

ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**YENİ NON-STEROİD ANTI-İNFLAMATUAR İLAÇ
TÜREVLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE
İNSAN GLİOBLASTOMA HATTINDA ANTI-KANSER
POTANSİYELLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Özlem ÖZDEMİR

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

2015

Her hakkı saklıdır

ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

ETÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**YENİ NON-STEROİD ANTI-İNFLAMATUAR İLAÇ TÜREVLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE İNSAN GLİOBLASTOMA HATTINDA ANTI-KANSER POTANSİYELLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

22 / 07 / 2015

Özlem ÖZDEMİR

Her hakkı saklıdır
T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ ONAY FORMU

YENİ NON-STERÖİD ANTIİNFLAMATUAR İLAÇ TÜREVLERİNİN SENTEZİ,
KARAKTERİZASYONU VE İNSAN GLİOBLASTOMA HATTINDA ANTI-KANSER
POTANSİYELLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Doç.Dr. Hasan TÜRKEZ danışmanlığında, Özlem ÖZDEMİR tarafından hazırlanan bu çalışma 22/07/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç.Dr.Hasan TÜRKEZ

İmza :

Üye : Prof.Dr. Antonio DI STEFANO

İmza :

Üye : Doç.Dr.Mesut TAŞKIN

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum


Doç.Dr. Hasan TÜRKEZ
Enstitü Müdürü

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YENİ NON-STEROİD ANTI-İNFLAMATUAR İLAÇ TÜREVLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE İNSAN GLİOBLASTOMA HATTINDA ANTI-KANSER POTANSİYELLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Özlem ÖZDEMİR

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hasan TÜRKEZ

Glioblastoma multiforme (GBM) tüm primer beyin kanserlerinin dörtte birini oluşturan ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından grade IV olarak sınıflandırılan ölümcül bir kanserdir. GBM tedavisi günümüzde halen kısıtlı ve hastaların yaşam süresi kısadır. Bu yüzden yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada NSAİİ (Ibuprofen, Naproksen ve Flurbiprofen) türevlerinin sentezlenmesi ve U-87 MG insan GBM hücre kültüründe yeni sentezlenen bazı NSAİİ türevlerinin *in vitro* sitolojik etkileri araştırmak amaçlanmıştır. Deneylede 9 farklı NSAİİ türevi bileşik 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında U-87 MG insan GBM hücre kültüründe 48 saat süresince denenmiş ve MTT testi ile hücre canlılığı belirlenmiştir. Ardından LDH testi ile membran bütünlüğü araştırılmıştır. Elde edilen değerlere göre NSAİİ türevlerinin U-87 MG insan GBM'de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. Yeni sentezlenen NSAİİ türevlerinin U-87 MG insan GBM hücreleri üzerindeki sitotoksik ve anti-kanser etkileri ilk defa bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

2015, 58 sayfa

Anahtar Kelimeler: Glioblastoma multiforme, Non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar, U87-MG hücre hattı, sitotoksikite, LDH salınımı, MTT

ABSTRACT

MASTER THESIS

SYNTHESIS , CHARACTERIZATION OF NOVEL NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS AND EVALUATION OF THEIR ANTI-CANCER POTENTIALS IN HUMAN GLIOBLASTOMA CELL LINE

Özlem ÖZDEMİR

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

Glioblastoma Multiforme (GBM) is one of the most malignant brain tumors classified as grade IV by WHO (World Health Organization) accounts for one in four of all primary brain tumors. The treatment options of GBM is so limited and the median survival is still short. Thus, new treatment approaches are necessary to prolong this limited life time. In this study we aimed to synthesize new NSAID prodrugs (Ibuprofen, Naproxen ve Flurbiprofen) and investigate in vitro cytotoxic effects of these NSAID prodrugs on U-87 MG human GBM cell line. U-87 MG GBM cell cultures were treated with 9 different NSAIDs (3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µg/ml) for 48 hours, Cell viability was investigated with MTT assay. Then, membran integrity was determined with LDH assay. According to the our results NSAID prodrugs exhibited dose dependent cytotoxic effects on U-87 MG GBM cell line when compared with the control group. The cytotoxic and anti-cancer effects of novel NSAID prodrugs on U-87 MG human GBM cell line were investigated for the first time.

2015, 58 pages

Keywords: Glioblastoma multiforme, Non-steroidal anti-inflammatory drugs,U87-MG cell line, cytotoxicity, LDH release, MTT

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım süresince görüş ve deneyimlerinden yararlandığım, desteğini her zaman hissettiğim danışman hocam Doç.Dr. Hasan TÜRKEZ'e ve Prof.Dr. Antonio DI STEFANO'ya teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmam sırasında yardım ve desteğini esirgemeyen Yrd.Doç.Dr. Serkan ÖRTÜCÜ'ye çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca birlikte çalıştığım Arş.Gör. Ayşenur ÖZDEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımın her aşamasında desteğini esirgemeyen Arş.Gör. Fatma Necmiye KACI'ya ve Arş.Gör. Mehmet Enes ARSLAN'a teşekkür ederim.

Hayatımda her dönemde olduğu gibi bu zorlu çalışma döneminde de yanımda olduklarını hissettiğim, maddi ve manevi yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen annem Hatice ÖZDEMİR, babam Osman ÖZDEMİR ve kardeşlerim Alaaddin ÖZDEMİR, Sümeyye ÖZDEMİR ve Fatih ÖZDEMİR'e yürekten teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Beyin Tümörleri.....	1
1.1.1. Glioblastoma Multiforme	3
1.1.1.1. GBM risk faktörleri	6
1.1.1.2. GBM tedavisi	7
1.2. Non-Steroid Antiinflamatuvar İlaçlar	8
1.2.1. Non-Steroid Antiinflamatuvar İlaçların Anti-Kanser Etkileri	9
1.2.1.1. Non-Steroid Antiinflamatuvar İlaçların Apoptoz Sürecine olan Etkisi.....	12
1.2.1.2. Non-Steroid Antiinflamatuvar İlaçların Anjiyogenez Sürecine olan Etkisi ...	14
1.2.2. Non-Steroid Antiinflamatuvar İlaçların Yan etkileri	15
1.2.3. Tez kapsamında kullanılan NSAİİ'lar	15
1.2.3.1. Ibuprofen	15
1.2.3.2. Naproksen	16
1.2.3.3. Flurbiprofen	17
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	22

İÇİNDEKİLER(devam)

3.1. Materyaller.....	22
3.1.1. Kullanılan Hücre Hattı.....	22
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	22
3.1.3. Kullanılan Cihazlar.....	22
3.2.Yöntemler.....	23
3.2.1. NSAİİ Türevlerinin Sentezi.....	23
3.2.1.1. Alkilendiamin ile eşleşme için genel metot.....	23
3.2.1.2. Lipoik asit ile eşleşme reaksiyonu.....	23
3.2.2. NSAİİ Türevlerinin Karakterizasyonu.....	24
3.2.3. Hücre Kültürü.....	25
3.2.3.1.Glioblastoma multiforme hücre hattının kültür edilerek çoğaltılması.....	25
3.2.3.2. Hücrelerin Deneye alınması ve İlaç uygulanması.....	25
3.2.3.3. MTT Analizi.....	26
3.2.3.4. LDH Analizi.....	27
3.2.4. İstatistiksel Analiz.....	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	29
4.1.Bileşiklerin Karakterizasyonu.....	29
4.2.NSAİİ Türevlerinin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri.....	33
4.2.1. Naproksen-hekzandiamid-LA(AL-3)'nın U-87 MG hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi.....	33
4.2.2. Flurbiprofen-hekzandiamid-LA(AL-6)'nın U-87 MG hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi.....	34
4.2.3. İbuprofen-hekzandiamid-LA(AL-9)'nın U-87 MG hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi.....	36
4.2.4. Naproksen-2-amino-etilenamid(AL-11)'in U-87 MG hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi.....	37

İÇİNDEKİLER(devam)

4.2.5. Naproksen-2-amino-hekzanamid(AL-13)'in U-87 MG hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi	38
4.2.6. Flurbiprofen-2-amino-etilenamid(AL-15)'in U-87 MG hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi	40
4.2.7. Flurbiprofen-2-amino-hekzanamid(AL-17)'in U-87 MG hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi	41
4.2.8. Ibuprofen-2-amino-etilenamid(AL-19)'in U-87 MG hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi	42
4.2.9. Ibuprofen-2-amino-hekzanamid(AL-21)'in U-87 MG hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi	44
4.3.LDH Analizi Sonuçları	45
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	47
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Primer ve Sekonder Glioblastoma Oluşumu	5
1.2. Astroitik, oligodendroglial ve oligoastroitik gliomalarda görülen genetik değişimler	6
1.3. Araşidonik asit metabolizması	9
1.4. Kansere ait özellikler(Hallmarks of Cancer)	10
1.5. İnflamasyon ve kanser ilişkisi	11
1.6. NSAİİ'lerin apoptoz süreci ile olan ilişkisi	13
1.7. İbuprofenin iki enantiomerik formu	16
1.8. Naproksenin iki enantiomerik formu	17
1.9. Flurbiprofenin iki enantiomerik lipoik asit ile eşleşme reaksiyonu	18
3.1. NSAİİ türevlerinin sentezi	24
3.2. MTT indirgenme reaksiyonu	26
3.3. NADH indirgenme reaksiyonu	27
4.1. Naproksen-hekzandiamid-LA'nın artan dozlarda U-87 MG insan GBM hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki	33
4.2. U-87 MG hücre hattında Naproksen-hekzandiamid-LA uygulaması sonrası Probit analizi	34
4.3. Flurbiprofen-hekzandiamid-LA'nın artan dozlarda U-87 MG insan GBM hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki	35
4.4. U-87 MG hücre hattında Flurbiprofen-hekzandiamid-LA uygulaması sonrası Probit analizi	35
4.5. İbuprofen-hekzandiamid-LA'nın artan dozlarda U-87 MG insan GBM hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki	36

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.6. U-87 MG hücre hattında İbuprofen-hekzandiamid-LA uygulaması sonrası Probit analizi	36
4.7. Naproksen-2-amino-etilenamid'in artan dozlarda U-87 MG insan GBM hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki	37
4.8. U-87 MG hücre hattında Naproksen-2-amino-etilenamid uygulaması sonrası Probit analizi	38
4.9. Naproksen-2-amino-hekzanamid'in artan dozlarda U-87 MG insan GBM hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki	39
4.10. U-87 MG hücre hattında Naproksen-2-amino-hekzanamid uygulaması sonrası Probit analizi	39
4.11. Flurbiprofen-2-amino-etilenamid'in artan dozlarda U-87 MG insan GBM hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki	40
4.12. U-87 MG hücre hattında Flurbiprofen-2-amino-etilenamid uygulaması sonrası Probit analizi	40
4.13. Flurbiprofen-2-amino-hekzanamid'in artan dozlarda U-87 MG insan GBM hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki	41
4.14. U-87 MG hücre hattında Flurbiprofen-2-amino-hekzanamid uygulaması sonrası Probit analizi	42
4.15. İbuprofen-2-amino-etilenamid'in artan dozlarda U-87 MG insan GBM hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki	43
4.16. U-87 MG hücre hattında İbuprofen-2-amino-etilenamid uygulaması sonrası Probit analizi	43
4.17. İbuprofen-2-amino-hekzanamid'in artan dozlarda U-87 MG insan GBM hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki	44

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.18. U-87 MG hücre hattında Ibuprofen-2-amino-hekzanamid uygulaması sonrası Probit analizi	44
4.19. NSAİİ türevlerinin artan dozlarda U-87 MG insan GBM hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki (karşılaştırmalı).....	45
4.20. NSAİİ türevlerinin U-87 MG hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkiler	46



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. WHO SSS tümörleri ana grupları	2
1.2. WHO Nöroepitelyal tümörlerin alt grupları	2
1.3. WHO Astrositik tümörler	3
1.4. GBM'ye neden olan genetik riskler ve insidansları.....	7
1.5. NSAİİ'lerin Anjigenez sürecinde olası katkıları	14
3.1. Tezde kullanılan NSAİİ Türevleri	24
4.1. U-87 MG hücre hattında Naproksen-hekzandiamid-LA uygulaması sonrası SPSS analizi	34
4.2. U-87 MG hücre hattında Flurbiprofen-hekzandiamid-LA uygulaması sonrası SPSS analizi	35
4.3. U-87 MG hücre hattında İbuprofen-hekzandiamid-LA uygulaması sonrası SPSS analizi	37
4.4. U-87 MG hücre hattında Naproksen-2-amino-etilenamid uygulaması sonrası SPSS analizi	38
4.5. U-87 MG hücre hattında Naproksen-2-amino-hekzanamid uygulaması sonrası SPSS analizi	39
4.6. U-87 MG hücre hattında Flurbiprofen-2-amino-etilenamid uygulaması sonrası SPSS analizi	41
4.7. U-87 MG hücre hattında Flurbiprofen-2-amino-hekzanamid uygulaması sonrası SPSS analizi	42
4.8. U-87 MG hücre hattında İbuprofen-2-amino-etilenamid uygulaması sonrası SPSS analizi	43
4.9. U-87 MG hücre hattında İbuprofen-2-amino-hekzanamid uygulaması sonrası SPSS analizi	45

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
%	Yüzde Konsantrasyon
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
°C	Santigrat Derece
ml	Mililitre
mmol	Milimol
N	Normalite
Nm	Nanometre
R _f	Retention factor
Rpm	Revolutions per minute
δ	Delta
µM	Mikromolar

Kısaltmalar

AA	Araşidonik asit
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CDK4- 6	Siklin bağımlı kinaz 4-6
CDKN2A-B	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A-B
COX	Siklooksijenaz
CYP2C9	Sitokrom P450 2C9
CYP450	Sitokrom P450
DCC	Deleted in Colorectal Carcinoma
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EET	Epoksieikozatrienoik Asit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Egr-1	Early growth response protein 1
ERBB2	Erb-B2 reseptör tirozin kinaz 2
FA	Flufenamik asit
FBS	Fetal bovine serum
FGF 1	Fibroblast büyüme faktörü 1
Flt-1	Fms-benzeri tirozin kinaz 1
GBM	Glioblastoma Multiforme
GİS	Gastrointestinal sistem
GOS	Gossypol
HETE	Hidroksieikozatetraenoik asite
HIF1 α	Hipoksi indüklenebilir faktör 1 α
IC ₅₀	%50 ölüm oranı
IDH1-2	Izositrat dehidrogenaz 1-2
JAK	Janus kinase
LA	Lipoik asit
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LOX	Lipoksigenaz
LT	Lökotrienlere
LX	Lipoksinlere
MAPK(Erk-1)	Mitogen-activated protein kinases
MET	Mesenchymal epithelial transition factor
MRI	Magnetik Rezonans Görüntüleme
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)2,5-difenil tetrasodyum bromid
NAG-1	NSAİİ aktive edici gen 1
NF1,	Neurofibromin 1
NF- κ B	Nukleer faktör- κ B
NMR	Nükleer manyetik rezonans
NSAİİ	Non-steroid anti-inflamatuar ilaçlar
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Prostasiklinlere

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

PDGFRA	Platelet kökenli büyüme faktör reseptörü
PG	Prostaglandin
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RB1	Retina blastoma
S100A9	S100 calcium-binding protein A9
SPSS	Statistic Program for Social and Science
SSS	Santral Sinir Sistemi
STAT3	Sinyal transduser ve transkripsiyon 3 aktivatörü
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TX	Tromboksanlara
VEGFR	Vasküler endoteliyal büyüme faktörü
VHL	Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

1.1. Beyin Tümörleri

Beyin tümörleri Santral Sinir Sistemi (SSS)'ni oluşturan beyin ve omurilikteki hücrelerin kontrolsüz bölünmeleri ve anormal büyümeleri sonucu gelişen hastalık grubudur. Köken aldıkları organa göre primer veya sekonder beyin tümörü olarak sınıflandırılırlar. Primer beyin tümörü beyinden köken alırken metastatik beyin tümörü olarak da adlandırılan sekonder beyin tümörü başka organdan gelişen tümörün metastaz yapması sonucu oluşmaktadır (Kheirrollahi vd. 2015).

Primer beyin tümörleri tüm hastalıklar içinde en dramatik türlerden birini oluşturmaktadır. Çocukluk çağının en sık rastlanan ikinci malignitesi olup erişkinlerde en sık görülen 6. malignite olarak karşımıza çıkmaktadır (Bailey ve Cushing 1926).

Primer beyin tümörleri her yıl dünyada yaklaşık 200.000 insanı etkilemekte ve yıllar içinde insidansında artış görülmektedir (Kheirrollahi vd. 2015). Bunun sebebi olarak tümör oluşumuna neden olabilecek çevresel faktörlerin artmasının yanı sıra manyetik rezonans (MRI), bilgisayarlı tomografi gibi tanıyı kolaylaştırıcı görüntüleme tekniklerinin yaygınlaşması görülmektedir (Blumenthal ve F Schulman 2005; Lee vd. 2010).

Beyin tümörlerinin etiyolojisi tam olarak belirlenememiştir. Ancak diğer kanserlerde olduğu gibi beslenme, sigara, alkol kullanımı, mesleki nedenler ve radyasyon gibi bazı risk faktörlerinin rolü araştırılmaktadır. Bunlar içinde özellikle radyasyon beyin tümörleri için önemli risk faktörüdür (Prasad ve Haas-Kogan 2009). Ayrıca, son yıllarda artan cep telefonu kullanımının beyin tümörlerinin oluşumuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Khurana vd. 2009).

SSS tümörlerinden biri olan beyin tümörlerinin ilk tanımlanması 1829 yılında Cruveilhier tarafından ve ilk sınıflandırılması 1836 yılında Bressler tarafından yapılmıştır. Ancak beyin tümörlerinin bugünkü sınıflandırılmasının temelini Virchow

atmıştır. Wirchow, nöroglia ve glioma tanımlarını ilk kez yaparak tümörlerin özellikleri arasında ilişki kurulmasını sağlamıştır. 1993 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılan sınıflandırmada ise tümörler 4 evreye ayrılmıştır ve evre I-IV arasında tümörler benignden maligne doğru sınıflanmıştır (Kleihues vd. 1993). 2007 yılında WHO tarafından tümörlerin histopatolojik özellikleri, yaşam süresi ve genetik profilleri dikkate alınarak dördüncü kez güncellenen sınıflama günümüzde en sık kullanılan sistemdir (Louis vd. 2007).

Santral sinir sistemi tümörleri WHO sınıflamasına göre 7 ana gruba bölünmüştür (WHO 2007) (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. WHO SSS tümörleri ana grupları

Nöroepitelyal Doku tümörleri
Kranyal ve Paraspinal Sinirlerin Tümörleri
Meninkslerin Tümörleri
Lenfomalar ve Hematopoyetik Tümörler
Germ Hücre Tümörleri
Sellar Bölgenin Tümörleri
Metastatik Tümörler

SSS tümörlerinden nöroepitelyal doku tümörleri 9 alt gruba ayrılmıştır (WHO 2007) (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. WHO Nöroepitelyal tümörlerin alt grupları

Astroitik Tümörler
Oligodendroglial tümörler
Oligoastroitik tümörler
Ependimal tümörler
Koroid pleksus tümörleri
Diğer nöroepitelyal tümörler
Nöronal ve mikst nöroglial tümörler
Pineal parankimal tümörler
Embriyonel tümörler

Glial hücrelerden köken alan ve glioma olarak adlandırılan primer beyin tümörleri santral sinir sistemi tümörlerinin en büyük grubunu oluşturmaktadır. Glioma tanımının içine giren tümörler; astrositolar, oligodendrogliolar, oligoastrocitolar ve ependimomlardır. Astrositik tümörler tüm gliomaların %80-85'ini oluştururlar. WHO sınıflamasına göre 4 dereceye ayrılmışlardır (Çizelge 1.3)(Louis vd. 2007). Derece artışıyla anjiyogenezde ve tümör büyüme potansiyelinde artış ile birlikte hastalığın seyrinde giderek kötüleşme söz konusudur. Derece I astrositolar subependimal dev hücreli astrositom ve pilositik astrositom olarak ikiye ayrılır. Derece II astrositolar diffüz astrositolar olarak da adlandırılırlar. Anaplastik astrositolar derece III düzeyindeki astrositik tümörler olup malign astrositom veya yüksek dereceli astrositom olarak da bilinirler. Glioblastoma multiforme (GBM) derece IV astrositom olup, en malign astrositik tümördür. Bu tümörlerin görülme yaşı ve sıklığı birbirlerinden farklılık göstermektedir.

Çizelge 1.3. WHO Astrositik tümörler

WHO Derece I	Subependimal dev hücreli astrositom Pilositik astrositom
WHO Derece II	Diffüz astrositom Pilomiksoid astrositom Pleomorfik ksantoastrocitom Oligoastrocitom
WHO Derece III	Anaplastik astrositom
WHO Derece IV	Glioblastoma Gliosarkom

1.1.1. Glioblastoma Multiforme

Glioblastoma yetişkinlerde görülen en yaygın primer beyin tümörüdür. WHO sınıflamasına göre derece IV astrositom olarak adlandırılan glioblastoma nekrozis ve vasküler proliferasyon patolojisine sahiptir.

Glioblastoma multiforme tüm gliomaların %45-50'sini oluşturmaktadır. 50-60 yaşları arasında görülen glioblastomanın erkeklerdeki insidansı kadınlara göre daha yüksektir (K/E=2/3). Ortalama 5,4 ayda belirti göstermektedir. GBM beyinde her bölgede görülmesine rağmen özellikle hemisferlerde yaygın olarak görülmektedir (Markett vd. 2005).

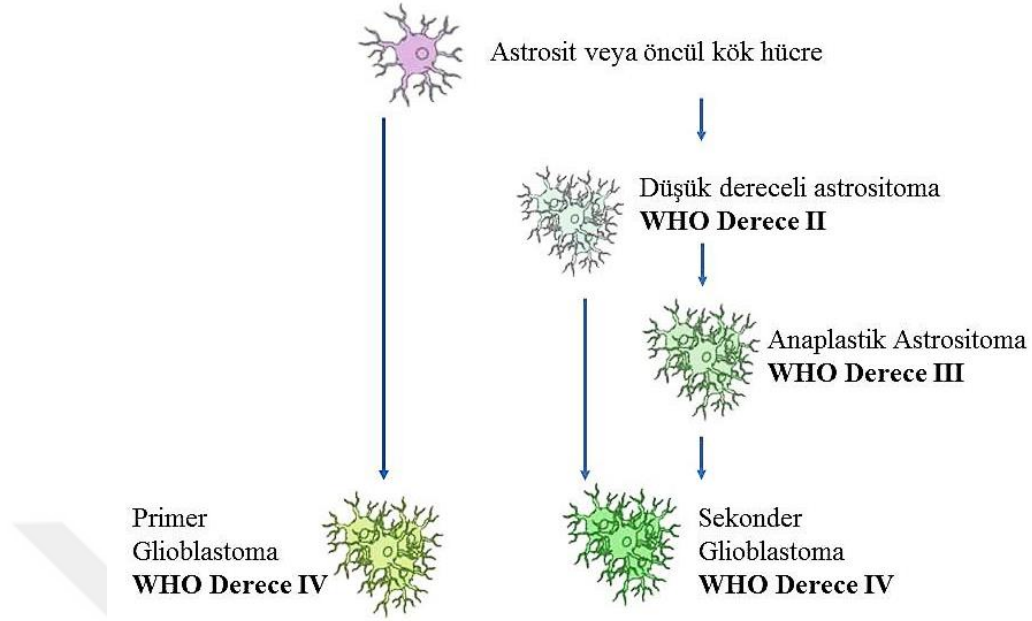
GBM kendi kendine çoğalma, kontrolsüz gelişme, dokuya invazyon yapabilme, apoptotik uyarıma direnç gösterme ve yeni kan damarı oluşturabilme gibi malign fenotipik özelliklere sahiptir (Sathornsumetee ve Rich 2007).

Aynı tümör dokusunda ve farklı hastalara ait tümör örneklerinde genetik yapının değiştiği ve bu yüzden hastalığın "multiform" olarak isimlendirildiği bilinmektedir (Kraakstad ve Chekenya 2010).

Glioblastomaların sekonder ve primer olmak üzere iki alt grubu bulunmaktadır. GBM'lerin %90'ı primer GBM iken, %10'u sekonder GBM olarak tanımlanır. Primer ve sekonder glioblastomada farklı hastalık subtipleri görülmekte ve kişilerin etkilenme yaşları ile hastalığın genetik yolağı farklılık göstermektedir (Ohgaki ve Kleihues 2007).

Glial öncül hücrelerden gelişen primer glioblastoma genellikle daha yaşlı bireylerde (ortalama 55 yaş) görülür ve hızlı seyreder (yaklaşık 3 ay). Önceden var olan klinik ya da histopatolojik bulgusu yoktur. 10q kaybı (%70), EGFR amplifikasyonu (%36), P16INK4A delesyonu (%31) ve PTEN mutasyonu (%25) ile karakterize edilmektedir (Ohgaki ve Kleihues 2007).

Sekonder glioblastoma ise düşük derece diffüz astrositoma veya anaplastik astrositomadan gelişmekte ve yavaş progresyon göstermektedir (Şekil 1.1.)(Ohgaki ve Kleihues 2007). Düşük dereceli astrositomaların GBM'ye dönüşmesi ortalama 4-5 yıl sürmektedir(Kraakstad ve Chekenya 2010). Sekonder glioblastomada genellikle TP53 mutasyonuna rastlanmaktadır(Ohgaki ve Kleihues 2009).

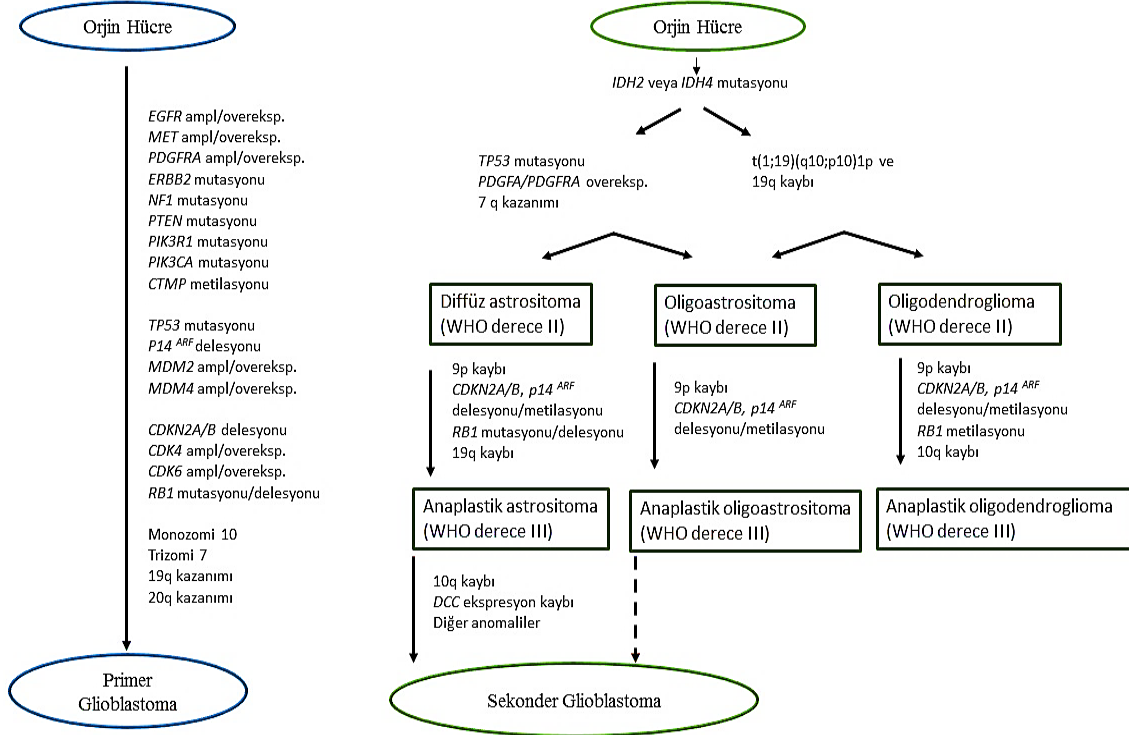


Şekil 1.1 Primer ve Sekonder Glioblastoma Oluşumu

*Ohgaki ve Kleihues (2007)'den modifiye edilerek alınmıştır.

Primer ve sekonder GBM'lerin oluşumları ve gelişimleri sırasında farklı genetik yollar etkilidir (Ohgaki ve Kleihues 2007; Ohgaki ve Kleihues 2009). Primer glioblastomalarda önemli hücresel yollarda görevli genlerde kromozomal, genetik ve epigenetik düzeyde kompleks değişimler görülmektedir. Reseptör tirozin kinaz/mitojen aktive edici protein kinaz/fosfoinositol 3-kinaz yolağı (*EGFR*, *MET*, *PDGFRA*, *ERBB2*, *NF1*, *PTEN*, *PIK3R1*, *PI3KCA*, *CTMP*), p53 yolağı (*TP53*, *p14^{ARF}*, *MDM2*, *MDM4*), ve pRb1 yollarındaki (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *CDK4*, *CDK6*, *RB1*) değişimler primer glioblastomada görülen genetik değişimlerdir. Ayrıca primer glioblastomalarda sıklıkla monozomi 10, trizomi 7 ve 19q ile 20q kazanımı da görülmektedir (Riemenschneider vd. 2010). Sekonder GBM'de platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü A (*PDGFRA*), *PDGFRA* ligandı ve tümör baskılayıcı protein 53 (*p53*) genlerinde, siklin bağımlı kinaz genlerinde (*CDKN2A/B*) delesyon ve metilasyon, retinoblastom yatkınlık lokusu protein 1 (*pRB1*) genlerinde mutasyon, *DCC* genlerinde ekspresyon kaybı sıklıkla görülen genetik değişikliklerdir. Ayrıca, *IDH1* veya *IDH2* mutasyonu ile kromozom 10 delesyonu sekonder glioblastomada saptanan anomalilerdir (Şekil 1.2.) (Sathornsumetee ve Rich 2008; Riemenschneider vd. 2010).

Primer GBM için EGFR amplifikasyonu, sekonder GBM için ise p53 mutasyonu karakteristik genetik değişikliklerdir (Sathornsumetee ve Rich 2008). Parsons ve arkadaşları (2008), GBM olgularında yaptıkları genom analizinde en sık değişen genlerin p53 (%40), EGFR (%37) ve PTEN (%30) olduğunu bildirmiştir.



Şekil 1.2 Astroitik, oligodendroglial ve oligoastroitik gliomalarda görülen genetik değişimler

*Riemenschneider MJ (2010)'den modifiye edilerek alınmıştır.

1.1.1.1. GBM risk faktörleri

GBM'ye yol açan risk faktörleri tam olarak bilinmemektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar ile glioma riskini arttıran bazı etiyolojik faktörler açığa çıkarılmıştır. Pestisitlere maruz kalma ve cep telefonu kullanımı gibi çeşitli çevresel faktörler üzerinde durulmuştur. Ancak bu faktörlerden sadece iyonize radyasyonun GBM'ye neden olduğu kesin olarak ortaya konulmuştur (Porter 2012). Ayrıca GBM'nin Li-Fraumeni sendromu,

Turcot sendromu ve nörofibromatozis-1 gibi bazı genetik hastalıklarla da ilişkili olduğu düşünülmektedir (Sørensen vd. 1986).

GBM çevresel faktörler dışında genetik etkenler tarafından da oluşabilmektedir (Parsons vd. 2008). Bu faktörler Çizelge 1.4' de özetlenmiştir.

Çizelge 1.4. GBM'ye neden olan genetik riskler ve insidansları

Genetik Risk	İnsidans
Kromozom 10 delesyonu	% 70
EGFR amplifikasyonu	% 40-% 60
P16INK4a delesyonu	% 30
P14ARF mutasyonu	% 30
P53 mutasyonu	% 30
PTEN mutasyonu	% 25
RB1 metilasyonu	% 15
MGMT metilasyonu	% 36

1.1.1.2. GBM tedavisi

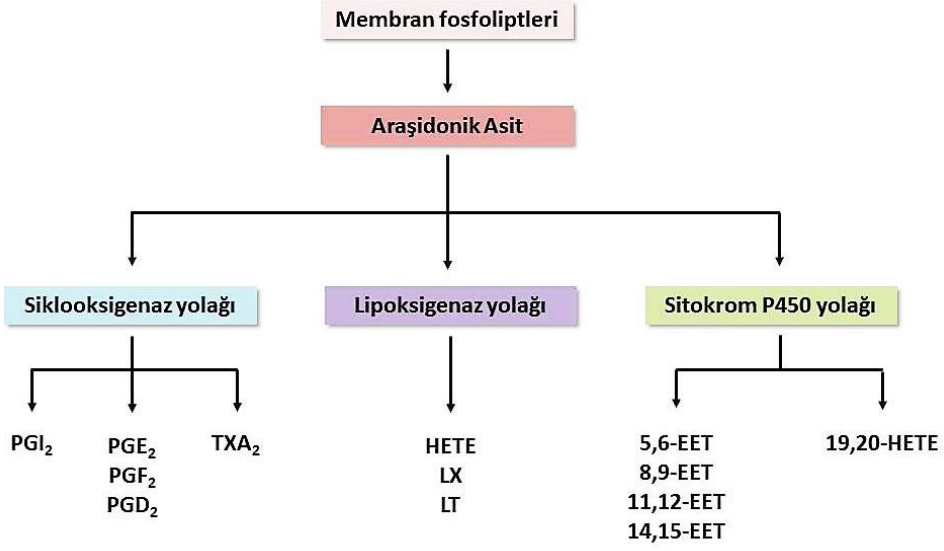
GBM tedavisinde kullanılan birincil yaklaşım cerrahi işlem ile tümörlü dokunun alınmasıdır. Cerrahi müdahale yapılamayan dokularda ise kemoterapi ve radyasyon ile tümörün büyümesinin engellenmesi amaçlanmaktadır. Ancak GBM farklı hücrelerden oluşan heterojen bir yapı gösterdiği için tedavisi güç kanserlerden biridir ve yüksek morbidite ve mortalite özelliklerine sahiptir. Son yıllarda tedavi amaçlı kullanılan yöntemlerde çok başarılı sonuçlar elde edilememekle birlikte gen tedavisi, anti-anjiogenez tedavi, lokal polimer ilaç uygulaması gibi deneysel çalışmalarla bazı olgularda yaşam süresinin uzatılması sağlanmıştır (Mason vd. 2007).

1.2. Non-Steroid Anti-inflamatuar İlaçlar

Non-steroid anti-inflamatuar ilaçlar (NSAİİ) farklı kimyasal gruplara sahip olmalarına rağmen benzer terapötik etki gösteren ilaç grubudur. Bu etkiler analjezik , anti-piretik ve anti-inflamatuar etkilerdir (Ardoın veSundy 2006).

NSAİİ'ların kökeni söğüt ağacı gibi salisilat içeren bitkilerin ekstraktlarının kullanıldığı Antik Roma ve Yunan dönemlerine kadar uzanmaktadır (Rainsford 2007).

NSAİİ'ların temel etki mekanizması prostaglandin (PG) biyosentezinin inhibisyonudur. PG'ler inflamasyon, ağrı, kanser, osteoporosis, astım gibi birçok fizyolojik ve patolojik hastalıklardan sorumludur. (Marnett vd. 1999; Rao ve Knaus 2008) Fizyolojik ve patolojik bir uyarana maruz kalma sonucunda membran fosfolipitlerinden fosfolipaz A₂ enzimi aracılığıyla araşidonik asit (AA) salınır. Bunun ardından serbest AA 3 farklı enzimatik yoldan biri ile dönüştürülür (Şekil 1.3.)(Wang vd. 2005) Siklooksigenaz (COX) yolağında AA PG'lere, prostasiklinlere (PC) ve tromboksanlara (TX) dönüştürülür. Lipoksigenaz (LOX) yolağında AA hidroksieikozatetraenoik asite (HETE), lökotrienlere (LT) ve lipoksinlere (LX) dönüştürülür. Sitokrom P450 (CYP450) monooksijenaz yolağında ise AA HETE ve epoksieikozatrienoik asit (EET) üretimi için salınır. Bu yolaklar dışında AA enzimatik olmayan yolakta izoprostan sentezi için salınır. Bu metabolik yolakların ürünleri eikozanoid olarak adlandırılır ve önemli intersellüler ve intrasellüler sinyal molekülleri olarak görev yaparlar. Damar geçirgenliği, platelet agregasyonu, proteinlerin taşınması ve proliferasyon gibi fizyolojik süreçlere katılırlar. Ayrıca eikozanoidler inflamasyon, otoimmünite, anjiyogenez, alerjik hastalıklar ve kanserde de görev yapmaktadır (Gerritsen 1996; Capdevila vd. 2000; Harizi vd. 2008). Yapılan çalışmaların çoğu PG'ler ve COX enzimi aracılığıyla üretilen metabolitlerin etkileri üzerine yoğunlaşmıştır.



Şekil 1.3. Araşidonik asit metabolizması

*Hıřovská vd. (2015)'den modifiye edilerek alınmıştır.

1.2.1. Non-Steroid Antiinflatuar İlaçların Anti-kanser Etkileri

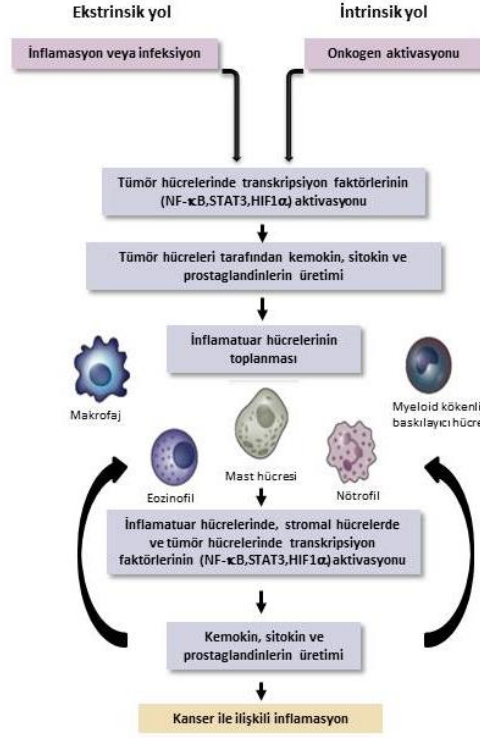
Kanser, hücrelerin normal metabolik ve davranışsal özelliklerinin değişmesiyle kontrolsüz ve düzensiz çoğalmalarına, immün sistemden kaçarak çevre ve uzak dokulara yayılmaları ile metastaz oluşturmalarına yol açan çok basamaklı bir süreçtir (Merlo vd. 2006). Hanahan ve Weinberg kanser gelişiminin çok basamaklı malignant bir süreç olduğunu açıkladıkları çalışmalarında kansere ait 10 özellik (hallmarks of cancer) öne sürmüşlerdir (Şekil 1.4.)(Hanahan ve Weinberg 2011). Bu özellikler; (I)Büyüme sinyallerini devam ettirme (II)Gelişme inhibitörlerinden kaçma (III)İmmun yıkımdan kaçma (IV)Ölümsüzlük yeteneği kazanma (V)Tümör oluşumunu indükleyen inflamasyon (VI)İnvazyon ve metastaz (VII)Anjiyogenez (VIII)Genom instabilite ve mutasyon (IX)Apoptozdan kaçma (X)Hücrel enerjiyetiklerin dereğülasyonu



Şekil 1.4. Kansere ait özellikler(Hallmarks of Cancer)

*Hanahan ve Weinberg (2011)'den modifiye edilerek alınmıştır.

Yapılan deneysel araştırmalar inflamasyon ile tümör oluşumu ve gelişiminin bağlantılı olduğunu göstermiştir. Tümör dokularında inflamatuvar hücrelerinin ve inflamatuvar mediyatörlerinin (kemokinler, sitokinler ve prostaglandinler) varlığı kanser ile inflamasyonun ilişkisini destekler niteliktedir. Kanser ile inflamasyon arasındaki bağlantı iki farklı yol ile açıklanmıştır : i) intrinsik yol ii) ekstrinsik yol. İntrinsik yolda mutasyon ve kromozomal düzenlenmeler sonucu çeşitli onkogenlerin aktivasyonu ve tümör supresör genlerin inaktivasyonu gibi neoplaziye neden olan genetik olaylar etkilidir. Ekstrinsik yolda ise inflamatuvar veya infeksiyöz şartlar kanser riskini artırmaktadır. Her iki yolun sonucunda tümör hücrelerinde transkripsiyon faktörleri nukleer faktör- κ B (NF- κ B), sinyal transduser ve transkripsiyon 3 aktivatörü (STAT3) ve hipoksi indüklenebilir faktör 1 α (HIF1 α) aktifleşerek sitokin, kemokin ve prostaglandin gibi inflamatuvar mediyatörlerinin üretimini düzenlerler ve inflamatuvar hücreleri aktifleştirirler. Sitokinler inflamatuvar hücrelerdeki aynı transkripsiyon faktörlerini aktifleştirerek daha fazla inflamatuvar mediyatörlerinin üretilmesine ve kanser ile ilişkili inflamatuvar mikroçevrenin oluşumuna yol açarlar (Şekil 1.5.)(Mantovani vd. 2008).



Şekil 1.5 İnflamasyon ve kanser ilişkisi

* Mantovani vd. (2008)'den modifiye edilerek alınmıştır.

Deneysel çalışmalar, hayvan tümör modelleri ve *in vitro* araştırmalar NSAİİ'lerin anti-kanser etkilerini ortaya koymuştur (Verheul vd. 1999; Akhmedkhanov vd. 2001; Cuzick vd. 2009; Uddin vd. 2010). NSAİİ'lerin anti-tümörojenik etkileri kolon (Sandler vd. 2003), akciğer (Harris vd. 2007), prostat (Wynne ve Djakiew 2010), baş boyun (Jayaprakash vd. 2006) ve mide kanseri (Uefuji vd. 2000) gibi pek çok kanser tipinde gösterilmiştir.

NSAİİ'lerin anti-kanser potansiyelleri siklooksigenaz enzimlerini inhibe etmelerinden kaynaklanmaktadır. Neoplastik ve tümör dokularında overeksprese olan COX genleri NSAİİ'lar tarafından baskılanmaktadır.

Siklooksigenaz (COX) enzimi Siklooksigenaz-1 (COX-1) ve Siklooksigenaz-2 (COX-2) olmak üzere iki izoforma sahiptir (Vane 1971). COX-1 normal dokularda bulunan temel izoformdur. Mide mukozasının korunması, böbreklerde damar genişlemesi

gibi fizyolojik fonksiyonlardan sorumludur (Vane 2000). COX-2 ise inflamasyon ya da sitokin, endotoksin, interlökin ve forbolester gibi mitojenik uyarılara cevap olarak indüklenir (DuBois vd. 1994). Bu yüzden COX-2 enziminin patolojik değişikliklerden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Yakın zamanda yapılan pek çok çalışmada da COX-2 enziminin karsinogenez ile olan ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır.

COX-2 enziminin çeşitli mekanizmalarla tümörögenез sürecine ve tümör hücrelerin malign fenotip kazanmasına katkıda bulunduğu rapor edilmiştir. Bu mekanizmalar: (I)prostaglandin üretiminin artması (II)prokarsinojenlerin karsinojenlere dönüşmesi (III)apoptoz inhibisyonu (IV)anjiyogenez indüksiyonu (V)kanser hücrelerinin invazivliğinin artması (VI)inflamasyonu ve immunoduyarlılığı düzenleme (Dempke vd. 2001; Xu 2002)

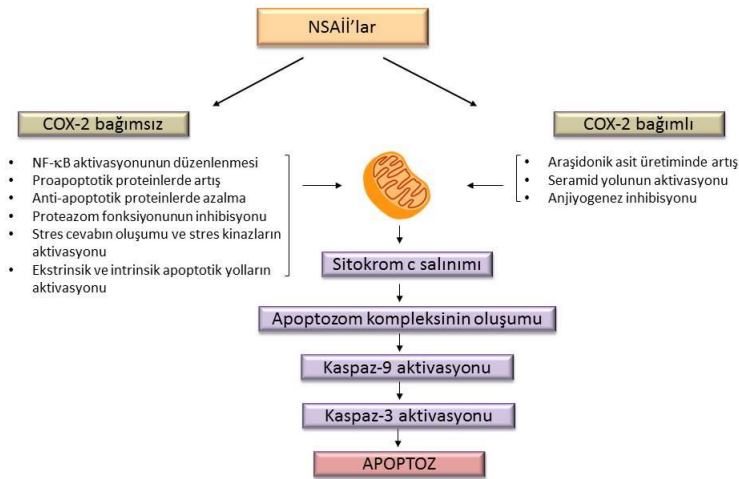
COX enziminin karsinogenez sürecine olan katkısının gösterilmesinin ardından PGE₂'nin çeşitli sinyal yolları ile sinerjetik etkiye giren sinyal kaskadlarını tetiklediği tespit edilmiştir. Bu sinyal yolları EGFR sinyalizasyonu (Yoshimoto vd. 2002), nükleer reseptör sinyalizasyonu (Wang vd. 2004), NfκB sinyalizasyonu (Poligone ve Baldwin 2001), MAPK sinyalizasyonu (Husain vd. 2001; Wong vd. 2004), VEGFR sinyalizasyonu (İñiguez vd. 2003) ve JAK-STAT sinyalizasyonudur (Shreedhar vd. 1998).

1.2.1.1.NSAİİ'lerin Apoptoz sürecine etkisi

Apoptoz, hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, programlı ve organizmada homeostaziye sağlayan bir mekanizmadır. Embriyonik dönemde ve postnatal gelişimde önemli rolü olan apoptoz aynı zamanda Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, X ışınları ve radyasyona maruz kalma gibi patolojik durumlarda da görülmektedir.

Apoptozu indükleyen uyarılarla birlikte mitokondride membran bütünlüğü bozularak sitokrom c salınır. Sitokrom c güçlü bir apoptoz mediyatörüdür ve intrasellüler proteaz ailelerinden biri olan kaspazları aktive ederler. Kaspazlar hücre organelleri ve kromatinini hızlı bir şekilde degrade ederek hücre yıkımına neden olur (Earnshaw vd. 1999).

NSAİİ'lerin apoptoz sürecine olan katkısı COX-2 bağımlı ve COX-2 bağımsız mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşmektedir (Şekil 1.6.)(Chan 2002). NSAİİ'lerin anti-karsinojenik etkisinin temel olarak COX-2 inhibisyonu aracılığıyla olduğu düşünülmektedir. COX-2 overekspresyonunun PGE₂ aracılığıyla hücre proliferasyonunu uyararak apoptozu inhibe ettiği ve anjiyogenezi artırarak karsinogeneze katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Chan 2002; Scartozzi vd. 2004; Dai ve Wang 2006). COX-2 overekspresyonu Bcl-2 seviyesini artırarak premalignant hücrelerin apoptozunu engellemektedir (Tsuji ve DuBois 1995). Fakat COX-2 inhibisyonunun apoptozu nasıl indüklediği tam olarak bilinmemektedir. Hücresel PGE₂ seviyesinin azalması, araşidonik asit seviyesinin artması ve hücre proliferasyonunun azalmasının apoptozun indüklenmesinde rolü olduğu düşünülmektedir (Chan vd. 1998). Araşidonik asit konsantrasyonundaki artış mitokondriyal membran geçirgenliğini bozarak sitokrom c salınımına neden olmakta ve apoptozu indüklemektedir (Scorrano vd. 2001; Cao vd. 2000). Araşidonik asit ayrıca güçlü bir apoptoz uyarıcı olan seramid üretimini artırmaktadır (Hannun 1996).



Şekil 1.6. NSAİİ'lerin apoptoz süreci ile olan ilişkisi

*Chan T. 2002'den modifiye edilerek alınmıştır.

1.2.1.2. NSAİİ'lerin Anjiyogenez sürecine etkisi

NSAİİ'lerin anjiyogenez sürecine olan etkisi tam olarak aydınlatılamamakla birlikte pek çok çalışmada COX-2 ile tümör anjiyogenezinin ilişkili olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda anjiyogenik büyüme faktörü ekspresyonundaki lokal değişiklikler, VEGF mediyatör ve regülatörlerindeki değişiklikler, endotelial hücre göçü, inflamatuvar hücrelerin ve plataletlerin toplanması, tromboksan A₂ aracılı etkiler gibi mekanizmalar üzerinde durulmuştur. Yapılan çalışmalar ve literatür bilgilerinin ışığında NSAİİ'lerin anjiyogenez inhibisyonu sürecine olan etkisinin multifaktöriyel olduğu önerilmiştir. NSAİİ'lerin etkili olduğu olası mekanizmalar Çizelge 1.5'de özetlenmiştir.

Çizelge 1.5. NSAİİ'lerin anjiyogenez sürecinde olası etkileri

Mekanizma	Sonuç	Referans
MAP kinaz (Erk2) inhibisyonu ve nükleer translokasyon	Endotelial hücre proliferasyonunun inhibisyonu	(Jones vd. 1999)
Hücre döngüsü proteinlerinin baskılanması ve retinoblastoma proteininin inhibisyonu	Endotelial hücre proliferasyonunun duraklaması	(Pai vd. 2000)
Egr-1 inhibisyonu	Endotelial hücre proliferasyonunun inhibisyonu , VEGF and Flt-1 gen aktivasyonunda azalma, FGF 1 ve 2 transkripsiyonunun inhibisyonu	(Szabó vd. 2001)
VHL tümör süpresör ekspresyonunda artış ve HIF-1 α akümüülasyonunda azalma	VEGF ve Flt-1 gen aktivasyonunda azalma	(Jones vd. 2002)
Nitrik oksit sentaz inhibisyonu . anjiyogenezi uyaran nitrik oksit konsantrasyonunda azalma	Anjiyogenez inhibisyonu	(Santos vd. 1995)
Anjiyogenez inhibitörü endostatin seviyesinde artış	Endotelial hücre proliferasyonunun inhibisyonu, mikrodamar stabilizasyonu	(Ma vd. 2002)
Endotelial hücre apoptozunun uyarılması	Endotelial hücre sayısında azalma	(Leahy vd. 2002)

1.2.2. Non-Steroid Antiinflamatuvar İlaçların Yan Etkileri

NSAİİ'lerin uzun süre ve sık kullanımlarının çeşitli yan etkileri olduğu gösterilmiştir. Yan etkiler içinde özellikle gastrointestinal sistemi (GİS) ilgilendiren gastrit, karın ağrısı, peptik ülser, gastrointestinal kanama, bulantı gibi etkiler yer almaktadır (Wolfe 2000). Bu etkilerin mide için koruma sağlayan prostaglandinleri oluşturan COX-1 enziminin inhibisyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. GİS ile ilgili yan etkileri azaltmak için COX-2 selektif NSAİİ'lar üzerinde durulmuştur. Ancak çeşitli çalışmalarla COX-2 selektif NSAİİ'ların da uzun süre kullanımı sonucunda kardiyovasküler rahatsızlık riskini artırdığı rapor edilmiştir (Nussmeier vd. 2005; Solomon vd. 2005). Bu etkinin anti-trombotik platelet inhibitörü ve vasodilatör olan PGI₂ ve protrombotik platelet agonisti ve vazokonstriktör olan TXA₂ üretimi arasındaki dengenin bozulmasıyla oluşan protrombotik durumdan kaynaklandığı düşünülmektedir (Vonkeman 2006).

1.2.3. Tez Kapsamında Kullanılan NSAİİ'lar

1.2.3.1. İbuprofen

İbuprofen analjezik, anti-inflamatuvar ve anti-piretik etkilere sahip fenilpropionik asit türevi non-steroid anti-inflamatuvar bir ilaçtır. Dr. Stuart Adams, Collin Burrows ve John Nicholson tarafından keşfedilen ibuprofen romatoid artrit gibi inflamasyon durumlarında ağrı önleyici ve ateşin düşürülmesi amacıyla kullanılmaktadır (Howard P. 1991; Buser, Poiger, ve Müller 1999).

İbuprofen, diğer non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar gibi, COX-1 ve COX-2 enzimlerini inhibe ederek prostaglandin sentezini baskılamaktadır (Kurumbail vd. 1996).

İbuprofenin moleküler ağırlığı 206,29 g/mol ve moleküler formülü C₁₃H₁₈O₂'dür. İbuprofen beyaz kristalize toz halindedir ve etanol, metanol organik çözücülerde kolayca çözünürken suda pratik olarak çözünmez.

İbuprofenin emilimi oral yol ile alındığında gastrointestinal kanaldan %80 oranında hızla gerçekleşmektedir. Plazma yarı ömrü 1,8 – 2,4 saattir (Payan ve Shearn 1989).

İbuprofenin yapısında bulunan kiral karbon atomu nedeniyle S- ve R- olmak üzere farklı biyolojik etki potansiyellerine sahip iki enantiomer formu bulunur (Şekil 1.7.). İbuprofenin sadece S(+) formunun prostaglandin sentezini inhibe ettiği dolayısıyla anti-inflamatuar etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Chen vd. 1991).



Şekil 1.7. İbuprofenin iki enantiomerik formu

*Rouzer C.(2011)'den alınmıştır

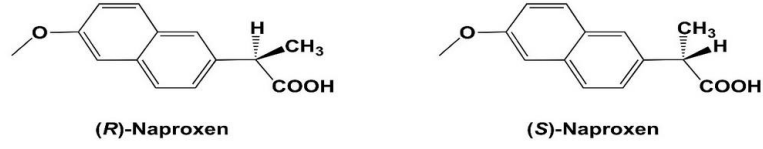
1.2.3.2. Naproksen

Naproksen kimyasal olarak α -metil-6-metoksi-2-naftalin-asetik asit ya da 2-(6-metoksi-2-naftil) propiyonik asit olarak adlandırılan sıklıkla ateş düşürücü, inflamasyon ve ağrı durumlarında kullanılan bir anti-inflamatuar ilaçtır (Daughton 2003).

Moleküler ağırlığı 230,259 g/mol olan naproksen COX-1 ve COX-2 enzimini inhibe ederek prostaglandin sentezini durdurmaktadır (Kurumbail vd. 1996).

$C_{14}H_{14}O_3$ kapalı formülüne sahip olan naproksen beyaz kristal bir yapıdadır. Ağız yoluyla alındığında tamamen emilir. Ağız yoluyla alındıktan 2–4 saat içerisinde maksimum kan konsantrasyonuna ulaşır. Karaciğerde metabolize olur (Dural EA 2002).

Naproksen asidik grup, aromatik grup, yan zincirler ve moleküle rasemik özellik kazandıran bir kiral karbon atomuna sahiptir. Naproksenin -R ve -S olmak üzere iki formu vardır (Şekil 1.8). Birçok NSAİİ'de olduğu gibi enantiyomerlerden biri daha fazla aktiviteye sahiptir. S-Naproksen R- enantiyomerine göre 28 kat daha aktif olarak etki gösterir ve R-Naproksenin toksik özelliği de vardır. (Gyo Lee vd. 2001)



Şekil 1.8 Naproksenin iki enantiomerik formu

*Rouzer C.(2011)'den alınmıştır.

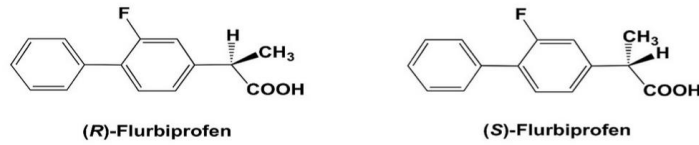
1.2.3.3.Flurbiprofen

Flurbiprofen, fenilpropiyonik asit türevi olan ve analjezik, anti-inflamatuar ve anti-piretik etkili nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçların profen grubunun bir üyesidir. Molekül ağırlığı 244,261 g/mol olan flurbiprofen, beyaz renkte kristal toz şeklindedir. Alkolde, asetonda ve eterde kolay çözünürken suda pratik olarak çözünmez.

Flurbiprofen ağız yoluyla alındıktan sonra gastrointestinal bölgeden kolayca absorbe olmakta, 1-2 saat içinde maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşmaktadır. Karaciğerde sitokrom P450 izoenzim CYP2C9 yoluyla büyük çoğunluğu metabolize olmakta ve idrarla vücuttan atılmaktadır (Martindale 2007).

Flurbiprofenin COX-1 ve COX-2 enzimini inhibe ederek inflamasyonu engellemesinin yanı sıra birçok kanser hücresi üzerinde anti-proliferatif etkileri olduğu ve tümör gelişimini baskıladığı gösterilmiştir (Jin vd. 2010).

Yapıdaki asimetric karbondan dolayı S- ve R- izomerleri arasında S- formu daha aktiftir (Şekil 1.9.). Safrada az aktif R(-) formundan daha aktif olan S(-) formuna dönmektedir (van Sorge vd. 1998).



Şekil 1.9 Flurbiprofenin iki enantiomerik formu

*Rouzer C.(2011)'den alınmıştır.

Yukarıda bahsedilen literatür bilgilerinin sonucunda

- (I) Antik Roma ve Yunan dönemlerinden beri analjezik, anti-piretik ve anti-inflamatuar amaçla kullanılan NSAİİ'lar günümüzde en sık reçete edilen ilaçlardır.
- (II) NSAİİ'lar terapötik etkilerinin yanı sıra kolon, akciğer, prostat gibi çeşitli kanser dokularında tümörögenез sürecini baskılayarak anti-kanser özellik göstermektedir.
- (III) Araştırmada kullanılmak üzere seçilen U-87 MG hücre hattı epiteliyal morfolojiye sahip insan glioblastoma tümör modelidir ve kanser araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.
- (IV) Tez kapsamında test edilen NSAİİ türevi bileşiklere ait bilgi literatürde bulunmamaktadır.

Bu nedenle ilk kez anti-kanser etkileri araştırılacak bu bileşiklerden elde edilen sonuçların bundan sonraki genetik çalışmalar için başlangıç niteliği taşıyacağı düşünülmektedir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Harris vd. (2000) 7,12-dimetilbenz(α)antrasen ile meme kanseri oluşumu indüklenen Sprague Dawley sıçanlarda COX-2 inhibitörü olan Celecoxib'in anti-tümörojenik etkisini araştırmışlardır. Celecoxib ile tedaviden sonra tümörlerin hacminde, derecesinde ve insidansında önemli ölçüde azalma olduğunu rapor etmişlerdir.

Zhou vd. (2001) AGS ve MKN-28 gastrik kanser hücrelerini kullanarak NSAİİ'lar tarafından indüklenen apoptotik süreçte etkili olan bcl-2 ailesi proteinlerinin ve kaspazlarının rolünü araştırmayı amaçlamışlardır. Aspirin ve Indomethacin ile muamele edilen hücrelerde Bcl-2 protein seviyesinin değişmediğini ancak proapoptotik proteinlerden olan bax ve bak proteinlerinin ekspresyonlarında artış olduğunu gözlemişlerdir. Ayrıca kaspaz-3 aktivitesinde de artış olduğunu rapor etmişlerdir.

Baek vd. (2002) COX-1 ve COX-2 overeksprese eden HCT-116 hücreleri geliştirmişlerdir. COX ekspresyonunun ve PGE2 ile araşidonik asidin proapoptotik ve anti-tümörojenik aktiviteye sahip NAG-1 geninin ekspresyonu üzerinde etkili olmadığını göstermişlerdir ve bundan yola çıkarak NSAİİ aracılı NAG-1 induksiyonun prostanoitten bağımsız bir yol ile gerçekleştiğini önermişlerdir.

Soumaoro vd. (2004) kolorektal karsinogeneizde yer alan COX-1 ve COX-2 ekspresyon seviyelerini göstermek amacıyla kolorektal adenokarsinoma teşhisi konmuş 288 hastadan toplanan tümör dokularını immünohistokimyasal olarak incelemişlerdir. COX-2 ekspresyonunun tümör boyutu ve derecesi, invazyon derinliği ve metastaz ile önemli ölçüde ilişkili olduğu ortaya konmuştur. COX-1 ekspresyonunun ise sadece tümör boyutu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Ribeiro vd. (2007) sentezledikleri ibuprofen, aspirin, Naproksen ve Indomethacin dirutenyum komplekslerinin ($[Ru_2(dNSAID)_4Cl]$) ve yeni $[Ru_2(dNSAID)_4(H_2O)_2]PF_6$) optik spektroskopik tekniklerle karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu bileşiklerden Naproksen ve ibuprofen 'den türevlenen bileşiklerin C6 glioma proliferasyonunda önemli derecede inhibisyon etkisi olduğunu göstermişlerdir.

Zhoue vd. (2010) yeni jenerasyon non-steroid anti-inflamatuar ilaçlardan biri olan Celecoxib'in U251 insan glioma hücre hattı üzerindeki proliferatif ve apoptotik etkilerini araştırmışlar ve elde ettikleri bulgular sonucunda doza ve zamana bağlı olarak proliferasyonun azaldığını ve apoptozun indüklendiğini bildirmişlerdir. Ayrıca Celecoxib ile survivin ekspresyonunun ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir.

Lee vd. (2011) NSAİİ olan flufenamik asit (FA) bileşiğinin antikanser bir ilaç olarak kullanılabilmesi için FA'nın hidrofobik monomerik ve dimerik prodruglarını sentezlemiş ardından da nanoprodruk haline getirmişlerdir. Nanoprodruk haline gelen FA'nın normal FA'ya göre U87 MG glioma hücrelerinin gelişimlerinin inhibisyonu üzerinde daha etkili olduğunu göstermişlerdir.

Kardosh vd. (2011) COX inhibitörü olan Celecoxib ilacının 25, 50, 75, 100, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarında LN229, LN18, U87 ve A172 insan glioblastoma hücre hatlarındaki anti-proliferatif etkilerini araştırdıkları çalışmalarında Celecoxib'in hücre proliferasyonunu azalttığını belirtmişlerdir.

Gomes ve Colquhoun (2012) T98G insan glioma hücre hattı kullanarak prostaglandin E1 ve E2 ile ibuprofenin proliferatif ve apoptotik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında ibuprofenin COX inhibisyonu aracılığıyla hücre sayısını ve migrasyonu azalttığını bulmuşlardır. Ayrıca eksojen PGE1 ve PGE2 varlığının hücre sayısını artışa neden olduğu göstermişlerdir.

Sareddy vd. (2013) yaptıkları bir çalışmada glioblastoma gelişiminde önemli role sahip Wnt/β-katenin/Tcf sinyal yolağını üzerinde NSAİİ olan diklofenac ve celecoxib'in etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonunda diklofenac ve Celecoxib'in Wnt/β-katenin/Tcf sinyal yolağının inhibisyonu ile insan glioblastoma hücrelerinin proliferasyonunu, koloni oluşumunu ve migrasyonu önemli derecede azalttığını göstermişlerdir.

Ning vd. (2013) glioma hücrelerinin büyümesini tetikleyen S100A9 proteininin ekspresyonunu ve NSAİİ'lerin S100A9 inhibiyonundaki potansiyelini araştırmışlardır. S100A9 protein seviyesi ile tümörün histolojik derecesi arasında doğru orantı olduğu ve glioma hücrelerinde S100A9 'un overekprese olduğunu rapor etmişlerdir. Buna ek olarak aspirinin glioma hücrelerinde hücre proliferasyonunu azalttığını rapor etmişlerdir. Aspirinin S100A9 overespresyonunun önün geçmek için bir hedef olabileceği üzerinde durmuşlardır.

Benadiba vd. (2014) Dirutenyum-Ibuprofen bileşiğinin [Ru₂Cl(Ibp)₄] C6 glioma sıçan modeli üzerinde anti-tümör özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında tümör bölgesinde toksik bir etki olmadan %41-45 oranında azalmaya neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Mudiraj ve Geeviman (2014) aspirin ve triazol halkalarını birleştirerek sentezledikleri yeni bileşiklerin 50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM, 600 µM ve 800 µM konsantrasyonlarında C6 glioma hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerini test ettikleri araştırmada tümör hücre canlılığın azaldığını ortaya koymuşlardır.

3. MATERYAL VE METOT

3.2. Materyaller

3.2.3. Kullanılan Hücre Hattı

U-87 MG insan glioblastoma hücre hattı Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarından temin edilmiştir.

3.2.4. Kullanılan Kitler

- MTT kiti **Chemicon®**
- LDH kiti **Cell Biolabs**

3.2.5. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- DMEM besi ortamı **Sigma-Aldrich®**
- Fetal Bovine Serum (FBS) **Gibco®**
- L – Glutamin **Gibco®**
- PBS (Phosphate Buffered Saline) **Sigma-Aldrich®**
- Penisilin / Streptomisin **Sigma-Aldrich®**
- Tripsin / EDTA **Sigma-Aldrich®**
- Tripan mavisi **Sigma-Aldrich®**
- DMSO (Dimetil sülfoksit) **Sigma-Aldrich®**
- Etanol **Merck**
- Metanol **Merck**

3.2.6. Kullanılan Cihazlar

- Mikroplate Okuyucu **Biotek EPOCH**
- Laminar Flow **ESCO NordicSafe™**
- CO₂ İnkübatör **ESCO Celculture CO2 Incubator**
- - 80°C Derin Dondurucu **ESCO Lexicon®**
- Su Banyosu **Wisd WiseBath**
- Masaüstü Soğutmalı Santrifüj **Hettich Zentrifugen**
- İnvrted Mikroskop **Leica**

- Otoklav **Tomy SX-500E**
- Vorteks **Wisd Wisemix VM-10**
- Hassas Terazı **Shimadzu ATX224**
- pH metre **OHAUS Starter 3100**
- Su Saflaştırma Cihazı **Millipore Direct- Q-3 UV**

3.2. Yöntemler

3.2.1. NSAİİ Türevlerinin Sentezi

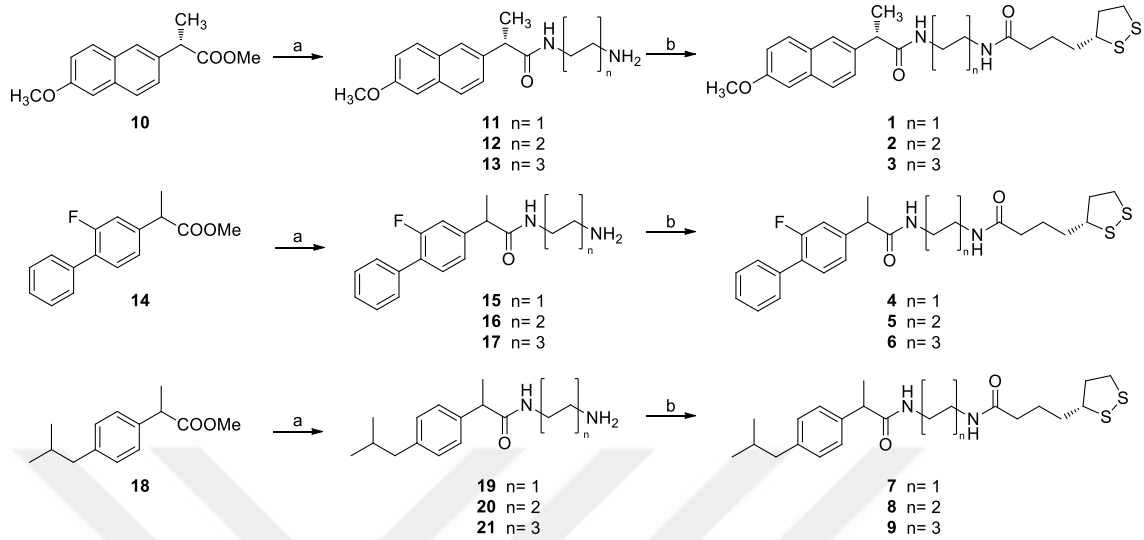
Tez kapsamında kullanılan 9 farklı bileşik G. d'Annunzio Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Bölümü Prof.Dr. Antonio Di Stefano danışmanlığında sentezlenmiştir.

3.2.1.1. Alkilendiamin ile eşleşme için genel metot

NSAİİ metil ester ile alkilendiamin (etilendiamin, bütüldiamin veya heksandiamin) karışımı karıştırıcıda 120 °C'de 4 saat reflux edilmiştir. Sonrasında reaksiyon 1N HCl ile asidifiye edilmiş su ile söndürülmüştür. Reaksiyona girmeyen esterler CHCl₃ ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Daha sonra sulu faz NaHCO₃ ile işlem den geçirilmiş ve CHCl₃ ile ekstrakte edilmiştir. Organik tabaka evaporasyondan önce susuz Na₂SO₄ üzerinde kurutulmuştur.

3.2.1.2. Lipoik asit ile eşleşme reaksiyonu

Kuru DCM içindeki lipoik asit solüsyonu NSAİİ-2-amino-alkilenamid (**11-13**, **15-17**, veya **19-21**) (0.9 mmol) TEA (21.16 mmol), HOBt (1.29 mmol), ve EDCI (2.57 mmol) ile karıştırılarak reaksiyonun gerçekleşmesi için oda sıcaklığında 16 saat bekletilmiştir. Su ile söndürüldükten sonra ürünün ekstraksiyonu DCM ile gerçekleştirilmiştir. Organik tabaka susuz MgSO₄ üzerinde kurutulmuştur ve solvent vakum ile uzaklaştırılmıştır. Ham üründen 1-9 bileşiklerinin elde edilebilmesi için CHCl₃/MeOH (95:5) ile kromatografi yapılmıştır.



Şekil 3.1. NSAİİ türevlerinin sentezi

- a) Etilendiamin (11,15,19), bütilendiamin (12,16,20) ve hekzandiamin (13,17,21) ile eşleşme reaksiyonu b) Lipoik asit ile eşleşme reaksiyonu

3.2.2. NSAİİ Türevlerinin Karakterizasyonu

Sentezlenen NSAİİ türevi bileşiklerin yapıları kromatografi, ^1H - ve ^{13}C -NMR teknikleriyle karakterize edilmiştir.

U87-MG glioblastoma hücreleri üzerindeki etkileri araştırılmak üzere sentezlenen 21 bileşikten biyolojik etkinliği bilinmeyen 9 tanesi seçilmiştir(Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Tezde kullanılan NSAİİ Türevleri

Bileşik no	Bileşik adı	M.A	Verim
AL-3	Naproksen-hekzandiamid-LA	460,65	%70
AL-6	Flurbiprofen-hekzandiamid-LA	474,65	%55
AL-9	Ibuprofen-hekzandiamid-LA	436,67	%55
AL-11	Naproksen-2-amino- etilenamid	488,71	%61

Çizelge 3.1. Tezde kullanılan NSAİİ Türevleri (devamı)

AL-13	Naproksen-2-amino-hekzanamid	502,71	%80
AL-15	Flurbiprofen-2-amino-etilenamid	464,73	%67
AL-17	Flurbiprofen-2-amino-hekzanamid	516,76	%73
AL-19	Ibuprofen-2-amino-etilenamid	530,76	%66
AL-21	Ibuprofen-2-amino-hekzanamid	492,78	%62

3.2.3. Hücre Kültürü

3.2.3.1. Glioblastoma multiforme hücre hattının kültür edilerek çoğaltılması

Çalışmada insan glioblastoma astrositomadan köken alan U-87 MG hücreleri kullanıldı. Hücreler flasklarda tek katman olacak şekilde %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin, %1 L-glutamin içeren Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) solüsyonu içinde 37°C'de, pH dengesinin korunması için %5 CO₂ içeren ortamda büyütüldü. %70-80 konfluense ulaşan hücreler haftada en az iki kere pasajlanarak çoğaltıldı. Flasktaki besiyeri uzaklaştırılarak PBS ile birkaç kez yıkandı ve %0.1 tripsin ve %0.04 EDTA solüsyonu eklendi. Flasklar inkübatöre kaldırılarak 5 dk beklendi. Hücreler flask tabanından tamamen ayrılınca tripsini inhibe etmek amacıyla besiyeri eklendi. Hücreler 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı ve besiyeriyle yeniden süspansiyon edildi.

Hücre sayısını saptamak amacı ile hemositometre kullanıldı. Hemositometrede, ortama ilave edilen tripan mavisi (vital boya) ile süspansiyondaki hücrelerin hem sayısı hem de canlılık oranları belirlendi. 25 cm² flasklara 1x10⁵ hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve 2 günde bir besiyeri değiştirildi.

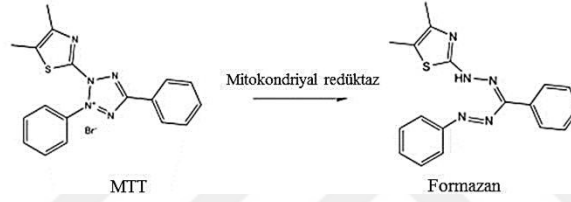
3.2.3.2. Hücrelerin Deneye Alınması

Deneyde hücreler 2x10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plâtelere ekildi. Hücrelerin tutunması için 24 saat 5% CO₂ içeren 37°C sıcaklıkta inkübe edildi ve bu süre sonunda bileşikler uygulandı. Bileşikler DMSO içerisinde çözülerek hazırlandı

ve besiyeri ile dilue edilerek belirlenen dozlara ulaşıldı. Her bileşik için 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 µg/ml dozları kullanıldı. İlaçların bütün dozları için 4'er kuyucuğa ekim yapıldı. Plate % 5 CO₂'li ortamda 37°C'de 48 saat inkübe edildi.

3.2.3.3. MTT Analizi

MTT yöntemi, hücre canlılığının kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Yöntem, canlı hücreler tarafından sarı renkli MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazolium bromid) boyasının tetrazolium halkasının parçalanması ile koyu mavi-mor renkli formazan bileşiğinin oluşması ilkesine dayanmaktadır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. MTT indirgenme reaksiyonu

MTT analizi için Chemicon firmasına ait MTT Cell Growth Assay Kit'i kullanılmıştır. Kitteki prosedür uygulanarak analiz gerçekleştirilmiştir.

96 kuyucuklu platalere ekilen hücre kültürleri %70-80 konfluense ulaştıktan sonra belirlenen doz konsantrasyonlarında bileşikler ile muamele edildi. 48 saat sonra her kuyucuğa steril ve karanlık koşullarda 10 µl MTT solüsyonu eklendi. Kültürler 37°C'de 4 saat inkübasyonda tutulduktan sonra süpernatant atılarak kuyucuklarda kalan formazan kristallerinin solubilize edilmesi için 100 µl izopropanol ile hazırlanmış 0,4 N HCl solüsyonu eklendi ve karıştırıldı. 96 kuyucuklu plate spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda okutularak absorbans değerleri elde edildi. Referans dalga boyu olarak 630 nm dalga boyu kullanıldı.

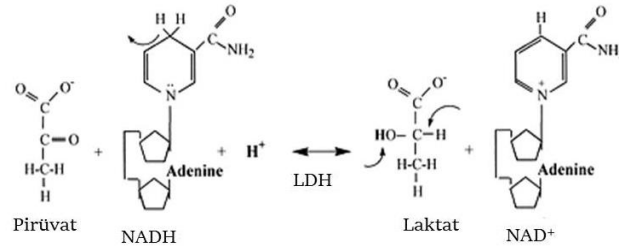
Uygulanan her doz için formüle göre yüzde canlılık ve sitotoksisite değerleri hesaplandı.

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{absorbans örnek} / \text{absorbans kontrol}) \times 100$$

$$\% \text{ Sitotoksisite} = [1 - (\text{absorbans örnek} / \text{absorbans kontrol})] \times 100$$

3.2.3.4. LDH Analizi

LDH yönteminde hücre ölümüyle ilgili olarak hücre zarı bütünlüğü değerlendirilmektedir. Bu yöntem NADH'ın β -nikotinamid adenin dinükleotid indirgenmesi reaksiyonunda LDH'nin aktivitesinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 3.3.). Bu amaçla ölü veya hasar görmüş hücrelerden salınan sitoplazmik laktat dehidrogenaz (LDH) enzim seviyesi kolorimetrik olarak saptanmaktadır.



Şekil 3.3. NADH indirgenme reaksiyonu

Bu çalışmada LDH analizi için Cell Biolabs firması tarafından üretilen CytoSelect™ LDH Cytotoxicity Assay kiti kullanıldı. Kitte yer alan prodesür uygulanarak analiz gerçekleştirilmiştir.

48 kuyucuklu platelere ekilen hücre kültürleri %70-80 konfluense ulaştıktan sonra her bir bileşiğin IC₅₀ değerindeki dozu ile muamele edildi. Pozitif kontrol olarak kitte bulunan Triton X-100 solüsyonu kullanıldı. 37°C ve %5 CO₂'de 48 saat inkübasyonun ardından platedeki besiyerinin 90 µl'si yeni bir 48 kuyucuklu plate alındı. Her bir kuyucuğa LDH bileşeninden 10 µl eklendi ve 37°C'de %5 CO₂'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. 48 kuyucuklu plate spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okutularak absorbans değerleri elde edildi.

Uygulanan her doz için formüle göre yüzde canlılık ve sitotoksosite değerleri hesaplandı.

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{absorbans örnek} / \text{absorbans kontrol}) \times 100$$

$$\% \text{ Sitotoksosite} = [1 - (\text{absorbans örnek} / \text{absorbans kontrol})] \times 100$$

3.2.4. İstatistiksel Analiz

Testler 4 kez uygulanmış, optik densite olarak elde edilen değerler, kontrole göre % değerlere dönüştürüldükten sonra, SPSS 15.0 (Statistic Program for Social and Science) yazılım programında, one-way ANOVA testi ve *post-hoc* olarak Duncan testi uygulanmış, anlamlılık değerleri olarak da $p < 0,005$ kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Bileşiklerin Karakterizasyonu

Flurbiprofen-2-amino-etilenamid (15). Yield: 67%; $R_f = 0.20$, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (7:3); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.30 (2H, s, NH_2), 1.51-1.55 (3H, d, CH_3 flurbiprofen), 2.73-2.80 (2H, m, CH_2 ethylenediamine), 3.23-3.29 (2H, m, CH_2 ethylenediamine), 3.57-3.59 (1H, m, CH flurbiprofen), 6.08 (1H, s, NH), 7.11-7.54 (8H, m, Ar); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 18.89 (CH_3 , flurbiprofen), 41.45 (CH_2 ethylenediamine), 42.38 (CH_2 ethylenediamine), 46.89 (CH flurbiprofen), 115.30-161.64 (6 x CH and 4 x C Ar), 173.99 (CO).

Ibuprofen-2-amino-etilenamid (19). Yield: 66%; $R_f = 0.18$, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (6:4); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.86-0.89 (6H, d, 2 x CH_3 ibuprofen), 1.47-1.50 (3H, d, CH_3 ibuprofen), 1.78 (2H, s, NH_2), 1.80-1.87 (1H, m, CH ibuprofen), 2.42-2.44 (2H, d, CH_2 ibuprofen), 2.68-2.72 (2H, t, CH_2 ethylenediamine), 3.20-3.23 (2H, m, CH_2 ethylenediamine), 3.49-3.56 (1H, m, CH ibuprofen), 5.98 (1H, s, NH), 7.08-7.26 (4H, m, Ar); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 18.77 (CH_3 , ibuprofen), 22.60 (2 x CH_3 , iBu), 30.41 (CH, ibuprofen), 41.42 (CH_2 ibuprofen), 42.15 (CH_2 ethylenediamine), 45.22 (CH_2 ethylenediamine), 46.94 (CH ibuprofen), 127.49-140.89 (4 x CH and 2 x C Ar), 175.12 (CO).

Naproxen-2-amino-butylenamide (12). Yield: 36%; $R_f = 0.06$, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:5); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.30 (2H, s, NH_2), 1.32-1.44 (4H, m, 2 x CH_2 butylenediamine), 1.57-1.59 (3H, d, CH_3 Naproxen), 2.56-2.61 (2H, t, CH_2 butylenediamine), 3.15-3.19 (2H, t, CH_2 butylenediamine), 3.65-3.69 (1H, m, CH Naproxen), 3.91 (3H, s, OCH_3), 5.79 (1H, br s, NH), 7.11-7.72 (6H, m, Ar); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 18.72 (CH_3 , Naproxen), 27.15-41.82 (4 x CH_2 butylenediamine), 47.29 (CH Naproxen), 55.56 (OCH_3), 105.81-136.89 (6 x CH and 3 x C Ar), 157.92 (C- OCH_3), 174.55 (CO).

Naproxen-2-amino-hekzanamid (13). Yield: 80%; $R_f = 0.11$, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:5); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.15-1.51 (10H, m, 4 x CH_2 hexanediamine and NH_2), 1.56-1.58 (3H, d, CH_3 Naproxen), 2.54-2.66 (2H, m, CH_2 hexanediamine), 3.11-3.18 (2H, m,

CH₂ hexanediamine), 3.62-3.67 (1H, m, CH Naproxen), 3.89 (3H, s, OCH₃), 5.46 (1H, br s, NH), 7.10-7.71 (6H, m, Ar); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 18.72 (CH₃, Naproxen), 26.50-42.24 (6 x CH₂ hexanediamine), 47.29 (CH Naproxen), 55.55 (OCH₃), 105.81-136.86 (6 x CH and 3 x C Ar), 157.93 (C-OCH₃), 174.47 (CO).

Flurbiprofen-2-amino-hekzanamid (17). Yield: 73%; R_f = 0.14, CHCl₃/MeOH (6:4); ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.22-1.47 (10H, m, 4 x CH₂ hexanediamine and NH₂), 1.52-1.55 (3H, d, CH₃ flurbiprofen), 2.61-2.66 (2H, m, CH₂ hexanediamine), 3.18-3.25 (2H, m, CH₂ hexanediamine), 3.53-3.57 (1H, m, CH flurbiprofen), 5.44 (1H, s, NH), 7.09-7.55 (8H, m, Ar); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 18.80 (CH₃, flurbiprofen), 26.65-42.29 (6 x CH₂ hexanediamine), 46.96 (CH flurbiprofen), 115.35-161.66 (6 x CH and 4 x C Ar), 173.56 (CO).

Ibuprofen-2-amino-hekzanamid (21). Yield: 62%; R_f = 0.15, CHCl₃/MeOH (6:4); ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 0.86-0.90 (6H, d, 2 x CH₃ ibuprofen), 1.21-1.42 (8H, m, 4 x CH₂ hexanediamine), 1.45-1.47 (3H, d, CH₃ ibuprofen), 1.69-1.73 (2H, m, CH₂ hexanediamine), 1.78-1.87 (1H, m, CH ibuprofen), 2.41-2.44 (2H, d, CH₂ ibuprofen), 2.92-2.96 (2H, t, CH₂ hexanediamine), 3.07-3.20 (2H, m, CH₂ hexanediamine), 3.47 (2H, s, NH₂), 3.52-3.58 (1H, m, CH ibuprofen), 5.99-6.03 (1H, t, NH), 7.07-7.26 (4H, m, Ar); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 18.76 (CH₃, ibuprofen), 22.62 (2 x CH₃, iBu), 25.76-29.14 (4 x CH₂ hexanediamine), 30.41 (CH, ibuprofen), 39.38 (CH₂ hexanediamine), 39.86 (CH₂ hexanediamine), 45.21 (CH₂ ibuprofen), 46.73 (CH ibuprofen), 127.56-140.88 (4 x CH and 2 x C Ar), 175.21 (CO).

Naproxen-ethylenediamide-LA (1). Yield: 66%; R_f = 0.54, CHCl₃/MeOH (95:5); ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.23-3.13 (15H, m, 6 x CH₂ LA and CH₃ Naproxen), 3.28-3.33 (4H, m, 2 x CH₂ ethylenediamine), 3.46-3.55 (1H, m, CH LA), 3.65-3.71 (1H, m, CH Naproxen), 3.91 (3H, s, OCH₃), 6.01-6.07 (2H, d, 2 x NH), 7.11-7.73 (6H, m, Ar); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 18.60 (CH₃, Naproxen), 25.43-40.45 (6 x CH₂ LA and 2 x CH₂ ethylenediamine), 47.21 (CH Naproxen), 55.59 (OCH₃), 56.65 (CH LA), 105.80-136.45 (6 x CH and 3 x C Ar), 157.99 (C-OCH₃), 173.93-176.08 (2 x CO).

Naproxen-butylenediamide-LA (2). Yield: 61%; $R_f = 0.57$, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:5); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.39-1.45 (8H, m, 4 x CH_2 LA), 1.58-1.60 (3H, d, CH_3 Naproxen), 1.62-1.71 (4H, m, 2 x CH_2 butylenediamine), 1.86-2.46 (4H, m, CH_2 LA and CH_2 butylenediamine), 3.09-3.21 (4H, m, CH_2 LA and CH_2 butylenediamine), 3.54-3.57 (1H, m, CH LA), 3.65-3.71 (1H, m, CH Naproxen), 3.92 (3H, s, OCH_3), 5.61-5.64 (2H, m, 2 x NH), 7.13-7.73 (6H, m, Ar); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 18.69 (CH_3 , Naproxen), 25.63-40.48 (6 x CH_2 LA and 4 x CH_2 butylenediamine), 47.29 (CH Naproxen), 55.60 (OCH_3), 56.70 (CH LA), 105.83-136.76 (6 x CH and 3 x C Ar), 157.97 (C- OCH_3), 173.04-174.82 (2 x CO).

Naproxen-hekzandiamid-LA (3). Yield: 70%; $R_f = 0.21$, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (99:1); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.17-1.48 (10H, m, 4 x CH_2 LA and CH_2 hexanediamine), 1.57-1.59 (3H, d, CH_3 Naproxen), 1.62-1.73 (4H, m, 2 x CH_2 hexanediamine), 1.83-2.49 (4H, m, CH_2 LA and CH_2 hexanediamine), 3.05-3.25 (6H, m, CH_2 LA and 2 x CH_2 hexanediamine), 3.50-3.59 (1H, m, CH LA), 3.64-3.72 (1H, m, CH Naproxen), 3.91 (3H, s, OCH_3), 5.48-5.61 (2H, m, 2 x NH), 7.12-7.73 (6H, m, Ar); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 18.72 (CH_3 , Naproxen), 25.70-40.47 (6 x CH_2 LA and 6 x CH_2 hexanediamine), 47.32 (CH Naproxen), 55.59 (OCH_3), 56.70 (CH LA), 105.84-136.83 (6 x CH and 3 x C Ar), 157.94 (C- OCH_3), 172.95-174.64 (2 x CO).

Flurbiprofen-ethylenediamide-LA (4). Yield: 56%; $R_f = 0.17$, benzene/AcOEt/MeOH (3:7:0.5); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.38-3.16 (15H, m, 6 x CH_2 LA and CH_3 flurbiprofen), 3.33-3.36 (4H, m, 2 x CH_2 ethylenediamine), 3.51-3.59 (2H, m, CH LA and CH flurbiprofen), 6.04 (1H, s, NH), 6.38 (1H, s, NH), 7.10-7.54 (8H, m, Ar); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 18.64 (CH_3 , flurbiprofen), 25.57-40.57 (6 x CH_2 LA and 2 x CH_2 ethylenediamine), 46.27 (CH flurbiprofen), 56.64 (CH LA), 115.24-161.57 (8 x CH and 4 x C Ar), 174.45-175.16 (2 x CO).

Flurbiprofen-butylenediamide-LA (5). Yield: 55%; $R_f = 0.26$, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (6:4); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.39-3.17 (19H, m, 6 x CH_2 LA, 2 x CH_2 butylenediamine, and CH_3 flurbiprofen), 3.18-3.28 (4H, m, 2 x CH_2 butylenediamine), 3.50-3.62 (2H, m, CH LA and CH flurbiprofen), 5.75-5.78 (1H, t, NH), 5.91-5.94 (1H, t, NH), 7.11-7.55 (8H, m, Ar); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 18.80 (CH_3 , flurbiprofen), 25.65-40.49 (6 x CH_2 LA

and 4 x CH₂ butylenediamine), 46.78 (CH flurbiprofen), 56.71 (CH LA), 115.35-161.61 (8 x CH and 4 x C Ar), 173.27-173.99 (2 x CO).

Flurbiprofen-hekzandiamid-LA (6). Yield: 55%; $R_f = 0.35$, CHCl₃/MeOH (6:4); ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 1.23-2.46 (21H, m, 6 x CH₂ LA, 3 x CH₂ hexanediamine, and CH₃ flurbiprofen), 3.08-3.24 (6H, m, 3 x CH₂ hexanediamine), 3.51-3.60 (2H, m, CH LA and CH flurbiprofen), 5.67-5.70 (1H, t, NH), 5.77-5.80 (1H, t, NH), 7.11-7.54 (8H, m, Ar); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 18.79 (CH₃, flurbiprofen), 25.71-40.48 (6 x CH₂ LA and 6 x CH₂ hexanediamine), 46.83 (CH flurbiprofen), 56.71 (CH LA), 115.34-161.61 (8 x CH and 4 x C Ar), 173.05-173.81 (2 x CO).

Ibuprofen-ethylenediamide-LA (7). Yield: 47%; $R_f = 0.24$, CHCl₃/MeOH (95:5); ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 0.88 (3H, s, ibuprofen), 0.90 (3H, s, ibuprofen), 1.34-3.18 (18H, m, 6 x CH₂ LA, CH, CH₂ and CH₃ ibuprofen), 3.29-3.32 (4H, m, 2 x CH₂ ethylenediamine), 3.49-3.60 (2H, m, CH LA and CH ibuprofen), 5.98 (1H, s, NH), 6.18 (1H, s, NH), 7.09-7.19 (4H, m, Ar); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 18.68 (CH₃, ibuprofen), 22.64 (2 x CH₃, ibuprofen), 25.57-40.48 (6 x CH₂ LA, CH ibuprofen, and 2 x CH₂ ethylenediamine), 45.23 (CH₂ ibuprofen), 46.82 (CH ibuprofen), 56.65 (CH LA), 127.44-140.98 (4 x CH and 2 x C Ar), 174.07-176.23 (2 x CO).

Ibuprofen-butylenediamide-LA (8). Yield: 42%; $R_f = 0.34$, CHCl₃/MeOH (95:5); ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 0.86 (3H, s, ibuprofen), 0.89 (3H, s, ibuprofen), 1.24-1.96 (18H, m, 6 x CH₂ LA, CH, CH₂ and CH₃ ibuprofen), 2.21-2.51 (4H, m, 2 x CH₂ butylenediamine), 3.18-3.43 (4H, m, 2 x CH₂ butylenediamine), 3.50-3.59 (2H, m, CH LA and CH ibuprofen), 5.55-5.59 (1H, s, NH), 5.72-5.78 (1H, s, NH), 7.08-7.21 (4H, m, Ar); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 18.72 (CH₃, ibuprofen), 22.62 (2 x CH₃, ibuprofen), 25.65-40.49 (6 x CH₂ LA, CH ibuprofen, and 4 x CH₂ ethylenediamine), 45.23 (CH₂ ibuprofen), 46.99 (CH ibuprofen), 56.69 (CH LA), 127.58-140.98 (4 x CH and 2 x C Ar), 173.06-174.98 (2 x CO).

Ibuprofen-hekzandiamid-LA (9). Yield: 55%; $R_f = 0.14$, CHCl₃/MeOH (9:1); ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 0.85-0.88 (6H, d, ibuprofen), 1.15-1.98 (20H, m, 6 x CH₂ LA, CH, CH₂ and CH₃ ibuprofen, and CH₂ hexanediamine), 2.14-2.20 (2H, m, CH₂ hexanediamine),

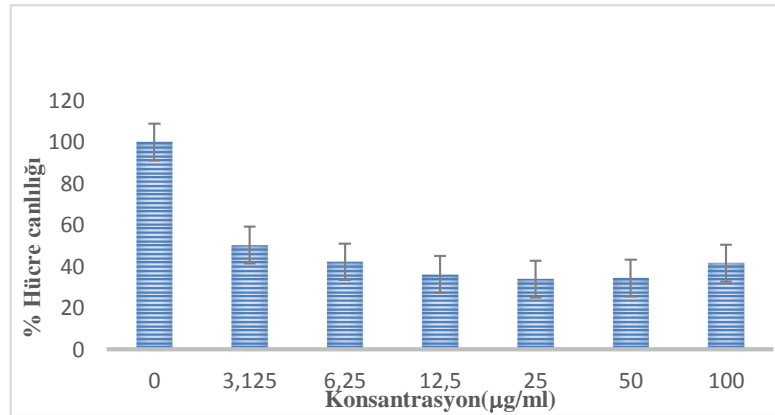
2.40-2.51 (2H, m, CH₂ hexanediamine), 3.17-3.41 (6H, m, 3 x CH₂ hexanediamine), 3.48-3.61 (2H, m, CH LA and CH ibuprofen), 5.40-5.45 (1H, t, NH), 5.63-5.69 (1H, t, NH), 7.08-7.20 (4H, m, Ar); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 18.69 (CH₃, ibuprofen), 22.61 (2 x CH₃, ibuprofen), 25.70-40.48 (6 x CH₂ LA, CH ibuprofen, and 6 x CH₂ hexanediamine), 45.22 (CH₂ ibuprofen), 47.01 (CH ibuprofen), 56.70 (CH LA), 127.57-140.93 (4 x CH and 2 x C Ar), 172.95-174.80 (2 x CO).

4.2. NSAİİ Türevlerinin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri

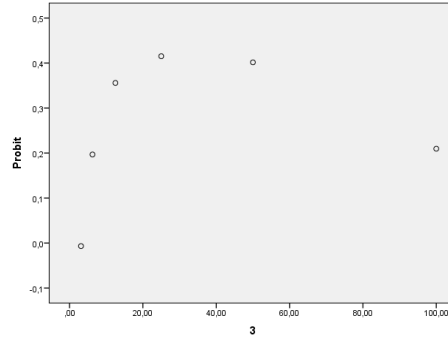
U-87 MG hücre hattına 3,125-100 µg/ml doz aralığında uygulanan 9 farklı NSAİİ türevi bileşiğin anti-proliferatif etkisinin belirlenmesi amacıyla MTT testi uygulanmıştır. Elde edilen bulgular kontrol ile karşılaştırılarak 9 bileşiğin IC₅₀ değerleri Probit analizi hesaplanmıştır.

4.2.1. Naproksen-hekzandiamid-LA(AL-3)'nın U-87 MG hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi

3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında naproksen-hekzandiamid-LA ile muamele edilen U-87 MG hücrelerinde sırasıyla %49, 58, 64, 67, 66 ve 59 oranında azalma görüldü (Şekil 4.1.). Elde edilen bulgular sonucunda naproksen-hekzandiamid-LA'nın IC₅₀ değeri 21,37 µg/ml olarak bulundu (Şekil 4.2.).



Şekil 4.1. Naproksen-hekzandiamid-LA'nın artan dozlarda U-87 MG insan GBM hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki



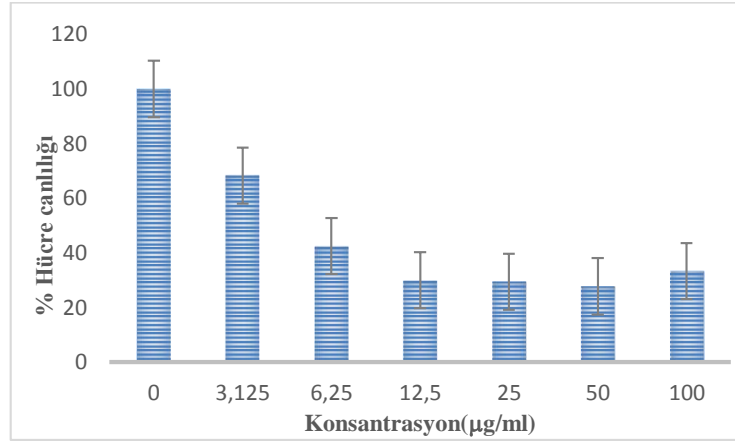
Şekil 4.2. U-87 MG hücre hattında Naproksen-hekzandiamid-LA uygulaması sonrası Probit analizi

Çizelge 4.1. U-87 MG hücre hattında Naproksen-hekzandiamid-LA uygulaması sonrası SPSS analizi

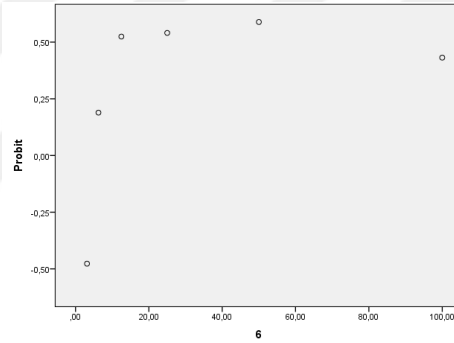
Konsantrasyonlar (µg/ml)	%Canlılık
Kontrol	100±0 ^a
3,125	41,66±0,55 ^b
6,25	34,44±2,22 ^c
12,5	33,89±2,78 ^c
25	31,48±4,49 ^c
50	42,22±3.88 ^b
100	46,11±0,55 ^b

4.2.2. Flurbiprofen-hekzandiamid-LA(AL-6)'nın U-87 MG hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi

3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında Flurbiprofen-hekzandiamid-LA ile muamele edilen U-87 MG hücrelerinde sırasıyla %32, 58, 77, 71, 73 ve 67 oranında azalma görüldü (Şekil 4.3.). Elde edilen bulgular sonucunda Flurbiprofen-hekzandiamid-LA'nın IC₅₀ değeri 20,88 µg/ml olarak bulundu (Şekil 4.4.).



Şekil 4.3. Flurbiprofen-hekzandiamid-LA'nın artan dozlarda U-87 MG insan GBM hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki



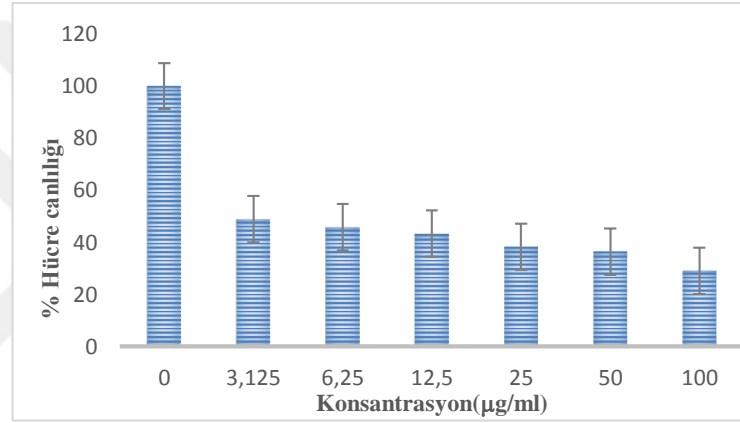
Şekil 4.4. U-87 MG hücre hattında Flurbiprofen-hekzandiamid-LA uygulaması sonrası Probit analizi

Çizelge 4.2. U-87 MG hücre hattında Flurbiprofen-hekzandiamid-LA uygulaması sonrası SPSS analizi

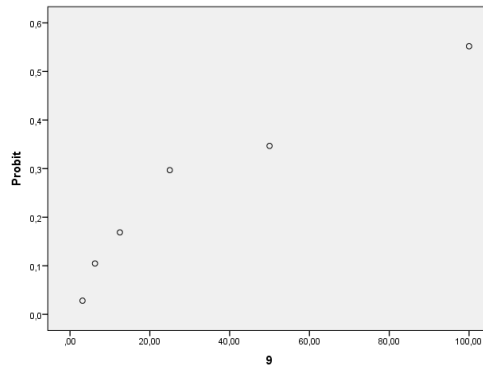
Konsantrasyonlar (µg/ml)	%Canlılık
Kontrol	100±0a
3,125	33,33±3,33 ^d
6,25	27,96 ±0,32 ^e
12,5	29,44±1,66 ^{de}
25	29,44 ±1,66 ^{de}
50	42,49±2,49 ^c
100	68,33±5,55 ^b

4.2.3. İbuprofen-hekzandiamid-LA(AL-9)'nın U-87 MG hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi

3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında İbuprofen-hekzandiamid-LA ile muamele edilen U-87 MG hücrelerinde sırasıyla %52, 55, 57, 62, 64 ve 71 oranında azalma görüldü (Şekil 4.5.). Elde edilen bulgular sonucunda İbuprofen-hekzandiamid-LA'nın IC₅₀ değeri 24,54 µg/ml olarak bulundu (Şekil 4.6.).



Şekil 4.5. İbuprofen-hekzandiamid-LA'nın artan dozlarda U-87 MG insan GBM hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki



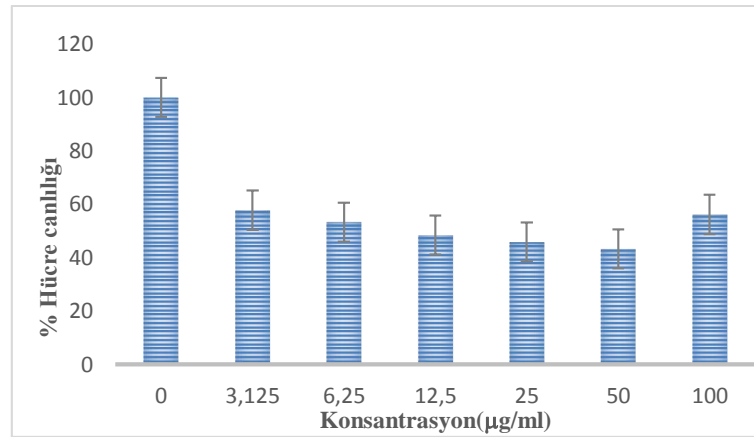
Şekil 4.6. U-87 MG hücre hattında İbuprofen-hekzandiamid-LA uygulaması sonrası Probit analizi

Çizelge 4.3. U-87 MG hücre hattında İbuprofen-hekzandiamid-LA uygulaması sonrası SPSS analizi

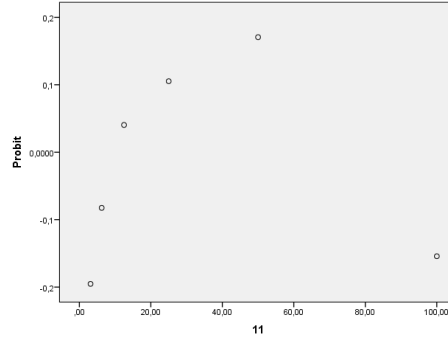
Konsantrasyonlar (µg/ml)	%Canlılık
Kontrol	100±0 ^a
3,125	29,07±7,70 ^e
6,25	36,48±2,24 ^d
12,5	38,88±0,55 ^{cd}
25	43,33±0,55 ^{bc}
50	45,83±1,39 ^b
100	46,94±1,94 ^b

4.2.4. Naproksen-2-amino-etilenamid(AL-11)'in U-87 MG hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi

3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında Naproksen-2-amino-etilenamid ile muamele edilen U-87 MG hücrelerinde sırasıyla %43, 47, 52, 55, 57 ve 44 oranında azalma görüldü (Şekil 4.7.). Elde edilen bulgular sonucunda Naproksen-2-amino-etilenamid'in IC₅₀ değeri 73,37 µg/ml olarak bulundu (Şekil 4.8.).



Şekil 4.7. Naproksen-2-amino-etilenamid'in artan dozlarda U-87 MG insan GBM hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki



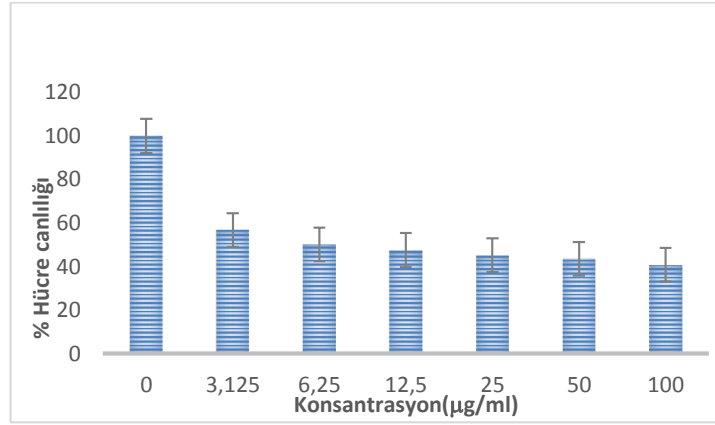
Şekil 4.8. U-87 MG hücre hattında Naproksen-2-amino-etilenamid uygulaması sonrası Probit analizi

Çizelge 4.4. U-87 MG hücre hattında Naproksen-2-amino-etilenamid uygulaması sonrası SPSS analizi

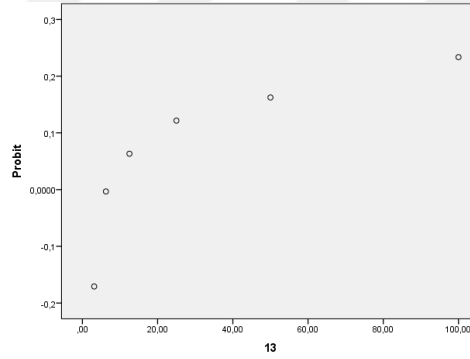
Konsantrasyonlar (µg/ml)	%Canlılık
Kontrol	100±0 ^a
3,125	56,13±2,58 ^b
6,25	42,15±3,55 ^d
12,5	45,81±0,55 ^d
25	48,17±7,07 ^d
50	53,33±1,97 ^{bc}
100	57,74±2,26 ^b

4.2.5. Naproksen-2-amino-hekzanamid(AL-13)'in U-87 MG hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi

3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında Naproksen-2-amino-hekzanamid ile muamele edilen U-87 MG hücrelerinde sırasıyla %44, 60, 53, 55, 57 ve 60 oranında azalma görüldü (Şekil 4.9.). Elde edilen bulgular sonucunda Naproksen-2-amino-hekzanamid'in IC₅₀ değeri 44,28 µg/ml olarak bulundu (Şekil 4.10.).



Şekil 4.9. Naproksen-2-amino-hekzanamid'in artan dozlarda U-87 MG insan GBM hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki



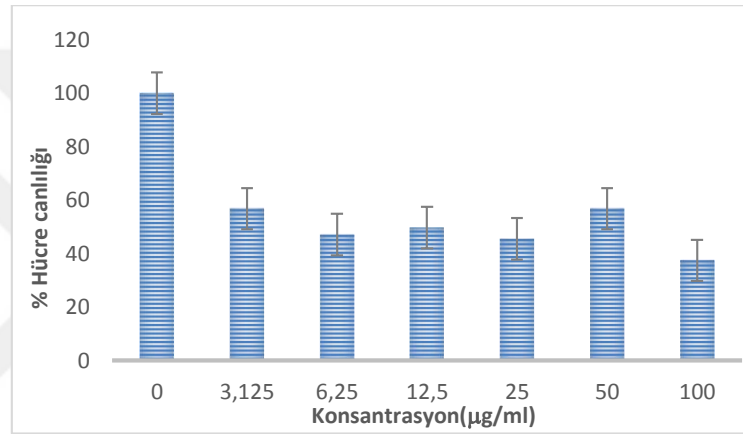
Şekil 4.10. U-87 MG hücre hattında Naproksen-2-amino-hekzanamid uygulaması sonrası Probit analizi

Çizelge 4.5. U-87 MG hücre hattında Naproksen-2-amino-hekzanamid uygulaması sonrası SPSS analizi

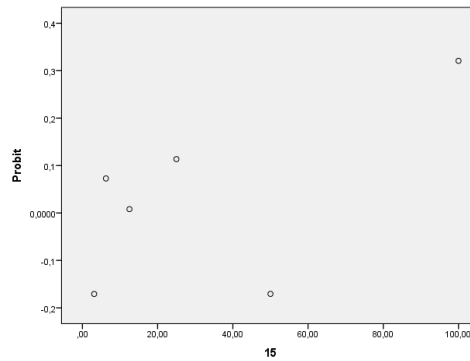
Konsantrasyonlar (µg/ml)	%Canlılık
Kontrol	100±0 ^a
3,125	40,74±0,51 ^c
6,25	43,55±4,83 ^c
12,5	45,16±0,65 ^c
25	47,53±8,57 ^c
50	43,44±5,96 ^c
100	56,77±4,52 ^b

4.2.6. Flurbiprofen-2-amino-etilenamid(AL-15)'in U-87 MG hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi

3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında Flurbiprofen-2-amino-etilenamid ile muamele edilen U-87 MG hücrelerinde sırasıyla %44, 53, 51, 55, 44 ve 63 oranında azalma görüldü (Şekil 4.11.). Elde edilen bulgular sonucunda Flurbiprofen-2-amino-etilenamid'in IC₅₀ değeri 49,42 µg/ml olarak bulundu (Şekil 4.12.).



Şekil 4.11. Flurbiprofen-2-amino-etilenamid'in artan dozlarda U-87 MG insan GBM hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki



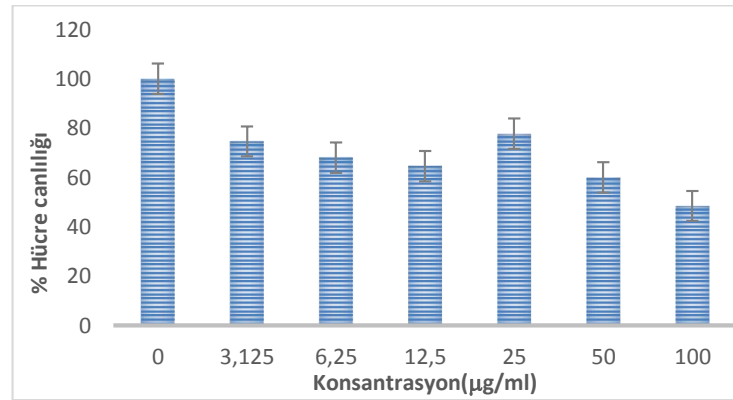
Şekil 4.12. U-87 MG hücre hattında Flurbiprofen-2-amino-etilenamid uygulaması sonrası Probit analizi

Çizelge 4.6. U-87 MG hücre hattında Flurbiprofen-2-amino-etilenamid uygulaması sonrası SPSS analizi

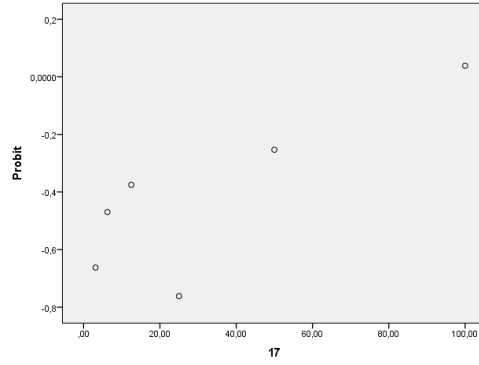
Konsantrasyonlar (µg/ml)	%Canlılık
Kontrol	100±0 ^a
3,125	37,63±0,98 ^d
6,25	56,77±0,65 ^b
12,5	45,48±6,13 ^c
25	49,68±1,29 ^c
50	44,30±4,39 ^c
100	56,77±1,94 ^b

4.2.7. Flurbiprofen-2-amino-hekzanamid(AL-17)'in U-87 MG hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi

3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında Flurbiprofen-2-amino-hekzanamid ile muamele edilen U-87 MG hücrelerinde sırasıyla %26, 32, 36, 23, 41 ve 52 oranında azalma görüldü (Şekil 4.13.). Elde edilen bulgular sonucunda Flurbiprofen-2-amino-hekzanamid'in IC₅₀ değeri 88,13 µg/ml olarak bulundu (Şekil 4.14.).



Şekil 4.13. Flurbiprofen-2-amino-hekzanamid'in artan dozlarda U-87 MG insan GBM hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki



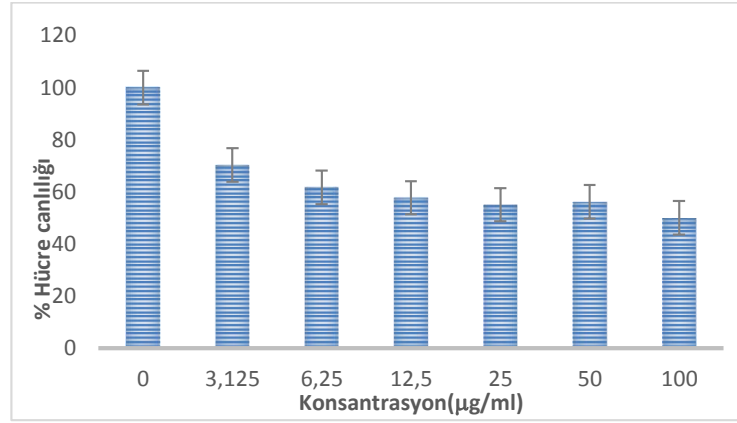
Şekil 4.14. U-87 MG hücre hattında Flurbiprofen-2-amino-hekzanamid uygulaması sonrası Probit analizi

Çizelge 4.7. U-87 MG hücre hattında Flurbiprofen-2-amino-hekzanamid uygulaması sonrası SPSS analizi

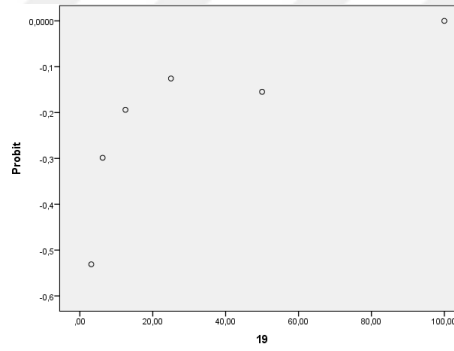
Konsantrasyonlar (µg/ml)	%Canlılık
Kontrol	100±0 ^a
3,125	56,15±7,69 ^d
6,25	59,99±0,77 ^d
12,5	77,69±0,77 ^b
25	64,61±13,87 ^{cd}
50	63,59±2,91 ^{cd}
100	74,61±0,55 ^{bc}

4.2.8. Ibuprofen-2-amino-etilenamid(AL-19)'in U-87 MG hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi

3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında Ibuprofen-2-amino-etilenamid ile muamele edilen U-87 MG hücrelerinde sırasıyla %30, 39, 43, 46, 44 ve 51 oranında azalma görüldü (Şekil 4.15.). Elde edilen bulgular sonucunda Ibuprofen-2-amino-etilenamid'in IC₅₀ değeri 79,54 µg/ml olarak bulundu (Şekil 4.16.).



Şekil 4.15. Ibuprofen-2-amino-etilenamid'in artan dozlarda U-87 MG insan GBM hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki



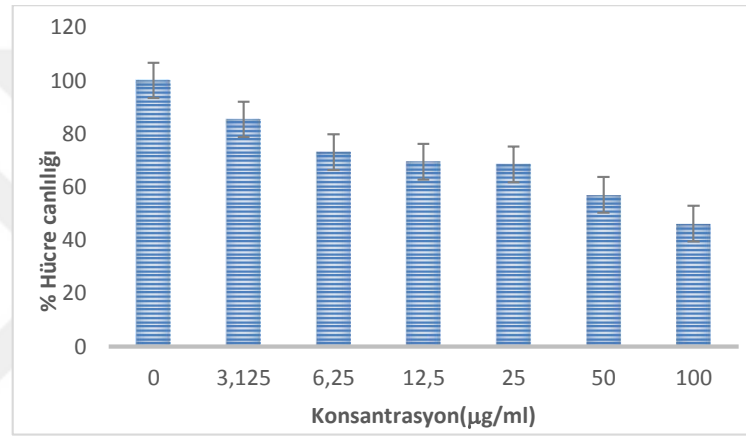
Şekil 4.16. U-87 MG hücre hattında Ibuprofen-2-amino-etilenamid uygulaması sonrası Probit analizi

Çizelge 4.8. U-87 MG hücre hattında Ibuprofen-2-amino-etilenamid uygulaması sonrası SPSS analizi

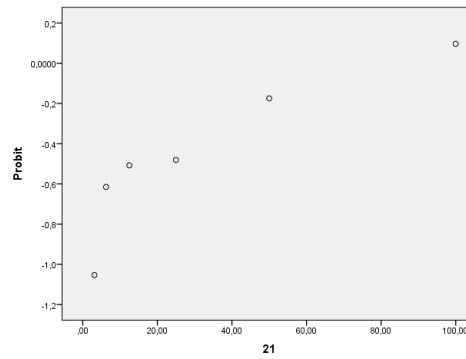
Konsantrasyonlar (µg/ml)	%Canlılık
Kontrol	100±0 ^a
3,125	51,15±8,85 ^c
6,25	56,41±0,44 ^c
12,5	54,99±5 ^c
25	51,79±11,12 ^c
50	60,77±5,38 ^{bc}
100	70,26±11,92 ^c

4.2.9. Ibuprofen-2-amino-hekzanamid(AL-21)'in U-87 MG hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi

3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında Ibuprofen-2-amino-hekzanamid ile muamele edilen U-87 MG hücrelerinde sırasıyla %15, 27, 31, 32, 44 ve 54 oranında azalma görüldü (Şekil 4.17.). Elde edilen bulgular sonucunda Ibuprofen-2-amino-hekzanamid'in IC₅₀ değeri 78,61 µg/ml olarak bulundu (Şekil 4.18.).



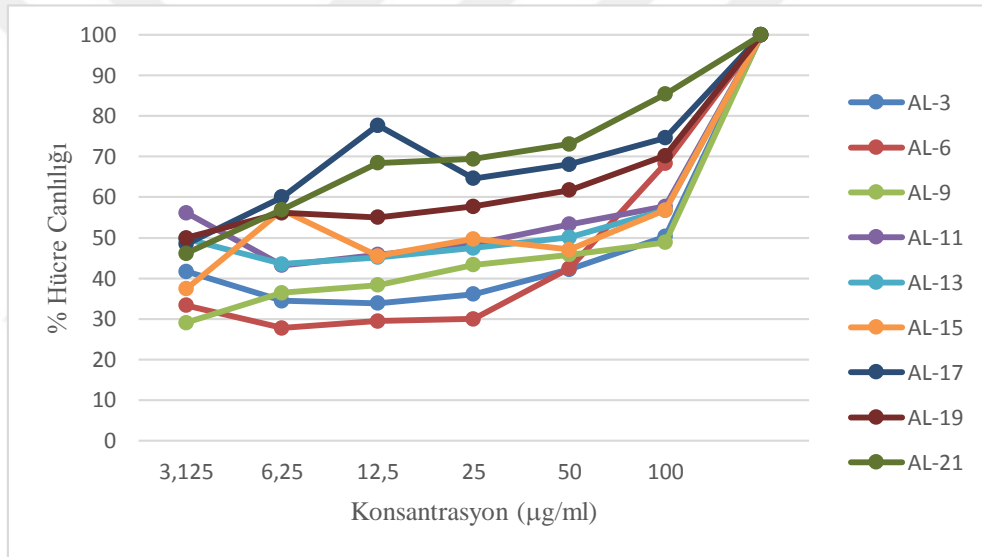
Şekil 4.17. Ibuprofen-2-amino-hekzanamid'in artan dozlarda U-87 MG insan GBM hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki



Şekil 4.18. U-87 MG hücre hattında Ibuprofen-2-amino-hekzanamid uygulaması sonrası Probit analizi

Çizelge 4.9. U-87 MG hücre hattında Ibuprofen-2-amino-hekzanamid uygulaması sonrası SPSS analizi

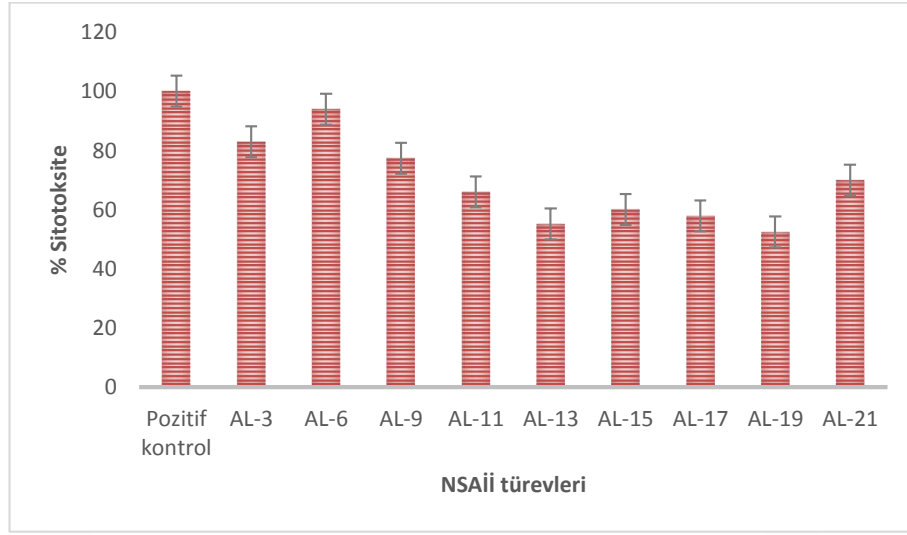
Konsantrasyonlar (µg/ml)	%Canlılık
Kontrol	100±0 ^a
3,125	46,15±0,77 ^e
6,25	56,92±3,85 ^d
12,5	70,26±2,95 ^c
25	67,43±6,40 ^c
50	73,07±4,80 ^{cb}
100	79,49±5,12 ^b



Şekil 4.19. NSAİİ türevlerinin artan dozlarda U-87 MG insan GBM hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etki (karşılaştırmalı)

4.3. LDH Analizi Sonuçları

NSAİİ türevlerinin daha önce yapılan MTT analizinde belirlenen IC₅₀ değerleri göz önünde bulundurularak bu bileşiklerin sitotoksik etkileri ve hücrelerin membran bütünlüğü LDH testi ile analiz edilmiştir.



Şekil 4.20. NSAİİ türevlerinin U-87 MG hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Glioblastoma multiforme (GBM) en yaygın görülen beyin tümörlerinden biridir. Radyasyon ve kemoterapiye direnç gösterdiğinden kesin bir tedavisi bulunmamaktadır. Teknolojinin gelişmesiyle birlikte mikronörocerrahi, iyonize radyasyon terapisi, radyolojik görüntüleme sistemleri gibi yöntemler geliştirilmesine rağmen GBM tedavisinde henüz başarılı sonuçlar elde edilememiştir. GBM tedavisine katkı sağlayacak yeni yaklaşımların geliştirilmesi sürecinde mevcut ilaçların etkinliğinin artırılması ve bu yeni bileşiklerin *in vitro* hücre kültürlerinde anti-kanser aktivitelerinin araştırılması oldukça değerlidir. Bu sebeple mevcut tez kapsamında halen etkin bir çözüm yaklaşımı bulunmayan GBM tedavisine katkıda bulunmak amacıyla yeni NSAİİ türevlerinin sentezlenmesi ve bu bileşiklerin insan GBM hücre kültüründe sitotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

NSAİİ'lar araziidonik asidi prostaglandin, prostasiklin ve tromboksana çeviren siklooksigenaz (COX) enziminin güçlü inhibitörleridir. Bu ilaçların analjezik, anti-piretik ve anti-inflamatuar gibi terapötik etkilerinin yanı sıra anti-proliferatif ve anti-anjiyogenik etkileri daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. (Uddin vd. 2010; Cuzick vd. 2009) Wynne ve Djakiew (2010) yaptıkları çalışmada NSAİİ'lardan R-flurbiprofen ve ibuprofenin prostat kanseri hücre hattında migrasyonu azalttığını rapor etmişlerdir. Benzer şekilde Jin vd. (2010) R-flurbiprofenin mide kanserinde migrasyonu ve proliferasyonu azalttığını ortaya koymuştur. Ayrıca, epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar ile NSAİİ kullanımının kanseri riskini azalttığını gösterilmiştir. Jalbert vd. (1992) farelerde yaptığı çalışmada ibuprofenin mide kanserinde anti-karsinojenik etki gösterdiğini tespit etmiştir. Sözkonusu bu bilimsel bulgular dikkate alınarak, mevcut tez kapsamında NSAİİ'lardan daha önce anti-proliferatif etkinlikleri gösterilen ibuprofen, naproksen ve flurbiprofen seçilerek bunların alkilendiamin (etilendiamin, bütillendiamin veya heksandiamin) ve lipoik asit türevleri sentezlenmiştir. Bu sayede NSAİİ'ların mevcut biyolojik etkinlikleri artırılıp, olası yan etkileri en aza indirgenmesi hedeflenmiştir.

Sentezlenen 21 NSAİİ türevinden 9 tanesi ön çalışmalar doğrultusunda seçilerek sitotoksik etkilerini araştırmak üzere çalışmaya dahil edilmiştir. *In vitro* çalışmalarda kullanılmak üzere üretilmiş ve özellikleri tanımlanmış çok sayıda insan GBM hücre hattından en yaygın kullanıma sahip olan U-87 MG hattı seçilmiş ve bileşiklerin sitotoksik etkinlikleri bu hücre hattı üzerinde denenmiştir.

Yeni sentezlenen NSAİİ türevlerinin GBM insan glioblastoma hücre hattında oluşturduğu sitotoksik etkilerin belirlenmesi için MTT ve LDH analizleri uygulanmıştır. Bu analizler hücrelerin proliferatif ve metabolik aktiviteleri hakkında bilgi veren hızlı ve doğruluğu yüksek olan testlerdendir. LDH ve MTT testleri belirli bir ajana maruz kalan hücrelerin canlılığının ve sitotoksitesinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Turkez ve Geyikoglu 2011; Turkez vd. 2012a, 2012b ve 2012c; Turkez ve Aydın 2013a ve 2013b; Turkez vd. 2014a ve 2014b; Turkez vd. 2015a, 2015b ve 2015c).

Sitotoksitesinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik testlerden biri olan MTT analizinde tetrazolium halkasının parçalanması sonucu MTT tuzu, koyu mavi-mor renkli formazan ürününe dönüşmektedir. Bu reaksiyon mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağımlıdır. Hücre membranı formazana geçirgen olmadığı için canlı ve mitokondri aktivitesi bozulmamış hücrelerde birikecektir ve sonuç olarak bu hücreler mor renkte boyanacaktır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda da NSAİİ'lerin sitotoksik etkileri MTT analizi ile tespit edilmiştir. Kardosh vd. (2011) COX inhibitörü olan celecoxib ilacının 25, 50, 75, 100, 250 ve 500 µM konsantrasyonlarında LN229, LN18, U87 ve A172 insan glioblastoma hücre hatlarındaki anti-proliferatif etkilerini araştırdıkları çalışmalarında azalan hücre proliferasyonunu belirlemek için MTT testinden yararlanmışlardır. Mudiraj ve Geeviman (2014) aspirin ve triazol halkalarını birleştirerek sentezledikleri yeni bileşiklerin 50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM, 600 µM ve 800 µM konsantrasyonlarında C6 glioma hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerini test etmek amacıyla MTT testi uygulamışlar ve canlılığın azaldığını ortaya koymuşlardır. Aynı şekilde Sareddy vd. (2013) yaptıkları bir çalışmada glioblastoma gelişiminde önemli role sahip Wnt/β-katenin/Tcf sinyal yolağını üzerinde

diklofenac ve celecoxib ilaçlarının etkilerini araştırmışlar ve insan glioblastoma hücrelerinin proliferasyonundaki önemli derecede azalışı MTT testi ile göstermişlerdir.

Hücre ölümüyle ilgili diğer bir parametre, hücre zarı bütünlüğüne, ölü veya hasar görmüş hücrelerden salınan sitoplazmik enzim aktivitesinin ölçülmesiyle değerlendirilmesidir. Laktat dehidrogenaz salınımı ekstrasellüler sıvıda laktat dehidrogenaz aktivitesini ölçmede kullanılmaktadır. İntrasellüler LDH'nin kültür besiyerine salınımı hücre membran hasarı sonucu geri dönüşümsüz hücre ölümünün belirteçidir. Çeşitli çalışmalarda NSAİİ'lerin sitotoksik etkileri LDH analizi ile tespit edilmiştir. Im ve Jang (2012) aspirinin tümörlü dokularda apoptozu indükleyen faktör olan TRAIL aktivitesinde artışa neden olarak HeLa hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü artırdığını LDH salınımı ile göstermişlerdir. Benzer bir çalışmada da (Chien vd. 2012) polifenolik bir bileşik olan Gossypol (GOS) aracılı apoptozda COX enziminin rolünü araştırdıkları çalışmalarında COLO205 ve HT29 insan kolon kanseri hücre hattı kullanarak NS398 (NS), aspirin (AS), diclofenac (DI), ve indomethacin (IN) gibi COX-inhibitörlerinin apoptozu artırdığını MTT ve LDH testleri ile doğrularak rapor etmişlerdir.

Önceki bulgular kanser gelişim özelliklerinin anlaşılmasında tümör-destekleyici inflamasyonun önemli olduğunu ve kronik inflamatuvar hastalıkların bazı kanser türlerinin oluşma risklerini artırdığını ortaya koymuştur (Wakimoto vd. 2008; Scheurer vd. 2011; Crusz ve Balkwill 2015). Yine, NSAİİ'lerin beyin kanserlerini de içeren çok çeşitli malignansilerde Wnt/ β -katenin/Tcf sinyallemesini baskılayarak tümör hücrelerinin proliferasyonlarını inhibe edebildiği rapor edilmiştir (Sareddy vd. 2013). Bulgularımızı destekler nitelikte olan bir çalışmada da Benadiba vd. (2014) diruthenium-ibuprofen bileşiğinin $[Ru_2Cl(Ibp)_4]$ (RuIbp) in vitro koşullarda sıçan C6 glioma hücrelerinin proliferasyonunun baskıladığını göstermişlerdir. İn vivo araştırmalar kapsamında oldukça değerli olarak kabul edilen ve sıçanlar üzerinde oluşturulan ortotopik glioma modelinde ibuprofenin tümör hücre proliferasyonunu belirgin düzeylerde azalttığı gözlenmiştir (Dagēstan vd. 2012). Yeni jenerasyon NSAİİ'lardan biri olan Celecoxib'in insan U251 glioma hücre hatlarında apoptozisi uyararak hücre proliferasyonunu baskıladığı tespit edilmiştir (Zhou vd. 2010). Bu bağlamda, mevcut tez çalışmasında

MTT ve LDH analizleri kullanılarak ilk kez test edilen bileşiklerin GBM hücre kültüründe (U-87 MG) konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılık oranlarını azalttığı gösterilmiştir. Nitekim, IC₅₀ değerleri sırasıyla 21.37, 20.88 ve 24.54 µg/ml olan AL-3, AL-6 ve AL-9 bileşiklerinin sitotoksik etkinliklerinin test edilen diğer bileşiklere oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak mevcut tez çalışması kapsamında elde edilen bulguların GBM tedavisinde kullanılabilir yeni ve potansiyeli yüksek ilaç geliştirilmesi konusunda önemli olduğu ve yeni çalışmalar için öncül niteliği taşıyacağı kanaatindeyiz.



KAYNAKLAR

- Akhmedkhanov A, Toniolo P, Zeleniuch-Jacquotte A, Kato I, Koenig KL, Shore RE., 2001. Aspirin and epithelial ovarian cancer. *Preventive medicine*, 33(6),682–7.
- Ardoin, S.P. ve Sundy, J.S., 2006. Update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Current opinion in rheumatology*, 18(3), 221–226.
- Baek SJ, Leigh C, Wilson LC, Lee C, Eling T., 2002. Dual Function of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Inhibition of Cyclooxygenase and Induction of NSAID-Activated Gene. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301(3),1126-1131
- Bailey P ve Cushing H.,1926. A classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis. J.B. Lippincott Company. Philadelphia, London.
- Benadiba M, de M Costa I, Santos RL, Serachi FO, de Oliveira Silva D, Colquhoun A.,2014. Growth inhibitory effects of the Diruthenium-Ibuprofen compound, [Ru₂Cl(Ibp)₄], in human glioma cells in vitro and in the rat C6 orthotopic glioma in vivo. *J Biol Inorg Chemical*, 19(6):1025-35.
- Blumenthal, D.T. ve F Schulman, S., 2005. Survival outcomes in glioblastoma multiforme, including the impact of adjuvant chemotherapy. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 5(5), 683–690.
- Buser, H.-R., Poiger, T. ve Müller, M.D., 1999. Occurrence and Environmental Behavior of the Chiral Pharmaceutical Drug Ibuprofen in Surface Waters and in Wastewater. *Environmental Science & Technology*, 33(15), 2529–2535.
- Cao, Y. vd., 2000. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(21), 11280–5.
- Capdevila, J.H., Falck, J.R. ve Harris, R.C., 2000. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *Journal of lipid research*, 41(2), 163–81.
- Chan, T.A. vd., 1998. Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(2), 681–6.
- Chan, T.A., 2002. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, apoptosis, and colon-cancer chemoprevention. *The Lancet. Oncology*, 3(3), 166–74.
- Chen, C.S. vd., 1991. Metabolic stereoisomeric inversion of ibuprofen in mammals. *Biochimica et biophysica acta*, 1078(3), 411–7.
- Chien, C.-C. vd., 2012. The role of COX-2/PGE₂ in gossypol-induced apoptosis of colorectal carcinoma cells. *Journal of cellular physiology*, 227(8), 3128–37.
- Crusz SM, Balkwill FR., 2015. Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nature Review Clinical Oncology*. 12(10), 584-96
- Cuzick, J. vd., 2009. Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement. *The Lancet Oncology*, 10(5), 501–507.
- Dagêstan Y, Karaca I, Bozkurt ER, Bilir A.,2012. Effects of Ibuprofen on orthotopic glioma model in rats. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*, 22(11):690-3.

- Dai, Y. ve Wang, W.-H., 2006. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in prevention of gastric cancer. *World journal of gastroenterology* : WJG, 12(18), 2884–9.
- Daughton, C.G., 2003. Cradle-to-cradle stewardship of drugs for minimizing their environmental disposition while promoting human health. II. Drug disposal, waste reduction, and future directions. *Environmental health perspectives*, 111(5), 775–85.
- Dempke, W. vd., 2001. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *Journal of cancer research and clinical oncology*, 127(7), 411–7.
- DuBois, R.N. vd., 1994. Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor-alpha and phorbol ester. *The Journal of clinical investigation*, 93(2), 493–8.
- Dural EA., 2002. *Farmakoloji, Nobel Kitabevleri*, İstanbul, 124–126, 264- 266, 294–295
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M. ve Kaufmann, S.H., 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual review of biochemistry*, 68, 383–424.
- Gerritsen, M.E., 1996. Physiological and pathophysiological roles of eicosanoids in the microcirculation. *Cardiovascular Research*, 32(4), 720–732.
- Gomes RN ve Colquhoun A., 2012. E series prostaglandins alter the proliferative, apoptotic and migratory properties of T98G human glioma cells in vitro. *Lipids in Health and Disease* 11:171
- Gyo Lee, E., Soon Won, H. ve Hyun Chung, B., 2001. Enantioselective hydrolysis of racemic naproxen methyl ester by two-step acetone-treated *Candida rugosa* lipase. *Process Biochemistry*, 37(3), 293–298.
- Hanahan, D. ve Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Hannun, Y.A., 1996. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5294),1855–9.
- Harizi, H., Corcuff, J.-B. ve Gualde, N., 2008. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in molecular medicine*, 14(10), pp.461–9.
- Harris RE, Alshafie GA, Abou-Issa H, ve Seibert K., 2000. Chemoprevention of Breast Cancer in Rats by Celecoxib, a Cyclooxygenase 2 Inhibitor. *Cancer Research*, 60, 2101–2103
- Harris, R.E., Beebe-Donk, J. ve Alshafie, G.A., 2007. Reduced risk of human lung cancer by selective cyclooxygenase 2 (COX-2) blockade: results of a case control study. *International journal of biological sciences*, 3(5), 328–34.
- Howard, P., 1991. *Handbook of environmental and exposure data*. Vol 1, Lewis publishers, Chelsea, MI.
- Husain, S.S. vd., 2001. MAPK (ERK2) kinase--a key target for NSAIDs-induced inhibition of gastric cancer cell proliferation and growth. *Life sciences*, 69(25-26), 3045–54.
- Im, S. ve Jang, Y., 2012. Aspirin enhances TRAIL-induced apoptosis via regulation of ERK1/2 activation in human cervical cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 424(1), 65-70
- Iñiguez, M.A. vd., 2003. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends in molecular medicine*, 9(2), 73–8.

- Jayaprakash, V. vd., 2006. Chemoprevention of head and neck cancer with aspirin: a case-control study. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*, 132(11), 1231–6.
- Jin, H. vd., 2010. R-flurbiprofen reverses multidrug resistance, proliferation and metastasis in gastric cancer cells by p75(NTR) induction. *Molecular pharmaceuticals*, 7(1), 156–68.
- Jones, M.K. vd., 1999. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nature medicine*, 5(12), 1418–23.
- Jones, M.K. vd., 2002. von Hippel Lindau tumor suppressor and HIF-1alpha: new targets of NSAIDs inhibition of hypoxia-induced angiogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(2), 264–6.
- Kardosh, A. vd., 2011. Differential Effects of Selective COX-2 Inhibitors on Cell Cycle Regulation and Proliferation of Glioblastoma Cell Lines. *Cancer Biology & Therapy*, 55–62.
- Kheirollahi, M. vd., 2015. Brain tumors: Special characters for research and banking. *Advanced biomedical research*, 4(1), 4.
- Khurana, V.G. vd., 2009. Cell phones and brain tumors: a review including the long-term epidemiologic data. *Surgical neurology*, 72(3), 205–14.
- Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW., 1993. WHO International Histological Classification of Tumors. In: *Histological typing of tumours of the central Nervous System*. 2nd edn. New York
- Krakstad, C. ve Chekenya, M., 2010. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Molecular cancer*, 9(1), 135.
- Kurumbail, R.G. vd., 1996. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 384(6610), 644–648.
- Leahy, K.M. vd., 2002. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer research*, 62(3), 625–31.
- Lee, C.-H. vd., 2010. Epidemiology of primary brain and central nervous system tumors in Korea. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, 48(2), 145–52.
- Lee B, Yoon CW, Osipov A, Moghavem N, Nwachokor D, Amatya R, Na R, Pantoja JL, Pham MD, Black KL, and Yu JS., 2011. Nanoprodrugs of NSAIDs: Preparation and Characterization of Flufenamic Acid Nanoprodrugs. *Journal of Drug Delivery*, 2011 (2011), 13 pages
- Louis, D.N. vd., 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*, 114(2), 97–109.
- Ma, L., del Soldato, P. ve Wallace, J.L., 2002. Divergent effects of new cyclooxygenase inhibitors on gastric ulcer healing: Shifting the angiogenic balance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20), 13243–7.
- Mantovani, A. vd., 2008. Cancer-related inflammation. *Nature*. 454, 436-444
- Markett J, D.V.V., Rosenberg SA, Hellman S., 2005. *Glioblastoma Multiforme* 1 st ed. Jones & Bartlett Pub.
- Marnett, L.J. vd., 1999. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *The Journal of biological chemistry*, 274(33), 22903–6.

- Martindale: The Complete Drug Reference.,2007. Ed: Sean C. Sweetman, Vol: 35th Edition, Pharmaceutical Pres, London.
- Mason, W.P. vd., 2007. Canadian recommendations for the treatment of glioblastoma multiforme. *Current oncology* (Toronto, Ont.), 14(3), 110–7.
- Merlo, L.M.F. vd., 2006. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature reviews. Cancer*, 6(12), 924–935.
- Mudiraj, A. & Geeviman, K., 2014. Triazolo aspirins inhibit proliferation of C6 glioma cell lines in vitro. *Journal of Pharmacy Research*, 8(6), 741–750.
- Ning H, Song C, Jinmu D, Qin H, Peng L, Feng W, Yuan C., 2013. Overexpression of S100A9 in human glioma and in-vitro inhibition by aspirin. *European Journal of Cancer Prevention*, 22(6), 585–595
- Nussmeier, N.A. vd., 2005. Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery. *The New England journal of medicine*, 352(11), 1081–91.
- Ohgaki, H. ve Kleihues, P., 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American journal of pathology*, 170(5), 1445–53.
- Ohgaki, H. ve Kleihues, P., 2009. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer science*, 100(12), 2235–41.
- Pai, R. vd., 2000. Indomethacin inhibits endothelial cell proliferation by suppressing cell cycle proteins and PRB phosphorylation: a key to its antiangiogenic action? *Molecular cell biology research communications : MCBRC*, 4(2), 111–6.
- Parsons, D.W. vd., 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5897), 1807–12. 2014].
- Payan DG, Shearn MA., 1989. NSAİ: Nonopioid analgezics; drugs used in goat, In *Basic and Clinical Pharmacology* ed by Katzung BG. 4th edition, Appleton and Lange, California
- Poligone, B. ve Baldwin, A.S., 2001. Positive and negative regulation of NF-kappaB by COX-2: roles of different prostaglandins. *The Journal of biological chemistry*, 276(42), 38658–38664.
- Porter, A., 2012. A Dead End : A Review of Glioblastoma Multiforme. *Eukaryon*, 8(March), 64–68.
- Prasad, G. ve Haas-Kogan, D.A., 2009. Radiation-induced gliomas. *Expert review of neurotherapeutics*, 9(10), 1511–7.
- Rainsford, K.D., 2007. Chapter 1 Anti-Inflammatory Drugs in the 21St Century. *Drugs*, 3–27.
- Rao, P. ve Knaus, E.E., 2008. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences*, 11(2), 81–110.
- Ribeiro G, Benadiba M, Colquhoun A, Silva DO., 2008. Diruthenium(II, III) complexes of ibuprofen, aspirin, naproxen and indomethacin non-steroidal anti-inflammatory drugs: Synthesis, characterization and their effects on tumor-cell proliferation. *Polyhedron*, 27(3), 1131–1137
- Riemenschneider, M.J. vd., 2010. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta neuropathologica*, 120(5), 567–84.
- Sandler, R.S. vd., 2003. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 348(10), 883-90.

- Santos AM, Sarfeh IJ, Tarnawski A, Tanoue K, Wahlstrom KJ, Knudsen KL, Irwin FL, Quina., 1995. Indomethacin inhibits nitric oxide synthase mRNA and protein expression in the gastric mucosa. A key to its injurious action? *Gastroenterology*, 108(4), A208
- Sareddy, G. vd., 2013. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Diclofenac and Celecoxib Attenuates Wnt/ β -Catenin/Tcf Signaling Pathway in Human Glioblastoma Cells. *Neurochemical research*, 38(11), 2313-22.
- Sathornsumetee, S. & Rich, J.N., 2008. Designer therapies for glioblastoma multiforme. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1142, 108–32.
- Scartozzi, M. vd., 2004. Molecular biology of sporadic gastric cancer: prognostic indicators and novel therapeutic approaches. *Cancer Treatment Reviews*, 30(5), 451–459.
- Scheurer ME, Amirian ES, Davlin SL, Rice T, Wrensch M, Bondy ML.,2011. Effects of antihistamine and anti-inflammatory medication use on risk of specific glioma histologies. *International Journal of Cancer*, 1;129(9), 2290-6.
- Scorrano, L. vd., 2001. Arachidonic acid causes cell death through the mitochondrial permeability transition. Implications for tumor necrosis factor-alpha apoptotic signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(15), 12035–40.
- Shreedhar, V. vd., 1998. A cytokine cascade including prostaglandin E2, IL-4, and IL-10 is responsible for UV-induced systemic immune suppression. *Journal of Immunology*, 160(8), 3783–9.
- Solomon, S.D. vd., 2005. Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. *The New England Journal of Medicine*, 352(11), 1071–80.
- Sørensen, S.A., Mulvihill, J.J. ve Nielsen, A., 1986. Long-term follow-up of von Recklinghausen neurofibromatosis. Survival and malignant neoplasms. *The New England Journal of Medicine*, 314(16), 1010–5.
- Soumaoro LT, Uetake H, Higuchi T, Takagi Y, Enomoto M, Sugihara K., 2004. Cyclooxygenase-2 Expression A Significant Prognostic Indicator for Patients With Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 10; 8465
- Van Sorge, A. vd., 1998. Specificity of Flurbiprofen and Enantiomers for Inhibition of Prostaglandin Synthesis in Bovine Iris/Ciliary Body. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 55(2-3), 169–177.
- Szabó, I.L. vd., 2001. NSAIDs inhibit the activation of egr-1 gene in microvascular endothelial cells. A key to inhibition of angiogenesis? *Journal of Physiology*, 95(1-6), 379–83.
- Turkez H, Geyikoglu F.,2011. The effect of laurel leaf extract against toxicity induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cultured rat hepatocytes. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 62(4), 309-15.
- Turkez H, Geyikoglu F, Mokhtar YI, Togar B.,2012a. Eicosapentaenoic acid protects against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced hepatic toxicity in cultured rat hepatocytes. *Cytotechnology*, 64(1), 15-25.
- Türkez H, Yousef MI, Geyikoglu F., 2012b. Propolis protects against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity in rat hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 50(6), 2142-8.
- Turkez H, Geyikoglu F, Yousef MI, Celik K, Bakir TO., 2012c. Ameliorative effect of supplementation with L-glutamine on oxidative stress, DNA damage, cell viability

- and hepatotoxicity induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat hepatocyte cultures. *Cytotechnology*, 64(6), 687-99.
- Türkez H, Aydın E., 2013a. Investigation of cytotoxic, genotoxic and oxidative properties of carvacrol in human blood cells. *Toxicology and Industrial Health*.
- Türkez H, Aydın E., 2013b. In vitro assessment of cytogenetic and oxidative effects of α -pinene. *Toxicology and Industrial Health*.
- Türkez H, Celik K, Toğar B., 2014a. Effects of copaene, a tricyclic sesquiterpene, on human lymphocytes cells in vitro. *Cytotechnology*, 66(4), 597-603.
- Turkez H, Geyikoglu F, Yousef MI, Togar B, Gürbüz H, Celik K, Akbaba GB, Polat Z., 2014b. Hepatoprotective potential of astaxanthin against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cultured rat hepatocytes. *Toxicology and Industrial Health*. 30(2), 101-12.
- Turkez H, Geyikoglu F, Yousef MI., 2015a. Ameliorative effects of docosahexaenoic acid on the toxicity induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cultured rat hepatocytes. *Toxicology and Industrial Health*. (in press).
- Turkez H, Sönmez E, Di Stefano A, Mokhtar YI., 2015b. Health risk assessments of lithium titanate nanoparticles in rat liver cell model for its safe applications in nanopharmacology and nanomedicine. *Cytotechnology*, (in press).
- Turkez H, Aydın E, Geyikoglu F, Cetin D., 2015c. Genotoxic and oxidative damage potentials in human lymphocytes after exposure to terpinolene in vitro. *Cytotechnology*, 67(3), 409-18.
- Tsujii, M. ve DuBois, R.N., 1995. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, 83(3), 493–501.
- Uddin, S. vd., 2010. Cyclooxygenase-2 inhibition inhibits PI3K/AKT kinase activity in epithelial ovarian cancer. *International journal of cancer*, 126(2), 382–94.
- Uefuji, K., Ichikura, T. ve Mochizuki, H., 2000. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 6(1), 135–138.
- Vane, J.R., 1971. Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-like Drugs. *Nature*, 231(25), 232–235.
- Vane, S.J., 2000. Aspirin and other anti-inflammatory drugs. *Thorax*, 55(90002), p.3S–9.
- Verheul, H.M. vd., 1999. Combination oral antiangiogenic therapy with thalidomide and sulindac inhibits tumour growth in rabbits. *British journal of cancer*, 79(1), 114–8.
- Vonkeman, H.E., 2006. Understanding the NSAID related risk of vascular events. *British Medical Journal*, 332(7546), 895–898.
- Wakimoto N, Wolf I, Yin D, O'Kelly J, Akagi T, Abramovitz L, Black KL, Tai HH, Koeffler HP., 2008. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs suppress glioma via 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. *Cancer Research*, 68(17), 6978-86.
- Wang, D. vd., 2004. Prostaglandin E2 promotes colorectal adenoma growth via transactivation of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor ?? *Cancer Cell*, 6(3), 285–295.
- Wang, D., Mann, J.R. ve DuBois, R.N., 2005. The role of prostaglandins and other eicosanoids in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 128(5), 1445–61.
- Wolfe, M., 2000. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *The New England Journal of Medicine*, 340(24), 1888–1899.

- Wong, B.C.-Y. vd., 2004. Cyclooxygenase-2 inhibitor (SC-236) suppresses activator protein-1 through c-Jun NH2-terminal kinase. *Gastroenterology*, 126(1), 136–47.
- Wynne, S. ve Djakiew, D., 2010. NSAID inhibition of prostate cancer cell migration is mediated by Nag-1 Induction via the p38 MAPK-p75(NTR) pathway. *Molecular Cancer Research*, 8(12), 1656–64..
- Xu, X.-C., 2002. COX-2 inhibitors in cancer treatment and prevention, a recent development. *Anti-cancer Drugs*, 13(2), 127–37.
- Yoshimoto, T. vd., 2002. Growth stimulation and epidermal growth factor receptor induction in cyclooxygenase-overexpressing human colon carcinoma cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 507, 403–7.
- Zhou XM, Wong B, XM, HB, M, Kung HF, DM, Lam SK., 2001, Non-steroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in gastric cancer cells through up-regulation of bax and bak. *Carcinogenesis*, 22 (9), 1393-1397.
- Zhou R, Zhang LZ, Wang RZ.,2010. Effect of celecoxib on proliferation, apoptosis, and survivin expression in human glioma cell line U251. *Chinese Journal of Cancer*, 29(3), 294-9

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Adana’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana’da tamamladı. 2008 yılında girdiği İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden 2012 yılında başarıyla mezun oldu. Aynı yıl İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde başladığı yüksek lisans öğrenimini 2015 yılında Erzurum Teknik Üniversitesi’nde tamamladı.

