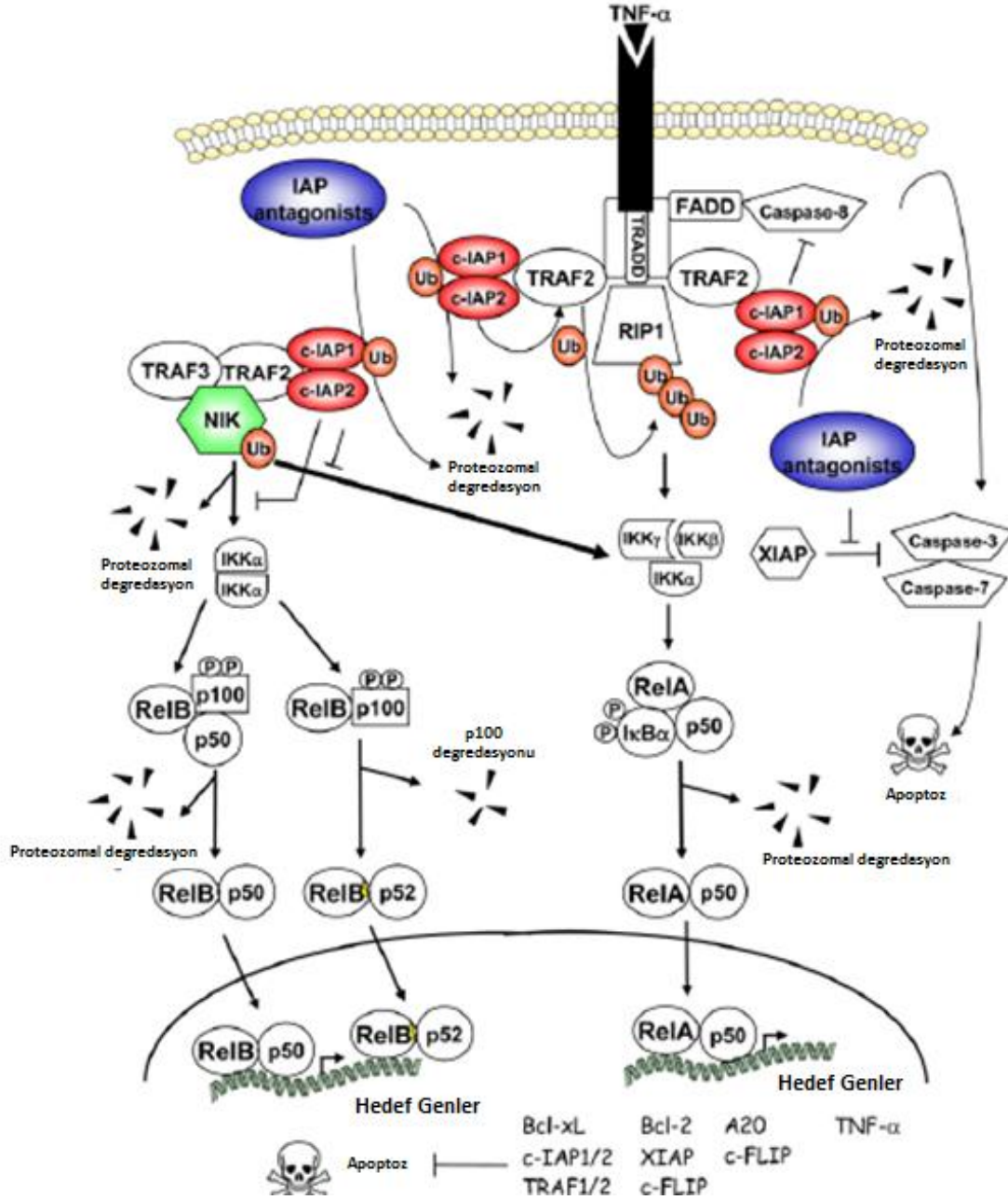
Şekil 1.14: Farklı reseptör aracılı klasik ve alternatif NF-κB sinyal yolağı (162) .

Aktif hale gelmiş NF-κB daha sonra iyi şekilde organize olmuş çoklu feedback mekanizmalarla down-regüle edilebilir. Bu amaçla yeni sentezlenmiş IκB proteinleri kullanılır. Sentezlenmesi tamamlanan IκB proteinleri, nükleustaki NF-κB'ye bağlanır ve onu tekrar sitozole taşır (20) .

Klasik ve alternatif yollar araştırmacılar tarafından genellikle birbirinden ayrı olarak değerlendirilse de son zamanlarda yapılan çalışmalar doğrultusunda birbiriyle etkileşim gösterebileceğine de işaret edilmektedir. Bunlardan farklı ajanlarla uyarım yapılmış bir çalışmada NIK'in klasik yolağa da dolaylı olabilecek etkisinden bahsedilmiştir (12) (Şekil 1.15-1.16).



Şekil 1.15: Farklı indüksiyon ajanları ile klasik ve alternatif NF-κB sinyal yolağı (12).
c-IAP: hücresel apoptoz proteini inhibitörü, TRAF: TNF reseptör ilişkili faktör.



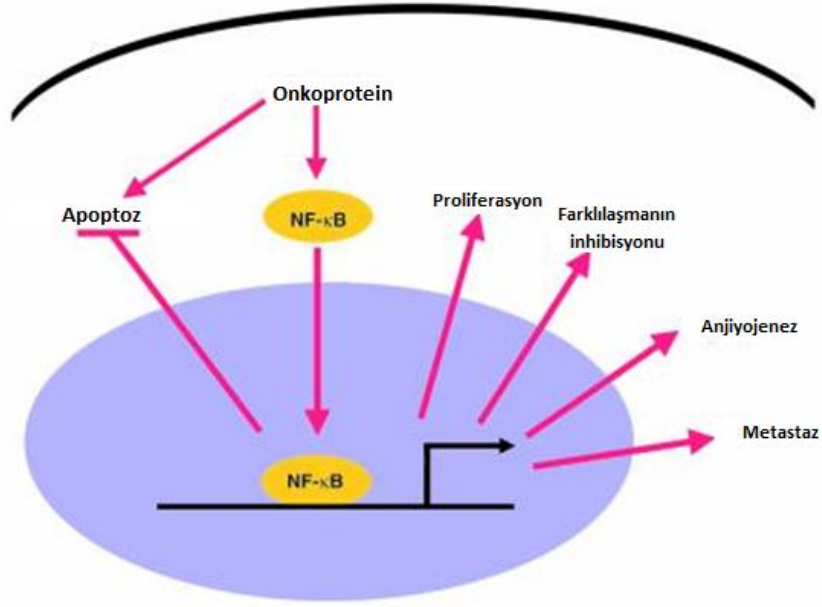
Şekil 1.16: TNF-α aracılı anti-apoptotik ile apoptotik etkinin oluşumu ve alternatif NF-κB sinyal yolağının klasik yolağa etkisi (12). Oklar aktivasyon basamaklarını, ucu kapalı barlar inhibisyon basamaklarını göstermektedir. c-IAP, hücrel apoptoz proteini inhibitörü; IAP antagonists, hücrel apoptoz proteini inhibitörü antagonistleri; IκB, NF-κB inhibitörü; IKK, IκB Kinaz; NIK, NF-κB-indükleyici kinaz; RIP, Reseptör interaktif protein; TNF-α, Tümör nekroz faktör-alfa; TRADD, TNF-reseptör ilişkili ölüm domaini; TRAF, TNF-reseptör ilişkili faktör; Ub, ubiquitin.

1.5.3. NF-kB SİNYAL YOLAĞININ ÖNEMİ

NF-kB alışılmışın dışında ve hızlı regülasyonu, kendisini kontrol eden geniş yelpazeli genlere sahip olması, immünolojik süreçte merkezi rol oynaması, alt-ünitelerinin kompleksliği ve birçok hastalıkla ilişkilendirilmesi gibi nedenlerden dolayı günümüzde hala pek çok araştırmacının ilgi odağı halindedir (8, 80) .

NF-kB transkripsiyon faktörleri, hem apoptoz hem de nekroz aracılığıyla programlanmış hücre ölümlerinin majör regülatörü olarak bilinmektedir. Bu bağlamda, normal insan hücrelerinde NF-kB aktivitesinin immün, hepatik, epidermal ve sinir sistemlerinin de dahil olduğu pek çok hücre sisteminin fizyolojik fonksiyonları, homeostazi ve normal doku gelişimi için önemli bir araç olduğu düşünülmektedir (60) . Ancak NF-kB transkripsiyon faktörleri stres, sitokinler, serbest radikaller, ultraviyole radyasyon, okside LDL ve bakteriyel veya viral antijenler gibi uyarılarla karşılaştıklarında hücresel bir yanıt oluşumu sürecinde de rol alırlar. Dolayısı ile bu faktörlerin çeşitli uyarımlar sonucunda meydana gelen inflamasyon, otoimmün hastalıklar, septik şok, viral enfeksiyon, hatasız immün yanıtın gelişimi, sinaptik plastisite süreçleriyle ve hafızayla da ilişkili olduğu belirtilmiştir. (60, 148) . Tüm bunlara karşın NF-kB tarafından programlanmış hücre ölümünün devamlı şekilde gelişen anormal regülasyonunun, nörodejenerasyondan kansere kadar değişen pek çok patolojik sonuç doğurabileceği de belirtilmiştir (60, 116) . Yapılan çalışmalarda artrit, kronik inflamasyon, astım, nörodejeneratif hastalıklar, kalp hastalıkları ve kanser gibi hastalık gruplarında yapısal IKK aktivasyonuna bağlı olarak bu transkripsiyon faktörlerinin devamlı olarak aktif halde olduğunun gösterilmesi bu fikri desteklemiştir (60, 142) . Bu hastalık gruplarında NF-kB'nin programlanmış hücre ölümünü regüle etmek yerine, aktivitesini etkin olan apoptozu önlemek amacıyla kullandığı belirlenmiştir (9, 60) . Ancak genellikle antiapoptotik ve antioksidan etkili proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonlarını sağlayarak hücreleri koruma özelliğine sahip NF-kB'nin, apoptoz ve nekrozdaki rolü farklı hücre türüne göre belirgin şekilde değişebildiği belirtilmiştir. Bazı durumlarda hücre

ölümünü uyaran stimölasyona karşı hücreleri duyarlı hale getirebildiği de gösterilmiştir. NF-kB'nin apoptoz gelişimini sağlayan ve bloke eden bu iki zıt etkisinin, ölümü indükleyen stimulusa ve hücre tipine bağlı olarak değiştiiğine karar verilmiştir (60) . Bu iki etkinin görülebildiği duruma örnek olarak, sinir sistemine ait nöronlar gösterilmiştir. Bu hücrelerde NF-kB aktivasyonu genellikle koruyucu yönde olmasına rağmen; reaktif oksijen türleri, ekzotoksinler ve proinflatuvar sitokinlerin üretiminden dolayı mikrogliyalarda meydana gelen NF-kB aktivasyonunun ise nöronları apoptoza götürdüğü belirtilmiştir (148) . Yine de günümüzde anormal NF-kB regölasyonu büyük oranda hem solid hem de hematopoetik malign özellikteki (Hodgkin lenfoma, multipl myelom, primer mediastinal B-hücreli lenfoma, tedaviye dirençli diffüz büyük B-hücreli lenfoma, çocukluk dönemi akut lenfoblastik lösemi, göğüs, prostat, over, akciğer, kolon, böbrek ve beyin kanseri gibi) pek çok kanser türüyle ilişkili tutulduğu için aydınlatılması gereken önemli bir araştırma konusu olarak görölmektedir. Tümör hücreleri üzerinde yapılan pekçok deney, yapısal olarak IKK aktivasyonuna bağlı olarak NF-kB'nin devamlı olarak aktive halde olduğunu da gösterilmesi ile bu fikri desteklemiştir (60,142) . Ancak tümör hücrelerindeki NF-kB'nin bu yapısal aktivasyonun nedeni hala tamamen anlaşılamamıştır. Bununla birlikte yapısal NF-kB yolağını yöneten kaskadların da bir tümör çeşidinden diğesine farklılık gösterebildiği bilinmektedir. Günümüzde NF-kB ile diğere transkripsiyon faktörleri arasındaki ilişki görece daha iyi şekilde açıklmış olsa da farklı çeşit tümörlere ait yapısal NF-kB aktivasyon kaskadlarından bir kısmı açığa çıkarılabilmektedir (2) . Tüm bu gerekçeler, özellikle kanser sürecinde bu denli aktif rol aldığı bilinen NF-kB sinyal yolağının daha iyi aydınlatılmasına olan gereksinimi açık şekilde göstermektedir.



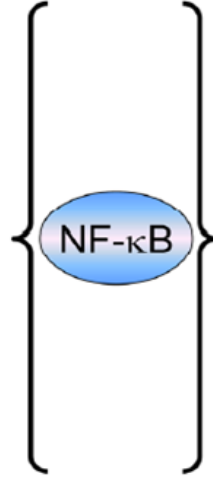
Şekil 1.17: Onkogenjenlerce uyarımda ve kanser kemo ve radyorezistansında NF-κB'nin rolü (9). NF-κB'nin aktivasyonu apoptozu bloke eder, hücre proliferasyonunu uyarır, potansiyel olarak farklılaşmayı bloke eder ve hücreyi metastaza götürür.

1.5.4. NF-κB VE KANSER İLİŞKİSİ

İnsanda kanser gelişimiyle birlikte farklılaşma görülen önemli sinyal yollarından biri de IKK/NF-κB sinyal yolağıdır. Solid tümör veya hematopoetik kanserli olgularda anormal NF-κB regülasyonu olduğunun görülmesi, araştırmacıları bu yolak ile kanser süreçlerinin gelişimi arasında ilişki kurmaya itmiştir (12, 174) (Şekil 1.18).

HEMATOLOJİK
MALİGNİTELER

Multipl Miyeloma(MM)
Mantle hücreli Lenfoma(MCL)
Mukoza ilişkili lenfoid doku (MALT) Lenfoma
Diffüz Büyük B-hücreli Lenfoma
Hodgkin Lenfoma (HL)
Miyelodisplastik Sendrom
Yetişkin T-hücre Lösemisi
Akut Lenfositik Lösemi (ALL)
Akut Miyeloid Lösemi (AML)
Kronik Lenfositik Lösemi (CLL)
Kronik Myeloid Lösemi (CML)

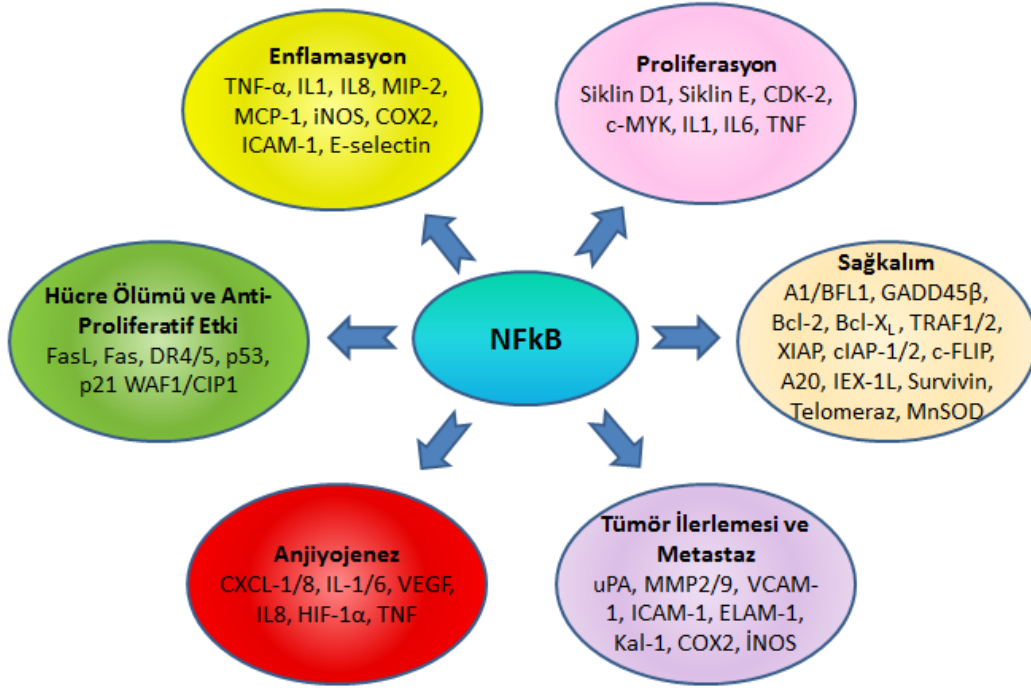


SOLİD TÜMÖRLER

Prostat Kanseri
Göğüs Kanseri
Serviks Kanseri
Böbrek Kanseri
Akciğer Kanseri
Karaciğer Kanseri
Kolon Kanseri
Pankreas Kanseri
Özofagus Kanseri
Mide Kanseri
Yutak Kanseri
Tiroid Kanseri
Paratiroid Kanseri
Melanom
Mesane Kanseri
Cylindroma
Skuamoz Hücre Karsinomu (Deri)
Skuamoz Hücre Karsinomu (Baş ve Boyun)
Ağız Karsinomu
Endometriyum Karsinomu
Ovaryum Kanseri
Retinoblastoma
Asitrositoma/Glioblastoma

Şekil 1.18: NF-κB'nin yapısal aktivasyonu ile ilişkili olan farklı kanser türleri (12) .

NF-κB aktivasyonu; proliferasyon, anjiyogenez, metastaz, inflamasyon ve apoptoz baskılanmasında görev alan genlerin transkripsiyonunu etkilemesi nedeniyle, kanserli doku ve hücre hatlarının tümünde görülen 6 belirgin özelliğin tamamından sorumlu tutulmaktadır (12) (Şekil 1.19).



Şekil 1.19: Kanseri oluşum ve gelişiminden sorumlu tutulan NF-kB'nin hedef genleri (12).

IKK/NF-kB aktivasyonunun genetik anlamda bloke edildiği fare modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda, özellikle inflamasyon ilişkili kanserlerde NF-kB'nin kritik role sahip olduğuna işaret edilmiştir (88, 114, 127).

NF-kB'nin belirlenmiş en önemli özelliği, kötü huylu ve normal hücrelerin her ikisinde de apoptoz mekanizmasını inhibe eden ürünler oluşturan hedef genlerin indüksiyonunu sağlayarak hücre sağ kalımını düzenlemesidir. Ayrıca, antioksidan proteinleri kodlayan genlerin uyarılması aracılığıyla programlanmış nekrozdan korunmada da önemli role sahiptir (12). Tümör hücrelerinin radyoterapi ve kemoterapi tedavilerine karşı direnç geliştirmesinin de sıklıkla NF-kB aracılığıyla olduğunun anlaşılmasından sonra, NF-kB aktivasyonunun inhibisyonu geleneksel

antikanser tedavilerin etkinliğinin geliştirilmesi için umut verici bir seçenek olarak görülmeye başlanmıştır (2, 12) .

Tüm bu gerekçeler nedeniyle, farklı moleküllerin kullanımıyla NF-kB aktivasyonunun ve dolayısı ile NF-kB'den etkilenen genlerin ekspresyonu aracılığıyla gerçekleşen proliferasyonun, anjiyojenezin, invazyonun inhibe edilmesi ve apoptozun uyarılabilmesiyle ilgili çalışmalar da yapılmaya başlanmıştır (131, 202) .

1.5.4.1. Onkojenezde NF-kB Ekspresyonu

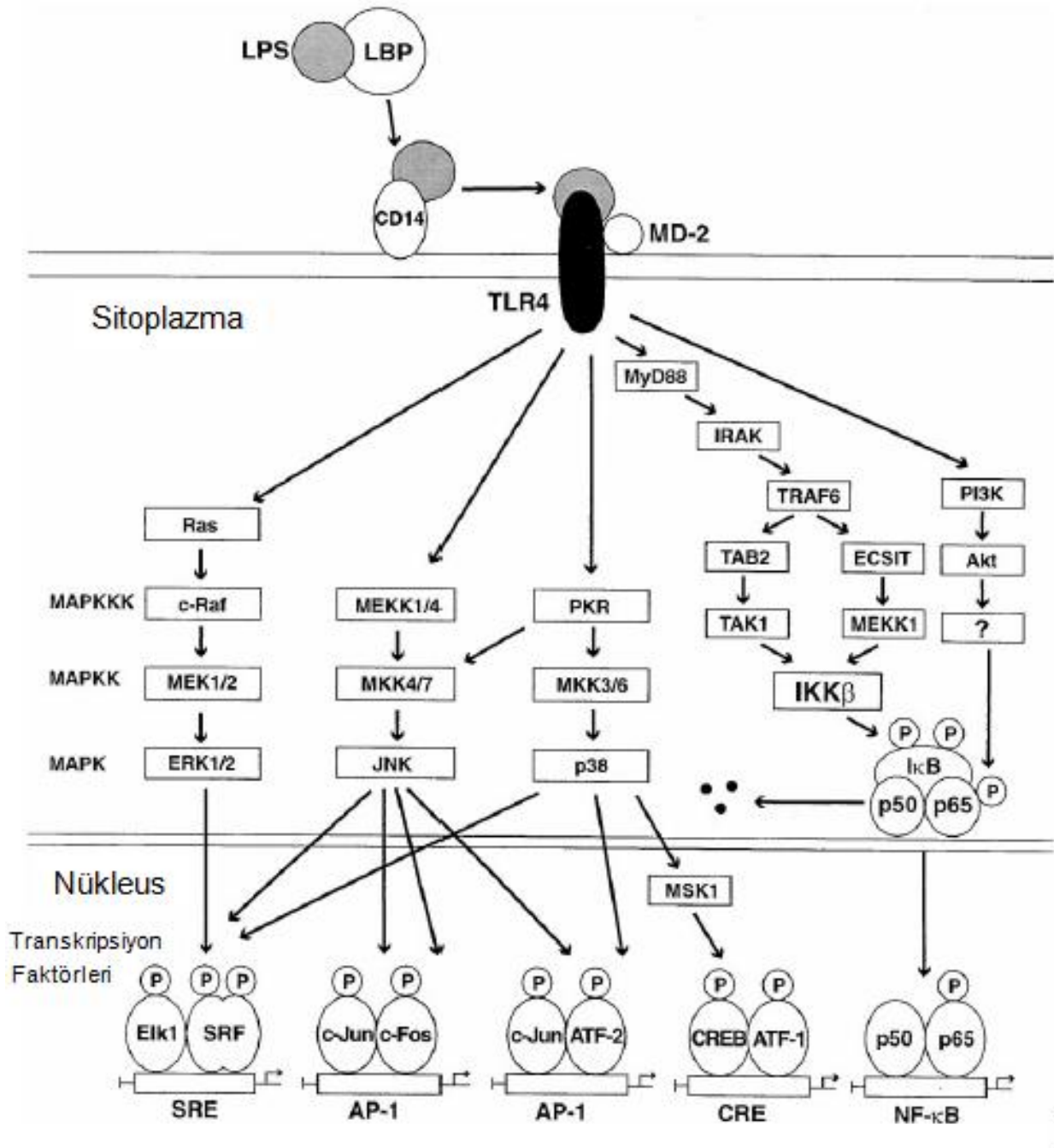
Onkojenezde NF-kB'nin rol aldığına dair ilk veriler, tavuklarda agresif tümör oluşumuna neden olan c-Rel proteininin aşırı onkojenik viral homoloğu olan “v-Rel” ile yapılan çalışmalara dayanmaktadır (182) . Bu çalışmalarda kanserle daha yakından ilişkili olduğu düşünülen genlerin c-Rel, NF-kB2 (p100/p52) ve Bcl-3 proteinleri tarafından kodlandığı düşünülmüştür. Bu genlerin amplifikasyon veya yeniden düzenlemeyi sağlayan genom bölgesinde lokalize olduğu bilinmektedir. Örneğin Bcl-3 geninin, B hücreli kronik lenfositer lösemilerin oluşumunda meydana geldiği, t(14,19) (q32;q13.1) olarak kromozomal translokasyon yaptığı, B hücreli neoplazmada ekspresyon düzeyinde artış oluşturduğu bilinmektedir. NF-kB2 ile ilişkili olan t(10,14) kromozomal translokasyonun B hücreli hodgkin dışı lenfoma ve diğer lenfomalarda etkili olduğu saptanmıştır. Kromozomal translokasyondan bağımsız olarak NF-kB'yle hücresel farklılaşmayı ilişiklendiren başka bulgular da vardır. NF-kB, farklılaşma oluşturan viral proteinler tarafından da aktive edilebilir. rnek olarak, T hücreli lösemi virüsü I (HTLV-I)'in Tax proteininin transkripsiyonel olarak NF-kB'yi arttırdığı belirlenmiştir. Buradan Tax'ın IKK kompleksi aracılığıyla doğrudan etkileşim yaparak NF-kB'yi aktive ettiği gösterilmiştir. Sonuç olarak NF-kB'nin bu aktivasyonunun sıçan fibroblastlarında Tax aracılı farklılaşmanın gerçekleştirilebilmesi için gerekli olabileceği görülmüştür (9) .

Onkojenezde NF-kB'nin rol aldığını destekleyen bulgular, doğrudan NF-kB yolağının incelendiği pek çok deney sonucunda gösterilmiştir. IκB-α'nın modifiye bir formu olan "süper represör IκB-α"nın ekspresyonu veya IKK'nin genetik olarak susturulması aracılığıyla yapılan NF-kB inhibisyonunun, Ras tarafından uyarılmış değişimleri de bloke ettiği gözlenmiştir. NF-kB'yi aktive eden onkojenik bileşik bir protein olan Bcr-Abl ile süregelen tümörjenezin de "süper represör IκB-α" ile bloke edilebildiği belirlenmiştir (9) .

Bazı kanser türlerinde NF-kB'nin durumu ve blokasyonunun sonuçlarına bakıldığında; hodgkin lenfomada NF-kB'nin aktive edildiği, inhibisyonunun ise lenfoma hücrelerinin büyümesini bloke ettiği görülmüştür (11) . Baş ve boyun skuamoz hücreli karsinom hücrelerinde NF-kB fonksiyonunun bloke edilmesinin, ksenograf tümör büyümesini inhibe ettiği anlaşılmıştır (57) . Sovak ve arkadaşları göğüs kanseri hücre hatlarında ve bazı tümörlerde özellikle NF-kB'nin klasik formunun (p50-p65) nükleusta lokalize olarak aktive olduğunu belirtse de (207) Baldwin ve arkadaşları insan göğüs kanserlerinde p65 aktivasyonundan çok, c-Rel ile birlikte Bcl-3 ve nükleer p52'nin aşırı ekspresyonunun rol oynadığını savunmuştur (9) .

1.5.4.2. NF-kB'nin Onkoproteinler ile Regülasyonu

NF-kB'nin aktive edilmiş hücrel onkoproteinler tarafından düzenlenmesi hakkındaki 2000 yılı öncesinde yapılan araştırmalar sadece Ras ve Raf üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalarda, Ras aracılığıyla uyarılan NF-kB'nin Raf'la ilişkili ya da ilişkisiz aktivasyonunun gerçekleşebileceği (9,30) , bu aktivasyon kaskadında p38 kinaz (163) ve PI3K/AKT (30, 144) gibi diğer proteinlerin aracılığıyla da IKK üzerinden etkinin oluşabileceğini gösteren açıklamalar yapılmıştır. Prostat kanserinde, Ras'ın yapısal olarak aktif olan NF-kB aracılığıyla da etkisini gösterdiğine dair çalışmalar vardır (3) .

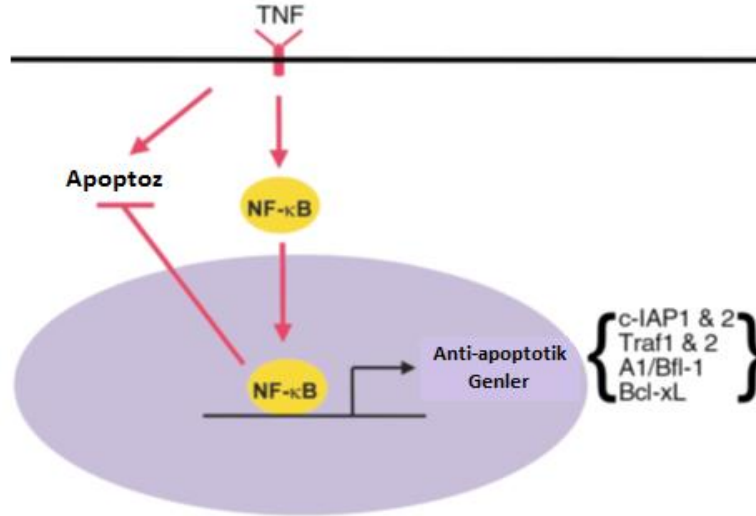


Şekil 1.20: LPS aracılı sinyal iletimi sonucunda etkilenen gen aileleri ve NF-κB sinyal yolağına etki eden proteinler (90) .

NF-kB'yi aktive eden başka onkojenik bileşikler de vardır. Bunlardan T hücreli lösemi virüsü (HTLV-1) kökenli "Tax" onkoproteininin IKK'ye bağlanarak kısmen NF-kB'yi aktivite ettiği ve NF-kB'nin nükleer translokasyonunu stimüle ettiği belirtilmiştir (35). Göğüs kanserinde amplifiye edilen ve bu kanserin önemli bir bölümünde aktif olan "Her2/Neu" isimli onkoprotein, AKT protein kinazı stimüle ettiği ve bu mekanizma ile NF-kB'ye bağlı gen ekspresyonlarını aktive ettiği anlaşılmıştır (238). Kronik myeloid lösemide yer alan Bcr-Abl bileşik onkoprotein de nüklusa translokasyonunu stimüle ederek ve transaktivasyon fonksiyonunu arttırarak NF-kB'yi aktive ettiği bildirilmiştir (185). Tümörjenezde aracılık eden **c-myc**'in da NF-kB tarafından regüle edildiği bilinmektedir (3). Büyüme faktörleri ile NF-kB aktivasyonunun, c-myc ekspresyonu aracılığıyla uyarılan apoptotik yanıtı da baskılayabileceği gösterilmiştir. Ancak NF-kB tarafından düzenlenen anti-apoptotik mekanizmalardan hangisinin bu fonksiyona yol açtığı hala belirsizliğini korumaktadır. Ayrıca, pek çok kanser türünde **IAP** (Apoptoz protein inhibitörleri) ailesine ait anti-apoptotik proteinlerin regülasyonunun bozulmuş olduğu ve bunun NF-kB aracılığıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (9). Bunlara ek olarak değişimi uyarılmış hücrelerde NF-kB'nin, apoptozu inhibe eden, hücre döngüsünde S fazına ilerlemeyi sağlayan ve Rb (Retinoblastoma) hiperfosforilasyonu ile ilişkili olan **Siklin D1**'in transkripsiyonunu artırarak hücre büyümesini tetikleyebileceği anlaşılmıştır. Siklin D1'in insan tümörlerinin bir kısmında upregüle halde bulunduğu tespit edilmesi bu fikri desteklemiştir (3). Bunun dışında hücre döngüsünü kontrol eden proteinlerden **CDK2 Kinaz**'in da NF-kB tarafından regüle edildiği bildirilmiştir (174). Ek olarak, onkojenezin farklı aşamalarında görevli **MMP-9, ICAM, ELAM-1, VCAM-1, VEGF, MCP-1, COX-2, NOS ve c-myb** gibi diğer gen ekspresyonlarının da NF-kB tarafından uyarıldığını gösteren pek çok çalışma yapılmıştır (3, 174).

1.5.4.3. Onkojenezde NF-kB'nin Proliferasyon ve Apoptotozdaki Rolü

NF-kB aktivasyonunun hücre ölüm yolağını baskılayabilme özelliğine sahip olduğunu ve TNF ile diğer ajanlarca uyarılmış apoptotik kaskadtan hücreleri korumak için gerekli olduğunu gösteren çok sayıda çalışma vardır (174) (Şekil 1.16). Apoptozun NF-kB aracılı baskılanmasının kaspaz 8 aktivasyonunu bloke eden (hücresel apoptoz protein inhibitörleri) c-IAP-1 ve c-IAP-2 ile (TNF Reseptör İlişkili Faktörler) TRAF1 ve 2'nin ekspresyonlarının aktivasyonu tarafından gerçekleştiğinin anlaşılmasından bu yana apoptoz transkripsiyonel bir olay olarak görülmektedir. NF-kB'nin bu etkiyi transkripsiyonel olarak Bcl-2 homologları A1/Bfl-1 ile Bcl-xL, IEX-1 ve XIAP gibi diğer antiapoptotik genleri aktive ederek yaptığı bilinmektedir (9, 12) (Şekil 1.21).



Şekil 1.21: TNF ve diğer uyarılarla gerçekleşen NF-kB indüksiyonunun apoptozu baskılayan genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu yönetmesi (9). Genler tarafından kodlanan proteinler, apoptozu bloke etmek üzere kaspaz kaskadında farklı düzeyde fonksiyon gösterirler.

NF-kB'nin, kesin olarak hücre büyümesi, apoptozun bloke edilmesi gibi onkojenezin pek çok yönüne etki ederek **anti-apoptotik etki** gösterdiği düşünülse de, onkojenezden koruyucu ve apoptozu indükleyici (**pro-apoptotik**) etkili olabileceğini savunan çalışmalar da mevcuttur (174). Şimdiye kadar yapılan çalışmalar neticesinde NF-kB'nin pro-apoptotik olarak rol oynadığı hücrelere örnek olarak B hücresi, T hücresi, nöral hücreler, göğüs hücreleri ve epitelyal hücreler gösterilmiştir (9,174). Von Von Hogerlinden ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, deri hücresinde aşırı eksprese edilmiş I κ B- α ile NF-kB'nin inhibe edilmesinin skuamöz hücre karsinomuna yol açtığı ancak aynı zamanda apoptozu da arttırdığı belirtilmiştir. NF-kB ve IKK- α 'nın deri farklılaşmasını kontrol edebileceğinin ileri sürülmesinden sonra, NF-kB'nin bazı formlarının kaybının onkojenezi geliştirebileceği düşünülmüştür (3). Dajee ve arkadaşları da NF-kB inhibisyonunun invaziv insan epidermal neoplazisini tetikleyeceğini savunmuştur (44). Bununla birlikte, göğüs kanserinde görülen NF-kB aktivasyonunda p50, p52 ve Bcl-3'ten oluşan bir kompleksin bu etkiden sorumlu olabileceği belirtilmiştir (9). Kasibhatla ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, T hücre aktivasyon sinyallerine veya kemoterapötik ajanlara karşı NF-kB ve AP-1'in pro-apoptotik **Fas Ligand (FasL)** proteinini indüklediği savunulmuştur. Buna bağlı olarak, NF-kB aracılığıyla upregüle olan Fas Ligand (FasL) proteinlerinin T hücrelerini uyarabileceği ve böylece T hücresi uyarımına ve bir kemoterapötik olan etopozit'e karşı apoptozun gelişebileceği belirtilmiştir. Ayrıca, İnsan kanserlerinde NF-kB transkripsiyonel aktivitesinin regülasyonun bozulmasına bağlı olarak, solid tümörlerden türemiş bazı farklılaşmış hücrelerin devamlı FasL ekspresyonu gösterdiği savunulmuştur (9). Günümüzde, tümör süpresör proteini olan **p53** ile NF-kB'nin antagonistik özellikte ve birbirine bağımlı rolleri olduğu farklı araştırma grupları tarafından açıklanmıştır. Bu proteinler arasındaki doğrudan antagonizma NF-kB'nin anti-apoptotik ve p53'ün pro-apoptotik rolü üzerine kurulmuştur. Ancak, NF-kB'nin p53 ekspresyonunu düzenleyebildiği ve hücre ölümünü uyan p53'e ihtiyaç duyduğunu gösteren çalışmalar da vardır (227). Bu etkinin mekanizması şu

şekilde açıklanmıştır: Apoptozun inhibisyonu söz konusu olduğunda NF-kB'nin transkripsiyonel koaktivatörler için, yarışma halinde olduğu düşünülen p53 fonksiyonunu antagonize edebileceği belirtilmiştir (227). Ancak buna zıt olarak, p53'ün bazı olaylarda NF-kB aracılığıyla apoptozu uyarabileceği de gösterilmiştir (192).

Sonuç olarak, farklı NF-kB komplekslerinin büyüme ve farklılaşmayı kontrol edebildiği, bu olaylarda ise NF-kB'nin farklı alt ünitelerinin **farklı hücre tiplerine veya farklı uyaranlara göre** pro-apoptotik veya pro-proliferatif olarak farklı roller gösterebileceği fikri ortaya atılmıştır (3,174). Bununla birlikte **farklı aktivasyon kaskadlarının tipine** göre, NF-kB'nin apoptozun gelişimine yola açan proteinlerin (Fas, c-myc, p53 ve I κ B- α gibi) veya apoptozu inhibe eden proteinlerin (TRAF2, IAP proteinleri, Bcl-2 benzeri proteinler gibi) ekspresyonuna neden olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca, NF-kB aktivasyonunun farklı yollarla hücre döngüsü proteinlerini (siklin D1 ve CDK2 Kinaz gibi) ve bunların apoptozu başlatan/geliştiren diğer hücresel komponentleriyle (p300 ve p53 gibi) olan etkileşimini kontrol edebileceği bildirilmiştir (174).

1.5.4.4. NF-kB İnhibisyonu ile Kanserden Korunma ve Kansere Tedavisi

Onkogenik hale getirilmiş Ras ekspresyonunun indüklediği hücrelerde veya bazı kanser hücre hatlarında NF-kB inhibisyonunun apoptotik yanıtta artmayı sağladığının gösterilmesi ile NF-kB inhibitörlerinin tek başına kanser tedavisi veya kanser profilaksisi için etki gösterebilecek bileşikler olabileceği fikri doğmuştur (3). İlk hipotez dikkate alındığında, tek başına NF-kB inhibisyonunun anti-apoptotik diğer faktörlerin devreye girebilmesi nedeniyle, solid tümörlerde genellikle etkin sonuçlar veremeyeceği; NF-kB inhibisyonunun sağ kalım için tek yol olduğu lösemi veya (Hodgkin Lenfoma gibi) lenfomlarda terapötik olarak yarar sağlayabileceği savunulmuştur. Bu bilgi ile tutarlı olarak, NF-kB'nin kemoprolifaktik bileşikler için önemli bir hedef olabileceği belirtilmiştir. Bu bileşiklerden aspirin ve diğer steroid olmayan anti-enflamatuvar ilaçlar (NSAID) ile tedavinin yol açtığı NF-kB inhibisyonunun, özellikle kolorektal

kanser gibi belirli kanserlerin gelişimini ve ilerlemesini bloke ettiği gösterilmiştir. İlginç şekilde aspirin ve sulindak'ın birlikte kullanımının IKK kompleksinin aktivasyonunu inhibe edebileceği rapor edilmiştir. Flavonoidler, curcumin ve resveratrol gibi pek çok diyetle alınan kemoprolifaktik bileşiğin NF-kB aktivasyonunu bloke ettiği de bilinmektedir. Tüm bu çalışmalar, onkojenin erken dönemlerinde primer olarak NF-kB'nin rol oynayabileceğine işaret etmektedir (3, 9).

NF-kB'nin apoptozu inhibe edebileceğini gösteren çalışmalar, NF-kB'nin kemoterapiye ve radyasyona karşı tümör direncine neden olup olmadığını değerlendirmek için de olanak sağlamıştır. HT1080 fibrosarkom hücrelerinin iyonize radyasyona veya kemoterapötik ajan daunorubisin'e maruz bırakıldığı bir çalışmada, bu tedaviler NF-kB p65-p50 heterodimerinin güçlü bir şekilde nükleusa taşınmasını uyarmıştır. Aşırı miktarda IκB ekspresyonuna bağlı NF-kB inhibisyonu yapılan tümör hücrelerinin daunorubisin ve iyonize edici radyasyona cevabı çarpıcı şekilde arttırdığı gösterilmiştir. Nüfuz farelerde büyüyen HT1080 fibrosarkom kökenli tümörlerin bir topoizomeraaz 1 inhibitörü olan "CPT-11" ilacına direnç gösterirken, modifiye edilmiş IκB-α ekspresyonuna sahip adenovirüslerle enfekte edilmesini takip eden tedavi sonucunda tümörün ilaca cevap verdiği görülmüştür. Kolorektal tümör hücre hattı "LoVo" gibi diğer kanser hücrelerinde kombine tedavi uygulanması ile de benzer cevaplar alınmıştır. CPT-11 ve IκB'nin adenoviral türevinin kombine tedavisi ile LoVo hücre hattında kanser hücrelerinin elimine edilebileceği de görülmüştür. Burada üzerinde durulması gereken nokta, CPT-11'in sistemik kullanımı sonucunda apoptozun belirgin şekilde artmasıyla kemoterapötik etkilisini artırmasıdır (9).

Kemoterapinin türü, NF-kB'nin pro- veya anti-apoptotik olup olmamasına göre belirlenir. Örneğin, çoğu kemoterapötik ilaç DNA hasarının bazı formlarını indüklerken, bunun tersine NF-kB aktivasyonunun inhibisyonu hücreyi ölüme sürükler. Bununla birlikte günümüzde DNA stabilitesine etki etmeyen, ancak mitotik çember kontrol noktasını devreye sokan, (mikrotübül

bağlama özelliği olan ajan) Taxol aracılığıyla hücre ölümünün uyarılabilmesi için NF-kB'nin gerekli olabileceği ve ya NF-kB inhibisyonunun Taxol tarafından indüklenmiş hücre ölümünü arttırabildiği savunulmaktadır (9) .

Prostat kanseri - NF-kB ilişkisiyle ilgili olarak, prostat kanserinde NF-kB aktivasyonunun yapısal olarak uyarıldığını gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır (167, 169) . Diğer kanser türlerinde yapılan çalışmalara paralel olarak prostat kanserinde yapılan hücre kültürü çalışmaları, NF-kB aktivasyonunun anti-apoptotik proteinlerin ekspresyon artışından sorumlu olabileceğini, buna bağlı olarak da anti-tümör tedavinin etkinliğini düşürdüğünü ve malign fenotipin gelişimine yardımcı olduğunu göstermiştir (169) .

NF-kB'nin prostat kanseri hücrelerinde belirgin şekilde androjen reseptörü mRNA'sı, protein düzeyi, transaktivasyon aktivitesi, serum PSA düzeyleri ile hücre proliferasyonunda artışa neden olduğunu gösteren çalışmalar da vardır. Bunlardan Zhang ve arkadaşlarının 2009 yılında androjen ile prostat dokusundaki NF-kB ekspresyonu arasındaki ilişkiyi incelediği *in vitro* çalışmada, NF-kB inhibitörlerinin androjen reseptörlerinin ekspresyonunu, PSA sekresyonunu ve prostat kanser proliferasyonunu azalttığı bildirilmiştir (236) .

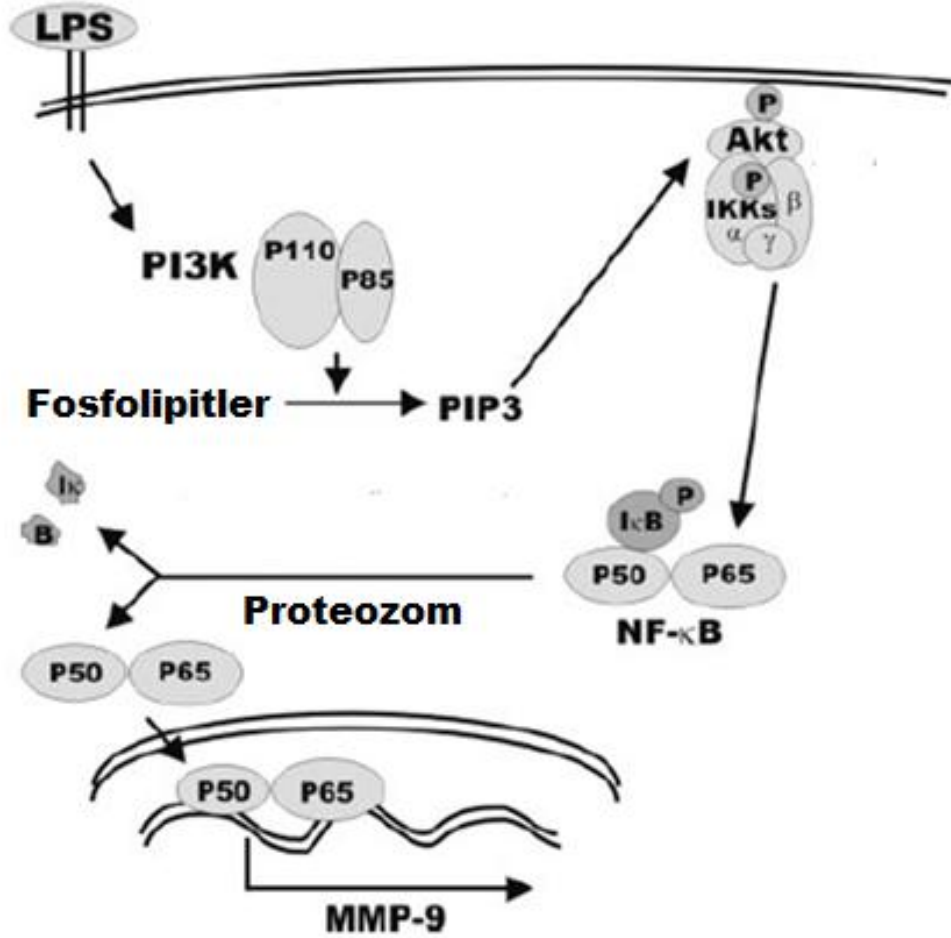
Sonuç olarak, NF-kB sinyal yolağının bloke edilmesinin çoğu tümör hücresinin antitümör ajanların aktivasyonuna daha duyarlı hale gelmesine ve/veya hücre proliferasyonunun azalmasına neden olacağı fikri günümüzde kabul görmüştür (2, 142) . Dolayısı ile NF-kB aktivasyonunu baskılama kapasitesine sahip ajanlar çeşitli yan etkilerine rağmen kanseri inhibe etme potansiyeline de sahip olarak düşünülmekte ve bu konuda umut vermektedir (142) .

1.5.5. NF-kB VE MMP İLİŞKİSİ

MMP'ler, bir DNA bağlanma bölgesi olan ve dimerizasyona izin veren korunmuş "Rel Homoloji Domaini"ne sahiptirler. MMP'lerin sekresyon ve aktiviteleri bu domain aracılığıyla dimerik transkripsiyon faktörü NF-kB tarafından düzenlenir (29) .

Günümüze kadar, NF-kB ile MMP'lerin ilişkisini gösteren pek çok çalışma yapılmıştır. NF-kB'nin MMP-9 geninin promotöründe bağlanma bölgesine sahip olan ve MMP-9 ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyonu aktifleyici bir faktör olduğu daha 90'lı yılların başında gösterilmiştir (194) . Son on yılda yapılan çalışmalarda ise NF-kB'nin bazı kanser türlerinde özellikle jelatinaz grubu olmak üzere farklı MMP'lerin ekspresyon ve aktivasyonlarındaki artışa aracılık ettiği gösterilmiştir (65,101,119) . Kim Y ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, meme kanseri hücre hattı olan MCF-7'de PMA ile protein ve mRNA düzeyinde uyarılan MMP-9 ekspresyonu ve aktivitesinin celastrol ile inhibe edildiği gösterilmiştir. Bu aktivasyon ile celastrolün NF-kB'nin nükleusa translokasyonunu, IκB'nin yıkımını ve MMP-9 promotör bölgesinde NF-kB'nin DNA bağlanma aktivitesini baskılaması nedeniyle, MMP-9'un transkripsiyonel aktivitesini inhibe ettiği düşünülmüştür (119) . Aterosklerotik plaklarla ilgili olarak fibroblast ve düz kas hücreleri üzerinde yapılan bir diğer çalışmada NF-kB'nin inhibe edilmesinin bu hücrelerde MMP-1, MMP-3 ve MMP-9 üretiminde artmayı engellediğini göstermiştir (18,19) . Bu çalışmanın devamı olarak aynı grup tarafından makrofajlar üzerinde yapılan bir çalışmada ise, *in vitro* veya *in vivo* olarak stimüle edilen makrofajların MMP-1 ve MMP-3 sekresyonlarının NF-kB aktivasyonundan kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (29) . LPS uyarımına bağlı olarak MMP-9 ekspresyonunda oluşan artışı, AKT/IKK-β aracılı NF-kB yolağıyla ilişkilendiren çalışmalar da bulunmaktadır (52,141) . Bunlardan birinde ise AKT aracılı NF-kB yolağının genistein ile inhibe edilmesi sonucunda göğüs kanseri gelişiminin durdurulabileceği öngörülmüştür (85) (Şekil 1.22). Makrofaj hücre hattı RAW264.7 hücreleri üzerinde yapılmış bir başka çalışmada, MMP-9 LPS ile indüklenmiş, saucerneol G adlı maddenin bu süreçteki etkisi, NF-kB ve MAPK yolları

üzerinden incelenmiştir. Sonuç olarak, genisteinin NF-kB DNA bağlanma aktivitesini, reporter gen aktivitesini, NF-kB'nin p65 alt ünitesinin translokasyonunu baskıladığı ve LPS uyarımı ile gerçekleşen MAPK yolağı aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (140) .



Şekil 1.22: LPS uyarımına bağlı PI3K ve AKT yolağı aktivasyonunun aracılık ettiği NF-kB aktivasyonu ve MMP-9 ekspresyonu (141) .

1.5.5.1. Prostat Kanserinde NF-kB Aracılı MMP'lerin Etkileri

Diğer kanser türlerinde olduğu gibi prostat kanserinde de MMP'lerin etkilerini NFkB aracılığıyla yaptığı konusu günümüzde hala araştırılma aşamasındadır.

NF-kB sinyalizasyonunun bloke edildiği PC-3M hücrelerinde yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, MMP-9'un mRNA düzeyinin ve kollajenaz aktivitesinin düştüğü, bu nedenle PC-3M hücrelerinde NF-kB aracılı MMP-9 ekspresyonunun oluşturduğu invazyon, anjiyogenez ve metastaz etkilerinin de inhibe edildiği belirtilmiştir (101). LPS'in prostat hücreleri üzerindeki etkisi hakkında fikir vermesi anlamında Kim HJ ve arkadaşlarının normal insan prostat epitelyal hücre hattı RWPE-1'ler üzerinde antimikrobiyal bir peptit olan "insan β -defensin" (Human Beta Defensin- HBD) ile ilgili yaptıkları çalışmalar oldukça önemlidir. LPS (10 μ g/ml ve 1sa) ile uyarılmış hücrelerden elde edilen proteinlerde fosfo-IkB- α 'nın ekspresyon düzeyinde artış meydana geldiği, IkB- α 'nın ekspresyon düzeyinin ise azaldığı gösterilmiştir (117).

Elde edilen bütün bulgular NF-kB'nin prostat kanserinin de dahil olduğu pek çok kanser türünün invazyon, proliferasyon, anjiyogenez ve metastaz süreci ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu gerekçelerle, prostat kanserinin de dahil olduğu çoğu kanser türünün profilaksisi ve/veya tedavisinde NF-kB potansiyel bir klinik hedef haline gelmiştir.

BÖLÜM II

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. *HÜCRE KÜLTÜRÜ*

2.1.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ PROTOKOLÜ

Deneylerde androjenden bağımsız insan prostat kanseri kemik metastazı hücre hattı PC-3' ler kullanılmış ve hücre hattı Oslo Üniversitesi, Biyoloji Enstitüsü'nden (Blindern, 0316 Oslo, Norveç) Prof. Dr. Fahri Saatçioğlu aracılığıyla temin edilmiştir.

2.1.1.1. Hücrelerin Dondurulması ve Çözündürülmesi

Hücre kültürü çalışmalarında hücre hatlarının korunabilmesi, pasaj sayısının ilerlemesine bağlı fenotipik ve genotipik değişimlerin önlenmesi; ayrıca bu çalışmalar sırasında güvenli olarak geriye dönebilme opsiyonunun sağlanabilmesi amacıyla hücre hatlarının kısa veya uzun süreli stoklanması gerekmektedir. Hücrelerin saklanabilmesi için en uygun yöntem -86°C veya -130°C'nin altında dondurma işlemidir. Dondurma işlemi sırasında hücrenin organellerinin korunması için dimetilsülfoksit (DMSO) ya da gliserol gibi kriyoprotektan ajanlar kullanılmaktadır (Tablo 2.1). Bu amaçla kullanılan ajanlar suda eriyebilen maddelerdir; donma sürecinde oluşan buz kristali miktarını ve elektrolit konsantrasyonundaki artışı kontrol ederek optimal değerlerin üzerine çıkmasını engellemektedirler.

Dondurma işlemi için ilk olarak hücreleri yüzeyden kaldırabilmek amacıyla; 10cm'lik kültür kapları (Tablo 2.1) için 10ml PBS (Phosphate Buffered Saline - Fosfat Tamponlu Salin) (Tablo 2.3) yıkamasının ardından 1ml %0,25 Trypsin-EDTA (Trypsin-Ethylenediaminetetraacetic acid - Trypsin-Etilendiamintetraasetik asit) (Gibco, 25200-056, ABD) uygulanır ve hücreler 37°C'de 1-2 dakika süreyle inkübatöre bırakılmıştır. Hücreler inkübatörden çıkarıldıktan sonra üzerlerine 3-4ml hazırlanan ortamdaki ilave edilmiş ve sonrasında pipetaj işlemi ile homojen hale getirilmiştir. 3500rpm'de 5dakika boyunca santrifüj edildikten sonra elde edilen hücre pelleti, üzerine %95

ortam, %5 oranında DMSO içeren solüsyonun ilavesinin ardından kriyo tüplere aktarılarak -86°C'deki derin dondurucuya kaldırılmıştır.

Donmuş olarak saklanan hücreler daha sonra çözündürülerek yeni kültürler hazırlanabilmektedir. Bu işlem esnasında ekstrasellüler ortam intrasellüler ortamdaki çözülme ve ani olarak serbest sıvı salınmakta ve sonuçta hipotonik hücreler şişerek patlamaktadır. Bu olumsuzlukların önüne geçebilmek için çözündürme işlemi olabildiğince hızlı yapılmalıdır.

Çözdürülecek olan hücreler -86°C derin dondurucudan çıkarılır çıkarılmaz 37°C'lik su banyosunda çözülene kadar (yaklaşık 1-2 dakika) bekletilmiştir. Ardından hücre kültür kabındaki 37°C'ye ısıtılmış 9 ml ortam üzerine dikkatlice pipetaj yapıldıktan sonra ilave edilmiştir.

Tablo 2.1: Hücre kültürü uygulamalarında kullanılan gereçler.

Kullanılan Gereç	Firma - Ülke
Steril Hücre Kültür Kabı (10 cm çapında)	Orange - İtalya
Steril Hücre Kültür Kabı (60 x 15 mm)	Orange - İtalya
2, 5, 10, 25 ml hacimli otomatik pipetler	Orange - İtalya
Thoma lamı	Marienfeld - Almanya
İnvert mikroskop	Leica - Almanya
%99,9 Dimetilsülfoksit (DMSO)(0231)	Amresco - ABD
%0.25 Trypsin-EDTA (03-052-1B)	Biological Industries - İsrail
0,2 µm porlu şırınga filtresi (16534K)	Minisart - Almanya
22G, 5ml'lik şırınga	Maviset - Türkiye

2.1.1.2. Hücrelerin Yetiştirilmesi ve Pasajlanması

Farklı hücre hatları ihtiyaçlarına uygun şekilde farklı ortamlarda yetiştirilmektedirler. PC-3 hücre hatları, %10 FBS ve % 1 L-glutamin içeren RPMI 1640 ortamında büyütülebilmektedir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2: PC-3 hücrelerinin yetiştirileceği kültür ortamının hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler ve oranları.

Madde	Miktar	Firma - Ülke
L-glutamin (L-glu) (25030-024)	5 ml	Gibco - ABD
Fötal Dana Serum (FBS) (041271A)	50 ml	Biological Industries - İsrail
RPMI-1640 Hücre Ortamı (21875-034)	500 ml	Gibco - ABD

Kültürlerde çoğalan hücreler, içinde bulundukları besi ortamındaki besleyici ajanları büyük ölçüde tükettikten ya da üreme yüzeyinin tamamını kullandıktan sonra çoğalma hızlarını düşürmekte ve zamanla tamamen durdurmaktadırlar. Bu dönemde kültürün bölünmesi yapılması gereken en doğru işlemdir ve bu işleme "pasajlama" adı verilmektedir.

Hücreler deneye alınacağı zaman Thoma lamında sayım işlemi uygulanıp istenilen hücre miktarı hesaplandıktan sonra pasajlama işlemi gerçekleştirilir. Deneye alınmayacak hücreler ise rutin olarak 48 saatte bir beslenir ve bulundukları hücre kültür kabının zeminini tamamen kapladıkları zaman seyreltmek üzere 1/10 oranında pasajlama yapılarak rutin beslemeleri devam ettirilir. Yüzeye bağımlı hücreler ile yapılan kültür çalışmalarında öncelikle hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ve birbirlerinden ayrılması gerekir. Bu işlem mekanik, enzimatik ya da kimyasal yöntemlerle mümkün olmaktadır. Hücrelerin yüzeyden ayrılmasından sonra ise en kısa sürede kullanılan enzim ve kimyasallar ortamdan uzaklaştırılmalı veya yeni besi ortamı ile seyreltme yapılmalıdır.

Gerçekleştirilen pasajlama işlemi için tek kullanımlık steril cam pastör pipetleri kullanılarak hücrelerin üzerlerindeki ortam vakum yardımıyla uzaklaştırılmıştır. 10cm'lik steril kaplara yapışmış olan hücrelerin yüzeyi uygulanacak tripsin-EDTA'nın etkisini arttırmak için 10ml steril PBS ile bir kez yıkanmıştır. PBS'in ortamdan uzaklaştırılmasının ardından 1ml tripsin-EDTA solüsyonu kültür kabının ortasına damla damla ilave edildikten sonra, 2-3 dakika süresince nazıkçe sallama işlemi yapılarak tripsin-EDTA'nın kültür kabının her bölgesine yayılması sağlanmıştır. Ardından tripsin-EDTA'sı vakum ile uzaklaştırılan kültür kabı, 37°C ve %5 CO₂'li inkübatörde hücreler yüzeyden kalkana kadar yaklaşık 1-2 dakika kadar beklemeye alınmıştır. Daha sonra 10ml yeni ortam hücrelerin üzerine ilave edilmiş ve pipet yardımıyla hücreler homojenize edilmiştir. (1/10 seyreltme oranında olacak şekilde) bu homojenatın 1ml'si yeni kültür kabındaki 9ml yeni ortamın üzerine yavaşça ilave edilmiştir. Hücrelerin kültür kabına homojen şekilde dağılmaları için nazıkçe sallama işlemi uygulandıktan sonra, kaplar hücrelerin büyümesi için inkübatöre yerleştirilmiştir.

Tablo 2.3: Fosfat tamponu (phosphate buffered saline-PBS) hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler.

Madde	Miktar	Firma - Ülke
KCl (28273980)	0.186g	Merck - Almanya
KH ₂ PO ₄ (P9791)	0.218g	Sigma - ABD
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O (K22287176)	2.3 g	Merck - Almanya

NOT: Maddeler tartılıp distile su içerisinde çözündürüldü ve çözelti pH'ı 7.4'e ayarlandı.

2.1.1.3. Hücre Sayımı

Hücre sayımı hücre süspansiyonunun yoğunluğunun belirlenmesi için yapılan bir işlemdir. Hücreler pasajlanırken, yeni kültüre istenen miktarda hücre alabilmek amacıyla Thoma lamında sayım işlemi uygulanmıştır. Sayım işlemleri için her uygulama öncesinde homojen hale getirilen hücre süspansiyonundan 100 µl alınıp Thoma lamı (Tablo2.1) ile üzerine yerleştirilmiş olan

lamelin arasındaki oluğa pipet ile kenardan sızdırılarak süspansiyonun yayılması sağlanır ve mililitredeki hücre sayısını belirlemek için ise aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\frac{\text{Hücre Sayısı}}{\text{ml}} = \text{Sayılan hücre miktarı} \times 10^4$$

2.1.1.4. **Starvasyon İşlemi**

Hücrelerin uyarılara daha iyi yanıt vermesini sağlamak amacıyla, LPS indüksiyonları ve doksisiklin tedavi uygulamaları öncesinde starvasyon işlemi yapılmıştır. Bu işlem iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir.

2.1.1.4.1. **%2'lik Starvasyona Alma**

6 kuyucuklu plate'lerdeki hücrelerin RPMI ortamları vakum yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra her kuyucuğa 1'er ml PBS ile yıkama yapılmıştır. Serumsuz RPMI hücre kültürü ortamı (Gibco, 21875-034, ABD) içerisine %2 oranında CT-FBS (Charcoal Treated Fetal Bovine Serum, Aktif kömürle işlem görmüş fetal dana serumu) (Gibco, 12676-011, ABD) ilave edilmiş ve bu karışımdan her kuyucuğa 2 ml ilave edildikten sonra 2 gün inkübasyona bırakılmıştır .

2.1.1.4.2. **%0,5'lik Starvasyona Alma**

6 kuyucuklu plate'lerdeki hücrelerin üzerinden %2'lik CT-FBS karışımları vakum yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra her kuyucuğa %0,5 CT-FBS'li serumsuz RPMI ortamı karışımından 1'er ml ilave edildikten sonra, hücreler yaklaşık olarak 3-4 saat kadar bu ortamla inkübasyona bırakılmıştır.

2.1.1.5. **LPS ile İndüksiyon**

Liyofilize toz halinde ve 1 mg olarak gelen LPS (Lipopolysaccharides from Escherichia coli 026:B6, Sigma, L2654, Almanya), 1ml sterilize edilmiş distile su içerisinde çözündürülerek 1mg/ml konsantrasyonda ana stok çözeltisi haline getirilmiş ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Her kullanım öncesi bu stok çözeltisinden uygun dilüsyonlar yapılarak istenilen konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır.

Hücreler, kontrol gurubuna karşı uygun konsantrasyonda LPS ile 24 saat boyunca inkübe edilerek, hücre proliferasyonu ile protein ekspresyon ve aktivasyonları uyarılmıştır.

2.1.1.6. **Doksisiklin Uygulaması**

Uygun saklama koşullarına göre sakladığımız sarı renkli toz haldeki doksisiklin hiklat (Kaifeng Pharma, Çin, K9-079), her kullanım öncesinde sterilizasyon filtresinden geçirilerek sterilize edilmiş distile su ile 10µg/ml konsantrasyonda doksisiklin çözeltisi olacak şekilde stok çözeltisi haline getirilmiştir. Hücre kültürüne uygulanacak bu çözeltinin sterilizasyonu, hücre kültürü kabini içerisinde 0.2µm çaplı deliklere sahip enjeksiyon filtrelerinden geçirilmek suretiyle sağlanmış ve çözelti kullanıma hazır hale getirilmiştir. Yeni hazırlanmış bu stok çözeltisinden uygun dilüsyonlar yapılarak istenilen konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır.

Hücre proliferasyonu ile farklı proteinlerin ekspresyon ve aktivasyonları üzerinde inhibisyon oluşturmak üzere, hücreler 24 saat süre ile kontrol gurubuna kıyasla uygun konsantrasyonda doksisiklin uygulamasına tabi tutulmuştur.

2.2. **HÜCRELERİN GRUPLANDIRILMASI VE DENEYE ALINMASI**

Prostat kanseri hücre hattı PC-3 hücrelerinde NF-kB sinyalizasyonunun rolü ile MMP enzimleri üzerindeki etkilerini ve hedef proteinler üzerinde doksisiklinin inhibitör potansiyelini araştırmak üzere planlanan çalışmada protokol gereği 4 farklı deney serisi oluşturulmuş ve her deney serisinde farklı incelemeler gerçekleştirilmiştir.

Protokol gereğince tüm deneylerde, PC-3 hücreleri rutin olarak %10 fetal dana serumu, ve %1 L-glutamin (200 mM) içeren RPMI 1640 ortamı ile beslenmiştir.

2.2.1. BİRİNCİ SERİ DENEYLER (TRİPAN MAVİSİ İLE BOYAMA VE ZİMOGRAFI YÖNTEMİ İLE KONSANTRASYON BELİRLENMESİ)

Birinci seri deneylerde hücreler plasebo, LPS, doksisisiklin, LPS+doksisisiklin olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Her gruba ait hücre süspansiyonundan alınan hücreler ilgili ajanlarla 24 saat süre ile inkübe edilmiş ve 24 saat sonunda etkili olan en uygun konsantrasyonu belirlemek üzere hücreler tripan mavisi ile boyanarak sayılmıştır.

2.2.1.1. LPS Konsantrasyonunun Belirlenmesi

İlk olarak, hücreler n sayısı ile orantılı olarak 12 kuyucuklu plate'lere ekilmiş ve (2.1.1.4 bölümünde bahsedildiği üzere) gerekli starvasyon işlemleri yapılmıştır. Prostat hücresi ve farklı hücreler üzerinde denenmiş LPS uygulamalarının olduğu literatürlerin konsantrasyonları ve uygulama süreleri göz önünde tutularak (108,113,117,184) LPS indüksiyonu için bir konsantrasyon aralığı saptanmıştır. Bu aralıkta ilgili konsantrasyon gradyanı şu şekilde belirlenmiştir: "Kontrol, 0.1µg/ml, 0.5µg/ml, 5µg/ml". Farklı plate'lerden gelen PC-3 hücrelerine plasebo grubuna karşı belirlenen LPS konsantrasyonları uygulanarak indüksiyon gerçekleştirilmiş ve hücreler 24 saat süre ile 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda hücreler 1 ml Tripsin-EDTA ile muamele edilerek hücrelerin platelerden ayrılması sağlanmış ve 10 ml kültür ortamı ile pipetaj sonrası homojen dağılımlı bir hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Bu süspansiyondan 10µl alınarak, önceden hazırlanan 90µl Tripan mavisi içeren ependorf tüp içerisine eklenmiştir. Böylece 1:9 oranında karışım elde edilmiştir. Bu karışım, pipetaj yapıldıktan sonra boyanın ölü hücrelere nüfuzu için 5 dakika süre ile bekletilmiştir. Bu süre sonunda 100 µl'lik karışım Thoma Lami'na alınarak, renksiz olan hücrelerin sayımı yapılmış ve çıkan sonuç dilüsyon faktörü (10^5) ile çarpılarak yaklaşık canlı hücre sayısı belirlenmiştir (n=6).

Tripan mavisi boyama yöntemi ile hücre proliferasyonu arttırdığı belirlenen LPS konsantrasyonunun deney için en uygun konsantrasyon olduğunu doğrulamak amacıyla

jelatinaz grubu MMP'lerin ekspresyon ve aktivitelerini uyaran en etkili konsantrasyon belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla LPS ile işlem görmüş hücrelerden elde edilen protein örnekleri ile jelatin zimografi yapılmıştır.

Proliferasyon ile birlikte MMP-9 ekspresyon ve aktivitesinin belirgin olarak arttığı LPS konsantrasyonu olan 0,5 µg/ml'nin 24 saat için en uygun konsantrasyon olduğu anlaşılmıştır.

2.2.1.2. Doksisisiklin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Hücrelerin n sayısı ile orantılı olarak 12 well plate'lere ekimi ve gerekli starvasyon işlemleri (daha önce 2.1.1.4 bölümünde bahsedildiği gibi) yapılmıştır. Prostat ve farklı hücreler üzerinde denenmiş doksisisiklin uygulamalarının olduğu literatürlerin konsantrasyonları ve uygulama süreleri göz önünde tutularak (139, 10, 72) bir doksisisiklin konsantrasyon gradyanı belirlenmiştir: "Kontrol, 0.5µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml". Plasebo grubuna karşı belirlenen bu konsantrasyonların etkileri, "LPS Konsantrasyonunun Belirlenmesi" bölümünde (Bölüm 2.2.1.1.) anlatıldığı gibi tripan mavisi sayım yöntemiyle hücre sayıları incelenerek belirlenmiştir (n=8). Doksisisiklinin tek başına hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşmeye neden olan konsantrasyonu 10µg/ml olarak belirlenmiştir. Ancak doksisisiklinin deney için uygun olan konsantrasyonunun bulunabilmesi için, hücrelerde etkin olduğu belirlenen LPS indüksiyona karşı doksisisiklinin farklı konsantrasyonları uygulanmıştır. Daha sonra, "LPS Konsantrasyonunun Belirlenmesi" bölümünde anlatıldığı gibi tripan mavisi boyama yöntemi kullanılarak ilacın etkileri hücre sayılarına bakılarak belirlenmiştir (n=4). Hücre sayısında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede normalizasyon sağlayan ilk konsantrasyon (5µg/ml) uygun konsantrasyon olarak kabul edilmiştir.

Bir MMP inhibitörü olan doksisisiklinin tripan mavisi boyama yöntemi ile hücre proliferasyonunu azalttığı belirlenen konsantrasyonun en uygun konsantrasyon olduğu sonucunu doğrulamak amacıyla, jelatinaz grubu MMP'lerin ekspresyon ve aktiviteleri

değerlendirilmiştir. Bu amaçla tek başına farklı konsantrasyonda doksisisiklin uygulanmış ve LPS'e karşı farklı konsantrasyonda doksisisiklin uygulanmış hücrelerden elde edilen protein örnekleri ile jelatin zimografi yöntemi uygulanmıştır. Sonuç olarak, tek başına jelatinaz grubu MMP ekspresyon ve aktivasyonu üzerinde belirgin inhibisyon oluşturan doksisisiklin konsantrasyonu 10µg/ml olarak belirlenmiştir. Ancak LPS'e karşı uygulanan farklı doksisisiklin konsantrasyonlarından jelatinaz grubu MMP ekspresyon ve aktivasyonunu belirgin şekilde normalize etmeye başlayan ilk konsantrasyon (5µg/ml) ise uygun konsantrasyon olarak kabul edilmiştir.

Tüm bunların sonucunda, proliferasyon ile birlikte jelatinazların ekspresyon ve aktivitesini 24 saatte belirgin olarak azaltan 5 µg/ml konsantrasyonunun doksisisiklin tedavisi için uygun konsantrasyon olduğu düşünülmüştür.

2.2.2. İKİNCİ SERİ DENEYLER (JELATİN ZİMOGRAFI)

Hücreler plasebo, LPS, doksisisiklin, LPS+doksisisiklin olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Tripin mavisi ile boyama ve hücre sayımı sonucunda hücrelerin proliferasyonuna göre belirlenen 0,5µg/ml konsantrasyonda LPS ve 5µg/ml konsantrasyonda doksisisiklin, ilgili hücre gruplarına uygun şekilde uygulanmış ve 24 saat süreyle inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra sırasıyla hücre pelletleri ve proteinler elde edilmiş ve ardından protein örneklerinde jelatin zimografi yöntemi ile jelatinaz ekspresyon ve aktiviteleri incelenmiştir.

2.2.2.1. Hücrelerin İzolasyonu

İndüksiyon ve ilaç uygulama sürelerinin sonlandırılmasını takiben hücreler, PBS ile yıkanıp Tripsin-EDTA ile kaldırılmış ve 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınmıştır. Hücreler 4000 rpm'de 8 dakika süre ile santrifüj edildikten sonra pelletler çekilmeksizin üst kısımdaki süpernatantlar vakumla uzaklaştırılmıştır. Tüplerin dibinde kalan pelletler, (izole edilmiş

hücreler), daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere - 86°C' deki derin dondurucuda saklanmıştır.

2.2.2.2. Protein İzolasyonu

Elde edilen pelletler, içerisine 1 tablet proteaz inhibitör kokteyli (Tablo 2.4) ve 0.5M konsantrasyonda PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride - Fenilmetilsülfonil florür) (Tablo 2.4) ilave edilen 10 ml protein ekstraksiyon tamponu (Tablo 2.4) ile lizis işlemine uğratılmış ve mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Karışımlar her 15 dakikada bir pipetleme yapılarak bir saat buzda bekletilmiş ve +4°C'de 30 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Pelletlerinden arındırılmış karışımın süpernatant kısmı ayrı tüplere alınmış ve protein konsantrasyonları tayin edilmiştir.

Tablo 2.4: Protein ekstraksiyon tamponu hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler.

Madde	Miktar	Firma - Ülke
HEPES (pH= 7.4) (H4034-25G)	20mM	Sigma - ABD
NaCl (S3014)	300mM	Sigma - ABD
EDTA (E5134-250G)	0.2mM	Sigma - ABD
TritonX-100 (T8787)	%0.1	Sigma - ABD
PMSF Kokteyl (93482)	0.5mM	Fluka - İsviçre
Proteaz inhibitör kokteyl tableti (04693159001)	10ml için 1 tablet	Roche - Almanya

NOT: PMSF ve proteaz inhibitör kokteyl tableti, tampon hazırlandıktan sonra, kullanım öncesinde ilave edilmektedir.

2.2.2.3. Protein Konsantrasyonu Ölçümü

Elde edilen protein örneklerinin konsantrasyon ölçümleri protein konsantrasyonu tayin kiti (Quant-IT Protein Assay Kiti; Invitrogen, Q33211, ABD) protokolüne uygun olarak; flourometrik Qubit cihazı (Tablo 2.5) ile yapılmıştır.

Ölçüm öncesinde kit içeriğindeki bütün ajanlar oda ısısına getirilmiştir. Kit protokolüne ve ölçüm yapılacak örnek sayısına uygun şekilde hesaplama yapılmıştır. Bunun için hazırlanan tampon karışımından flourometrik Qubit cihazına ait tüplerin her birine 199 µl eklenmiş, üzerlerine protein örneklerinden 1'er µl eklenerek 15 dakika beklenmiştir. Daha sonra flourometrik Qubit cihazında ölçüm yapılmış, konsantrasyon sonuçları "µg/µl" olarak alınmıştır.

2.2.2.4. Jelatin Zimografi İncelemeleri

PC-3 hücrelerinden protein ekstraksiyon tamponu ile elde edilen süpernatantlarda jelatinaz grubu enzimlerin (MMP-2 ve MMP-9) ekspresyon ve aktiviteleri jelatin zimografi yöntemi ile belirlenmiştir.

Öncelikle jelatin zimografi için uygun jeller hazırlanmıştır. Bunun için jel hazırlama düzeneği (Tablo 2.5) kullanılmıştır. İlk olarak % 10'luk ayırıcı jel hazırlanmış (Tablo 2.6) ve yaklaşık 45 dakika jelin polimerleşmesi için beklenmiştir. Ardından %10'luk paketleyici jel hazırlanmış (Tablo 2.6) ve ayırıcı jel üzerine dökülerek yaklaşık 30 dakika paketleyici jelin polimerleşmesi için beklenmiştir.

Hazırlanan jeller vertikal elektroforez sistemine (Tablo 2.5) yerleştirilerek içerisine yürütme tamponu (Tablo 2.7) eklenmiştir. Her kuyucukta 25 µg protein olacak şekilde homojenat ve örnek 5X yükleme tamponu (Tablo 2.7) ile 20X indükleyici ajanı (Tablo 2.7) karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Molekül ağırlığı markırı olarak "PageRuler plus prestained protein ladder" (Tablo 2.7) kullanılmıştır. Elektroforez sistemi kapatılarak 60V sabit voltajda oda sıcaklığında yaklaşık 3 saat elektroforez işlemi uygulanmıştır. Elektroforezden sonra jeller ikişer defa 30 dakika süreyle % 2,5 Triton X-100 renatürasyon tamponu (Tablo 2.7) ile yıkanmıştır. Daha sonra jeller, 37°C'de bir gece boyunca aktivasyon tamponunda (jel inkübasyon tamponu) (Tablo 2.7) inkübe edilmiştir. Ertesi gün inkübasyondan alınan jeller, boyama çözeltisi (Tablo 2.7) ile 2 saat boyunca boyanmıştır. Fazla boyadan arındırma amacıyla

yıkama çözeltisi (Tablo 2.7) ile yıkama yapılmıştır. Yıkanan jeller, Fusion FX7 (Tablo 2.5) yazılımının floresans görüntüleme sistemi ile dijital olarak görüntülenmiş ve elde edilen görüntüler kaydedilmiştir. Alınan görüntü dosyaları ImageJ (ImageJ 1.46r, National Institutes of Health, ABD) yazılımı ile analiz edilmiştir. Her bir bantın molekül ağırlığı, molekül ağırlığı markırı ile doğrulandıktan sonra her örnek için MMP'lere ait bant alanları ve optik dansiteleri (OD) belirlenmiştir. Substrat jelin lizis miktarı $\{\text{alan (mm}^2\text{)} \times \text{optik dansite (OD / mm}^2\text{)}\}$ formülünden hesaplanarak μg total protein başına elde edilen lizis birimi $\{(\text{alan} \times \text{dansite}) / \mu\text{g total protein}\}$ (rölatif proteinaz aktivitesi) olarak kantite edilmiştir.

Tablo 2.5: Jelatin zimografi yöntemi için kullanılan aygıtlar.

Kullanılan Aygıt	Firma - Ülke
Görüntüleme Cihazı	Fusion FX7, Vilber Lourmat - Fransa
Elektroforez Jel Hazırlama Düzeneği ve Elektroforez Sistemi	Mini-PROTEAN Tetra Cell, BioRad 165-8001, İngiltere
Elektroforez Güç Kaynağı	Labnet Power Station 200 - ABD
Quant-IT (Qubit) Konsantrasyon Ölçüm Cihazı	Invitrogen, Q32857 - ABD
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R - İngiltere
Santrifüj	VWR Galaxy 14D - ABD
Su Banyosu	Memmert Oilbath Model One 10 - Almanya
Manyetik Karıştırıcı	Nüve MK418 - Türkiye
Tartım Cihazı	Precisa XB220A - İsviçre
pH metre	WTW İnoLab Ph Level1 - Almanya
Vortex	Labnet VX100 - ABD
Buz makinası	Hoshizaki Ice Maker FM-80EE - İngiltere
Çalkalayıcı (Shaker)	Heidolph Duomax 1030 - Almanya

Tablo 2.6: Jelatin zimografide poliakrilamid jellerin hazırlanması için gerekli çözelti, kimyasal maddeler (10 ml için).

Madde	Miktar		Firma - Ülke
	% 10'luk Ayırıcı Jel	% 10'luk Paketleyici Jel	
% 30 Akrilamid karışımı (A8887)	2,5 ml	1,3 ml	Sigma - ABD
dH ₂ O	3,85 ml	6,1 ml	
20 mg/ml Jelatin (G9382)	1 ml	-	Sigma - ABD
1,5 M Tris-HCl (pH 8.8) (TRS002.500)	2,5 ml	-	BioShop - Kanada
1,0 M Tris-HCl (pH 6.8) (TRS002.500)	-	2,5 ml	BioShop - Kanada
% 20 SDS (L4390)	50 µl	50 µl	Sigma - Japonya
% 10 APS (A3678)	100 µl	50 µl	Sigma - İngiltere
TEMED (T7024)	4 µl	10 µl	Sigma - Çin

Tablo 2.7: Jelatin zimografi yöntemi için kullanılan tamponlar, çözeltiler, kimyasal maddeler.

	Madde	Miktar	Firma - Ülke
10X Yürütme Tamponu	Tris-baz (T6066)	30,2 g.	Sigma - ABD
	Glisin (50046)	188 g.	Sigma - Belçika
	SDS (L4390)	% 0,1	Sigma - Japonya
	dH ₂ O	Km. 1L	
Renatürasyon Tamponu	Triton X-100 (TRX777.100)	% 2,5	BioShop - Kanada
Aktivasyon (inkübasyon) Tamponu	Tris-baz pH: 7,6 (T6066)	1M, 25 ml	Sigma - ABD
	CaCl ₂ .2H ₂ O (CCL444.250)	13mM	Bioshop - Kanada
	NaCl (S3014)	50 mM	Sigma - ABD
	dH ₂ O	Km. 500 ml	
Boyama Çözeltisi	Coomassie Blue R-250 (CBB250.10)	% 0,5	Bioshop - Kanada
	Metanol (1.06008.2500)	% 40	Merck - Almanya
	Asetik Asit (1.00056.2500)	% 10	Merck - Almanya
	dH ₂ O	Km. 1L	
Yıkama Çözeltisi	Metanol (1.06008.2500)	% 40	Merck - Almanya
	Asetik Asit (1.00056.2500)	% 10	Merck - Almanya
	dH ₂ O	Km. 1L	
Molekül Ağırlığı Markırı	PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (SM1811)	7µl / jel	Thermo - ABD
Yükleme Solüsyonu (R0891)	5X Protein Yükleme Tamponu	0,75 µl/örnek	Fermentas - ABD
	20X İndükleyici Ajan	5,25 µl/örnek	Fermentas - ABD

2.2.3. ÜÇÜNCÜ SERİ DENEYLER (WESTERN BLOT)

Hücreler plasebo, LPS, doksisisiklin, LPS+doksisisiklin olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Tripan mavisi ile boyama ve hücre sayımı sonucunda hücrelerin proliferasyonuna göre belirlenen 0.5 µg/ml konsantrasyonda LPS ve 5 µg/ml konsantrasyonda doksisisiklin, ilgili hücre gruplarına uygun şekilde uygulanmış ve 24 saat süreyle inkübasyon yapılmıştır. Uygulama süreleri sonunda, zimografi yönteminde anlatıldığı gibi önce hücrelerin izolasyonu (bölüm

2.2.2.1) takibinde protein izolasyonu (bölüm 2.2.2.2) yapılmış, elde edilen proteinlerin konsantrasyonları da aynı şekilde (bölüm 2.2.2.3) ölçülmüştür. Ardından protein örneklerinde western blot yöntemi ile uygun antikorlar kullanılarak MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-10, NF- κ B, I κ B, p-I κ B- α , IKK- β proteinlerinin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir.

2.2.3.1. Western Blot İncelemeleri

Plasebo, LPS, doksisisiklin, LPS+doksisisiklin olmak üzere farklı uygulamalar yapılan PC-3 hücrelerinden elde edilen total proteinlerde ilgili proteinlerin ekspresyon düzeyleri western blot yöntemi ile belirlenmiştir

İlk olarak %10'luk SDS-PAGE jeller hazırlanmıştır. Bunun için jel hazırlama düzeneği (Tablo 2.11) kullanılmıştır. Öncelikle % 10'luk ayırıcı jel hazırlanmış (Tablo 2.8) ve yaklaşık 45 dakika jelin polimerleşmesi için beklenmiştir. Ardından %10'luk paketleyici jel hazırlanmış (Tablo 2.8) ve ayırıcı jel üzerine dökülerek yaklaşık 30 dakika paketleyici jelin polimerleşmesi için beklenmiştir.

Vertikal elektroforez sistemi (Tablo 2.11) içerisine önce hazırlanan jeller yerleştirilmiş daha sonra da yürütme tamponu (Tablo 2.9) ilave edilmiştir. Her kuyucukta 25 μ g protein olacak şekilde homojenat ve 5X yükleme tamponu ile 15X indükleyici ajan (Tablo 2.9) karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Molekül ağırlığı markırı olarak PageRulerplus prestained protein ladder (Tablo 2.9) kullanılmıştır. Elektroforez sistemi kapatılarak 80V sabit voltajda oda sıcaklığında yaklaşık 2 buçuk saat elektroforez işlemi uygulanmıştır. Elektroforez sonrası jeller, metanolde aktiflenmiş PVDF membranla (Tablo 2.11) birlikte semi-dry transfer solüsyonunda (Tablo 2.9) ıslatılmış kromatografi kağıtları (Tablo 2.11) arasında olacak şekilde, semi-dry transfer cihazına (Tablo 2.11) alınmıştır. Transfer işlemi 320 mA'de 1 buçuk saat sürdürülmüştür. Protein transferi tamamlanan membranlar, 1X PBS-Tween20 tamponu (Tablo 2.9) ile ön yıkamaya alınıp, %5 süt tozu içeren PBS-Tween20 ile 1 saat süreyle bloklamaya

bırakılmıştır. Daha sonra membranlar, PBS-Tween20 tamponu ile tekrar yıkandıktan sonra +4°C'de bir gece β -aktin primer antikoru (Tablo 2.10) ile inkübe edilmiştir. Ertesi gün primer antikor inkübasyonundan alınan membranlar, tekrar PBS-Tween20 tamponu ile yıkandıktan sonra, uygun sekonder antikor inkübasyonları (Tablo 2.10) oda sıcaklığında 30 dakika süre ile gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler her farklı primer antikor için tekrarlanmıştır.

Her bir PVDF membranın görüntülenebilmesi için, karanlık bir ortamda ImmunoCruz görüntüleme ajanı (Tablo 2.10) içindeki reaktif solüsyonu (solüsyon A) ve tampon solüsyonu (solüsyon B) 1:1 oranında alınarak bir karışım hazırlanmıştır. Bu karışımdan her membran için 2 ml kullanılarak PVDF membran üzerinde 1 dakika inkübasyon yapılmıştır. Ardından Fusion FX7 (Tablo 2.11) yazılımı ve kemilüminesans görüntüleme sistemi ile dijital olarak görüntüleme yapılmış ve elde edilen görüntüler kaydedilmiştir. Bu görüntü dosyaları daha sonra ImageJ (ImageJ 1.46r, National Institutes of Health, ABD) yazılımı ile analiz edilmiştir. Her bir bantın molekül ağırlığı, molekül ağırlığı markırı (Tablo 2.9) ile doğrulandıktan sonra her örnek için ilgilenilen proteinlere ait bant alanları ve optik dansiteleri (OD) belirlenmiştir. İlgilenilen protein ölçümleri {alan (mm²) x optik dansite (OD / mm²)} formülünden hesaplanarak kantite edilmiştir. Her protein için yapılan bu ölçümlerden sonra aynı örneklerle ait β -aktin ekspresyonları aynı şekilde belirlenmiştir. İlgilenilen protein ekspresyonunun her bir örnek için belirlenen β -aktin ekspresyonuna oranlanması ile ilgilenilen proteinin rölatif ekspresyon düzeyi saptanmıştır.

Tablo 2.8: Western blotta poliakrilamid jellerin hazırlanması için gerekli çözelti, kimyasal maddeler (10 ml için).

Madde	Miktar		Firma - Ülke
	% 10'luk <i>Ayırıcı Jel</i>	% 10'luk <i>Paketleyici Jel</i>	
% 30 Akrilamid karışımı (A8887)	3,3 ml	1,7 ml	Sigma - ABD
dH ₂ O	4,1 ml	5,7 ml	
4X Ayırıcı Jel Tamponu	2,5 ml	-	
4X Paketleyici Jel Tamponu	-	2,5 ml	
% 10 APS (A3678)	100 µl	100 µl	Sigma - İngiltere
TEMED (T7024)	4 µl	10 µl	Sigma - Çin

Tablo 2.9: Western blot yöntemi için kullanılan tamponlar, çözeltiler, kimyasal maddeler.

	Madde	Miktar	Firma - Ülke
4X Ayırıcı Jel Tamponu	Tris-HCl (pH: 8,8) (TRS002.500)	1,5 M	BioShop - Kanada
	SDS (L4390)	% 0,4	Sigma - Japonya
4X Paketleyici Jel Tamponu	Tris-HCl (pH: 6,8) (TRS002.500)	0,5 M.	BioShop - Kanada
	SDS (L4390)	% 0,4	Sigma - Japonya
10X Yürütme Tamponu	Tris-baz (T6066)	30,2 g.	Sigma - ABD
	Glisin (50046)	188 g.	Sigma - Belçika
	SDS (L4390)	% 0,1	Sigma - Japonya
	dH ₂ O	km. 1L	
20X PBS Solüsyonu	Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O (1.06580.1000)	0.16 M	Merck - Almanya
	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O (1169297)	0.04 M	Merck - Almanya
	NaCl (S3014)	2.8 M	Sigma - ABD
	dH ₂ O (pH: 7)	km. 1L	
Tween 20	Tween 20 (P9416)		Sigma, ABD
Semi-Dry Transfer Tamponu	Tris-baz (T6066)	16mM	Sigma - ABD
	Glisin (50046)	120mM	Sigma - Belçika
	Metanol (1.06008.2500)	%20 v/v	Merck - Almanya
Molekül Ağırlığı Markırı	PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (SM1811)	7µl / jel	Thermo - ABD
Yükleme Solüsyonu (R0891)	5X Protein Yükleme Tamponu	0.75 µl/örnek	Fermentas - ABD
	20X İndükleyici Ajan	5.25 µl/örnek	Fermentas - ABD

NOT: Km; Kafi Miktar

Tablo 2.10: Western blot yöntemi için kullanılan antikorlar ve görüntüleme ajanı.

Kullanılan Primer Antikorlar	Firma - Ülke
Mouse Anti-MMP-2 Antibody (MAB3308)	Millipore - ABD
Rabbit Anti-MMP-9 (G657) Antibody (2270)	Cell Signaling - ABD
Rabbit Anti-MMP-10 Antibody (PA1380)	Boster - ABD
Rabbit Anti-MMP-8 Antibody (PA1207)	Boster - ABD
Rabbit Anti-NF- κ B p65 Antibody (8242)	Cell Signaling - ABD
Rabbit Anti-I κ B- α Antibody (9242)	Cell Signaling - ABD
Rabbit Anti-phospho-NF-KBIA(Tyr305) Antibody (BS5515R)	Bioss - ABD
Rabbit Anti-IKK- β (2C8) Antibody (2370)	Cell Signaling - ABD
Rabbit Anti- β -actin Antibody (4970)	Cell Signaling - ABD
Kullanılan Sekonder Antikorlar	Firma - Ülke
Anti-Rabbit IgG (SH026)	Abm - Kanada
Anti-mouse IgG (A5906)	Sigma - Almanya
Kullanılan Görüntüleme Ajanı	Firma - Ülke
Western Blotting Lüminol Reagent (ImmunoCruz) (SC-2048)	Santa Cruz - Almanya

Tablo 2.11: Western blot yöntemi için kullanılan aygıt ve gereçler.

Kullanılan Aygıt ve Gereçler	Firma - Ülke
Görüntüleme Cihazı	Fusion FX7, Vilber Lourmat - Fransa
Semi-Dry Transfer Cihazı	VWR V20-SDB - Avusturya
Semi-Dry Transfer Güç Kaynağı	Thermo EC1000-90 - ABD
Elektroforez Jel Hazırlama Düzenegi ve Elektroforez Sistemi	Mini-PROTEAN Tetra Cell, BioRad 165-8001, İngiltere
Elektroforez Güç Kaynağı	Labnet Power Station 200 - ABD
Quant-IT (Qubit) Konsantrasyon Ölçüm Cihazı	Invitrogen, Q32857 - ABD
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R - İngiltere
Santrifüj	VWR Galaxy 14D - ABD
Sıvı Azot Tankı	Air Liquide TR21 - İspanya
Su Banyosu	Memmert Oilbath Model One 10 - Almanya
Manyetik Karıştırıcı	Nüve MK418 - Türkiye
Tartım Cihazı	Precisa XB220A - İsviçre
pH metre	WTW İnoLab Ph Level1 - Almanya
Vortex	Labnet VX100 - ABD
Buz makinası	Hoshizaki Ice Maker FM-80EE - İngiltere
Çalkalayıcı (Shaker)	Heidolph Duomax 1030 - Almanya
Western Blot (PVDF) Membranı (03 010 040 001)	Roche - Almanya
Kromatografi Kağıtları (3030-392)	Whatman - İngiltere

2.2.4. DÖRDÜNCÜ SERİ DENEYLER (İMMUNOHİSTOKİMYA)

2.2.4.1. İmmünohistokimyasal İncelemeler

Dördüncü seri deneylerde, altlarına lamel (coverslip) yerleştirilen 6 kuyucuklu plate'lere hücre ekimi yapılmıştır. "Plasebo", "LPS", "Doksisiklin", "LPS ve Doksisiklin" olmak üzere ayrılan 4 hücre grubuna tripan mavisi hücre sayımı sonucunda, hücrelerin proliferasyonuna ve bu proliferasyonun inhibisyonuna göre belirlenen sırasıyla 0,5 µg/ml LPS ve 5 µg/ml doksisiklin

uygun şekilde verilmiş ve 24 saat süreyle inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra inkübasyon süreleri tamamlanan hücreler, üzerlerine 2'şer ml. %96'lık alkol ilave edilerek 5 dakika boyunca fikse edilmiştir. Fiksasyonu tamamlanan hücre örnekleri, azalan derecede alkol serileri ile rehidrate edilip distile su ile yıkanmıştır. Tripsin-EDTA solüsyonu içinde 37°C etüvde 15 dakika tutulan hücrelere, PBS ile yıkamanın ardından doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla %3'lük hidrojen peroksit uygulanmış ve PBS ile yıkama yapılmıştır. Bloklama solüsyonu ile 10dk inkübe edilen hücre örneklerinin ilgili primer antikorlar ile (Tablo 2.12) 1 gece +4°C'de inkübasyonu yapılmıştır. Ardından fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan hücre örnekleri biyotinlenmiş sekonder antikor ve enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (Tablo 2.12) ile muamele edilmiştir. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) (Tablo 2.12) kullanılmıştır. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen hücre örnekleri şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatılmış ve ışık mikroskobu (Olympus, DP70, ABD) ile incelenmiştir.

p-IkB- α , IKK- β , MMP-8 ve MMP-9 immünohistokimyasal boyanma skorlaması için, PC-3 hücrelerinde kahverengi sitoplazmik boyanma "pozitif boyanma", NF-kB için ise kahverengi nükleer boyanma "pozitif boyanma" olarak değerlendirilmiştir. Boyanma yoğunluğu ve boyanma dağılımı 0-4 arasında skorlanmıştır. Skorlama esnasında objektifliği sağlamak amacıyla, skorlama işleminde görev alan araştırmacılardan örneklerin hangi gruba ait olduğu gizlenmiştir. Bu yöntemle elde edilen skorların ortalaması alındıktan sonra 2'den küçük olan skor değerleri "zayıf boyama", 2'den büyük olan skor değerleri ise "kuvvetli boyama" olarak kabul edilmiştir. Gruplar arasında fark olup olmadığı yarı kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 2.12: İmmünohistokimya yöntemi için kullanılan antikorlar ve boyalar.

Kullanılan Primer Antikorlar	Firma - Ülke
Rabbit Anti-MMP-9 (G657) Antibody (2270)	Cell Signaling - ABD
Rabbit Anti-MMP-8 (PA1207)	Boster - ABD
Rabbit Anti-NF- κ B p65 Antibody (8242)	Cell Signaling - ABD
Rabbit Anti-phospho-NF-KBIA(Tyr305) (BS5515R)	Bioss - ABD
Rabbit Anti-IKK- β (2C8) Antibody (2370)	Cell Signaling - ABD
Kullanılan Sekonder Antikorlar	Firma - Ülke
Biyotinlenmiş Sekonder Antikor Ve Enzimle İşaretli (Peroksidaz) Avidin-Biyotin Kompleksi (85-9043)	Invitrogen, Histostain-Plus Broad Spectrum - ABD
Kullanılan Boya ve Kimyasallar	Firma - Ülke
Diaminobenzidin (DAB) Boyası (1718096)	Roche - Almanya
Blokaj Solüsyonu (85-9043)	Invitrogen, Histostain- Plus Broad Spectrum - ABD
PBS Yıkama Solüsyonu (79383)	(Sigma - ABD)
Trypsin solüsyonu (00-3008)	Digest All 2A, Zymed - ABD

2.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Tüm veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. Farklı pasajlardan gelen her bir hücre kültür kabındaki hücrelerden elde edilen protein ekstraktları için "n" ifadesi kullanılmıştır. $P \leq 0.05$ düzeyindeki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Hücre sayımı, zimografi ve western blot deneylerinde elde edilen sonuçların istatistiksel analizinde GraphPad Prism 5.03 (San Diego-California, ABD) bilgisayar yazılımının eşleştirilmiş Student's *t*-test modülü kullanılmıştır.

İncelenen proteinlerin immünohistokimyasal yöntemle belirlenen ve immünopozitiviteleri temsil eden skor değerlerinin istatistiksel analizleri, SPSS 16.0 (Illinois, ABD) yazılımının Ki-kare testi kullanılarak yapılmıştır.

BÖLÜM III

3. BULGULAR

3.1. *UYGUN KONSANTRASYON BELİRLEME ÇALIŞMALARI*

3.1.1. **TRİPAN MAVİSİ İLE HÜCRE SAYIMI VE PROLİFERASYONUN BELİRLENMESİ**

3.1.1.1. **Farklı Konsantrasyonlarda LPS İndüksiyonun Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi**

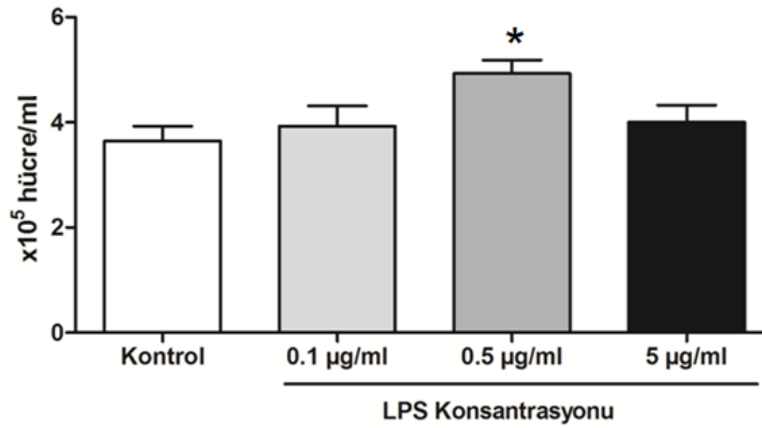
PC-3 hücrelerinde, kontrol grubuna karşı LPS'in farklı konsantrasyonlarının (0.1 µg/ml, 0.5µg/ml ve 5µg/ml) proliferatif etkilerini değerlendirmek üzere tripan mavisi ile hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.

24 saat süre ile 0.1 µg/ml ve 5 µg/ml LPS indüksiyonlarının kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, 0.5µg/ml konsantrasyondaki LPS ile yapılan 24 saat süreli indüksiyonun hücre proliferasyonu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.1;Tablo 3.1).

Tablo 3.1: LPS'in farklı konsantrasyonları ile 24 saat süreli indüksiyonlar sonunda belirlenen hücre sayıları.

	Kontrol	LPS		
		0.1 µg/ml	0.5 µg/ml	5 µg/ml
Hücre Sayısı (x10 ⁵ hücre/ml)	3.643 ± 0.283	3.929 ± 0.385	4.929 ± 0.254 *	4.000 ± 0.327

Veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. * $P \leq 0.05$ kontrol ile LPS, eşleştirilmiş Student's *t*-test (n=7).



Şekil 3.1: LPS'in farklı konsantrasyonları ile 24 saat süreli indüksiyonlar sonunda belirlenen hücre sayıları. Veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. * $P \leq 0.05$ kontrol ile LPS, eşleştirilmiş Student's *t*-test (n=7).

3.1.1.2. Farklı Konsantrasyonlarda Doksisisiklin Uygulamasının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

PC-3 hücrelerinde, kontrol grubuna karşı doksisisiklinin farklı konsantrasyonlarının (0.5µg/ml, 5µg/ml ve 10µg/ml) hücre proliferasyonu üzerindeki inhibitör etkilerini değerlendirmek amacıyla tripan mavisi ile hücre sayımı yöntemi uygulanmıştır.

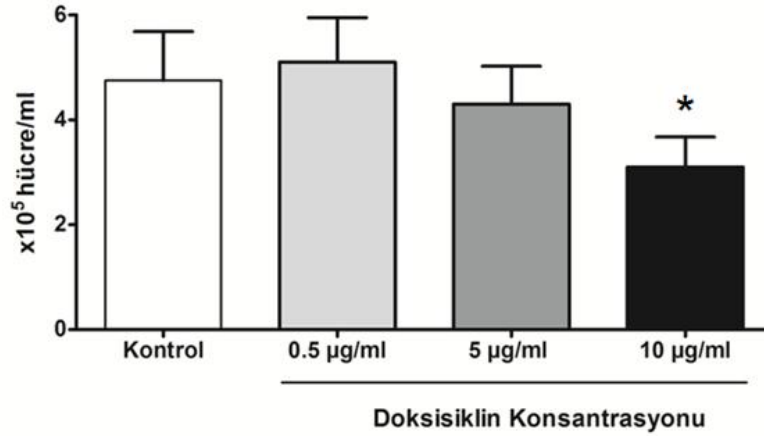
24 saat süreli 0.5µg/ml ve 5µg/ml doksisisiklin uygulamalarının kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı görülmüştür. Diğer yandan 24 saat süre ile

10µg/ml doksisisiklin uygulamasının hücre proliferasyonu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.2; Tablo 3.2).

Tablo 3.2: Doksisisiklinin farklı konsantrasyonları ile 24 saat süreli inkübasyonlar sonunda belirlenen hücre sayıları.

	Kontrol	Doksisisiklin		
		0.5 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml
Hücre Sayısı (x10 ⁵ hücre/ml)	4.750 ± 0.932	5.100 ± 0.846	4.300 ± 0.720	3.100 ± 0.572 *

Veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. * $P \leq 0.05$ kontrol ile doksisisiklin, eşleştirilmiş Student's *t*-test (n=10).



Şekil 3.2: Doksisisiklinin farklı konsantrasyonları ile 24 saat süreli inkübasyonlar sonunda belirlenen hücre sayıları. Veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. * $P \leq 0.05$ kontrol ile doksisisiklin, eşleştirilmiş Student's *t*-test (n=7).

3.1.1.3. Etkili LPS Konsantrasyonuna Karşı Farklı Konsantrasyonlarda Doksisisiklin Uygulamalarının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri

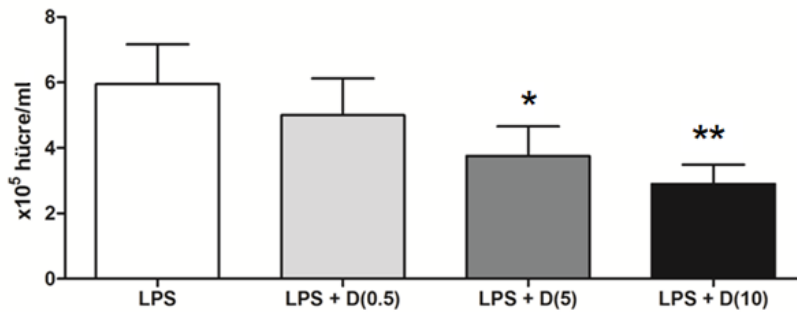
PC-3 hücreler üzerinde 24 saatlik inkübasyonda proliferasyon oluşturduğu belirlenen LPS konsantrasyonuna (0.5µg/ml) karşı doksisisiklinin farklı konsantrasyonlarının (0.5µg/ml, 5µg/ml ve 10µg/ml) anti-proliferatif etkilerini değerlendirmek amacıyla tripan mavisi ile hücre sayımı yöntemi uygulanmıştır.

Eş zamanlı olarak 24 saat süre ile LPS ve 0.5µg/ml doksisisiklin uygulamasının kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı görülmüştür. Buna karşın 24 saat süre ile 5µg/ml ve 10µg/ml doksisisiklin uygulamalarının hücre proliferasyonu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.3; Tablo 3.3).

Tablo 3.3: Eş zamanlı olarak LPS (0.5 µg/ml) indüksiyonu ve farklı konsantrasyonlarda doksisisiklinin 24 saat süre ile inkübasyonu sonunda hesaplanan hücre sayıları.

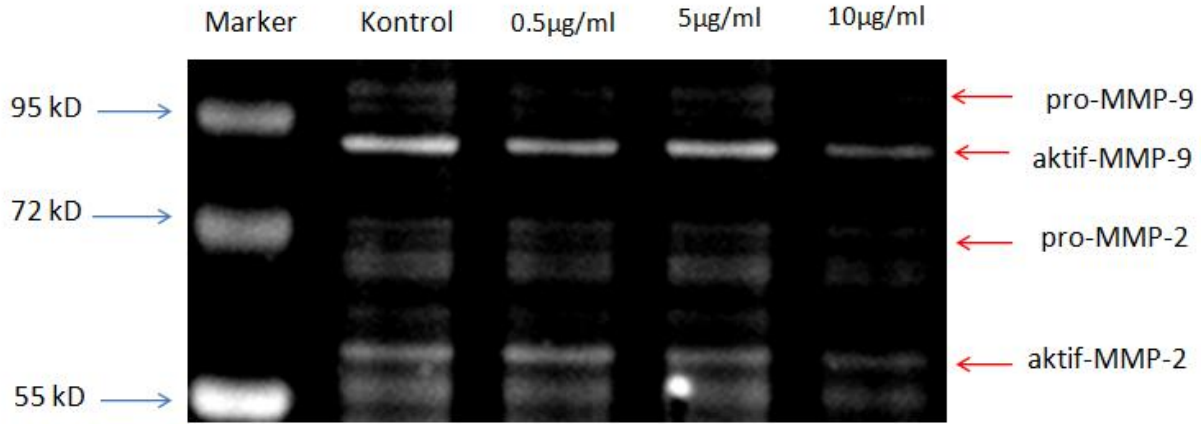
	LPS	LPS + Doksisisiklin		
		0.5µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml
Hücre Sayısı (x10 ⁵ hücre/ml)	5.950 ± 1.214	5.000 ± 1.123	3.750 ± 0.905 *	2.900 ± 0.586 **

Veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$ kontrol ile LPS+doksisisiklin, eşleştirilmiş Student's *t*-test (n=10).



Şekil 3.3: Eş zamanlı olarak LPS (0.5 µg/ml) indüksiyonu ve farklı konsantrasyonlarda doksisisiklinin (µg/ml) 24 saat süre ile inkübasyonu sonunda belirlenen hücre sayıları. Veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$ kontrol ile LPS+doksisisiklin, eşleştirilmiş Student's *t*-test. D; doksisisiklin (µg/ml) (n=10).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 24 saat süre ile 0.5µg/ml ve 5µg/ml doksisisiklin uygulamalarının belirgin bir fark oluşturmadığı saptanmıştır. Buna karşın, 24 saat süre ile 10µg/ml doksisisiklin uygulamasının her iki jelatinaz ekspresyonu ve aktivitesi üzerinde azalmaya neden olduğu saptanmıştır (Şekil 3.5).

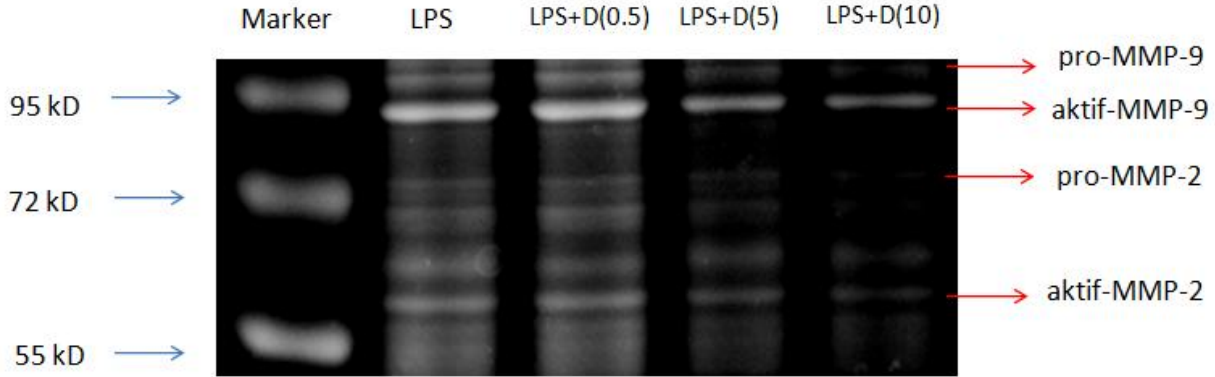


Şekil 3.5: PC-3 hücre hattında 24 saat süre ile ve farklı konsantrasyonlarda uygulanan doksisisiklin'in jelatinaz ekspresyon ve aktiviteleri üzerine etkisi. kD; kilodalton.

3.1.2.3. Etkili LPS Konsantrasyonuna Karşı Uygulanan Farklı Doksisisiklin Konsantrasyonlarının Jelatinazlara Etkisi

PC-3 hücreleri üzerinde 24 saatlik uygulamada indükleyici etkinliği belirlenen LPS konsantrasyonuna (0.5µg/ml) karşı doksisisiklinin farklı konsantrasyonlarının (0.5µg/ml ve 5µg/ml) jelatinaz ekspresyon ve aktiviteleri üzerindeki inhibitör etkilerini değerlendirmek amacıyla jelatin zimografi yöntemi uygulanmıştır.

24 saat süre ile 0.5µg/ml doksisisiklin uygulamasının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belirgin bir fark oluşturmadığı gözlenmiştir. Ancak, 24 saat süre ile 5µg/ml ve 10µg/ml doksisisiklin uygulamalarının her iki jelatinaz ekspresyon ve aktivitesi üzerinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6: Eş zamanlı 24 saat süreli uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve farklı konsantrasyonlarda doksisisiklinin PC-3 hücrelerindeki jelatinaz ekspresyon ve aktiviteleri üzerine etkisi. kD; kilodalton, D; doksisisiklin (µg/ml).

3.2. JELATİN ZİMOGRAFI ANALİZLERİ

Uygun ve etkili LPS ve doksisisiklin konsantrasyonlarını belirleme çalışmaları ile saptanan konsantrasyonlar esas alınarak, 24 saat boyunca eş zamanlı LPS ve doksisisiklin uygulanarak elde edilen protein örneklerinde jelatinaz ekspresyon ve aktiviteleri jelatin zimografi yöntemi ile saptanmıştır (Şekil 3.7).

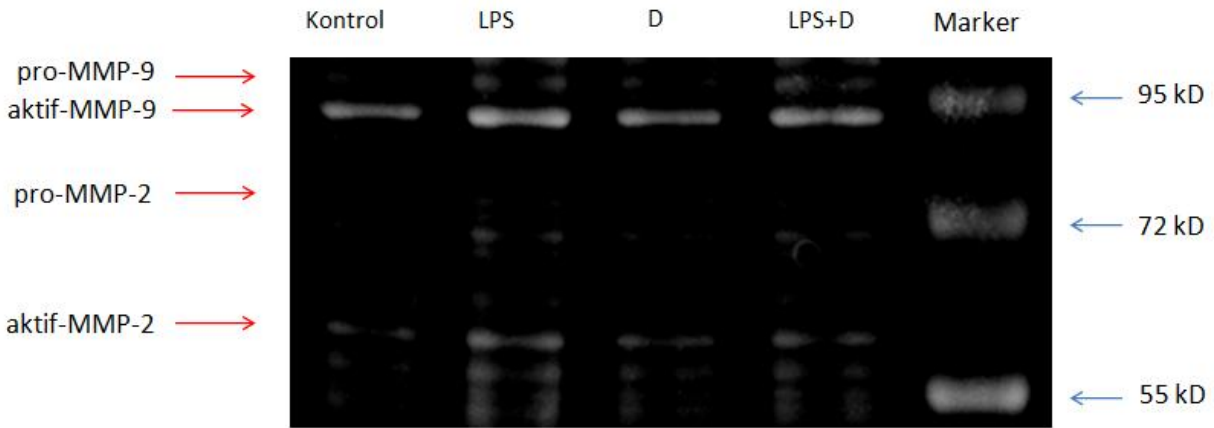
PC-3 hücrelerindeki MMP-2 ekspresyon ve aktivite düzeylerinin yetersiz oluşu nedeniyle MMP-2 bantları analiz edilememiştir. Ancak LPS indüksiyonu ve doksisisiklin uygulamalarının MMP-2 aktivitesi üzerine olan etkileri gözlemsel olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan zimografi çalışmalarında 24 saat süre ile 0.5µg/ml LPS uygulamasının kontrol ile karşılaştırıldığında MMP-2 aktivitesinde belirgin bir artış meydana getirdiği belirlenmiştir. 24 saat süre ile 5µg/ml doksisisiklin uygulamasının ise LPS'in meydana getirdiği MMP-2 aktivitesi üzerindeki bu artışı belirgin olarak azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.6, Şekil 3.7).

Yapılan zimografi çalışmalarında 24 saat süre ile 0.5µg/ml LPS uygulamasının kontrol ile karşılaştırıldığında MMP-9 ekspresyonunda belirgin bir artış meydana getirdiği görülmüştür. 24

saat süre ile 5µg/ml doksisiklin uygulamasının ise LPS'in meydana getirdiği MMP-9 ekspresyonu üzerindeki bu artışı belirgin olarak azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3-6, Şekil 3-7).

Bunun yanı sıra elde edilen zimografi görüntülerinde saptanan aktif MMP-9 bantlarının alan*dansite ölçümleri analiz edilerek LPS ve doksisiklin uygulamalarının MMP-9 aktivitesine olan etkileri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.



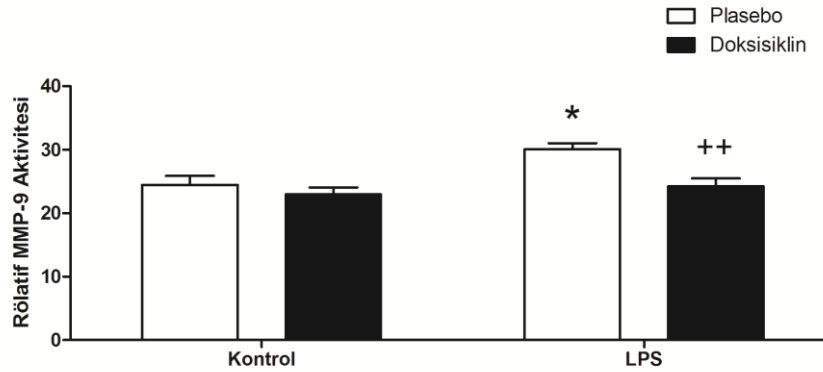
Şekil 3.7: Eş zamanlı 24 saat süreli uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve/veya doksisiklinin (5µg/ml) PC-3 hücrelerindeki jelatinaz ekspresyon ve aktiviteleri üzerine etkisi. kD; kilodalton, D; doksisiklin (n=7).

24 saat süre ile 0.5µg/ml LPS uygulamasının kontrol ile karşılaştırıldığında MMP-9 aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana getirdiği belirlenmiştir. 24 saat süre ile 5µg/ml doksisiklin uygulamasının ise MMP-9 aktivitesi üzerinde LPS'in meydana getirdiği bu artışı istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı gözlenmiştir (Şekil 3.8; Tablo 3.4).

Tablo 3.4: 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklinin (5µg/ml) rölatif MMP-9 aktivite değerleri.

Rölatif MMP-9 Aktivitesi	Doksisisiklin (-)	Doksisisiklin (+)
LPS (-)	24.440 ± 1.435	22.960 ± 1.100
LPS (+)	30.100 ± 0.937 *	24.200 ± 1.290 ⁺⁺

Veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. * $P \leq 0.05$ kontrol ile LPS; ++ $P \leq 0.01$ LPS ile LPS+doksisisiklin, eşleştirilmiş Student's *t*-test (n=7).



Şekil 3.8: PC-3 hücre hattında 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklinin (5µg/ml) MMP-9 aktivitesi üzerine etkileri. Veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. * $P \leq 0.05$ kontrol ile LPS; ++ $P \leq 0.01$ LPS ile LPS+doksisisiklin, eşleştirilmiş Student's *t*-test (n=7).

3.3. WESTERN BLOT ANALİZLERİ

3.3.1. NF-KB EKSPRESYONU

Etkili LPS ve doksisisiklin konsantrasyonunu belirleme çalışmalarında saptanan konsantrasyonlar esas alınarak, 24 saat boyunca eş zamanlı LPS ve doksisisiklin uygulamaları sonucunda elde edilen protein örneklerinde western blot yöntemi ile NF-kB ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

24 saat süre ile 0.5 µg/ml LPS indüksiyonunun NF-kB ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana getirdiği belirlenmiştir. Bununla beraber tek başına 5 µg/ml

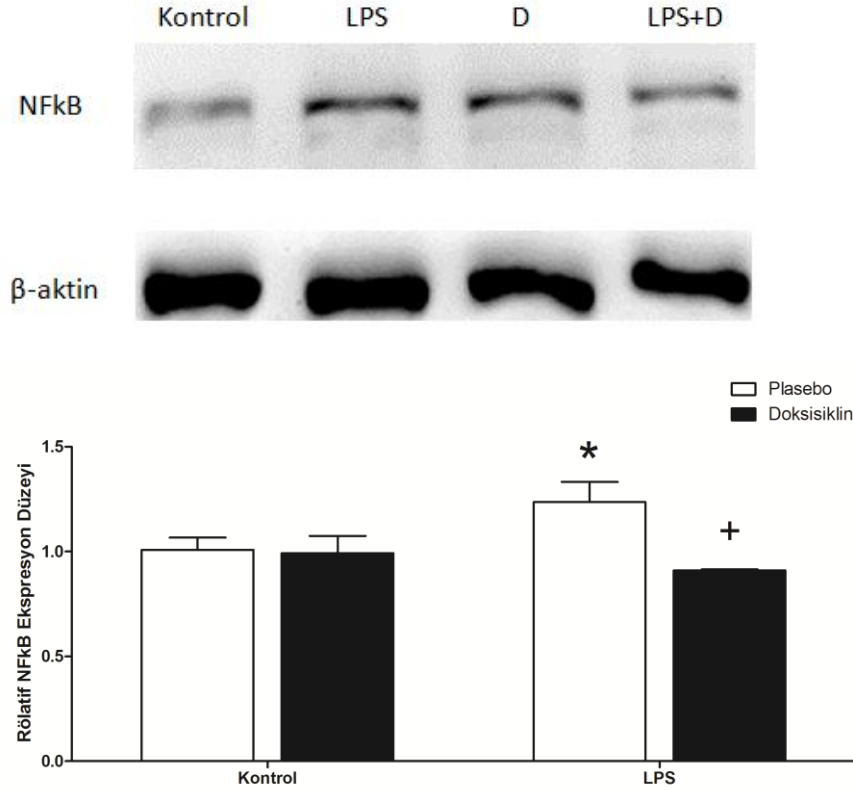
konsantrasyonda doksisisiklin uygulamasının NF-kB ekspresyon düzeyini değiştirmediği, LPS ile eş zamanlı doksisisiklin uygulamasının ise NF-kB ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma oluşturduğu görölmüştür (Tablo 3.5; şekil 3.9).

Tablo 3.5: Eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklin (5 µg/ml) uygulamalarının NF-kB ekspresyon düzeyine etkisi.

Rölatif NF-kB Ekspresyonu	Doksisisiklin (-)	Doksisisiklin (+)
LPS (-)	1.01 ± 0.118	0.993 ± 0.164
LPS (+)	1.24 ± 0.193 *	0.909 ± 0.011 ⁺

Veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. * $P \leq 0.05$ kontrol ile LPS;

⁺ $P \leq 0.05$ LPS ile LPS+doksisisiklin, eşleştirilmiş Student's *t*-test. (n=4)



Şekil 3.9: PC-3 hücre hattında eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5 μ g/ml) ve doksisisiklinin (5 μ g/ml) NF-kB ekspresyonu üzerine etkisi ve temsili western blot görüntüsü. Veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. * $P \leq 0.05$ kontrol ile LPS; + $P \leq 0.05$ LPS ile LPS+doksisisiklin, eşleştirilmiş Student's t-test. (n=4)

3.3.2. IKB- α EKSPRESYONU

Etkili LPS ve doksisisiklin konsantrasyonunu belirleme çalışmalarında saptanan konsantrasyonlar esas alınarak, 24 saat boyunca eş zamanlı LPS ve doksisisiklin uygulamaları sonucunda elde edilen protein örneklerinde western blot yöntemi ile Ikb- α protein ekspresyon düzeyleri saptanmıştır.

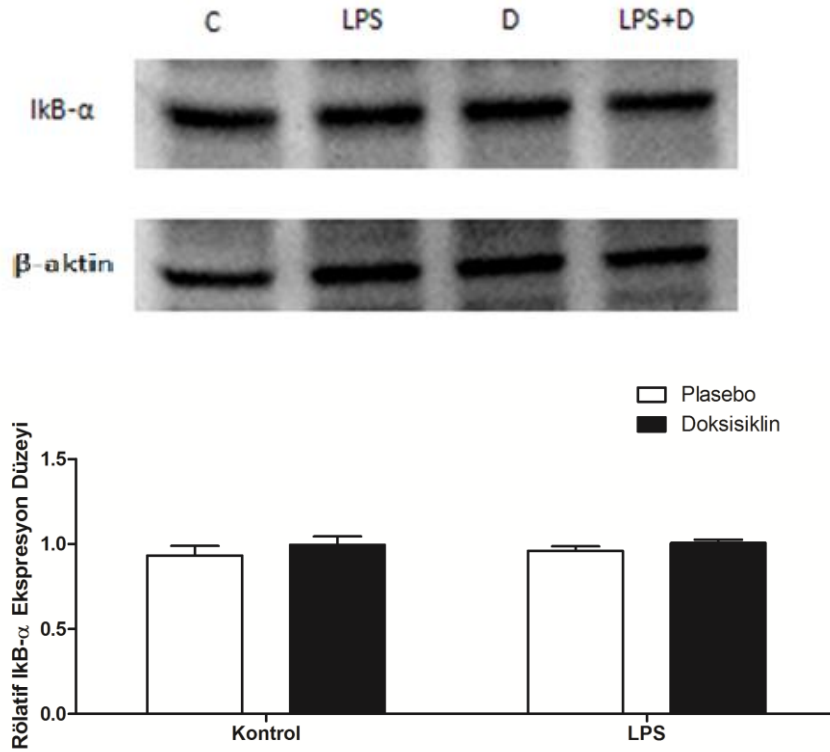
24 saat süre ile 0.5 μ g/ml LPS indüksiyonunun Ikb- α ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik meydana getirmediği saptanmıştır. Benzer şekilde tek başına 5 μ g/ml konsantrasyonda doksisisiklin uygulamasının ve LPS ile eş zamanlı doksisisiklin

uygulamasının da I κ B- α ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe sebep olmadığı belirlenmiştir (Tablo 3.6; Şekil 3.10).

Tablo 3.6: Eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5 μ g/ml) ve doksisisiklin (5 μ g/ml) uygulamalarının I κ B- α ekspresyon düzeyine etkisi.

Rölatif I κ B- α Ekspresyonu	Doksisisiklin (-)	Doksisisiklin (+)
LPS (-)	0.933 $\pm$ 0.0556	0.996 $\pm$ 0.0494
LPS (+)	0.960 $\pm$ 0.0270	1.007 $\pm$ 0.0188

Veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. Eşleştirilmiş Student's *t*-test. (n=8)



Şekil 3.10: PC-3 hücre hattında eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5 μ g/ml) ve doksisisiklinin (5 μ g/ml) I κ B- α ekspresyonu üzerine etkisi ve temsili western blot görüntüsü. Veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. Eşleştirilmiş Student's *t*-test. (n=8)

3.3.3. p-IKB- α EKSPRESYONU

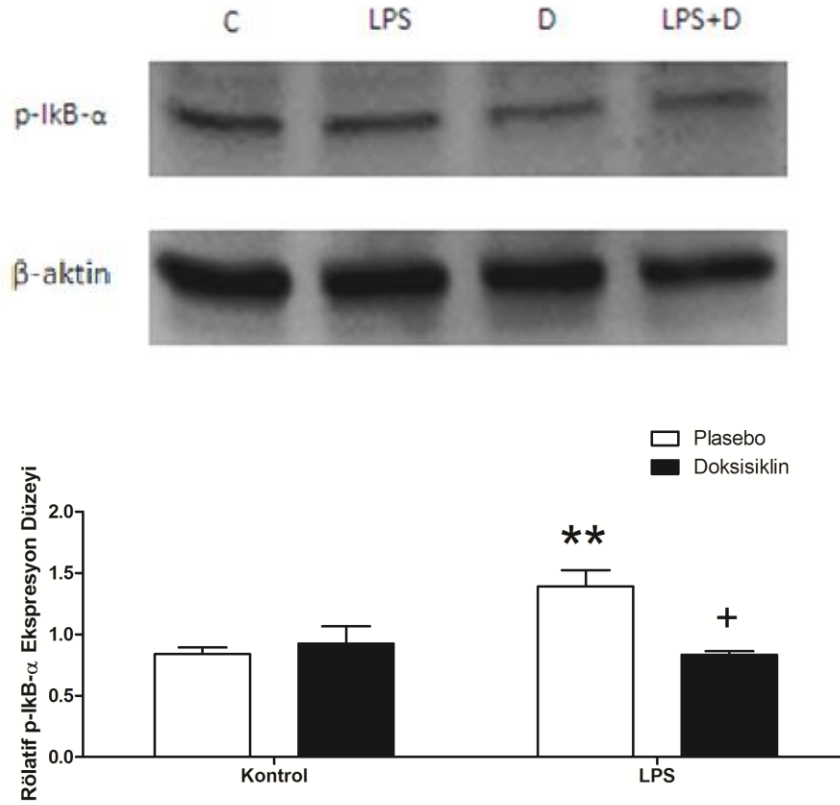
Etkili LPS ve doksisisiklin konsantrasyonunu belirleme çalışmalarında saptanan konsantrasyonlar esas alınarak, 24 saat boyunca eş zamanlı LPS ve doksisisiklin uygulamaları sonucunda elde edilen protein örneklerinde western blot yöntemi ile p-IKB- α protein ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

24 saat süre ile 0.5 μ g/ml LPS indüksiyonunun p-IKB- α ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana getirdiği belirlenmiştir. Bununla beraber tek başına 5 μ g/ml konsantrasyonda doksisisiklin uygulamasının p-IKB- α ekspresyon düzeyini değiştirmedeği, LPS ile eş zamanlı doksisisiklin uygulamasının ise p-IKB- α ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma oluşturduğu saptanmıştır. (Tablo 3.7; Şekil 3.11).

Tablo 3.7: Eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5 μ g/ml) ve doksisisiklin (5 μ g/ml) uygulamalarının p-IKB- α ekspresyon düzeyine etkisi.

Rölatif p-IKB- α Ekspresyonu	Doksisisiklin (-)	Doksisisiklin (+)
LPS (-)	0.839 $\pm$ 0.055	0.925 $\pm$ 0.140
LPS (+)	1.390 $\pm$ 0.133 **	0.834 $\pm$ 0.029 ⁺

Veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. ** $P \leq 0.01$ kontrol ile LPS; ⁺ $P \leq 0.05$ LPS ile LPS+doksisisiklin, eşleştirilmiş Student's *t*-test. (n=5)



Şekil 3.11: PC-3 hücre hattında eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisiklinin (5µg/ml) p-IkB-α ekspresyonu üzerine etkisi ve temsili western blot görüntüsü. Veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. **** $P \leq 0.01$** kontrol ile LPS; **+ $P \leq 0.05$** LPS ile LPS+doksisiklin, eşleştirilmiş Student's *t*-test. (n=5)

3.3.4. İKB KİNAZ-β (IKK-β) EKSPRESYONU

Etkili LPS ve doksisiklin konsantrasyonunu belirleme çalışmalarında saptanan konsantrasyonlar esas alınarak, 24 saat boyunca eş zamanlı LPS ve doksisiklin uygulamaları sonucunda elde edilen protein örneklerinde western blot yöntemi ile IKK-β protein ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

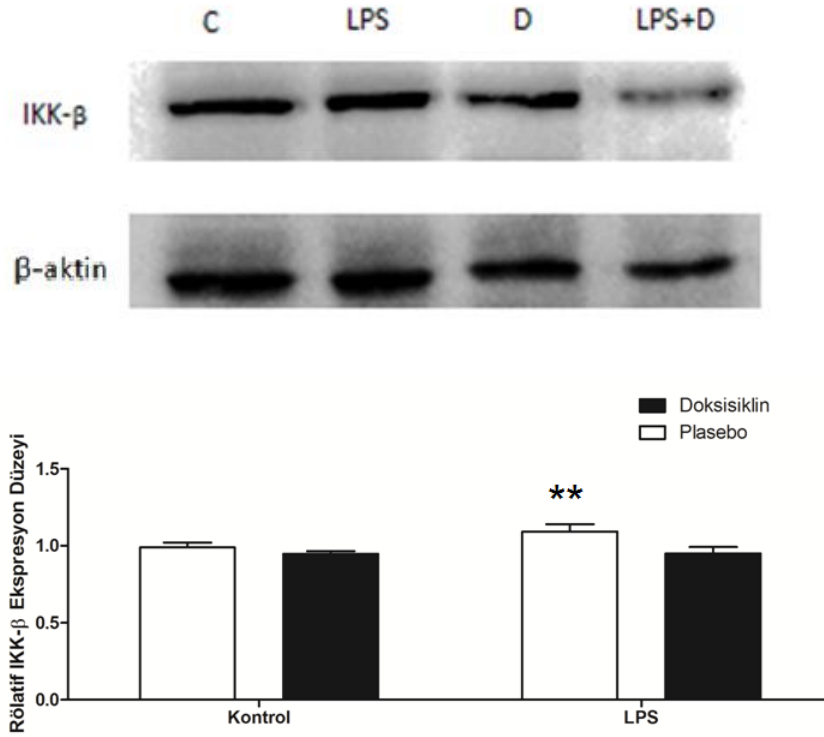
24 saat süre ile 0.5 µg/ml LPS indüksiyonunun IKK-β ekspresyonu düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana getirdiği saptanmıştır. Bununla birlikte tek başına 5 µg/ml

konsantrasyonda doksisisiklin uygulamasının IKK- β ekspresyon düzeyinde değişiklik yapmadığı, LPS ile eş zamanlı doksisisiklin uygulamasının ise IKK- β ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azalma eğilimi gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 3.8; Şekil 3.12).

Tablo 3.8: Eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5 μ g/ml) ve doksisisiklin (5 μ g/ml) uygulamalarının IKK- β ekspresyon düzeyine etkisi.

Rölatif IKK- β Ekspresyonu	Doksisisiklin (-)	Doksisisiklin (+)
LPS (-)	0.989 $\pm$ 0.033	0.948 $\pm$ 0.017
LPS (+)	1.091 $\pm$ 0.049 **	0.951 $\pm$ 0.040

Veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. ** $P \leq 0.01$ kontrol ile LPS, eşleştirilmiş Student's *t*-test. (n=5)



Şekil 3.12: PC-3 hücre hattında eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5 μ g/ml) ve doksisisiklinin (5 μ g/ml) IKK- β ekspresyonu üzerine etkisi ve temsili western blot görüntüsü. Veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. ** $P \leq 0.01$ kontrol ile LPS, eşleştirilmiş Student's *t*-test. (n=5)

3.3.5. MMP-9 EKSPRESYONU

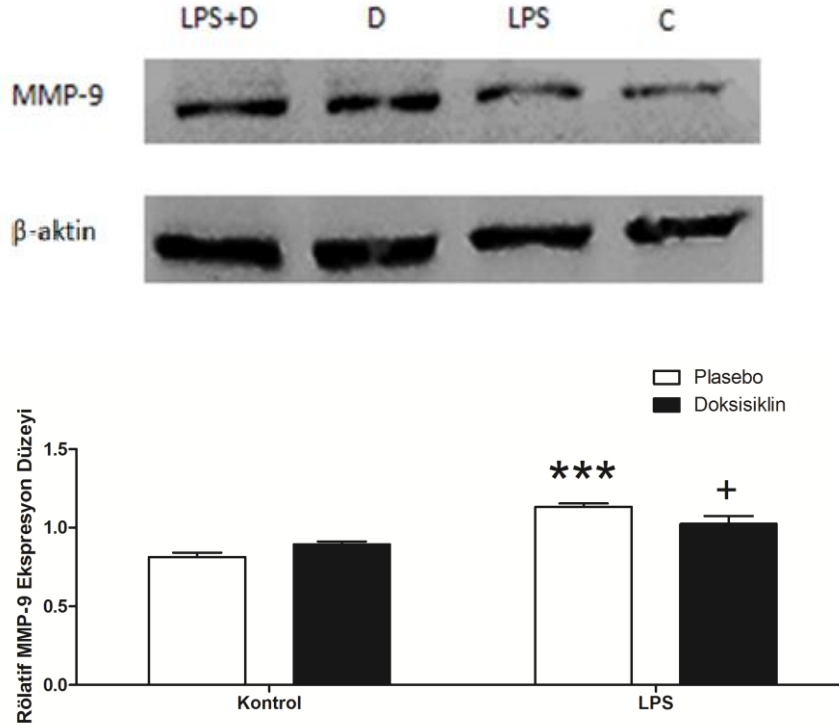
Etkili LPS ve doksisisiklin konsantrasyonunu belirleme çalışmalarında saptanan konsantrasyonlar esas alınarak, 24 saat boyunca eş zamanlı LPS ve doksisisiklin uygulamaları sonucunda elde edilen protein örneklerinde western blot yöntemi ile MMP-9 protein ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

24 saat süre ile 0.5 µg/ml LPS indüksiyonunun MMP-9 ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana getirdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte tek başına 5 µg/ml konsantrasyonda doksisisiklin uygulamasının MMP-9 ekspresyon düzeyini değiştirmezken, LPS ile eş zamanlı doksisisiklin uygulamasının ise MMP-9 ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma oluşturduğu belirlenmiştir. (Tablo 3.9; Şekil 3.13).

Tablo 3.9: Eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklin (5 µg/ml) uygulamalarının MMP-9 ekspresyon düzeyine etkisi.

Rölatif MMP-9 Ekspresyonu	Doksisisiklin (-)	Doksisisiklin (+)
LPS (-)	0.813 ± 0.028	0.895 ± 0.018
LPS (+)	1.132 ± 0.022 ***	1.025 ± 0.049 ⁺

Veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. *** $P \leq 0.005$ kontrol ile LPS; ⁺ $P \leq 0.05$ LPS ile LPS+doksisisiklin, eşleştirilmiş Student's *t*-test. (n=5)



Şekil 3.13: PC-3 hücre hattında eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklinin (5µg/ml) MMP-9 ekspresyonu üzerine etkisi ve temsili western blot görüntüsü. Veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. *** $P \leq 0.001$ kontrol ile LPS, + $P \leq 0.05$ LPS ile LPS+doksisisiklin, eşleştirilmiş Student's *t*-test. (n=5)

3.3.6. MMP-2 EKSPRESYONU

Etkili LPS ve doksisisiklin konsantrasyonunu belirleme çalışmalarında saptanan konsantrasyonlar esas alınarak, 24 saat boyunca eş zamanlı LPS ve doksisisiklin uygulamaları sonucunda elde edilen protein örneklerinde western blot yöntemi ile MMP-2 protein ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

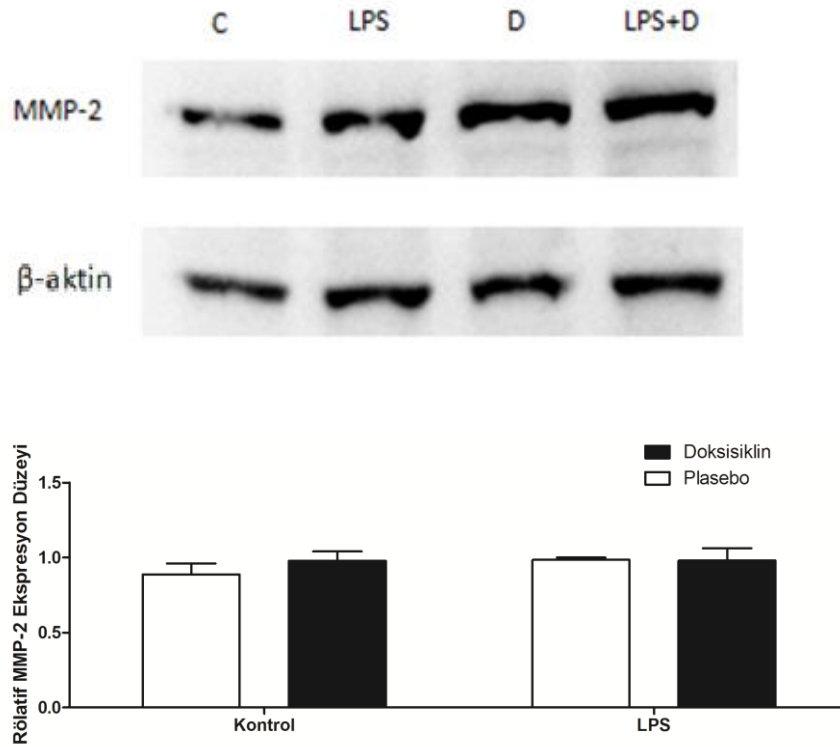
24 saat süre ile 0.5 µg/ml LPS indüksiyonunun MMP-2 ekspresyon düzeyinde anlamlı herhangi bir değişiklik meydana getirmediği saptanmıştır. Benzer şekilde tek başına 5 µg/ml konsantrasyonda doksisisiklin uygulamasının ve LPS ile eş zamanlı doksisisiklin uygulamasının da

MMP-2 ekspresyon düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde değiştirmediği belirlenmiştir (Tablo 3.10; şekil 3.14).

Tablo 3.10: Eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklin (5 µg/ml) uygulamalarının MMP-2 ekspresyon düzeyine etkisi.

Rölatif MMP-2 Ekspresyonu	Doksisisiklin (-)	Doksisisiklin (+)
LPS (-)	0.888 ± 0.074	0.979 ± 0.062
LPS (+)	0.985 ± 0.015	0.980 ± 0.082

Veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. Eşleştirilmiş Student's *t*-test. (n=6)



şekil 3.14: PC-3 hücre hattında eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklinin (5µg/ml) MMP-2 ekspresyonu üzerine etkisi ve temsili western blot görüntüsü. Veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. Eşleştirilmiş Student's *t*-test. (n=6)

3.3.7. MMP-8 EKSPRESYONU

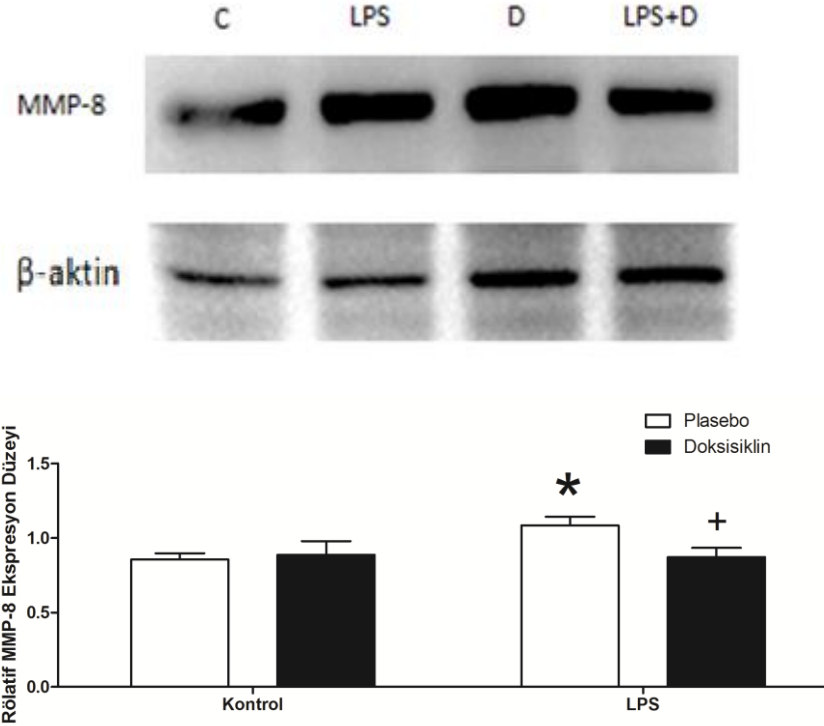
Etkili LPS ve doksisisiklin konsantrasyonunu belirleme çalışmalarında saptanan konsantrasyonlar esas alınarak, 24 saat boyunca eş zamanlı LPS ve doksisisiklin uygulamaları sonucunda elde edilen protein örneklerinde western blot yöntemi ile MMP-8 protein ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

24 saat süre ile 0.5 µg/ml LPS indüksiyonunun MMP-8 ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana getirdiği görülmüştür. Ayrıca, tek başına 5 µg/ml konsantrasyonda doksisisiklin uygulamasının MMP-8 ekspresyon düzeyini değiştirmezken, LPS ile eş zamanlı doksisisiklin uygulamasının ise MMP-8 ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma oluşturduğu anlaşılmıştır. (Tablo 3.11; Şekil 3.15).

Tablo 3.11: Eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklin (5 µg/ml) uygulamalarının MMP-8 ekspresyon düzeyine etkisi.

Rölatif MMP-8 Ekspresyonu	Doksisisiklin (-)	Doksisisiklin (+)
LPS (-)	0.855 ± 0.042	0.888 ± 0.091
LPS (+)	1.083 ± 0.060 *	0.872 ± 0.062 ⁺

Veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. * $P \leq 0.05$ kontrol ile LPS; ⁺ $P \leq 0.05$ LPS ile LPS+doksisisiklin, eşleştirilmiş Student's *t*-test. (n=5)



Şekil 3.15: PC-3 hücre hattında eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklinin (5µg/ml) MMP-8 ekspresyonu üzerine etkisi ve temsili western blot görüntüsü. Veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. * $P \leq 0.05$ kontrol ile LPS; + $P \leq 0.05$ LPS ile LPS+doksisisiklin, eşleştirilmiş Student's *t*-test. (n=5)

3.3.8. MMP-10 EKSPRESYONU

Etkili LPS ve doksisisiklin konsantrasyonunu belirleme çalışmalarında saptanan konsantrasyonlar esas alınarak, 24 saat boyunca eş zamanlı LPS ve doksisisiklin uygulamaları sonucunda elde edilen protein örneklerinde western blot yöntemi ile MMP-10 protein ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

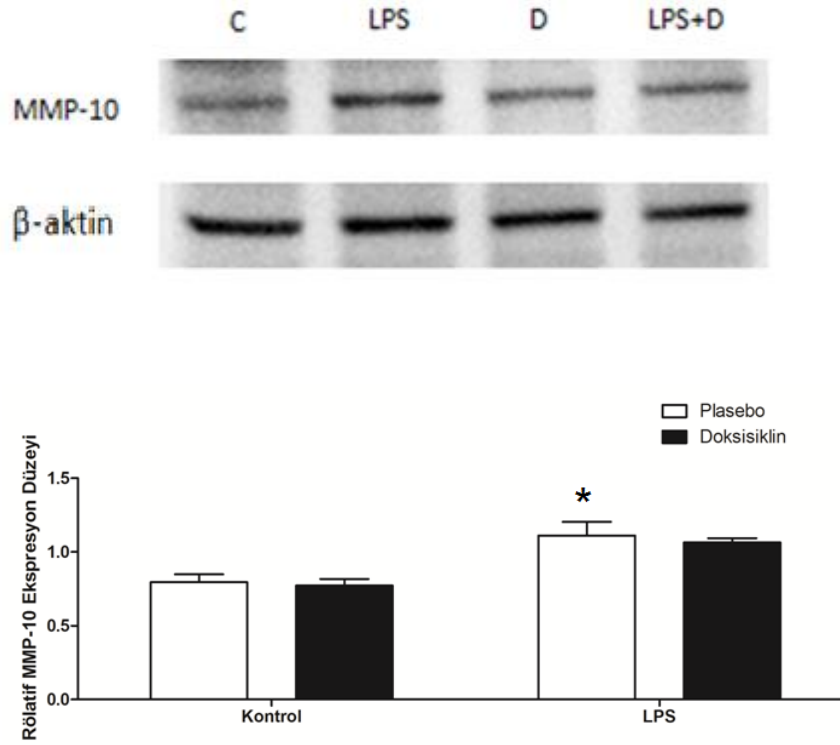
24 saat süre ile 0.5 µg/ml LPS indüksiyonunun MMP-10 ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana getirdiği saptanmıştır. Bununla birlikte tek başına 5 µg/ml konsantrasyonda doksisisiklin uygulamasının MMP-10 ekspresyon düzeyini

değiştirmezken, LPS ile eş zamanlı doksisisiklin uygulamasının ise MMP-10 ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma oluşturmaya eğilimli olduğu ancak bunun istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmadığı belirlenmiştir (Tablo 3.12; Şekil 3.16).

Tablo 3.12: Eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5µg/ml) ve doksisisiklin (5 µg/ml) uygulamalarının MMP-10 ekspresyon düzeyine etkisi.

Rölatif p-IkB-α Ekspresyonu	Doksisisiklin (-)	Doksisisiklin (+)
LPS (-)	0.794 ± 0.054	0.772 ± 0.044
LPS (+)	1.111 ± 0.092 *	1.064 ± 0.029

Veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. * $P \leq 0.05$ kontrol ile LPS, eşleştirilmiş Student's *t*-test. (n=5)



Şekil 3.16: PC-3 hücre hattında eş zamanlı olarak 24 saat süre ile uygulanan LPS (0.5 μ g/ml) ve doksisiklinin (5 μ g/ml) MMP-10 ekspresyonu üzerine etkisi ve temsili western blot görüntüsü. Veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir. * $P \leq 0.05$ kontrol ile LPS, eşleştirilmiş Student's *t*-test. (n=5)

3.4. **İMMÜMOHİSTOKİMYASAL ANALİZLER**

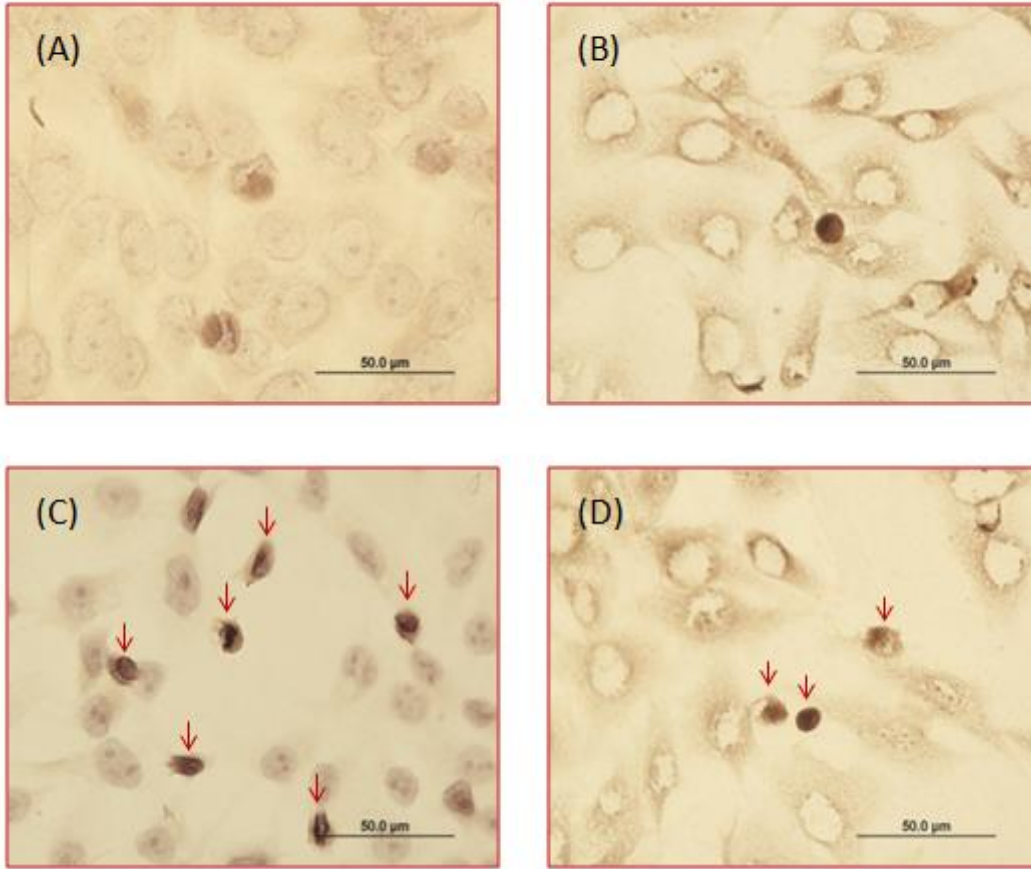
3.4.1. **NF-KB EKSPRESYONU**

Uygun ve etkili LPS ve doksisiklin konsantrasyonunu belirleme çalışmalarında saptanan konsantrasyonlar esas alınarak, 24 saat boyunca eş zamanlı LPS ve doksisiklin uygulanan hücreler üzerinde immunohistokimyasal boyama yöntemi uygulanmış ve NF-kB protein ekspresyon düzeyleri skorlanmıştır.

Buna göre, 24 saat süre ile 0.5 μ g/ml LPS indüksiyonunun NF-kB ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış oluşturduğu gözlenmiştir. Tek başına 5 μ g/ml

konsantrasyonda doksisisiklin uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmadiğı, LPS ile eş zamanlı doksisisiklin uygulamasının ise NF-kB ekspresyon düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı belirlenmiştir (Tablo 3.13; Şekil 3.17).

NFkB



Şekil 3.17: (A) Kontrol, (B) doksisisiklin, (C) LPS (D) LPS + doksisisiklinin uygulandığı PC-3 hücre gruplarında NF-kB immüno pozitivitesi için belirlenen temsili görüntüler (20X).

Tablo 3.13: Kontrol, doksisisiklin, LPS ve LPS + doksisisiklinin uygulandığı PC-3 hücre gruplarında NF-kB immüno pozitivitesine özgü skor değerleri.

NF-kB	Kontrol	LPS	Doksisisiklin	LPS + Doksisisiklin
Zayıf Boyama	3	0	3	3 ⁺
Kuvvetli Boyama	0	3 [*]	0	0

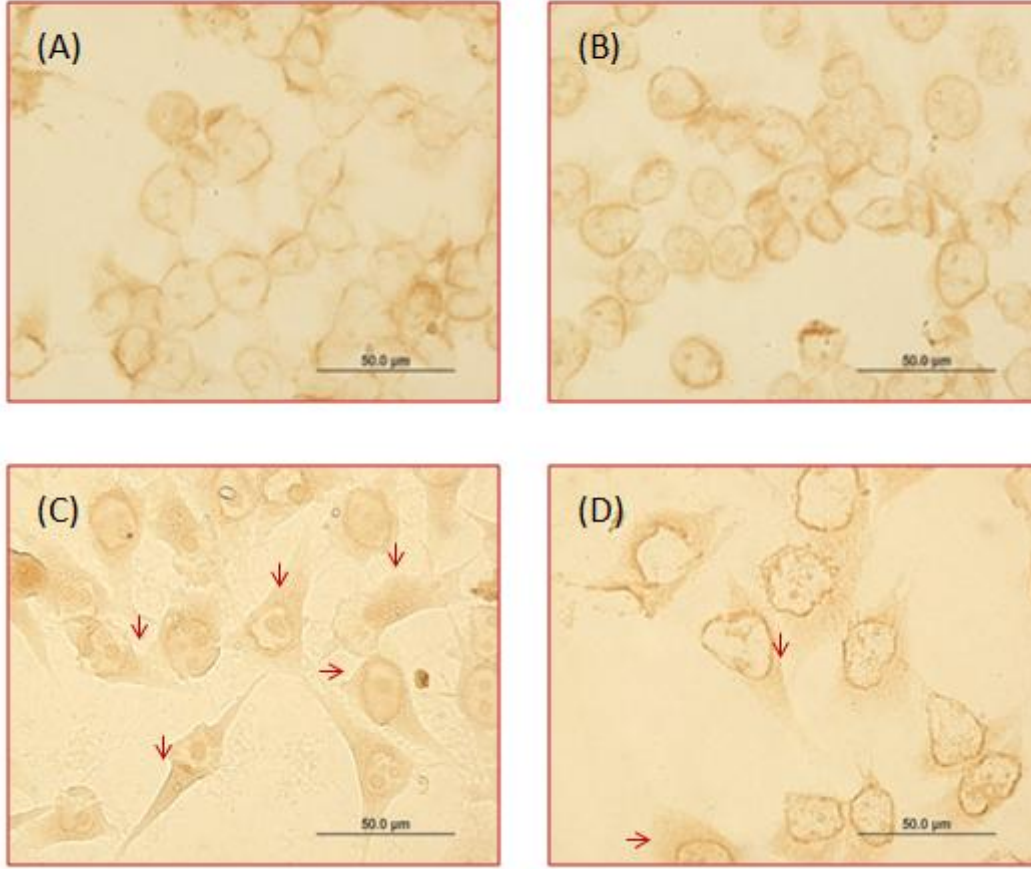
n her bir gruptaki uygulama sayısını göstermektedir. * $P \leq 0.05$ kontrol ile LPS; ⁺ $P \leq 0.05$ LPS ile LPS+doksisisiklin, Ki-kare testi. (n=3)

3.4.2. p-IKB- α EKSPRESYONU

Etkili LPS ve doksisisiklin konsantrasyonunu belirleme çalışmalarında saptanan konsantrasyonlar esas alınarak, 24 saat boyunca eş zamanlı LPS ve doksisisiklin uygulanan hücreler üzerinde immunohistokimyasal boyama yöntemi uygulanmış ve p-IkB- α protein ekspresyon düzeyleri skorlanmıştır.

Buna göre, 24 saat süre ile 0.5 μ g/ml LPS indüksiyonunun p-IkB- α ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış oluşturduğu gözlenmiştir. Tek başına 5 μ g/ml konsantrasyonda doksisisiklin uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmadığı, LPS ile eş zamanlı doksisisiklin uygulamasının ise p-IkB- α ekspresyon düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı belirlenmiştir (Tablo 3.14; Şekil 3.18).

p-IkB-α



Şekil 3.18: (A) Kontrol, (B) doksisisiklin, (C) LPS ve (D) LPS + doksisisiklinin uygulandığı PC-3 hücre gruplarında p-IkB-α immünopozitivitesi için belirlenen temsili görüntüler (20X).

Tablo 3.14: Kontrol, doksisisiklin, LPS ve LPS + doksisisiklinin uygulandığı PC-3 hücre gruplarında p-IkB-α immünopozitivitesine özgü skor değerleri.

p-IkB-α	Kontrol	LPS	Doksisisiklin	LPS + Doksisisiklin
Zayıf Boyama	3	0	3	3 ⁺
Kuvvetli Boyama	0	3 [*]	0	0

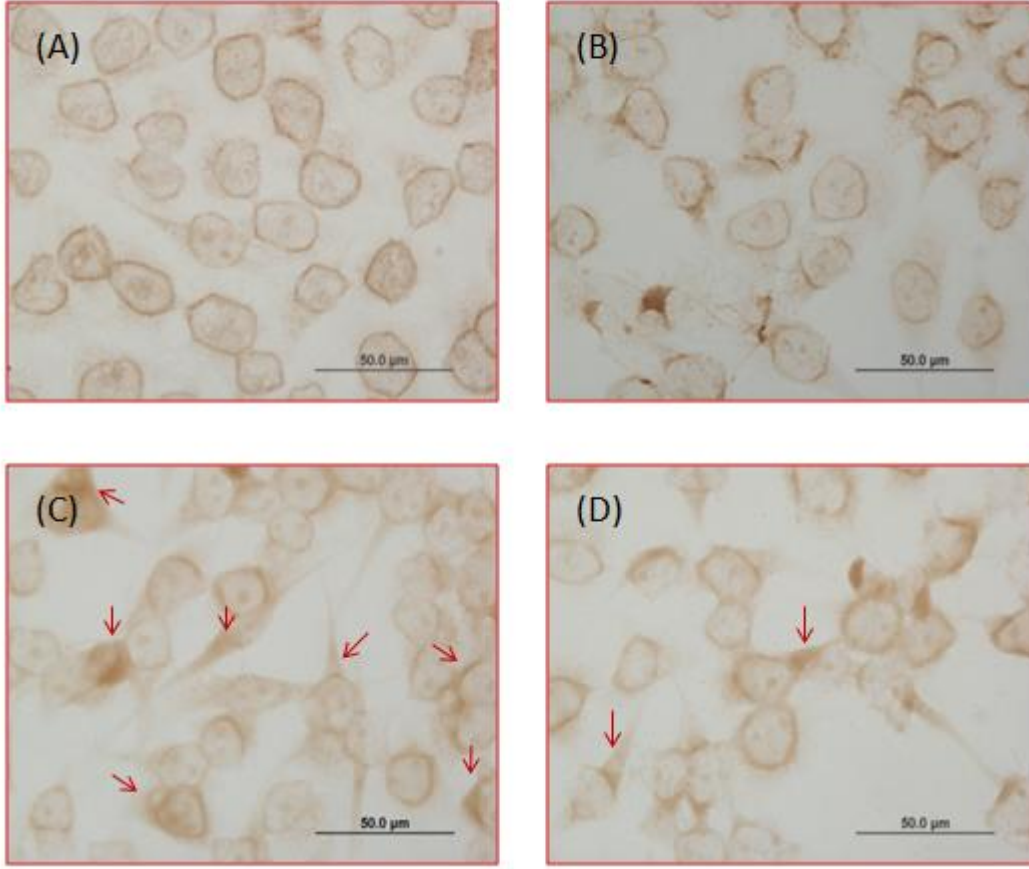
n her bir gruptaki uygulama sayısını göstermektedir. * $P \leq 0.05$ kontrol ile LPS; ⁺ $P \leq 0.05$ LPS ile LPS+doksisisiklin, Ki-kare testi. (n=3)

3.4.3. IKK- β EKSPRESYONU

Uygun ve etkili LPS ve doksisisiklin konsantrasyonunu belirleme çalışmalarında saptanan konsantrasyonlar esas alınarak, 24 saat boyunca eş zamanlı LPS ve doksisisiklin uygulanan hücreler üzerinde immünboyama yöntemi uygulanarak IKK- β protein ekspresyon düzeyleri, skorlanmıştır.

Buna göre, 24 saat süre ile 0.5 $\mu\text{g/ml}$ LPS indüksiyonunun IKK- β ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış oluşturduğu belirlenmiştir. Tek başına 5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda doksisisiklin uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmadığı, LPS ile eş zamanlı doksisisiklin uygulamasının ise IKK- β ekspresyon düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı belirlenmiştir (Tablo 3.15; Şekil 3.19).

IKK- β



Şekil 3.19: (A) Kontrol, (B) doksisisiklin, (C) LPS ve (D) LPS + doksisisiklinin uygulandığı PC-3 hücre gruplarında IKK- β immüno pozitivitesi için belirlenen temsili görüntüler (20X).

Tablo 3.15: Kontrol, doksisisiklin, LPS ve LPS ile doksisisiklinin birlikte uygulandığı PC-3 hücre gruplarında IKK- β immüno pozitivitesine özgü skor değerleri.

IKK- β	Kontrol	LPS	Doksisisiklin	LPS + Doksisisiklin
Zayıf Boyama	3	0	3	3 ⁺
Kuvvetli Boyama	0	3 [*]	0	0

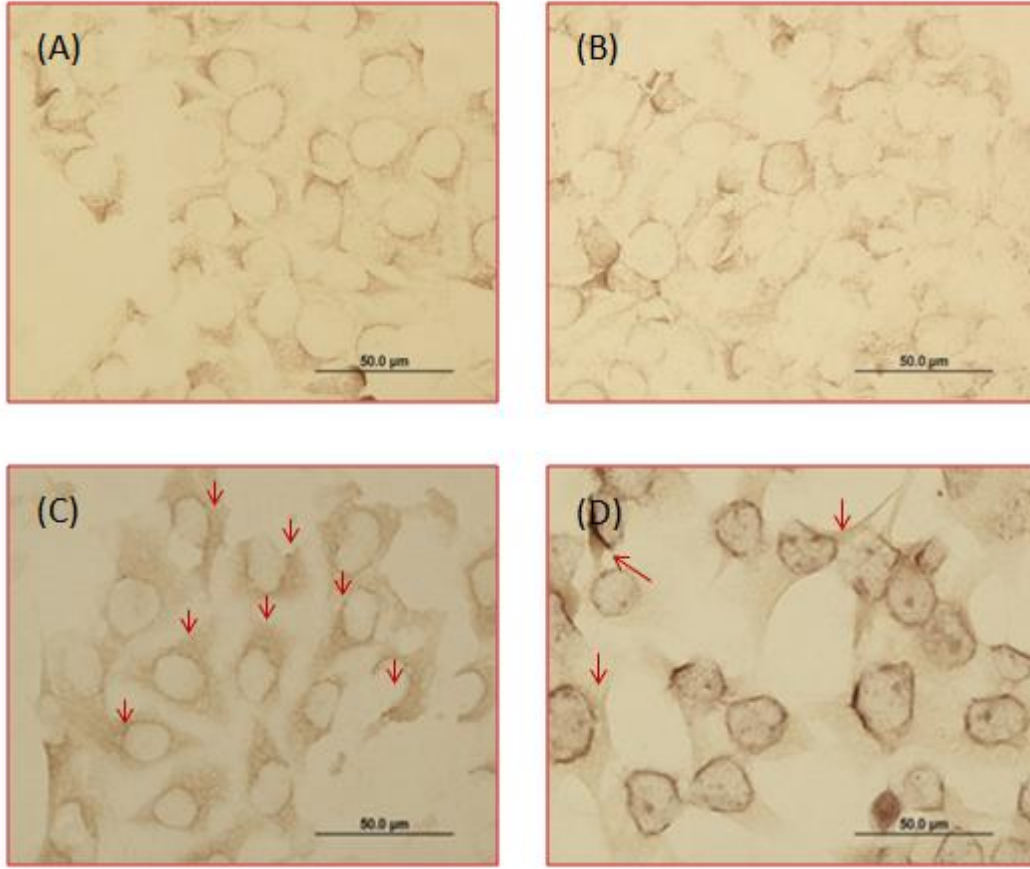
n her bir gruptaki uygulama sayısını göstermektedir. * $P \leq 0.05$ kontrol ile LPS; ⁺ $P \leq 0.05$ LPS ile LPS+doksisisiklin, Ki-kare testi. (n=3)

3.4.4. MMP-9 EKSPRESYONU

Uygun ve etkili LPS ve doksisisiklin konsantrasyonunu belirleme çalışmalarında saptanan konsantrasyonlar esas alınarak, 24 saat boyunca eş zamanlı LPS ve doksisisiklin uygulanan hücreler üzerinde immünboyama yöntemi uygulanarak MMP-9 protein ekspresyon düzeyleri, skorlanmıştır.

Buna göre, 24 saat süre ile 0.5 µg/ml LPS indüksiyonunun MMP-9 ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış oluşturduğu gözlenmiştir. Tek başına 5 µg/ml konsantrasyonda doksisisiklin uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmadığı, LPS ile eş zamanlı doksisisiklin uygulamasının ise MMP-9 ekspresyon düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı saptanmıştır (Tablo 3.16; Şekil 3.20).

MMP-9



Şekil 3.20: (A) Kontrol, (B) doksisisiklin, (C) LPS ve (D) LPS + doksisisiklinin uygulandığı PC-3 hücre gruplarında MMP-9 immünopozitivitesi için belirlenen temsili görüntüler (20X).

Tablo 3.16: Kontrol, doksisisiklin, LPS ve LPS + doksisisiklinin uygulandığı PC-3 hücre gruplarında MMP-9 immünopozitivitesine özgü skor değerleri. n her bir gruptaki uygulama sayısını göstermektedir. * $P \leq 0.05$ kontrol ile LPS; + $P \leq 0.05$ LPS ile LPS+doksisisiklin, Ki-kare testi. (n=3).

MMP-9	Kontrol	LPS	Doksisisiklin	LPS + Doksisisiklin
Zayıf Boyama	3	0	3	3 ⁺
Kuvvetli Boyama	0	3 [*]	0	0

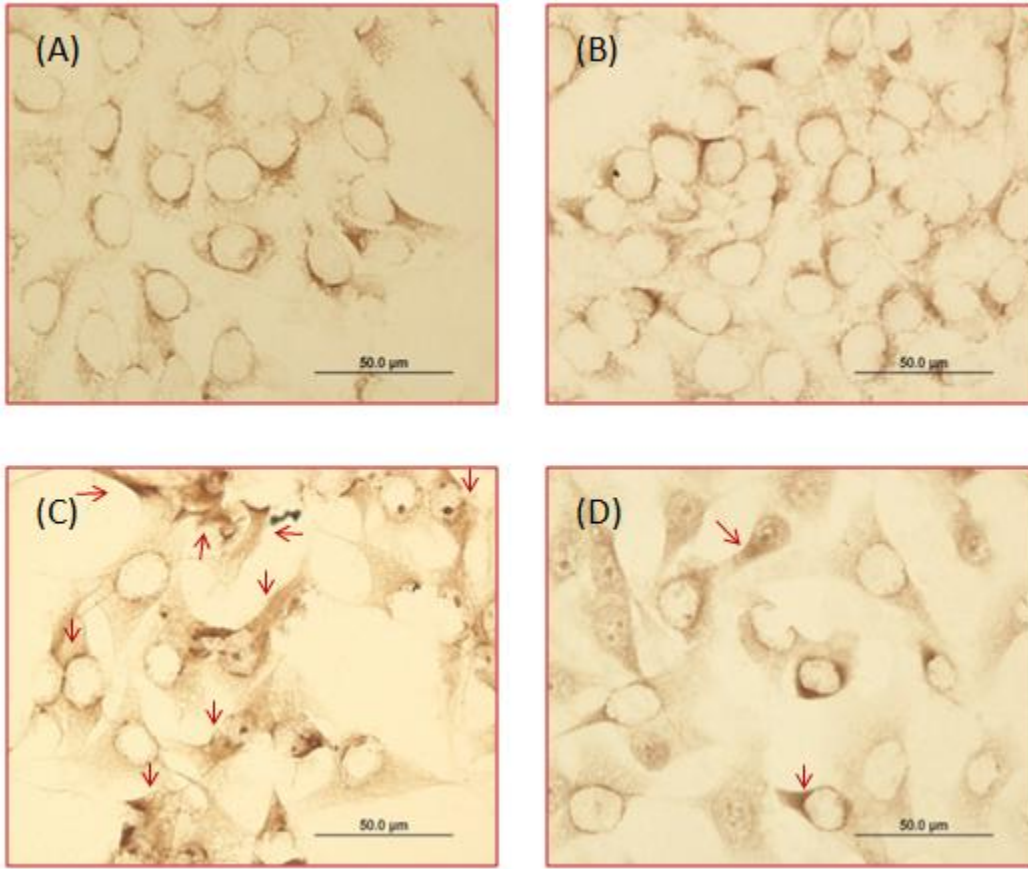
n her bir gruptaki uygulama sayısını göstermektedir. * $P \leq 0.05$ kontrol ile LPS; + $P \leq 0.05$ LPS ile LPS+doksisisiklin, Ki-kare testi. (n=3)

3.4.5. MMP-8 EKSPRESYONU

Uygun ve etkili LPS ve doksisisiklin konsantrasyonunu belirleme çalışmalarında saptanan konsantrasyonlar esas alınarak, 24 saat boyunca eş zamanlı LPS ve doksisisiklin uygulanan hücreler üzerinde immünboyama yöntemi uygulanarak MMP-8 protein ekspresyon düzeyleri, skorlanmıştır.

Buna göre, 24 saat süre ile 0.5 g/ml LPS indüksiyonunun MMP-8 protein düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış oluşturduğu belirlenmiştir. Tek başına 5 g/ml konsantrasyonda doksisisiklin uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmadığı, LPS ile eş zamanlı doksisisiklin uygulamasının ise MMP-8 ekspresyon düzeyini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı belirlenmiştir (Tablo 3.17; şekil 3.21).

MMP-8



Şekil 3.21: (A) Kontrol, (B) doksisiklin, (C) LPS ve (D) LPS + doksisiklinin uygulandığı PC-3 hücre gruplarında MMP-8 immünopozitivitesi için belirlenen temsili görüntüler (20X).

Tablo 3.17: Kontrol, doksisiklin, LPS ve LPS + doksisiklinin uygulandığı PC-3 hücre gruplarında MMP-8 immünopozitivitesine özgü skor değerleri. n her bir gruptaki uygulama sayısını göstermektedir.

MMP-8	Kontrol	LPS	Doksisiklin	LPS + Doksisiklin
Zayıf Boyama	3	0	3	3 ⁺
Kuvvetli Boyama	0	3 [*]	0	0

n her bir gruptaki uygulama sayısını göstermektedir. * $P \leq 0.05$ kontrol ile LPS; ⁺ $P \leq 0.05$ LPS ile LPS+doksisiklin, Ki-kare testi. (n=3)

BÖLÜM IV

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda androjenden bağımsız insan prostat kanseri kemik metastazı hücreleri olan PC-3 hücre kültüründe LPS indüksiyonu sonrası MMP ekspresyon ve aktivitesinin düzenlenmesinde NF-kB sinyalizasyonunun rolü ve MMP inhibitörü olarak yaygın kabul gören doksisisiklinin bu sinyal yolağı ile MMP'ler üzerindeki inhibitör etkileri incelenmiştir.

İnflamasyonun önemli bileşenlerinden olan MMP'lerin kanser patojenezinin aşamaları olarak kabul edilen proliferasyon, invazyon ve metastaz aşamalarındaki rolleri iyi bilinmektedir. Bu nedenle çalışmamızda günümüzde önemli morbidite ve mortalite oranına sahip bir kanser türü olan insan prostat kanserini iyi biçimde taklit eden PC-3 hücre hattı kullanılmıştır. PC-3 hücre hattı androjenden bağımsız prostat kanseri kemik metastazını en iyi şekilde temsil etmesi nedeniyle, prostat kanseri çalışmalarında kullanılan diğer hücre hatları olan LNCaP (androjene bağımlı prostat kanseri lenf nodu metastazı hücre hattı), DU145 (androjenden bağımsız prostat kanseri beyin metastazı hücre hattı), MDA PCa 2b (androjene bağımlı prostat kanseri kemik metastazı hücre hattı) gibi hücre hatlarından farklılık göstermektedir (77).

4.1. *NF-kB VE KANSER İLİŞKİSİ*

NF-kB, hemen hemen bütün hayvan hücre tiplerinde bulunan, transkripsiyon faktörü protein kompleksidir (174). NF-kB transkripsiyon faktörleri, hem apoptoz hem de nekroz aracılığıyla programlanmış hücre ölümlerinin majör regülatörü olarak bilinmektedir. Bu nedenle NF-kB aktivitesinin pek çok hücre sisteminin fizyolojik fonksiyonları, homeostazı ve normal doku gelişimi için önemli bir araç olduğu düşünülmektedir (60). Ancak, stres, sitokinler, serbest radikaller, ultraviyole radyasyon, okside LDL, bakteriyel veya viral antijenler gibi uyaranlara maruziyet ile NF-kB yolağında anormal regülasyonların, nörodejenerasyondan kansere kadar değişen pek çok hastalığa yol açtığı belirlenmiştir (142). Bu hastalık gruplarında NF-kB

aktivitesinin programlanmış hücre ölümünü regüle etmek yerine, patolojik sürecin sürdürülmesine ve uygulanan tedaviye direnç gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (60). Günümüzde anormal NF-kB regülasyonunun, hodgkin lenfoma, multipl miyelom, primer mediastinal B-hücre lenfoması, tedaviye dirençli yaygın büyük hücreli B-hücre lenfoması, çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemisi, göğüs, prostat, over, akciğer, kolon, böbrek ve beyin kanseri gibi pek çok solid ve hematopoetik kanser türüyle ilişkili olduğu kabul edilmektedir (142).

Prostat kanseri hücre hatlarıyla yapılan pek çok çalışma, NF-kB aktivasyonunun anti-apoptotik protein ekspresyonlarını artırdığını, uygulanan anti-tümör tedavinin etkinliğini düşürdüğünü, böylece malign fenotipin gelişimine yardımcı olduğunu göstermiştir. Yine pek çok çalışma normal prostat epitel hücre hatlarında NF-kB yolağını aktiveleyen fosforile IKK- α/β (p-IKK- α/β), fosforile I κ B- α (p-I κ B- α), NF-kB (p65, p50) gibi proteinlerin bazal düzeyde iken, prostat kanseri hücrelerinde yapısal olarak aktif halde olduklarını göstermiştir (77, 169, 187). Palayoor ve arkadaşları, PC-3, DU-145, LNCaP gibi prostat kanseri hücre hatlarında NF-kB yolağına ait proteinlerin ekspresyonunun hücrelerin androjene bağımlı veya bağımsız olmalarına göre farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmaya göre, androjenden bağımsız PC-3 ve DU-145 hücrelerinde, NF-kB'nin DNA'ya bağlanma aktivitesinin yüksek, NF-kB aktivasyonuna aracılık eden IKK- α 'nın aktif, NF-kB'nin yapısal inhibitörü olan I κ B- α düzeylerinin ise düşük olduğu belirtilmiştir. Androjene bağımlı LNCaP'lerde ise NF-kB ve IKK- α 'nın yapısal olarak bazal düzeyde olmasına karşın, çeşitli uyaranlarla aktiveleşebileceği belirtilmiştir (169).

NF-kB proliferasyon, anjiyogenez, metastaz, tümör gelişimi, inflamasyon ve apoptozun baskılanması ile ilgili genlerin transkripsiyonel aktivasyonlarını modüle edebilen bir sinyal yolağıdır. NF-kB'nin bloke edilmesi, tümör hücrelerinin proliferasyonunda azalmaya sebep olması ve/veya bu hücreleri anti-tümör ajanların etkilerine daha duyarlı hale getirmesi nedeniyle

günümüzde büyük önem kazanmıştır (142). Bunu destekler nitelikte Gilmore ve Herscovitch'in yaptığı bir araştırmada NF-kB sinyalizasyonunun inhibisyonu için kullanılan sekiz yüze yakın farklı bileşik olduğu belirtilmiştir (80). Bugüne kadar NF-kB sinyal yolağını inhibe eden ilaçlarla pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan birinde PC-3 ve DU-145 hücrelerinde yapısal olarak bulunan, LNCaP'lerde ise indüklenen NF-kB ve IKK- α aktivitelerinin anti-inflamatuvar bir ilaç olan ibuprofen ile inhibe edilebileceği bildirilmiştir (169).

4.2. ***LPS'İN PROLİFERATİF ETKİSİ***

İnflamasyon, prostatında büyüme gözlenen hastalardan alınan patolojik doku örneklerinde sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Prostat büyümesi ile inflamasyon arasındaki ilişkiye özgü kesin mekanizma henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, makrofajların veya lenfositlerin aktivasyonu ve sitokinlerin ekspresyonunun bu süreçte önemli role sahip olabileceği düşünülmektedir. Makrofajlarda olduğu gibi, prostat epitel hücrelerinin de inflamasyon sürecini tetikleyen proinflamatuvar sitokinleri salıverme özelliğine sahip olması bu fikri desteklemektedir (105).

LPS (Lipopolisakkarit), gram negatif bakteri hücre duvarının, glikolipit özellikteki yapısal ve temel bileşeni olan bir endotoksindir (66). LPS aynı zamanda makrofajlar için en potent aktivatör olarak bilinmektedir (140). Pikogram düzeyindeki konsantrasyonlarının dahi makrofajları aktive edebildiği gösterilmiştir (66). LPS'in lipit A parçası ile aktive olan makrofajlarda sırasıyla önce hücresel aktivasyonun gerçekleştiği, ardından sistemik toksisiteye dönüşen aktif pro-inflamatuvar moleküllerin saliverilmesinin uyarıldığı bilinmektedir (66). Bunlar arasında TNF- α , IL-1 β , IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin ve ek olarak nitrik oksit, prostaglandin E2 gibi diğer inflamatuvar medyatörler ve MMP'lerin olduğu belirtilmiştir (140). Kanseri hücrelerinde ilaca karşı direnç gelişiminde, proliferasyon, migrasyon ve invazyon gibi süreçlerde Toll benzeri reseptörlerin (TLR) rol oynadığı pek çok çalışmada bildirilmiştir.

Bunlardan özellikle TLR4'ün prostat kanserinde yüksek oranda eksprese edildiği ve tümör hücrelerinin sağ kalımı ile proliferasyonuna yardımcı olduğu gösterilmiştir (123,237). Bu nedenle prostat kanserinin incelenmesinde, güçlü bir inflamasyon ve proliferasyon tetikleyicisi olarak görev yapan ve TLR ligandı olan LPS'e olan ilgi artmıştır. Sağlıklı prostat epitel hücrelerinde ve prostat kanser hücrelerinde yapılan pek çok çalışma LPS'in bu hücrelerde proliferasyonu stimüle ettiğini de göstermiştir (77,123,172). Iglesias-Gato ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 1µg/ml konsantrasyondaki LPS'in PC-3 hücrelerinde oluşturduğu proliferatif yanıt 5 gün boyunca izlenmiş ve LPS'in 24. saatten itibaren bu hücrelerin proliferasyonunda anlamlı düzeyde indükleyici etki gösterdiği belirlenmiştir (105). Tüm bu verilere ek olarak, günümüz araştırmalarında erkek genitoüriner sistemi enfeksiyonlarının çoğunlukla prostat kanserine de yol açabilen gram (-) bakterilerden kaynaklandığının gösterilmesi ve LPS'in gram (-) bakteri kaynaklı bir ajan olması (123) nedeniyle, çalışmamızda bu ajanın indükleyici olarak kullanılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla 24 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.5, 5 µg/ml) LPS indüksiyonu sonucunda PC-3 hücrelerinde gelişen proliferatif yanıtlar tripan mavisi hücre sayımı yöntemi ile değerlendirilmiş, 0.5µg/ml konsantrasyonda LPS kullanımının 24 saat için en iyi proliferatif yanıtı verdiği gözlenmiştir.

4.3. LPS'İN MMP'LERE ETKİSİ

Farklı hücrelerde TNF-α, LPS, IL-1β gibi çeşitli sitokinler ve TGF-β, HGF, EGF gibi büyüme faktörleri aracılığıyla MMP aktivitesinin kontrol edilebildiği pek çok araştırma grubu tarafından gösterilmiştir (140,149,188). Bu indüksiyon ajanlarından LPS ile farklı hücre hatlarında yapılmış çok sayıda çalışma olduğu görülebilmektedir. Sıçan mikrogliya hücre hattında (HAPI) yapılan bir çalışma, LPS indüksiyonunun MMP-1, MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonlarını mRNA ve protein düzeyinde belirgin olarak artırdığını göstermiştir (145). Mikroglialara ait farklı bir hücre hattında (BV-2) çalışan diğer bir araştırma grubu, LPS ile MMP-3'ün mRNA ve protein düzeyinde indüklenebildiğini göstermiştir (32). Sıçan mikrogliya ve astrositlerinin primer

kültürlerinde LPS indüksiyonu ile MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonunda benzer şekilde belirgin artış meydana geldiği gözlenmiştir (86). Jackson ve arkadaşlarının tam insan kanı kullanarak yaptığı bir çalışmada LPS indüksiyonunun Tip1 transizyonel B hücreleri ve T1 hücrelerinde MMP-9 düzeylerini arttırdığı belirtilmiştir (108). Sıçanların diz eklemlerinden alınan sinoviyal membranları üzerinde *in vitro* olarak yapılan bir başka çalışmada ise, LPS indüksiyonunun MMP1a, MMP-1b, MMP-3, MMP-9, MMP-13, MMP-14, TIMP-1 ve TIMP-3 mRNA düzeylerinde artma oluşturduğu, MMP-2, TIMP-2 ve TIMP-4 düzeylerinde ise azalmaya neden olduğu saptanmıştır (104). Sağlıklı kişilerden alınan nötrofiller üzerinde yapılan bir çalışmada LPS'in MMP-7, MMP-8, MMP-9 ve TIMP-1 düzeylerinde indükleyici role sahip olduğu gösterilmiştir (201). Bu çalışmalardan farklı olarak, insan hepatoblastoma hücre hattında (HepG2) LPS'in MMP-2 ve TIMP-2 mRNA düzeyleri ile MMP-2/TIMP-2 oranını artırırken jelatinaz aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (98). Kemik iliği hücreleri ve mutasyona uğramış farelerden alınan B hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise, B hücrelerinde MMP-9'un spontan olarak üretildiği, LPS'in pro-B, pre-B ve olgunlaşmamış B hücrelerinde belirgin bir etki göstermezken olgunlaşmış B hücrelerinde MMP-9 sekresyonunu stimüle ettiği belirlenmiştir (149). Tüm bu çalışmalara dayanarak LPS'in az sayıda farklı hücrede farklı yanıtlara da sebep olabilmesine karşın pek çok hücrenin MMP ekspresyon ve aktivitesi üzerinde indükleyici rolü olduğu görülmektedir. Prostat kanseri hücre hatlarında LPS'in MMP'leri indüklediğini gösteren çok sayıda çalışma da bulunmaktadır. Bunlardan birinde, PC-3 ve LNCaP hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda ve farklı sürelerde LPS indüksiyonunun benin prostat hiperplazisinde (BPH) özellikle TLR-4-5-7-9'un, prostat kanserinde (PCA) ise özellikle TLR-1-2-3'ün ekspresyonlarında artış meydana getirdiği ifade edilmiştir. Bununla birlikte, incelemeye alınan BPH hastalarında kısmen MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonu gözlenirken, PCA'lı hastaların tamamında MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonu olduğu saptanmıştır (122). Bu çalışmanın aksine Klein ve arkadaşları LNCaP hücreleri üzerinde LPS (5µg/ml, 48sa) indüksiyonunun matrisilin grubu MMP'lerin

ekspresyonunu değiştirmediğini savunmuşlardır (120). Bu bulgular, LPS ile indüklenen MMP yanıtlarının farklı dokulardan kaynaklanan hücreler kadar kanserli prostat dokusundan kaynaklanan hücrelerin androjene bağımlı olup olmamasına göre de değişiklik gösterebileceğini düşündürmüştür. Çalışmamızda PC-3 hücrelerinde indüksiyon oluşturmak için belirlediğimiz LPS'in (0.5µg/ml, 24sa) jelatinaz grubu MMP'lerin (MMP-2, -9) ekspresyon ve aktivitelerini arttırdığı jelatin zimografi analizleri ile gösterilmiştir. Bu sonuçlar tripan mavisi ile sayım yöntemi sonucunda belirlediğimiz LPS indüksiyonunun konsantrasyon ve süresinin MMP indüksiyonu oluşturmak ve prostat kanseri sürecini incelemek için de uygun olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte çoğu kanser hücresinde görüldüğü gibi bizim çalışmamızda kullandığımız PC-3 hücrelerinde de LPS ile indüksiyonu sonucunda jelatinaz aktivitelerinin ekspresyonlara kıyasla daha belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir. Jelatin zimografi incelemelerimiz de her iki jelatinazın ekspresyonlarından çok, aktivitelerinin arttığını göstermiştir. Jelatinazlar arasında ise daha önce Huang ve arkadaşlarının da belirttiği gibi PC-3 hücrelerinde özellikle MMP-9'daki artışı MMP-2'ye kıyasla daha fazla olduğu saptanmıştır (101). Gerçekten de aynı hücre hattında LPS indüksiyonu ile yaptığımız araştırmamızda MMP-9 ekspresyon ve aktivitesi anlamlı düzeyde artarken, MMP-2 aktivitesinin düşük oranda artış gösterdiği ve ekspresyonunun ise değişmediği belirlenmiştir. Yine yaptığımız incelemeler sonucunda LPS'in kanser veya prostat hücrelerinde MMP-8 ve MMP-10 düzeylerinde oluşturduğu etkileri inceleyen herhangi bir çalışmanın bulunmadığı saptanmıştır. Bu kapsamda incelemelerimiz sonucunda bir kanser ve prostat hücre hattı olan PC-3 hücrelerinde LPS'in MMP-8 ve MMP-10 ekspresyonlarında artışa yol açtığı ilk kez tarafımızdan gösterilmiştir.

4.4. *LPS'İN NF-kB YOLAğINA ETKİLERİ*

LPS ile stimölasyonun, NF-kB yolağının yanı sıra, mitojenle aktive olan protein kinaz yolağı (MAPK; ERK1 ve 2, JNK ve p38) dahil pek çok hücre içi sinyal yolağı aracılığıyla da gerçekteşebileceği belirtilmektedir. Kesin olmamakla birlikte bu sinyal yolağlarının NF-kB

(p50/65) ve AP-1(c-Fos/c-Jun) gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerini aktif hale getirebileceği de gösterilmiştir (90). Farklı hücre hatlarında LPS'in doğrudan ya da diğer yollar aracılığıyla dolaylı olarak NF-kB sinyal yolağı üzerinde oluşturduğu düşünülen etkilerini değerlendiren çok sayıda çalışma yapılmıştır. İnsan mezenşimal kök hücreleri üzerinde LPS stimülasyonu ile NF-kB yolağı arasındaki ilişkiyi değerlendiren bir çalışmada, bu hücrelerdeki NF-kB aktivitesinde LPS ile anlamlı derecede artış oluşturulabileceği tespit edilmiş, benzer şekilde farklı kök hücre çalışmalarında da NF-kB'nin proliferasyon, farklılaşma ve migrasyon süreçlerinde rol alabileceği aynı çalışmada ifade edilmiştir (40). BPH ve PCA oluşumu ve gelişiminden inflamasyonlu prostat düz kas hücrelerinin sorumlu olabileceğini belirten Leimgruber ve arkadaşları, LPS (0.1, 1, 10µg/ml) ile indüklenen normal sıçan primer prostat düz kas hücrelerinde 10. dakikadan itibaren NF-kB ve TLR4 ekspresyonlarının arttığını ancak CD14 (LPS sinyal yolağının ko-reseptörü) düzeyinde herhangi bir değişiklik oluşmadığını bildirmişlerdir. Aynı araştırmada artan NF-kB ekspresyonunun 30. ve 120.dakikalarda zamana bağlı olarak azaldığı belirtilmiştir (129). Bu araştırmanın sonuçları LPS ile indüklenen prostat hücrelerinin NF-kB ekspresyon yanıtlarının canlı türüne, hücrenin kökenine ve hücrelerin sağlıklı ya da kanser oluşuna göre değişebileceğini göstermektedir. Prostat kanseri akciğer metastazı epitel hücre hattı olan MAT-LU hücreleri ile yapılan diğer bir çalışmada ise LPS (1µg/ml, 24sa) indüksiyonu ile hücrelerdeki TLR4 ve CD14 mRNA düzeyleriyle paralel olarak NF-kB nükleer translokasyonunun arttığı bildirilmiştir (78). Sağlıklı insan prostat epitel hücre hattı RWPE-1'lerde çalışan Kim ve arkadaşları, LPS (10µg/ml, 1sa) ile uyarımın p-IkB-α ekspresyonunda artma, IkB-α ekspresyonunda ise azalma oluşturduğunu gözlemlemiş, LPS'in bu hücrelerde NF-kB aktivasyonunu uyarabileceği sonucuna varmışlardır (117). RWPE-1 hücrelerinde çalışan Kundu ve arkadaşları, LPS'in NF-kB ekspresyonu üzerindeki bu indükleyici etkisinin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak değişebileceğini belirtmişlerdir. İlgili çalışmada, 10 ve 100ng/ml konsantrasyonlarda LPS indüksiyonu ile NF-kB aktivitesinin 24. saatte maksimum

şekilde arttığı, daha sonra azaldığı ve bu azalmanın 120. saate kadar devam ettiği belirtilmiştir. 1ng/ml gibi düşük konsantrasyonlarda ise LPS indüksiyonunun NF-kB'nin aktivasyonunu zamana bağlı olarak 120. saate kadar artırdığı da ifade edilmiştir (123). Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara paralel olarak, epitel kaynaklı prostat kanser hücre hattı olan PC-3 hücrelerinde yaptığımız çalışmamızda da 24 saat süreli LPS indüksiyonunun NF-kB ve p-IkB- α ekspresyonlarını arttırdığı gözlenmiş ancak Kim ve arkadaşlarının çalışmalarından farklı şekilde IkB- α ekspresyonunun değişmediği saptanmıştır. Çalışmamızda kullandığımız IkB- α antikorunun total IkB- α düzeyini belirlemeye yönelik bir antikor olması nedeniyle, belirlediğimiz total IkB- α düzeyinin p-IkB- α ve IkB- α ekspresyonlarının toplamını temsil ettiği ve 24 saat gibi uzun bir sürede p-IkB- α düzeyi artarken, IkB- α düzeyinin azalmış olabileceği, bu nedenle de total düzeyin değişmediği düşünülmüştür. Bununla birlikte LPS indüksiyonu sonucunda 24. saatte NF-kB, p-IkB- α ve IKK- β düzeylerinin hem western blot yöntemi ile hem de immünohistokimyasal olarak artmış şekilde görülmesi, NF-kB yolağının hala aktif durumda olduğunu ve uyarılara cevap verebildiğini göstermektedir. Bir başka çalışmada ise LPS ile uyarılmış THP-1 makrofaj hücreleri tarafından salınan proinflatuvar sitokinlerin bulunduğu ortama maruz kalan androjene bağımlı prostat kanseri epitel hücre hattı LNCaP'lerin NF-kB ekspresyonlarında artma olduğu saptanmıştır. Buna karşın LNCaP'lere 3 saat boyunca aynı konsantrasyonda doğrudan LPS uygulamasının ise NF-kB ekspresyonunu değiştirmedeği gözlenmiştir (231). Bu sonuçlar NF-kB gibi androjene bağımlı prostat hücrelerinde LPS indüksiyonun diğer indükleyici faktörler olmaksızın NF-kB ekspresyonunu doğrudan etkileyebileceğini göstermiştir. Androjenden bağımsız prostat kanseri hücreleri olan DU145 ve JCA1 hücrelerinin kullanıldığı bir çalışmada ise 1.5 μ g/ml LPS ve 7.5ng/ml TNF ile NF-kB sinyalizasyonun uyarılabildiği belirtilmiştir (76). Bu bulgular androjenden bağımsız prostat kanser hücrelerinde NF-kB sinyalizasyonunun LPS ile indüklenebileceğini düşündürmüştür. Bu çalışmaların dışında tek başına LPS uygulamasının PC-3 hücrelerindeki NF-kB ekspresyonları

üzerindeki etkilerini değerlendiren farklı çalışmalar da yapılmıştır. Bunlardan Iglesias-Gato ve arkadaşlarının çalışmasında, diğer androjenden bağımsız hücrelerde olduğu gibi PC-3 hücrelerinde de LPS ile NF-kB aktivasyonunun uyarılabildiği görülmüş ve bu etkinin LPS'in TLR-4'leri dolaylı ya da dolaysız olarak etkilemesinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (105). Benzer şekilde DU145 ve PC-3'lerde yapılan bir diğer çalışmada LPS (1µg/ml, 30dak) indüksiyonu ile NF-kB aktivasyonunun arttığı saptanmıştır. Aynı çalışmada inhibitör etkili retijerik asit b isimli madde ile 24-48 saate kadar p65 ve p-IkB-α'nın mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinde azalmanın izlenebildiği gösterilmiştir (135). Zhang ve arkadaşlarının PC-3 hücrelerinde yaptığı çalışmada ise LPS (10ng/ml, 24sa) ile TLR4 aktivasyonunun NF-kB'nin nükleer translokasyonunu ve TNF üretimini artırdığı saptanmış, ek olarak bu hücrelerde LPS ile indüksiyonun NF-kB sinyal yolağının öncesinde yer alan PI3K ve AKT ekspresyonlarını da artırdığı belirlenmiştir (237). LPS'in TLR4 aracılı NF-kB sinyal yolağını kullanarak kronik bakteriyel prostatit ile gelişen prostat karsinogenезinde önemli rol oynadığını gösteren bir diğer çalışmada, PC-3 hücrelerinde selenyum uygulaması sonrası LPS (10µg/ml, 3sa) indüksiyonu yapılmıştır. Sonuç olarak, selenyum'un LPS ile stimüle edilen PC-3 hücrelerinde p65'in nükleusa translokasyonunu inhibe ederek koruyucu etki gösterebileceği belirtilmiştir (172). PC-3 hücrelerinde yapılan tüm bu çalışmalara paralel şekilde kendi çalışmamızda da 24 saat süreyle 0.5µg/ml konsantrasyonda kullanılan LPS'in NF-kB, p-IkB-α ve IKK-β ekspresyonları üzerinde indükleyici etki gösterdiği tarafımızca belirlenmiştir. Bu sebeple daha önce yapılmış çalışmaların sonuçlarından faydalanarak belirlediğimiz LPS'e ait indüksiyon süresi ve konsantrasyonunun, NF-kB sinyalizasyonunu uyarmak için uygun olduğu anlaşılmıştır.

4.5. *LPS'İN NF-kB ARACILI MMP'LERE ETKİLERİ*

LPS'in MMP'ler üzerindeki indükleyici etkisine ilişkin çok sayıda çalışmaya rastlamak mümkünken, LPS aracılı MMP yanıtlarına NF-kB sinyalizasyonunun aracılık ettiğini gösteren kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. RAW264.7 ve THP1 makrofaj hücre hatlarında yapılan bir

çalışmada LPS indüksiyonu sonucu salıverilen IL-8, MCP-1, IL-1 β ve TNF- α gibi sitokinlerin MMP-9 aktivasyonuna yol açtığı bildirilmiştir. Bu çalışmada LPS indüksiyonunun I κ B- α fosforilasyonunu, NF- κ B'nin nükleusa translokasyonunu, buna paralel olarak MMP-9 ekspresyon ve aktivasyonunu artırdığı, I κ B- α düzeyini ise azalttığı ifade edilmiştir (118). Çalışmamızda incelediğimiz PC-3 hücrelerinde ise LPS indüksiyonu sonrası MMP-9 ekspresyon ve aktivitesi ile MMP-2 aktivitesinin arttığı jelatin zimografi analizleri ile gösterilmiştir. Ancak jelatin zimografi analizlerimizde proMMP-2 bantları, aktif MMP-2 bantlarına kıyasla çok zayıf olarak görülebilmektedir. Yapılan western blot analizlerimizde ise LPS indüksiyonu sonrası MMP-9 ekspresyonunun arttığı, MMP-2 ekspresyonunun ise değişmediği belirgin şekilde gözlenmiştir. Aynı MMP-2 antikoruyla western blot yöntemini kullanan Attiga ve arkadaşları da fibroblast hücre kültür ortamı ile indüklenen DU-145 hücrelerinde özellikle proMMP-2 düzeyindeki değişimleri belirgin olarak görebildiği halde aktif MMP-2 düzeyindeki değişimleri net olarak izleyememiştir (7). Bu sonuçlar kullandığımız antikorunun androjenden bağımsız prostat kanseri hücrelerde MMP-2 aktivitesinden çok proMMP-2 ekspresyonunu belirlemeye uygun olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca çalışmamızda PC-3 hücrelerinde LPS indüksiyonu sonrası p-I κ B- α düzeyinin artmasına karşın, total I κ B- α ekspresyon düzeyinin değişmediği gösterilmiştir. Yukarıda da belirtildiği gibi total I κ B- α düzeyinde azalmanın gerçekleşmemesi, LPS indüksiyonu ile oluşan p-I κ B- α ve I κ B- α ekspresyonlarındaki değişimlerin farklı yönde olması sonucunda total I κ B- α düzeyinin değişmemesi ile açıklanmıştır.

LPS ile indüklenen NF- κ B sinyalizasyonunun aracılık ettiği jelatinaz ekspresyon ve aktivitelerindeki değişimi farklı hücre ve dokularda inceleyen çalışmalardan yukarıda bahsedilmiştir. Buna karşın, LPS indüksiyonu sonrası NF- κ B aracılı MMP-8 ve MMP-10 ekspresyonlarındaki değişimleri inceleyen ancak sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Bunlardan pankreas hücreleri ve makrofajlarla yapılan pankreatitle ilgili bir çalışmada LPS ile indüksiyon sonucunda p65'e bağımlı şekilde gelişen MMP-10 aktivitesinin arttığı belirtilmiştir

(216). Bu bilgiyi destekler nitelikte Reel ve arkadaşlarının insan monosit ve makrofaj hücrelerinde yaptığı bir çalışmada LPS indüksiyonunun COX enzimlerinden bağımsız şekilde MMP ekspresyon ve aktivitelerini artırdığı gösterilmiş, oluşan MMP-1, MMP-10 ve MMP-14 ekspresyon artışlarında ERK1/2, JNK-MAPK ile IKK β /NF-kB yolaklarının etkisinin olabileceği bildirilmiştir (184). İnsan nötrofil hücreleri ile yapılmış bir çalışmada ise LPS indüksiyonunun MMP-7, MMP-8, MMP-9 ve TIMP-1 düzeylerinde meydana getirdiği artış NF-kB ve AP-1 transkripsiyon faktörleri ile ilişkilendirilmiştir (201). Diğer çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olarak, bizim çalışmamızda da 24 saat boyunca 0.5 μ g/ml LPS ile indüklenmiş PC-3 hücrelerinde MMP-9 ekspresyon ve aktivitesi ile MMP-8 ve MMP-10 ekspresyonlarındaki artışa paralel olarak NF-kB ve p-IkB- α ekspresyonlarının da arttığı belirlenmiştir. Ayrıca 24 saatlik LPS indüksiyonu sonrasında NF-kB'nin nükleusa transloke halde olduğu da immünohistokimyasal olarak tarafımızdan gösterilmiştir. Bazı çalışmaların LPS indüksiyonuna bağlı olarak oluşan MMP ekspresyonlarındaki artışı, AKT/IKK- β aracılı NF-kB yolağıyla ilişkilendirdiği görülmüştür (52,85,141). Bunlardan birinde, RAW264.7 makrofaj hücrelerinde LPS'in MMP-9'u stimüle ettiği ve bu stimülasyondan büyük oranda PI3K/Akt/IKK α /NF-kB kaskadının sorumlu olduğu belirtilmiştir (150). Bu kaskadın MMP aktivasyonundaki rolünü ilk kez açıklayan Lu ve arkadaşları çalışmalarında proteozom inhibitörleri aracılığıyla NF-kB yolağının, PI3K inhibitörleri aracılığıyla da PI3K/AKT yolağının MMP-9 regülasyonu için önemini göstermişlerdir. Sonuç olarak da bu hücrelerde LPS'in NF-kB yolağı aracılığıyla MMP-9 aktivasyonu oluşturduğunu belirtmişlerdir (141). NF-kB sinyalizasyonu aracılı MMP up-regülasyonunun MAPK aktivasyonu aracılığıyla geliştiğini savunan çalışmalar da mevcuttur. Bunlardan RAW264.7 hücrelerinde yapılmış çalışmalarda, LPS indüksiyonun MAPK yolağı aktivasyonunu, NF-kB'nin p65 alt ünitesinin translokasyonunu, NF-kB DNA bağlanma ve reporter gen aktivitesini uyararak MMP-9 ekspresyonunu artırdığı ifade edilmiştir (33,140). BV-2 mikrogliya ve RAW264.7 makrofaj hücrelerinde de LPS ile indüklenme sonucunda artan NF-kB translokasyonu ve bağlanma

aktivitesine bağılı olarak MMP aktivasyonunun *in vitro* ve *in vivo* olarak arttığı gösterilmiştir (27). Başka bir çalışmada THP-1 makrofaj hücrelerinde LPS indüksiyonunun NF-kB ve MMP aktivitelerini arttırdığını gösteren benzer sonuçlara rastlanmıştır (128). İnsan nötrofil hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada da LPS indüksiyonu ile uyarılan MAPK yolağı aracılığıyla NF-kB ve AP-1 transkripsiyon faktörlerinin MMP üretimini düzenlediği, bu transkripsiyon faktörlerinin inhibisyonu ile MMP'lerin baskılanabildiği bildirilmiştir (201). Bu çalışmalardan farklı olarak NF-kB'nin siRNA transfeksiyonu sonucunda bloke edildiği karaciğer hücre hatlarında LPS indüksiyonunun anti-apoptotik Bcl-2 proteini ve karaciğer tip-1 kollajen mRNA'sını azaltırken, MMP-2 aktivitesini uyardığı ve hücrelerin apoptoza yönelirken MMP üretimini arttırdığını bildiren bir çalışmaya da rastlanmıştır (41). Bu çalışmada NF-kB yolağının blokajı ile apoptozun indüklenmesine karşın MMP-2 ekspresyonunda gelişen bu artış hücre farklılığından kaynaklanan istisnai bir durum olarak gözükmektedir.

Prostat kanser hücrelerinde NF-kB aracılı MMP aktivasyonunu incelemiş çalışmalara bakıldığında, PC-3 ve DU145 gibi androjenden bağımsız prostat kanseri hücrelerinde TNF- α ve PMA gibi farklı indükleyici ajanların kullanıldığı sınırlı sayıda araştırmaya rastlanmıştır. Bahsi geçen çalışmalarda söz konusu indükleyicilerin NF-kB ve AP-1 aracılığıyla özellikle MMP-9 aktivasyonuna ve böylece metastaz, anjiyojenez ve invazyon gelişimine yol açtığı belirtilmiştir (152, 203, 221). LPS ile indüklenen PC-3 hücrelerinde yaptığımız çalışmamızda, NF-kB sinyal yolağının aktivasyonu aracılığıyla MMP-2 ve MMP-9 aktivitesine ek olarak MMP-8, MMP-9 ve MMP-10 ekspresyonlarında artış olduğu ilk kez tarafımızdan bildirilmiştir. Bu yönüyle çalışmamızın bulguları, PC-3 androjenden bağımsız prostat kanseri hücrelerinde LPS'le indüklenen MMP aktivasyonuna NF-kB yolağının aracılık edebileceğini göstermektedir. Bununla birlikte daha önce yapılan pek çok çalışmada NF-kB'nin özellikle MMP-9 üzerindeki promotör bölgesinin varlığından sıkça söz edilirken, MMP-2'nin NF-kB aracılı uyarıma cevap vermediğini gösteren çalışmaların mevcut olduğu görülmektedir (101). Ancak jelatinazlar dışındaki diğer

MMP'lerde NF-kB promotör bölgesinin varlığı/yokluğu veya bu MMP'lerin aktivasyonunun NF-kB aracılığıyla gerçekleşip gerçekleşmediğini belirten herhangi bir çalışma saptanamamıştır. Çalışmamızda LPS indüksiyonu sonucunda NF-kB sinyalizasyon yolağı aktivasyonuna paralel olarak MMP-8, MMP-9 ve MMP-10 ekspresyonları artarken MMP-2 ekspresyonunda ise belirgin bir değişme olmadığı gösterilmiştir. Bu veriler jelatinaz grubu MMP'lere ek olarak MMP-8 ve MMP-10'un da NF-kB promotör bölgelerinin bulunabileceğini ve buna bağlı olarak bu MMP'lerin ekspresyonlarının NF-kB aracılığıyla transkripsiyon düzeyinde düzenlenmiş olabileceğini düşündürmektedir.

4.6. **DOKSİSİKLİNİN PROLİFERASYONA ETKİSİ**

Doksisisiklin, metal iyonlarını şelatlayabilen, tetrasiklin türevi bir ilaçtır. Geniş spektrumlu bir antibiyotik olma özelliği ile tanınan bu ilacın söz konusu özelliğinin yanı sıra MMP sentez ve aktivitesi, IL-1 sentezi, aktif B hücrelerinin fonksiyonları, aktif makrofajların oluşturduğu LPS aracılı nitrik oksit sentezi, kültüre edilmiş kondrosit hücrelerindeki kollajen sentezi gibi çok sayıda hücre fonksiyon üzerinde inhibitör etki gösterdiği de anlaşılmıştır. Bu nedenle doksisisiklin araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiş bir ajandır (206). Mitokondriyal süreçlerin antibiyotiklerce selektif olarak inhibe edilebileceğinin fark edilmesinden sonra, karsinogenezin uyarıldığı tümörlerdeki büyümenin de antibiyotiklerce inhibe edebileceğini gösteren pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda tetrasiklinlerin sitotoksik aktiviteye de sahip olabileceği düşünülmüştür. Doksisisiklin gibi tetrasiklinlerin bazı tümör modellerinde anti-tümör aktivite gösterdiği, ancak zayıf *in vivo* etkileri ve morbidite göstermeleri nedeniyle kanser tedavisinde uzun süreli kullanımlarını kısıtlayabileceği düşünülmüştür (139). Dolayısı ile bu ajanların tümöre olan özgünlükleri önem kazanmıştır. Bu amaçla, farklı hücrelerin tetrasiklinlere olan farklı selektif geçirgenliklerine bağlı olarak oluşan özgün sitostatik aktiviteleri araştırmalarla test edilmiştir. Yapılan araştırmalardan birinde doksisisiklinin sıçanlarda ilaca geçirgen T hücre lösemilerinin hücre proliferasyonunu inhibe ederken, geçirgen olmayan eritroid ve B lenf

hücrelerinde ise etkisiz olması, ilacın özgünlüğünü göstermesi bakımından umut verici olarak görülmüştür (222). Ayrıca, tetrasiklinlerin bu sitostatik etkilerini fibroblast ve sarkom hücrelerinde de göstermesi (193) ilacın antikanser etkileriyle ilgili çalışmaları arttırmıştır. Güçlü bir MMP inhibitörü olmasının yanında uzun yarı ömürlü, ucuz ve potent bir ilaç olması nedeniyle doksisiklinin, PC-3 prostat kanseri hücrelerinde yaptığımız çalışmamızda kullanımı uygun görülmüştür. Bununla birlikte doksisiklinin NF-kB sinyalizasyonu üzerindeki inhibitör etkilerini inceleyen az sayıda çalışmanın olması da ilacın bu yönüyle değerlendirilmesinin uygun olacağını düşündürmüştür. Sitotoksik etkilerin değerlendirildiği farklı çalışmalarda, tetrasiklin ve türevlerinden (doksisiklin ve minosiklin) özellikle doksisiklinin diğerlerine kıyasla insan adenokarsinom hücrelerindeki sağ kalımı daha fazla inhibe etme yeteneğine sahip olarak gösterilmesi de (58) çalışmamızda tetrasiklinler arasından doksisiklinin seçilmesinde etkili olmuştur. Doksisiklinin de üyesi olduğu tetrasiklinlerin sitotoksik etkilerinin mekanizmasını açıklamak üzere yapılan çalışmalar sonucunda, bu etkilerinin hücre döngüsünün G1 fazını bloke etmelerine bağlı olarak gelişen proliferasyonun durdurma yeteneklerinden (193), proinflamatuvar mediatörlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinde önemli role sahip olan NF-kB ve p38 MAPK yollarını inhibe etmesinden (16) kaynaklanmış olabileceği belirtilmiştir. NF-kB'nin bu etkisini p53'ün transkripsiyonel düzeyde indüklenmesini ve protein düzeyinde stabilizasyonunu sağlayarak gösterdiğini bildiren bir çalışma da bulunmaktadır (181). Söz konusu çalışmada pankreatik hücre hattı MDAPanc-28 üzerinde, doksisiklinin anti-kanser etkisinin p53'ün negatif regülatörü Hdm2 düzeyini azaltmasından ve buna bağlı olarak p53'ün yarı ömrünün uzamasından dolayı olduğu savunulmuştur (181). Farklı mekanizmaların önerildiği bu çalışmalardan yola çıkılarak doksisiklinin NF-kB sinyalizasyonunu inhibe etmek suretiyle MMP aracılı proliferasyonu engellemiş olabileceği fikri çalışmamızda inceleme konusu olmuştur.

Kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalar, doksisiklinin karsinogenezin pek çok aşamasını inhibe edici özellikte olduğunu göstermiştir. Rubins ve arkadaşları doksisiklinin malign mezotelyal proliferasyonu inhibe edebildiğini savunmuş (190), Onoda ve arkadaşları ise kolorektal hücre hatlarındaki invazyonun doksisiklin ile inhibe edildiğini göstermiştir (165). Ayrıca başka bir çalışmada doksisiklinin meme kanserinde gelişen proliferasyonu, kemik metastazını, jelatinaz aktivitelerini azalttığı da gösterilmiştir (71,193). Farklı kanser türleri ile çalışan Fife ve arkadaşları da insan göğüs kanseri hücreleri (MDA-MB-435), insan prostat adenokarsinom hücreleri (LNCaP) ve insan osteosarkom hücrelerinde (U20S) yaptıkları çalışmalarda doksisiklinin hücre proliferasyonunu, jelatinaz ekspresyon ve aktivitesini, matrijel invazyonunu inhibe ettiğini ve DNA fragmentasyonu ile apoptozu indüklediğini göstermişlerdir (72). Doksisiklinin özellikle prostat hücrelerinin proliferasyonuna etkisini değerlendiren diğer çalışmalar da farklı hücre tipleriyle aynı doğrultuda sonuçlar vermiştir. İnsan renal ve prostat karsinom hücrelerinde yapılan çalışmalarda, tetrasiklinlerin sitostatik etkiye sahip olduğu, hatta uzun süreli tedavi sonrasında da sitotoksik etki gösterdikleri belirtilmiştir (186,193). Başka bir çalışmada prostat ve renal karsinom hücrelerinde doksisiklin ile yapılan sitotoksik tedavi sonrasında oluşan DNA fragmentasyonunun apoptoz göstergesi olduğu belirtilmiştir (70,72,193). Fife ve arkadaşlarının LNCaP hücreleri ile yaptığı çalışmada, tripan mavisi ile sayım yöntemi kullanılmış, 5 ve 10 µg/ml konsantrasyonlardaki doksisiklinin proliferasyonu inhibe ettiği belirtilmiştir. Ayrıca doksisiklinin (10µg/ml) jelatinazları inhibe ettiği jelatin zimografi yöntemi ile gösterilmiştir (72). Bu sonuçlara paralel olarak çalışmamızda incelediğimiz PC-3 hücrelerinde de 5 ve 10 µg/ml konsantrasyonlardaki doksisiklinin proliferasyonu inhibe ettiği tarafımızdan gösterilmiştir. Doksisiklinin proliferasyonu inhibe edici özelliğinin *in vitro* deneylerle gösterilmesinden sonra, araştırmacılar bu deneylere ek olarak insan kaynaklı tümör hücreleri aktarılmış hayvan modellerinde çalışmaya başlamıştır. Chen ve arkadaşlarının transgenik PC-3 hücreleri üzerinde yaptığı çalışmada doksisiklinin (1µg/ml, 1-2gün) proliferasyonu inhibe edici

özelliikteki plasminojen aktivator inhibitörü-1'in (PAI-1) ekspresyonunu uyararak endotelial apoptozu artırdığı, böylece anjiyogenez ve tümörjenezini inhibe ettiği savunulmuştur. Aynı çalışmada farelerde *in vivo* olarak doksisisiklin kullanımının PAI-1 ekspresyonunu uyararak tümör gelişimini inhibe ettiği de gösterilmiştir (31). Bu çalışmalara paralel şekilde Lokeshwar ve arkadaşlarının çalışmasında prostat kanserine karşı kullanılan doksisisiklinin ve antibiyotik özelliği olmayan, kimyasal olarak modifiye edilmiş tetrasiklinlerin (CMT'ler) *in vitro* olarak prostat hücre proliferasyonunu, tümör hücrelerinin invazyon potansiyelini azalttığı; sıçan metastatik prostat tümörlerinde ise tümör büyüme ve metastazını inhibe ettiği gösterilmiştir. Ek olarak tetrasiklin türevlerinden kaynaklanan bu etkilerin hücre döngüsünün G0/G1 fazında durdurulması nedeniyle ortaya çıktığı belirtilmiştir. Ayrıca yapılan klinik çalışmalarda, oral olarak kullanılabilen ve toksik olmayan CMT-3 gibi tetrasiklinlerin prostat ve diğer metastatik kanser türlerinin tedavisinde kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir (139). Sonuç olarak, pek çok *in vitro* ve *in vivo* çalışmada kullanılan tetrasiklin türevlerinin mezotelyom, osteosarkom ve göğüs kanserlerinde olduğu gibi prostat kanseri hücrelerinde de sitotoksik etkiler gösterebildiği belirlenmiştir. Önceki çalışmalara paralel şekilde çalışmamızda PC-3 hücrelerinde tripan mavisi hücre sayım yöntemi kullanılarak doksisisiklin ile hücre sayılarının azaldığının belirlenmesi, jelatin zimografi analizlerinde de proliferasyondan sorumlu jelatinaz ekspresyon ve aktivitelerinin azaldığının gösterilmesi doksisisiklinin antiproliferatif etkisini ortaya koymuştur.

4.7. **DOKSİSİKLİNİN MMP'LERE ETKİSİ**

Günümüzde, tetrasiklin ve türevlerinin güçlü MMP inhibitörü özelliğe sahip oldukları ve antibiyotik etkileri dışında birçok hücresel fonksiyonu etkileyen çok yönlü ilaçlar oldukları bilinmektedir (81, 193). İki binli yılların başlarına kadar yapılan çalışmalarda doksisisiklinin MMP inhibitörü etkisinin mekanizması henüz kesin olarak aydınlatılamasa da bu etkisine ilişkin bazı olası mekanizmalar ileri sürülmüştür. Doksisisiklinin MMP inhibitörü etkisini, MMP'lerin yapısındaki Zn^{+2} veya Ca^{+2} 'a bağlanarak enzimin aktif bölgesini bloke etmesiyle, aktivasyon

esnasında proenzimi parçalanmaya yatkın hale getiren yapısal değişikliklere neden olmasıyla, MMP'lerin mRNA transkripsiyonunu inhibe etmesiyle, ekstraselüler aktivasyon esnasında pro-MMP zimojenini yıkıma uğratması ya da bu mekanizmalardan birkaçıyla ilişkili olarak gösterdiği düşünülmüştür (72,81). Günümüzde ise doksisisiklinin anti-mikrobiyal etkisinden farklı olarak MMP inhibitörü etkisini bazı hücre tiplerinde MMP aktivitesini inhibe etmek veya MMP aktivasyonu esnasında enzimi yıkmak suretiyle doğrudan gösterdiği düşünülmektedir. Bunlara ek olarak, doksisisiklinin MMP transkripsiyonunu azaltmak, pro-jelatinaz ve pro-kollajenazların aktivasyonunu sağlayan reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırmak suretiyle dolaylı şekilde inhibisyon yaptığı da ileri sürülen görüşler arasındadır (28). Önceki bilgilerin ışığında, çalışmamızda da PC-3 hücrelerinde doksisisiklinin MMP inhibitörü etkisinin altında yatan mekanizmanın araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla bir transkripsiyon faktörü olarak bilinen ve kanser sürecinin pek çok basamağında görev alan NF-kB sinyal yolağının MMP'ler üzerindeki transkripsiyonel etkileri ve rolü incelenmiştir.

Tetrasiklinlerin MMP inhibitörü rolünü incelemek üzere yapılan çalışmalarda bu ilaçların damarlarda intimal kalınlaşmayı azalttığı (14,107) aortik anevrizmada (42,215), periodontal hastalıkta (17) ve artritte matriks yıkımını azalttığı (87,209), tümör hücre invazyonunu, tümör metastazını (72,197) ve tümör anjiyojenezi inhibe ettiği (214) gösterilmiştir. Pek çok hücre tipinde MMP inhibitörü yetenekleri bakımından kıyaslanan tetrasiklin, doksisisiklin ve minosiklinden özellikle jelatinaz inhibitör aktivitesi en güçlü olan doksisisiklinin çoğu çalışmada tercih edildiği belirtilmiştir (193). Fife ve arkadaşlarının tetrasiklin analoglarıyla yaptığı bir çalışmada bu ajanların anti-anjiyojenik aktiviteye sahip olduğu ve *in vitro* olarak 10µM ve üzeri doksisisiklin konsantrasyonlarının MMP'leri irreversibl olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (71). Hanemaaijer ve arkadaşlarının romatoid sinoviyal fibroblastlar ve insan endotel hücrelerinde yaptığı diğer bir çalışmada, bu hücrelerde TNF ve PMA indüksiyonları ile MMP-8 mRNA ve protein düzeylerinde artış olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada 50µM doksisisiklinin tip2 kollajen

yıkımını tamamen inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar doksisisiklinin spesifik olarak MMP-8 ekspresyon ve aktivitesini inhibe etmesi ile ilişkilendirilmiştir (94). Cho ve arkadaşları da mikrogliyal BV-2 hücrelerinde yaptıkları bir çalışmada LPS'le indüklenme sonrasında doksisisiklinin MMP-3 mRNA ve protein düzeylerinde azalma oluşturduğunu gözlemlemiştir (32). C8161 malign melanom hücrelerinde yapılan bir diğer çalışmada ise tetrasiklin türevi bir MMP inhibitörü olan COL-3'ün jelatinazları inhibe ettiği açıklanmıştır (186). Doksisisiklinin MMP inhibitörü özelliğini prostat kanseri hücrelerinde de gösterdiği sınırlı sayıda çalışmada bildirilmiştir. Lokeshwar ve arkadaşlarının PC-3, DU145 ve MAT-LyLu hücreleri ile yaptığı çalışmalarda özellikle doksisisiklin ve CMT-3'ün proliferasyon gibi karsinojenik özelliklerle birlikte jelatinaz tipi MMP aktivasyonunu da inhibe ettiği gösterilmiştir (137). Bu çalışmalara ek olarak, farklı kanser hücrelerinde çeşitli indüksiyon ajanları ile indüksiyon yapıldığını gösteren ve bu hücrelerde doksisisiklinin MMP inhibitörü etkisini inceleyen çalışmalar da bulunmaktadır. Roomi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sadece MMP-2 eksprese eden akciğer kanseri (A-549) ve MMP-2 ile MMP-9'un her ikisini de eksprese eden malign mezotelyom (MSTO-211H) hücre hatlarında, doksisisiklinin jelatinaz düzeylerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada doksisisiklinin PMA indüksiyonu sonrası her iki jelatinaz aktivasyonunu konsantrasyonla orantılı bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (188). Aynı grubun ovaryum (Hela, DoTc2-4510) ve serviks kanseri (SK-OV-3) hücre hatları üzerinde yaptığı bir başka çalışmada, LPS'in servikal kanser hücre hatlarındaki jelatinaz ekspresyonlarını artırdığı görölürken, ovaryum kanser hücre hattını etkilemediği belirtilmiştir. Ancak PMA ile indüklendiğinde her iki hücre hattında jelatinaz ekspresyonlarının arttığı ve doksisisiklin ile inhibe edildiği belirtilmiştir (189). Bu çalışmalardan yola çıkılarak, prostat kanser hücrelerinde LPS indüksiyonu sonrası doksisisiklinin MMP inhibitörü etkisini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu yönüyle çalışmamız ilk olma özelliği taşımaktadır. Ayrıca, çalışmamız herhangi bir kanser hücre hattında LPS indüksiyonu ile indüklenen MMP yanıtlarının doksisisiklin ile inhibisyonunu incelemesi yönüyle de bir ilk teşkil

etmektedir. Daha önceki çalışmalardan farklı olarak Cazalis ve arkadaşlarının insan tam kan örnekleriyle yaptıkları bir çalışmada LPS ile indüklenmiş MMP-8 ve MMP-9 düzeylerinde doksisisiklin veya diğer tetrasiklin türevleri ile bir değişim olmadığını savunmuşlardır (22). Buna karşın, Gu ve arkadaşları insan monositleri ile yaptıkları çalışmada LPS ile indüklenen MMP-8 ve MMP-9 ekspresyon artışlarının doksisisiklin ve CMT-3 ile inhibe edilebileceğini bildirmişlerdir (89). Gu ve grubunun çalışmasına benzer şekilde PC-3 hücrelerinde LPS indüksiyonu sonrası gelişen MMP ekspresyon ve aktivite artışı üzerine doksisisiklinin etkilerinin değerlendirildiği çalışmamızda, doksisisiklinin MMP-8 ekspresyonu ile MMP-9 ekspresyon ve aktivitesinde inhibisyon olduğu gözlenmiştir. MMP-2 ekspresyonunun ise çalıştığımız PC-3 hücre hattında oldukça düşük düzeyde olduğu görülmüş ve doksisisiklinin bu ekspresyon üzerinde anlamlı bir etki oluşturmadığı saptanmıştır. Başka araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar incelendiğinde farklı hücre hatlarında LPS ile indüklenen MMP-8 ve MMP-9 ekspresyonlarına ek olarak indüklenmiş MMP-2 ekspresyonu üzerinde doksisisiklinin inhibisyon yeteneğinin açıklanmaya çalışıldığı görülsede (23) doksisisiklinin MMP-10 ekspresyonu üzerindeki etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yaptığımız analizler, PC-3 hücrelerinde doksisisiklinin LPS ile indüklenen MMP-10 ekspresyonu üzerinde tam inhibisyon oluşturmada da bu proteinin ekspresyonunu inhibe etme eğilimi gösterdiğini ortaya koymuştur.

4.8. *DOKSİSİKLİNİN NF-kB YOLAĞINA ETKİLERİ*

Doksisisiklin (16) ve minosiklin başta olmak üzere diğer tetrasiklin türevlerinin (4, 161) hücre kültüründe NF-kB yolağı üzerindeki etkisini inceleyen çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır. Bunlardan birinde tümör süpresör gen olan PTEN'in akciğer kanseri hücrelerinin invazyonu üzerindeki inhibitör etkilerini inceleyen Akca ve arkadaşları, PTEN'in prostat kanserinde de PI3K-AKT-NF-kB kaskadını etkileyerek kanser invazyonunu inhibe edebileceğini bildirmişlerdir (4). Akca ve arkadaşlarının bulguları, çalışmamızda da PC-3 hücrelerinde doksisisiklin uygulamasının NF-kB sinyal yolağı üzerinde oluşturduğu inhibisyonun, PTEN düzeylerini

arttırmasından kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Minosiklinin LPS ile indüklenen aktif mikrogliyalardaki NF-kB ve MAPK aktivasyonlarını inceleyen Nikodemova ve arkadaşları, indüksiyon yapılmış BV-2 ve primer mikrogliya hücrelerinde minosiklin uygulanması ile I κ B- α yıkımında azalma meydana geldiğini açıklamışlardır (161). Bu çalışmaya benzer şekilde, çalışmamızda da PC-3 hücrelerinde, LPS indüksiyonunun total I κ B- α ekspresyonunda değişiklik oluşturmazken p-I κ B- α ekspresyonunu artırdığı, buna karşın doksisisiklinin total I κ B- α ekspresyonunu değiştirmezken, p-I κ B- α ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Bu sonuç doksisisiklinin PC-3 hücrelerinde LPS ile indüklenen NF-kB sinyal yolağını inhibe edebildiğini göstermektedir. Önceki çalışmalar incelendiğinde, LPS ile indüklenmiş herhangi bir kanser hücresinde doksisisiklinin NF-kB sinyalizasyon yolağı üzerindeki inhibitör etkilerini inceleyen başka bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu yönüyle çalışmamızın bulguları kanser hücre kültüründe LPS ile indüksiyon sonrası doksisisiklinin NF-kB yolağı üzerindeki olası inhibitör etkisini inceleyen ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Bununla birlikte kanser veya prostat hücresi olmasa da LPS ile uyarıma karşı uygulanan doksisisiklinin NF-kB sinyal yolağı üzerindeki etkisini incelemesi bakımından Bernardino ve arkadaşlarının yaptığı çalışma oldukça ilgi çekicidir. Tetrasiklinlerin bakteri kökenli Lyme hastalığında oluşan inflamasyon üzerindeki inhibitör etkisini inceleyen bu çalışmada, insan monosit hücre hattı THP-1'in, maymundan alınan astrosit ve mikrogliaların, bakteriden alınmış lipoprotein dış yüzey proteini A ile indüksiyonu sonrası doksisisiklin (5 ve 10 μ g/ml, 24sa) ve minosiklinin etkileri incelenmiştir. Bu ajanların konsantrasyona bağımlı şekilde NF-kB ve IKK- α gen düzeylerinde azalma meydana getirdiği, ayrıca I κ B- α 'nın fosforilasyonunu ve NF-kB'nin nükleusa translokasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (16). Bu çalışmayla uyumlu olarak çalışmamızda PC-3 hücrelerinde doksisisiklinin (5 μ g/ml, 24sa) IKK- β ekspresyonunu azaltma eğilimi gösterdiği, p-I κ B- α ve NF-kB ekspresyonlarını ise anlamlı derecede inhibe ettiği ilk kez gösterilmiştir. Bu yönü ile çalışmamız herhangi bir prostat doku yada hücresinde doksisisiklinin NF-kB yolağı üzerindeki inhibitör etkisini inceleyen ilk çalışmadır.

4.9. **DOKSİSİKLİNİN NF-kB ARACILI MMP'LERE ETKİLERİ**

Doksisisiklinin NF-kB sinyalizasyonunu etkileyerek MMP'ler üzerinde inhibitör etki gösterdiğini bildiren çok sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunlardan doksisisiklinin anevrizma oluşan abdominal aort örneklerindeki etkilerini değerlendiren klinik bir çalışmada yüksek dozda (50, 100, 300 mg/gün) doksisisiklin ile 2 haftalık tedavi sonrası MMP-9 ve NF-kB düzeylerindeki değişimler incelenmiştir. Bu çalışmada doksisisiklin uygulaması ile MMP-9 ekspresyon ve aktivitesinin azaldığı saptanırken, NF-kB'nin ekspresyon düzeylerinde ise belirgin bir değişim gözlenmediği bildirilmiştir (134). Choi ve arkadaşlarının insan dermal fibroblast hücreleri üzerinde yaptığı bir diğer çalışmada ise TNF- α indüksiyonu ile özellikle pro-MMP-2'de oluşturulan ekspresyon artışının doksisisiklin tarafından inhibe edilebildiği ve NF-kB sinyal yolağının bu hücrelerde MMP'lerin indüksiyonundan sorumlu olduğu belirtilmiştir (34). Ancak bu çalışmada indüklenmiş hücrelerde doksisisiklinin NF-kB sinyal yolağı üzerindeki olası inhibitör etkisi incelenmemiştir. Makrolid türevi antibiyotikler olan eritromisin ve roksitromisinin 1 saatlik ön uygulama sonrası LPS ile indüklenmiş nötrofillerde MMP-9 ekspresyonu üzerine olan etkilerini *in vitro* olarak değerlendiren bir başka çalışma, yine bir antibiyotik türevi olan doksisisiklinin etkilerini değerlendirmek için çalışmamıza yol gösterici olabilir. İlgili çalışmada roksitromisinin LPS ile indüklenen MMP-9 ekspresyonu üzerinde belirgin bir inhibisyon oluşturduğu, TIMP-1 üzerinde ise etki göstermediği saptanmıştır. Bununla birlikte roksitromisinin LPS ile indüklenmiş NF-kB ve AP-1 ekspresyonlarını hem mRNA hem de protein düzeyinde inhibe ettiği belirtilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak roksitromisinin NF-kB ve AP-1 inhibisyonu yaparak MMP-9'u mRNA düzeyinde baskıladığı bildirilmiştir (113). Çalışmamıza benzer şekilde insan monosit hücrelerinde yapılan Gu ve arkadaşlarının çalışmasında doksisisiklin ve CMT-3'ün NF-kB yolağını inhibe etmek suretiyle MMP'lerde inhibisyon oluşturabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada LPS (50ng/ml) indüksiyonu sonucunda artan sitokin ve MMP üretiminin NF-kB fosforilasyonu aracılığıyla meydana gelmiş olabileceği, NF-kB

fosforilasyonunun ise doksisiklin (2 ve 5 μ M) ve CMT-3 (2 ve 5 μ M) ile inhibe edilebildiği bildirilmiştir (89). Önceki çalışmalara bakıldığında prostat veya herhangi bir kanser türünde doksisiklinin NF-kB yolağı ve bu yolak aracılı MMP aktivasyonu üzerindeki inhibitör etkilerini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yönüyle çalışmamızın bulguları özgündür ve PC-3 prostat kanseri hücrelerinde doksisiklinin NF-kB sinyalizasyonunu ve MMP aktivitesini inhibe ederek antikanser etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

BÖLÜM V

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda androjenden bağımsız insan prostat kanseri kemik metastazı PC-3 hücre hattında MMP ekspresyon ve aktivitelerinin düzenlenmesinde NF-kB sinyalizasyonunun olası rolü ve doksisisiklinin bu sinyal yolağı ile MMP'ler üzerindeki inhibitör etkileri incelenmiştir. Bu amaçla PC-3 hücreler LPS ile indüklenmiş, ardından bu indüksiyonun NF-kB sinyalizasyonu ile MMP ekspresyon ve aktiviteleri üzerindeki düzenleyici rolü ve MMP inhibitörü olarak yaygın kabul gören doksisisiklinin etkileri jelatin zımografi, western blot ve immünohistokimya yöntemleri ile değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, PC-3 insan prostat kanseri hücrelerinde LPS indüksiyonu ile NF-kB sinyal yolağının, bu yolak aracılığıyla MMP ekspresyon ve aktivesinin, dolayısıyla hücre proliferasyonunun uyarılabileceğı ilk kez tarafımızdan gösterilmiştir. Ayrıca, LPS indüksiyonu yapılmış prostat kanseri hücrelerinde MMP'lerin ve proliferasyonunun doksisisiklin ile inhibe edilebildiğinin gösterilmesi yönünden de çalışmamız bir ilk teşkil etmektedir.

Daha önce farklı hücreler kullanılarak yapılmış çalışmalarda, LPS indüksiyonu aracılığıyla NF-kB sinyalizasyonunun uyarıldığı ve bu sinyalizasyona bağılı olarak özellikle jelatinaz tipi olmak üzere birçok MMP'nin ekspresyon ve aktivitesinde artış meydana geldiğı gösterilmiştir. Bu mekanizmanın androjenden bağımsız prostat kanser hücrelerinde de gerçekleşebildiğı çalışmamızda ilk kez ortaya konmuştur. Bu bakımdan araştırmamız LPS ile NF-kB sinyalizasyonu aracılı MMP aktivitesindeki artışı prostat ve prostat kanser hücre hatlarında ilk kez gösteren çalışma olmuştur.

Bununla birlikte farklı kanser hücrelerinde LPS indüksiyonu sonucunda NF-kB aracılı MMP-9 ekspresyon ve aktivitesinin uyarılabileceğini gösteren diğer çalışmalara paralel şekilde,

Çalışmamız bir kanser hüresinde LPS indüksiyonunun NF-kB aracılı jelatinaz aktiviteleri ile birlikte MMP-8 ve MMP-10 ekspresyonlarını da uyarabileceğini bildiren ilk çalışma olma özelliğine sahiptir.

Diğer yandan, LPS ile indüklenmiş farklı hücre hatlarında MMP-2 aktivitesi ile birlikte MMP-8 ve MMP-9 ekspresyonlarının doksisiklin ile inhibisyonu daha önceki çalışmalarla uyumlu şekilde yaptığımız incelemelerde de gösterilmiştir. Ancak araştırmamız LPS ile indüklenen MMP-10 ekspresyonu üzerinde doksisiklinin etkilerini değerlendiren ilk çalışmadır. Bulgularımız stromelinin grubundan MMP-10 ekspresyonunun doksisiklin ile anlamlı düzeyde inhibe edilmese de inhibe edilme eğiliminde olduğunu göstermiştir.

Doksisiklinin MMP ekspresyon ve aktivitelerini inhibe etme yeteneğinin NF-kB sinyal yolağının inhibisyonu aracılığıyla gerçekleşebileceği daha önceki araştırmalarda gösterilmiştir. Ancak çalışmamıza benzer şekilde LPS ile indüklenmiş NF-kB sinyal yolağı aktivasyonunun doksisiklin ile baskılanmasıyla ilgili bugüne dek çok kısıtlı sayıda çalışmanın yapıldığı saptanmıştır. Bununla birlikte doksisiklinin NF-kB sinyal yolağı üzerindeki inhibitör etkisine ilişkin elde ettiğimiz sonuçlar kanser ve prostat hücrelerinde ilk kez tarafımızca bildirilmiştir.

Çalışmamızın sonuçları, PC-3 insan prostat kanser hücrelerinde LPS ile indüklenen MMP ekspresyon ve aktivasyonunun düzenlenmesinde NF-kB sinyalizasyonunun önemli role sahip olabileceğini, doksisiklinin bu sinyal yolağını ve MMP aktivitesini inhibe ederek antikanser etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Araştırmamızda elde ettiğimiz bulgular doksisiklinin önemli bir inflamasyon markırı ailesi olan MMP'lerin yer aldığı proliferasyon, tümör gelişimi, invazyon, metastaz ve anjiyogenez gibi pek çok süreçteki inhibitör rolünün ve mekanizmasının daha iyi aydınlatılmasına katkıda bulunabilir. Doksisiklinin oluşturduğu MMP inhibitörü etkinin NF-kB sinyal yolağının inhibisyonu aracılığıyla meydana gelebileceği yönündeki bulgularımızın diğer çalışmalarla da desteklenmesi, bu yolağın kanser patojenezindeki kompleks rollerinin

anlaşılmasına katkıda bulunabilir. Ayrıca bulgularımız kanserin yanı sıra NF-kB aracılığıyla meydana gelen pek çok inflamatuvar ve proliferatif hastalığın önlenmesi ve tedavisi için yeni terapötik hedeflerin ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde umut verici ve yol gösterici olabilir.

BÖLÜM VI

6. ÖZET

Prostat kanseri, özellikle modern toplumlardaki erkeklerde önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olan ancak mekanizması tam olarak aydınlatılamayan bir kanser türüdür. Matriks metalloproteinaz enzimlerinin (MMP'ler) aşırı matriks yıkımına yol açarak kanser gelişiminde önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Prostat kanseri araştırmaları MMP'lerin inflamasyon, malign hücre proliferasyonu, metastaz ve anjiyogenez gibi pek çok patolojik süreçte rol oynadığını göstermiştir. Önemli bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa B'nin (NF- κ B) çeşitli kanser türlerinde oluşan anormal aktivitesinin MMP aktivasyonuna ve sonuçta malign hücre proliferasyonu ve invazyonuna yol açtığı bildirilmiştir. Çalışmamızda, insan prostat kanseri PC-3 hücre hattında MMP ekspresyon ve aktivitesinin düzenlenmesinde NF- κ B sinyalizasyonunun rolü ve doksisisiklinin inhibitör etkileri incelenmiştir. PC-3 hücreler LPS ile indüklenmiş, daha sonra bu indüksiyonun ve doksisisiklinin NF- κ B sinyalizasyonu ile MMP'ler üzerindeki etkileri, jelatin zımpara, western blotlama ve immünohistokimya yöntemleri ile değerlendirilmiştir. LPS indüksiyonu PC-3 hücrelerinde proliferasyona neden olmuş, doksisisiklin hücre proliferasyonundaki bu artışı inhibe etmiştir. Bunun yanı sıra, LPS indüksiyonu jelatinaz ekspresyon ve aktivitelerinde, MMP-8, MMP-10, NF- κ B(p65), p-I κ B- α , IKK- β ekspresyonlarında ve ayrıca p65'in nükleusa translokasyonunda artışa neden olmuştur. Doksisisiklin LPS ile indüklenen jelatinaz ekspresyon ve aktiviteleri ile MMP-8, NF- κ B(p65), p-I κ B- α ekspresyonlarını ve aynı zamanda p65'in nükleusa translokasyonunu inhibe etmiştir. Ayrıca doksisisiklin IKK- β ve MMP-10 ekspresyon artışlarını inhibe etmemesine karşın, inhibe etme eğilimi göstermiştir. Diğer yandan, MMP-2 ve I κ B- α ekspresyon düzeyleri LPS ya da doksisisiklin ile değişmemiştir. Çalışmamızın sonuçları, PC-3 hücrelerinde LPS ile indüklenen MMP ekspresyon ve aktivasyonunun düzenlenmesinde NF- κ B sinyalizasyonunun önemli role sahip olabileceğine

işaret etmektedir. Doksisiklin NF-kB sinyalizasyonunu ve dolayısıyla MMP'leri inhibe edebilir. Doksisiklin, yararlı etkileri ile prostat kanseri tedavisine yeni bir terapötik yaklaşım sağlayabilir.

7. ABSTRACT

Prostate cancer is a kind of cancer which causes considerable morbidity and mortality in men in modern societies, but its mechanism is not fully elucidated. Matrix metalloproteinase enzymes (MMPs) are known to play important role in cancer progression by inducing excess matrix degradation. Prostate cancer studies have shown that MMPs play crucial role in most of pathological processes such as inflammation, malign cell proliferation, metastasis and angiogenesis. Abnormal activity of nuclear factor kappa B (NF- κ B) which is an important transcription factor, in some kind of cancers was reported to cause MMP activation, and proliferation and invasion of malign cell. In our study, the role of NF- κ B signaling in the regulation of MMP expression and activity, and the inhibitory effects of doxycycline were investigated in PC-3 human prostate cancer cell line. PC-3 cells were induced by LPS, and then the effects of this induction and doxycycline on NF- κ B signalling and MMPs were evaluated by using gelatin zymography, western blotting and immunohistochemistry. LPS induction caused increased cell proliferation and doxycycline inhibited this increment in PC-3 cells. Besides, LPS induction led to increased expression and activities of gelatinases and increased expressions of MMP-8, MMP-10, NF- κ B(p65), p-I κ B- α , IKK- β and also increased translocation of p65 to nucleus. Doxycycline inhibited LPS-induced gelatinase expression and activities, and expressions of MMP-8, NF- κ B(p65), p-I κ B- α and also translocation of p65 to nucleus. Furthermore, although doxycycline did not inhibit increased IKK- β and MMP-10 expressions, it tended to inhibit these expressions. On the other hand, MMP-2 and I κ B- α expression levels did not change by either LPS or doxycycline. Our findings indicate that NF- κ B signaling may have an important role in the regulation of LPS-induced MMP expression and activation in PC-3 cells. Doxycycline may inhibit NF- κ B signaling and thereby MMPs. Doxycycline may offer a novel therapeutic approach to prostate cancer therapy because of its useful effects.

BÖLÜM VII

8. KAYNAKLAR

1. Abate-Shen C, Shen MM. Mouse models of prostate carcinogenesis. *Trends Genet.* 2002; 18: S1-S5.
2. Aggarwal BB, Sung B. NF-kappaB in cancer: a matter of life and death. *Cancer Discov.* 2011; 1: 469-471.
3. Aggarwal BB, Takada Y, Shishodia S *et al.* Nuclear transcription factor NF-kappa B: role in biology and medicine. *Indian J.Exp.Biol.* 2004; 42: 341-353.
4. Akca H, Demiray A, Tokgun O, Yokota J. Invasiveness and anchorage independent growth ability augmented by PTEN inactivation through the PI3K/AKT/NFkB pathway in lung cancer cells. *Lung Cancer* 2011; 73: 302-309.
5. Aksun, S. A., Özmen, D., and Bayındır, O. Metalloproteinazlar, inhibitörleri ve ilişkili fizyolojik ve patolojik durumlar. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2001; 21, 332-342.
6. Andela VB, Gordon AH, Zotalis G *et al.* NFkappaB: a pivotal transcription factor in prostate cancer metastasis to bone. *Clin.Orthop.Relat Res.* 2003; S75-S85.
7. Attiga FA, Fernandez PM, Weeraratna AT, Manyak MJ, Patierno SR. Inhibitors of prostaglandin synthesis inhibit human prostate tumor cell invasiveness and reduce the release of matrix metalloproteinases. *Cancer Res.* 2000; 60: 4629-4637.
8. Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu.Rev.Immunol.* 1996; 14: 649-683.
9. Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J.Clin.Invest* 2001; 107: 241-246.
10. Baniwal SK, Khalid O, Gabet Y *et al.* Runx2 transcriptome of prostate cancer cells: insights into invasiveness and bone metastasis. *Mol.Cancer* 2010; 9: 258.
11. Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D *et al.* Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J.Clin.Invest* 1997; 100: 2961-2969.
12. Baud V, Karin M. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2009; 8: 33-40.
13. Beaudoux JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin.Chem.Lab Med.* 2004; 42: 121-131.

14. Bendeck MP, Conte M, Zhang M, Nili N, Strauss BH, Farwell SM. Doxycycline modulates smooth muscle cell growth, migration, and matrix remodeling after arterial injury. *Am.J.Pathol.* 2002; 160: 1089-1095.
15. Bendeck MP, Irvin C, Reidy MA. Inhibition of matrix metalloproteinase activity inhibits smooth muscle cell migration but not neointimal thickening after arterial injury. *Circ.Res.* 1996; 78: 38-43.
16. Bernardino AL, Kaushal D, Philipp MT. The antibiotics doxycycline and minocycline inhibit the inflammatory responses to the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *J.Infect.Dis.* 2009; 199: 1379-1388.
17. Bezerra MM, Brito GA, Ribeiro RA, Rocha FA. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 2002; 35: 613-616.
18. Bond M, Baker AH, Newby AC. Nuclear factor kappaB activity is essential for matrix metalloproteinase-1 and -3 upregulation in rabbit dermal fibroblasts. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1999; 264: 561-567.
19. Bond M, Chase AJ, Baker AH, Newby AC. Inhibition of transcription factor NF-kappaB reduces matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 production by vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc.Res.* 2001; 50: 556-565.
20. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004; 25: 280-288.
21. Calzado MA, Bacher S, Schmitz ML. NF-kappaB inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer. *Curr.Med.Chem.* 2007; 14: 367-376.
22. Cazalis J, Tanabe S, Gagnon G, Sorsa T, Grenier D. Tetracyclines and chemically modified tetracycline-3 (CMT-3) modulate cytokine secretion by lipopolysaccharide-stimulated whole blood. *Inflammation* 2009; 32: 130-137.
23. Cena J, Lalu MM, Rosenfelt C, Schulz R. Endothelial dependence of matrix metalloproteinase-mediated vascular hyporeactivity caused by lipopolysaccharide. *Eur.J.Pharmacol.* 2008; 582: 116-122.
24. Chakrabarti S, Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Exp.Lung Res.* 2005; 31: 599-621.
25. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol.Cell Biochem.* 2003; 253: 269-285.
26. Chandler S, Miller KM, Clements JM *et al.* Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *J.Neuroimmunol.* 1997; 72: 155-161.
27. Chang CC, Tien CH, Lee EJ *et al.* Melatonin inhibits matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activation in the lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 and BV2 cells and a mouse model of meningitis. *J.Pineal Res.* 2012; 53: 188-197.

28. Chang WY, Clements D, Johnson SR. Effect of doxycycline on proliferation, MMP production, and adhesion in LAM-related cells. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2010; 299: L393-L400.
29. Chase AJ, Bond M, Crook MF, Newby AC. Role of nuclear factor-kappa B activation in metalloproteinase-1, -3, and -9 secretion by human macrophages in vitro and rabbit foam cells produced in vivo. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2002; 22: 765-771.
30. Chaturvedi MM, Sung B, Yadav VR, Kannappan R, Aggarwal BB. NF-kappaB addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. *Oncogene* 2011; 30: 1615-1630.
31. Chen SC, Henry DO, Hicks DG, Reczek PR, Wong MK. Intravesical administration of plasminogen activator inhibitor type-1 inhibits in vivo bladder tumor invasion and progression. *J.Urol.* 2009; 181: 336-342.
32. Cho Y, Son HJ, Kim EM *et al.* Doxycycline is neuroprotective against nigral dopaminergic degeneration by a dual mechanism involving MMP-3. *Neurotox.Res.* 2009; 16: 361-371.
33. Choi HJ, Chung TW, Kim JE *et al.* Aesculin inhibits matrix metalloproteinase-9 expression via p38 mitogen activated protein kinase and activator protein 1 in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells. *Int.Immunopharmacol.* 2012; 14: 267-274.
34. Choi JY, Piao MS, Lee JB, Oh JS, Kim IG, Lee SC. Propionibacterium acnes stimulates pro-matrix metalloproteinase-2 expression through tumor necrosis factor-alpha in human dermal fibroblasts. *J.Invest Dermatol.* 2008; 128: 846-854.
35. Chu ZL, DiDonato JA, Hawiger J, Ballard DW. The tax oncoprotein of human T-cell leukemia virus type 1 associates with and persistently activates IkappaB kinases containing IKKalpha and IKKbeta. *J.Biol.Chem.* 1998; 273: 15891-15894.
36. Clark JM, Jr., Chang AY. Inhibitors of the transfer of amino acids from aminoacyl soluble ribonucleic acid to proteins. *J.Biol.Chem.* 1965; 240: 4734-4739.
37. Claudio E, Brown K, Park S, Wang H, Siebenlist U. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat.Immunol.* 2002; 3: 958-965.
38. Çömez İY. Prostat adeno kanserli hastalarda tümör ve nekrozis faktör alfa C-4 dolmorfizmi sıklığı. *İstanbul Sağlık Müdürlüğü*, 2010. http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/pdf/uroloji/dr_yusuf_ilker_comez.pdf
39. Coope HJ, Atkinson PG, Huhse B *et al.* CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO J.* 2002; 21: 5375-5385.
40. Crisostomo PR, Wang Y, Markel TA, Wang M, Lahm T, Meldrum DR. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-alpha, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2008; 294: C675-C682.

41. Cui D, Zhang S, Ma J, Han J, Jiang H. Short interfering RNA targetting NF-kappa B induces apoptosis of hepatic stellate cells and attenuates extracellular matrix production. *Dig.Liver Dis.* 2010; 42: 813-817.
42. Curci JA, Mao D, Bohner DG *et al.* Preoperative treatment with doxycycline reduces aortic wall expression and activation of matrix metalloproteinases in patients with abdominal aortic aneurysms. *J.Vasc.Surg.* 2000; 31: 325-342.
43. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J.Pathol.* 1999; 189: 300-308.
44. Dajee M, Lazarov M, Zhang JY *et al.* NF-kappaB blockade and oncogenic Ras trigger invasive human epidermal neoplasia. *Nature* 2003; 421: 639-643.
45. De Marzo AM, DeWeese TL, Platz EA *et al.* Pathological and molecular mechanisms of prostate carcinogenesis: implications for diagnosis, detection, prevention, and treatment. *J.Cell Biochem.* 2004; 91: 459-477.
46. De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am.J.Pathol.* 1999; 155: 1985-1992.
47. De Marzo AM, Meeker AK, Zha S *et al.* Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology* 2003; 62: 55-62.
48. De Marzo AM, Nakai Y, Nelson WG. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urol.Oncol.* 2007; 25: 398-400.
49. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S *et al.* Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat.Rev.Cancer* 2007; 7: 256-269.
50. Dejardin E, Droin NM, Delhase M *et al.* The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity.* 2002; 17: 525-535.
51. Derudder E, Dejardin E, Pritchard LL, Green DR, Korner M, Baud V. RelB/p50 dimers are differentially regulated by tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-beta receptor activation: critical roles for p100. *J.Biol.Chem.* 2003; 278: 23278-23284.
52. Dhawan P, Singh AB, Ellis DL, Richmond A. Constitutive activation of Akt/protein kinase B in melanoma leads to up-regulation of nuclear factor-kappaB and tumor progression. *Cancer Res.* 2002; 62: 7335-7342.
53. Di SF, Gentile V, De MA *et al.* Distribution of inflammation, pre-malignant lesions, incidental carcinoma in histologically confirmed benign prostatic hyperplasia: a retrospective analysis. *Eur.Urol.* 2003; 43: 164-175.
54. Dökmeci İ. *Farmakoloji* İstanbul Nobel Tıp Kitabevleri, 2000.

55. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ.Res.* 1995; 77: 863-868.
56. Dong Z, Nemeth JA, Cher ML, Palmer KC, Bright RC, Fridman R. Differential regulation of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and TIMP-2 expression in co-cultures of prostate cancer and stromal cells. *Int.J.Cancer* 2001; 93: 507-515.
57. Duffey DC, Chen Z, Dong G *et al.* Expression of a dominant-negative mutant inhibitor-kappaB α of nuclear factor-kappaB in human head and neck squamous cell carcinoma inhibits survival, proinflammatory cytokine expression, and tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 1999; 59: 3468-3474.
58. Duivenvoorden WC, Hirte HW, Singh G. Use of tetracycline as an inhibitor of matrix metalloproteinase activity secreted by human bone-metastasizing cancer cells. *Invasion Metastasis* 1997; 17: 312-322.
59. Duivenvoorden WC, Popovic SV, Lhotak S *et al.* Doxycycline decreases tumor burden in a bone metastasis model of human breast cancer. *Cancer Res.* 2002; 62: 1588-1591.
60. Dutta J, Fan Y, Gupta N, Fan G, Gelinas C. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene* 2006; 25: 6800-6816.
61. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat.Rev.Cancer* 2002; 2: 161-174.
62. Ennis BW, Matrisian LM. Matrix degrading metalloproteinases. *J.Neurooncol.* 1994; 18: 105-109.
63. Ergun O, Kosar A. Prostat kanseri ve kronik prostatit ilişkisi. *S.D.Ü.Tıp Fak.Derg.* 2010; 17: 28-31.
64. Evans JD, Ghaneh P, Kawesha A, Neoptolemos JP. Role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. *Digestion* 1997; 58: 520-528.
65. Felix M, Guyot MC, Isler M *et al.* Endothelin-1 (ET-1) promotes MMP-2 and MMP-9 induction involving the transcription factor NF-kappaB in human osteosarcoma. *Clin.Sci.(Lond)* 2006; 110: 645-654.
66. Fenton MJ, Golenbock DT. LPS-binding proteins and receptors. *J.Leukoc.Biol.* 1998; 64: 25-32.
67. Ferreri AJ, Ponzoni M, Guidoboni M *et al.* Regression of ocular adnexal lymphoma after Chlamydia psittaci-eradicating antibiotic therapy. *J.Clin.Oncol.* 2005; 23: 5067-5073.
68. Ferreri AJ, Ponzoni M, Guidoboni M *et al.* Bacteria-eradicating therapy with doxycycline in ocular adnexal MALT lymphoma: a multicenter prospective trial. *J.Natl.Cancer Inst.* 2006; 98: 1375-1382.

69. Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res.* 1990; 50: 6130-6138.
70. Fife RS, Rougraff BT, Proctor C, Sledge GW, Jr. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by doxycycline in cultured human osteosarcoma cells. *J.Lab Clin.Med.* 1997; 130: 530-534.
71. Fife RS, Sledge GW, Jr. Effects of doxycycline on in vitro growth, migration, and gelatinase activity of breast carcinoma cells. *J.Lab Clin.Med.* 1995; 125: 407-411.
72. Fife RS, Sledge GW, Jr. Effects of doxycycline on cancer cells in vitro and in vivo. *Adv.Dent.Res.* 1998; 12: 94-96.
73. Foda HD, Zucker S. Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *Drug Discov.Today* 2001; 6: 478-482.
74. Galis ZS, Johnson C, Godin D *et al.* Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circ.Res.* 2002; 91: 852-859.
75. Garcia-Touchard A, Henry TD, Sangiorgi G *et al.* Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2005; 25: 1119-1127.
76. Gasparian AV, Burkhardt CA, Purmal AA *et al.* Curaxins: anticancer compounds that simultaneously suppress NF-kappaB and activate p53 by targeting FACT. *Sci.Transl.Med.* 2011; 3: 95ra74.
77. Gasparian AV, Yao YJ, Kowalczyk D *et al.* The role of IKK in constitutive activation of NF-kappaB transcription factor in prostate carcinoma cells. *J.Cell Sci.* 2002; 115: 141-151.
78. Gatti G, Rivero V, Motrich RD, Maccioni M. Prostate epithelial cells can act as early sensors of infection by up-regulating TLR4 expression and proinflammatory mediators upon LPS stimulation. *J.Leukoc.Biol.* 2006; 79: 989-998.
79. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002; 109 Suppl: S81-S96.
80. Gilmore TD, Herscovitch M. Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene* 2006; 25: 6887-6899.
81. Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, Sorsa T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv.Dent.Res.* 1998; 12: 12-26.
82. Golub LM, McNamara TF, Ryan ME *et al.* Adjunctive treatment with subantimicrobial doses of doxycycline: effects on gingival fluid collagenase activity and attachment loss in adult periodontitis. *J.Clin.Periodontol.* 2001; 28: 146-156.

83. Golub LM, Ramamurthy NS, McNamara TF, Greenwald RA, Rifkin BR. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs. *Crit Rev.Oral Biol.Med.* 1991; 2: 297-321.
84. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur.J.Cell Biol.* 1997; 74: 111-122.
85. Gong L, Li Y, Nedeljkovic-Kurepa A, Sarkar FH. Inactivation of NF-kappaB by genistein is mediated via Akt signaling pathway in breast cancer cells. *Oncogene* 2003; 22: 4702-4709.
86. Gramegna P, Latronico T, Brana MT *et al.* In vitro downregulation of matrix metalloproteinase-9 in rat glial cells by CCR5 antagonist maraviroc: therapeutic implication for HIV brain infection. *PLoS.One.* 2011; 6: e28499.
87. Greenwald RA, Golub LM, Lavietes B *et al.* Tetracyclines inhibit human synovial collagenase in vivo and in vitro. *J.Rheumatol.* 1987; 14: 28-32.
88. Greten FR, Eckmann L, Greten TF *et al.* IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 2004; 118: 285-296.
89. Gu Y, Lee HM, Sorsa T *et al.* Non-antibacterial tetracyclines modulate mediators of periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: a mechanistic link between local and systemic inflammation. *Pharmacol.Res.* 2011; 64: 573-579.
90. Guha M, O'Connell MA, Pawlinski R *et al.* Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* 2001; 98: 1429-1439.
91. Gum R, Wang H, Lengyel E, Juarez J, Boyd D. Regulation of 92 kDa type IV collagenase expression by the jun aminoterminal kinase- and the extracellular signal-regulated kinase-dependent signaling cascades. *Oncogene* 1997; 14: 1481-1493.
92. Güneş S, Bağcı H, Sarıkaya Ş. Prostat Kanseri Genetiği. *O.M.Ü.Tıp Dergisi* 2003; 20: 152-158.
93. Hah N, Lee ST. An absolute role of the PKC-dependent NF-kappaB activation for induction of MMP-9 in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2003; 305: 428-433.
94. Hanemaaijer R, Sorsa T, Konttinen YT *et al.* Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblasts and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor-alpha and doxycycline. *J.Biol.Chem.* 1997; 272: 31504-31509.
95. Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J.Natl.Cancer Inst.* 2001; 93: 178-193.

96. Hohman DW, Noghrehkar D, Ratnayake S. Lymphangioleiomyomatosis: A review. *Eur.J.Intern.Med.* 2008; 19: 319-324.
97. Hozumi A, Nishimura Y, Nishiuma T, Kotani Y, Yokoyama M. Induction of MMP-9 in normal human bronchial epithelial cells by TNF-alpha via NF-kappa B-mediated pathway. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2001; 281: L1444-L1452.
98. Hsiao CC, Kao YH, Huang SC, Chuang JH. Toll-like receptor-4 agonist inhibits motility and invasion of hepatoblastoma HepG2 cells in vitro. *Pediatr.Blood Cancer* 2013; 60: 248-253.
99. Hsing AW, Chokkalingam AP. Prostate cancer epidemiology. *Front Biosci.* 2006; 11: 1388-1413.
100. Hsing AW, Tsao L, Devesa SS. International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int.J.Cancer* 2000; 85: 60-67.
101. Huang S, Pettaway CA, Uehara H, Bucana CD, Fidler IJ. Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene* 2001; 20: 4188-4197.
102. Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *J.Urol.* 2002; 168: 9-12.
103. Huie M, Oettel K, Van UL *et al.* Phase II study of interferon-alpha and doxycycline for advanced renal cell carcinoma. *Invest New Drugs* 2006; 24: 255-260.
104. Hyc A, Osiecka-Iwan A, Niderla-Bielinska J, Moskalewski S. Influence of LPS, TNF, TGF-ss1 and IL-4 on the expression of MMPs, TIMPs and selected cytokines in rat synovial membranes incubated in vitro. *Int.J.Mol.Med.* 2011; 27: 127-137.
105. Iglesias-Gato D, Carsten T, Vesterlund M, Pousette A, Schoop R, Norstedt G. Androgen-independent effects of *Serenoa repens* extract (Prostasan(R)) on prostatic epithelial cell proliferation and inflammation. *Phytother.Res.* 2012; 26: 259-264.
106. Ikebe T, Takeuchi H, Jimi E, Beppu M, Shinohara M, Shirasuna K. Involvement of proteasomes in migration and matrix metalloproteinase-9 production of oral squamous cell carcinoma. *Int.J.Cancer* 1998; 77: 578-585.
107. Islam MM, Franco CD, Courtman DW, Bendeck MP. A nonantibiotic chemically modified tetracycline (CMT-3) inhibits intimal thickening. *Am.J.Pathol.* 2003; 163: 1557-1566.
108. Jackson L, Cady CT, Cambier JC. TLR4-mediated signaling induces MMP9-dependent cleavage of B cell surface CD23. *J.Immunol.* 2009; 183: 2585-2592.
109. Jemal A, Siegel R, Ward E *et al.* Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J.Clin.* 2008; 58: 71-96.

110. Jimenez JA, Kao C, Raikwar S, Gardner TA. Current status of anti-angiogenesis therapy for prostate cancer. *Urol.Oncol.* 2006; 24: 260-268.
111. Johansson N, Ahonen M, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell Mol.Life Sci.* 2000; 57: 5-15.
112. Johnson S, Knox A. Autocrine production of matrix metalloproteinase-2 is required for human airway smooth muscle proliferation. *Am.J.Physiol* 1999; 277: L1109-L1117.
113. Kanai K, Asano K, Hisamitsu T, Suzaki H. Suppression of matrix metalloproteinase-9 production from neutrophils by a macrolide antibiotic, roxithromycin, in vitro. *Mediators.Inflamm.* 2004; 13: 313-319.
114. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006; 441: 431-436.
115. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu.Rev.Immunol.* 2000; 18: 621-663.
116. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat.Immunol.* 2002; 3: 221-227.
117. Kim HJ, Jung JR, Kim HJ *et al.* Expression of human beta-defensin-2 in the prostate. *BJU.Int.* 2011; 107: 144-149.
118. Kim JH, Jeong JH, Jeon ST *et al.* Decursin inhibits induction of inflammatory mediators by blocking nuclear factor-kappaB activation in macrophages. *Mol.Pharmacol.* 2006; 69: 1783-1790.
119. Kim Y, Kang H, Jang SW, Ko J. Celastrol inhibits breast cancer cell invasion via suppression of NF-kB-mediated matrix metalloproteinase-9 expression. *Cell Physiol Biochem.* 2011; 28: 175-184.
120. Klein RD, Borchers AH, Sundareshan P *et al.* Interleukin-1beta secreted from monocytic cells induces the expression of matrilysin in the prostatic cell line LNCaP. *J.Biol.Chem.* 1997; 272: 14188-14192.
121. Ko SY. Myricetin suppresses LPS-induced MMP expression in human gingival fibroblasts and inhibits osteoclastogenesis by downregulating NFATc1 in RANKL-induced RAW 264.7 cells. *Arch.Oral Biol.* 2012; 57: 1623-1632.
122. Konig JE, Senge T, Allhoff EP, Konig W. Analysis of the inflammatory network in benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *Prostate* 2004; 58: 121-129.
123. Kundu SD, Lee C, Billips BK *et al.* The toll-like receptor pathway: a novel mechanism of infection-induced carcinogenesis of prostate epithelial cells. *Prostate* 2008; 68: 223-229.

124. Kupferman ME, Fini ME, Muller WJ, Weber R, Cheng Y, Muschel RJ. Matrix metalloproteinase 9 promoter activity is induced coincident with invasion during tumor progression. *Am.J.Pathol.* 2000; 157: 1777-1783.
125. Kuzuya M, Iguchi A. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *J.Atheroscler.Thromb.* 2003; 10: 275-282.
126. Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 2004; 49: 187-198.
127. Lawrence T, Bebien M, Liu GY, Nizet V, Karin M. IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature* 2005; 434: 1138-1143.
128. Lee WR, Chung CL, Hsiao CJ *et al.* Suppression of matrix metalloproteinase-9 expression by andrographolide in human monocytic THP-1 cells via inhibition of NF-kappaB activation. *Phytomedicine.* 2012; 19: 270-277.
129. Leimgruber C, Quintar AA, Sosa LD, Garcia LN, Figueredo M, Maldonado CA. Dedifferentiation of prostate smooth muscle cells in response to bacterial LPS. *Prostate* 2011; 71: 1097-1107.
130. Leinonen T, Pirinen R, Bohm J, Johansson R, Kosma VM. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) predicts tumour recurrence and unfavourable outcome in non-small cell lung cancer. *Histol.Histopathol.* 2008; 23: 693-700.
131. Li F, Wang Y, Wang X, Li J, Cui H, Niu M. Ganoderic acids suppress growth and angiogenesis by modulating the NF-kappaB signaling pathway in breast cancer cells. *Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.* 2012; 50: 712-721.
132. Lia NG, Shib ZH, Tang YP, Duan JA. Selective matrix metalloproteinase inhibitors for cancer. *Curr.Med.Chem.* 2009; 16: 3805-3827.
133. Libby P, Lee RT. Matrix matters. *Circulation* 2000; 102: 1874-1876.
134. Lindeman JH, Abdul-Hussien H, van Bockel JH, Wolterbeek R, Kleemann R. Clinical trial of doxycycline for matrix metalloproteinase-9 inhibition in patients with an abdominal aneurysm: doxycycline selectively depletes aortic wall neutrophils and cytotoxic T cells. *Circulation* 2009; 119: 2209-2216.
135. Liu YQ, Hu XY, Lu T *et al.* Retigeric acid B exhibits antitumor activity through suppression of nuclear factor-kappaB signaling in prostate cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS.One.* 2012; 7: e38000.
136. Loftus IM, Porter K, Peterson M *et al.* MMP inhibition reduces intimal hyperplasia in a human vein graft stenosis model. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1999; 878: 547-550.
137. Lokeshwar BL. Chemically modified non-antimicrobial tetracyclines are multifunctional drugs against advanced cancers. *Pharmacol.Res.* 2011; 63: 146-150.

138. Lokeshwar BL, Escatel E, Zhu B. Cytotoxic activity and inhibition of tumor cell invasion by derivatives of a chemically modified tetracycline CMT-3 (COL-3). *Curr.Med.Chem.* 2001; 8: 271-279.
139. Lokeshwar BL, Selzer MG, Zhu BQ, Block NL, Golub LM. Inhibition of cell proliferation, invasion, tumor growth and metastasis by an oral non-antimicrobial tetracycline analog (COL-3) in a metastatic prostate cancer model. *Int.J.Cancer* 2002; 98: 297-309.
140. Lu Y, Hong TG, Jin M *et al.* Saucerneol G, a new lignan, from *Saururus chinensis* inhibits matrix metalloproteinase-9 induction via a nuclear factor kappaB and mitogen activated protein kinases in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *Biol.Pharm.Bull.* 2010; 33: 1944-1948.
141. Lu Y, Wahl LM. Production of matrix metalloproteinase-9 by activated human monocytes involves a phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/IKKalpha/NF-kappaB pathway. *J.Leukoc.Biol.* 2005; 78: 259-265.
142. Luqman S, Pezzuto JM. NFkappaB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention. *Phytother.Res.* 2010; 24: 949-963.
143. Lynch CC, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation* 2002; 70: 561-573.
144. Madrid LV, Wang CY, Guttridge DC, Schottelius AJ, Baldwin AS, Jr., Mayo MW. Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB. *Mol.Cell Biol.* 2000; 20: 1626-1638.
145. Mairuae N, Connor JR, Cheepsunthorn P. Increased cellular iron levels affect matrix metalloproteinase expression and phagocytosis in activated microglia. *Neurosci.Lett.* 2011; 500: 36-40.
146. Martin MD, Matrisian LM. The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26: 717-724.
147. Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J.* 1998; 12: 1075-1095.
148. Mattson MP, Meffert MK. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death.Differ.* 2006; 13: 852-860.
149. Melamed D, Messika O, Glass-Marmor L, Miller A. Modulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) secretion in B lymphopoiesis. *Int.Immunol.* 2006; 18: 1355-1362.
150. Mendes SS, Candi A, Vansteenbrugge M *et al.* Microarray analyses of the effects of NF-kappaB or PI3K pathway inhibitors on the LPS-induced gene expression profile in RAW264.7 cells: synergistic effects of rapamycin on LPS-induced MMP9-overexpression. *Cell Signal.* 2009; 21: 1109-1122.

151. Montironi R, Santinelli A, Mazzucchelli R. Prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Panminerva Med.* 2002; 44: 213-220.
152. Moon DO, Choi YH, Moon SK, Kim WJ, Kim GY. Butein suppresses the expression of nuclear factor-kappa B-mediated matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in prostate cancer cells. *Toxicol.In Vitro* 2010; 24: 1927-1934.
153. Moses MA, Harper J, Folkman J. Doxycycline treatment for lymphangi leiomyomatosis with urinary monitoring for MMPs. *N.Engl.J.Med.* 2006; 354: 2621-2622.
154. Murphy G, McAlpine CG, Poll CT, Reynolds JJ. Purification and characterization of a bone metalloproteinase that degrades gelatin and types IV and V collagen. *Biochim.Biophys.Acta* 1985; 831: 49-58.
155. Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol.Aspects Med.* 2008; 29: 290-308.
156. Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1994; 732: 31-41.
157. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol.Chem.* 1997; 378: 151-160.
158. Nagase H, Suzuki K, Itoh Y *et al.* Involvement of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPS) during matrix metalloproteinase activation. *Adv.Exp.Med.Biol.* 1996; 389: 23-31.
159. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J.Biol.Chem.* 1999; 274: 21491-21494.
160. Nakayama M, Bennett CJ, Hicks JL *et al.* Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection. *Am.J.Pathol.* 2003; 163: 923-933.
161. Nikodemova M, Duncan ID, Watters JJ. Minocycline exerts inhibitory effects on multiple mitogen-activated protein kinases and IkappaBalpha degradation in a stimulus-specific manner in microglia. *J.Neurochem.* 2006; 96: 314-323.
162. Nishikori M, Ohno H, Haga H, Uchiyama T. Stimulation of CD30 in anaplastic large cell lymphoma leads to production of nuclear factor-kappaB p52, which is associated with hyperphosphorylated Bcl-3. *Cancer Sci.* 2005; 96: 487-497.
163. Norris JL, Baldwin AS, Jr. Oncogenic Ras enhances NF-kappaB transcriptional activity through Raf-dependent and Raf-independent mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J.Biol.Chem.* 1999; 274: 13841-13846.
164. Okuyama S, Mishina H, Yoshizumi A, Usuba Y, Takahashi M. Intratumoral doxycycline for skin metastases of human malignancies. *Tohoku J.Exp.Med.* 1987; 151: 241-244.

165. Onoda T, Ono T, Dhar DK, Yamanoi A, Fujii T, Nagasue N. Doxycycline inhibits cell proliferation and invasive potential: combination therapy with cyclooxygenase-2 inhibitor in human colorectal cancer cells. *J.Lab Clin.Med.* 2004; 143: 207-216.
166. Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B *et al.* Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J.Leukoc.Biol.* 2001; 69: 851-859.
167. Pajonk F, Pajonk K, McBride WH. Inhibition of NF-kappaB, clonogenicity, and radiosensitivity of human cancer cells. *J.Natl.Cancer Inst.* 1999; 91: 1956-1960.
168. Palapattu GS, Sutcliffe S, Bastian PJ *et al.* Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1170-1181.
169. Palayoor ST, Youmell MY, Calderwood SK, Coleman CN, Price BD. Constitutive activation of IkappaB kinase alpha and NF-kappaB in prostate cancer cells is inhibited by ibuprofen. *Oncogene* 1999; 18: 7389-7394.
170. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* 2001; 2: 533-543.
171. Patel RN, Attur MG, Dave MN *et al.* A novel mechanism of action of chemically modified tetracyclines: inhibition of COX-2-mediated prostaglandin E2 production. *J.Immunol.* 1999; 163: 3459-3467.
172. Pei Z, Li H, Guo Y, Jin Y, Lin D. Sodium selenite inhibits the expression of VEGF, TGFbeta(1) and IL-6 induced by LPS in human PC3 cells via TLR4-NF-(K)B signaling blockage. *Int.Immunopharmacol.* 2010; 10: 50-56.
173. Perigny M, Bairati I, Harvey I *et al.* Role of immunohistochemical overexpression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-11 in the prognosis of death by ovarian cancer. *Am.J.Clin.Pathol.* 2008; 129: 226-231.
174. Prasad S, Ravindran J, Aggarwal BB. NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship. *Mol.Cell Biochem.* 2010; 336: 25-37.
175. Prostate Cancer Detailed Guide. American Cancer Society. 2012. <http://www.cancer.org/cancer/prostatecancer/detailedguide/prostate-cancer-key-statistics>.
176. Prostate Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008. International Agency for Research on Cancer . 2008. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/prostate.asp>
177. Prostate cancer incidence statistics. Cancer Research UK. 2012. <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/types/prostate/incidence/uk-prostate-cancer-incidence-statistics>.
178. Purcell WT, Rudek MA, Hidalgo M. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *Hematol.Oncol.Clin.North Am.* 2002; 16: 1189-1227.

179. Putzi MJ, De Marzo AM. Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology* 2000; 56: 828-832.
180. Pyke C, Ralfkiaer E, Huhtala P, Hurskainen T, Dano K, Tryggvason K. Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. *Cancer Res.* 1992; 52: 1336-1341.
181. Radhakrishnan SK, Kamalakaran S. Pro-apoptotic role of NF-kappaB: implications for cancer therapy. *Biochim.Biophys.Acta* 2006; 1766: 53-62.
182. Rayet B, Gelinas C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 1999; 18: 6938-6947.
183. Reel B. Matriks Metalloproteinaz Enzimleri ve Ateroskleroz . *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 26, 527-537. 2006.
184. Reel B, Sala-Newby GB, Huang WC, Newby AC. Diverse patterns of cyclooxygenase-independent metalloproteinase gene regulation in human monocytes. *Br.J.Pharmacol.* 2011; 163: 1679-1690.
185. Reuther JY, Reuther GW, Cortez D, Pendergast AM, Baldwin AS, Jr. A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes Dev.* 1998; 12: 968-981.
186. Richards C, Pantanowitz L, Dezube BJ. Antimicrobial and non-antimicrobial tetracyclines in human cancer trials. *Pharmacol.Res.* 2011; 63: 151-156.
187. Rodriguez-Berriguete G, Fraile B, Paniagua R, Aller P, Royuela M. Expression of NF-kappaB-related proteins and their modulation during TNF-alpha-provoked apoptosis in prostate cancer cells. *Prostate* 2012; 72: 40-50.
188. Roomi MW, Monterrey JC, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M. Modulation of MMP-2 and MMP-9 by cytokines, mitogens and inhibitors in lung cancer and malignant mesothelioma cell lines. *Oncol.Rep.* 2009; 22: 1283-1291.
189. Roomi MW, Monterrey JC, Kalinovsky T, Rath M, Niedzwiecki A. In vitro modulation of MMP-2 and MMP-9 in human cervical and ovarian cancer cell lines by cytokines, inducers and inhibitors. *Oncol.Rep.* 2010; 23: 605-614.
190. Rubins JB, Charboneau D, Alter MD, Bitterman PB, Kratzke RA. Inhibition of mesothelioma cell growth in vitro by doxycycline. *J.Lab Clin.Med.* 2001; 138: 101-106.
191. Rudek MA, Figg WD, Dyer V *et al.* Phase I clinical trial of oral COL-3, a matrix metalloproteinase inhibitor, in patients with refractory metastatic cancer. *J.Clin.Oncol.* 2001; 19: 584-592.
192. Ryan KM, Ernst MK, Rice NR, Vousden KH. Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature* 2000; 404: 892-897.

193. Saikali Z, Singh G. Doxycycline and other tetracyclines in the treatment of bone metastasis. *Anticancer Drugs* 2003; 14: 773-778.
194. Sato H, Seiki M. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* 1993; 8: 395-405.
195. Scheidereit C. IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* 2006; 25: 6685-6705.
196. Seftor RE, Seftor EA, De Larco JE *et al.* Chemically modified tetracyclines inhibit human melanoma cell invasion and metastasis. *Clin.Exp.Metastasis* 1998; 16: 217-225.
197. Selzer MG, Zhu B, Block NL, Lokeshwar BL. CMT-3, a chemically modified tetracycline, inhibits bony metastases and delays the development of paraplegia in a rat model of prostate cancer. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1999; 878: 678-682.
198. Sethi CS, Bailey TA, Luthert PJ, Chong NH. Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders. *Br.J.Ophthalmol.* 2000; 84: 654-666.
199. Sfanos KS, De Marzo AM. Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology* 2012; 60: 199-215.
200. Shen LC, Chen YK, Lin LM, Shaw SY. Anti-invasion and anti-tumor growth effect of doxycycline treatment for human oral squamous-cell carcinoma--in vitro and in vivo studies. *Oral Oncol.* 2010; 46: 178-184.
201. Shimizu T, Kanai K, Kyo Y, Asano K, Hisamitsu T, Suzaki H. Effect of tranilast on matrix metalloproteinase production from neutrophils in-vitro. *J.Pharm.Pharmacol.* 2006; 58: 91-99.
202. Shishodia S, Aggarwal BB. Diosgenin inhibits osteoclastogenesis, invasion, and proliferation through the downregulation of Akt, I kappa B kinase activation and NF-kappa B-regulated gene expression. *Oncogene* 2006; 25: 1463-1473.
203. Shukla S, Gupta S. Suppression of constitutive and tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor (NF)-kappaB activation and induction of apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma PC-3 cells: correlation with down-regulation of NF-kappaB-responsive genes. *Clin.Cancer Res.* 2004; 10: 3169-3178.
204. Simon C, Simon M, Vucelic G *et al.* The p38 SAPK pathway regulates the expression of the MMP-9 collagenase via AP-1-dependent promoter activation. *Exp.Cell Res.* 2001; 271: 344-355.
205. Skotheim RI, Korkmaz KS, Klok TI *et al.* NKX3.1 expression is lost in testicular germ cell tumors. *Am.J.Pathol.* 2003; 163: 2149-2154.
206. Smith VA, Cook SD. Doxycycline-a role in ocular surface repair. *Br.J.Ophthalmol.* 2004; 88: 619-625.

207. Sovak MA, Bellas RE, Kim DW *et al.* Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J.Clin.Invest* 1997; 100: 2952-2960.
208. St Sauver JL, Jacobson DJ, McGree ME, Girman CJ, Lieber MM, Jacobsen SJ. Longitudinal association between prostatitis and development of benign prostatic hyperplasia. *Urology* 2008; 71: 475-479.
209. Steinmeyer J, Daufeldt S, Taiwo YO. Pharmacological effect of tetracyclines on proteoglycanases from interleukin-1-treated articular cartilage. *Biochem.Pharmacol.* 1998; 55: 93-100.
210. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 2001; 17: 463-516.
211. Sundov Z, Tomic S, Vilovic K, Kunac N, Kalebic M, Bezic J. Immunohistochemically detected high expression of matrix metalloproteinase-2 as predictor of poor prognosis in Duke's B colon cancer. *Croat.Med.J.* 2008; 49: 636-642.
212. Syed S, Takimoto C, Hidalgo M *et al.* A phase I and pharmacokinetic study of Col-3 (Metastat), an oral tetracycline derivative with potent matrix metalloproteinase and antitumor properties. *Clin.Cancer Res.* 2004; 10: 6512-6521.
213. Talvensaari-Mattila A, Paakko P, Hoyhtya M, Blanco-Sequeiros G, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a marker of aggressiveness in breast carcinoma. *Cancer* 1998; 83: 1153-1162.
214. Tamargo RJ, Bok RA, Brem H. Angiogenesis inhibition by minocycline. *Cancer Res.* 1991; 51: 672-675.
215. Thompson RW, Baxter BT. MMP inhibition in abdominal aortic aneurysms. Rationale for a prospective randomized clinical trial. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1999; 878: 159-178.
216. Treiber M, Neuhofer P, Anetsberger E *et al.* Myeloid, but not pancreatic, RelA/p65 is required for fibrosis in a mouse model of chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 2011; 141: 1473-85, 1485.
217. Trudel D, Fradet Y, Meyer F, Harel F, Tetu B. Membrane-type-1 matrix metalloproteinase, matrix metalloproteinase 2, and tissue inhibitor of matrix proteinase 2 in prostate cancer: identification of patients with poor prognosis by immunohistochemistry. *Hum.Pathol.* 2008; 39: 731-739.
218. Tu G, Xu W, Huang H, Li S. Progress in the development of matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr.Med.Chem.* 2008; 15: 1388-1395.
219. Türkeri L. Kronik prostatit, enflamasyon ve prostat kanseri. *Üroonkoloji Bülteni* 2007; 11-15.
220. Üstunes L. RxMediaPharma interaktif ilaç bilgi kaynağı. *Genel mühendislik mekanik sanayi ve ticaret a.ş.*, 2012.

221. Uzzo RG, Crispen PL, Golovine K, Makhov P, Horwitz EM, Kolenko VM. Diverse effects of zinc on NF-kappaB and AP-1 transcription factors: implications for prostate cancer progression. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1980-1990.
222. van den Bogert C, Dontje BH, Kroon AM. The antitumour effect of doxycycline on a T-cell leukaemia in the rat. *Leuk.Res.* 1985; 9: 617-623.
223. van Leenders GJ, Gage WR, Hicks JL *et al.* Intermediate cells in human prostate epithelium are enriched in proliferative inflammatory atrophy. *Am.J.Pathol.* 2003; 162: 1529-1537.
224. Van LP, Wielockx B, Puimege L, Noel A, Lopez-Otin C, Libert C. Resistance of collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8)-deficient mice to TNF-induced lethal hepatitis. *J.Immunol.* 2005; 175: 7642-7649.
225. Vihinen P, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int.J.Cancer* 2002; 99: 157-166.
226. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res.* 2002; 4: 157-164.
227. Webster GA, Perkins ND. Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53. *Mol.Cell Biol.* 1999; 19: 3485-3495.
228. Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 1991; 5: 2145-2154.
229. Woessner JF, Jr. MMPs and TIMPs--an historical perspective. *Mol.Biotechnol.* 2002; 22: 33-49.
230. Wojtowicz-Praga SM, Dickson RB, Hawkins MJ. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest New Drugs* 1997; 15: 61-75.
231. Wong CP, Bray TM, Ho E. Induction of proinflammatory response in prostate cancer epithelial cells by activated macrophages. *Cancer Lett.* 2009; 276: 38-46.
232. Xiao G, Harhaj EW, Sun SC. NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol.Cell* 2001; 7: 401-409.
233. Xu J, Benyon RC, Leir SH, Zhang S, Holgate ST, Lackie PM. Matrix metalloproteinase-2 from bronchial epithelial cells induces the proliferation of subepithelial fibroblasts. *Clin.Exp.Allergy* 2002; 32: 881-888.
234. Yilmaz HH, Yazihan N, Tunca D. Cancer Trends and Incidence and Mortality Patterns in Turkey. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 2011; 41: 10-16.

235. Zeigler ME, Chi Y, Schmidt T, Varani J. Role of ERK and JNK pathways in regulating cell motility and matrix metalloproteinase 9 production in growth factor-stimulated human epidermal keratinocytes. *J.Cell Physiol* 1999; 180: 271-284.
236. Zhang L, Altuwaijri S, Deng F *et al.* NF-kappaB regulates androgen receptor expression and prostate cancer growth. *Am.J.Pathol.* 2009; 175: 489-499.
237. Zhang Y, Wang Y, Yuan J *et al.* Toll-like receptor 4 ligation confers chemoresistance to docetaxel on PC-3 human prostate cancer cells. *Cell Biol.Toxicol.* 2012; 28: 269-277.
238. Zhou BP, Hu MC, Miller SA *et al.* HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway. *J.Biol.Chem.* 2000; 275: 8027-8031.
239. Zucker S, Cao J, Chen WT. Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene* 2000; 19: 6642-6650.

ÖZGEÇMİŞ

29 Nisan 1987 yılında Hatay'da doğdum. Lise öğrenimimi İskenderun İbni Sina Anadolu Lisesi'nde 2005 yılında ikincilik derecesiyle mezun olarak tamamladıktan sonra, lisans eğitimimi Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde 2010 yılında bitirdim. Aynı yılın Eylül ayında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı'na kabul edildim ve tez çalışmalarımı bu branşta devam ettirdim.