

**A549, NIH3T3, RATEC ve C6
HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE
KAPTOPRİL ve
LOSARTAN'IN
ANTİPROLİFERATİF ve
SİTOTOKSİK ETKİLERİ**

Nusretullah Reşidi
Doktora Tezi

**A549, NIH3T3, RATEC ve C6 HÜCRE
KÜLTÜRLERİNDE KAPTOPRİL ve
LOSARTAN'IN ANTİPROLİFERATİF ve
SİTOTOKSİK ETKİLERİ**

Nusretullah Reşidi
Doktora Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakoloji Anabilim Dalı
Eskişehir, Eylül 2007

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Yusuf Öztürk

JÜRİ ve ENSTİTÜ ONAYI

Uz. Ecz. Nusretullah REŞİDİ'nin "A549, NIH3T3, RATEC ve C6 Hücre Kültürlerinde Kaptopril ve Losartan'ın Antiproferatif ve Sitotoksik Etkileri" başlıklı Farmakoloji Anabilim Dalı'ndaki Doktora Tezi,tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve sınav Yönetmeliğinin maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Prof.Dr. Yusuf ÖZTÜRK Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof.Dr. V. Melih ALTAN Ankara Üniversitesi	
Üye	Prof.Dr. A. Tanju ÖZÇELİKAY Ankara Üniversitesi	
Üye	Prof.Dr. Süleyman AYDIN Anadolu Üniversitesi	
Üye	Yar. Doç. Dr. Bülent ERGUN Anadolu Üniversitesi	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
.....tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve soyadı : Nusretullah REŞİDİ
Doğum tarihi ve yeri : 15.12.1972 / Kabil
Uyruğu : Afganistan
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresleri
Adres : Deafganan Asmayi Cad. Parsa Okulu karşısı
No.92 Kabil/Afganistan
Tel : 05553913936
Tel : +93 70243485
E-posta : nusret28@yahoo.com

Eğitim Durumu

İlkokul* :
Ortaokul* :
Lise : Nadirye Lisesi Kabil (1989)*
Üniversite : Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi,
Eskişehir (1998)
Yüksek Lisans : Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Farmakoloji Anabilim Dalı, Eskişehir (2001)
Doktora : Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Farmakoloji Anabilim Dalı, Eskişehir (2007)
Yabancı Dil : Türkçe, İngilizce

Mesleki Deneyim

Kuruluş adı : Eskişehir Ecza Koop
Bölüm : İthal ilaç ve acil bölümü sorumlusu
Burslar : T.C. Milli Eğitim Bakanlığı Bursu

*Afganistan'da 11 yıllık zorunlu eğitim sonunda lise eşdeğeri diploma verilmektedir

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde, beni yönlendiren, bana çalışma olanağı sağlayan, bilgi ve deneyimlerinden sürekli yararlandığım Sayın Prof. Dr. Yusuf Öztürk'e ve Sayın Doç. Dr. Ayşe Tansu Koparal'a destekleri için çok teşekkür ederim.

Yüksek Lisans tezim sırasında ve sonrasında benimle bilgi ve deneyimlerini paylaşan, beni yönlendiren Sayın Prof.Dr. Süleyman AYDIN'a içtenlikle teşekkür ederim.

Hücre kültürü tekniklerini öğrenmeme yardımcı olan ve benimle deneyimlerini paylaşan Dr. Seval KORKMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez deneylerinin yürütülmesinde laboratuvar olanaklarını bana ardına kadar açan eski ve yeni BİBAM müdürleri Sayın Prof.Dr. Mustafa ŞENYEL'a ve Sayın Prof.Dr. Rıdvan SAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez deneylerimin yürütülmesinde gerekli olan bazı kimyasal maddelerin sağlanmasında bana destek veren Sayın Prof.Dr. Şeref DEMİRAYAK'a ve Sayın Öğr.Gör. Uzm. Ahmet SARAÇOĞLU'na teşekkürü borç bilirim.

Tüm Lisans, Yüksek Lisans ve Doktora eğitimim sırasında verdikleri burs ile beni maddi ve manevi yönden destekleyen T.C. Milli Eğitim Bakanlığı'nın sayın yetkililerine minnet ve şükranlarımı sunarım.

Tüm Yüksek Lisans eğitimim süresince kısmi-zamanlı çalışmama olanak vererek beni destekleyen Eskişehir ECZA-KOOP'un sayın yetkililerine içten teşekkürlerimi sunarım

Burada isimlerini tek tek sayamayacağım, ancak çeşitli şekillerde yardım ve destekler bulduğum Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesinin mensuplarına teşekkür ederim.

Son olarak, benim yetişmemde büyük pay sahibi olan, ancak bugün hayatta olmayan Anne'mi ve Baba'mı sonsuz minnet ve şükran duyguları ile anmak istiyorum ...

A549, NIH3T3, RATEC ve C6 HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE KAPTOPRİL ve LOSARTAN'IN ANTİPROLİFERATİF ve SİTOTOKSİK ETKİLERİ

ÖZET

Kaptopril ve losartan gibi renin-anjiyotensin sistemine müdahale eden ilaçların keşfi, hipertansiyon ve diğer yaşamı tehdit eden kardiyovasküler hastalıkların klinik tedavisi için gerçekten önemli bir gelişme olmuştur. Son yıllarda klinik kullanımları sırasında kaptopril ve losartan'ın çeşitli kanser tipleri üzerinde yararlı etkileri dikkat çekmiştir. Bu bağlamda çeşitli kanser hastalarında antiproliferatif ve sitotoksik etkilerinin olduğu rapor edilmiştir. Ancak, kaptopril ve losartan'ın bu antiproliferatif ve sitotoksik etkileri sadece klinik çalışmalarda değil, aynı zamanda hücre kültürü çalışmalarında ve tümör taşıyan hayvanlarla yapılan *in vivo* araştırmalarda da rapor edilmiştir.

Bu nedenle tez çalışması, kaptopril ve losartan'ın A549 küçük hücreli olmayan akciğer adenokarsinomu hücreleri, C6 glioma hücreleri, NIH3T3 fibroblastları ve RATEC endotel hücreleri gibi çeşitli kötücül ve kötücül olmayan kültür hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve sitotoksik etkilerini araştırmak üzere tasarlanmıştır. Çalışmanın kapsamı içinde kaptopril ve losartan'ın A549 hücreleri, C6 glioma hücreleri, NIH3T3 hücreleri ve RATEC hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve sitotoksik etkilerinin, immün savunma, anjiyojenez ve kötücül hücrelere karşı sitotoksitesinde önemli bir endojen faktör olduğu bildirilmiş olan nitrik oksit üretimi ile ilişkili olarak araştırılması amaçlanmıştır. Kullanılan kültür hücreleri arasından, C6 glioma hücreleri ve RATEC hücreleri kaptopril ve losartan'ın antiproliferatif ve sitotoksik etkilerinin araştırılmasında daha önce hiç kullanılmamıştır. Ayrıca, C6 glioma ve RATEC hücrelerinin proliferasyon yetenekleri ve nitrik oksit üretimi üzerindeki etkileri daha önce kaptopril ve losartan ile hiç araştırılmamıştır. Kaptopril ve losartan'ın A549 üzerine etkileri ile ilgili olarak da sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır.

Bu çalışmada elde edilen bulgular, kaptopril ve losartan'ın şiddetleri hücre tipinden tipine değişkenlik gösteren bir biçimde antiproliferatif ve sitotoksik etkileri olduğunu göstermektedir. Benzer durum kültür hücrelerinin nitrik oksit üretme yeteneklerinde de gözlenmiştir. Test edilen kültür hücrelerinde renin-anjiyotensin sistemi komponentlerinin değişken ekspresyonu, bu değişkenlik gösteren etki şiddeti için en olası neden olarak gözükmektedir. Bu çalışmada elde edilen bulgular literatur verileri temel alınarak tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: kaptopril, losartan, antiproliferatif etki, sitotoksitesite, nitrik oksit

**ANTIPROLIFERATIVE and CYTOTOXIC EFFECTS OF
CAPTOPRIL and LOSARTAN ON
A549, NIH3T3, RATEC and C6 CELL CULTURES**

ABSTRACT

Discovery of interfering drugs with renin-angiotensin system, such as captopril, losartan, etc., is a real breakthrough for the clinical management of hypertension and other life threatening cardiovascular diseases. Recently, beneficial effects captopril and losartan on various cancer types have been noticed during their clinical uses. In this context, they have been reported to possess antiproliferative and cytotoxic activities in various cancer patients. However, these antiproliferative and cytotoxic effects with captopril and losartan have been reported not only in clinical studies, but also in cell culture studies and *in vivo* investigations with tumor bearing animals.

The present thesis studies were, therefore, designed for the investigation of antiproliferative and cytotoxic effects of captopril and losartan on certain malignant and non-malignant cell lines, A549 non-small cell lung adenocarcinoma cells, C6 glioma cells, NIH3T3 fibroblasts and RATEC endothelial cells. Within the scope of this study, it was aimed to investigate the antiproliferative and cytotoxic effects of captopril and losartan on A549 cells, C6 glioma cells, NIH3T3 fibroblasts and RATEC cells in relation to their nitric oxide production, which has been reported as an important endogenous factor for immune defense, angiogenesis and cytotoxicity against malignant cells. Among the cell lines used, C6 glioma cells and RATEC cells have not been investigated previously for the antiproliferative and cytotoxic effects of captopril and losartan or relatively less investigated only with a few previous studies. In addition, the effects of these two drugs on the proliferation abilities and nitric oxide productions of C6 glioma cells and RATEC cells have not been investigated previously. There is also a limited number of investigations related to the effects of captopril and losartan on A549.

The findings obtained in the present study revealed that captopril and losartan have antiproliferative and cytotoxic effects whose potencies are varying from one cell type to another cell type. Similar situation was also observed in the nitric oxide production abilities of the cultured cells. The most probable reason for varying potencies observed in these experiments seem to be varying expressions of renin-angiotensin system components in cultured cells tested. Findings obtained in the present study were discussed on the basis of literature data.

Keywords: captopril, losartan, antiproliferative effect, cytotoxicity, nitric oxide

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	3
Anjiyotensinler ve Antagonistleri	3
<i>Kısa tarihçe</i>	3
<i>Anjiyotensinler</i>	3
<i>Renin</i>	3
<i>Anjiyotensin dönüştürücü enzim</i>	4
<i>ADE ve ADE inhibitörleri</i>	4
<i>Anjiyotensin reseptörleri</i>	5
<i>AT₁ reseptörleri</i>	5
<i>AT₂ reseptörleri</i>	5
<i>Anjiyotensin II</i>	5
<i>ADE inhibitörleri</i>	6
<i>AT₁ reseptör blokörleri</i>	7
Kanserde Renin-Anjiyotensin Sistemi Ekspresyonu	8
Kanserde ADE İnhibitörlerinin Rolü	9
Tümör Büyümesi, Hücre Proliferasyonu ve Anjiyojenezde AT ₁ Reseptörlerinin Rolü	11
<i>Proliferasyon</i>	11
<i>Hücre siklusu</i>	11
<i>Anjiyojenez</i>	12
Nitrikoksit	12
Çalışmalarda Kullanılan Hücrelerin Özellikleri	13
<i>A549 küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu</i>	13
<i>C6 sıçan glioma hücreleri</i>	14
<i>NIH3T3 fibroblast hücreleri</i>	14
<i>RATEC sıçan adipöz doku endotelial hücreleri</i>	14
Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler Hakkında Bilgi	15
<i>Mitokondriyal aktiviteye dayalı MTT ölçümü</i>	15
<i>Lizozomal aktiviteye dayalı nötral kırmızı alım ölçümü</i>	15
<i>Nitrik oksit düzeyleri hakkında fikir veren nitrit ölçümü</i>	15
GEREÇLER	17
Kimyasallar ve Çözeltiler	17
Malzemeler	17
Cihazlar	17
YÖNTEMLER	18
Deney İçin Hücrelerin Hazırlanışı	18

	SAYFA
MTT ölçümü	18
Nötral kırmızısı alım ölçümü	18
Nitrit ölçümü	19
Biyoistatistik Değerlendirme ve Grafikler	19
BULGULAR ve TARTIŞMA	20
Kaptopril Sonuçları	20
<i>Kaptopril'in MTT ölçüm sonuçları</i>	20
<i>Kaptopril'in nötral kırmızısı alım ölçümü sonuçları</i>	22
<i>Kaptopril'in nitrit oluşumu üzerine etkisinin ölçüm sonuçları</i>	25
Losartan Sonuçları	27
<i>Losartan'in MTT ölçüm sonuçları</i>	27
<i>Losartan'in nötral kırmızısı alım ölçümü sonuçları</i>	29
<i>Losartan'in nitrit oluşumu üzerine etkisinin ölçüm sonuçları</i>	31
SONUÇ ve ÖNERİLER	34
KAYNAKLAR	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI	Sayfa
Çizelge 1 ADE İnhibitörleri ve Bazı Özellikleri	6
Çizelge 2 ADE İnhibitörlerinin Çeşitli Kansere Üzerindeki <i>in vitro</i> Etkileri	10

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	Sayfa
Şekil 1 Kaptopril'in A549 Hücrelerinde MTT Testi Üzerine Etkisi	20
Şekil 2 Kaptopril'in C6 Hücrelerinde MTT Testi Üzerine Etkisi	21
Şekil 3 Kaptopril'in NIH3T3 Hücrelerinde MTT Testi Üzerine Etkisi	21
Şekil 4 Kaptopril'in RATEC Hücrelerinde MTT Testi Üzerine Etkisi	22
Şekil 5 Kaptopril'in A549 Hücrelerinde Nötral Kırmızısı Alım Yanıtı	23
Şekil 6 Kaptopril'in C6 Hücrelerinde Nötral Kırmızısı Alım Yanıtı	23
Şekil 7 Kaptopril'in NIH3T3 Hücrelerinde Nötral Kırmızısı Alım Yanıtı	24
Şekil 8 Kaptopril'in RATEC Hücrelerinde Nötral Kırmızısı Alım Yanıtı	24
Şekil 9 Kaptopril'in A549 Hücrelerinde Nitrit Konsantrasyonu Üzerine Etkisi	25
Şekil 10 Kaptopril'in C6 Hücrelerinde Nitrit Konsantrasyonu Üzerine Etkisi	25
Şekil 11 Kaptopril'in NIH3T3 Hücrelerinde Nitrit Konsantrasyonu Üzerine Etkisi	26
Şekil 12 Kaptopril'in RATEC Hücrelerinde Nitrit Konsantrasyonu Üzerine Etkisi	26
Şekil 13 Losartan'ın A549 Hücrelerinde MTT Testi Üzerine Etkisi	27
Şekil 14 Losartan'ın C6 Hücrelerinde MTT Testi Üzerine Etkisi	28
Şekil 15 Losartan'ın NIH3T3 Hücrelerinde MTT Testi Üzerine Etkisi	28
Şekil 16 Losartan'ın RATEC Hücrelerinde MTT Testi Üzerine Etkisi	29
Şekil 17 Losartan'ın A549 Hücrelerinde Nötral Kırmızısı Alım Yanıtı	29
Şekil 18 Losartan'ın C6 Hücrelerinde Nötral Kırmızısı Alım Yanıtı	30
Şekil 19 Losartan'ın NIH3T3 Hücrelerinde Nötral Kırmızısı Alım Yanıtı	31
Şekil 20 Losartan'ın RATEC Hücrelerinde Nötral Kırmızısı Alım Yanıtı	31
Şekil 21 Losartan'ın A549 Hücrelerinde Nitrit Konsantrasyonu Üzerine Etkisi	32
Şekil 22 Losartan'ın C6 Hücrelerinde Nitrit Konsantrasyonu Üzerine Etkisi	32
Şekil 23 Losartan'ın NIH3T3 Hücrelerinde Nitrit Konsantrasyonu Üzerine Etkisi	33
Şekil 24 Losartan'ın RATEC Hücrelerinde Nitrit Konsantrasyonu Üzerine Etkisi	33

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

AT-1	: Anjiotensin-II tip 1 reseptörü
-COOH	: Karboksil grubu
ERK	: Ekstraselüler regüle kinaz
iNOS	: Nitrik oksid sentaz uyarılabilir formu
JAK	: Janus kinaz
MAP	: Mitogen ile aktive protein kinaz
nNOS	: Nitrik oksid sentaz nöronal izoformu
-POOH	: Fosforil grubu
-SH	: Tiyol grubu
TGF- β	: Transforme edici büyüme faktörü- β
ADE	: Anjiotensin Dönüştürücü Enzim
Ang- I	: Anjiotensin-I
Ang-II	: Anjiotensin-II
CDK	: Siklin bağımlı kinaz
DMEM-F12	: Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle, besleyici karışım-F12 Ham besi yeri)
DMSO	: Dimetilsülfoksit
EDTA	: Etilen-diamintetra asetik asit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EGFR	: Endotelial büyüme faktörü reseptörü
ELISA	: Enzim –bağlantılı immün deney
Elk-1	: Nüklear transkripsiyon faktörü
eNOS	: Nitrik oksit sentaz endotelial izoformu
FCS	: Fötal calf serum
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration)
IUPHAR	: International Union of Pharmacology
KDa	: Kilo dalton
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NF-kappa	: Nekroz faktörü-kappa
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksid sentaz
PBS	: Fosfat tuz tamponu (Phosphate Buffer Saline)
PKC	: Protein kinaz C
STAT	: Sinyal transduser ve transkripsiyon aktivatörü
TGF- β	: Transforme edici büyüme faktörü β
TNF- α	: Tümör nekroz faktör α
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü

GİRİŞ ve AMAC

Kanserler normal dokudan ayrılma ve istila kabiliyeti kazanmış tümörlerdir; böyle lezyonlar vücudun herhangi bir dokusunda gelişebilmektedir. Kanserler ortak biyolojik özellik taşıyan heterojen hastalıklar grubudur. Bir tümör doku homeostazını yok eden hücre klonal populasyonun hızlı gelişmesi ile başlamakta ve kitle büyümesi ile artan invazif özelliği ile kansere dönüşmektedir. Kanser gelişiminin ileri evrelerinde kanserli hücreler, kan ve lenf sistemine girip farklı organ ve dokularda gelişmektedir; bu oluşum metastaz olarak bilinmektedir. Kanserlin invazif ve metastatik özellikleri normal dokularda ölümcül yıkımlara neden olmaktadır (Offermanns ve Rosenthal, 2003).

1980'lerin başında FDA onayını alan hipertansif ve kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan Anjiotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörü kaptoprilin (Smith ve Vane, 2003) hastalarda *in vivo* koşullarda ve kültür ortamında doğrudan endotelial hücrelerle etkileşerek anjiyojenik faktörlere zıt yönde aktivite gösterdiği ve deneysel modellerde doğal veya implante tümörlerin büyümelerini yavaşlatığı anlaşılmıştır (Abalı ve ark., 2002). Kaptoprilin tetiklediği bu antianjiyojenik aktivitenin ADE inhibisyonundan bağımsız olduğu gösterilmiştir. Bu durumda, tümör ve kansere bağlı ölümlerde azalma ve/veya hasta yaşam sürelerinde uzama beklenmelidir. Ne var ki, kaptopril ile tedavi gören hastalarda tümör ve kansere bağlı ölüm oranlarındaki düşme konusunda yeterince kanıt olmadığı ifade edilmiştir (Otani ve ark., 2001; Amaral ve ark., 2001; Volpert ve ark., 1996).

Antianjiyojenik aktivitenin yanında, ADE inhibitörlerinin normal ve tümöral hücrelerde proliferasyonu yavaşlatıcı etkilerini de bildiren bilimsel raporlar bulunmaktadır. Özellikle AIDS hastalarında sık görülen bir tümör çeşidi olan Kaposi sarkomunun tedavisinde kaptoprilin etkili bir ilaç olduğu (Fujiyama ve ark., 2001) ve prostat kanseri riskini düşürdüğü gösterilmiştir (Ronquist ve ark., 2004). Kaptoprilin insan nöroblastoma hücreleri (Bauer ve ark., 1990), insan akciğer fibroblastları (Chen ve ark., 1991), köpek renal epitelial hücreleri (Nguyen ve ark., 1994), hamster pankreatik karsinom hücrelerinde (Reddy ve ark., 1995) mitozu inhibe ettiği bulunmuştur. Bu gözlemler, anjiyotensinlerin tümör ve normal hücrelerde proliferasyonu modüle ettiğini düşündürmektedir. Gerçekten de, proliferasyon ve doku gelişimi modülasyonunda anjiyotensin-II (Ang-II)'nin rol oynadığı ve bu modülasyonun hücrelerin taşıdığı AT₁ Ang-II alt-reseptör tipine bağlı olduğu, koroner endotelial hücrelerde yapılan araştırmalar ile gösterilmiştir (Stoll ve ark., 1995). Ayrıca, selektif bir AT₁ blokörü olan losartan (Reynolds, 1996) sığır aorta endotelial kültürlerinde hücre proliferasyonunu bloke ettiği bildirilmiştir (Otani ve ark., 1998). Büyük olasılıkla, Ang-II bu etkilerini, transforme edici büyüme faktörü- β (transforming growth factor- β ; TGF- β) başta olmak üzere çeşitli doku büyüme faktörlerinin faaliyetlerini modüle ederek ortaya çıkarmaktadır.

Yaygın olarak kabul edilen bir bilimsel görüşe göre, ADE inhibitörlerinin normal hücrelerde sitoprotektif etkileri bulunmaktadır. Bu etkide ADE inhibitörlerinin antioksidan ve serbest radikal süpürücü özellikleri rol oynamaktadır. Molekül yapısında sülfidril (SH) veya tiyol radikali taşımayan ADE inhibitörlerinin daha güçlü ADE inhibisyonu yapmalarına karşın, sülfidril veya tiyol radikali taşıyanların (kaptopril ve CL 242817) fibröz veya neoplastik hücre büyümesinin

kontrolünde daha etkili oldukları belirlenmiştir. Tiyol radikali sayesinde antioksidan özellik kazanan ADE inhibitörleri metalloproteinaz enzimi üzerindeki modülatör nitelikleri ile de dikkat çekmektedirler (Molteni ve ark., 2003; Yoshiji ve ark., 2002; Moulder ve ark., 2003). Kanser tedavisinde geliştirilen diğer stratejiler yanında, ADE inhibitörleri ve AT₁ alttipinde Ang-II reseptör blokörlerinin iyi birer antiproliferatif, sitostatik ve büyüme önleyici olabileceğine dair kanıtlar giderek artmaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı, ADE inhibitörü olan kaptoprilin ve anjiyotensin reseptör blokörü olan losartanın C6 sıçan glioma hücre soyu, A549, RATEC ve NIH3T3 hücreleri üzerine antiproliferatif ve sitotoksik etkilerini tümör hücre kültür modelleri kullanarak incelemektir. Ayrıca bu tez çalışması kapsamında, nitrik oksit (NO) oluşumunun izlenmesi için indirekt bir yöntem olan nitrit ölçümü yöntemi kullanılarak adı geçen antihipertansif ilaçların proliferasyon üzerindeki etkilerinin NO oluşumu ile paralellik gösterip göstermediği sorusuna yanıt aranmaktadır. Ayrıca, başta RATEC olmak üzere tez deneylerinde kullanılan hücrelerin proliferasyon yetenekleri ve NO üretimi üzerine adı geçen ilaçların etkileri fazla araştırılmamıştır. C6 glioma hücrelerinde kapropril'in antiproliferatif ve apoptotik etkileri daha önce hiç araştırılmamışken, losartan'ın bu hücrenin proliferasyon yeteneği üzerine etkisini rapor eden sadece bir çalışma bulunmaktadır. A549 hücreleri kanser ile ilgili bir çok çalışmada kullanılmışken, kapropril ve losartanın bu hücreler üzerindeki etkileri çok fazla araştırılmamıştır. Ayrıca, konsantrasyon (doz)-etki ve zaman-etki ilişkileri de çok fazla çalışmaya konu olmamıştır. Böylece, bu çalışma ile kaptopril ve losartanın antiproliferatif ve sitotoksik etkileri ilk kez organize biçimde araştırılmış olacaktır.

KAYNAK BİLGİSİ

Anjiyotensinler ve Antagonistleri

Kısa tarihçe

Renin-anjiyotensin sisteminin tarihi Tigerstedt ve Bergman'ın 1898'de böbrek ekstreminin tansiyon yapıcı etkisi araştırması ile başlamaktadır (Basso ve Terragno, 2001). 1934 yılında renal arter klemplenecek yapılan deneysel hipertansiyonda renin adlı bir molekülün salındığı Goldblatt tarafından bulunmuştur (Van Epps, 2005). 1940 yılında, Arjantin'de Eduardo Braun-Menendez başkanlığında ve ABD'de Irvine H. Page başkanlığında olmak üzere 2 bağımsız araştırma grubunun çalışmaları ile Anjiyotensin molekülü keşfedilmiştir. 1957'de Ang-II sentez edilerek vücuttan izole edilen ile aynı olduğu anlaşılmış (Schwarz ve ark., 1957) ve renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi ilişkileri ortaya konulmuştur. 1960'larda *Bothrops jararaca* adlı yılan zehirinde yer alan ve aynı zamanda bradikinin de potansiyalize eden kininaz II enzimi; yani anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) bulunmuştur. 1970'lerde ilk peptid ADE inhibitörleri ve anjiyotensin reseptör blokörleri, 1977 yılında ilk peptid olmayan ADE inhibitörü kaptopril keşfedilmiştir (Hall, 2000). 1982 yılında ilk anjiyotensin reseptör blokörleri ve 1988'de ilk peptid olmayan selektif AT₁ reseptör blokörü losartan bulunmuş ve 1995 yılında kullanıma girmiştir (Timmermans ve ark., 1996). Brezilya'lı farmakolog Maurico Rocha E Silva önderliğindeki bir araştırma grubu tarafından bradikinin'in keşfi de anjiyotensinler ve ADE inhibitörleri ile ilgili araştırmalara belli ölçüde ışık tutmuştur (Rocha E Silva ve ark., 1949).

Anjiyotensinler

İnsan organizmasında anjiyotensin I, II, III, IV ve anjiyotensin (1-7) [Ang(1-7)] olmak üzere 5 çeşit anjiyotensin molekülü endojen olarak bulunmaktadır. Kanın α_2 globulin fraksiyonunda bulunan anjiyotensinojenden renin aracılığı ile anjiyotensin I (Ang-I); Ang-I'den ADE veya ADE dışı yollar (katepsin G, kimaz vb.) aracılığı ile anjiyotensin-II (Ang-II); endopeptidazlar aracılığı ile de anjiyotensin III ve diğerleri oluşmaktadır (Kayaalp, 2002).

Renin

Böbrek jukstaglomerüler hücreleri tarafından renin bir miktar glikoprotein ile beraber depolanmış biçimde bulunmakta ve salıverilmesi çeşitli regülatör yollarla gerçekleşmektedir. Adrenal bez, beyin, akciğer ve kalp gibi bazı ekstrarenal dokular da renin içermekte veya eksprese etmektedir. Sıçan adrenokortikal hücrelerinde exon1A adlı gen renin alternatifi olarak eksprese edilmektedir (Persson ve ark., 2003).

Renin, anjiyotensinojenden Ang-I oluşumunu sağlamaktadır. Kıvrım diüretikleri, ADE inhibitörleri, anjiyotensin reseptör blokörleri, β adrenerjik reseptör agonistleri ve vazodilatörler renin salgısını artırırken non-steroidal analjezik antiinflamatuar ilaçlar ve β adrenerjik reseptör blokörleri renin salgısını azaltırlar. Renin'in substratı olan anjiyotensinojenin ana kaynağı karaciğer olmakla birlikte, yağ dokusu, beyin ve böbrekte de bu prekürsör proteinin yapıldığı gösterilmiştir. (Kayaalp, 2002).

Anjiyotensin dönüştürücü enzim

ADE, kininaz II olarak da adlandırılmaktadır. Çinkoya bağımlı metalloproteinazlar enzim ailesindedir (Piepho, 2000). Damar endotel hücrelerinin luminal membranında yer almakta, kısmen sekretazla koparılarak kanda serbest hale gelmekte ve substratı olan anjiyotensin-I'in (Ang-I) karboksil ucundan histidin-lösin amino asitlerini kopararak Ang-II'e çevirmektedir. Gen polimorfizmi gösteren bir moleküldür. (Kayaalp, 2002).

Bu enzim, renin-anjiyotensin ve kallikrein-kinin sistemlerinin temel elemanıdır. Molekül ağırlıkları açısından halen üç değişik ADE formu bilinmektedir: 90, 150 ve 180 KDa olan ACE formları. 150 ve 180 KDa ağırlığındaki enzim formları protein yapısındadır ve endotelial hücrelerin membranına dış yüzünde bağlı olarak bulunmaktadır. Dolaşım benzer büyüklükte ve benzer işleve sahip proteinler bulunmaktadır. Enzimin birbirine benzeyen iki lobu ve her iki lobta da birbirinden bağımsız çalışan birer aktif bölge bulunmaktadır. Aktif bölgeler değişik katalitik profiller göstermekte ve ADE inhibitörlerine karşı farklı düzeyde afiniteler sergilemektedir. Üçüncü ve küçük ADE formu (90 KDa) sadece bir aktif bölge taşımaktadır ve gelişimini tamamlamış jerm hücrelerinde (testislerde) bulunmaktadır. ADE bazı peptid substratların karboksil terminalinden aminoasid çiftlerini ayırmaktadır. Ang-I'i Ang-II'ye dönüştürmesi ve bradikininin inaktif forma indirgenmesi ADE'nin en önemli fonksiyonlarıdır. ADE, ilaç geliştirme çalışmaları için önemli bir hedefdir (Offermanns ve Rosenthal, 2003).

İnsan plazmasındaki ADE'nin kökeni endotelial hücreler, vücudun diğer sıvılarındaki ADE'nin kökeni ise epitelial ve endotelial hücreler veya jerm hücreleridir. ADE'nin izoformları olan iki loblu somatik formlar ve tek loblu jerminal form Ang-I'i Ang-II'ye dönüştürmektedir. Ayrıca, plazma kininlerini, P maddesini, kemotaktik peptidi ve opioid peptidleri kapsayan geniş biyoaktivite spektrumunda yer alan çeşitli peptidleri metabolize etmektedir. Bu geniş substrat spektrumu ve vücuttaki yaygın dağılımı, ADE'nin kardiyovasküler homeostazdaki önemli rolünün yanı sıra, neovaskülarizasyon, fertilizasyon, ateroskleroz, böbrek ve akciğerde fibrozis, miyokardiyal hipertrofi, inflamasyon ve yara iyileşmesi gibi fizyopatolojik olaylarda da işlevlerinin bulunduğunu ortaya koymaktadır. ADE inhibitörleri hipertansiyon tedavisinde, kardiyovasküler ve renal hastalıkların tedavisinde muhtemel iç organları hasarlarından korunma amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Işic ve Behnia, 2003).

ADE ve ADE inhibitörleri

Endotelial, epitelial ve nöroepitelial hücrelerde membrana bağlı ve soluble formda kan, plazma ve diğer vücut sıvılarında bulunan ADE, Ang-I'i Ang-II'ye dönüştürdüğü ve ayrıca bradikinin ile diğer bazı endojen peptidlerin düzeyini düşürdüğü için, ADE inhibitörleri vücuttaki Ang-II düzeylerini düşürmekte ve bradikinin ile diğer bazı peptidlerin düzeyleri yükselmektedir. Buna göre, ADE inhibisyonu sonucunda Ang-II düzeyleri düştüğü için antihipertansif etki, opioid peptidlerin düzeyi yükseldiği için analjezi (Ercan ve ark., 1980; Türker ve ark., 1979; Takai, 1996) ve bradikinin birikimine bağlı öksürük gibi yan etkiler (Bolser, 2004) ortaya çıkmaktadır. ADE inhibitörleri bu etkilerini kompetitif biçimde enzime bağlanıp ADE'yi inhibe ederek ortaya çıkarmaktadır. ADE inhibitörlerinin taşıdıkları (-SH), (-COOH) veya (-POOH) gibi fonksiyonel

gruplar ADE'inin katalitik aktif bölgesindeki çinkoya bağlanarak enzimi inhibe etmektedir (Piepho, 2000., White, 1998). Kaptopril ve zofinopril'in yapısındaki –SH grubu (SH-donörü olarak) plazminojenden doğal antianjiyojenik olan anjiyostatin'in oluşumunda rol oynayarak moleküle ilave bir özellik kazandırmaktadır (Gately ve ark., 1997; Merchan ve ark., 2003).

Anjiyotensin reseptörleri

G proteinleri ile kenetli yedi transmembranal segmentli (7-TM) reseptör süperailisine ait reseptörlerdir. Anjiyotensin reseptörleri renin-anjiyotensin sisteminin efektör peptidi olan Ang-II'nin etkilerine aracılık etmektedir. Anjiyotensinler için vücutta AT₁, AT₂, AT₃ ve AT₄ olmak üzere 4 reseptör tipi tanımlanmıştır. IUPHAR (International Union of Pharmacology) veritabanının 2007 yılı verilerine göre (http-2), AT₁ için AT_{1a} ve AT_{1b} reseptör alttipleri saptanmıştır. Ang-II biyolojik aktivitelerini esas olarak AT₁ ve AT₂ reseptörler aracılığı ile gerçekleştirmektedir. Ang-II'nin çoğu fizyolojik etkilerine AT₁ reseptörü ve AT₁ reseptörü alt tipleri olan AT_{1a} ve AT_{1b} aracılık etmektedir. AT₂ reseptörünün genel olarak zıt yönde düzenleyici reseptör olduğu belirtilmiştir (Nouet ve Nahmias, 2000). AT₃ ve AT₄ reseptörleri üzerindeki bilgiler henüz yetersizdir.

AT₁ reseptörleri

Böbrek, kalp, vasküler düz kas hücreleri, beyin, adrenal bez, plateletler, adipositler ve plasentada lokalize olduğu belirtilmiştir (Burnier ve Brunner, 2000). G-proteinin Gq/11 alt tipine kenetlidir, losartan ve diğer bifeniltetrazol türevlerine yüksek affinite gösteren reseptörlerdir. Aktivasyonu sonucunda intrasellüler kalsiyum dalgalanması ve protein kinaz C (PKC) aktivitesinde artış görülmektedir. G-proteini ile sinyal iletimi, *ras* ve *rhoA* gibi GTP bağlayan proteinlerin ve tirozin kinaz sistemin aktivasyonuna neden olmaktadır. Kinaz sistemi mitojenle aktive protein kinaz (MAP kinaz) ve janus kinaz (JAK)/STAT (signal transducer and activator of transcription) yolaklarını da kapsamaktadır. Bunun sonucunda transkripsiyon faktörleri olan ve genle ilişkili büyüme ekspresyonunu başlatan ve/veya inflamasyon başlatan aktivatör protein-1 (AP-1) ve NF-κ (nektroz faktörü-kappa) aktive edilir. Bu detay, Ang-II'nin proliferasyon ve inflamasyon üzerindeki etkilerini açıklamaktadır (Bader ve ark., 2001)

AT₂ reseptörleri

PDI 123177, PDI 123319 ve CGP 42112A gibi agonistlere yüksek affinite gösteren reseptörlerdir. Genelde AT₁ reseptörlerine zıt etkileri vardır ve antiproliferatif, proapoptotik ve vazodilatör etkilidirler. Fötal dokularda yaygındırlar (Kayaalp, 2002). AT₂ reseptörlerinin işlevleri hala tartışma konusudur. AT₂ reseptörü özellikle diferansiyasyon sürecinde, proliferasyon inhibisyonunda ve apoptoz indüklemesinde etkilidir. AT₂ reseptör embriyonik gelişimde sıkı bir denetim altında eksprese olurken, yetişkinlerde adrenal bez ve overlerde eksprese olmaktadır. Doku hasarı ve inflamatuvar süreçler sonunda ekspresyonu indüklenmektedir (Bader ve ark., 2001).

Anjiyotensin II

Ang-II damarları büzererek total periferik damar resistansı artışına yol açmaktadır. Bunu prekapiller arteriyoller ve kısmen postkapiller venülleri büzülmesi yoluyla

sağlamaktadır. Böbreklerden su, sodyum ve klor itrahını azaltıp, potasyum itrahını artırmaktadır. Adrenal korteksten aldosteron salgısını arttırıp renal kan akım hızını azaltmaktadır. Diyetle alınan günlük sodyum miktarına göre böbreklerden sodyum itrahını düzenlemektedir. Kalp ve damarlar üzerine de hipertrofi ve “remodeling” yapıcı etkisi olduğu bulunmuştur (Kayaalp, 2002).

Kan basıncı ve kardiyovasküler homeostazda Ang-II'nin regülatör peptid olduğunun anlaşılmasının ardından, hücre proliferasyonu düzenlenmesinde, dokularda “remodeling”, anjiyonez ve inflamasyonda önemli katkılarına olabileceği fark edilmiştir. Bu son fark edilen fizyolojik işlevler sözkonusu peptidin kanserde de rol oynayabileceğini akla getirmektedir. ADE inhibitörleri ve Ang-II AT₁ reseptör antagonistlerinin tümör gelişimi yavaşlatılmasında, anjiyonez ve metastaz önlenmesinde yarar sağlayabileceğine dair önemli düzeyde kanıt biriktiği bildirilmiştir (Deshayes ve Nahmias, 2005).

ADE inhibitörleri

Renin-anjiyotensin sistemine farmakolojik müdahale, 1960'larda Brezilya'da yetişen *Botrops jararaca* isimli yılan venomundan anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibe eden bir maddenin izole edilmesi ile başlamıştır. Bu maddenin ilk klinik denemelerde potent bir antihipertansif ajan olduğu saptanmıştır; fakat maddenin antihipertansif etki için paranteral alınması gerekliliğinden kaynaklanan önemli bir dezavantajı bulunmaktaydı. ADE'nin aktif noktalarının modellenmesi ve söz konusu aktif noktalara ilaçlarının bağlanması düzenlenleyen yapı-aktivite çalışmalarının ürünü olarak ilk oral etkili ADE inhibitörü olan kaptopril geliştirilmiştir. (Smith ve Vane, 2003). Çizelge 1 günümüz klinik uygulamalarında kullanılan ADE inhibitörlerinin bazı özelliklerini özetlemektedir.

Çizelge 1. ADE İnhibitörleri ve Bazı Özellikleri

Bağlı Olduğu Grup	İlaç	Ön-ilaç	t _{1/2} (saat)	Lipofilite ¹	Eliminasyon Oranı
Sülfidril	Kaptopril	Hayır	≤2	+	Böbrekler
	Zofenopril	Evet		+++	%70 Böbrekler+%30 Karaciğer
Karboksil	Benazepril	Evet	10-11	++	Böbrekler+Karaciğer
	Enalapril	Evet	11	++	Böbrekler
	Trandolapril	Evet	16-24	++	%30 Böbrekler+%70 Karaciğer
	Lisinopril	Hayır	12	+	Böbrekler
	Moeksipril	Evet	2-9	++	Böbrekler+Karaciğer
	Perindopril	Evet	>30	++	Böbrekler
	Kinapril	Evet	3	++	Böbrekler+Karaciğer
	Ramipril	Evet	13-17	++	%70 Böbrekler+%30 Karaciğer
Fosforil	Spirapril	Evet	>30	++	Böbrekler
	Fosinopril	Evet	11,5	+++	%50 Böbrek+%50 Karaciğer

¹PubChem veritabanı (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) kullanılarak elde edilen XlogP değerlerinin karşılaştırılması ile belirlenen relatif lipofilite

ADE inhibitörleri kalp üzerindeki olumlu etkilerini “preload” ve “after load” parametrelerini düşürerek miyokardial fibrozisi inhibe etmektedir. Bu ilaçlar, böbrekte glomerüler basıncı düşürmekte, antifibrotik ve antiinflamatuvar etkili ilaçlara özgül olarak katkıda bulunmaktadır (Offermanns ve Rosenthal, 2003). ADE inhibitörleri, enzimde kompetitif inhibisyon yaparak kan ve dokulardaki Ang-II düzeyini düşürmekte ve kompensatuvar bir mekanizma ile kandaki renin düzeyini yükseltmektedir. Kan basıncının ve böbrek fonksiyonlarının renin

bağımlı olduğu durumlarda kan basıncında daha fazla düşme olacağı için dozun azaltılması gerekmektedir. Primer hiperaldosteronizme bağlı hipertansiyonda ve siyah ırk mensuplarında görülen düşük reninli hipertansiyonda kan basıncında daha az düşme olmaktadır. ADE inhibitörleri beyin ve koroner kan akım hızını düşürmemekte ve kalp-damar hipertrofilerini önlemekte, hatta tersine çevirebilmektedirler. Bu son özellik insanda ilk perindopril ile gösterilmiştir (Kayaalp, 2002).

ADE inhibitörleri ayrıca kinin konsantrasyonlarını da yükseltmektedir. Ek olarak ADE inhibitörleri, ADE'nin kininleri enzimatik aktifleştirmesinden bağımsız olarak, kinin-B₂ reseptörü arasındaki etkileşimi doğrudan düzenleyerek kinin etkilerini potansiyelize etmektedirler. Kininlerin, ADE inhibitörlerinin kardiy- ve renoprotektif etkilerinde rol oynadığı bilinmektedir. Kinin potansiyalizasyonu ADE inhibisyonunun olumlu etkilerine katkıda bulunmakta, ancak öksürük ve anjiyoödem gibi yan etkilerin de temel nedenini oluşturmaktadır. Gözlenen diğer yan etki ise ilk dozda ortostatik hipotansiyondur. Hem anjiyotensin inhibisyonu ve hem de kinin memelilerde böbrek gelişiminde önemli olduğundan, ADE inhibitörlerinin ve renin-anjiyotensin sistemine müdahale eden ilaçların hamilelik döneminde muhtemelen alınmaması gerekmektedir (Offermanns ve Rosenthal, 2003).

Klinik kullanımda, ADE inhibitörleri tek başlarına hafif ve orta hipertansiyonlu olgularda %50; hidroklorotiazid ile kombine edilirse %90 oranında terapötik yarar sağlamaktadır. Kontrollü klinik deneylerde mortalite ve morbiditeyi azalttıkları gösterilmiştir. İndikasyon alanları arasında, hipertansiyon, sol ventriküler sistolik disfonksiyon, akut miyokard infarktüs¹, kronik böbrek yetmezliği², serebrovasküler hastalık³, sklerodermada renal krizin tedavisi (mortaliteyi kaptopril azaltır) yer almaktadır. ADE inhibitörleri, birçok antihipertansif ilacın aksine, glukoz, lipid ve ürik asit metabolizmasını bozmamaktadır. En sık rastlanan (% 5-20 oranında) yan etkisi kuru öksürüktür. Hiperkalemi, akut böbrek yetmezliği ve anjiyonörotik ödem yapabilmektedirler. Teratojenik etkileri olan ilaçlardır. Tad alma duyusunu bozulabilir. Antihipertansifler, kapsaisin, non-steroidal analjezik-antiinflamatuar ilaçlar, diüretikler, digoksin ve lityum ile etkileşim göstermektedirler. Allopürinol'e karşı duyarlılık artışına neden olmaktadır. (Kayaalp, 2002)

AT₁ reseptör blokörleri

Reseptöre kompetitif biçimde bağlanırlar, fakat yenilemez antagonizma vardır. Damar büzülmesi, aldosteron salgılanmasının inhibisyonu, kalp ve damarlardaki hipertrofiyi önleme gibi etkileri göstermektedirler. Düşük reninli olanlar dışındaki hipertansiyonlularda etkilidirler.(Kayaalp, 2002). Bu grubun ilk örneği losartan'dır bunu "sartanlar" ailesinden beş yeni üye, valsartan, telmisartan, kandesartan, eprosartan) takip etmiştir. Anjiyotensin üretiminin alternatif yolları ADE inhibitörleri veya katepsinler ile etkilenmediği zaman, sartanlar

¹Özellikle hipertansiyonlu ve diyabetli hastalarda daha büyük yarar sağlamaktadır.

² Diyabetik nefropatili olgularda ilerlemeyi önlediği ve geciktirdiği bulunmuştur, ayrıca non-diyabetik nefropatide de etkilidir.

³ Yüksek risk altındaki serebrovasküler hastalığı kişilerde yeniden infarktüs ve/veya inme riskini azalttığı bulunmuştur.

anjyotensini daha da mükemmel bloke ederler; sartanlar renin-anjyotensin sistemi için ADE inhibitörlerine oranla daha spesifiklerdir.

AT₁ reseptörü bloke olduğunda kompensator renin konsantrasyonu artışı Ang-II'nin birikmesine neden olarak AT₂ reseptörünün aktivasyonuna yol açmaktadır. AT₂ reseptör stimülasyonu aracılığı ile özellikle mikrovasküler sahada oluşan vazodilatasyona bradikinin ve NO aracılık etmektedir (Carey, 2005).

AT₁ reseptör blokerlerinin tek indikasyon alanı hipertansiyon tedavisidir. Konjestif kalp yetmezliği tedavisindeki etkinlikleri ise henüz deneme aşamasındadır. AT₁ antagonistlerin faz-I klinik denemeler sırasında ADE inhibitörleri gibi hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği ve renal yetmezlik durumlarında etkili oldukları kanıtlanmıştır. Halen ADE inhibitörlerini tolere etmeyen hastalar için tavsiye edilmektedir (Burnier ve Brunne, 2000). ADE inhibitörlerinden daha güvenlidirler. AT₁ blokerleri, ADE inhibitörlerinin klinik kullanımını kısıtlayan en önemli yan etkisi olan öksürüğe yol açmamaktadır. Daha az oranda anjionörotik ödeme yol açmaktadırlar. Kan basıncı ve böbrek fonksiyonunun renin-anjyotensin sistemine fazla bağımlı olduğu hastalarda akut böbrek yetmezliği yapabilirler. Gebelerde teratojenik etkilidir. Eğilim yaratan durumlarda hiperkalemiye yol açabilmektedirler (Kayaalp, 2002).

Gerek ADE inhibitörleri gerekse AT₁ reseptör antagonistleri antiproliferatif etkileri nedeniyle ile sol ventriküler hipertrofinin tedavisi için başarı ile kullanılmıştır.

Kanserde Renin-Anjyotensin Sistemi Ekspresyonu

Renin-anjyotensin sistemi bileşenlerinin beyin, akciğer, prostat, meme, pankreas kanseri, cilt ve serviks karsinomunu da kapsayan birçok doku ve hücrelerde eksprese olduğu gösterilmiştir.

AT₁ reseptörlerinin insanlarda gastrik (Huang ve ark., Baskıda:2007) ve servikal (Kikkawa ve ark., 2004) kanser ile yumurtalık karsinoma (Suganuma ve ark., 2005) hücrelerinde aşırı-ekspresyonu belirlenmiştir. Skuamöz cilt karsinomu, fare meme adenokarsinomu, gırtlak skuamöz hücreli karsinomu ve insan akciğer adenokarsinomu hücrelerinde eksprese oldukları belirlenmiştir (Takeda ve Kondo, 2001; Guerra ve ark., 1993; Marsigliante ve ark., 1996; Batra ve ark., 1994; Fujimoto ve ark., 2001). AT₁ reseptörlerinin belirtilen bu aşırı-ekspresyonu ile tümör invazyonu arasında yüksek düzeyde korelasyon bulunmuştur. Prostat kanser hücrelerindeki AT₁ reseptör mRNA ekspresyonunun normal prostat hücrelerine göre fazla olduğu tespit edilmişken (Uemura ve ark., 2003), iyicil prostat hiperplazisinde AT₁ reseptör ekspresyonunda istatistiksel açıdan anlamlı azalma gösterilmiştir (Dinh ve ark., 2001).

Mast hücreleri orijinli kimaz enzimi, ADE'den bağımsız yollardan lokal Ang-II oluşumunu kolaylaştırmaktadır (Li ve ark., 2004). Ang-II, ADE-bağımlı karboksipeptidaz (ADE2) ile Ang(1-7)'ye dönüşmektedir. Ang(1-7)'nin ise astrositomalarda proliferasyonu induklerken (Fogarty ve ark., 2003), akciğer kanserinde proliferasyonu AT₁ ve AT₂ reseptörleri ile ilişkili olmayan bir mekanizma ile inhibe ettiği gösterilmiştir (Gallagher ve Tallant, 2004). Ang-II'yi parçalayan aminopeptidaz-A ve adiposit kökenli lösin-aminopeptidaz (A-LAP) enzimlerinin endometrial karsinomada Ang-II ve AT₁ reseptörleriyle birlikte

eksprese edildiği saptanmıştır. Bu peptidazların aşırı-ekspresyonunun uterus kanser hücrelerinde tümör büyümesi, anjiyojenez ve vasküler endotelial büyüme faktör (VEGF) düzeyinin düşüşüyle sonuçlandığı belirlenmiştir (Ino ve ark., 2004). Renin-anjiyotensin sistemi, AT₁ ve AT₂ reseptörlerinin kanserli doku ve hücrelerde lokal ekspresyonunun gösterilmesi kanserde Ang-II rolünün araştırmasına sebep olmuştur.

Kanserde ADE İnhibitörlerinin Rolü

ADE inhibitörlerinin kansere karşı koruyucu rolünü fikri ilk kez 1998'de Lever ve ark. (1998) tarafından ortaya atılmıştır. Kaptopril kullanan hastaların prostat kanserine yakalanma riskinin düşük olduğu, özellikle 2 yıldan daha uzun süre kullanımda günde 50 mg'dan fazla olmayan dozların daha etkili olduğu bazı epidimiyolojik çalışmalar ile anlaşılmıştır (Lindberg ve ark., 2004; Ronquist ve ark., 2004). ADE inhibitörleri bazı deneysel kanserlerde değişken sonuçlar verirken (Piotr ve ark., 2006), perindopril'in düşük dozlarıyla *in vivo* koşullarda tümör büyümesi ve neovaskülarizasyonu anlamlı derecede düşürdüğü fare hepatosellular karsinomada ile baş ve boyun skuamöz karsinomasında gösterilmiştir (Abalı ve ark., 2002; Noguchi ve ark., 2003; Yasumatsu ve ark., 2004). Kaptopril'in fibrosarkoma implante edilmiş sıçanlarda anjiyojenez ve tümör gelişimini azalttığı rapor edilmiştir (Volpert ve ark., 1996). Anjiyojenez ile yakından ilişkili olan artrit, diabetik retinopati, ateroskleroz ve kanser gelişiminde azaltıcı etki kaptopril'in farmakolojik açıdan üstün özelliklerini oluşturmaktadır. Çizelge 2 farklı ADE inhibitörlerinin çeşitli kanser tipleri ve bazı kötücül olmayan hücreler üzerinde daha önceden rapor edilmiş *in vitro* etki sonuçlarını derlemektedir.

Kaptopril'in endotelial hücre migrasyonu üzerindeki inhibitör etkisinin ADE inhibisyonundan bağımsız olduğu belirtilmiştir (Volpert ve ark., 1996; Prontera ve ark., 1999). Anjiyojenez için gerekli olduğu bilinen çinko bağımlı endotelial kökneli 72 ve 92 Kdalton ağırlıklı metalloproteinazların kaptopril ile doğrudan inhibisyonu, matriks degradasyonu ve invazyonda söz konusu bu ilacın rolünü göstermektedir (Volpert ve ark., 1996). Ayrıca, kaptopril'in matriks metalloproteinazların sentetik bir inhibitörü olan batimastat ile sinerjistik etki göstererek gelatinaz-A aktivitesini düşürüp tümör hacmi ve metastaz sayısını düşürdüğü belirtilmiştir.

ADE inhibitörlerinin bir kısmı sülfidril (SH) veya tiyol radikali (kaptopril ve CL 242817) taşırlar, bunların yapısında tiyol taşımayan gruptakilere oranla fibroz ve neoplastik hücre büyümesinin kontrolünde daha etkili oldukları görünmüştür (Molteni ve ark., 2003). Kaptopril'in (SH) grubunun metalloenzimlerin yapısında bulunan Zn⁺² atomu için güçlü bir ligand olduğu, bu grubun (SH-) taşıyan endojen bileşiklerle reaksiyona girerek disülfid köprüleri oluşturduğu ve kaptopril'in etki süresini ve yarılanma ömrünü kısıtladığı açıklanmıştır (Gohlke ve Schölkens, 2002). Kaptopril, melanoma (de Groot-Besseling ve ark., 2004) ve insan renal hücreleri karsinoma modelinde tümör kitlesini küçülttüğü bildirilmiştir.

Bu bilgiler ışığında ADE inhibitörlerinin çeşitli kanser tiplerinde yararlı olabileceği görülmektedir. Ancak, sahip oldukları çoklu mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılmış değildir. ADE inhibitörlerinin koruyucu etkileri sadece Ang-II inhibisyonundan kaynaklanmamaktadır. *In vivo* koşullarda Ang-II'nin tümör gelişimindeki kesin rolünü anlamak için, araştırmacılar hücre membranındaki

reseptör sinyalinin hedef alan Ang-II reseptör antagonistleri üzerinde yoğunlaşmış bulunmaktadır. Değişik insan tümör tiplerinin cerrahi örneklerinde VEGF ekspresyonunun arttığı ve bunun tümör için düşük tedavi beklentisi ve tümörün agresif davranışları korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. Hayvan modellerinde VEGF'nin aşırı-ekspresyonunun tümör büyümesini artırırken, VEGF supresyonunun ise tümör büyümesini yavaşlattığı saptanmıştır (Folkman, 1995; Ferrara ve Davis-Smyth, 1997). Son zamanlarda Ang-II değişik tümör hücrelerinde VEGF gen ekspresyonunda artışa neden olduğu gösterilmiştir. Diabetik sıçan retinasında VEGF mRNA'nın aşırı-ekspresyonunu, ADE inhibitörleri olan ramipril ve perindopril ile anlamlı düzeyde suprese edildiği bildirilmiştir (Higgins ve ark., 2003). Fare retinopati modelinde kaptopril, VEGF ve VEGF reseptörü (VEGF-R2) ekspresyonunu azaltarak anjiyojenik etkinliği düşürdüğü belirtilmiştir.

Çizelge 2. ADE İnhibitörlerinin Çeşitli kanser Tipleri Üzerindeki *in vitro* Etkilerinin Daha Önceden Rapor Edilmiş Sonuçları (Lindberg ve ark., 2004' ten değiştirilerek hazırlanmıştır)

HücreTipleri	ADE İnhibitörü ve Dozu	Proliferasyon (Dozu)*	Gen Ekspresyonu*	Migrasyon ve İnvazyon*	Gelatinolitik Aktivite*	Anjiyojeniz*	Referanslar
SH-SY5 insan neuroblastoma	Kaptopril 0,23 -23 mM Enalaprilat 0,05-13 mM	↓↓(4,6-23 mM) ↓ (2,6-13 mM)					Chen ve ark., 1991
T-47D Hs578T insan meme adenokarsinoma	Kaptopril 0,05-5 mM Lisinopril 0,05-5 mM	↓(0.1-1.8 mM) Etkisiz (0,05-1,8mM)	Değişmiş (1mM) Etkisiz (1mM)				Small ve ark.,1997
SN 12K-1 insan renal karsinoma	Kaptopril 0,0001-10 mM	↓ (1-10 mM)					Hii ve ark., 1998
T98G insan glioma	Kaptopril 0,1-40 mM	Etkisiz (0,1-10 mM)		↓(0.1-10 mM)	↓ (20-40mM) [#] ↓		Nakagawa ve ark., 1995
WDCA Faregil pankreatik Adenokarsinoma	kaptopril 1 mM CGS-13945 1mM	↓ (1mM) ↓ (1mM)	Değişmiş (1 mM) Değişmiş (1 mM)				Reddy ve ark.,1995
3LL Faregil akciğer karsinoma	Kaptopril 1,3-11 mM	↓(1,3-11 mM)					Kowalski ve Herman, 1996
BNL-HCC Faregil karaciğer karsinoma	Perindoprilat 1 µM	Etkisiz (1 µM)	Değişmiş (1 µM)				Yoshiji ve ark., 2001
3LL Faregil akciğer karsinoma	Kaptopril 0,1-20 mM		Değişmiş (0,1-5 mM)		↓ (5-20 mM) [#]		Prontera ve ark., 1999
Kötücül Olmayan Hücreler							
HUVEC	Perindoprilat 1 µM	Etkisiz (1µM)				↓(1 µM)	Yoshiji ve ark., 2001
Sığır adrenal kapilar	Kaptopril 0,001-50 mM Lisinopril (kons.bilgi yok) Enaprilat (kons.bilgi yok)			↓(0,001-0mM) ↓	↓ (1-50 mM) [#]		Volpert ve ark 1993
Sıçan mezanşiyal Hücreler	Kaptopril 0,001-1 µM **+20-40 mM [#] Lisinopril 0,001-100 µM**				↓(0,05-1mM)** ↓(20-40 mM) [#] ↓(50-100mM)**		Sorbi ve ark., 1993

*Etkili doz parantez arasına alınmıştır. ** Biotin-avidin deneyi. [#]Gelatin zimografi deneyi

Diabete bağılı iskemik ayak modelinde, ADE inhibisyonunun neovaskülarizasyon, kapiler dansite ve ayak perfüzyonunu bradikinin sinyal aktivasyonu aracılığıyla artırırken, diyabetik retinopati modelinde Ang-II inhibisyonu aracılığıyla damar gelişimini azaltması ADE inhibisyonunun dual etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Ebrahimian ve ark., 2005).

Kaptopril'in sülhidril donörü olarak plazminojen aktivatörlerden (urokinaz, streptokinaz gibi) biri ile kombinasyonu durumunda, plazminojenden endojen anjiyostatin oluşmasına yardımcı olduğu ve oluşan anjiyostatin *in vitro* ve *in vivo* Lewis akciğer karsinomasında metastaz ve anjiyojenezini inhibe ettiği belirtilmiştir (Gately ve ark., 2007; Merchan ve ark., 2003).

Tümör Büyümesi, Hücre Proliferasyonu ve Anjiyojenezde AT₁ Reseptörlerin Rolü.

Proliferasyon (Hücre bölünmesini takip eden DNA replikasyonu)

Sıçanlarda Ang-II infüzyonu vasküler düz kas hücrelerinde DNA sentezini stimüle ettiği ve söz konusu stimülasyonun neointimal düz kas hücrelerinde daha belirgin olduğu (Daeman ve ark., 1991) ve Ang-II'nin AT₁ reseptör aktivasyonu aracılığı ile koroner damarların endotelial hücrelerinde proliferasyonu arttığı açıklanmıştır (Stoll ve ark., 1995). AT₁ antagonisti losartan'ın, VEGF dahil bir çok büyüme faktörünü inhibe ettiği ve sıçan C6 glioma hücrelerinin büyümesini azalttığı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda gösterilmiştir (Arrieta ve ark., 2005).

AT₁ reseptörlerin aktivasyonunun birçok hücre tipinde proliferasyonu indüklediği bilinmektedir. AT₁ insan kanserli hücrelerinde proliferasyonu (Uemura ve ark., 2003; Arrieta ve ark., 2005; Fujimoto ve ark., 2001; Muscella ve ark., 2002; Merchan ve ark., 2003) protein kinaz aktivasyonu ve büyüme faktörü stimülasyonu aracılığıyla indüklemektedir. AT₁ reseptörleri aktivasyonu, prostat (Uemura ve ark., 2003) ve meme (Merchan ve ark., 2003; Mazzotta ve ark., 2003) kanserinde epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörü (EGFR) transaktivasyonu, PKC aktivasyonu, sinyal transduser ve transkripsiyon aktivatör-3 (STAT3)'ün fosforilasyonu, ekstraselüler-regülate kinaz (ERK) aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. AT₁ reseptörleri aracılığı ile EGF reseptörün transaktivasyonunun kanserde ayırıcı bir özellik olduğu belirtilmiştir. AT₂ reseptörlerin antiproliferatif etkisinin EGF reseptörlerinin oto-fosforilasyonu aracılığıyla gerçekleştiği fikri savunulmaktadır (Elbaz ve ark., 2000).

Sıçan aorta düz kasının Ang-II aracılığı ile proliferasyonunda Elk-1 (nükleer transkripsiyon faktörü) aktivasyonu ile PKC'nin ζ izoformunun aktivite gösterdiği ve Ang-II'nin, ras/PKC ζ /MEK yolaklarıyla ERK1/2'yi aktive etmesinin vasküler düz kas proliferasyonunda önemli bir sinyal transdüksiyon mekanizması olduğu belirlenmiştir (Mazzotta ve ark., 2003; Zhao ve ark., 2005).

Hücre siklusu

Hücre tipine bağılı olarak Ang-II hücre siklusu gelişimini AT₁ reseptörleri aracılığı ile indüklemektedir. Diğer hücre tiplerinde örneğin renal proksimal tübüler hücrelerinde Ang-II'nin p27kip1 gibi sikline bağımlı kinaz (CDK) ekspresyonunu indüklerken, hücre siklusu gelişimini G1 fazında inhibe ederek hipertrofiye yol açtığı, ayrıca G1 fazında kalmış hücrelerde AT₂ reseptör aktivasyonunun apoptoz veya farklılaşma ile sonuçlandığı ve AT₁ reseptörlerinin bazı hücre tiplerinde

apoptoza aracılık ettiği belirtilmiştir. Ang-II reseptörlerinin (AT₁ reseptörlere karşı AT₂ reseptörleri!) hücre siklusu düzenlenmesindeki mekanizmaları tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (Wolf ve ark., 2004).

Anjiyojenez

Ang-II'nin önemli endojen anjiyojenez destekleyicilerinden olan transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β)'yı stimüle ettiği ve proanjiyojeniklerden biri olan VEGF'un serumdaki yüksek düzeyinin tümör ilerlemesi, düşük tedavi cevabı ve hayata kalma şansının azalması özelliklerini belirginleştirdiği belirtilmiştir (Marsigliante ve ark., 1996). Endotelial hücreler tirozin kinaz reseptörü olan Tie1/Tie2 reseptör sistemini taşıdığı ve Ang-II'nin sığır retinası endotelial hücrelerinde Tie2 reseptör ligandı olan anjiyopietin-II ekspresyonunu AT₁ reseptörlerin aracılığıyla indüklediği ve anjiyopietin-II'nin daha sonraki basamakta PKC ve MAP kinazı tetiklediği belirtilmiştir (Otani ve ark., 2001). Anjiyopietin-I ve anjiyopietin-II, VEGF'e bağlı neovaskularizasyonu facilitate ettiği ileri sürülmüştür (Otani ve ark., 2001; Amaral ve ark., 2001). Sığır retinası endotelial hücre kültüründe Ang-II, AT₁ reseptör stimülasyonu aracılığıyla VEGF-R2 upregülasyonuna neden olmaktadır (Otani ve ark., 2001). Ek olarak, ADE inhibitörü olan lisinopril ile renin-anjiyotensin sisteminin supresyonunun veya sıkı tuz diyetinin, VEGF ekspresyonunu tamamen bloke ederek anjiyojenezi hafiflettiği gözlenmiştir (Amaral ve ark., 2001). AT₁ reseptörlerinin aktivasyonunun ayrıca, metaloproteinazlar aracılığı ile pro-heparin bağlayıcı (EGF) benzeri büyüme faktörü (proHB-EGF) üretimini stimüle ederek HB-EGF salınması, EGF reseptör aktivasyonu, kombine anjiyopietin-II ve VEGF etkisi suretiyle anjiyojeneze neden olduğu bildirilmiştir (Fujiyama ve ark., 2001). Ang-II ile AT₁ reseptörlerin aktivasyonu *in vitro* koşullarda vasküler düz kas hücrelerinin duyarlılığını artırmakta veya plateletlerden türetilen büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve TGF salınmasını indüklemektedir (Machado ve ark., 2000). Ang-II'nin AT₁ reseptörler aracılığıyla neovaskularizasyonu stimüle ettiği ve bir metaboliti olan Ang(1-7)'nin AT₂ reseptörler aracılığı ile endojen antianjiyojenik maddeler eksprese ettiği açıklanmıştır (Machado ve ark., 2000).

Yukarıda belirtilen bilgiler göstermektedir ki; losartan gibi AT₁ reseptörüne spesifik antagonistler doğrudan veya dolaylı biçimde pro-anjiyojenik faktörleri down-regüle ederek anjiyojenezi inhibe etmektedir. Diğer bir deyişle, AT₁ reseptör antagonizması, AT₂ reseptör aktivasyonuna karşı üstünlük sağlayarak anjiyojenezi engellemektedir. AT₁ reseptörler, kinaz sinyal transduser ve (JAK-STAT) transkripsiyon aktivatörleri ile etkileşmektedir (Mascareno ve Siddiqui, 2000). Bu sinyal yolunun büyüme ile ilgili olarak eritropietin, trombopietin, granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) ve bazı interleukinler gibi sitokinler tarafından kullanıldığı savunulmuştur (Piu ve ark., 2002). Ang-II ile AT₁ reseptörlerin aktivasyonu JAK-STAT yolaklarını büyümeyi oluşturmak üzere tetiklemektedir.

Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO) son yıllarda tanımlanan ve birçok biyolojik olayda önemli rolü olan çok kısa yarı ömürlü bir serbest radikaldir. İlk olarak 1980 yılında vasküler sistemde endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) olarak tanımlanmıştır

(Furchgott and Zawadzki, 1980). Vücutta endotel ve diğer hücrelerde NO ve diğer bir son ürün olan sitrüllin, arginin amino asidinden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığı ile sentez edilmektedir. NOS'un genetik olarak farklı üç izoformu tespit edilmiştir. Bunlar düşük miktarda üretilerek vasküler tonüsü ayarlayan bir konstitutif endotelial izoform (eNOS), yine düşük miktarda üretilen sinaptik şekillenme ve nörotransmisyonu düzenleyen konstitutif nöronal bir izoform (nNOS) ve yüksek miktarda üretilerek immün/inflamatuvar olaylarda rol alan ve hücre aracılı immun cevapta etkili bir komponent olan uyarılabilir form (iNOS) olarak belirlenmiştir. nNOS ve eNOS izoenzimleri NO üretimi için Ca^{+2} -kalmodulin kompleksine bağımlıdır, buna karşılık iNOS bağımsızdır. NO fizyolojik konsantrasyonlarda hemen tüm organ sistemlerinde değişik biyolojik etkilere sahiptir (Moncada ve ak., 1991; Nathan ve ark., 1992; Ignarro ve ark., 1999).

NO gastrointestinal sistem düz kası, hava yolları düz kası ve kavernöz dokulardaki vasküler düz kasların gevşemesinde önemli bir mediyatördür. NO merkezi sinir sisteminde hafızanın şekillenmesini de kapsayan çeşitli fonksiyonları bir nörotransmitter olarak desteklemektedir (Wass ve ark.,2006).

Periferde ise gastrointestinal ve ürojenital sistemlerle ilgili çeşitli fonksiyonları düzenlemektedir (Toda ve Herman, 2005; Araujo ve Welch, 2006). İlave olarak NO'nun, konak savunması ve immunolojik reaksiyonlarda da işlevi vardır (Bronte ve Zanovello, 2005). Miyokard işlev bozukluğu, dolaşım yetmezliği ve farklı organ disfonksiyonu ile sonlanan durumlara artmış NO yapımının katkısı olabilmektedir. Öte yandan artmış NO, vazodilatasyona trombosit adezyon ve agregasyonunun engellenmesi ile mikrosirkülasyonda rahatlamaya neden olarak dokuların oksijenlenmesi yönünden önemli düzeyde yarar sağlamaktadır (Roberts ve ark., 1997; Cheung ve ark., 1997). Nitrik oksit ortam havasında belli bir oranda yer alan atmosferik bir gazdır. Sigara dumanı, egzoz gazı ve kirli havada daha yoğun olarak bulunmaktadır.

Çalışmalarda Kullanılan Hücrelerin Özellikleri

A549 küçük hücreli olmayan akciğer karsinoması

Akciğer kanserinin yaklaşık %80'ı küçük olmayan hücreli (non-small cell-carcinoma; NSCLC) akciğer kanserleridir. Bunlar arasında adenokarsinoma yer almaktadır. Küçük olmayan hücreli akciğer kanseri agresif tümör hastalıklarındandır. Tanı anında bölgesel ya da uzak metastaz sıklığı %70 kadar yüksektir (Guarino ve ark., 2002). Epidemiyolojik verilere göre akciğer kanseri kadınlarda tüm kansere bağlı ölümlerin %25'inden ve erkeklerde ise %30'undan sorumlu durumdadır (Guarino ve ark., 2001). A549 küçük olmayan hücreli epiteliyal akciğer adenokarsinomudur. 58 yaşında hasta bir kişiden D.J.Giard tarafından alınmıştır. A549 hücreleri keratin üretmektedirler. Tümörde p53 düzeyinin normal olduğu, IL-1B ve TNF- α ile indüklenebilen iNOS enziminin bulunduğu, ancak eNOS bulunmadığı saptanmıştır (Evdokiou ve Cowled, 1998). A549 hücreleri Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Laboratuvarında daha yapılan çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır. Bunlar arasında, aspirin'in ve bitkisel kökenli fitoöstrojenik bir madde olan kersetin'in standart antineoplastik bir ajan olan paklitaksel ile karşılaştırmalı olarak antiproliferatif ve apoptotik etkilerinin hücre kültürü ortamında incelendiği

çalışmalar bulunmaktadır (Korkmaz ve Öztürk, 2004a;b). Bu tez çalışmasında 20-22. pasajlar arasındaki hücreler kullanılmıştır.

C6 sıçan glioma hücreleri

Çok hızlı proliferen olan C6 glioma hücre soyu, ilk olarak Wistar-Furth ırkı sıçanların *N,N'*-nitrozo-metilüre maddesine maruz bırakılması suretiyle elde edilmiştir. Bu hücreler, neonatal sıçanların beyinleri içine implante edildiklerinde glioblastoma multiforme (GBM) hücrelerine morfolojik açıdan çok benzemektedir. GBM, çoğu terapötik ajana rezistan ve oldukça agresif bir tümöral hastalıktır ve hastaların çoğu tanı konmasının ardından 1 yıllık dönemde yaşamlarını yitirmektedir. Birçok kötücül kanser dokusunda olduğu gibi, farklılaşmamış hücre popülasyonları C6 gliomanın karakteristik morfolojik özelliklerindedir. Ayrıca, yine hücre morfolojisi açısından bakıldığında bu hücrelerin multiform olma özellikleri dikkat çekmektedir: Beyin dokusuna implante C6 hücrelerinin bulunduğu yerlerde nekroz ve hemoraji odakları oluşmakta ve hücreler genetik çeşitlilik sergilemektedir. Bu genetik çeşitlilik, çeşitli gen kayıpları veya amplifikasyonları ile nokta mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. C6 glioma hücrelerinde, normal hücrelerde bulunan glial fibriler asidik protein adı verilen bir protein de bulunmamaktadır (Grobber ve ark., 2002). Bu hücreler önemli düzeyde iNOS enzimi içermekte ve bu hücrelerin çeşitli kemoterapötiklere karşı rezistansında NO üretimi önemli rol oynamaktadır (Yang ve ark., 2002). C6 glioma hücreleri de Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Laboratuvarında daha önce yapılan ve berberin, timol, karvakrol gibi çeşitli maddelerin antiproliferatif ve sitotoksik etkilerinin incelendiği araştırmalarda kullanılmıştır (Korkmaz ve ark., 2000; Korkmaz ve Öztürk, 2006). Haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak üretilen hücreler 30-35. pasajlar arasında kullanılmıştır.

NIH3T3 fibroblast hücreleri

Aaronson tarafından NH/SWISS fare embriyosundan elde edilen adheren fibroblast hücrelerdir. Kültür ortamında kontakt inhibisyona çok duyarlıdır. Çoğalma eğilimi göstermekle beraber stabil bir morfolojik özelliklere sahiptir. Bu özelliklere sahip olduğundan DNA transfeksiyon ve transformasyon çalışmaları için uygun ve kullanışlıdır. Fare sarkoma virüsleri ve faregil lösemi virüslerine karşı duyarlıdır. Ectromelia virüsü için yapılan test negatif sonuç vermiştir (http-1; Chang ve Pastan, 1996; Jainchill ve ark., 1969; Andersson ve ark., 1979). NIH3T3 hücreleri de Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Laboratuvarında hem kanser (Abdallah, 2003; Korkmaz ve ark., 2000; Korkmaz ve Öztürk, 2004a) ile ilgili hem de yara iyileştirici (Öztürk ve ark., 1997) etkilerin araştırıldığı daha önceki çalışmalarda kullanılmıştır. NIH3T3 hücreleri 30-35. pasaj arasında kullanılmıştır.

RATEC sıçan adipöz doku endotelial hücreleri

Yeni bir hücre soyu olan RATEC C2 klon hücreleri (Rat Adipose Tissue Endothelial Cells; sıçan yağ dokusu endotel hücreleri) Koparal ve ark. (2004) tarafından F344 NSIc ırkı sıçanın testisindeki epididimal doku etrafındaki adipöz dokudan (yağ dokusundan) hazırlanan hücre süspansiyonundan (stromal vascular fraction) endotel hücrelerinin izole edilmesi suretiyle elde edilmiştir. Hücreler Dr.

A.Tansu Koparal (Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) tarafından sağlanmıştır. RATEC hücreleri 28-30. pasajlar arasında kullanılmıştır.

Çalışmalarda Kullanılan Yöntemler Hakkında Genel Bilgiler

Mitokondriyal aktiviteye dayalı MTT ölçümü

MTT ölçümü *in vitro* koşullarda metabolizmanın canlılığına dayanarak sitotoksisteyi ölçmek için uygulanan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir (Holst-Hansen ve Brünner, 1981). Bu yöntem, hızlı, kolay ve yüksek oranda doğruluğa sahiptir. Bir tetrazolyum tuzu olan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) sarı renkli olup, yaşayan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat-dehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanmanın sonunda suda çözünmeyen koyu mavi renkte kristaller oluşmaktadır. Kristaller, DMSO ve izopropanol gibi organik çözücülerde kolayca çözünmektedir. Çözünmüş olan bu boya, konsantrasyona bağımlı olarak spektrofotometrik yöntemle görünür dalga boylarında ölçülebilen bir absorbans vermektedir. Böylece indirekt olarak hücrelerin metabolik aktiviteleri ölçülmektedir. Ayrıca ölçülen değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir (Mosmann, 1983; Deniot ve Lang, 1986; Carmichael, 1987). Süksinatdehidrojenaz mitokondrielerin matriksinde yer alan Krebs siklusu enzimlerinden birisidir ve diğer enzimlerinden farklı olarak mitokondriyal iç membranın içe bakan yüzeyinde bulunmaktadır. Bu enzim, FAD (Flavin adenin dinükleotid) demir-kükürt (Fe:S) proteini içermektedir. (Murray ve ark., 1993; Voet ve Voet., 1995; Alberts ve ark., 1998). Bu yöntem, çalışma basamaklarının az olması açısından hızlı, kolay ve çok sayıda örneğin çalışılmasına imkan veren bir testtir (Reile ve ark., 1990; Kueng ve ark., 1998; Senaratne ve ark., 2000).

Lizozomal aktiviteye dayalı nötral kırmızısı alımı ölçümü

Kolorometrik bir yöntem olan nötral kırmızısı alımı sitotoksiste deneyi, lizozomlarda biriken, elektrostatik olarak lizozomal matrisindeki anyonik bölgelere bağlanan, katyonik süpravital bir boya olan nötral kırmızısının (3-amino-7-dimetilamino-2metil fenozin hidroklorid) canlı hücrelerce alımına dayanmaktadır (Bulychev ve ark., 1978; Weyermann ve ark., 2005; Andreoli ve ark., 2003). Hücre yüzeyinde veya hassas lizozomal membrandaki hasar, nötral kırmızısının alımını ve bağlanmasını azaltarak canlı/sağlam hücrelerle hasarlı/ölü hücreleri birbirinden ayırmayı mümkün kılmaktadır (Komissarova ve ark., 2004; Barile, 1994). Nötral kırmızısı boyası canlı, hasar görmemiş hücrelerin lizozomlarında birikmektedir (Fotakis ve Timbrell 2006; Yano ve Marcondes, 2005). Nötral kırmızısı alımı sitotoksiste deneyi, oldukça basit, güvenilir ve diğer pahalı deneylerin yerini alabilecek nitelikte bir test yöntemidir (Pipiolkiewicz ve ark., 2005).

Nitrik oksit düzeyleri hakkında fikir veren nitrit ölçümü

NO yarılanma ömrü çok kısa olan bir bileşiktir. Kan gibi fizyolojik ortamlarda yarılanma ömrü 6-20 saniye kadardır ve bu durum bazal koşullarda NO ölçümünü güçleştirmektedir. NO, her ne kadar elektrokimyasal ve kemilüminesans gibi yöntemler ile direkt olarak ölçülebilse de, hızlı ve basit bir yöntem olarak çoğu örnekte NO metabolizmasının dayanıklı son ürünleri olan nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) miktarlarının ölçümü de sıklıkla kullanılmaktadır. Griess yöntemi ile duyarlılık limitinin 0,1-1 μM kadar olduğu bildirilmiştir (Nagano, 1999). NO

metabolizmasının incelenmesi için sadece nitrit miktarlarının ölçümü sıklıkla kullanılsa da, bu reaksiyonlar sonucunda nitratın da oluştuğu ve biyolojik sistemlerde nitritin hem demiri içeren proteinler varlığında nitrate okside olduğu da unutulmamalıdır (Gross ve Wolin, 1995). Fizyolojik koşullarda NO yaklaşık 3:2 oranında nitrit ve nitrate okside olmaktadır. Oksijenlenen çözeltilerde nitritin nitrate dönüşümü oldukça yavaştır. Bütün bunlarla birlikte, nitrit ve nitratın oluşum oranları değişken ve örneğe de bağımlı olduğundan, NO metabolizmasının derecesinin en iyi göstergesi nitrit ve nitratın ikisinin birden (NO_x olarak ifade edilir) ölçülmesiyle elde edilen sonuçlardır. Nitrit vücut sıvılarında nitratın daha az konsantrasyonda bulunduğundan, çoğu durumda NO_x nitrat konsantrasyonları ifade edilmektedir.

Nitrit ölçümü için 50'den fazla kolorimetrik yöntem kullanılmıştır; bu yöntemlerden çoğu azo boyalarının oluşumu temeline dayanmaktadır (Sawicki, 1971). Griess yöntemi nitritin asidik ortamda primer bir aromatik amin ile (sülfanilamit) diazotizasyonu ve N-(1-naftil) etilendiamin hidroklorit (NED) ile mor renkli bir azo ürünü oluşturması esasına dayanmaktadır (Tunçtan, 2005). Griess reaksiyonu, nitrit iyonlarına duyarlı olduğundan, ortamdaki nitratın nitrite indirgenmesi *in vivo* olarak oluşan NO'nun gerçeğe yakın miktarlarda ölçümüne olanak tanımaktadır (Dejam ve ark., 2004). Diğer yandan, Griess yönteminin submikromolar düzeyde NO ölçümü için uygun olmadığı, ancak, nitrit ve birlikte bulunan nitroksitlerin ölçümü için en uygun ölçüm yöntemi olduğu da düşünülmektedir (Archer, 1993).

Apoptotik sinyal iletiminin anahtar proteini kaspaz (caspase) enzimleridir. Apoptotik uyarı sırasında (örneğin TNF- α) ile uyarı, Fas-resprör aktivasyonu, büyüme yokluğu durumlarında) sistein proteazlar olan kaspaz enzimleri aktive olurlar. Kaspaz enzimlerinin yukardaki sinyal iletim yolları aracılığı ile aktivasyonu nitrik oksit tarafından inhibe edilir. Sistein bağımlı proteazlar olan kaspaz enzimlerinin (kaspaz 1-8) NO-bağımlı inaktivasyonlarının nedeni tiyol gruplarının nitrozasyonudur. NO vericileri ayrıca fas-reseptörleri ile kaspaz aktivasyonu arasındaki sinyal iletim yolunu da etkileyerek kaspaz aktivasyonunu önlerler. NO mitokondrileri de stabilize ederek apoptosisi baskılar. Proapoptotik uyarı mitokondri iç zar yapısında bozulmalara ve buradan sitokrom c'nin salınımına neden olur. Nitrik oksitin proapoptotik etkileri siklooksijenaz-2 inhibisyonu, Bcl-2 sentezinin baskılanması, DNA ile tepkimeleri, P53 sentezinin indüksiyonu, mitokondri zar geçirgenliğinin artması, tiyolların oksidasyonu, kaspaz aktivasyonunu kapsarken antiapoptotik etkileri HSP 70 ve Bcl-2 sentezinin indüksiyonu, kaspaz enzimlerinin S-nitrozasyonu ile inaktivasyonu, cGMP artışı ve mitokondri da aşırı Ca²⁺ birikimini önlemek ve antioksidan etkilerine bağlı olduğu düşünülür. Nitrik oksitin sitotoksik, proapoptotik ya da antiapoptotik etkilerden hangisini göstereceği yine ortamdaki NO derişimine bağlıdır (Kılınç ve Kılınç, 2003).

GEREÇLER

Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Kaptopril (Mustafa Nevzat İlaç Sanayii A.Ş. Türkiye)

Losartan (Mustafa Nevzat İlaç Sanayii A.Ş. Türkiye)

Dimetilsülfoksid- DMSO (Sigma Almanya, Merck)

Etanol %96 (Merck)

Fetal Calf serumu (Biological Industries İsrail)

Fosfat Tuz Tamponu (PBS-A)

HCl (Merck)

CaCl₂ (Merck)

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) (Sigma İngiltere)

Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (Biological Industries İsrail)

NaOH (Merck)

NaHCO₃

Tripsin-EDTA Solüsyonu (Biological Industries İsrail)

Medium F-12 (HAM's)

DMEM düşük glikozlu

DMEM

Fetal Bovine Serum F7524 (Sigma Almanya)

Neutral Red

Glasiyel asetik asit

Formaldehit

NaNO₂

Cihazlar

Steril Kabin (Holten)

ELISA cihazı (Bio-Tek)

İmmüno-floresan mikroskop ve fotoğraf ataçmanı (Olympus)

Karbondioksit inkübatörü (Heraeus)

Kuru hava sterilizatörü (Heraeus)

Otoklav (Hirayama)

Soğutmalı santrifüj (Heraeus)

Malzemeler

Otoklavlanabilir cam şişe (Iso-lab)

1, 2, 5, 10 mL'lik cam pipet (Iso-lab)

10, 100, 1000µL mikropipet ucu

15, ve 50 mL'lik santrifüj tübü (TPP Avrupa)

22*22 Lamel

Neubauer lamı (Iso lab)

25 ve 75 cm²'lik kültür flakaları (TPP Avrupa)

96 kuyucuklu plakalar (TPP Avrupa)

Çok kanallı mikropipet (Eppendorf)

Stepet pipet (Eppendorf)

20 ve 50 mL'lik injektör

Parafilm M

YÖNTEMLER

Deney İçin Hücrelerin Hazırlanışı

Uygun kuşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler yeterli sayıya eriştikleri zaman 5 mL PBS ile yıkandıktan sonra 5mL PBS EDTA ile durulanmış ve tripsin ile muamele ederek toplanmıştır. 1 mL'de 100.000 hücre olacak şekilde Neubauer lamı kullanarak süspansiyon hazırlanmıştır. 100.000 hücre/mL şeklinde süspansiyon edilmiş hücreler 96 kuyucuklu plakaya her bir kuyucuğa 0,1 mL olacak şekilde ekilmiştir. Böylece her kuyucuğa 10.000 hücre ekilmiş olmaktadır. Hücreler, yapışması ve yeni ortama alışması için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hücrelerin üzerine test maddelerinin istenilen konsantrasyonları içeren taze besiyerleri⁴ ilave edilip, test maddeleri ile 24, 48, 72 ve 96 saat inkübe edildi. Kaptopril ve losartan'ın 0,004, 0,02, 0,1, 0,5 ve 2,5 mM'lık konsantrasyonları sağlayan dilüsyonları uygun besiyerlerinde taze olarak hazırlanarak hücre içeren kuyucuklar içine uygulanmıştır. Kontrol grubu olarak hücreler içeren kuyucuklara sadece 0,2-0,3 mL besiyeri ilave edilmiştir. Test maddelerini (kaptopril veya losartan) içeren besiyerleri, 96 kuyucuklu plakaların her bir gözüne 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar için 0,2 mL, 72 ve 96 saatlik inkübasyonlar için 0,3 mL koyularak inkübe edilmiştir. Bu sürelerin sonunda hücrelerde aşağıda belirtilen ölçümler uygulanmıştır.

MTT ölçümü

MTT 5 mg/mL olacak şekilde PBS içinde çözülerek stok solüsyonu hazırlanmıştır. Çalışma solüsyonu stok solüsyonundan 1:9 oranla besiyeri ile seyrelterek elde edilmiştir. Hazırlanmış olan (0,5 mg/mL MTT) çalışma solüsyonu 96 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna 0,1 mL olarak ilave edilmiş ve 3 saat inkübasyonda bekletildikten sonra plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazı ile 540 nm dalga boyunda okutulmuştur (Mosmann, 1983; Horakova, 2001)

Nötral kırmızısı alımı ölçümü

Test maddeleri ile gerekli süre bekletilen hücreler alıp besiyerleri uzaklaştırılmış ve hücreler 37°C'ye getirilmiş PBS ile yıkanmıştır. Nötral kırmızısı stok solüsyonu 1:100 oranında besiyeri ile karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlanmış⁵ ve her bir kuyucuğa 0,1 ml ilave edilerek 37°C'de 3-4 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda boyama solüsyonu uzaklaştırılarak taze hazırlanmış formaldehit-kalsiyum klorür fiksatif/yıkama solüsyonundan 100'er µl ilave edilerek yıkanmış ve solüsyon dökülmüş, plakalar ters çevrilerek kurutma kağıdı üzerinde bir gün bekletilerek kurutulmuş, asetik asit-etanol solüsyonu her bir kuyucuğa 0,1 ml ilave edilerek 15 dakika oda ısısında bekletilmiş ve 30 dakika çalkalayıcıda çalkalanarak boya homojen hale getirilmiştir. Plakalardaki

⁴ Besiyerleri olarak A549 hücreleri için; Ham's-F12; C6 Glioma hücreleri için %50 Ham's-F12 + %50 DMEM; NIH3T3 hücreleri için DMEM; RATEC hücreleri için düşük glukozlu DMEM kullanılmıştır. Bu besiyerlerine ayrıca %10 FCS, 100 IU/ml penisilin ve streptomisin de ilave edilmiş ve hücreleri içeren besiyerleri yukarıda belirtilen sürelerde 37°C; %5CO₂+%95O₂ koşullarında tutulmuşlardır.

⁵ 0.4 gr Nötral kırmızısı + 100 mL besiyeri, membran filtreden geçirilip sterilize edilmiş ve koyu renkli şişe ile buzdolabında saklanmıştır.

hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Bu deneyin her aşaması boya ışıkta bozulduğu için mümkün olduğunca karanlıkta yapılmıştır (Horakova 2001, Shen ve West, 1998).

Nitrit ölçümü

NO'in yarılanma ömrü çok kısa olduğundan besiyerindeki oluşan metaboliti NO₂⁻ ölçülmektedir. Yukarıda belirtilen biçimde hazırlanan hücreleri içeren 96 kuyucuklu plakada her kuyucuktan 100 µL süpernatant alınır üzerine eşit miktarda Griess reaktifi (0,05% naftilendiamin dihidroklorür, 0,5% sülfonilamid, 2,5% H₃PO₄) ilave edilip 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra ELISA cihazı ile 540 nm dalga boyunda okutulmuştur (Al-alami ve ark. 1998). Elde edilen değerler kontrol grubunda standard olarak 25 µM sodyum nitrit ile karşılaştırıldı.

Biyostatistik Değerlendirme ve Grafikler

Absorbans ölçümlerine ait değerler her grubun kendi kontrolünün absorbans değerine oranlanarak % aktivite olarak ifade edilmiştir. Tez kapsamında rapor edilen sonuçlar belirli sayıda (n) deney sonucunun aritmetik ortalamasıdır. Deney sonuçlarının değerlendirilmesinde IBM uyumlu kişisel bir bilgisayarda çalıştırılan SPSS (Version 11.5) programı (SPSS Inc.) kullanılmıştır. Ayrıca, ham verilerin bilgisayarda toplanması ve istatistiksel değerlendirmesi yapılmış verilerden grafiklerin hazırlanmasında Microsoft Excel (Office 2007) programından yararlanılmıştır.

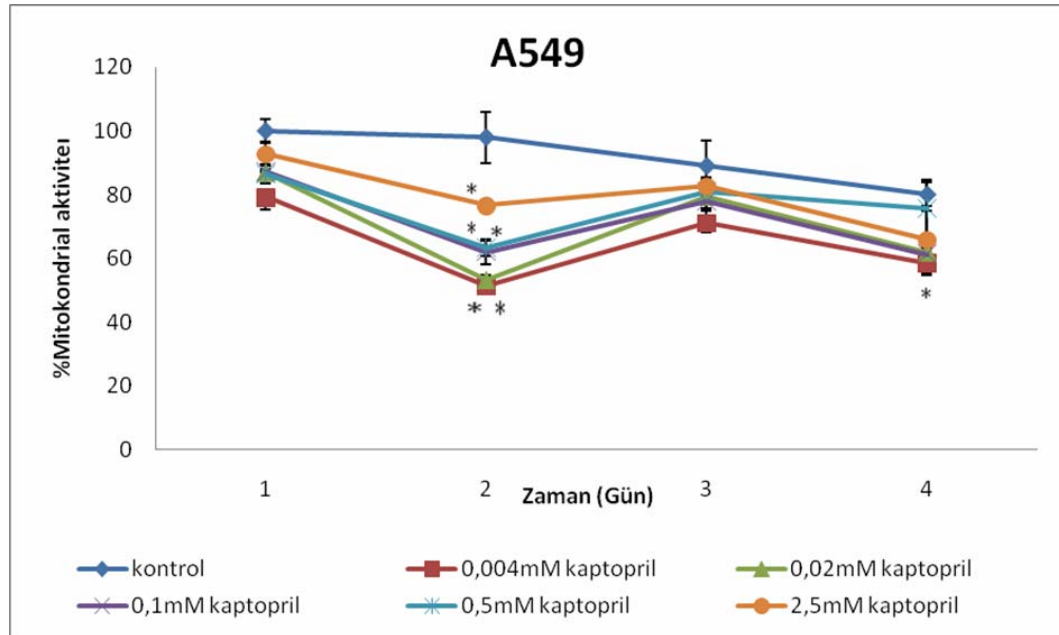
Sonuçlar ortalama ± standart hata (St.hata) olarak ifade edilmiş ve tezde verilen grafiklerde St.hatalar düzey çizgiler olarak yerleştirilmiştir. Deney grupları arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ve *post hoc* olarak Tukey testi uygulanarak istatistiksel değerlendirme altına alınmıştır. $p < 0.05$ düzeyinde sonuçlar arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir. Çizilen grafiklerde istatistiksel anlamlılıklar uygun işaretler ile gösterilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Kaptopril Sonuçları

Kaptopril'in MTT ölçüm sonuçları

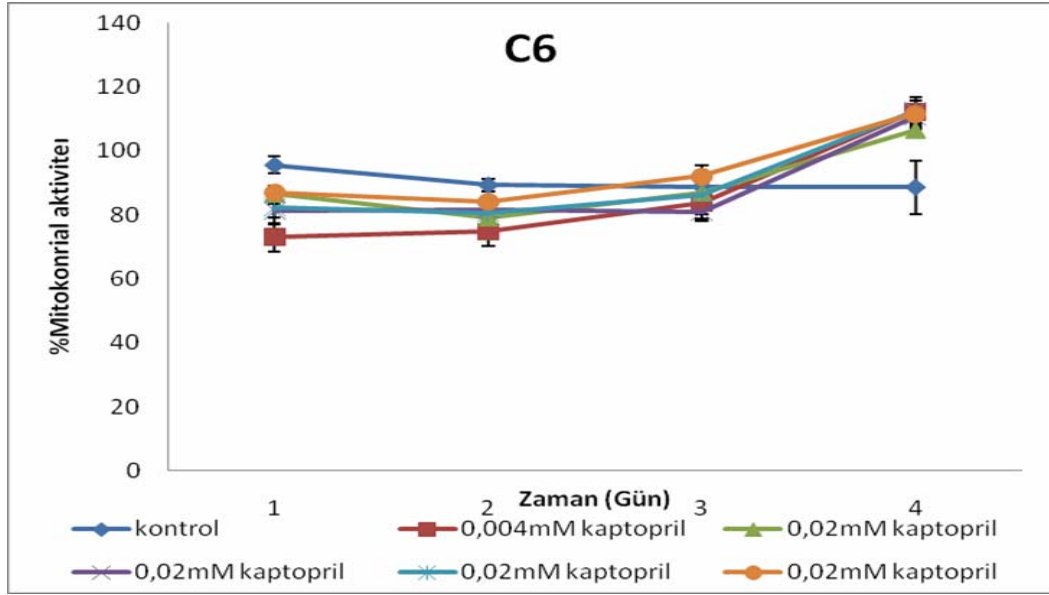
Kaptopril uygulanan hücrelerden elde edilen MTT sonuçlarına göre, A549 hücrelerinde üçüncü günde ikinci güne nazaran etki düşüşü görülmektedir, dördüncü günde ise etki tekrar görülmeye başlamaktadır. A549 hücrelerinde maksimum yanıt ise ikinci günde gözükmemektedir (Şekil 1). Bu bulgular, bize kaptopril'in uygulanan konsantrasyonlarda antiproliferatif ve sitotoksik etkilerinin olduğunu göstermektedir. Elde edilen gözlemler, A549 hücrelerinde antiproliferatif etkiler gözlemlemiş daha önceki bazı çalışmaların (Kowalski ve ark., 1995) sonuçlarını doğrular niteliktedir. Ancak, tez kapsamında A594 ile elde edilen bu sonuçlar Ang-II'nin apoptotik ve kaptoprilin antiapoptotik etkilerini rapor eden Wang ve ark. (1995)'nin gözlemleri ile çelişir niteliktedir. Bu çelişki, büyük bir olasılıkla deney koşullarındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Ancak, kaptopril'in bu çalışmada gözlenen antiproliferatif etkisi, daha önce literatürde bu ilaçla başka kötücül hücre kültürlerinde bildirilmiş olan antiproliferatif ve sitotoksik etkiler ile genel anlamda benzerlik göstermektedir (Chen ve ark., 1991; Small ve ark., 1997; Hii ve ark., 1998; Nakagawa ve ark., 1995; Reddy ve ark., 1995; Kowalski ve Herman, 1996).



Şekil 1. Kaptopril'in A549 Hücrelerinde MTT Testi Üzerine Etkisi. (*) Günlere Göre Anlamli Farklılıklar. Anamlılık Dğeri $p < 0,05$, Ortalama Değeri \pm St. Hata (n = 6)

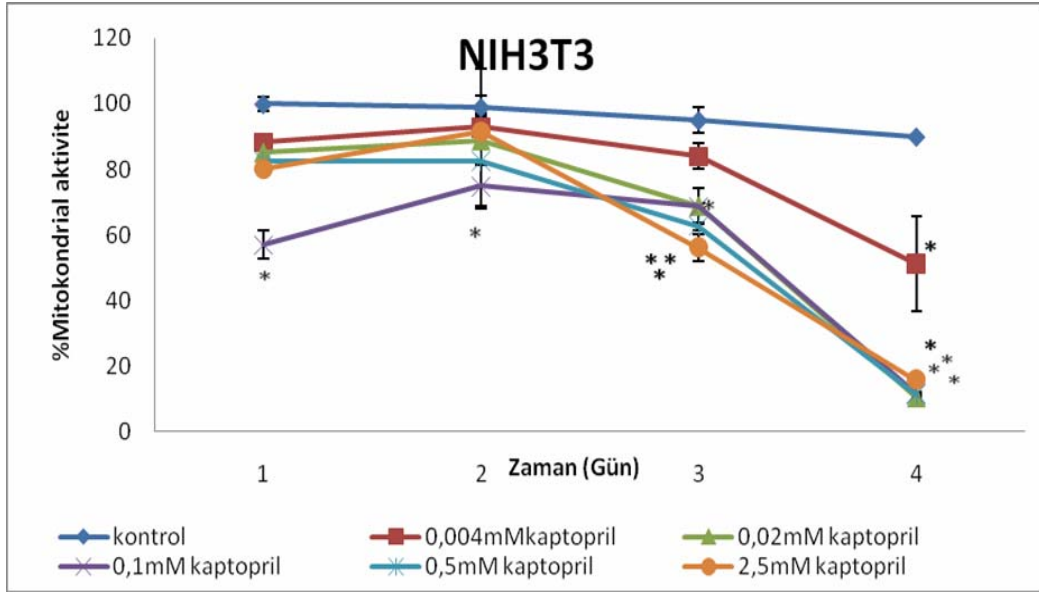
C6 hücrelerinde deneyde kullanılan kaptopril konsantrasyonlarının anlamlı etki yaratmadığı gözükmemektedir (Şekil 2). Kaptopril'in C6 glioma hücreleri üzerindeki etkileri ilk kez bu tez çalışması kapsamında değerlendirilmiştir. Tez deneylerinde elde edilen bulgular, kaptopril'in bu hücrelerde antiproliferatif ve sitotoksik etkilerinin olmadığını göstermekte ve Yoshiji ve ark. (2001) tarafından faregil

karaciğer karsinomasında elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir (Çizelge 2).



Şekil 2. Kaptopril'in C6 hücrelerinde MTT testi üzerine etkisi. (*) Günlere göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0,05$, ortalama değer \pm St. Hata (n = 6)

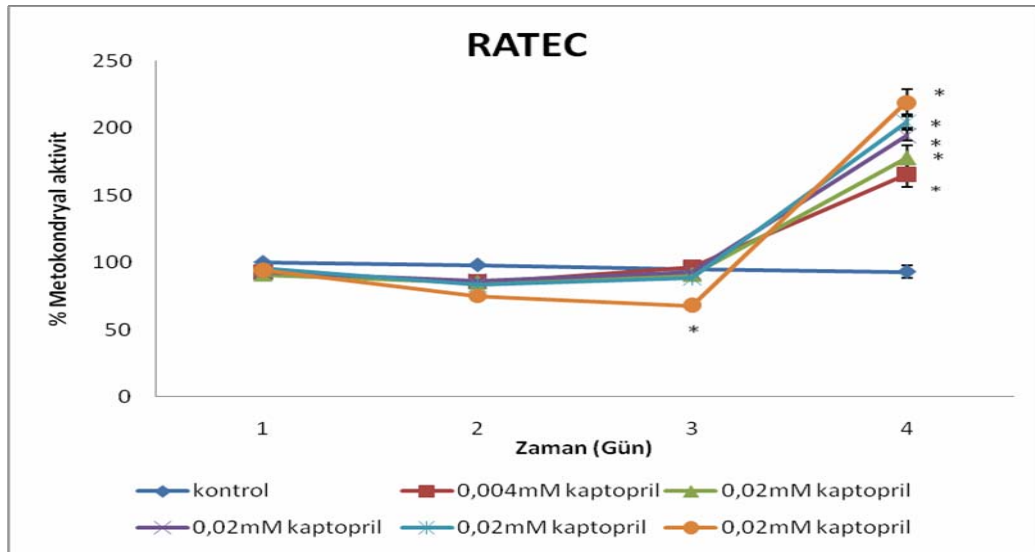
NIH3T3 hücrelerinde kaptopril'in MTT testindeki etkisi 0,1mM konsantrasyonda birinci günden başlamakta ve ikinci günde anlamlı yanıt kaybolmakta, yanıt üçüncü günde devam edip, dördüncü günde tüm konsantrasyonların maksimum yanıtları gözükmemektedir (Şekil 3). Bu bulgular, kaptopril'in NIH3T3 fibroblast hücrelerinde belirgin bir antiproliferatif ve sitotoksik etkisinin olduğunu göstermektedir. NIH3T3 hücreleri proliferasyon ve sitotoksikite çalışmalarında yaygın olarak kullanılan hücreler olmasına karşın, ilginç olarak yapılan literatür



Şekil 3. Kaptopril'in NIH3T3 Hücrelerinde MTT Testi Üzerine Etkisi. (*) Günlere Göre Anlamlı Farklılıklar. Anlamlılık Değeri $p < 0,05$, Ortalama Değer \pm St. Hata (n = 6)

taramalarında kaptopril'in bu hücre tipinde proliferasyon yeteneğine ilişkin daha önceden yapılmış herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Bu gözlem ayrıca, kaptopril'in yara iyileşimi sürecini olumsuz yönde etkileyeceğini akla getirmektedir. Ancak beklenenin tam aksine, daha önce yapılan araştırmalarda söz konusu bu ilacın, antianjiyojenik etkiler de taşımasına rağmen, yara iyileşme hızını etkilemediği saptanmıştır (Qui ve ark., 2000). Ayrıca, kaptopril'in NIH3T3 hücreleri üzerinde gösterdiği bu antiproliferatif ve sitotoksik etkiler, söz konusu ilacın fibrosis durumlarında ortaya çıkardığı olumlu antifibrotik etkilerin açıklayıcı temelini oluşturmaktadır (Igc ve Behnia, 2003; Baybutt ve ark., 2007).

RATEC hücrelerinde üçüncü günün 2,5 mM kaptopril'in gösterdiği etki haricinde diğer konsantrasyonların etkisiz olduğu, fakat dördüncü günde kullanılan tüm konsantrasyonlarda mitokondriyal aktivitede anlamlı artış gözükmektedir (Şekil 4). Bu bulgular aynı zamanda RATEC endotel hücrelerinde proliferasyon artışı anlamına gelmektedir. Kötü olmaya yakın diğer bir hücre tipi olan RATEC üzerinde literatüre kayıtlı çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Kaptopril'in etkisi de ilk kez bu tez çalışması ile incelenmiş olmaktadır. Endotel tipindeki bu hücrelerde elde edilen gözlemler, daha önce literatürde diğer endotel tipleri (vasküler, retinal, koroidal, vs) ile rapor edilmiş olan sonuçlarla örtüşmektedir (Hamdi ve Castellon, 2003; Liu ve ark., 2007). Buradan, kaptopril'in vasküler protektif etkilerinin olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Destekler nitelikte, klinik gözlemlere dayanılarak kaptopril ve diğer ADE inhibitörlerinin kardiyovasküler protektif etkileri olduğu ileri sürülmüştür (Stojiljkovic ve Behnia, 2007).

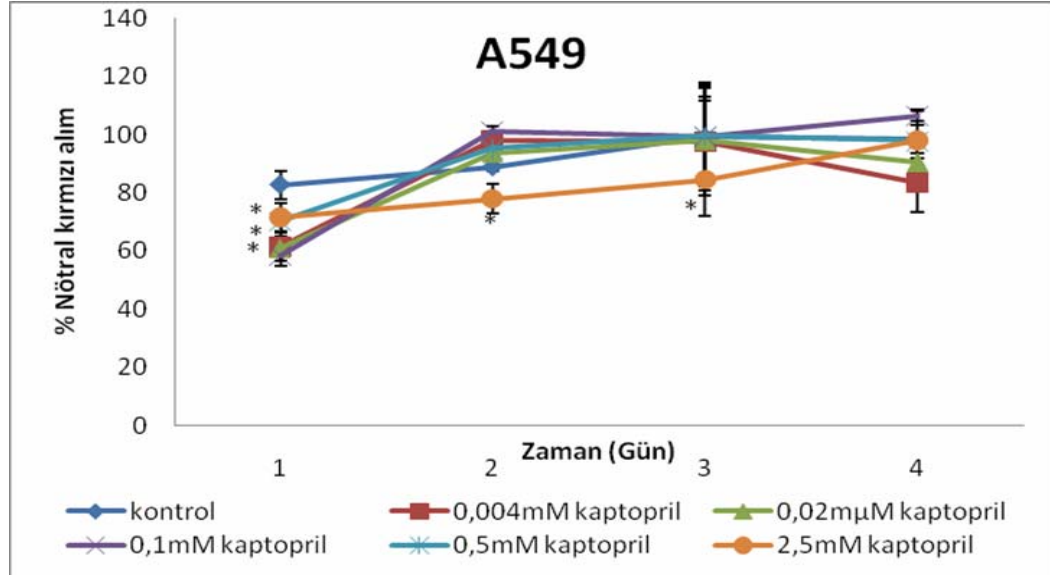


Şekil 4. Kaptopril'in RATEC Hücrelerinde MTT Testi Üzerine Etkisi. (*) Günlere Göre Anlamlı Farklılıklar. Anlamlılık Dğeri $p < 0,05$, Ortalama Değer \pm St. Hata (n = 6)

Kaptopril'in Nötral Kırmızısı Alım Ölçümü Sonuçları

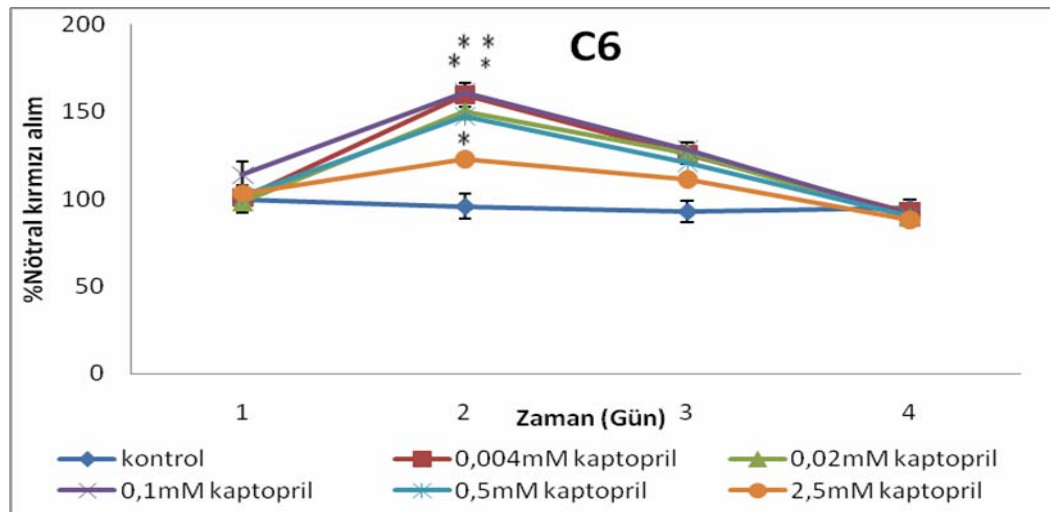
Kaptopril'e maruz bırakılmış A549 hücrelerinde 0,02 ve 0,1 mM konsantrasyonların birinci günde etkili olduğu ve düşürdüğü, 2,5mM konsantrasyonun ise ikinci ve dördüncü günlerde anlamlı derecede yanıt oluşturduğu gözükmektedir, dördüncü günde ise anlamlı derecede yanıt

oluşmadığı gözükmemektedir (Şekil 5). Bu sonuçlar, kaptopril'in A549 hücrelerinde lizozomal aktiviteyi düşürdüğü ve muhtemelen de apoptotik etki oluşturduğunu göstermektedir. Bu gözlem, Wang ve ark. (1995) tarafından A549 hücreleri ile daha önceden rapor edilen sonuçlarla çelişmektedir.



Şekil 5. Kaptopril'in A549 Hücrelerinde Nötral Kırmızısı Alım Yanıtı. (*) Günlere Göre Anlamli Farklılıklar. Anlamlilik Değeri $p < 0,05$, Ortalama Değerler \pm St. Hata (n=6)

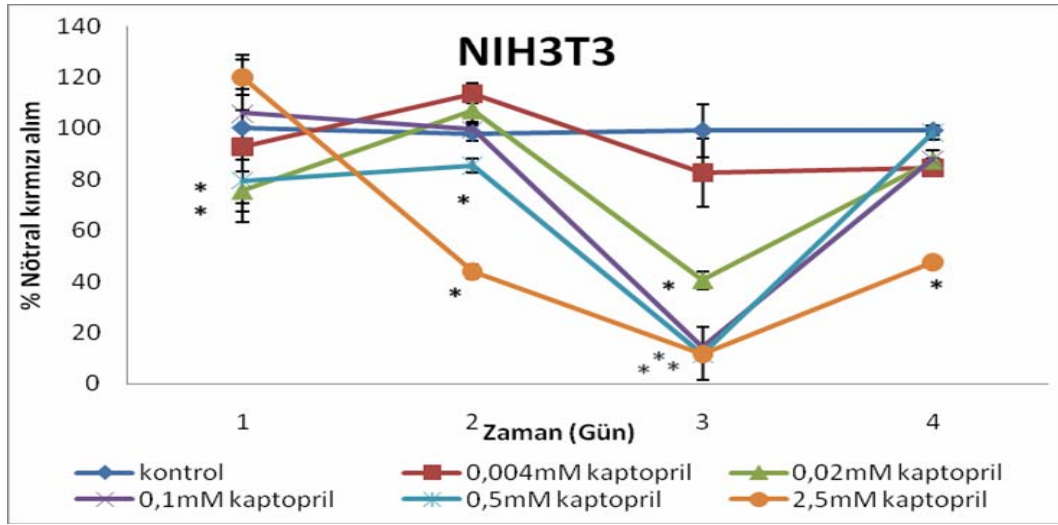
Deneylerde kullanılan tüm kaptopril konsantrasyonları ile C6 hücrelerinde ikinci günde neutral kırmızısı alımı üzerinde artırıcı etki gözükürken, hücreler üçüncü ve dördüncü günlerde anlamli derecede etkilenmemiştir (Şekil 6). Bu bulgular, söz konusu ilacın C6 glioma hücrelerinde lizozomal aktiviteyi yükselttiği ve muhtemelen de antiapoptotik etki oluşturduğunu göstermektedir. Literatürde bu hücre tipi ve kaptopril ile yapılmış herhangi bir araştırma bulunmamaktadır. Bu gözlem, Wang ve ark. (1995) tarafından A549 hücreleri ile daha önceden rapor



Şekil 6. Kaptopril'in C6 Hücrelerinde Nötral Kırmızısı Alım Yanıtı. (*) Günlere Göre Anlamli Farklılıklar. Anlamlilik Değeri $p < 0,05$, Ortalama Değerler \pm St. Hata (n=6)

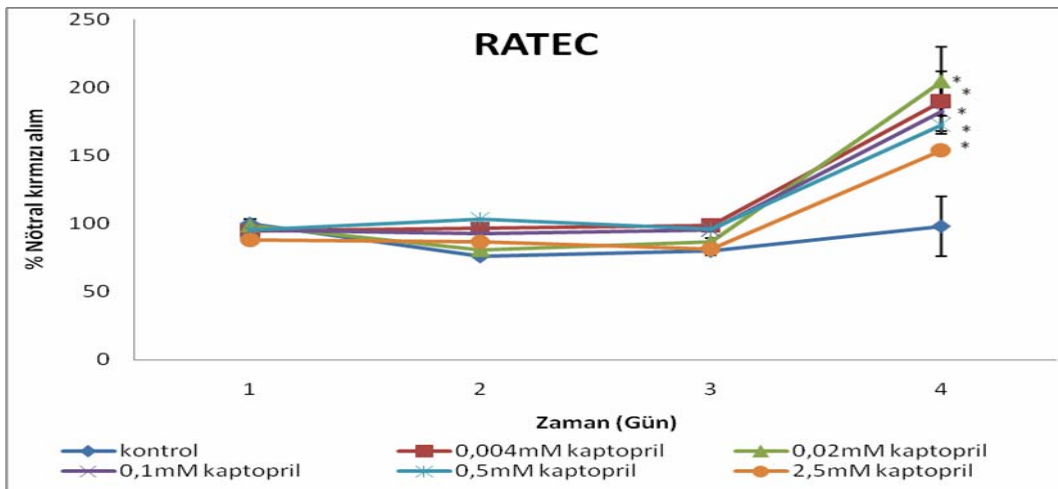
edilen sonuçlarla uyuşmaktadır.

Kaptopril NIH3T3 hücrelerinde 0,5 ve 2,5 mM konsantrasyonların azalan tipte etkileri birinci günden itibaren başlamakta, ikinci günde devam etmekte ve üçüncü günde maksimuma ulaşmaktadır. Dördüncü günde ise sadece 2,5 mM konsantrasyonu etkili iken kullanılan diğer konsantrasyonlar etkili olmadığı gözükmektedir (Şekil 7). MTT sonuçları ile bağlantılı olarak değerlendirildiğinde bu gözlem, lizozomal aktivitedeki azalmadan ziyade hücre sayısındaki azalma anlamına gelmektedir. Diğer bir deyişle bu gözlem, kaptoprilin NIH3T3 hücreleri üzerindeki antiproliferatif ve sitotoksik etkisini doğrulamaktadır.



Şekil 7. Kaptopril'in NIH3T3 Hücrelerinde Nötral Kırmızısı Alım Yanıtı. (*) Günlere Göre Anlamli Farklılıklar. Anlamlilik Değeri $p<0,05$, Ortalama Değeri \pm St. Hata (n=6)

Kaptopril'in RATEC hücrelerinde nötral kırmızısı alımı üzerinde birinci, ikinci, ve üçüncü günlerde etkili olmadığı, fakat dördüncü günde kullanılan tüm konsantrasyonlarda nötral kırmızısı alımı aktivitesinde anlamli artışlar yaptığı gözükmektedir. Üstelik bu artışlar kaptopril konsantrasyonu (doz) artışına bağımlı olarak ortaya çıkmaktadır (Şekil 8). Bu bulgular, sözkonusu ilacın RATEC

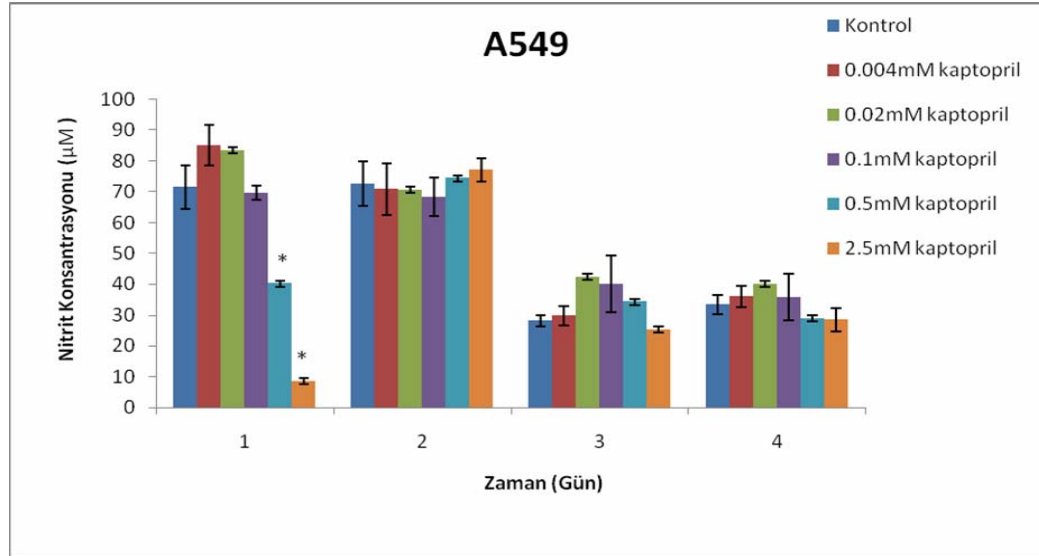


Şekil 8. Kaptopril'in Ratec Hücrelerinde Nötral Kırmızısı Alım Yanıtı. (*) Günlere Göre Anlamli Farklılıklar. Anlamlilik Değeri $p<0,05$, Ortalama Değeri \pm St. Hata (n=6)

hücrelerinde lizozomal aktiviteyi yükselttiği ve muhtemelen de antiapoptotik etki oluşturduğunu göstermektedir. Literatürde bu hücre tipi ve kaptopril ile yapılmış herhangi bir araştırma bulunmamaktadır. Ancak, genel anlamda bulguların bu hücre tipinin MTT sonuçları ile ilgili olarak yukarıda ileri sürülen görüşler ile uyum gösterdiği anlaşılmaktadır.

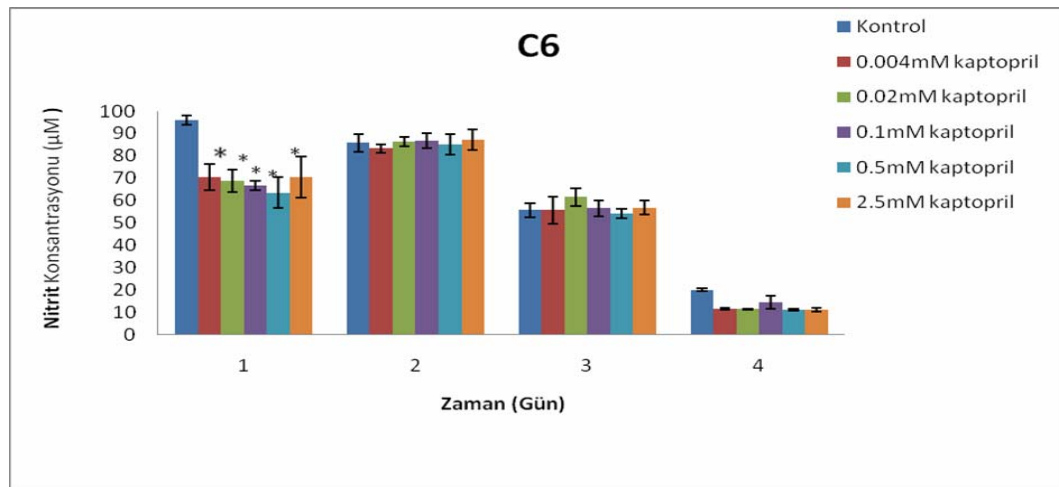
Kaptopril'in nitrit oluşumu üzerine etkisinin ölçüm sonuçları

Kaptopril'e maruz bırakılmış A549 hücrelerinde birinci gün ölçümlerinde nitrit düzeyleri istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde azalmakta, ancak sonraki günlerde nitrit düzeyleri etkilenmemektedir (Şekil 9).



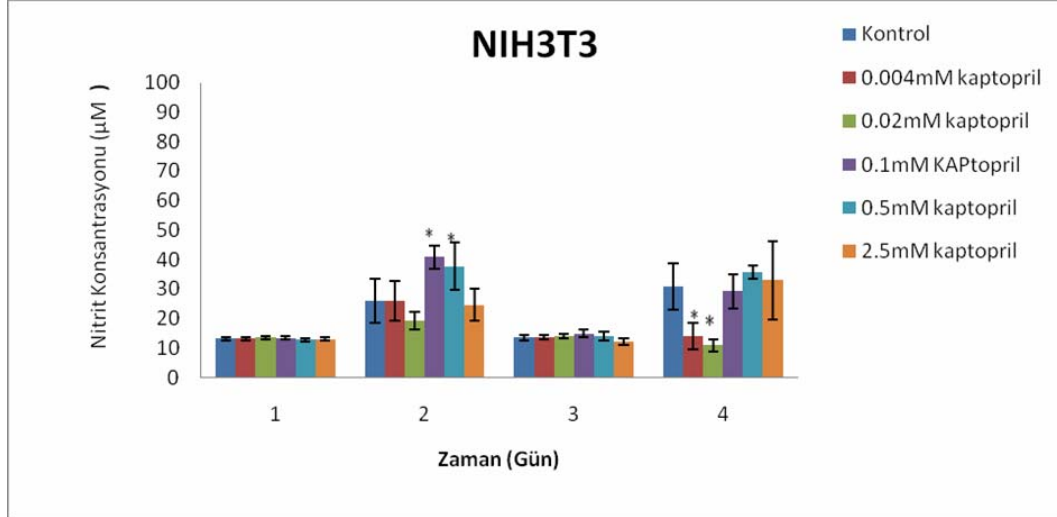
Şekil 9. Kaptopril'in A549 Hücrelerinde Nitrit Konsantrasyonu Üzerine Etkisi. (*) Günlere Göre Anlamlı Farklılıklar. Anlamlılık Değeri $p < 0,05$, Ortalama Değerler \pm St. Hata (n=6)

A549 hücrelerinde olduğu gibi C6 glioma hücreleri kaptopril ile inkübe edildiği zaman birinci günde nitrit düzeyleri istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde azalmaktadır. Diğer günlerde ise etki gözükmemektedir (Şekil 10).



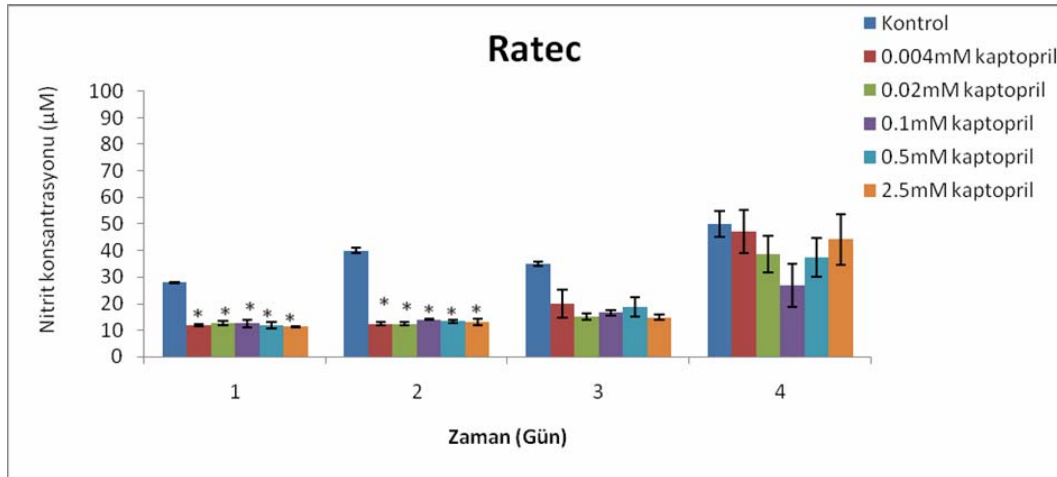
Şekil 10. Kaptopril'in C6 Hücrelerinde Nitrit Konsantrasyonu Üzerine Etkisi. (*) Günlere Göre Anlamlı Farklılıklar. Anlamlılık Değeri $p < 0,05$, Ortalama Değerler \pm St. Hata (n=6)

NIH3T3 hücreleri kaptopril ile inkübe edildiği zaman ikinci günde nitrit düzeyleri hafif biçimde ancak istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde artmaktadır. Dördüncü günde ise azalma görülmektedir (Şekil 11).



Şekil 11. Kaptopril'in NIH3T3 Hücrelerinde Nitrit Konsantrasyonu Üzerine Etkisi. (*) Günlere Göre Anlamlı Farklılıklar. Anlamlılık Değeri $p < 0,05$, Ortalama Değerler \pm St. Hata (n=6)

RATEC hücreleri kaptopril ile inkübe edildiği zaman birinci ve ikinci günde nitrit düzeyleri istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde azalmaktadır. Diğer günlerde ise etki gözükmemektedir (Şekil 12).



Şekil 12. Kaptopril'in RATEC Hücrelerinde Nitrit Konsantrasyonu Üzerine Etkisi. (*) Günlere Göre Anlamlı Farklılıklar. Anlamlılık Değeri $p < 0,05$, Ortalama Değerler \pm St. Hata (n=6)

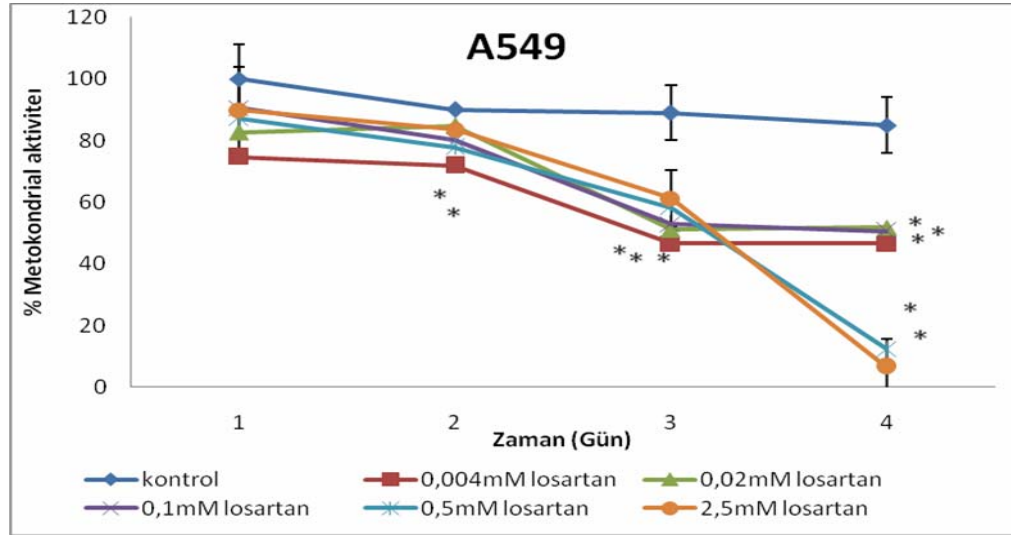
İlk bakışta çelişkili gözükken bu gözlemler, büyük bir olasılıkla anjiyotensin II oluşumunun engellenmesi ile ilişkilidir. Anjiyotensin II, nitrik oksit yapımını arttırmaktadır ve bu artışa AT₂ reseptörlerinin aktivasyonu aracılık etmektedir (Li ve ark., 2007; Pinaud ve ark., 2007). Nitrik oksit düzeylerinde görülen azalmaların hücre tipine bağlı olarak farklı zamanlarda ortaya çıkması büyük bir olasılıkla

hücre tipinin eksprese ettiği AT₂ reseptör miktarı ve reseptör duyarlılığı ile bağlantılıdır. NIH3T3 hücrelerinde olduğu gibi nitrik oksit düzeyinde artış görülmesi ise örneğin bradikinin artışı, farklı mekanizmaları gibi akla getirmektedir.

Losartan Sonuçları

Losartan'ın MTT ölçüm sonuçları

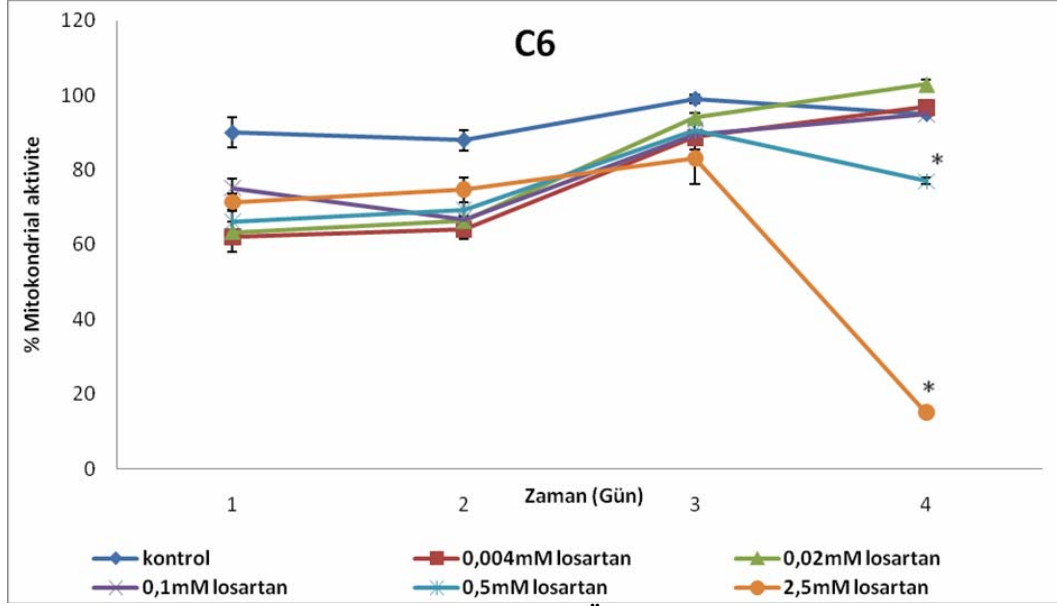
Losartan uygulanan hücrelerden elde edilen MTT sonuçlarına göre, A549 hücrelerinde ikinci günden itibaren anlamlı düşme görülmekte, üçüncü günde anlamlı etki devam ederek dördüncü günde maksimuma ulaştığı gözükmektedir (Şekil 13). Kaptopril sonuçlarıyla paralellik gösteren bu bulgular, büyük bir olasılıkla mitokondriyel aktivitede azalma ve antiproliferatif/sitotoksik etkiyi işaret etmektedir.



Şekil 13. Losartan'ın A549 Hücrelerinde MTT Testi Üzerine Etkisi. (*) Günlere Göre Anlamlı Farklılıklar. Anlamlılık Değeri $p < 0,05$, Ortalama Değer \pm St. Hata (n = 6)

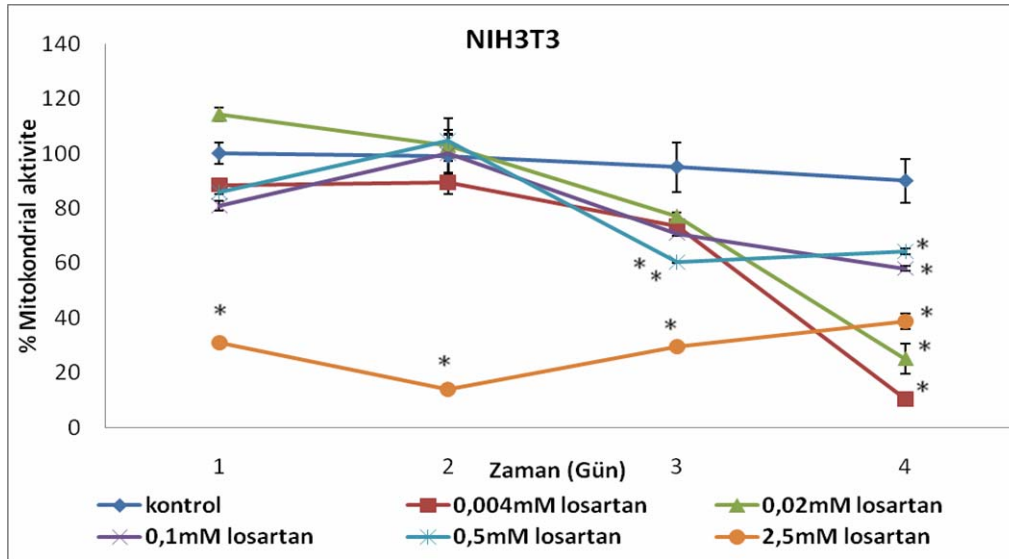
Losartan'ın C6 hücreleri üzerinde birinci, ikinci ve üçüncü günlerinde hücreleri etkilemediği, fakat dördüncü günde 0,5 ve 2,5 mM konsantrasyonları ile mitokondriyal aktivite üzerinde etkili olduğu ve etkiyi düşürdüğü gözükmektedir. (Şekil 14). Kaptoprilden farklılık gösteren bu gözlem, mitokondriyel aktivitede azalma ve antiproliferatif/sitotoksik etkiyi işaret etmektedir. Bu gözlem literatür verileri ile de uyumludur. Arrieta ve ark. (2005) C6 glioma hücrelerinde losartan ile apoptotik etki gözlemlemiş, Rivera ve ark. (2001) ise bu hücrelerde AT₁ reseptörlerinin varlığını ve AT₁ reseptör blokajının antiproliferatif etkiler ortaya çıkardığını kanıtlamışlardır.

Losartan'ın NIH3T3 hücreleri üzerinde etkisi üçüncü günde 0,5 mM konsantrasyonundan başlarken 2,5 mM konsantrasyonu ile bu düşüş birinci günden dördüncü güne de devam etmekte fakat maksimum etki ikinci günde gözükmektedir. 0,004 ve 0,02 mM konsantrasyonların dördüncü günde istatistik



Şekil 14. Losartan'ın C6 Hücrelerinde MTT Testi Üzerine Etkisi. (*) Günlere Göre Anlamli Farklılıklar. Anlamlilik Değeri $p < 0,05$, Ortalama Değer \pm St. Hata (n = 6)

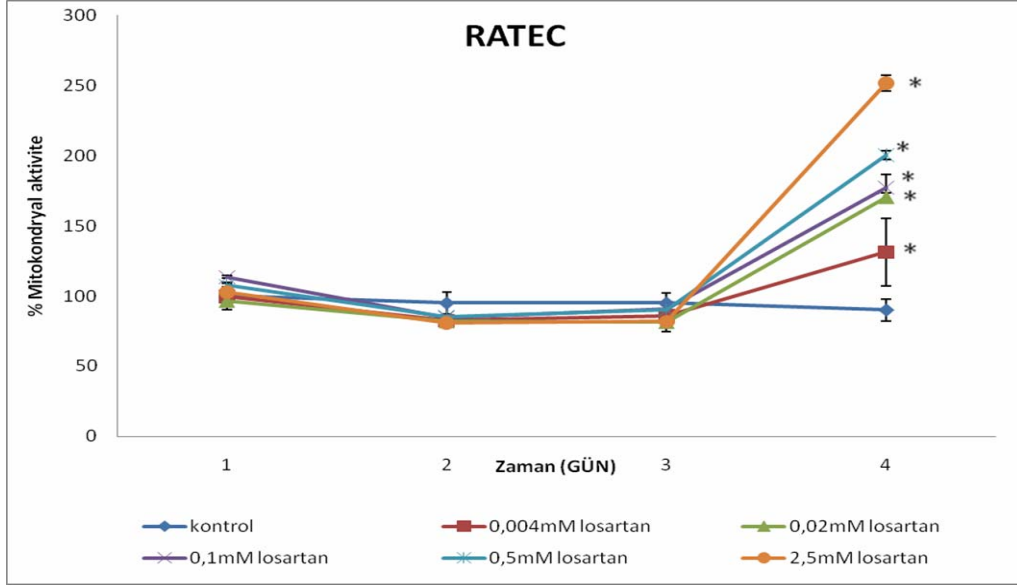
açidan anlamli yanıt oluşturduğu gözükmetedir (Şekil 15). Kaptopril sonuçlarıyla paralellik gösteren bu bulgular, büyük bir olasılıkla mitokondriyel aktivitede azalma ve antiproliferatif/sitotoksik etkiyi işaret etmektedir.



Şekil 15. Losartan'ın NIH3T3 Hücrelerinde MTT Testi Üzerine Etkisi. (*) Günlere Göre Anlamli Farklılıklar. Anlamlilik Değeri $p < 0,05$, Ortalama Değer \pm St. Hata (n = 6)

Losartan'ın RATEC hücreleri üzerinde kaptopril sonuçlarına benzer şekilde birici, ikinci ve üçüncü günlerde mitokondriyal aktivite ve hücrelerin viabilitesi üzerinde etkili olmadığı, fakat dördüncü günde 0,004 mM konsantrasyonu dışında uygulanan diğer tüm konsantrasyonlarda hücre proliferasyonu ve mitokondriyal aktivitede artırıcı yanıtları görölmektedir (Şekil 16). Kaptopril sonuçlarıyla paralellik gösteren bu bulgular, büyük bir olasılıkla mitokondriyel aktivitede

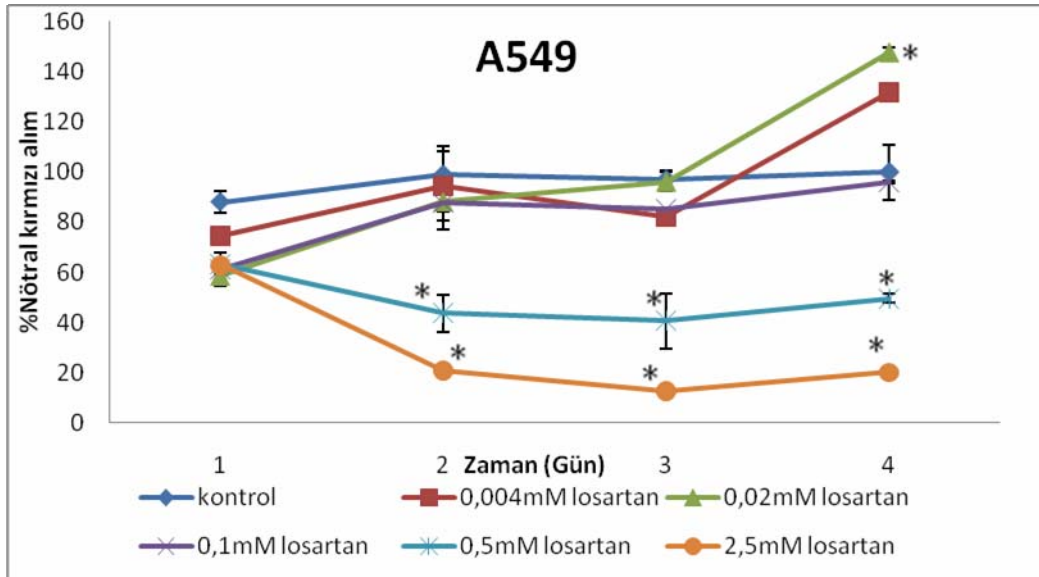
azalma ve antiproliferatif/sitotoksik etkiyi işaret etmektedir. Burada da endotel dokusu ve geniş anlamda kardiyovasküler sistemde protektif bir etkiden söz etmek olasıdır.



Şekil 16. Losartan'ın RATEC Hücrelerinde MTT Testi Üzerine Etkisi. (*) Günlere Göre Anlamli Farklılıklar. Anlamlilik Değeri $p < 0,05$, Ortalama Değer \pm St. Hata (n = 6)

Losartan'ın nötral kırmızısı alım ölçümü sonuçları

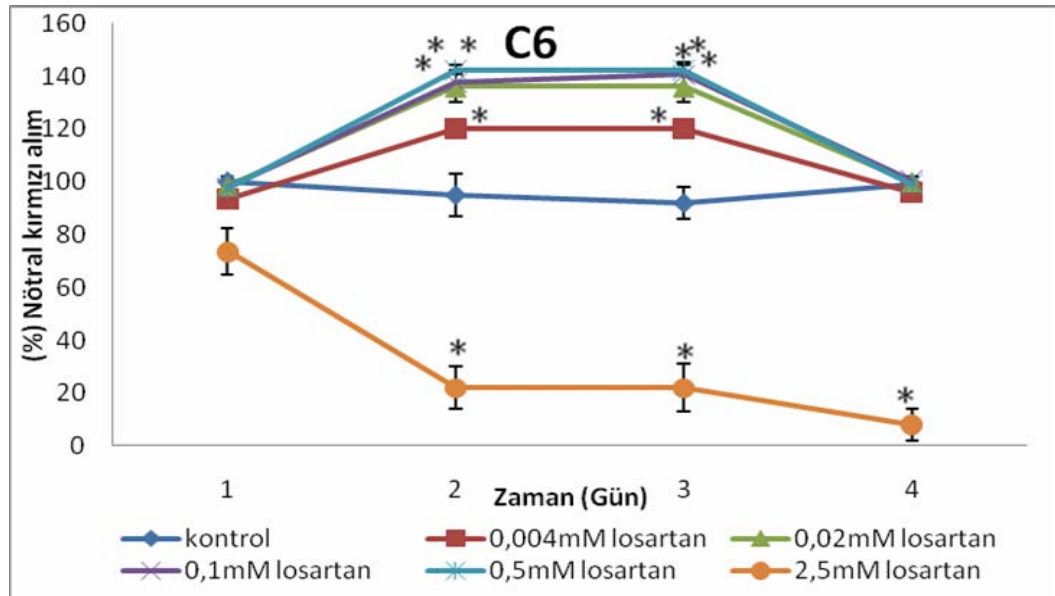
Losartan'a maruz bırakılmış A549 hücrelerinde 0,02 mM konsantrasyonu dördüncü günde hücre viabilite ve lizozomal aktivite üzerinde artırıcı etkisi gözükmemektedir. 0,5 ve 2,5 mM konsantrasyonların A549 hücrelerin viabilite ve lizozomal aktivite üzerinde azaltıcı etkileri ise ikinci günde başlamakta, üçüncü ve dördüncü günde devam etmektedir (Şekil 17). MTT sonuçlarına birlikte



Şekil 17. Losartan'ın A549 Hücrelerinde Nötral Kırmızısı Alım Yanıtı. (*) Günlere Göre Anlamli Farklılıklar. Anlamlilik Değeri $p < 0,05$, Ortalama Değerler \pm St. Hata (n=6)

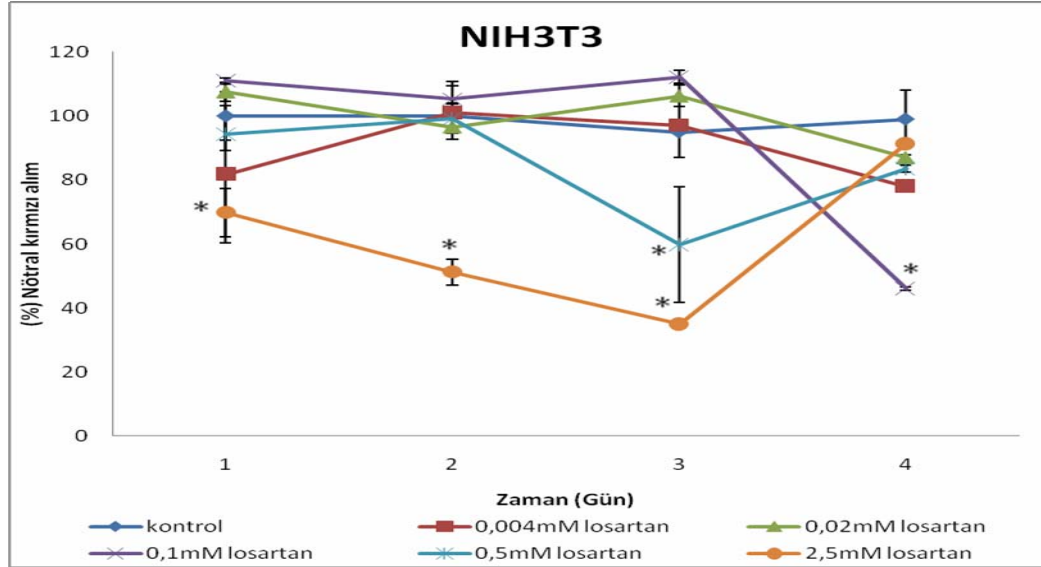
Değerlendirildiğinde bu bulgular, 0,5 ve 2,5 mM konsantrasyonlarda uygulanan losartan'ın antiproliferatif ve sitotoksik etkinliğini göstermektedir. Bu antiproliferatif etkinin apoptozdan kaynaklanması kuvvetle olasıdır. Sonuçlar bir ölçüde kaptopril ile de paralellik göstermektedir.

Losartan'ın C6 glioma hücrelerinde 0,004-0,5 mM konsantrasyonları viabilite ve lizozomal aktivite üzerinde artırıcı etkileri ikinci ve üçüncü günlerinde gözükmektedir. Losartanın 2,5 mM konsantrasyonu ise C6 hücrelerin viabilite ve lizozomal aktivite üzerinde ikinci günden itibaren anlamlı derecede azaltıcı yanıt oluşturduğu gözükmektedir (Şekil 18). Burada losartan'ın doza bağımlı olan bir bifazik etkisinden söz etmek gerekmektedir. Düşük losartan dozları bu hücre tipinde antiapoptotik etkiyi işaret ederken, yüksek doz ile apoptotik etki olduğu görülmektedir. Bu etki zıtlığında AT₁ alt reseptör tiplerinin yani AT_{1a} ve AT_{1b}'nin rol oynaması muhtemel gözükmektedir.



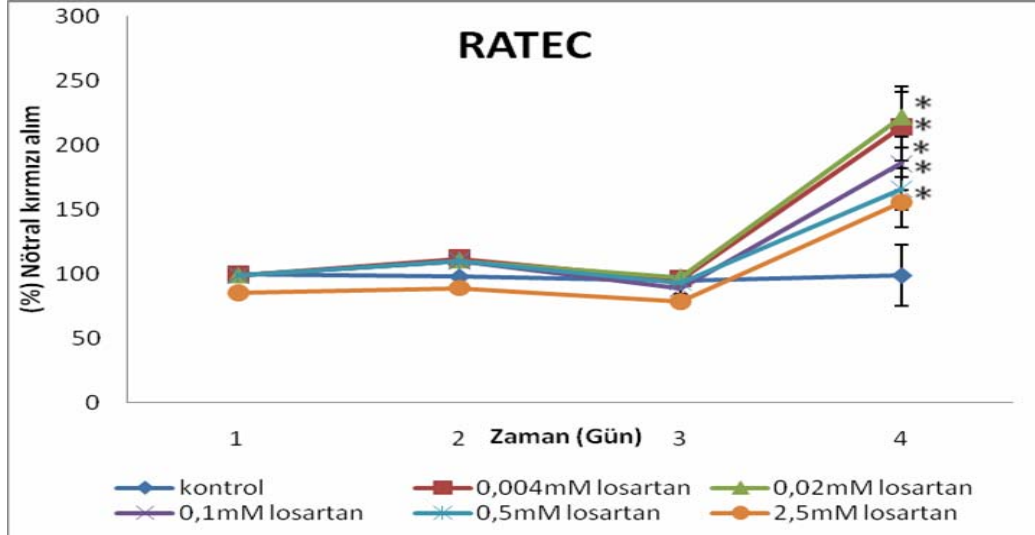
Şekil 18. Losartan'ın C6 Hücrelerinde Nötral Kırmızısı Alım Yanıtı. (*) Günlere Göre Anlamlı Farklılıklar. Anlamlılık Değeri $p < 0,05$, Ortalama Değerler \pm St. Hata (n=6)

NIH3T3 hücrelerinin losartan'ın 2,5 mM konsantrasyonuna karşı yanıtı birinci günde başlamakta, ikinci günde devam etmekte, üçüncü günden sonra hücre viabilite ve lizozomal aktivite artışa geçerek ve kontrol grubu düzeyine ulaşmaktadır. 0,5 mM konsantrasyonu ile sadece üçüncü günde hücre viabilitesini düşürdüğü ve dördüncü günde ise kontrol grubuna yaklaştığı gözükmektedir. Losartan'ın 0,1 mM konsantrasyonu ise dördüncü günde hücre viabilite ve lizozomal aktivite üzerinde etkili olmuştur (Şekil 19). Bu bulgular, losartan'ın NIH3T3 hücrelerinde lizozomal aktiviteyi azalttığı ve apoptoza yönlendirdiği görülmektedir. Ancak dördüncü gündeki etki farklılığı nedeniyle hücrelerin apoptoza girdiğini düşünmek akılcı bir yaklaşım olmayacaktır. Ancak, MTT sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde, bu etkinin antiproliferatif/sitotoksik nitelikte olduğunu düşünmek gerekmektedir.



Şekil 19. Losartan'ın NIH3T3 Hücrelerinde Nötral Kırmızı Alım Yanıtı. (*) Günlere Göre Anlamli Farklılıklar. Anlamlilik Değeri $p < 0,05$, Ortalama Değerler \pm St. Hata (n=6)

Losartan RATEC hücreleri üzerinde kaptopril ve losartanın MTT sonuçlarının grafiğine benzer bir grafik vermiştir. Buna göre losartan birinci, ikinci ve üçüncü günlerinde lizozomal aktivite ve hücrelerin viabilitesi üzerinde etkili olmadığı, fakat dördüncü günde uygulanan tüm konsantasyonların hücre proliferasyonu ve lizozomal aktivite üzerinde artırıcı yanıt oluşturduğu görölmektedir (Şekil 20).

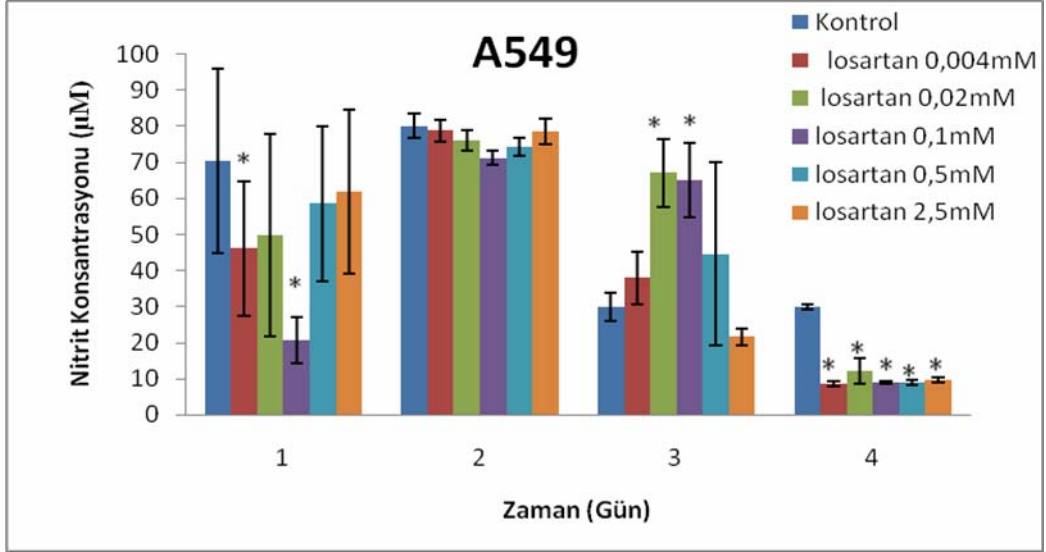


Şekil 20. Losartan'ın RATEC Hücrelerinde Nötral Kırmızı Alım Yanıtı. (*) Günlere Göre Anlamli Farklılıklar. Anlamlilik Değeri $p < 0,05$, Ortalama Değerler \pm St. Hata (n=6)

Losaran'ın nitrit oluşumu üzerine etkisinin ölçüm sonuçları

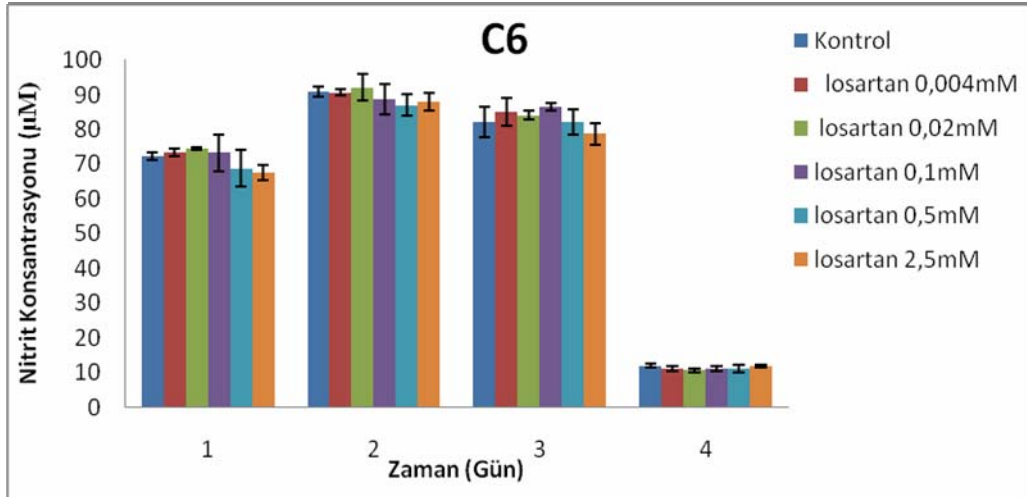
Losartan'a maruz bırakılmış A549 hücreleri birinci ve dördüncü günde nitrit düzeylerinde düşme sergilemekte, ancak üçüncü günde ara konsantrasyonlar ile

nitrit düzeylerinde artma görülmektedir (Şekil 21). Bulgular yine bir çeşit bifazik etkiyi işaret etmektedir: Yüksek dozlar ve uzun süre inkübasyon nitrik oksit yapımını azaltırken, düşük dozlar nitrik oksit yapımını arttırabilmektedir.



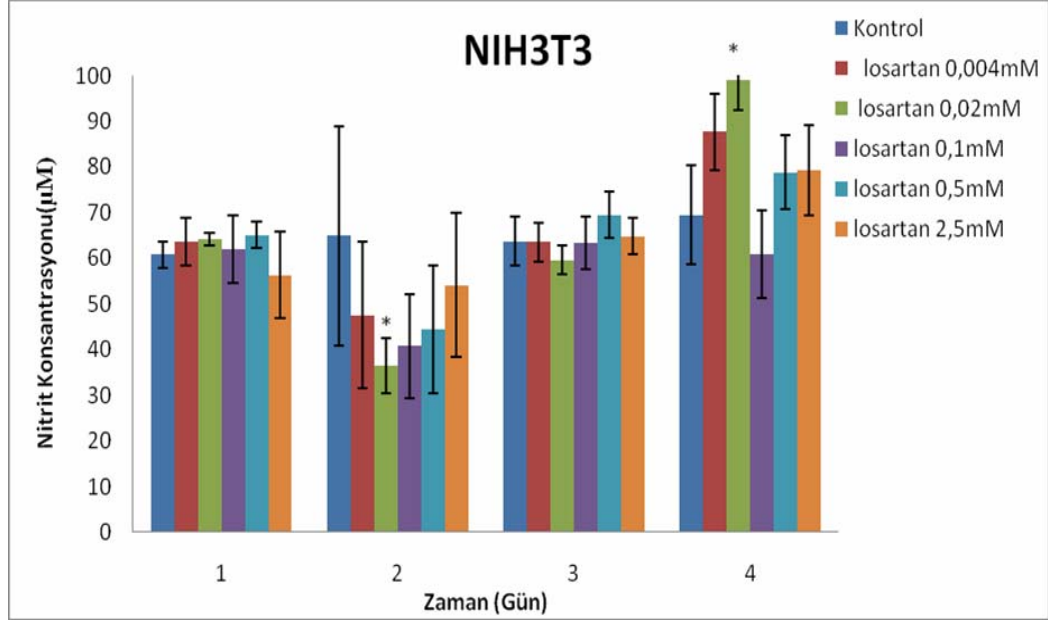
Şekil 21. Losartan'ın A549 Hücrelerinde Nitrit Konsantrasyonu Üzerine Etkisi. (*) Günlere Göre Anlamli Farklılıklar. Anlamlilik Değeri $p < 0,05$, Ortalama Değerler \pm St. Hata (n=6)

Üzerine losartan uygulanan C6 glioma hücrelerinde nitrit ölçümü sonuçları kontrollere göre istatistiksel anlamli farklılık göstermemektedir, yani losartan bu hücrelerde NO yapımını değıştirmemektedir (Şekil 22).



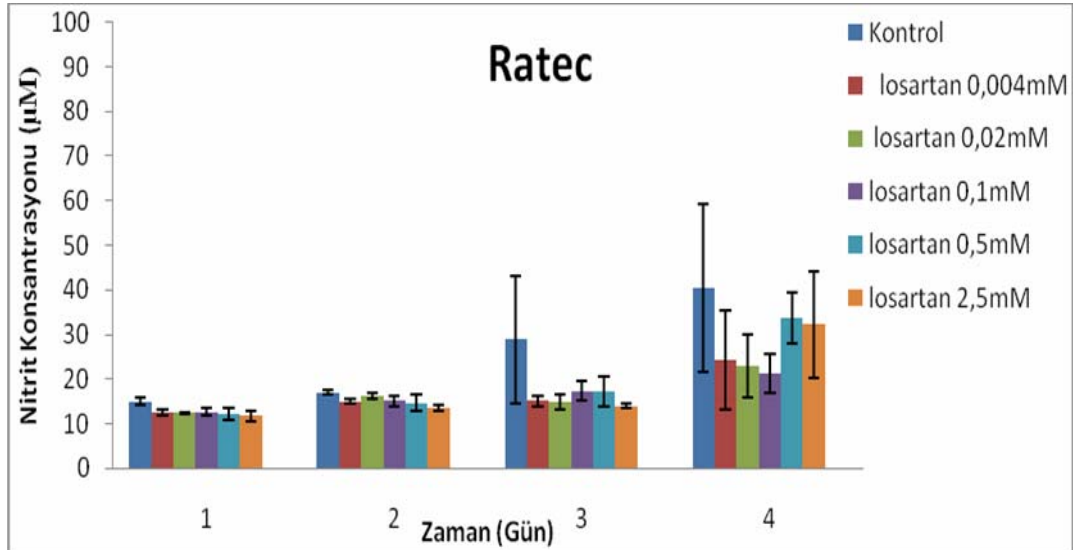
Şekil 22. Losartan'ın C6 Hücrelerinde Nitrit Konsantrasyonu Üzerine Etkisi. (*) Günlere Göre Anlamli Farklılıklar. Anlamlilik Değeri $p < 0,05$, Ortalama Değerler \pm St. Hata (n=6)

0,02 mM Losartan'a maruz bırakılmış NIH3T3 hücreleri ikinci günde nitrit ölçümünde, yani NO üretiminde azalma ve dördüncü günde nitrit ölçümünde, yani NO üretiminde artma göstermektedir (Şekil 23). Burada da bifazik etkiden söz etmek gerekmektedir ve bu kaptopril'in NIH3T3 hücreleri üzerindeki etkilerine benzemektedir.



Şekil 23. Losartan'ın NIH3T3 Hücrelerinde Nitrit Konsantrasyonu Üzerine Etkisi. (*) Günlere Göre Anlamlı Farklılıklar. Anlamlılık Değeri $p < 0,05$, Ortalama Değerler \pm St. Hata (n=6)

Üzerine losartan RATEC hücrelerinde nitrit ölçümü sonuçları kontrollere göre istatistiksel anlamlı farklılık göstermemektedir, yani losartan bu hücrelerde NO yapımını değiştirmemektedir (Şekil 24).



Şekil 24. Losartan'ın RATEC Hücrelerinde Nitrit Konsantrasyonu Üzerine Etkisi. (*) Günlere Göre Anlamlı Farklılıklar. Anlamlılık Değeri $p < 0,05$, Ortalama Değerler \pm St. Hata (n=6)

SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar, kaptopril ve losartan'ın daha önceden yapılmış olan araştırmalarda olduğu gibi hem iyicil hem de kötücül olan hücrelerde apoptoz ve proliferasyon üzerine etkilerinin olduğunu göstermektedir. Ancak, etkilerin tipi ilaçların uygulandığı hücre tipi, uygulanan konsantrasyon ve uygulama süresine bağlı olarak değişim göstermektedir. Bu değişimin en temel nedeni uygulama yapılan hücrelerin anjiyotensin reseptör yoğunlukları ve farklı reseptör alt tipleri olabilir.

Genel olarak antiproliferatif etki ağırlıklı profil sergileyen bu ilaçların başka araştırmacılar tarafında da önerildiği gibi kanser tedavisine bir adjuvan olarak katılması gelecekte sözkonusu olabilecektir. Ancak, bu yapılmadan önce çeşitli hücre tipleri üzerinde geniş bir tarama yapılmalı ve en etkili olacağı kanser hücresi tipleri belirlenmelidir. Belirlenmesi gereken diğer bir özellik de ilaçların dozunun ne olacağıdır. *In vitro* çalışmalar çoğu kez *in vivo* kullanım dozu hakkında sağlıklı bilgi vermemektedir. Dolayısıyla *in vivo* kanser modelleri ile de kombinasyon çalışmaları yapılmalıdır. Bu tez çalışmasında kullanılan konsantrasyonlar kardiyovasküler etkiler için gerekenlerden daha yüksektir. Bu dozların *in vivo* çalışmalarda güvenliği ve yarar/zarar oranı araştırılmalıdır. Ancak, bu noktada belirtilmesi gereken bir nokta bulunmaktadır. Bu çalışmada, ilaçların tek başına etkilerinin belirgin biçimde görülmesi için yüksek konsantrasyonlar (dozlar) seçilmiştir. Bu konsantrasyonlar antiproliferatif, sitotoksik ve apoptotik etkiler için literatürde belirtilenler ile benzerdir. Doğal olarak antineoplastik bir ilaç ile kombinasyon durumuna gelindiğinde dozların azaltılması gerekecektir.

Tiyol grubu taşıyan kaptopril gibi ADE inhibitörlerinin antioksidan etkinliğinin ve bu etkinliğin kanser kemoprofilaksisi açısından öneminin araştırılması gerekmektedir. Bu tür bir çalışma için molekülünde tiyol taşımayan ADE inhibitörleri ile karşılaştırma yapmak yarar sağlayacaktır. Bu arada, bir başka önemli nokta da diğer ADE inhibitörleri ve AT1 blokerleri ile araştırma yapılmasıdır, çünkü literatürde kanser ile ilişkisi en çok araştırılan ilaçlar kaptopril ve losartandır. Diğer ilaçlarda antiproliferatif, sitotoksik ve apoptotik etkiler farklı düzeylerde olabilecektir. Bunun araştırılması da pratik açıdan önemli yararlar sağlayacaktır.

Yan etki insidansı oldukça düşük ve terapötik penceresi yüksek ilaçlar olan kaptopril ve losartan'ın kanser tedavisine gelecekte adjuvan olarak katılması halinde sağlıklı hücrelerin de proliferasyon ve NO üretimi açısından etkileneceği bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlardan anlaşılmaktadır. Örneğin, yara iyileşiminin etkilenmesi muhtemel gözükmektedir. Her ne kadar, paradoksal olarak yara iyileşiminin etkilenmediğini rapor eden çalışmalar (Qui ve ark., 2000) bulunmaktaysa da, yara iyileşimi sürecinin tüm basamaklarının değerlendirildiği ayrıntılı bir çalışma gerekmektedir, çünkü bu ilaçlar yara iyileşiminde önemli rol oynayan fibroblastların proliferasyonunu etkilemektedir.

Öte yandan fibroblastların etkilenmesinin de önemli pratik yararları sözkonusudur. Örneğin, karaciğerde fibröz doku oluşumu ile gelişen siroz hastalığının önlenmesi ve tedavisi açısından bu ilaçların yararları olabilecektir. Bu hipotezi bazı araştırmacıların farklı modeller kullanarak test ettiği ve çelişkili

sonuçlar alındığı grlmektedir. Wei ve ark. (2004) losartan tedavisinin karbontetraklorür ile oluşan hepatik fibrozisi engellediğini gösterirken, Ibanez ve ark. (2007) kolin-eksik diyetle sıçanlarda oluşan nonalkolik steatohepatit modelinde bu ilacın etkisiz olduğunu rapor etmiştir. Bu noktada da, karaciğerdeki fibrozis ve sonucunda oluşan sirozun farklı modellerle ve ayrıntılı olarak incelenmesi gereği ortaya çıkmaktadır.

Losartan ve/veya kaptopril tedavisi ile sağlıklı hücrelerin etkilenmesi ile ortaya çıkabilecek diğer bir yarar endotel tabakasının bütünlüğünün korunması ve kardiyovasküler protektif etkidir. Bu etki, hem olası metastazların oluşmasını engellemek hem de hasta yaşam kalitesinin devamı açısından önem taşıyacaktır. Kanseri tedavisi gören bir kişinin aynı zamanda hipertansiyon veya bir kardiyovasküler hastalık ile uğraşmak zorunda kalması olasılığı bu tür tedavi ile azalacaktır. Tezde elde edilen bulgular, endotelial protektif etkiyi işaret etmektedir. Diğer araştırıcıların da rapor ettiği bu olumlu etkiler, kanser tedavisinin artıları arasına katılabilecektir.

Bu çalışmanın en önemli eksiklerinden birisi standart antiproliferatif (antineoplastik) ilaçlar ile kombinasyon uygulanmamış olmasıdır. Ancak bu tür bir çalışmada tek bir ilaç ile kombinasyonun fikir vermeyeceği ve kliniğe yansıtılabilecek sonuçlar açısından yeterli olamayacağı aşıkardır, nkn bilindiği gibi antineoplastik ilaçlar çok çeşitli mekanizmaları kullanarak etki göstermektedir. Dolayısıyla, her bir mekanizmanın temsilcisi olan ilaçlar kullanılması ile yapılacak kombinasyon çalışmaları gereklidir. Ancak, bu çok uzun bir çalışma süresini gerektirecektir.

Bu çalışmada eksik bırakılan noktalardan birisi de nitrik oksit ile bu ilaçların proliferasyon bağlamındaki mekanistik ilişkileridir. Bunun için daha detaylı bir çalışma planı ile kapsamlı bir çalışmaya gereksinim vardır: Çeşitli nitrik oksit donör ve indükleyicileri ile NO üretiminin provokasyonu, çeşitli NOS inhibitörleri, vs. Ayrıca, bu tür bir çalışma planında, başlangıçta daha fazla hücre ekerek araştırmanın yürütülmesinde önemli yararlar grlmektedir.

Bu tez çalışması ile elde edilen bulguların farklı yöntemlerle irdelenmesi zorunludur. Örneğin, matrigel, rozet formasyonu ve koloni formasyonu gibi teknikler ile bu ilaçların kanserin anjiyojenez/metastaz özellikleri, malignite kapasitesi ve DNA yapısı özellikleri üzerine etkileri gibi hususların araştırılması son söz olarak önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Abalı, H., Güllü, İ.H., Engin, H., Haznedaroğlu, İ.C., Erman, M., Tekuzman, G., Old antihypertensives as novel antineoplastics: angiotensin-I-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists, *Med. Hypoth.*, 59 (3), 344-348 (2002).

Abdallah, Q.M.A., A549, Hela ve NIH3T3 Hücre Kültürlerinde Paklitaksel ve Sodyum Nitroprussid'in Tek Başlarına ve Kombine Etkileri: Nitrikoksid'in Antiproliferatif Etkideki Rolü, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (2003).

Al-almi O., Sammons, J., Martin, J.H., Hassan, H.T., Divergent effect of taxol on proliferation, apoptosis and nitric oxide production in MHH225 CD34 positive and U937 CD34 negative human leukaemia cells, *Leuk. Res.*, 22, 939-945 (1998).

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., *Essential Cell Biology*, Garland Publishing Inc., New York, 449, 121-129, 1998.

Amaral A.L., Roman R.J., Gren A, Renin gene transfer restores angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in Dahl rats, *Hypertension.*, 37 (2), 386-390 (2001).

Andersson, P., Goldfarb, M.P., Weinberg, R.A., A defined subgenomic fragment of *in vitro* synthesized Moloney sarcoma virus DNA can induce cell transformation upon transfection, *Cell.*, 16 (1), 63-75 (1979).

Andreoli, C., Gigante, D., Nuziata, A., A review of *in vitro* methods to assess the biological activity of tobacco smoke with the aim reducing the toxicity of smoke, *Toxicol. in Vitro.*, 17, 587-594 (2003).

Araujo, M., Welch, W.J., Oxidative stress and nitric oxide in kidney function, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 15, 72-77 (2006).

Archer, S., Measurement of nitric oxide in biological models, *FASEB J.*, 7, 349-360 (1993).

Arrieta, O., Guevara, P., Escobar, E., García-Navarrete, R., Pineda, B., Sotelo, J., Blockage of angiotensin II type 1 receptor decreases the synthesis of growth factors and induces apoptosis in C6 cultured cells and C6 rat glioma, *Br. J. Cancer.*, 92, 1247-1252 (2005).

Bader, M., Peters, J., Baltatu, O., Müller, D.N., Luft, F.C., Ganten, D., Tissue renin-angiotensin systems: New insights from experimental animal models in hypertension research, *J. Mol. Med.*, 79, 76-102 (2001).

Barile, F.A., *Introduction to in vitro cytotoxicology mechanisms and methods*, CRC Pres., Boca Raton, Florida, USA, 53-55, 1994.

Basso, N., Terragno, N.A., History about the discovery of the renin-angiotensin system, *Hypertension.*, 38, 1246-1249 (2001).

Batra, V.K., Gopalakrishnan, V., McNeill, J.R., Hickie, R.A., Angiotensin II elevates cytosolic free calcium in human lung adenocarcinoma via activation of AT₁ receptors, *Cancer Lett.*, 76, 19-24 (1994).

- Bauer, H.A., Lametschwandtner, A., Steiner, M., Bauer, H.C., Influence of angiotensin converting enzyme inhibitor (captopril) on kidney epithelial cells in vitro: Studies on potassium (^{86}Rb) influx and cellular proliferation, *Clin. Chim. Acta.*, 187, 47-54 (1990).
- Baybutt, R.C., Herndon, B.L., Umbehrr, J., Mein, J., Xue, Y., Reppert, S., Van Dillen, C., Kamal, R., Halder, A., Molteni, A., Effects on cytokines and histology by treatment with the ACE inhibitor captopril and the antioxidant retinoic acid in the monocrotaline model of experimentally induced lung fibrosis, *Curr. Pharm. Des.*, 13 (13), 1327-1333 (2007).
- Bolser, D., Experimental models and mechanisms of enhanced coughing, *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 17(6), 383-388 (2004).
- Bronte, V., Zanovello, P., Regulation of immune responses by L-arginine metabolism, *Nat. Rev. Immunol.*, 5, 641-654 (2005).
- Bulychev, A., Trouet, A., Tulkens, P., Uptake and intracellular distribution of neutral red in cultured fibroblasts, *Cell Res.*, 115, 343-355 (1978).
- Burnier, M., Brunner, H.R., Angiotensin II receptor antagonists, *Lancet.*, 355, 637-645 (2000).
- Carey, R.M., Update on the role of the AT_2 receptor, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 14(1), 67-71 (2005).
- Carmichael, J., Degraff, W., Gazdar, Minna, J.D., Mitchell, J.B., Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, *Cancer Res.*, 47, 936-942 (1987).
- Chang, K., Pastan, I., Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas and over cancers, *Cell Biol.*, 93, 136-140 (1996).
- Chen, L., Re, R.N., Prakash, O., Mondal, D., Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces neuroblastoma cell growth rate. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 196, 280-283 (1991).
- Cheung, P.Y., Salas, E., Schulz, R., Radomski, M.W., Nitric oxide and platelet function: Implications for neonatology, *Semin. Perinatol.*, 21, 409-417 (1997).
- Daeman, M.J.A.P., Lombardi, D.M., Bosman, F.T., Schwartz, S.M., Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall, *Circ. Res.*, 68 (2), 450-456 (1991).
- de Groot-Besseling, R.R., Ruers, T.J., van Kraats, A.A., Poelen, G.J., Ruiten, D.J., de Waal, R.M., Westphal, J.R., Anti-tumor activity of a combination of plasminogen activator and captopril in a human melanoma xenograft model, *Int. J. Cancer.*, 112 (2), 329-334 (2004).
- Dejam, A., Hunter, C., Schechter, A.N., Gladwin, MT., Emerging role of nitrite in human biology, *Blood Cells Mol Dis.*, 32 (3), 423-429 (2004).
- Deniot, F., Lang, R., Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J. Immunol. Meth.*, 89, 271-277 (1986).

- Deshayes, F., Nahmias, C., Angiotensin receptors: A new role in cancer? *Trends Endocrinol. Metab.*, 16 (7), 293-299 (2005).
- Dinh, D.T., Frauman, A.G., Sourial, M., Casley, D.J., Johnston, C.I., Fabiani, M.E., Identification, distribution, and expression of angiotensin II receptors in the normal human prostate and benign prostatic hyperplasia, *Endocrinol.*, 142(3), 1349–1356 (2001).
- Ebrahimian, T.G., Tamarat, R., Clergue, M., Duriez, M., Levy, B.I., Silvestre, J.S., Dual effect of Angiotensin converting enzyme inhibition on angiogenesis in type I diabetic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 25(1), 65-70 (2005).
- Elbaz, N., Bedecs, K., Masson, M., Sutren, M., Strosberg, A.D., Nahmias, C., Functional trans-inactivation of insulin receptor kinase by growth-inhibitory angiotensin II AT₂ receptor, *Mol. Endocrinol.*, 14 (6), 795–804 (2000).
- Ercan, Z.S., Ilhan, M., Türker, R.K., Alterations by captopril of pain reactions due to thermal stimulation of the mouse foot: interactions with morphine, naloxone and aprotinin, *Eur. J. Pharmacol.*, 63(2-3), 167-177 (1980).
- Evdokiou, A., Cowled, P.A., Tumor-suppressive activity of the growth arrest-specific gene GASI in human tumor cell lines, *Int. J. Cancer.*, 75, 568-77 (1998).
- Ferrara, N., and Davis-Smyth, T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.*, 18, 4–25 (1997).
- Fogarty, D. J., Sánchez-Gómez, M.V., Matute, C., Multiple angiotensin receptor subtypes in normal and tumor astrocytes in vitro, *Glia.*, 39 (3), 304–313 (2002).
- Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.*, 1(1), 27–31 (1995).
- Fotakis, G., Timbrell, J.A., *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicol. Lett.*, 160, 171-177 (2006).
- Fujimoto, Y., Sasaki T., Tsuchida, A., Chayama, K., Angiotensin II type 1 receptor expression in human pancreatic cancer and growth inhibition by angiotensin II type 1 receptor antagonist, *FEBS Lett.*, 495, 197–200 (2001).
- Fujiyama, S., Matsubara H., Nozawa Y., Maruyama, K., Mori, Y., Tsutsumi, Y., Masaki, H., Uchiyama, Y., Koyama, Y., Nose, A., Iba, O., Tateishi, E., Ogata, N., Jyo, N., Higashiyama, S., Iwasaka, T., Angiotensin AT₁ and AT₂ receptors differentially regulate angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis by modulating heparin binding–epidermal growth factor (EGF)–mediated EGF receptor transactivation. *Circ. Res.*, 88 (1), 22-29 (2001).
- Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.*, 288(5789), 373-376 (1980).
- Gallagher, P., Tallant, E., Inhibition of human lung cancer cell growth by angiotensin-(1–7), *Carcinogenesis.*, 25, 2045–2052 (2004).

Gately, S., Twardowski, P., Sharon Stack, M., Deborah, L. Cundiff., Grella, D., Francis, J. C., Enghild, J., Kwaan, H.C., Lee, F., Kramer, R.A., Volpert, O., Bouck, N., Soff, G.A., The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 (20), 10868-10872 (1997).

Gohlke, P., Schölkens, B.A., ACE Inhibitors: Pharmacology, In: *Angiotensin, Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 163/1, K. Starke (Ed.), Springer, Berlin-Heidelberg, 376-400 (2002).

Grobben, B., DeDeyn, P.P., Slegers, H., Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion, *Cell Tissue Res.*, 310, 257-270 (2002).

Gross, S.S., Wolin, M.S., Nitric Oxide: Pathophysiological mechanisms, *Annu. Rev. Physiol.*, 57, 737-769 (1995).

Guarino, M.J., Schneider, C.J., Grubbs, S.S., Biggs, D.D., Himmelstein, A.L., Hogaboom, K., Tilak, S., A dose-escalation study of weekly topotecan, cisplatin, and gemcitabine front-line therapy in patients with inoperable non-small cell lung cancer, *Oncologist.*, 7, 509-515 (2002).

Guerra, F.K., Ciuuffo G.M., Elizalde P.V., Charreau E.H., Saavedra, J.M., Enhanced expression of angiotensin II receptor subtypes and angiotensin converting enzyme in medroxyprogesteron-induced mouse mammary adenocarcinomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 193 (1), 93–99 (1993).

Hall, J.E., Historical perspective of renin-angiotensin system. In: *Angiotensin Protocols, Methods in Molecular Medicine*, Vol.51, D.H. Wang (Ed.), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 3-22, (2000).

Hamdi, K.K., Castellon, R., ACE inhibition actively promotes cell survival by altering gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310(4), 1227-1235 (2004).

Higgins, R.D., Yan, Y., Geng, Y., Shama, J., Barr, S.M., Captopril and vascular endothelial growth factor in a mouse model of retinopathy, *Curr. Eye Res.*, 27 (2), 123-129 (2003).

Hii, S-I., Nicol, D.L., Gotley, D.C., Thompson, L.C., Green, M.K., Jonsson, J.R., Captopril inhibits tumour growth in a xenograft model of human renal cell carcinoma, *Br. J. Cancer.*, 77, 880-883 (1998).

Holst-Hansen, C., Brünner, N., MTT cell proliferation assay. In: *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, Vol. 1, J.E. Celis (Ed.), Academic Press, London, 16-18 (1998).

Horakova, K., Sovcikova, A., Seemannova, Z., Syrova, D., Busanyova, K., Drobna, Z., Ferencik, M., Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants, *Free Radic. Biol. Med.*, 30: 650-664 (2001).

http-1, American Type of Cell Culture (ATCC): <http://www.atcc.org> (Erişim tarihi: 25/08/2007).

http-2, IUPHAR Receptor Database. <http://www.iuphar.org/nciuphar.html> (Erişim tarihi: 25/08/2007).

Huang, W., Yu, L-F., Zhong, J., Qiao, M-M., Xiang Jiang, F., Du, F., Tian, X-L., Wu, Y-L., Angiotensin II type 1 receptor expression in human gastric cancer and induces MMP2 and MMP9 expression in MKN28 Cells, *Dig. Dis. Sci.*, (2007; Baskıda), doi: 10.1007/s10620-007-9838-9

Igic, R., Behnia, R., Properties and distribution of angiotensin converting enzyme. *Curr. Pharm. Des.*, 9 (9), 697-706 (2003).

Ignarro, L.J., Cirino, G., Casini, A., Napoli, C., Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: An overview, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 34, 879-886 (1999).

Ino, K., Shibata, K., Kajiyama, H., Yamamoto, E., Nagasaka, T., Nawa, A., Nomura, S., Kikkawa, F., Regulatory role of membrane-bound peptidases in the progression of gynecologic malignancies, *Biol. Chem.*, 385 (8), 683–690 (2004).

Jainchill, J.L., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells, *J. Virol.*, 4 (5), 549-553 (1969).

Kayaalp, S.O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Onuncu baskı, Hacettepe-Taş Kitabevi, Ankara, 447,451-540,1427-1432, 2002.

Kikkawa, F., Mizuno, M., Shibata, K., Kajiyama, H., Morita, T., Ino, K., Nomura, S., Mizutani, S, Activation of invasiveness of cervical carcinoma cells by angiotensin II, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 190, 1258–1263 (2004).

Komissarova, E., Saha, S.K., Rossman, T.G., Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 202, 99-107 (2005).

Koparal, A. T., Yamaguchi, H., Kaoru, O., Kitagawa, S.Y., Differential effects of green tea catechins on three endothelial cell clones isolated from rat adipose tissue and human umbilical vein endothelial cells, *Cytotechnology.*, 46, 25-36 (2004).

Korkmaz, S., Koşar, M., Başer, K.H.C., Öztürk, Y., Effects of berberine on C6 glioma and NIH3T3 fibroblast cell lines, *Phytomedicine*, 7 (Suppl.2): 123, (2000).

Korkmaz, S., Öztürk Y., Evaluation of cytotoxic effects of quercetin on A549, HeLa, HT-29, MCF-7 and NIH3T3 cell cultures: A comparative study with paclitaxel, *Fund. Clin. Pharmacol.*, 18(Suppl.1), 119 (2004a).

Korkmaz, S., Öztürk Y., Antiproliferative and antitumor effects of aspirin on A549 non-small lung cancer cells, *Anticancer Res.*, 24, 3539-3540 (2004b).

Korkmaz, S., Öztürk, Y., Anticarcinogenic Effects of Carvacrol and Thymol on C6 Glioblastoma multiforme Cell Line, *Acta Pharmacol. Sinica.*, 27(Suppl.), 68 (2006).

Kowalski, J., Belowski, D., Wielgus, J., Gabryel, B., Klin, M., Herman, Z.S., Effect of captopril and thiorphan on the proliferation of human neoplastic cell lines and their influence on cytostatic activity of interferon alpha or cytotoxic activity of doxorubicin. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 43(1), 47-50 (1995).

- Kowalski, J., Herman, Z.S., Captopril augments antitumor activity of cyclophosphamide in mice, *Pol. J. Pharmacol.*, 48, 281-285 (1996).
- Kueng, W., Silber, E., Eppenberger, U., Quantification of cells cultured on 96-well plates, *Anal. Biochem.*, 182, 16-19 (1989).
- Kılınc, K., Kılınc, A., Nitrik Oksit Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri, Palme Yayıncılık, Ankara, 111-127, 2003.
- Lever, A. F., Hole, D., Gillis, C. R., McCallum, I. R., McInnes, G.T., MacKinnon, P. L., Meredith, P.A., Murray, L.S., Reid, J.L., Robertson James, W. K., Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet.*, 352, 179–184 (1998).
- Li, M., Liu, K., Michalicek, J., Angus, J.A., Hunt, J.E., Dell'Italia, L.J., Feneley, M.P., Graham, R.M., Husain, A., Involvement of chymase-mediated angiotensin II generation in blood pressure regulation, *J. Clin. Invest.*, 114, 112–120 (2004).
- Li, J., Zhao, X., Li, X., Lerea, K.M., Olson, S.C., Angiotensin II type 2 receptor-dependent increases in nitric oxide synthase expression in the pulmonary endothelium is mediated via a G alpha i3/Ras/Raf/MAPK pathway, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 292 (6), C2185-C2196 (2007).
- Liu, Y.H., You, Y., Song, T., Wu, S.J., Liu, L.Y., Impairment of endothelium-dependent relaxation of rat aortas by homocysteine thiolactone and attenuation by captopril. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 50(2), 155-161 (2007).
- Lindberg, H., Nielsen, D., Jensen, B.V., Eriksen, J., Skovsgaard, T., Angiotensin converting enzyme inhibitors for cancer treatment? *Acta Oncologica.*, 43 (2), 142-152 (2004).
- Machado, R.D.P., Santos, R.A.S., Andrade, S.P., Opposing actions of angiotensins on angiogenesis, *Life Sci.*, 66 (1), 67–76. (2000).
- Marsigliante, S., Resta, L., Muscella, A., Vinson, G.P., Marzulla, A., Storelli, C., AT₁ angiotensin II receptor subtype in the human larynx squamous laryngeal carcinoma, *Cancer Lett.*, 110 (1), 19–27 (1996).
- Mascareno, E., Siddiqui, M.A., The role of Jak/STAT signaling in heart tissue renin-angiotensin system, *Mol. Cell Biochem.*, 212(1-2), 171-175 (2000).
- Mazzotta, A., Manca, C., Marsigliante, S., Angiotensin II activates extracellular signal regulated kinases via protein kinase C and epidermal growth factor receptor in breast cancer cells, *J. Cell. Physiol.*, 196, 370–377(2003).
- Merchan, J.R., Chan, B., Kale, S., Schnipper, L. E., Sukhatme, V.P., *In vitro* and *in vivo* induction of antiangiogenic activity by plasminogen activator and captopril, *J. Natl. Cancer Inst.*, 95 (5), 388-399 (2003).
- Molteni, A., Ward, W.F., Chang, H., Ts'ao, C., Tylor, J., Small, W.Jr., Moltini, L.B., Veno, P.A., Cytostatic properties of some angiotensin I converting enzyme inhibitors and of angiotensin II type I receptor antagonists, *Curr. Pharm. Des.*, 9(9), 751-761 (2003).
- Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A., Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharmacol. Rev.*, 43, 109-142 (1991).

- Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Meth.*, 65, 55-63 (1983).
- Moulder, J.E., Fish, B. L., Cohen, E.P., ACE inhibitors and Angiotensin-II receptor antagonists in the treatment and prevention of bone marrow transplant nephropathy, *Curr. Pharm. Dis.*, 9 (9), 737-749 (2003).
- Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K., Rodwell, V.W. Kanser, Onkojenler ve Büyüme Faktörleri., Harper'in Biyokimyası., (Çeviri). Barış kitapevi, İstanbul, 818-836, 1993.
- Muscella, A., Greco, S., Elia, M. G., Storelli, C., Marsigliante, S., Angiotensin II stimulation of Na⁺/K⁺ATPase activity and cell growth by calcium-independent pathway in MCF-7 breast cancer cells, *J. Endocrinol.*, 173, 315–323 (2002).
- Nagano, T., Practical methods for detection of nitric oxide, *Luminescence.*, 14, 283-290 (1999).
- Nakagawa, T., Kubota, T., Kabuto, M., Kodera, T., Captopril inhibits glioma cell invasion *in vitro*: involvement of matrix metalloproteinases, *Anticancer Res.*, 15, 1985-1989 (1995).
- Nathan, C., Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells, *FASEB J.*, 6, 3051-3064 (1992).
- Nguyen, L., Ward, W.F., Ts'ao, C., Molteni, A., Captopril inhibits proliferation of human lung fibroblasts in culture: A potential antifibrotic mechanism. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 205, 80-84 (1994).
- Noguchi, R., Yoshiji, H., Kuriyama, S., Yoshii, J., Ikenaka, Y., Yanase, K., Namisaki, T., Kitade, M., Yamazaki, M., Mitoro, A., Tsujinoue, H., Imazu, H., Masaki, T., Fukui, Hiroshi., Combination of interferon-beta and the angiotensin-converting enzyme inhibitor, perindopril, attenuates murine hepatocellular carcinoma development and angiogenesis, *Clin. Cancer Res.*, 9, 6038–6045 (2003).
- Nouet, S., Nahmias, C., Signal transduction from the angiotensin II AT₂ receptor, *Trends Endocrinol. Metab.*, 11, 1-6 (2000).
- Offermanns, S., Rosenthal, W., *Encyclopedic Reference of Molecular Pharmacology*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2003.
- Otani, A., Tagaki, H., Oh, H., Koyama, S., Honda, Y. , Angiotensin II induces expression of the tie2 receptor ligand, angiopoietin-2 in bovine retinal endothelial cells, *Diabetes.*, 50, 867–875 (2001).
- Otani A., Tagaki H., Suzuma K., Hondai. Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced angiogenic activity in retinal micro capillary endothelial cells, *Circ. Res.*, 82: 612-28 (1998).
- Öztürk, N., Korkmaz, S., Zeytinoğlu, H., Zeytinoğlu, M., Öztürk, Y., Başer, K.H.C., Effects of gentiopicoside, swertiamarine and swertiamarine and sweroside from *Gentiana lutea* subsp. *symphyandra* roots on cultured 3T3 fibroblasts: Implications for wound healing. (Poster presentation in 5th

International Symposium on Pharmaceutical Sciences) Abstract Book, Ankara, June 24-27, P74, (1997).

Persson, P.B., Skalweit, A., Mrowka, R., Thiele, B.J., Control of renin synthesis, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 285 (3), 491-497 (2003).

Piepho, R.W., Overview of the angiotensin converting-enzyme inhibitors, *Am. J. Health Syst. Pharm.*, 57(Suppl. 1) S3-S7 (2000).

Pinaud, F., Bocquet, A., Dumont, O., Retailleau, K., Baufreton, C., Andriantsitohaina, R., Loufrani, L., Henrion, D., Paradoxical role of angiotensin II type 2 receptors in resistance arteries of old rats, *Hypertension.*, 50(1), 33-34 (2007).

Piotr, J.W., Kwiatkowska, E.P., Kazimierzak, U., Suchorska, W., Kowalczyk, D.W., Mackiewicz, A., Captopril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, promotes growth of immunogenic tumors in mice, *Clin. Cancer Res.*, 12, 4095-4102 (2006).

Piu, F., Magnani, M., Ader, M.E., Dissection of the cytoplasmic domains of cytokine receptors involved in STAT and Ras dependent proliferation, *Oncogene.*, 21 (22), 3579-3591 (2002).

Popiolkiewicz, J., Polkowski, K., Skierski, J.S., Mazurek, A., *In vitro* toxicity evaluation in the development of new anticancer drugs-genistein glycosides, *Cancer Lett.*, 229, 67-75 (2005).

Prontera, C., Marriani, B., Rossi, C., Poggi, A., Rotilio, D., Inhibition of gelatinase A (MMP-2) by batimastat and lung metastases in mice bearing Lewis lung carcinoma, *Int. J. Cancer.*, 81, 761-766 (1999).

Qiu, J.G., Factor, S., Chang, T.H., Knighton, D., Nadel, H., Levenson, S.M., Wound healing: captopril, an angiogenesis inhibitor, and *Staphylococcus aureus* peptidoglycan. *J. Surg. Res.*, 92 (2), 177-185 (2000).

Reddy, M.K., Baskaran, K., Molteni, A., Inhibitors of angiotensin-converting enzyme modulate mitosis and gene expression in pancreatic cancer cells, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 210 (3), 221-226, (1995).

Reile, H., Birnbock, H., Bernhardt, G., Spruss, T., Schonenberger, H., Computerized determination of growth kinetic curves and doubling times from cells in microculture, *Anal. Biochem.*, 187, 262-267 (1990).

Reynolds, J.E.F., Martindale: The extra pharmacopoeia, 31st Edition, , The Royal Pharmaceutical Society, London., 900, 1996.

Rivera, E., Arrieta, O., Guevara, P., Duarte-Rojo, A., Sotelo, J., AT1 receptor is present in glioma cells; its blockage reduces the growth of rat glioma. *Br. J. Cancer*, 85 (9), 1396-1399 (2001).

Roberts, J.D.Jr., Fineman, J.R., Morin, F.C.3rd, Shaul, P.W., Rimar, S., Schreiber, M.D., Polin, R.A., Zwass, M.S., Zayek, M.M., Gross, I., Heymann, M.A., Zapol, W.M., Inhaled nitric oxide and persistent pulmonary hypertension of the newborn. The inhaled Nitric Oxide Study Group, *N. Engl. J. Med.*, 336 (9), 605-610 (1997).

Rocha E Silva, M., Beraldo, W.T., Rosenfeld, G., Bradykinin a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulins by snake venoms and trypsin, *Amer. J. Physiol.*, 156, 261-273 (1949).

Ronquist, G., Rodríguez, L.A., Ruigómez, A., Johansson, S., Wallander, M.A., Frithz, G., Svärdsudd, K., Association between captopril, other antihypertensive drugs and risk of prostate cancer, *Prostate*, 58 (1), 50-56 (2004).

Sawicki, C.R., Fluorometric Determination of Nitrate. *Anal. Lett.*, 4, 761-775, (1971).

Schwarz, H., Bumpus, F.M., Page, I.H., Synthesis of a biologically active octapeptide similar to natural isoleucine angiotonin octapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 5697-5703 (1957).

Senaratne, S.G., Pirianov, G., Mansi, J.L., Arnett, T.R., Colston, K.W., Biphosphonates induce apoptoses in human breast cancer cell lines, *Br. J. Cancer.*, 82, 1459-1468 (2000).

Shen, Y., West, C., Toxicity of aromatic aerobic biotransformation products of toluene to HeLa cells, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 60(2), 177-184, (1998).

Small, W.Jr., Molteni, A., Kim, Y.T., Taylor, J.M., Chen, Z., Ward, W.F., Captopril modulates hormone receptor concentration and inhibits proliferation of human mammary ductal carcinoma cells in culture, *Breast Cancer Res. Treat.*, 44 (3), 217-224 (1997).

Smith, C.G., Vane, J.R., The discovery of captopril, *FASEB Journal.*, 17(8), 788-7898 (2003).

Sorbi, D., Fadly, M., Hicks, R., Alexander, S., Arbeit, L., Captopril inhibits the 72 kDa and 92 kDa matrix metalloproteinases, *Kidney Int.*, 44, 1266-1272 (1993).

Stojiljkovic, L., Behnia, R., Role of renin-angiotensin system inhibitors in cardiovascular and renal protection: A lesson from clinical trials. *Curr. Pharm. Des.*, 13 (13), 1335-1345 (2007).

Stoll, M., Steckelings, U.M., Paul, M., Bottari, S.P., Metzger, R., Unger, T., The Angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells, *J. Clin. Invest.*, 95 (2), 651-657 (1995).

Suganuma, T., Ino, K., Shibata, K., Kajiyama, H., Nagasaka, T., Mizutani, S., Kikkawa, F., Functional expression of the angiotensin II type 1 receptor in human ovarian carcinoma cells and its blockade therapy resulting in suppression of tumor invasion, angiogenesis, and peritoneal dissemination, *Clin. Cancer Res.*, 11, 2686-2694 (2005).

Takai, S., Song, K., Tanaka, T., Okunishi, H., Miyazaki, M., Antinociceptive effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and an angiotensin II receptor antagonist in mice, *Life Sci.*, 59(21), PL331-PL336 (1996).

Takeda, H., Kondo, S., Differences between squamous cell carcinoma and keratoacanthoma in angiotensin type-1 receptor expression, *Am. J. Pathol.*, 158, 1633-1637 (2001).

Timmermans, P.B., Duncia, J.V., Carini, D.J., Chiu, A.T., Wong, P.C., Wexler, R.R., Smith, R.D., Discovery of losartan, the first angiotensin II receptor antagonist, *J. Hum. Hypertens.*, 9(Suppl 5), S3-S18 (1995).

Toda, N., Herman, A.G., Gastrointestinal function regulation by nitrenergic efferent nerves, *Pharmacol Rev.*, 57, 315-338 (2005).

Tunçtan, B., Nitrik oksit miktarlarının Griess yöntemi ile ölçülmesi. Türk Farmakoloji derneği Farmakoloji Eğitim Sempozyumları Programı Nitrik oksidin Farmakolojisi, 27 Mayıs, Mersin,61-68, (2005).

Türker, R.K., Ilhan, M., Ercan, Z.S., Potentiation by angiotensin converting enzyme inhibitor, SQ, 14225, of the analgesic effect of morphine in mice, *Eur. J. Pharmacol.*, 58 (1), 99-100 (1979).

Uemura, H., Shiguro, H., Nakaigawa, N., Nagashima, Y., Miyoshi, Y., Fujinami, K., Sakaguchi, A., Kubota, Y., Angiotensin II receptor blocker shows antiproliferative activity in prostate cancer cells: a possibility of tyrosine kinase inhibitor of growth factor, *Mol. Cancer Ther.*, 2, 1139–1147(2003).

Van Epps, H. L., Harry Goldblatt and the discovery of renin, *J. Exp. Med.*, 201 (9), 1351 (2005).

Voet, D., Voet, J.G., Biochemestery. John Wiley and Sons, Inc., New York, 553-554, 1995.

Volpert, O.V., Ward, W.F., Lingen, M.W., Chesler, L., Solt, D.B., Johnson, M.D., Molteni, A., Polverini, P.J., Bouck, N.P., Captopril inhibits angiogenesis and slows the growth of experimental tumors in rats, *J. Clin. Invest.*, 98, 671-679 (1996).

Wang, R, Zagariya, A., Ibarra-Sunga, O., Gidea, C., Ang, E., Deshmukh, S., Chaudhary, G., Baraboutis, J., Filippatos, G., Uhal, B.D., Angiotensin II induces apoptosis in human and rat alveolar epithelial cells, *Am. J. Physiol.*, 276 (5 Pt 1), L885-L889 (1999).

Wass, C., Archer, T., Palsson, E., Fejgin, K., Klamer, D., Engel, J.A., Svensson, L., Effects of phencyclidine on spatial learning and memory: Nitric oxide-dependent mechanisms, *Behav. Brain Res.*, 174 (1), 147-153 (2006).

Wei, Y.H., Jun, L., Qiang, C.J., Effect of losartan, an angiotensin II antagonist, on hepatic fibrosis induced by CCl₄ in rats, *Dig. Dis. Sci.*, 49 (10), 1589-15-94 (2004).

Weyermann, J., Lochmann, D., Zimmer, A., A practical note on the use of cytotoxicity assays, *Int. J. Pharm.*, 288, 369-376 (2005).

White, C.M., Pharmacologic, pharmacokinetic, and therapeutic differences among ACE inhibitors, *Pharmacotherapy.*, 18, 588-599 (1998).

Wolf, G., Wenzel, U.O., Angiotensin II and cell cycle regulation, *Hypertension.*, 43, 693-698 (2004).

Yang, D.I., Yin, J.H., Mishra, S., Mishra, R., Hsu, C.Y., NO-mediated chemoresistance in C6 glioma cells, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 962, 8-17 (2002).

Yano, C.L., Marcondes, C.C.G., Cadmium chloride-induced oxidative stress in skeletal muscle cells *in vitro*, *Free Radic. Biol. Med.*, 39 (10), 1378-1384 (2005).

Yasumatsu, R., Nakashima, T., Masuda, M., Ito, A., Kuratomi, Y., Nakagawa, T., Komune, S., Effects of the angiotensin-I converting enzyme inhibitor perindopril on tumor growth and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma cells, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 130, 567–573 (2004).

Yoshiji, H., Kuriyama, S., Fukui, H., Angiotensin-I converting enzyme inhibitors may be an alternative anti-angiogenic strategy in the treatment of liver fibrosis and hepatocellular carcinoma-possible role of vascular endothelial growth factor, *Tumor Biol.*, 23(6), 348-56 (2002).

Yoshiji, H., Kuriyama, S., Kawata, M., Yoshii, J., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Nakatani, T., Tsujinoue, H., Fukui, Hiroshi., The angiotensin-converting enzyme inhibitor perindopril suppresses tumor growth and angiogenesis: possible role of the vascular endothelial growth factor, *Clin. Cancer Res.*, 7, 1073-1078 (2001).

Zhao, Y., Liu, J., Li, L., Liu, L., Wu, L., Role of Ras/PKC ζ /MAK/ERK1/2 signaling pathway in Angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation, *Regul. Peptides.*, 128 (1), 43-50 (2005).