



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TOLFENAMİK ASİTİN KARACİĞER KANSER HÜCRELERİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Süha AKIN

**Danışman
Prof. Dr. Selda Kabadere**

2018



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TOLFENAMİK ASİTİN KARACİĞER KANSER HÜCRELERİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Süha AKIN

**Danışman
Prof. Dr. Selda Kabadere**

2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

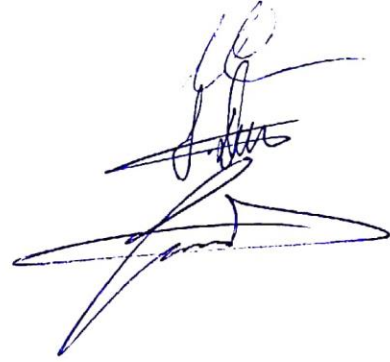
Süha AKIN'ın Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "Tolfenamik Asitin Karaciğer Kanseri Hücreleri Üzerine Etkisi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

Tarih
04.06.2018

Üye: Prof. Dr. Nilüfer ERKASAP

Üye: Prof. Dr. Selda KABADERE

Üye: Doç. Dr. Gökhan KUŞ



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 07/06. 2018 tarih ve 118/5819 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan Yeysi GÜNEŞ
Enstitü Müdürü

1

Özet

Karaciğer kanseri ülkemizde ve dünyada sık görülen, tedavisi zor kanser türlerindedir. Kanserli hücreleri yok etmeyi amaçlayan kemoterapi ve radyoterapi uygulamaları yeterli ve verimli olmadığı için yeni kimyasal ilaçlar arama çalışmaları devam etmektedir. Tolfenamik asit (TA) non-steroid antienflamatuvar ilaç sınıfının bir üyesidir ve siklooksijenaz enzimini inhibe etmektedir. Yapılan çalışmalarda prostattan akciğer kanserine kadar pek çok kanser tipinde apoptozu tetikleyerek kanserli hücreleri öldürdüğü saptanmıştır. Çalışmamızda karaciğer kanseri olarak yüksek insidansı nedeniyle kastedilen hepatosellüler karsinomadır (HSK). Bu çalışmada insan HSK (HepG2) ve sıçan HSK (H4IIE) hücre dizilerinde TA'nın 5, 10, 25, 50 ve 100 µM'lık dozları 24, 48 ve 72 saat uygulanmış ve 3-4,5-dimetil-tiazolil-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) ile canlılıkları belirlenmiştir. Etkili bulunan 50 ve 100 µM dozları H4IIE hücrelerine 24 saat süreyle uygulandıktan sonra tümör nekroz faktör (TNF-α), NF-κB, interlökin 1-β ve kaspaz-3 gen ifadenmesi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile değerlendirilmiştir. HepG2 hücrelerine 24 saat süreyle 5, 10, 25, 50 ve 100 µM TA uygulaması sonucu elde edilen yaşayan hücre oranları %100, %106, %95, %89, %59 olarak hesaplanmıştır. 48 saat süreyle aynı dozlarda elde edilen yaşam oranları %120, %116, %110, %89, %50 olarak belirlenmiştir. 72 saat süreyle aynı dozlarda elde edilen yaşam oranları ise %108, %110, %103, %95, %51 olarak belirlenmiştir. H4IIE hücrelerine 24 saat süreyle 5, 10, 25, 50 ve 100 µM TA uygulaması sonucu elde edilen yaşayan hücre oranları %94, %92, %92, %90, %74 olarak belirlenmiştir. 48 saat süreyle aynı dozlarda elde edilen yaşam oranı %90, %92, %91, %77, %53 olarak belirlenmiştir. 72 saat süreyle aynı dozlarda elde edilen yaşam oranları ise %88, %82, %81, %75, %46 olarak belirlenmiştir. PCR sonuçlarına göre TNF-α gen ifade düzeyinde 50 ve 100 µM TA uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre katlı artış gözlenmiştir. Ancak NF-κB, interlökin 1-β ve kaspaz-3 gen ifadesinde gruplar arasında istatistiksel bir fark görülmemiştir. Bu sonuçlara göre artan TA dozuna zamana bağlı olarak hücre ölümünün arttığı ve TA'nın TNF-α gen ekspresyonunu arttırarak apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca düşük dozdaki 5 ve 10 µM TA'nın sadece HepG2 hücre sayısında bir artışa neden olduğu gözlemlendi. TA'nın HepG2 ve H4IIE hücrelerinde çoğalmayı baskılayıcı ve apoptozu uyancı etkilerinin tespit edilmesi açısından önemlidir.

Anahtar kelimeler: Tolfenamik asit, hepatosellüler karsinoma, HepG2, H4IIE, TNF alfa, MTT, apoptoz.

Summary

Liver cancer is a common type of cancer that is common in our country and in the World and treatment of this disease is very difficult. Since chemotherapy and radiotherapy applications aiming at destroying cancerous cells are not sufficient and productive, studies for finding new chemicals go on. Tolfenamic acid (TA) is a member of the non-steroidal antiinflammatory drug class and inhibits the cyclooxygenase enzyme. Studies have shown that many cancer types, from lung cancer to prostate cancer, have been shown to kill cancer cells by stimulate appoptosis. Because of the high incidence in liver cancers, hepatocellular carcinoma is referred, in our study. In the present study, at the doses of 5, 10, 25, 50 and 100 μM TA were administered on human HSK (HepG2) and rat HSK (H4IIE) cell lines for 24, 48 and 72 hours and subsequent cell viabilities were tested by 3-4,5-dimetil-tiazolil-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) analyse. Tumor necrosis factor (TNF- α), NF- κB , interleukin 1- β and caspase-3 gene expressions were assessed by Polymerase Chain Reaction (PCR) after effective concentrations (50 and 100 μM) of TA were applied to H4IIE cells for 24 hours. When HepG2 cells were exposed to 5, 10, 25, 50 and 100 μM doses of TA for 24 hours, the rates of living cells were determined as 100%, 106%, 95%, 89% and 59%, respectively. When, the same doses were applied for 48 hours, the living cell rates were %120, %116, %110, %89, %50, respectively. When, the same doses were applied for 72 hours, the living cell rates were %108, %110, %103, %95, %51 respectively. When H4IIE cells were exposed to 5, 10, 25, 50 and 100 μM doses of TA for 24 hours, the rates of living cells were determined as 94%, 92%, 92%, 90% and 74%, respectively. When, the same doses were applied for 48 hours, the living cell rates were %90, %92, %91, %77, %53, respectively. When, the same doses were applied for 72 hours, the living cell rates were %88, %82, %81, %75 and %46, respectively. According to PCR results, TNF- α gen expression level was observed to increase when compared to the control group in 50 and 100 μM TA groups. However, NF- κB , interleukin 1 β and caspase-3 gen expressions were not statistically significant between the groups. These results show that TA increases dose and time dependent cell death and leads to apoptosis by increasing gene expression of TNF- α . It was also observed that 5 and 10 μM TA caused an increase in HepG2 cell count only. It is important that TA inhibits proliferation and stimulates apoptosis on HepG2 and H4IIE cells.

Key words: Tolfenamic acid, hepatocellular carcinoma, HepG2, H4IIE, TNF alfa, MTT, apoptosis.

İçindekiler

Özet.....	iii
Summary	iv
İçindekiler.....	v
Tablolar Dizini.....	vii
Şekiller Dizini.....	viii
Simge ve Kısaltmalar Dizini	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 - Karaciğer Anatomisi Ve Fiziolojisi.....	3
2.2 - Karaciğer Kanseri	5
2.2.1. HSK	5
2.2.2. Kolanjiokarsinom.....	6
2.3 - Hücre – Apoptoz Ve Kanser İlişkisi.....	6
2.4 - NSAİ ilaçlar	8
2.4.1. NSAİ ilaçların Etki mekanizması.....	9
2.4.2. Tolfenamik asit.....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	14
3.1 - Hücre kültürünün yapılması	14
3.2 - Kültür için yapılan hazırlıklar.....	14
3.3 - Hücrelerin ekimi ve yaşatılması	14
3.4 - Hücre sayısını belirleme	14
3.5 - Deney grupları 1	15
3.6 - MTT ile hücre canlılığını belirleme	15
3.7 - Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	16
3.8 - RNA İZOLASYONU	16
3.9 - RNA konsantrasyonunun Hesaplanması	17
3.10 - İstatistiksel analiz.....	17
4. BULGULAR.....	18

4.1 – İlaçların hücre canlılığına etkileri	18
4.1.1 MTT yöntemi bulguları	18
4.1.1.1. TA'nın H4IIE hücrelerine 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulanması.....	18
4.1.1.2. TA'nın HepG2 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulanması.....	19
4.2 – PCR Sonuçları.....	19
4.2.1. TA'nın H4IIE hücrelerinde kaspaz-3 gen ifadenmesi üzerindeki etkisi.....	20
4.2.2. TA'nın H4IIE hücrelerinde IL-1 β gen ifadenmesi üzerindeki etkisi	20
4.2.3. TA'nın H4IIE hücrelerinde NF- κ B gen ifadenmesi üzerindeki etkisi	21
4.2.4. TA'nın H4IIE hücrelerinde TNF- α gen ifadenmesi üzerindeki etkisi	22
5- TARTIŞMA	24
6- SONUÇ VE ÖNERİLER.....	27
7- KAYNAKLAR DİZİNİ.....	28
8- ÖZGEÇMİŞ.....	35

Tablolar Dizini

Tablo 2.4.1. NSAİ ilaçların kimyasal yapısına göre sınıflandırılması.....	8
Tablo 2.4.1.1. Siklooksijenaz ürünleri ve etkileri.....	9
Tablo 3.8.1. PCR için kullanılan primerler.....	16
Tablo 4.2.1.1. TA ile muamele edilen H-4-IIE hücrelerinde belirlenen kaspaz-3 aktivitesinin sonuçlarının kontrolle karşılaştırılması.....	19
Tablo 4.2.2.1. TA ile muamele edilen H-4-IIE hücrelerinde belirlenen IL-1 β aktivitesinin sonuçlarının kontrolle karşılaştırılması.....	20
Tablo 4.2.3.1. TA ile muamele edilen H-4-IIE hücrelerinde belirlenen NF- κ B aktivitesinin sonuçlarının kontrolle karşılaştırılması.....	20
Tablo 4.2.4.1. TA ile muamele edilen H-4-IIE hücrelerinde belirlenen TNF- α aktivitesinin sonuçlarının kontrolle karşılaştırılması.....	21

Şekiller Dizini

Şekil 2.1.1. Karaciğer kesiti.....	3
Şekil 2.1.2. Hepatik lobüller ve hepatosit şematik çizimi.....	4
Şekil 2.4.1.1. Hücre membranından araşidonik asit ve cox, lox sentezi.....	10
Şekil 2.4.1.2. Araşidonik asit metabolitleri ve etkili olduğu hücre ve organlar.....	11
Şekil 2.4.2.1. TA'nın molekül formülü.....	12
Şekil 3.6.1. 48 saat TA ile muamele edilen hücrelerin MTT analizi.....	15
Şekil 4.1.1.1.1. TA'nın belirtilen dozlarda H-4-IIE hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	17
Şekil 4.1.1.2.1. TA'nın 5, 10, 25, 50 ve 100 µM dozlarında Hep G2 hücre canlılığı üzerindeki etkileri	18
Şekil 4.2.4.1. TA ve kontrol gruplarının H-4-IIE hücrelerinde TNF-a gen ifadenme düzeyi üzerindeki etkisi.....	22

Simge ve Kısaltmalar Dizini

COX	:	Siklooksijenaz
DMEM	:	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	:	Dimetilsülfoksit
FCS	:	Fetal dana serumu (Fetal calf serum)
HSK	:	Hepatosellüler karsinoma
LOX	:	Lipoksijenaz
MTT	:	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromid
NSAİ	:	Non-steroid antienflamatuar
PCR	:	Real Time-PCR (RT-PCR) tekniği
PGG2	:	Prostaglandin G2
TA	:	Tolfenamik asit
TNF	:	Tümör nekroz faktör
μM	:	Mikromolar
NF- κB	:	Nükleer faktör kapp B
PBS	:	Phosphate buffered saline

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, kontrolden çıkmış hücrelerin bölünmesinin kontrol altına alınamadığı durumdur (Beytur, 2011). Hastadan hastaya çok farklı değişkenlikler gösterebilir. Başlangıcı, gelişimi ve sonlanması açısından son derece karmaşık bir hastalıktır. Bu çeşitlilik ve karmaşa moleküler ve hücresel düzeyde de mevcuttur. Sağlıklı hücrelerin bu denli değişim göstererek çok uzaktaki doku ve organlara sıçrayacak kadar kontrolsüz ve hızlı çoğalması metastaz açısından çok yolaklı ve uzun bir süreçtir (Merlo, 2006). Karaciğer kanseri tüm dünyada, özellikle erkeklerde sıklıkla rastlanan, kansere bağlı ölümlerde 3. sırada yer alan önemli bir hastalıktır (Jemal A, 2011).

Hepatosellüler karsinoma (HSK), karaciğer kanser tipleri arasında görülme sıklığı en yüksek olan tümör tipidir (Ferlar J, 2010). Karaciğer kanseri, hepatosit adı verilen karaciğer hücrelerinden köken almaktadır. Bu sebeple HSK olarak isimlendirilmektedir. HSK, kronik karaciğer hastalıklarının zemininde gelişen karaciğerin primer tümörüdür. Tedavisi ise oldukça sınırlıdır. Mevcut cerrahi operasyonlar, karaciğer nakli, kemoterapi gibi yöntemler kullanılsa da sağ kalım oranı artmamıştır. Cerrahi operasyon sonrası da hastaların hayat kaliteleri artmamıştır. Bu nedenle mevcut tedaviler yerine alternatif madde arayışları hız kazanmıştır (Gish, 2006). HSK gelişimine neden olan faktörler oldukça fazladır. Viral hastalıklar, aşırı alkol tüketimi, insülin direnci, karaciğer yağlanması ve şeker hastalığı bunlardan sadece birkaçıdır (El-Serag, 2007). Asya ülkelerinde yüksek sıklıkla görülmesine rağmen Avrupa, Amerika ve Orta Doğu'da düşük sıklıkla görülmektedir (Ishak, 1987). Ancak son yıllarda gelişmiş ülkelerde alkol tüketimi ve obeziteye bağlı olarak görülme sıklığı artmıştır (El-Serag, 2007). Coğrafi bölgelere göre risk faktörleri değişiklik gösteren HSK için siroz ve karaciğer hastalıkları majör risk faktörlerindedir. Otoimmün hepatit, Wilson hastalığı, aşırı kırmızı et tüketimi ve yağlı beslenme daha nadir görülen risk faktörlerindedir (McGlynn, 2009). HSK'lı vakalarda hastalığa özgü bir bulguya rastlamak zordur. Genellikle hastalar ağrı ve kilo kaybından yakınır. İleri evrede erken tokluk hissi görülebilir. Bazı vakalarda ateş, kanama ve kemik ağrısı da eşlik edebilir (Bruix, 1990). Hastaların yarısından fazlası tedavi seçeneklerinin olmadığı evrede teşhis edilir. Erken bulgu görülmemesi bu duruma gerekçe gösterilebilir. Teşhis sonrası sağ kalım ortalama 1,5 yıldır (Berrino, 2007). Hepatit B, HSK'ya neden olan en önemli virüstür. Benzer şekilde hepatit C virüsü, siroz, kronik karaciğer hastalıkları ve HSK gelişimine neden olan bir RNA virüsüdür (Lavanchy, 2009). Hepatit B enfeksiyonundan korunmak için en etkili yol aşıdır (Kane MA, 2013). Hepatit B virüsü, karaciğerde hücre nekrozu yapmaktadır. Aynı zamanda enflamasyona ve sitokin sentezine de yol açmaktadır. Tüm bu etmenler

proliferasyonu arttırabilir. Enflamatuvar yanıt TNF- α ve IL sentezini arttırmaktadır. Sağlıklı hepatositler G0 fazındadır. Kanserli hücreye dönüştüğünde ise hücre – hücre ve hücre – ekstrasellüler matriks ilişkisi bozulmaktadır. Karaciğer hücrelerini G0'dan döngüye başlatan tüm etmenler HSK için risk faktörü olarak kabul edilmektedir (Yamamoto, 1999).

Non-steroid antienflamatuvar (NSAİ) ilaçların kullanım amacı ağrı kesici ve ateş düşürücü olmalarıdır. Tolfenamik asit (TA) yan etkileri diğer ilaçlara göre daha az olan bir NSAİ ilaçtır. NSAİ ilaçlar COX enziminin inhibe edilmesi ile enflamasyonu azaltır (Vickers, 1996). Bu ilaçlar moleküler yapısı nedeniyle COX inhibisyonu yaparken gastrointestinal toksisite meydana getirmektedir. Çünkü genelde NSAİ ilaçlar zayıf organik asittir ve gastrik mukoza bariyerinden geçebilir ve mukoza hücrelerine zarar verebilir. Bu da gastrik ülser oluşumuna neden olabilir (Simon, 1998).

Bugüne kadar TA'nın, prostat kanseri, meme, pankreas ve kolon kanserleri üzerine kanseri durdurucu etkileri kanıtlanmıştır (Sankpal U, 2012). Bu hücre çoğalmasını önleyici özellikleri apoptotik yollardaki artışla başlamaktadır (Wankya, 1985). HSK'da mevcut tedavilerin sınırlı olması, yeni ilaçlar ve yeni etki mekanizmalarının araştırılmasını zorunlu kılmaktadır. COX-2, çoğu kanser türünde artış göstermektedir. NSAİ ilaçlar COX ve LOX ürünlerini azaltmaktadır (Solomon DH, 2009).

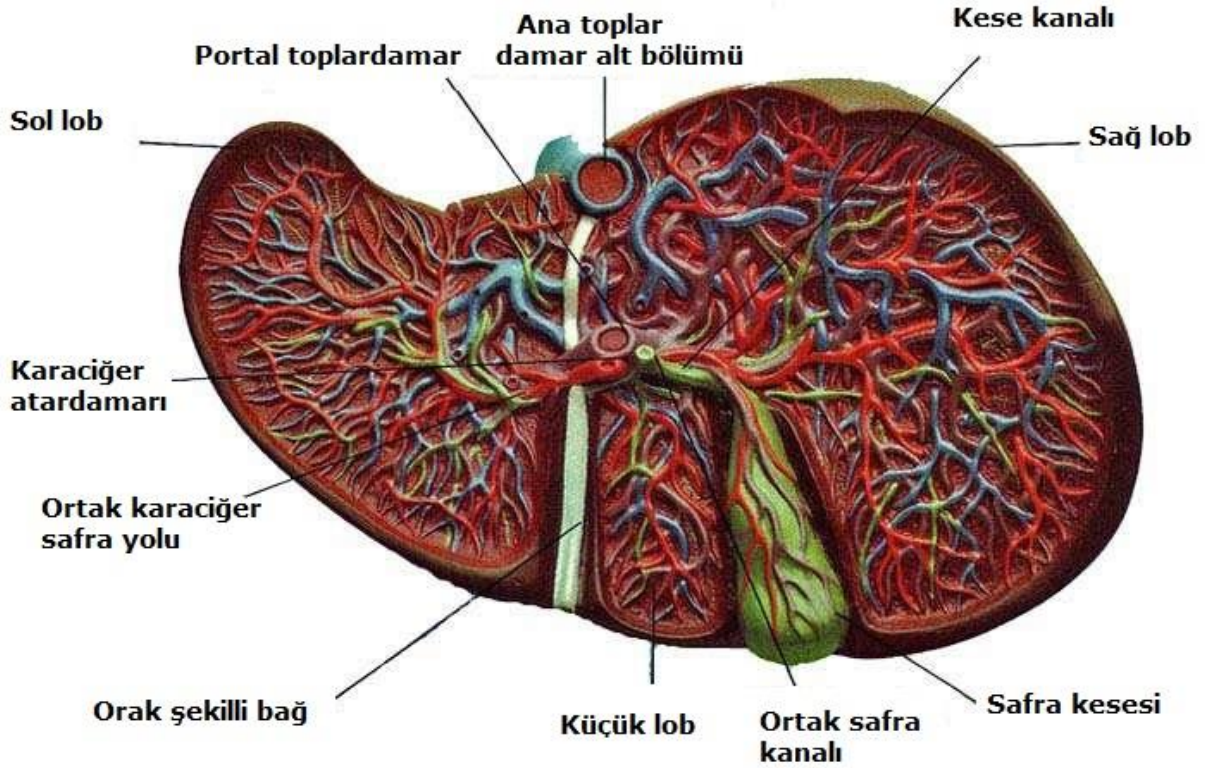
COX, araşidonik asitten prostaglandin sentezini sağlayan bir enzimdir. Prostaglandinler enflamasyon ve ağrı ile alakalı fonksiyonlara sahiptir. Üretildikleri doku türüne göre farklılık göstermektedir. COX'un ikinci formu ilk olarak 1989'da tanımlanmıştır (Rosen, 1989). COX-1 dokuların fizyolojik görevlerini düzenlemektedir. COX-2 ise genellikle enflamasyon ile ilgili sitokin, tümör geliştirici ve büyüme faktörleri gibi ürünlerin sentezinde görevlidir (Bolton, 1998). Her iki enzim farklı genler tarafından kodlanır ancak aminoasit dizilimleri arasında fark yoktur (Smith, 1994). COX-2 artışı tümör anjiyojenezini desteklemektedir ve NSAİ ilaçlar COX inhibitörü olduğu için anti-anjiyojenez etkisi vardır (Bertagnolli, 2003).

Bu çalışmanın amacı insan ve sıçan karaciğer kanser hücre hatlarında TA'nın hücre canlılığı üzerine etkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

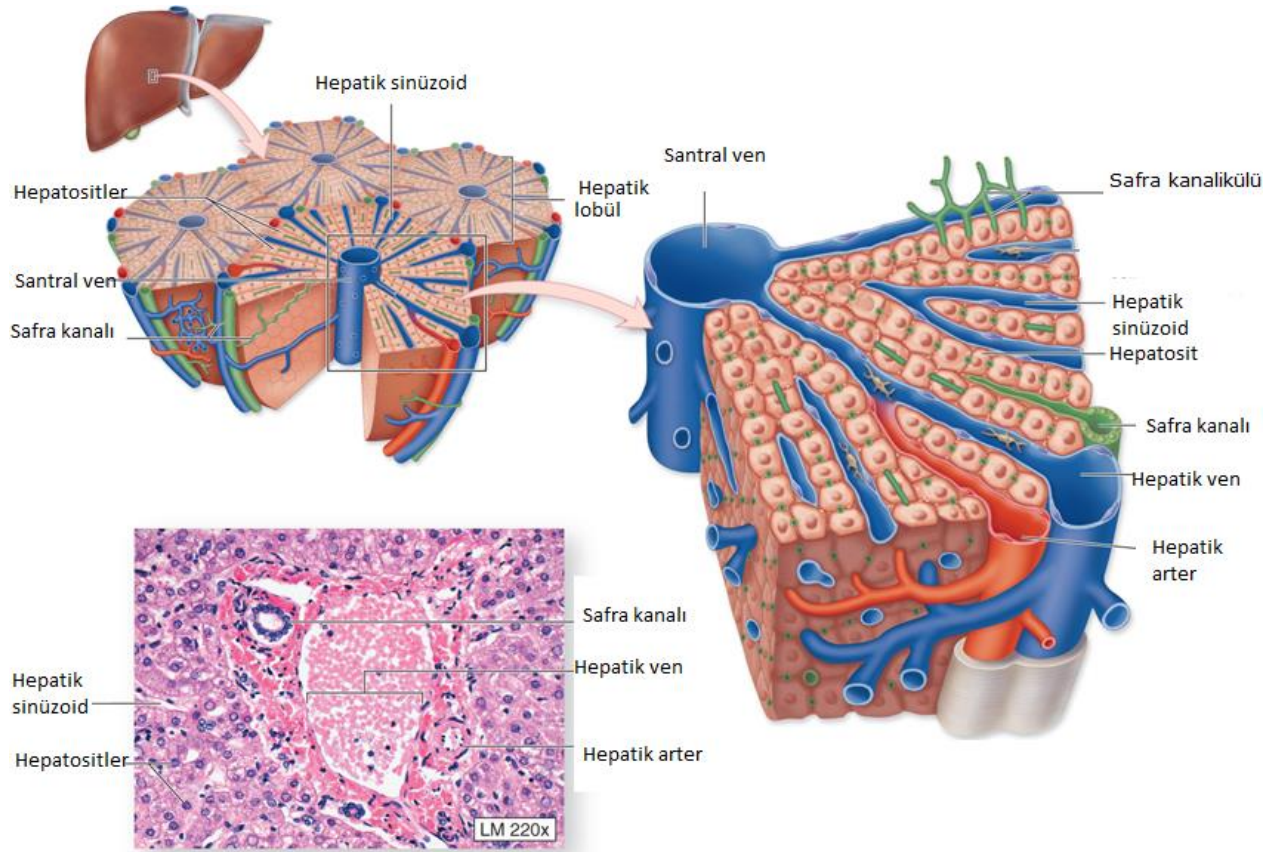
2.1 Karaciğer Anatomisi Ve Fizyolojisi

Erişkinlerde yaklaşık 1500 gram olan karaciğer vücudun en ağır organıdır (Butterworth, Wasnick, Mackey, 2016). Anatomik olarak 2 ana lobdan (sağ ve sol) oluşmaktadır (Şekil 2.1.1). Karaciğer, göğüs kafesinin arkasında, abdomenin sağ üst çeyreğinde bulunur. Glisson kapsülü denen ince bir bağ dokusu tabakasıyla çevrelenmiştir (Barash, 2017).



Şekil 2.1.1. Karaciğer kesiti.

Karaciğer lobül denilen 50.000-100.000 anatomik ünitelerden oluşmuştur (Şekil 2.1.2). Lobüller, hepatosit adı verilen karaciğer hücreleri tarafından oluşturulmaktadır (Butterworth vd. 2016). Hepatositler bir santral ven ve onun etrafını saran, portal triad adı verilen, bilier kanal, hepatik arter ve portal ven ile sınırlı hepatik sinüzoidlerin içerisinde yapılanmıştır. Sinüzoidleri hepatositlerden ayıran boşluklarda çeşitli hücreler bulunmaktadır ve bunlar karaciğerin enfeksiyonlara ve antijenlere karşı savunmasında önemli rol oynamaktadır (Barash, 2017).



Şekil 2.1.2. Hepatik lobüller ve hepatosit şematik çizimi. (McGraw-Hill Education)

Karaciğer, portal ve sistemik dolaşımdaki gıda maddelerinin alımından, pek çok protein ve safra bileşenlerinin sentezine kadar; dolaşımdaki gıda maddelerinin ve toksinlerin regülasyonundan, bağışıklık sistemine kadar çeşitli metabolik ve salgılama fonksiyonunu gerçekleştiren bir organdır. Bu fonksiyonlardan bazıları şunlardır:

- Safra sentezi ve düzenlenmesi
- Protein sentezi
- Kolesterol ve lipoprotein üretilmesi
- Besinlerin depolanması
- Hemoglobin metabolizması
- İlaçların ve diğer zehirli maddelerin detoksifikasyonu
- İmmünolojik konak savunma sistemi (Barash, 2017)

2.2. Karaciğer Kanseri

Karaciğerin malign tümörleri, primer (karaciğer dokusundan köken alan) ve sekonder (metastatik) olmak üzere iki grupta incelenmektedir (Nazlıgöl, Uzunköy, 2006). HSK, dünyada beşinci en sık görülen primer karaciğer kanseridir. Dünya çapında kansere bağlı ölümlerde üçüncü sıraya gelmiştir (El-Serag, 2018). Histolojik olarak değerlendirildiğinde karaciğer kanseri iki ana tipe ayrılmaktadır: HSK (%80) ve kolanjiokarsinom (%15) (Xue, Li, Bai, Wang, Ji, Lu, 2017). HSK'nın sağ kalım oranı %5'ten daha azdır (Schutte K, 2009).

2.2.1. HSK

Hepatositlerden köken alan HSK, karaciğerde en sık gözlenen primer malign tümördür. İnsidansı yaşla artmaktadır. HSK tanısında kullanılan başlıca tümör belirteçleri alfa fetoprotein, glypican-3, hepatoma spesifik gamma-glutamil transferaz ve des-gamma karboksiprotrombindir (Nazlıgöl, Uzunköy, 2006).

HSK için risk faktörleri şunlardır:

- Hepatit B virüsü,
- Hepatit C virüsü,
- Hepatit B ve Hepatit C koenfeksiyonu,
- Aflatoksin B1,
- Alkol,
- Herediter hemakromatozis
- Alfa-1 antitripsin eksikliği
- Wilson hastalığı
- Nonalkolik steatohepatit
- Herediter tirozinemi tip 1
- Erkek cinsiyet
- Glikojen depo hastalığı tip 1 (Nazlıgöl, Uzunköy, 2006).

HSK yüksek orandaki ölüm ve hastalık oranının gittikçe artması nedeniyle dünya çapında büyük bir sağlık problemi haline gelmiştir (He, Guo, Zhang, Gong, Yang, 2018). HSK'da cerrahi müdahale, etanol enjeksiyonu veya radyofrekans ile geriletme gibi tedaviler, transarteriyel kemoembolizasyon denilen karaciğer damarlarını anjiyo yöntemi ile tıkama duruma göre tercih edilen başlıca tedavi yöntemlerindedir (Nazlıgöl, Uzunköy, 2006). Fakat gizli bir başlangıca sahip olması nedeniyle, birçok hasta tanı sırasında çoktan ileri evreye ulaşmıştır; karaciğer nakli ve cerrahi müdahale gibi iyileştirici tedavilere aday değildir (He, Guo, Zhang, Gong, Yang, 2018).

2.2.2. Kolanjiokarsinom

Kolanjiokarsinom için başlıca risk faktörleri şunlardır:

- Primer sklerozan kolanjit
- Karaciğer paraziti (clonorchiasis)
- Thorotrast
- Fibrokistik hastalıklar
- Anabolizan steroidler (Nazlıgöl, Uzunköy, 2006; Xue, Li, Bai, Wang, Ji, Lu, 2017).

Sarılık en sık görülen klinik bulgudur. Alkalen fosfataz, gamma glutamil transpeptidaz ve bilirubin yüksekliği başlıca laboratuvar bulgularındandır. Serum tümör belirteçlerinden karsinoembriyjenik antijen, CA 19-9 ve CA-125 yükselebilir. Uygun vakalarda rezeksiyon ilk tercih edilen tedavi yöntemidir (Nazlıgöl, Uzunköy, 2006).

2.3. Hücre – Apoptoz Ve Kanseri İlişkisi

Apoptoz terimi ilk kez 1972 yılında ortaya atılmıştır. Hücre ölümü ve çoğalmasi arasındaki hassas kontrolü dengeleyen çok önemli bir mekanizmadır. Genlerle düzenlenir, enerjiye bağımlıdır ve homeostazı korur. Apoptoz, genel tanımı ile kontrollü hücre ölümü mekanizmasıdır (Flusberg DA, 2015). Kanseri hücrelerinde DNA mutasyonu sonucu hücre apoptoz ile ölmektedir. Apoptozun düzenlenmesinde kaspazlar, kalsiyum ve p53 gibi bazı moleküllerin etkili olduğu bulunmuştur. Özellikle kalsiyum, apoptotik süre içinde sürekli hücre içine girmekte ve enzim aktivitesini arttırmaktadır (Law, B.Y, 2014).

Apoptotik ölüm 4 ana maddeye dayanmaktadır. Bunlar; Bcl-2 proteinleri, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1, kaspazlar ve p53 genidir. Bu bileşenler hücreyi biyokimyasal olarak uyarmakta, çekirdek zarı kırılmalarına neden olmakta, DNA'yı parçalamakta ve apoptotik cisimleri şekillendirmektedir (Cakarto, 2008).

Kaspazlar olarak adlandırılan kontrollü hücre ölümünü düzenleyen proteinler memelilerde bulunmaktadır. Katalitik bölgelerinde sistein ihtiva ettiklerinden dolayı enzim olarak işlev görmekte ve kaspaz adını almaktadır. Kaspaz aktivasyonu hücreye özeldir. Tüm hücrelerde aktif olmayan pro-enzim halinde bulunmaktadır. Sitokrom c'nin sitoplazma içine salınmasıyla apoptozun son basamaklarından sorumlu enzim olan kaspazlar aktive olmakta ve proteaz aktivasyonunu sağlayarak sitoplazmadaki proteinlerin yıkımından sorumlu olmaktadır. Diğer taraftan da DNA ve RNA yıkımını

gerçekleştirmektedir. Kaspazların baskılanması apoptozu engellemektedir (Huerta, 2006).

Fas ve TNF reseptörleri hücrenin zarında bulunmakta ve bunlara bağlanan moleküller hücreyi apoptozu sürüklemektedir. Bunu sağlayan hücre dışı uyardır. Hücreye içeriden bir stres uygulanması sonucu aktive olan Bax proteinleri (proapoptotik) mitokondri zarının iyon geçirgenliğini değiştirerek sitokrom c'nin dışarı çıkmasına neden olmaktadır. Bu da kaspazları aktive etmektedir. Kaspazlar da DNA'yı parçalamaktadır (Douglas, 2000).

TNF- α ilk kez 1984'te izole edilmiştir ve hala araştırmalara konu olmaya devam etmektedir. Çünkü enflamasyon, septik şok ve doku yaralanması gibi pek çok olayda fonksiyonu vardır. TNF- α ortamdaki konsantrasyonuna bağlı olarak yararlı ya da zararlı etki gösterebilir. İmmün yanıtın oluşmasında rol oynadığı gibi çoklu organ yetmezliği gelişmesinde de rol oynamaktadır (Tracey, 1993). Hazır halde bulunan birçok genin ifadenmesinde temel görevlere sahip maddelerden biridir. Mikrobiyal ürünler, proenflamatuar sitokinler, T ve B hücre mitojenleri fiziksel ve kimyasal stres ile aktive olabilir. NF- κ B sitokinlerin, kemokinlerin, adhezyon moleküllerin, COX-2 gibi enzimlerin gen ifadesini düzenleyebilmektedir (Ghosh, 1998).

Endojen TNF- α , T hücrelerinde reseptör aracılı apoptozu indüklemektedir (Zheng L, Fisher G, Miller 1995). Ancak TNF- α 'nın kanser oluşum mekanizması üzerine etkisi hala net olarak bilinmemektedir. DNA tamiri üzerinde baskılayıcı etkilere sahip olduğu düşünülmektedir (Szlosarek PW, Balkwill FR, 2003).

Apoptoz mekanizması 2 yolla gerçekleşir;

- 1 – İntirinsik (mitokondriyal) yol
- 2 – Ekstrinsik yol

Apoptozu tetikleyen bazı hücre içi sinyaller vardır. DNA hasarı, hücre içi Ca^{+2} artışı, hipoksi ve metabolik bozukluklar bu sinyallerin başlıcalarıdır. Her iki yolda da kaspazlar önemli rol üstlenmiştir. Hücre içi sinyaller intirinsik yolu tetiklerken hücre dışı sinyaller ekstrinsik yolu tetikleyerek apoptozu uyarır (Kroemer, 2007)

İntirinsik yolda hücre içi sinyallerle alınan uyarılar proapoptotik proteinleri aktive eder. Aktive olan bu proteinler mitokondriyon zarında zar potansiyelini değiştirir. Böylece mitokondriyon membranındaki porlardan sitokrom-C ve diğer moleküllerinin salınımını artırır. Bir dizi reaksiyon sonrası apoptoz başlatılmaktadır.

Ekstrinsik yolda ise hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine ölüm sinyalleri bağlanmasıyla başlar. Bu reseptörler adaptör molekülleri ve prokaspazlarla birleşir. Bu birleşme sonrası inaktif durumdaki prokaspaz-8'in uzun ve kısa kolları kesilerek aktif kaspaz-8 oluşur. Aktif kaspaz-8 ise kaspaz-3'ü aktive eder. Kaspaz-3 DNA fragmantasyonuna neden olarak apoptoza neden olur (Adams, 2011)

2.4. NSAİ İlaçlar

NSAİ ilaçlar, 1800'lerin sonunda sentezlenip tıbbi kullanıma girmiştir (Von Mering, 1893). 1820'de kolşisin ile başlayan bu serüven 1971'e kadar gizemini korumuştur. 1971'de John R. Vane NSAİ'lerin etki mekanizmaları üzerine çalışmış ve ilk kez siklooksijenaz (COX) tanımını kullanmıştır. 90'lı yıllarda ise COX enziminin birden fazla izomeri ve bunların farklı görevleri olabileceği ifade edilmiştir (Ardoin SP, 2006). Tablo 2.4.1'de NSAİ ilaçların kimyasal yapısına göre sınıflandırılması gösterilmektedir.

Tablo 2.4.1. NSAİ ilaçların kimyasal yapısına göre sınıflandırılması.

ASİDİK OLANLAR	
--Karboksilik türevleri	asit
--Salisilik esterleri	asit ve Aspirin, Diflunisal, Kolin salisilat, Metil salisilat, Magnezyum Salisilat, Salisil salisilat (salsalat)
-- Fenamik asitler	Flufenamik asit, Metafenamik asit, Meklofenamik asit, Niflumik asit, Tolfenamik asit
-- Propronik asitler	Ibuprofen, Naproksen, Flurbiprofen, Fenbufen, Benaksopropen, Fenoprofen, Ketoprofen, İndoprofen, Tiaprofenik asit, Soprofen, Karprofen, Oksaprozin, Pirprofen
-- Asetik asitler	Diklofenak, İndometazin, Etodolak, Sulindak, Tolmetin
--Enolik asitler	
-- Pirazolonlar	Fenilbutazon, Oksifenbutazon, Azopropazon
-- Oksikamlar	Piroksikam, Pesoksikam, Sudoksikam, Tenoksikam, İsooksikam
ASİDİK OLMAYANLAR	Nabumeton
--Koksibler	Rofekoksib, Selekoksisib, Valdekoksib, Parekoksisib, Etorikoksib, Lumirakoksib

2.4.1. NSAİ ilaçların etki mekanizması

Hücre zarı fosfolipidlerinden olan araşidonik asit, fosfolipidlerden fosfolipaz enzimleri ile koparılmaktadır. Enflamasyon sonrası uyarılar COX enzimleri aracılığıyla araşidonik asitten prostasiklin ve prostaglandin sentezini arttırmaktadır. Ardından siklik endoperoksitler (PGG2 ve PGH2) ve tromboksan A2 sentezlenmektedir. Enflamasyon yolunda lipooksijenaz (LO) ürünleri de bulunmaktadır (Tablo 2.4.1.1).

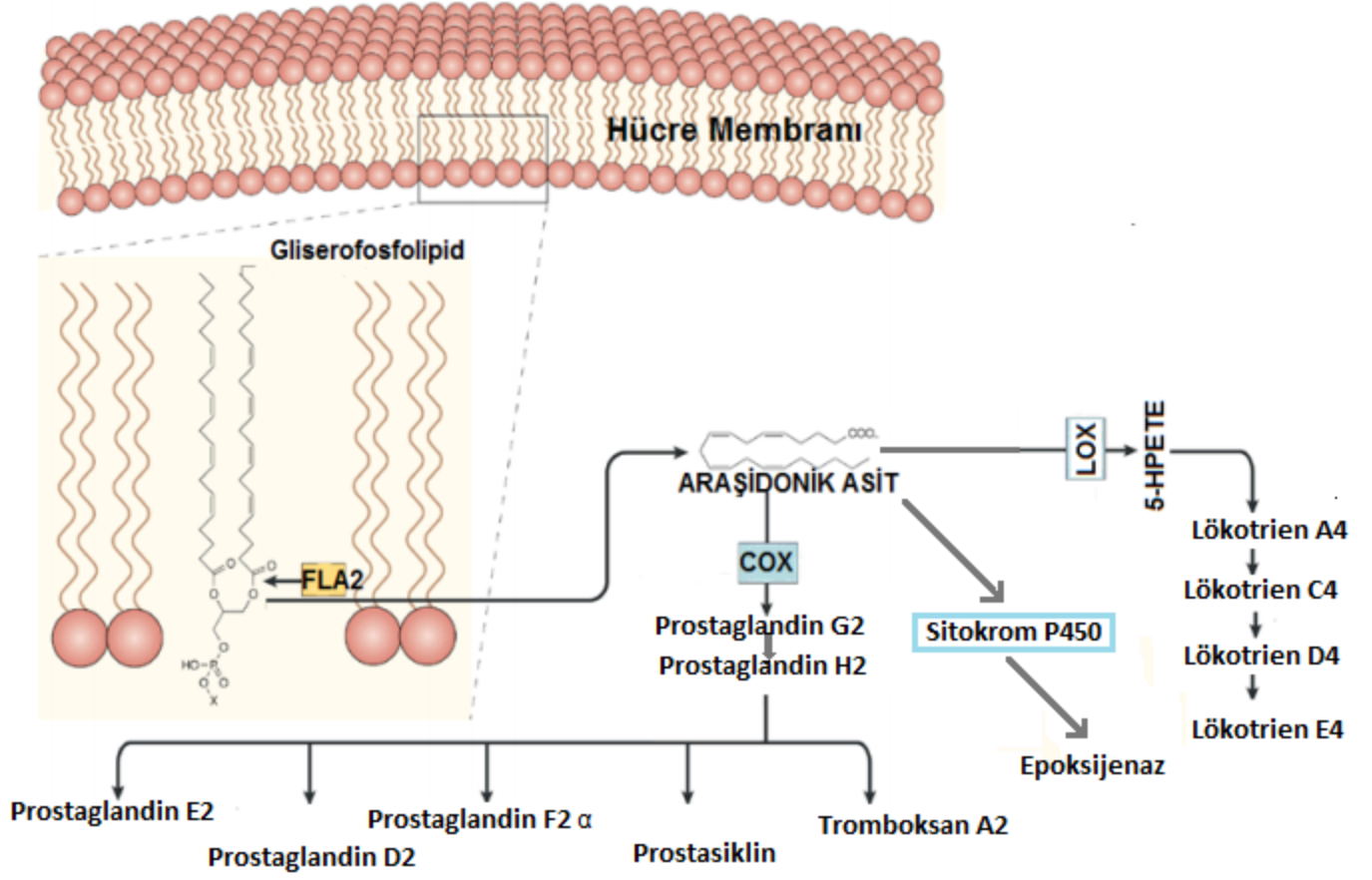
Geçtiğimiz yıllarda COX-2 ekspresyonu ve aktivitesinin tümör gelişiminde rol oynadığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Günümüzde COX-2'nin malign büyümeye yol açtığı ve COX-2 inhibitörlerinin karaciğer kanserinin malign potansiyelini etkilediği bilinmektedir. HSK'lı ve non tümöral karaciğer sirozlu hastalarda COX-2'nin fazla miktarda olduğu gösterilmiştir. Kolon kanserinde ve karaciğer kanserinde NSAİ apoptozu indüklemektedir.

COX-2 ve karsinojen arasındaki bağlantıyı açıklayacak birkaç mekanizma vardır. Prostaglandinlerin anjiyojenezi arttırması, immun yanıtı baskılaması ve hücre proliferasyonunu arttırması örnek olabilir. COX-2'nin aşırı ifadesi apoptozu inhibe etmekte ve malign hücrelerin invazyonunu arttırmaktadır. NSAİ ilaçlar, COX-1 ve COX-2 aktivasyonunu inhibe ederek bu süreçte rol oynamaktadır (Simon, 1998).

Tablo 2.4.1.1. Siklooksijenaz ürünleri ve etkileri.

SİKLOOKSİJENAZ ÜRÜNLERİ	
PGE1, PGE2	<ul style="list-style-type: none">• Vazodilatasyon ve vasküler permeabilitede artma• Oksitosik etki• Bronş düz kaslarında gevşeme• Mide asit salgısında azalma (sitoprotektif etki)• Lökosit infiltrasyonu• Trombosit agregasyonunun inhibisyonu
PGD2	<ul style="list-style-type: none">• Vazodilatasyon• Bronkokonstriksiyon
PGF2 -ALFA	<ul style="list-style-type: none">• Ven ve venüllerde büzüşme• Oksitosik etki• Bronkokonstriksiyon
PROSTASİKLİN	<ul style="list-style-type: none">• Vazodilatasyon• Trombosit agregasyonunda inhibisyon• Fibrinolitik etkinlik
TROMBOKSAN A2	<ul style="list-style-type: none">• Vazokonstriksiyon• Trombosit kümeleşmesi uyarımı• Vasküler permeabilitede artma
LİPOOKSİJENAZ ÜRÜNLERİ	
LÖKOTRİENLER	<ul style="list-style-type: none">• Bronkokonstriksiyon• Kapiller geçirgenlikte artma• Hiperaleji• Lökosit aktivasyonu ve damar endoteline yapışması

NSAİ ilaçlar, COX ve LOX ürünlerini azaltmaktadır. Şekil 2.4.1.1'de LOX ve COX enzimleri ile oluşan ürünler şematize edilmiştir. COX enzimleri tüm dokularda bulunmakta, fizyolojik ve patolojik olaylarda rol oynamaktadır. İmmun sistem, hemostaz, iç organların işlevleri ve oksidatif reaksiyonlar gibi önemli olaylara katılmaktadır. Özellikle COX-2, çoğu kanser türünde artış göstermektedir (Solomon DH, 2009). Şekil 2.4.1.2'de COX ve LOX ürünlerinin etkilediği hücreler ve organlar gösterilmiştir.



Şekil 2.4.1.1. Hücre membranındaki araşidonik asitten COX, LOX ve sitokrom p450 ile prostaglandin, lökotrien ve epoksijenaz sentezi.

Aspirin ve diğer NSAİ ilaçların özefagus, akciğer, pankreas ve kolorektal kanserlerinde anti-kanser etkisi gösterdiği keşfedilmiştir (Zhang, Lee, Basha Baker Ahmad, 2011). Ticari olarak Tolfenak, Tolfedine ve Tolfine isimleri ile satılmakta olan TA'nın, diğer NSAİ ilaçlardan daha az yan etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Eskerod, 1994). Ancak doza bağlı olmakla birlikte baş ağrısı, halsizlik, yorgunluk gibi basit yan etkileri olabilmektedir (Eskerod, 1994).

Hayvanlar üzerinde yapılan deneylerde TA'nın ağrı kesici, ateş düşürücü etkilerinin yanı sıra romatoit artrit tedavisinde de etkili olduğu görülmüştür (Zachariae and Sylvest, 1972). Yakın zamanda ise kolorektal kanser hücrelerinde ve pankreas kanser hücrelerinde kanser hücrelerinin gelişimini baskıladığı tespit edilmiştir (Abdelrahim, 2006). Bununla birlikte ovaryum, prostat ve akciğer kanser hücrelerini de apoptoza sürükleyerek öldürdüğu kanıtlanmıştır (Choi, 2011 Basha, 2011).

Yine yapılan son çalışmalarda TA, bazı bakteri suşlarına karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir. Alzheimer hastalığında patolojik süreçleri baskıladığı bildirilmiştir (Ahmed 2018).



3- GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 - Hücre Kültürünün Yapılması

Hücrelerin üreme ve ölüm mekanizmalarını, hücrenin işleyişini, çeşitli gen ifadelerini ve patolojik olayları açıklayabilmek için genellikle hücre kültürü yöntemi kullanılmaktadır. Hücre kültürü genellikle %95 O₂, %5 CO₂ içermelidir. Çalışmamızda ticari olarak satın alınan insan (HepG2) ve sıçan (H4IIE) HSK hücre dizileri kullanılmıştır. HepG2 hücreleri Prof. Dr. Ayşe Tansu Koparal'ın nazik hediyesidir. H4IIE ATCC'den satın alınmıştır.

3.2 - Kültür İçin Yapılan Hazırlıklar

Steril olarak satın alınan Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) +4°C'de saklandı. Fetal sığır serumu (fetal calf serum FCS) ve streptomisin, penisilin (Sigma) karışımı -20°C'de dondurularak saklandı. Toz halindeki tolfenamik asit (Sigma) dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma) içinde çözüldü ve istenen dozlar elde edildi.

3.3 - Hücrelerin Ekimi Ve Yaşatılması

Uygun şartlarda dondurularak saklanan HEPG2 ve H4IIE hücreleri oda sıcaklığında çözüldü. Hücreler çözüldükten sonra DMEM, %10 FCS ve %1 antibiyotik karışımı içeren santrifüj tüpü içinde, +4°C'de 5 dakika 1000 devirde döndürüldü. Süpernatant kısmı atılarak DMSO uzaklaştırıldı. Dibe çöken hücreler, içerisinde besi ortamı bulunan 25 cm²'lik flasklara ekilerek 37°C'de %100 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatöre konuldu. İnkübe edilen hücreler ters ışık mikroskopunda kontrol edildi. Eskiyen besi ortamı pipet ile uzaklaştırılarak iki günde bir taze besi ortamı takviyesi yapıldı. Hücreler flask tabanının %90'ını kapladığında deneye alındı.

3.4 - Hücre Sayısını Belirleme

Hücre sayısını belirlemede kullanılan tripan mavisi, ölü hücreleri boyamaktadır. Canlı hücreler hücre zarlarını kaybetmediği için boya absorbe etmemektedir, boyanmazlar. Flaskta tabanın %90'ını kaplayan hücrelerin besi ortamı pipet ile uzaklaştırıldı. Daha sonra flasklar Hank's balanced salt solution (HBSS, Sigma) ile proteinleri uzaklaştırmak amacıyla yıkandı. Flaskta kalan hücreler tripsin ile muamele edilerek tabandan kaldırıldı. 4°C'de 1000 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Sayım kabına 0,2 ml hücre çözeltisi, 0,3 ml HBSS ve 0,5 ml tripan mavisi eklenerek 5 dakika beklendi. Sayım kabı içinden 10 µl alınan örnek CEDEX marka hücre sayıcıda sayılarak 1 mL'deki canlı hücre sayısı belirlendi.

3.5 - Deney Grupları 1

TA'nın karaciğer kanser hücreleri üzerine etkisini değerlendirmek için 5, 10, 25, 50 ve 100 µM'lık dozları hazırlandı. Deney grupları aşağıdaki gibiydi:

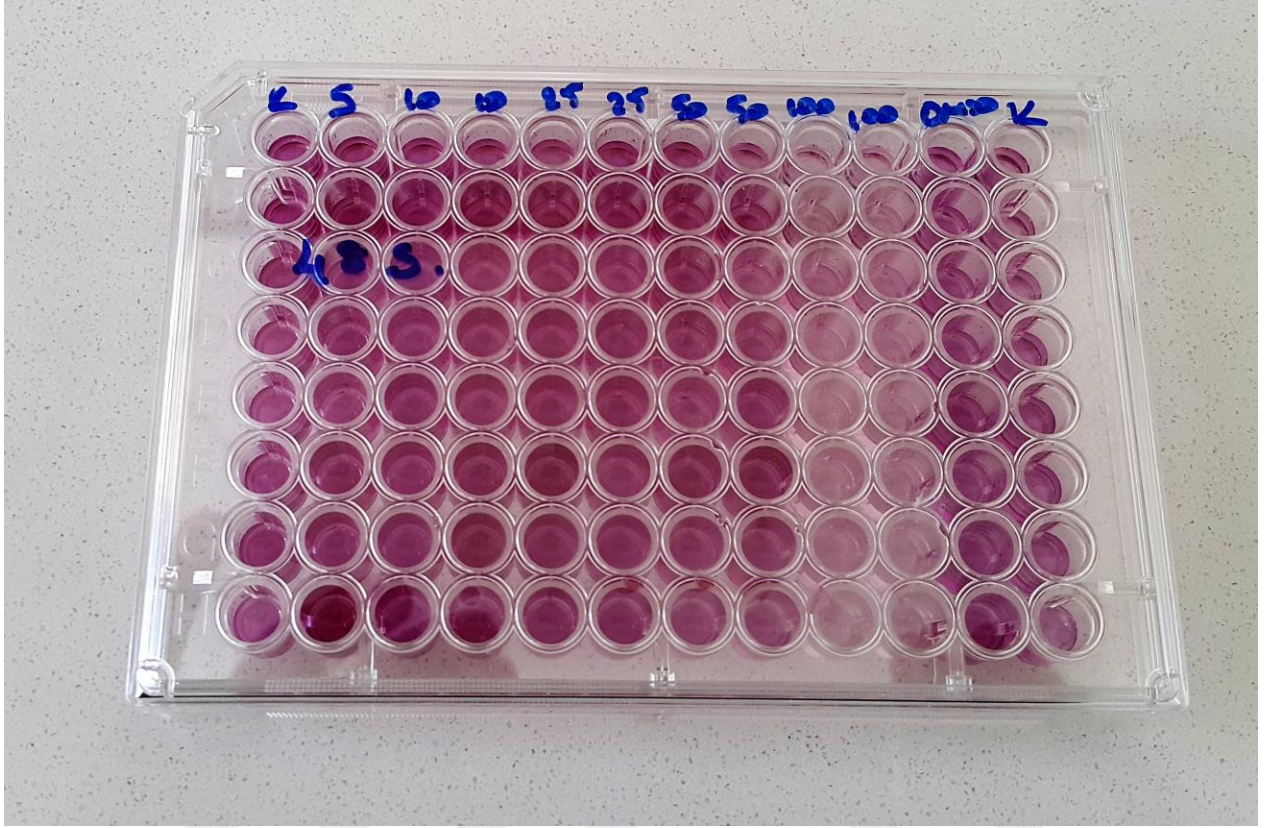
- 1.Kontrol grubu: 24, 48 ve 72 saat süreyle sadece besiyeri uygulandı.
- 2.DMSO grubu: En yüksek dozda kullanılan DMSO miktarı 24, 48 ve 72 saat uygulandı.
- 3.TA grubu: 5, 10, 25, 50 ve 100 µM TA, 24, 48 ve 72 saat uygulandı.

Çalışmanın ikinci aşamasında apoptozu değerlendirmek için bağlantılı olarak kullandığımız Kaspaz 3, interlökin 1β, TNF-α ve NF-κB gen ifadesini H4IIE hücrelerinde ölçmek üzere PCR tekniği uygulandı. H4IIE hücrelerinde 24 saatte 50µM ve 100 µM TA dozları etkili bulunduğu için PCR deneyleri için belirtilen dozlar kullanıldı.

3.6 - MTT İle Hücre Canlılığını Belirleme

Hücreler flask tabanının %90'ını kapladıktan sonra sayım tripan mavisi ile yapılarak 1 mL'deki canlı hücre sayısı bulundu. 96 kuyucuklu plate alınarak her bir kuyucuğa 1×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. HEPG2 ve H4IIE hücreleri 24, 48 ve 72 saat 5, 10, 25, 50 ve 100 µl TA ile muamele edildikten sonra MTT analizi uygulandı (Şekil 3.5.1).

Kısaca, MTT, Phosphate buffered saline (PBS) içinde çözüldü ve filtre edildi. Her bir kuyucuğa 25 µl MTT çözeltisi eklenerek 4 saat, 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa 100 µl DMSO eklendi. Plate 5 dakika karanlıkta çalkalanarak bekletildi. Boya absorbansı spektrofotometrede (Bio Tek) 550 nm'de okundu. Kuyucuklardaki optik yoğunluk yaşayan hücre yüzdesine çevrildi.



Şekil 3.6.1. 48 saat TA ile muamele edilen hücrelerin MTT analizi.

3.7 - PCR

25 cm² lik flasklarda 1×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapıldıktan sonra 50 ve 100 μ M TA konsantrasyonları eklendi. 24 saatlik inkübasyonun ardından hücreler toplandı ve RNA izolasyonu aşamasına geçildi.

3.8 - RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için hücreler toplandı, santrifüj edildi. Santrifüj edilen hücreler 200 μ l PBS ile muamele edildi. 400 μ l lysis- buffer eklendikten sonra vortekslendi. Filtreli tüplere alınan karışım 15 saniye 8000 devirde santrifüj edildi. Filtrenin altında kalan kısım atıldı. Parçalanmış hücrelerdeki DNA ve RNA filtrede kaldı. Filtredeki DNA'yı yıkmak için DNAase incubation Buffer ile muamele edildi ve 20°C'de 15 dakika beklendi. 500 μ l wash buffer 1 ile yıkama aşamasına geçildi. 15 saniye 8000 devirde santrifüj edildikten sonra wash buffer 2 den 500 μ l eklenerek tekrar 15 saniye 8000 devirde santrifüj edildi. Tekrar yıkama solüsyonu 2 den 200 μ l eklenip 2 dakika 13000 devirde santrifüj edildi. Filtreli tüpün altına yeni bir tüp takıldı. Filtreye 50 μ l elution buffer eklenerek 1 dakika 8000 devirde çevrildi. Filtrede saf olarak toplanan

total RNA elution buffer içinde toplandı. cDNA sentezine kadar -80°C’de saklandı.

PCR için kullanılan primerler tablo 3.8.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.8.1. PCR için kullanılan primerler.

	Forward	Reverse
Kaspaz3	TGACTGGAAAGCCGAAACTC	AGCCTCCACCGGTATCTTCT
IL-1 β	AGAAGCTTCCACCAATACTC	AGCACCTAGTTGTAAGGAAG
TNF- α	CCCAGGGACCTCTCTAATCA	AGCTGCCCTCAGCTTGAG
NF- κ B	GAAATTCCTGATCCAGACAAAAC	ATCACTTCAATGGCCTCTGTGTAG

3.9 - RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

RNA konsantrasyonunu belirlemek için 1,5 μ L RNA Nanodrop 1000 cihazı ile 260nm dalga boyunda ölçümler yapıldı. cDNA sentezi için her örnekten 500ng total RNA alındı ve bu ddH₂O ile 9,4 μ L’ye tamamlandı. Üzerine 1 μ L random primer ve 1 μ L oligo-dt primer karışımı eklendi. Toplamda 11.4 μ L olan karışım 65°C de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Her örnek için Buffer 5x4 μ L, Reverse transkriptaz 1.1 μ L, protektor RNAase inhibitör 0.5 μ L, Deoksinükleotit mix 2 μ L ve DTT 1 μ L, toplamda 8.6 μ L olacak şekilde hazırlandı. Primerlerle inkübe edilen RNA’larla komponent vorteks cihazı ile karıştırıldı ve 29°C’de 10 dakika, 48°C’de 60 dakika ve 85°C’de 5 dakika inkübe edildi. Çıkan örnekler -20°C’de saklandı.

3.10 - İstatistiksel Analiz

MTT sonucunda elde ettiğimiz veriler IBM SPSS 21 programı ile değerlendirildi. Tek yönlü ANOVA testi ve Tukey’s karşılaştırma testi uygulandı. P değeri 0.05’den küçük olanlar anlamlı kabul edildi.

PCR bulgularımızın istatistiksel değerlendirmesi için GraphPad Prism6 programı kullanılmıştır. Öncelikle gruplar Shapiro-Wilk Normal Test kullanılarak normal dağılım gösterip göstermediğine göre analiz edilmiştir. Normal dağılım gösteren veriler tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirildikten sonra gruplar arasındaki farklar Tukey testi ile analiz edilmiştir. Normal dağılım göstermeyen veriler ise Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildikten sonra gruplar arasındaki farklılıklar Dunn testi ile analiz edilmiştir. p değeri 0.05’den küçük olanlar anlamlı kabul edilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir.

4- BULGULAR

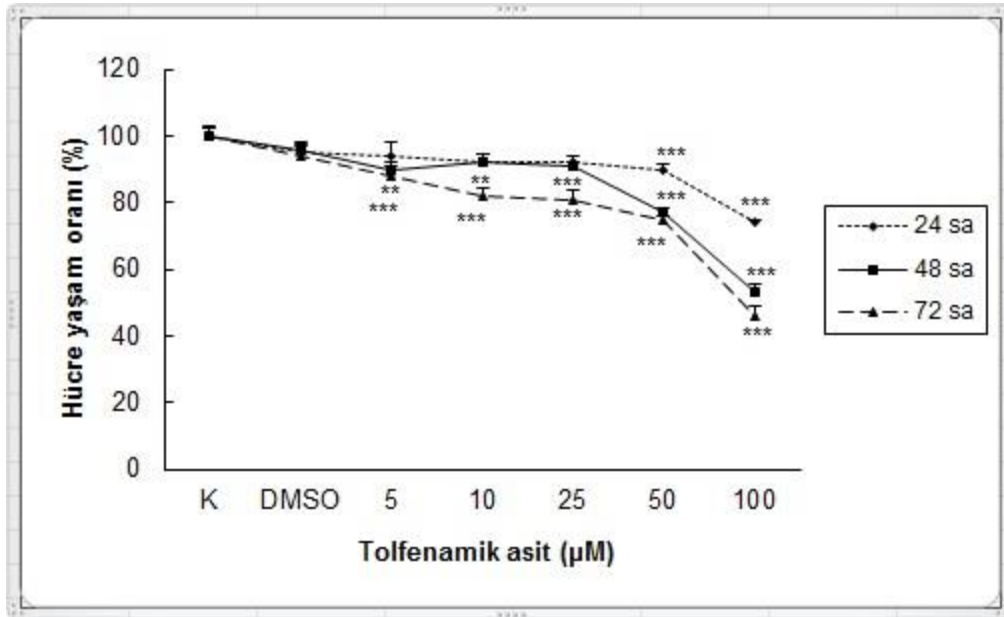
4.1 – İlaçların Hücre Canlılığına Etkileri

TA'nın hücre canlılığına etkisi MTT yöntemi ile belirlendi ve elde ettiğimiz sonuçlar karşılaştırıldı.

4.1.1 MTT yöntemi bulguları

4.1.1.1. TA'nın H4IIE hücrelerine 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulanması

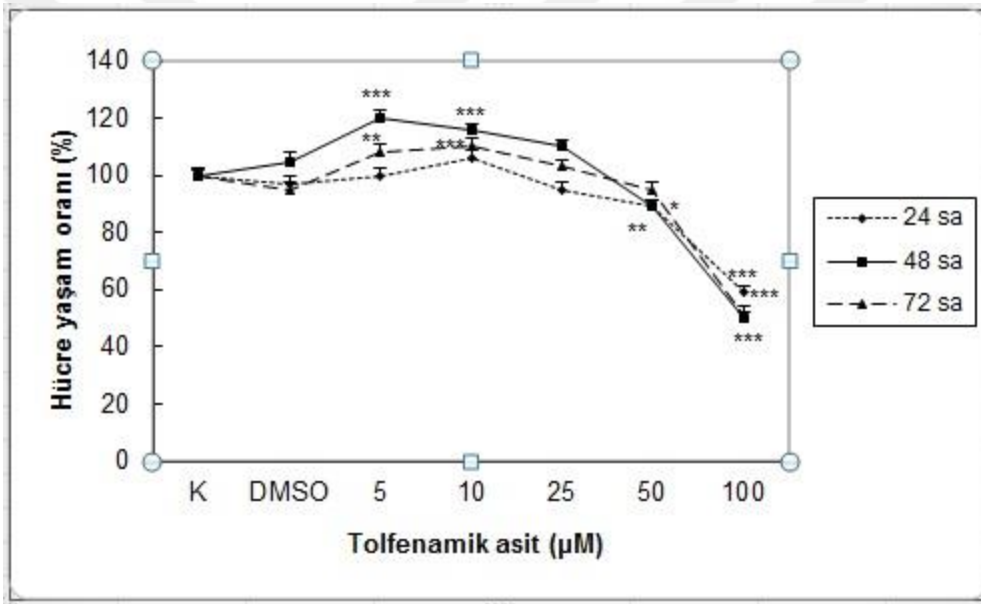
Çözücü olarak kullandığımız DMSO, TA'nın en yüksek dozundaki miktarda hücrelerin yaşam oranlarında herhangi bir değişikliğe neden olmadı. H4IIE hücrelerine 24 saat süreyle 5, 10, 25, 50 ve 100 μM TA uygulaması sonucu elde edilen yaşayan hücre oranları %94, %92, %92, %90 ($p < 0.001$), %74 ($p < 0.001$) olarak belirlenmiştir. 48 saat süreyle aynı dozlarda elde edilen yaşam oranı %90 ($p < 0.01$), %92 ($p < 0.01$), %91 ($p < 0.001$), %77 ($p < 0.001$), %53 ($p < 0.001$) olarak belirlenmiştir. 72 saat süreyle aynı dozlarda elde edilen yaşam oranları ise %88 ($p < 0.001$), %82 ($p < 0.001$), %81 ($p < 0.001$), %75 ($p < 0.001$), %46 ($p < 0.001$) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1.1.1.1).



Şekil 4.1.1.1.1. TA'nın belirtilen dozlarda H4IIE hücre canlılığı üzerindeki etkileri. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

4.1.1.2. TA'nın HepG2 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulanması

Çözücü olarak kullandığımız DMSO, TA'nın en yüksek dozundaki miktarında hücrelerin yaşam oranlarında herhangi bir değişikliğe neden olmadı. HEPG2 hücrelerine 24 saat süreyle 5, 10, 25, 50 ve 100 μM TA uygulaması sonucu elde edilen yaşayan hücre oranları %100, %106, %95, %89 ($p < 0.01$), %59 ($p < 0.001$) olarak belirlenmiştir. 48 saat süreyle aynı dozlarda elde edilen yaşam oranı %120 ($p < 0.001$), %116 ($p < 0.001$), %110, %89 ($p < 0.05$), %50 ($p < 0.001$) olarak belirlenmiştir. 72 saat süreyle aynı dozlarda elde edilen yaşam oranları ise %108 ($p < 0.01$), %110 ($p < 0.001$), %103, %95, %51 ($p < 0.001$) olarak belirlenmiştir. (Şekil 4.1.1.2.1)



Şekil 4.1.1.2.1. TA'nın 5, 10, 25, 50 ve 100 μM dozlarında HepG2 hücre canlılığı üzerindeki etkileri. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

4.2 – PCR Sonuçları

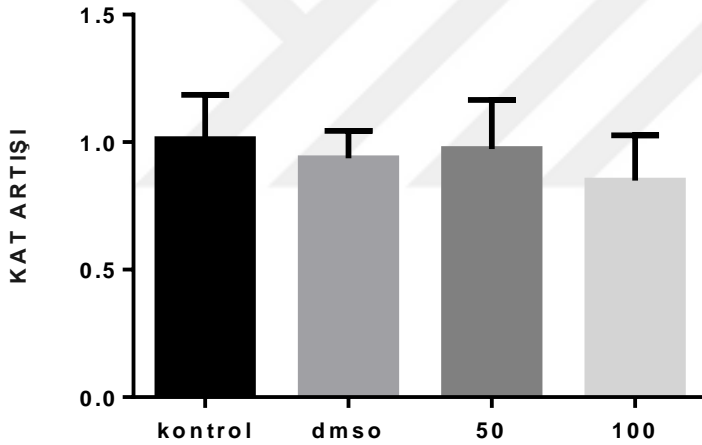
Deneylerimizin MTT testinden sonraki aşamalarına H4IIE hücreleri ile ve etkili bulunan sırasıyla % 10 ve % 26 ölüme neden olan 50 ve 100 μM TA konsantrasyonları ile devam edildi. 24 saat süreyle 50 ve 100 μM TA ile muamele edilen veya sadece besiyeri ile beslenen H4IIE hücreleri kaspaz-3, IL-1 β , NF- κB ve TNF- α gen ifadenmesi yönünden PCR tekniği ile değerlendirildi. Sonuçlarımız birbirinden bağımsız en az 3 deneyin ortalamasını ifade etmektedir.

4.2.1. TA'nın H4IIE hücrelerinde kaspaz-3 gen ifadenmesi üzerindeki etkisi

TA, kaspaz-3 gen ifadenme düzeyinde gruplar arasında istatistiksel bir fark göstermemektedir ($p>0.05$) (şekil 4.2.1.1 ve tablo 4.2.1.1)

Tablo 4.2.1.1. TA ile muamele edilen H4IIE hücrelerinde belirlenen kaspaz-3 aktivitesinin sonuçlarının kontrole karşılaştırılması.

Grup	Kontrol	DMSO	50 μ M	100 μ M	p
Ortalama kat artışı	1.01	0.93	0.97	0.84	0.39



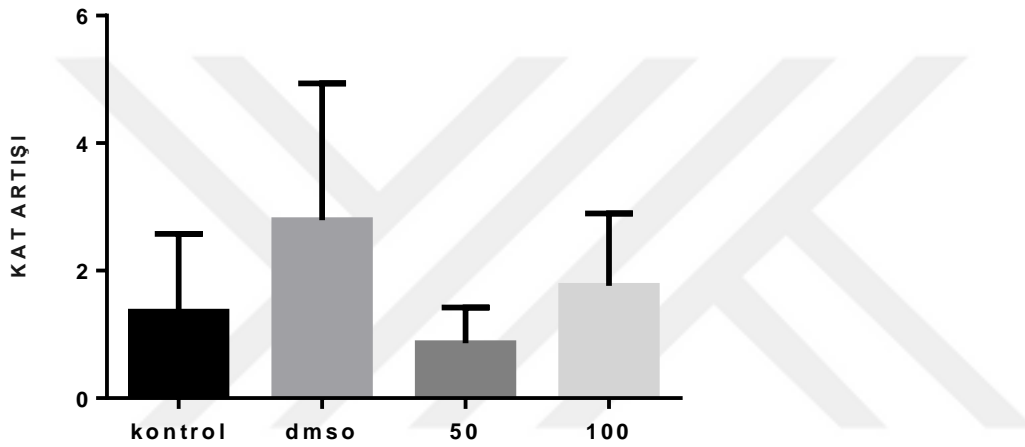
Şekil 4.2.1.1. TA ve kontrol gruplarının H4IIE hücrelerinde kaspaz-3 gen ifadenme düzeyindeki etkisi ($p<0.05$).

4.2.2. TA'nın H4IIE hücrelerinde IL-1 β gen ifadenmesi üzerindeki etkisi

Sitotoksik hücre ölümünde, hızla artan IL-1 β aktivitesi ve apoptoz arasındaki ilişkiyi incelemek amaçlanmıştır. Ancak IL-1 β gen ifadenmesi düzeyinde gruplar arasında istatistiksel bir farka neden olmamıştır (şekil 4.2.2.1 ve tablo 4.2.2.1).

Tablo 4.2.2.1. TA ile muamele edilen H4IIE hücrelerinde belirlenen IL-1 β aktivitesinin sonuçlarının kontrolle karşılaştırılması.

Grup	Kontrol	DMSO	50 μ M	100 μ M	p
Ortalama kat artışı	1.35	2.79	0.86	1.76	0.15



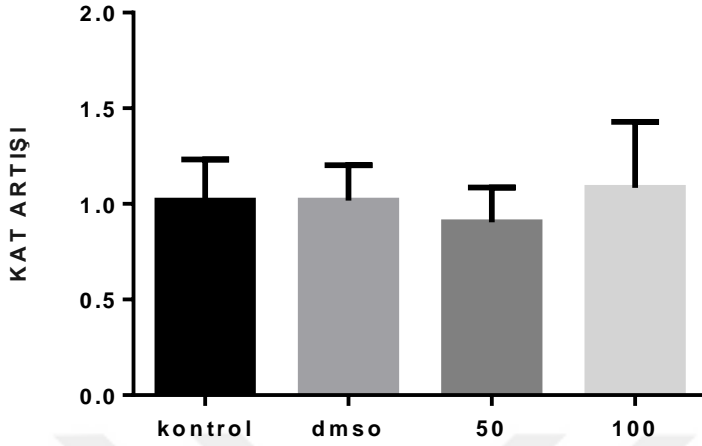
Şekil 4.2.2.1. TA ve kontrol gruplarının H4IIE hücrelerinde IL-1 β gen ifadenme düzeyi üzerindeki etkisi (p>0.05).

4.2.3. TA'nın H4IIE hücrelerinde NF- κ B gen ifadenmesi üzerindeki etkisi

TA, NF- κ B gen ifadenme düzeyinde 100 μ M'da artışa sebep olmuş ancak gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır (p>0.05) (şekil 4.2.3.1 ve tablo 4.2.3.1).

Tablo 4.2.3.1. TA ile muamele edilen H4IIE hücrelerinde belirlenen NF- κ B aktivitesinin sonuçlarının kontrolle karşılaştırılması.

Grup	Kontrol	DMSO	50 μ M	100 μ M	p
Ortalama kat artışı	1.01	1.01	0.90	1.84	0.6



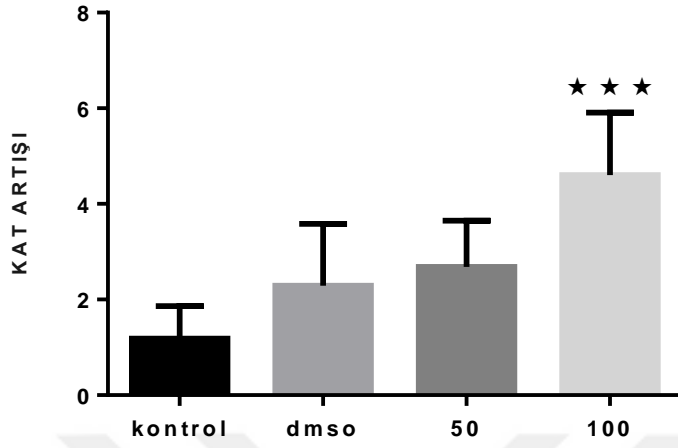
Şekil 4.2.3.1. TA ve kontrol gruplarının H4IIE hücrelerinde NF-κB gen ifadenme düzeyi üzerindeki etkisi ($p>0.05$).

4.2.4. TA'nın H4IIE hücrelerinde TNF-α gen ifadenmesi üzerindeki etkisi

Sitotoksik ölüm sürecinde bir sitokin olarak yükselen belirteçlerden birisi olan TNF-α gen ekspresyonu, 50 ve 100 µM TA uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre katlı olarak artış göstermiştir ($p>0.05$) (şekil 4.2.4.1 ve tablo 4.2.4.1).

Tablo 4.2.4.1. TA ile muamele edilen H4IIE hücrelerinde belirlenen TNF-α aktivitesinin sonuçlarının kontrolle karşılaştırılması.

Grup	Kontrol	DMSO	50µM	100µM	p
Ortalama kat artışı	1.18	2.28	2.68	4.60	0.0013



Şekil 4.2.4.1 TA ve kontrol gruplarının H4IIE hücrelerinde TNF- α gen ifadenme düzeyi üzerindeki etkisi ($p>0.05$).

5- TARTIŞMA

HSK, dünyada beşinci en sık görülen primer karaciğer kanseridir. Dünya çapında kansere bağlı ölümlerde üçüncü sıraya gelmiştir (El-Serag, 2018). Tedavisi zor olan bu kanser tipindeki yüksek ölüm oranı, bilim insanlarını yeni yollar ve yeni ilaçlar aramaya teşvik etmiştir. Biz de çalışmamızda HepG2 ve H4IIE hücrelerini 24, 48 ve 72 saat süreyle 5, 10, 25, 50, 100 µM TA dozlarına maruz bıraktık. Deney sonucunda yaşayan hücreler istatistiksel anlamda kayda değer bir oranda azalmıştır. Spektrofotometrik ölçüm teknikleri ile yapılan bu çalışma RT-PCR ile desteklenmiştir.

TA, iyi tolere edilebilen, düşük yan etkiye sahip bir COX2 inhibitörü olduğu için diğer NSAİ ilaçlara nazaran daha etkilidir. Ağrı kesici, ateş düşürücü özellikleri ile hayvan modellerinde migren ve romatoid artrit gibi hastalıkların tedavilerindeki başarısı kanıtlanmıştır (Colon, 2011). Son yıllarda yapılan pek çok çalışmada TA'nın kanserli hücre çoğalmasını baskıladığı ve metastazı yavaşlattığı bildirilmiştir (Abdelrahim, 2006). Bu sebeple çalışmamızda sıçan ve insan karaciğerinin malign hücrelerinde TA'nın etkisini araştırmayı hedefledik.

HEPG2 hücrelerine 24 saat süreyle 5, 10, 25, 50 ve 100 µM TA uygulaması sonucu elde edilen yaşayan hücre oranları %100, %106, %95, %89, %59 olarak belirlenmiştir. 48 saat süreyle aynı dozlarda elde edilen yaşam oranları %120, %116, %110, %89, %50 olarak belirlenmiştir. 72 saat süreyle aynı dozlarda elde edilen yaşam oranları ise %108, %110, %103, %95, %51 olarak belirlenmiştir. Düşük dozda uygulanan TA, 48 ve 72 saatte sadece insan hücresi olan HepG2 hücre sayısında anlamlı bir artışa neden olmuştur. Son yıllarda yapılan bir çalışmanın sonuçları da bizim sonuçlarımızla paralellik göstermektedir. HCT116 ve HT29 kolorektal kanser hücreleri üzerine kurkumin ve TA'nın birlikte etkisini araştıran çalışmada normal hücre olarak kullanılan H9C2 kardiyomiyosit hücrelerinde 25 ve 50 µM TA dozunun 48 saatte hücre canlılık oranını % 7 ve % 9 oranında arttırdığı bulunmuştur. Ancak bu küçük artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (Umesh 2015).

H4IIE hücrelerine 24 saat süreyle 5, 10, 25, 50 ve 100 µM TA uygulaması sonucu elde edilen yaşayan hücre oranları %94, %92, %92, %90, %74 olarak belirlenmiştir. 48 saat süreyle aynı dozlarda elde edilen yaşam oranı %90, %92, %91, %77, %53 olarak belirlenmiştir. 72 saat süreyle aynı dozlarda elde edilen yaşam oranları ise %88, %82, %81, %75, %46 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre TA ile muamele edilen sıçan ve insan karaciğer kanser hücrelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı ve bu azalmanın süre ve doz ile doğru orantılı olduğu belirlenmiştir.

Sonuçlarımızı destekleyen çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda TA, akciğer (Colon, 2011) ve özefagus (Papineni, 2009) kanserlerinde hücre büyümesini baskılamış ve metastazı yavaşlatmıştır. TA'nın diğer NSAİ ilaçlara nazaran kanserli hücreler üzerine apoptozu uyarıcı etkisi kanıtlanmıştır (Colon, 2011). Bu etkileri de COX enzimleri aracılığı ile yapmaktadır. Çalışmamızda 50 ve 100 µM TA uygulanan gruplarda TNF-α aktivitesi kontrol grubuna göre katlı olarak artmıştır (tablo 4.2.4.1 ve şekil 4.2.4.1). Endojen TNF-α T hücrelerinde reseptör aracılı apoptozisi indüklemektedir (Zheng L, Fisher G, Miller 1995). Ancak TNF-α'nın kanser oluşum mekanizması üzerine etkisi hala net olarak bilinmemektedir. DNA tamirini baskılayıcı etkilere sahip olduğu düşünülmektedir (Szlosarek PW, Balkwill FR, 2003). Umesh ve arkadaşları HCT116 ve HT29 kolorektal kanser hücreleri üzerine kurkumin ve TA'nın birlikte etkisini araştıran çalışmada TA ve kurkuminin kombine kullanımında kaspaz-3 ve kaspaz-7 aktivitesinde katlı artış görülmüş ve hücrelerin yarısından fazlası ölmüştür (Umesh 2015).

COX enziminin iki alt tipi olan COX-1 ve COX-2 enzimleri yapısal benzerliklerine rağmen farklı fonksiyonlara sahiptirler. COX-2 ekspresyonu ihtiyaç halinde sentezlenen COX-1'den farklı olarak sitokinler, hormonlar, mitojenler ve büyüme faktörleri tarafından uyanılmaktadır. Bu durum enflamatuar hastalıklar ve kanserlerde miktarının yüksek olmasını açıklamaktadır. Çalışmalar COX-2 ile üretilen prostaglandinlerin tümör hücrelerinin çoğalmasında, sağ kalımında, anjiojenezde ve HSK patogeneğinde etkili olduğunu göstermiştir (Gupta RA 2001).

NSAİ ilaçlar, COX-1 enzimini azaltırken COX-2 sentezini ve peroksizom proliferator aktive edici reseptör (PPAR) alfa ve gamma ligandlarını arttırmaktadır. PPAR'lar ligandlarla aktifleşen transkripsiyonel düzenlemeyi gerçekleştiren nükleer reseptörlerdir. PPAR delta, hücre replikasyonu, hücre büyümesi, farklılaşması, tümörögenез ve apoptozda rol alan hazır sentezlenmiş halde bekleyen ve prostaglandin ve analogları tarafından aktifleştirilen bir alt tipidir (E.A.Meade J.M.Lehmann, 1999). Glinghammer ve arkadaşlarının çalışmasında PPAR delta aktivasyonu sonucu hücresel çoğalma ve HSK'da COX-2 gen ekspresyonu artışı tespit edilmiştir (Glinghammer 2003). NSAİ bir ilaç olan Sulindac, PPAR'ı inhibe etmekte ve kolorektal tümör oluşumunu baskılamaktadır (T.C.He 1999).

NSAİ ilaçların anti tümöral etkilerinin birkaç bilinen mekanizması da Bcl-2 ekspresyonunu azaltmaları, seramid üretimini arttırmaları ve NF-κB sinyal yolağını engellemeleridir (Liu XH 1998, Yin MJ, 1998). NF-κB çoğu tümör gelişiminde aktif rol oynayan protein ailesi üyesidir. Tüm hücrelerde inaktif halde bulunmaktadır. İnflamasyonu ve büyümeyi düzenleyen 200'den fazla geni düzenlemektedir (Garg, 2002, Shishodia, 2004). HSK (Hep3B ve

HepG2) hücrelerinde artmış COX-2 gen ekspresyon oranı gösterilen bir çalışmada serine/treonine protein kinaz B(Akt) fosforilasyonu selektif COX-2 inhibitörü olan selekoksib kullanılarak azaltılmış ve böylece apoptozun indüklendiği sonucuna ulaşılmıştır (Leng 2003). Bizim çalışmamızda da 100 µM TA'nın HepG2 hücrelerinde 72 saat sonunda kalan hücre sayısını anlamlı olarak azalttığı saptanmıştır.

Çalışmamızda, HepG2 hücrelerinde TA dozuna ve ilk 48 saatte zamana bağlı olarak hücre ölümünün arttığı bulunmuştur. Ayrıca TA'nın H4IIE hücrelerinde doz ve zamana bağlı olarak antiproliferatif etki gösterdiği ve TNF-α gen ifadenmesini arttırarak apoptozu tetiklediği ortaya konmaya çalışılmıştır.



6- SONUÇ VE ÖNERİLER

Karaciğer kanseri tanısı ve tedavisi en zor hastalıkların başında gelmektedir. Günümüzdeki tedavi yöntemleri hastaların yaşam süresini kalitesini arttırmayı hedeflese de bunu başaramamaktadır. Kullanılan kemoterapi ilaçlarının yan etkilerinin hastalar tarafından tolere edilmesi son derece zordur. Bu nedenle yan etkileri en az, kanserli hücre öldürücülüğü en yüksek ilaç arama çalışmaları devam etmektedir. Çalışmamızda TA kullanmamızın nedeni, diğer NSAİ ilaçlara göre daha az yan etkisi bulunmasıdır.

Bu çalışmada TA doz bağımlı olarak HepG2 ve H4IIE hücre hatlarında, kanserli hücrelerin çoğalmasını baskılamaktadır. TA'nın 5, 10, 25, 50 ve 100 μM 'lık dozları deneye alınmıştır. 50 ve 100 μM 'lık dozlarda anlamlı bir hücre ölümü görülmüştür. Ayrıca bu dozlarda TNF- α gen ifadesinde artışa neden olarak apoptozu tetiklediği gösterilmiştir. NF- κB gen ifadesinde anlamlı olmasa da bir artış söz konusudur. Bundan sonraki çalışmalarda apoptozu düzenleyen regülatörlerden Bcl-2 ve Bax gen ifadeleri çalışılabilir.

TA'nın diğer ilaçlarla kombine olarak kullanımının etkisini güçlendirebileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca hayvanlar üzerinde yapılacak in vivo deneylerle etkisinin ortaya konmasının kanser tedavisinde yeni bir yol açabileceğine ve bilime ışık tutacağına inanmaktayız.

7-KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdelrahim, M., Baker, C. H., Abbruzzese, J. L., & Safe, S. (2006). *Tolfenamic Acid and Pancreatic Cancer Growth, Angiogenesis, and Sp Protein Degradation*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 98(12), 855–868.
- Abou-Alfa, G. K., Johnson, P., Knox, J. J., Capanu, M., Davidenko, I., Lacava, J., Saltz, L. B. (2010). *Doxorubicin Plus Sorafenib vs Doxorubicin Alone in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma*. JAMA, 304(19), 2154.
- Adams JM, Cory S. Life or death decions by the Bcl-2 family. Trends. Biochem Sc2001;26:61-6.
- Aggarwal, B. B., Shishodia, S. (2004). *Suppression of the Nuclear Factor- κ B Activation Pathway by Spice-Derived Phytochemicals: Reasoning for Seasoning*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1030(1), 434–441.
- Ahmed, S., Sheraz, M. A., Ahmad, I. (2018). *Tolfenamic Acid. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 43, 255–319.
- Altekruse, S. F., McGlynn, K. A., Reichman, M. E. (2009). *Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005*. J Clin Oncol, 27(9), 1485–1491.
- Alter, H., Block, T., Brown, N., Brownstein, A., Brosgart, C., Chang, K.-M., Zoulim, F. (2018). *A research agenda for curing chronic hepatitis B virus infection*. Hepatology, 67(3), 1127–1131.
- American Association for Cancer Research., S., *International Cancer Research Foundation.*, M., *William H. Donner Foundation.*, A., *Sanchez-Arellano, B., Gordon, S., Mizutani, Y., Bonavida, B. (2006). Cancer research: the official organ of the American Association for Cancer Research*. Inc. Cancer Research (Vol. 66). Waverly Press.
- Ardoin, S. P., & Sundy, J. S. (2006). Update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Current Opinion in Internal Medicine, 5(4), 372–377

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Basha, R., Ingersoll, S. B., Sankpal, U. T., Ahmad, S., Baker, C. H., Edwards, J. R., Abdelrahim, M. (2011). *Tolfenamic acid inhibits ovarian cancer cell growth and decreases the expression of c-Met and survivin through suppressing specificity protein transcription factors*. *Gynecologic Oncology*, 122(1), 163–170.
- Berrino, F., De Angelis, R., Sant, M., Rosso, S., Lasota, M. B., Coebergh, J. W., & Santaquilani, M. (2007). *Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995–99: results of the EurocarE-4 study*. *The Lancet Oncology*, 8(9), 773–783.
- Bertagnolli, M. M. (2003). *The potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) for colorectal cancer prevention*. *Journal of Surgical Oncology*, 84(3), 113–119.
- Black, W. C., Bayly, C., Belley, M., Chan, C.-C., Charleson, S., Denis, D., Prasit, P. (1996). *From indomethacin to a selective COX-2 inhibitor: Development of indolalkanoic acids as potent and selective cyclooxygenase-2 inhibitors*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 6(6), 725–730.
- Bruix, J., & Sherman, M. (2005). *Management of hepatocellular carcinoma*. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 42(5), 1208–1236.
- Choi, E.-S., Shim, J.-H., Jung, J.-Y., Kim, H.-J., Choi, K.-H., Shin, J.-A., Cho, S.-D. (2011). *Apoptotic effect of tolfenamic acid in androgen receptor-independent prostate cancer cell and xenograft tumor through specificity protein 1*. *Cancer Science*, 102(4), 742–748.
- Colon, J., Basha, M. R., Madero-Visbal, R., Konduri, S., Baker, C. H., Herrera, L. J., Abdelrahim, M. (2011). *Tolfenamic acid decreases c-Met expression through Sp proteins degradation and inhibits lung cancer cells growth and tumor formation in orthotopic mice*. *Investigational New Drugs*, 29(1), 41–51.
- Çakarto, M. (2008). *Preeklampsi patogenezinde plasental apoptozisin yeri*.
- Deleforge, J., Thomas, E., Davot, J. L., Boisrame, B. (1994). *A field evaluation of the efficacy of tolfenamic acid and oxytetracycline in the treatment of bovine respiratory disease*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 17(1), 43–47.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Dubois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., Gupta, R. A., Simon, L. S., A. Van De Putte, L. B., Lipsky, P. E. (1998). *Cyclooxygenase in biology and disease*. The FASEB Journal, 12(12), 1063–1073.
- El-Serag, H. B., Rudolph, K. L. (2007). *Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis*. Gastroenterology.
- Eskerod, O. (1994). *Gastrointestinal Tolerance Studies on Tolfenamic Acid in Humans and Animals*. Pharmacology & Toxicology, 75, 44–48.
- Flusberg, D. A., Sorger, P. K. (2015). *Surviving apoptosis: life–death signaling in single cells*. Trends in Cell Biology, 25(8), 446–458.
- Gish, R. (2007). *Improving outcomes for patients with chronic hepatitis B*. Hepatol.
- Green, D. R. (2000). *Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors*. Cell, 102(1), 1–4.
- Greenfield, C., Fowler, M. J. F., Wankya, B. M., Shah, M. V., Okoth, F., Monjardino, J., Gatei, D. (1985). *The molecular relationship between HBV infection and hepatoma in Kenya*. East African Medical Journal, 62(11), 791–793.
- He, T. C., Chan, T. A., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1999). PPAR δ Is an APC-Regulated Target of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. Cell, 99(3), 335–345.
- He, X., Guo, X., Zhang, H., Kong, X., Yang, F., Zheng, C. (2018). *Mechanism of action and efficacy of LY2109761, a TGF- β receptor inhibitor, targeting tumor microenvironment in liver cancer after TACE*. Oncotarget, 9(1), 1130–1142.
- Healy, C. G., Simons, J. W., Carducci, M. A., Dewese, T. L., Bartkowski, M., Tong, K. P., Bolton, W. E. (1998). *Impaired expression and function of signal-transducing zeta chains in peripheral T cells and natural killer cells in patients with prostate cancer*. Cytometry, 32(2), 109–119.
- Hsi, L. C., Eling, T. E. (2003). *Carcinogenesis Involving Cyclooxygenase and Lipoxygenase*, 245–255.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Ishak, K., in, H. Z.-S., 1987. *Hepatotoxic effects of the anabolic/androgenic steroids*. (1987) by Thieme Medical
- Jemal, A., Bray, F., Ferlay, J. (1999). *Global Cancer Statistics: 2011*. CA Cancer J Clin, 49(2), 1,33-64.
- John F. Butterworth, John D. Wasnick, David C. Mackey, 2016. *Klinik Anesteziyoloji*, Güneş Tıp Kitabevleri.
- Kane, M. A., Hadler, S. C., Lee, L., Shapiro, C. N., Cui, F., Wang, X., Kumar, R. (2013). *The inception, achievements, and implications of the China GAVI Alliance Project on Hepatitis B Immunization*. Vaccine, 31, J15–J20.
- Klinghammer, L., Urschel, K., Cicha, I., Lewczuk, P., Raaz-Schrauder, D., Achenbach, S., Garlichs, C. D. (2013). *Impact of telmisartan on the inflammatory state in patients with coronary atherosclerosis – Influence on IP-10, TNF- α and MCP-1*. Cytokine, 62(2), 290–296.
- Kroemer G, Galluzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Physiol Rev. 2007;87:99-163.
- Lavanchy, D. (2009). *The global burden of hepatitis C*. Liver International, 29(s1), 74–81.
- Law, B. Y. K., Chan, W. K., Xu, S. W., Wang, J. R., Bai, L. P., Liu, L., Wong, V. K. W. (2015). *Natural small-molecule enhancers of autophagy induce autophagic cell death in apoptosis-defective cells*. Scientific Reports, 4(1), 5510.
- Leng, J. (2003). *Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular carcinoma cell growth through Akt activation: Evidence for Akt inhibition in celecoxib-induced apoptosis*. Hepatology, 38(3), 756–768.
- Masferrer, J. L., Zweifel, B. S., Manning, P. T., Hauser, S. D., Leahy, K. M., Smith, W. G., Seibert, K. (1994). *Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91(8), 3228–3232.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Meade, E. A., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., Prescott, S. M. (1999). *Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells*. The Journal of Biological Chemistry, 274(12), 8328–8334.
- Merlo, L. M. F., Pepper, J. W., Reid, B. J., Maley, C. C. (2006). *Cancer as an evolutionary and ecological process*. Nature Reviews Cancer.
- Mitchell, J. A., Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R. J., Vane, J. R. (1993). *Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90(24), 11693–11697.
- Nazlıgöl, Y., Uzunköy, A., Üniversitesi Tıp Fakültesi, H., Bilim Dalı ve, G., Cerrahi Anabilim Dalı, *Karaciğerin primer malign tümörlerine genel bakış*.
- Okami, J., Yamamoto, H., Fujiwara, Y., Tsujie, M., Kondo, M., Noura, S., Monden, M. (1999). *Overexpression of cyclooxygenase-2 in carcinoma of the pancreas*. Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 5(8), 2018–2024.
- Ozer, A., Yakupogullari, Y., Beytur, A., Beytur, L., Koroglu, M., Salman, F., Aydogan, F. (2011). *Risk factors of hepatitis B virus infection in Turkey: A population-based, case-control study: Risk Factors for HBV Infection*. Hepatitis Monthly, 11(4), 263–268.
- Papineni, S., Chintharlapalli, S., Abdelrahim, M., Lee, S. O., Burghardt, R., Abudayyeh, A., Safe, S. (2009). *Tolfenamic acid inhibits esophageal cancer through repression of specificity proteins and c-Met*. Carcinogenesis, 30(7), 1193–1201.
- Paulie, S., Rosén, A., Ehlin-Henriksson, B., Braesch-Andersen, S., Jakobson, E., Koho, H., Perlmann, P. (1989). *The human B lymphocyte and carcinoma antigen, CDw40, is a phosphoprotein involved in growth signal transduction*. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 142(2), 590–595.
- Role of age and race in the risk of hepatocellular carcinoma in veterans with hepatitis B virus infection*. Cghjournal.org. (2018)

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

- Rühl, R., Seidensticker, M., Peters, N., Mohnike, K., Bornschein, J., Schütte, K., Ricke, J. (2009). *Hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis: assessment of the liver function after Yttrium-90 radioembolization with resin microspheres or after CT-guided high-dose-rate brachytherapy*. Digestive Diseases (Basel, Switzerland), 27(2), 189–199.
- Ruidong, X., Jing, L., Fan, B., Xinwei, W., Junfang, J., Yinying, L. (2017). *A race to uncover a panoramic view of primary liver cancer*. Cancer Biology & Medicine, 14(4), 335.
- Sankpal, U. T., Abdelrahim, M., Connelly, S. F., Lee, C. M., Madero-Visbal, R., Colon, J., Basha, R. (2012). *Small molecule tolfenamic acid inhibits PC-3 cell proliferation and invasion in vitro, and tumor growth in orthotopic mouse model for prostate cancer*. The Prostate, 72(15), 1648–1658.
- Sankpal, U. T., Nagaraju, G. P., Gottipolu, S. R., Hurtado, M., Jordan, C. G., Simecka, J. W., Basha, R. (2016). *Combination of tolfenamic acid and curcumin induces colon cancer cell growth inhibition through modulating specific transcription factors and reactive oxygen species*. Oncotarget, 7(3), 3186–3200.
- Shah, S., Mahmud, N., Mftah, M., (2006), *Chronic but not acute conjugated linoleic acid treatment inhibits deoxycholic acid-induced protein kinase C and nuclear factor- κ B activation in human colorectal*.
- Solomon, D., Version, D. F, (2009), *Overview of selective COX-2 inhibitors*.
- Szlosarek, P. W., Balkwill, F. R. (2003). *Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours*. The Lancet. Oncology, 4(9), 565–573.
- Szlosarek, P., Oncology, F. B.T. lancet, (2003), *Tumour necrosis factor α : a potential target for the therapy of solid tumours*.
- Tracey, K. J., Cerami, A. (1993). *Tumor necrosis factor: an updated review of its biology*. Critical Care Medicine, 21(10 Suppl), S415-22.
- Von Mering, J., *Beitrage zur Kenntniss der antipyretica*. Ther Monatsch, 7, 577-587.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam ediyor)

Wang, J. Y., *of glycyrrhizin on NF- κ B binding activity in CC14- plus ethanol-induced liver cirrhosis in rats*. *Liver*, 18(3), 180–185.

Zachariae, E., Sylvest, J. (1972). *Osteoarthritis of the Knee Treated with Tolfenamic Acid*. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 1(3), 97–99.

Zheng, L., Fisher, G., Miller, R., Peschon, J., Nature, D. L., (1995). *Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor*. Springer.



8- ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Süha AKIN
Doğum tarihi ve yeri : 03.05.1986 / Kütahya
Uyruğu : TC
Medeni durumu : Evli
İletişim adresleri : suhabio@gmail.com

Eğitim Durumu

İlkokul : Şeker İlkokulu Eskişehir, 1998
İlköğretim : Hüseyin Saim Ekim İlköğretim Okulu İstanbul,
2000
Lise : Demirci Lisesi (YDA) Manisa, 2004
Üniversite : ESOGÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü,
2012