

MDAH-2774 İnsan Over Kanseri Üç Boyutlu Hücre Kültüründe Farklı İlaç Etkilerinin Nitrik Oksit Sentaz Değişiklikleri ile İncelenmesi

Şule Ayla¹, Gülperi Öktem², Ayhan Bilir³

¹Şanlıurfa Kadın Hastalıkları ve Doğum Hastanesi, Şanlıurfa

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir

³İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

Özet

Amaç: MDAH-2774 insan over kanseri iki ve üç boyutlu hücre kültüründe farklı ilaç etkilerinin hücre proliferasyonu ve nitrik oksit sentaz değişiklikleri ile incelenmesidir.

Yöntem: İki boyutlu kültürlerde ilaçların ayrı ayrı ve birlikte kullanımları 24, 48, 72 ve 96. saatlerde hücre çoğalması açısından, Üç boyutlu kültürlerde 24 ve 96. saatlerde uyarılabilir (indüklenebilir) nitrik oksit sentaz ve endotelial nitrik oksit sentaz aktivitesi açısından immünohistokimyasal yöntemle incelendi.

Bulgular: Parasetamol, Gemsitabine ve Gemsitabine + Parasetamol ve Gemsitabine + Resveratrol kombinasyon gruplarında bu ilaçların kullanılması kontrole göre tüm saatlerde hücre sayısını anlamlı bir şekilde azalttı ($p < 0,05$). Yapılan immunohistokimyasal analizler Gemsitabine'in MDAH-2774 hücreleri ile tek başına veya ilaç kombinasyonu ile karşılaştırıldığında nitrik oksit sentaz ve endotelial nitrik oksit sentaz immunoreaktivitesinde artışa neden olduğunu göstermiştir. İmmunoreaktivite 96 saatte, 24 saate göre belirgin olarak artmıştır.

Sonuç: İlaçların tek tek ve kombinasyon halinde kullanımı tüm saat dilimlerinde hücre proliferasyonunu azaltmış, nitrik oksit sentaz ve endotelial nitrik oksit sentaz aktivitesini artırmıştır.

Anahtar kelimeler: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz, endotelial nitrik oksit sentaz, MDAH-2774, gemsitabine, resveratrol, parasetamol

Cerrahpaşa Tıp Derg 2009; 40: 88-96

Examination of the different medicine effects at MDAH-2774 human ovary cancer three dimensional cell culture with nitric oxide synthase changing

Abstract

Objectives: The purpose of our study is to examine the effects of the various medicines at the three dimensional MDAH-2774 human ovary cancer culture with cell proliferation and nitric oxide synthase changing.

Methods: Using of medicines at the two dimensional cultures jointly or severally was examined by immunohistochemical method in terms of cell increasing at the 24th, 48th, 72nd and 96th hours and in terms of activities of excitable (inducible) nitric oxide synthase and endothelial nitric oxide synthase at the tree dimensional cultures.

Results: Using of these medicines in Paracetamol, gemsitabine and Gemsitabine + Paracetamol and Gemsitabine + Resveratrol combination groups, reduced the number of the cells at all hours according to the control ($p < 0,05$). When performed immunohistochemical analyses were individually compared with the cells of MDAH-2774 or medicine combination, it indicated that caused increasing at inducible nitric oxide synthase and endothelial nitric oxide synthase immunoreactivity. Immunoreactivity increased markedly at the 96th hour in comparison with the 24th hour.

Conclusion: Using of the medicines one by one or in combination, reduced the cell proliferation at all hour time zones and increased inducible nitric oxide synthase and endothelial nitric oxide synthase activity.

Key words: Inducible nitric oxide synthase, endothelial nitric oxide synthase, MDAH-2774, gemsitabine, Resveratrol, paracetamol

Cerrahpaşa J Med 2009; 40: 88-96

Alındığı Tarih: 14 Ekim 2009

Yazışma Adresi (Address): Dr. Şule Ayla

Şanlıurfa Kadın Hastalıkları ve Doğum Hastanesi Şanlıurfa

Şanlıurfa

e-posta: suleayla@istanbul.edu.tr

Over kanserleri jinekolojik kanserler arasında çok yüksek mortalite oranına sahiptir. Evre II-I tümörlerde 5 yıllık yaşam süresi %28 olarak bilinmektedir ve hastaların %60'ın da tümör son evresinde teşhis edilebilmektedir. Cerrahi ve sitotoksik tedavinin sı-

doi:10.2399/ctd.09.88

<http://www.ctf.edu.tr/dergi/online/2009v40/s3/a2.pdf>

nırlı başarısı nedeniyle, over kanser hücresinde duyarlılık yaratacak sitotoksik ajanlar tedavide adres olmuştur [1]. Diğer solid tümörlerde olduğu gibi, over kanserinin büyüme ve metastazı, hücreler arası yapının bozulması, hücreyel yapışma, hücre göçü, invazyon, çoğalma ve yeni damar oluşumu ile devam eden ve tümör çevresinde gelişen bir dizi olaylar zincirini gerektirir [2].

Kanser tedavisinde kullanılmayan ancak yapılan çalışmalarda kanser hücreleri üzerinde sitotoksik veya anti-proliferatif etkileri gösterilmiş ilaçlar klasik kemoterapi ajanlarıyla birlikte kullanıldığında umut verici sonuçlar doğurabilmektedir. Bu ilaçlardan biri olan Parasetamol, para-aminofel türevi nonsteroid (steroid olmayan) antiinflamatuar (NSAI) ve narkotik olmayan, ağrı kesici (analjezik) ve ateş düşürücü (antipiretik) etkisi yüksek olan bir ilaçtır. Yapılan çalışmalarda tümör hücreleri üzerine anti-proliferatif etkisi olduğu gösterilmiştir [3].

Gemcitabine (2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine monohydrochloride, Gemzar®) deoksisitidin analogu, pirimidin nükleozidi yapısında bir antimetabolittir. Gemcitabine başlıca etkisini, DNA polimeraz ve ribonükleotid redüktaz enzimleri üzerinden DNA sentezini engelleyerek gösterir [4]. S fazına spesifik bir ilaçtır ve sitotoksik etki gösterir [5].

Resveratrol (3,4,5 trihidroksistilben) ise üzüm tanelerinde bol miktarda bulunan polifenol yapıda doğal bir antioksidan maddedir. Resveratrol'un antioksidan, anti-tümör ve östrojenik etkiye sahip olduğu yolunda bir çok literatür bulunmaktadır [6,7]. Kanser tedavisinde çeşitli doğal veya sentetik maddeler, hücre poliferasyonunu engellemesi ve apoptozu tetiklemesi nedeniyle kullanılmaktadırlar. Polifenolik bileşiklerden resveratrolün de hücre sinyal kaskatında çeşitli mekanizmalarla kanseri önleyici aktivitesi gösterilmiştir [8].

Nitrik oksit (NO) son yıllarda tanınan, birçok biyolojik olayda önemli rolü olan, çok kısa yarı ömürlü bir serbest radikaldir. NO ve diğer bir son ürün olan sitrülilin, argininden NO sentaz (NOS) enzimi aracılığı ile sentezlenir [9,10]. NOS birçok anti-patojenik ve anti-tümoral aktivite de rol oynamaktadır. NOS'ın genetik olarak farklı üç izoformu tesbit edilmiştir: Uyarılabilir (indüklenebilir) nitrik oksit sentaz (iNOS), endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS). eNOS endotelial hücrelerden, kardiyak miyositlerden ve hipokampal piramidal hücrelerden üretilebi-

lidir. iNOS ilk olarak endotoksin ve sitokinler tarafından uyarılan makrofaj ve karaciğer hücrelerinde tanımlanmıştır, tümör hücrelerine sitotoksik ve sitostatik etki oluşturur [11].

Bu çalışmada Parasetamol ve Resveratrolün, pirimidin nükleozidi yapısında bir antimetabolit olan Gemcitabine (2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine monohydrochloride, Gemzar®) ile etkileşimleri, tek tek ve kombinasyon tedavilerine verdiği yanıt incelenecektir. İlaç etkileri iNOS ve eNOS immünoreaktiviteleri değerlendirilerek gösterilecektir.

Gereç ve Yöntem

Hücre Kültürü Koşulları ve Kullanılan İlaçlar

Bu çalışmada Amerikan Hayvan Hücre Kültür Koleksiyonu (ATCC) hücre bankasından sağlanan MDAH-2774 (CRL no: 10303) hücre soyu kullanıldı. MDAH 2774 over tümör hücreleri için besi ortamı, inaktive edilmiş %10 FCS (Fötal Sığır Serumu), %1 NaHCO₃ (Fenol kırmızısı ilaveli), 0.2 mM glutamin, 100 IU/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin içeren RPMI-1640 (Biological Industries) medyumunu kullanıldı. Hücreler bu besi ortamını içeren 25 cm² ve 75 cm²lik flaklarda, iç ortamı %5 CO₂, %95 nem içeren, 37°C olan inkübatör (Sanyo) içinde haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak üretilirdi. Resveratrol (Sigma Saint Louis, USA) etanol içerisinde hazırlandı, Parasetamol (Laboratories UPSA- Bristol Myers Squibb Company) saf su, Gemcitabine (Gemzar; Eli Lilly Company) steril serum fizyolojik ile dilüe edildi.

Deney Protokolleri

Çalışmanın ilk aşamasında, 6 kuyucuklu kültür kaplarının her bir kuyucuğuna %100 canlı 500.00 MDAH-2774 hücresi 5 ml RPMI 1640 medyumunu içinde ekildi. Gemcitabine ve resveratrolün her biri için 0.1; 1; 10; 100 µg/ml konsantrasyonları 100'er µl'lik eşit hacimlerde hücrelere verildi. Parasetamol 40 µg/ml dozu hazırlandı. Kontrol grubuna ise herhangi bir ilaç uygulaması yapılmadı.

Her ilacın her bir dozu için 3'er kuyucuğa ekim yapıldı. Tüm gruplar 24, 48, 72 ve 96. saatler için ekildi ve 37°C'de %5 CO₂ hava karışımında rutubetli ortamda

inkübe edildi. Tüm saatlerin sonunda kuyucuklarda bulunan hücreler %0.05 tripsin ile ayrı ayrı toplanıp santrifüj edildi. Süpernatant kısımları atıldıktan sonra 1 ml medyum ile süspansiyon haline getirilip sayma kamerasıyla (hemasitometre) sayıldı. Toplam hücre sayıları kaydedildi. ID50 (İnhibition dose %50) değeri, Gemcitabine için 10 µgr/ml, Resveratrol için 10mM/ml, Parasetamol için 40 µgr/ml olarak saptandı.

Sferoid Model, Doku Takibi ve İmmünohistokimya

Üç boyutlu kültür modelinde, her bir grup için agarla kaplanmış 6 kuyucuklu kültür kaplarının her bir kuyucuğuna 5 ml medyum içerisinde 1.000.000 canlı MDAH-2774 hücresi ekildi. Hücreler rutin bakımları yapılmak kaydıyla nemli %5 CO₂ hava karışımı ortamda 37°C'de 7 gün süreyle sferoid oluşumu için bekletildi. Deney grubu sferoidlerine etkin dozlarda ilaçlar uygulanırken kontrol grubu sferoidlerine ise herhangi bir ilaç uygulaması yapılmadı. 24. ve 96. saatlerin sonunda gruplardaki sferoidler %10 formaldehitte (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, U.S.A.) tespit edildi. Rutin takip işlemlerinden sonra parafinde bloklandı.

Fiksasyon sonunda rutin takibine alındı ve hazırlanan parafin bloklardan 5 µm kesitler (Leica MR 2145) elde edildi. Rutin protokole uygun olarak etanol serilerinden geçirildi ve immunohistokimyasal analiz için hazır hale getirildi. Dokular önce distile su ardından 10 dk. Fosfat tamponlu salin (PBS) uygulandı. Sonrasında 50 mM Tris buffer (pH 7.5) içerisindeki %2 tripsin'de (Sigma chemical Co. St. Lois, Missouri, USA) 37°C 15 dk. bekletildi. Kesitlerin çevresi Dako pen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çizilerek görünür hale getirildi ve %3 H₂O₂ solüsyonunda 15 dk. endojen peroksidaz aktivitesi için bekletildi. Sonrasında kesitler primer antikorlar ile inkübe edildi. iNOS (1:100 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA), eNOS (1:100 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA) antikorları kullanıldı. Kesitler Biotinli sekonder antikorla ve Streptavidin konjuge horseradish peroxidase (her ikisi de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA) ile en az 30 dk. inkübe edildi. Son olarak Diaminobenzidine (DAB) (DeadEnd Colorimetric TUNEL system, Promega, Madison, USA) eklendi ve 5dk. kadar beklenerek immünohistokimyasal işaretlenmesi sağlandı. Bütün dilüsyonlar ve yıkama basamakla-

rında PBS kullanıldı. Kesitlere Mayer hematoksilin (Zymed Laboratories, U.S.A.) ile zıt boyama yapıldı. Sudan geçirildikten sonra etanol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Ksilin ile temizlenerek entellan (Merck) ile kapatıldı. İmmünoreaktivite, negatif (-), zayıf (+), orta (++) ve güçlü (+++) olarak değerlendirildi. İmmünohistokimyasal (IHC) analizi için ID 50 dozları kullanılmıştır.

Bulgular

Hücre Proliferasyonunun Kinetik

Deneylerinin Bulguları

Kontrol grubunda 24. ve 96. saatler arasındaki zaman dilimi boyunca hücre sayısında, beklenildiği üzere sağlıklı bir yükseliş gözlemlendi.

Resveratrol grubu ilk 24 saat için hücre proliferasyonu üzerine etki etmedi (p>0.05). Ancak diğer tüm saatler için anlamlı ölçüde hücre tutunmasını azalttı (24, 48 ve 96. saatler için p< 0.05).

Parasetamol grubu 24. ve 96. saatler arasında hücre sayısını azaltmak üzerinde anlamlı bir etki gösterdi (24, 48, 96. saatler için p< 0.05).

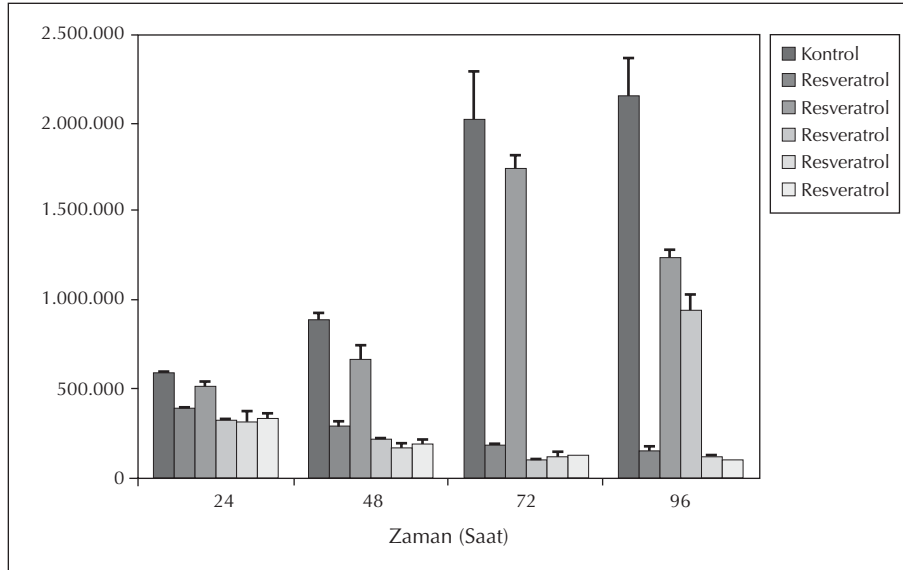
Gemcitabine grubu 24. ve 96. saatler arasındaki tüm zaman dilimleri boyunca kontrol grubuna göre anlamlı derecede (p<0.05) hücre sayısında azalma gösterdi.

Gemcitabine + Parasetamol ve Gemcitabine + Resveratrol kombinasyon gruplarında bu ilaçların birlikte kullanılması kontrole göre tüm saatlerde hücre sayısını anlamlı bir şekilde azalttı (p<0.05) (Tablo 1).

İmmünohistokimyasal Bulgular

MDAH 2774 insan over kanseri üç boyutlu hücre kültür modelinde iNOS ve eNOS immünoreaktivitesi değerlendirilmiştir. İmmünohistokimyasal analiz sonuçları her iki molekül için benzerlik göstermektedir.

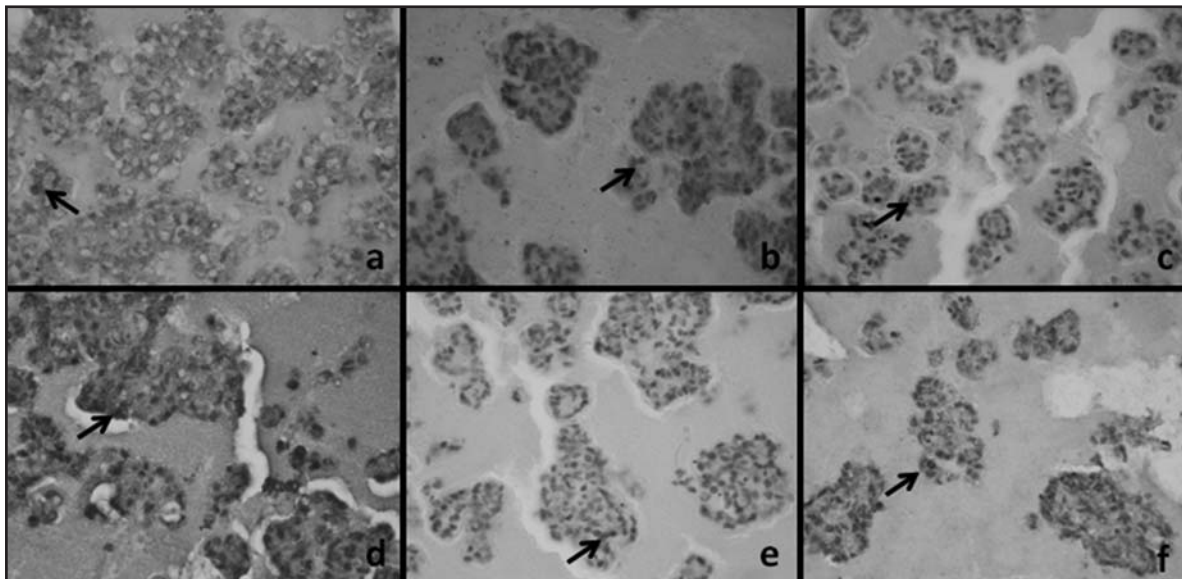
24. saatte iNOS ve eNOS immünoreaktivitesi Parasetamol (Şekil 1-2 c) ve Resveratrol (Şekil 1-2 d) grubunda kontrol grubu (Şekil 1-2a) ile benzer şekilde zayıf pozitif olarak gözlenmektedir. Gemcitabine'in tek kullanımında ve ilaç kombinasyonlarında her iki molekülün immünoreaktivitesi orta (++) düzeyde artmış olarak belirlenmiştir (Şekil 1-2 b,d,e) (Tablo 2).



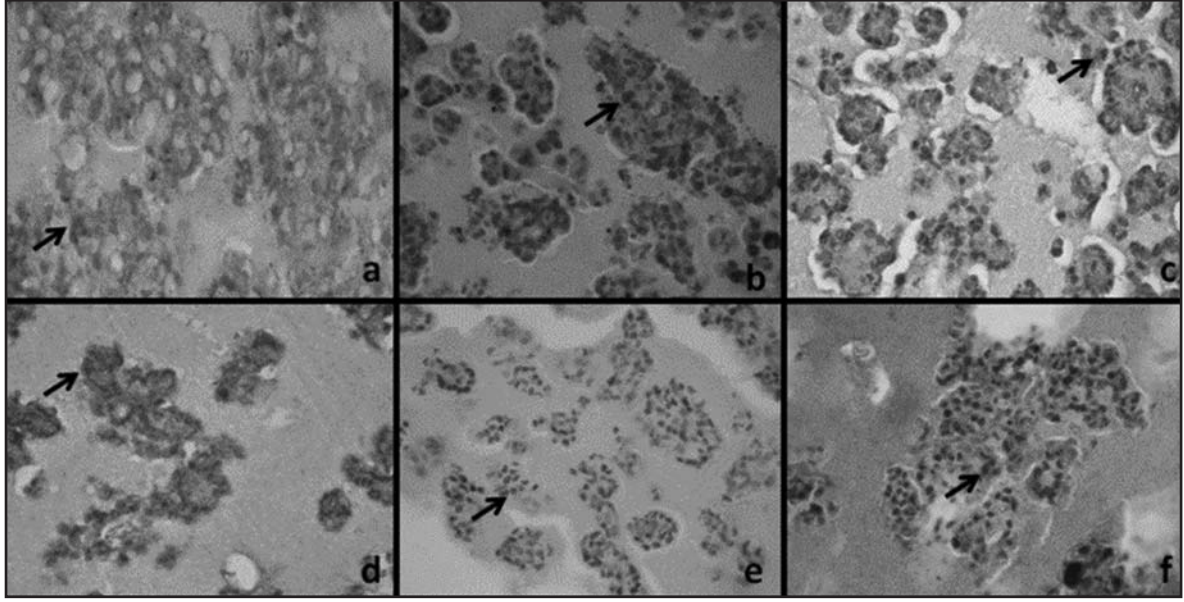
Tablo 1. Zamana bağlı hücre çoğalma verileri.

Gemcitabine ve parasetamolün tek tek kullanımlarında 96. saatte iNOS immünoreaktivitesi güçlü (+++) (Şekil 3b,c), Resveratrol grubunda ise immunohistokimyasal analiz kontrol grubuna yakın bulunmuştur (+) (Şekil 3d). Kombinasyon gruplarında ise immunoreaktiviteleri güçlü (+++) olarak izlenmektedir (Şekil 3e,f) (Tablo 3). 96 saatte eNOS grubuna ait kontrol grubu (Şekil 4a) ve Resveratrol (Şekil 4d) grubunda immünoreaktivite zayıf-

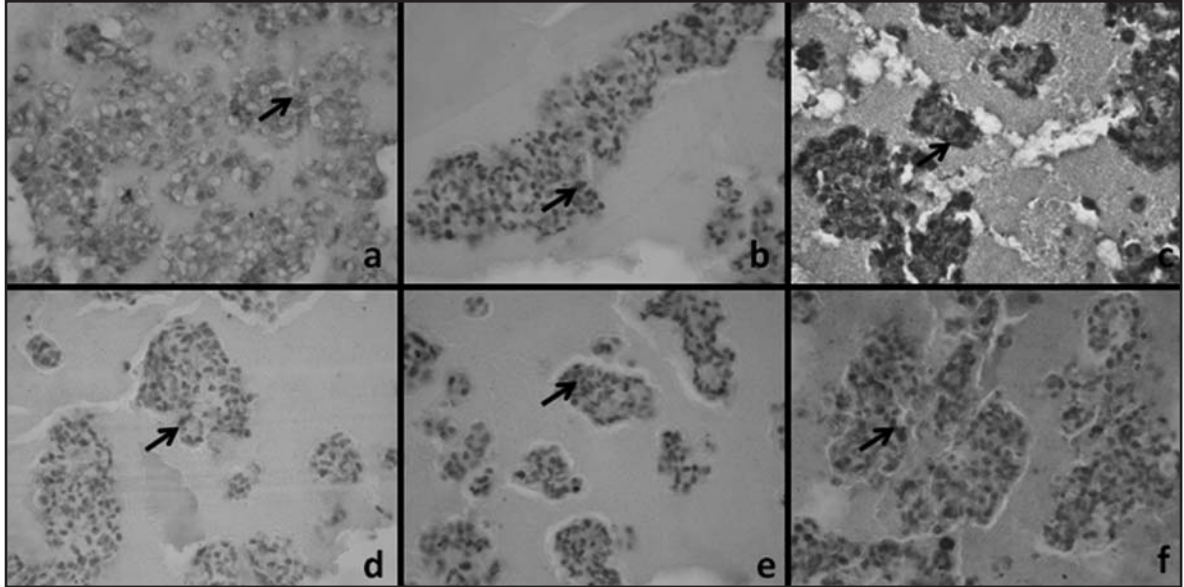
tır (+). İlaç kombinasyon gruplarında ise immünoreaktiviteleri güçlü (+++) olarak bulunmuştur (Şekil 4e,f) (Tablo 3). Yapılan immünohistokimyasal analizler Gemcitabine'in MDAH-2774 hücreleri ile tek başına veya ilaç kombinasyonu ile karşılaştırıldığında iNOS ve eNOS immünoreaktivitesinde artışa neden olduğunu göstermiştir. İmmünoreaktivite 96 saatte, 24 saate göre belirgin olarak artmıştır.



Şekil 1. iNOS 24 saat Kontrol (a), Gemcitabine (b), Parasetamol (c), Resveratrol (d), Gemcitabine + Parasetamol (e), Gemcitabine + Resveratrol (f) (immünreaktif hücreleri göstermektedir).



Şekil 2. eNOS 24 saat, Kontrol (a), Gemcitabine (b), Parasetamol (c), Resveratrol (d), Gemcitabine + Parasetamol (e), Gemcitabine + Resveratrol (f).



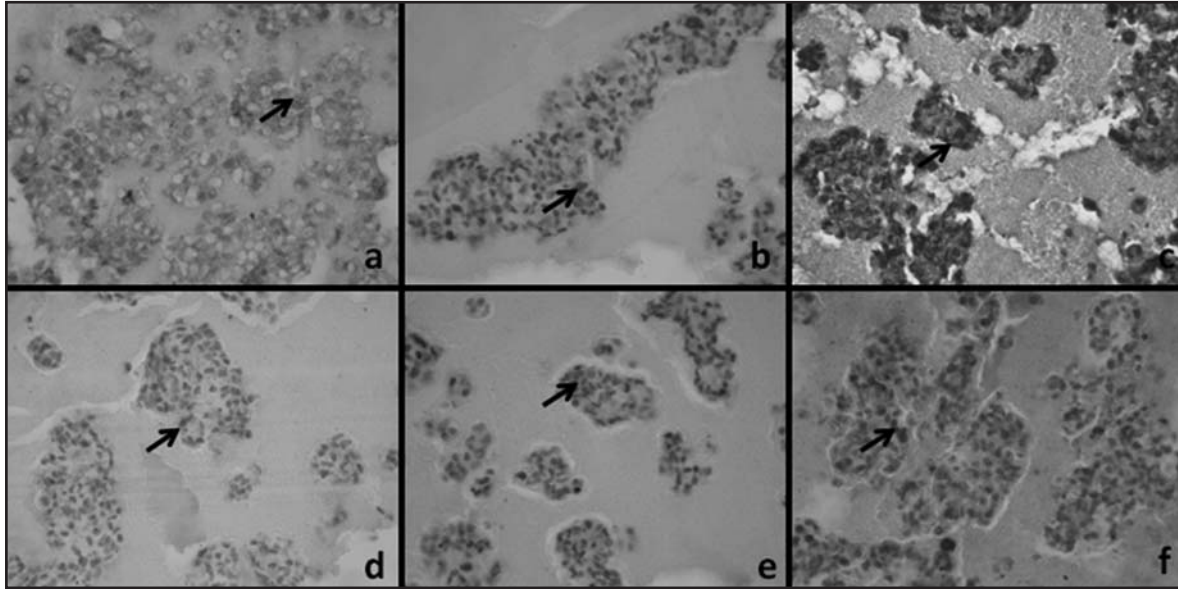
Şekil 3. iNOS 96 saat, Kontrol (a), Gemcitabine (b), Parasetamol (c), Resveratrol (d), Gemcitabine + Parasetamol (e), Gemcitabine + Resveratrol (f).

Tartışma

Klasik tedavi yöntemlerinin kanser tedavisindeki önemi tartışılmazdır. Bununla birlikte, kanser vakalarının sayısının artışı ve kullanılan ilaçlara karşı direnç, yeni teşhis ve tedavi yöntemlerine duyulan ihtiyaç, başta

“geleneksel bitkisel tıp” gibi alternatif tedavi yöntemlerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur [8].

Son yıllarda çalışmalar özellikle üzüm çekirdeğinde ve kabuğunda bol miktarda bulunan ve antioksidan özelliği iyi bilinen resveratrol gibi maddelerin kanser-



Şekil 4. eNOS 96 saat, Kontrol (a), Gemcitabine (b), Parasetamol (c), Resveratrol (d), Gemcitabine + Parasetamol (e), Gemcitabine + Resveratrol (f)

den koruyucu etkiden sorumlu olabileceğini ortaya koymuştur [12]. Literatürde 1-100 mikrom resveratrolün hematopoetik ve solid organ tümör hücre dizilerinde, sitotoksik ve apoptozisi indükleyici özellikleri olabileceğine dair yayınlar bulunmaktadır [12]. Yine bazı yayınlarda kanser hücre soylarında resveratrolün apoptozise neden olabileceği ve bu etkisi ile kanser hücreleri-

nin proliferasyon oranını düşürebileceği gösterilmiştir [13,14,15].

Resveratrolün 1 nanoM-100 mikrom arasında değişen dozları ile yapılan bir çalışmada, ID50 değerleri değişen hücre dizilerinde 1-100 mikrom olarak bulunmuş ve tek başına kullanılması durumunda, epitelyal ve hematolojik tümör hücre dizilerinde proliferasyon oranını

Tablo 2. 24 saat, Kontrol, Gemcitabine, Parasetamol, Resveratrol ve kombinasyon gruplarında, iNOS ve eNOS için immünohistokimyasal analiz sonuçları semikantitatif olarak değerlendirilmiştir.

	Kontrol	Gemsitabin	Parasetamol	Resveratrol	Gemsitabin+ Parasetamol	Gemsitabin+ Resveratrol
iNOS	+	++	+	+	++	++
eNOS	+	++	+	+	++	++

Tablo 3. 96 saat, Kontrol, Gemcitabine, Parasetamol, Resveratrol ve kombinasyon gruplarında, iNOS ve eNOS için immünohistokimyasal analiz sonuçları semikantitatif olarak değerlendirilmiştir.

	Kontrol	Gemsitabin	Parasetamol	Resveratrol	Gemsitabin+ Parasetamol	Gemsitabin+ Resveratrol
iNOS	+	+++	+++	+	+++	+++
eNOS	+	++	++	+	+++	+++

düşürdüğü ve sitotoksik olduğu görülmüştür [12]. Çalışmamızda Şahih ve ark. [12]'nin bu bulgularına paralel olarak, resveratrolün, 10 mikroM'lık dozunun tüm zaman dilimlerinde hücre proliferasyonunu azalttığı görüldü (Tablo 1).

DNA replikasyonunu ve tamirini engelleyen bir ilaç olan Gemcitabine ile 5-florourasili (5-FU) karşılaştıran randomize bir çalışmada, bu ilacın hem sağkalım oranını artırdığı, hem de hastalarda yan etkiye daha az neden olması açısından daha üstün olduğu gösterilmiş ve pankreas kanserlerinin tedavisinde, birinci seçenek olarak kullanılması önerilmiştir. Gemcitabine aynı zamanda tümör hücrelerinin radyoterapiye karşı duyarlılığını da arttıran bir ilaçtır ve radyoterapi ile birlikte kullanılan Gemcitabine, tümör hücrelerinin DNA sentezinin inhibisyon süresini uzatmaktadır [16].

Bizim çalışmamızda da Gemcitabine, MDAH- 2774 over tümör hücreleri üzerine ileri derecede etkili bir ilaç olduğunu gösterdi, hücre proliferasyonunun inhibisyonuna ($p<0.05$) neden oldu (Tablo 1).

C6 ve U138-MG gliom hücre kültürlerinde indometazin, hücre siklusunun değişik evrelerinde hücre proliferasyonunu baskıladı ve bu durumun ERK gibi çeşitli hücre içi sinyal yollarını inhibe etmesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir [17]. Parasetamolün de gliom hücre kültüründe proliferasyonu engellediği ve apoptoza neden olduğu bilinmektedir [18,19]. Çalışmamızda da parasetamol izlenen tüm zaman dilimlerinde hücre proliferasyonunu azaltmaktadır (Tablo 1).

Parasetamol glutatyon S- transferaz enziminin aktivitesini azaltabilir [20]. Bu enzimler over kanserinde cisplatin ve carboplatin gibi antikanser ilaçlara karşı direnç oluşturan mekanizmada yer almaktadır. 2002 senesinde Bilir ve ark.[21] tarafından yapılan bir çalışmada, parasetamolün MDAH-2774 insan over kanser hücresinde carboplatin duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir.

Kombinasyon gruplarımızda hücre proliferasyonunda azalma görüldü. Meydana gelen bu azalma parasetamolün Gemcitabine etkisini sensitize etmesi şeklinde yorumlayabiliriz. NSAI ilaçların pankreas kanserinde Gemcitabine duyarlılığını artırdığını, bunun da siklooksijenaz enziminin inhibisyonuyla bağlantılı olduğu gösterilmiştir [22]. Parasetamolün ve resveratrolün hücrelerde apoptozisi arttırarak tutunmuş hücreleri azaltması

ve gemcitabin varlığında hücre ölümünü daha da hızlandırması bunu belirleyen bir diğer mekanizma olabilir.

Bu çalışmada yapılan diğer deneyde resveratrol, parasetamol ve Gemcitabine uygulanan MDAH-2774 insan over kanseri hücrelerinin, uyarılabilir (indüklenbilir) nitrik oksit ve endotelial nitrik oksit sentaz ekspresyonundan nasıl etkilendiği araştırıldı. 1980'den bugüne kadar yapılan çalışmalarda , nitrik oksitin kısa ömürlü inorganik serbest radikal bir gaz olduğu ve tüm memeli organlarında intrasellüler ikinci haberci gibi etki gösterdiği, vasküler hemostazın bir parçası olduğu, nörotransmisyon ve antimikrobiyal defansta rolünün olduğu bildirilmiştir [23,24]. Farais-Eisner ve ark. [25] ile Stuer ve ark. [26] Nathan tarafından salgılanan efektör bir molekül olduğu ve tümör gelişimini inhibe edici etkisinin bulunduğu bildirilmiştir. Ancak son yapılan çalışmalarda bunun tam tersini öne süren makaleler de yayınlanmıştır. Bazı çalışmalar NO'in solid tümörlerin gelişimini ve progresyonunu arttırdığını göstermiştir [27,28]. Xie ve ark. [29] tarafından yapılan çalışmada NO'in yüksek düzeylerde bulunmasının apoptozisi başlatarak tümör hücrelerinin metastatik potansiyelini yok ettiği gösterilmiştir. iNOS bazal seviyesindeki düşük veya ara düzeydeki artış tümör gelişimini olumlu etkilemekte neovaskularizasyonu ve angiogenezisi indükleyerek tümör kan akımını arttırmakta ve sonuçta vasküler permeabilitede artışa neden olmaktadır. iNOS düzeyinde yüksek miktarlardaki artış tümör gelişimi ve platelet aktivasyonu inhibe olmakta bu da sitostatik, sitotoksik ve apoptotik bir etki yaratmaktadır [30].

iNOS ve eNOS, MCF-7 meme kanseri gibi bir çok farklı malign insan tümör hücrelerinden salınmaktadır [31]. Dahr ve ark. [32]'nin yaptığı bir çalışmada yüksek konsantrasyon NO'in DNA ve proteinler üzerine hasarlayıcı bir etkisi olabileceği söylenmiştir. Zeybek ve ark. [33]'nin yaptığı bir çalışmada Gemcitabine ve Gemcitabine+ vinaralbin uygulanan MCF-7 hücrelerinde immunpozitif eNOS artışı gözlenmiştir [33]. Biz de çalışmamızda MDAH-2774 over tümör hücrelerinde iNOS ve eNOS ekspresyonunu gözlemledik, çalışmamızda Gemcitabine ve parasetamolün tek tek ve kombinasyon uygulamalarında iNOS ve eNOS immunpozitif işaretlenmiş hücre sayılarında artış gözlemledik, resveratro-

lün tek başına uygulanışında kontrolden farklı olmadığı gözlenirken, Gemcitabine ile kombinasyonunda güçlü bir immünoreaktivite göstermesi Gemcitabine'in sitotoksik etkisine tümör hücrelerin verdiği bir yanıt olarak düşünülmüştür. Gemcitabine solid tümörlerde S- fazında etkili ve apoptozisi tetikleyen bir ajandır [33]. Literatürde 1-100 mikrom resveratrolün hematopoetik ve solid organ tümör hücre dizilerinde, sitotoksik ve apoptozisi indükleyici özellikleri olabileceğine dair yayınlar bulunmaktadır [12]. Parasetamolün de gliom hücre kültüründe proliferasyonu engellediği ve apoptoza neden olduğu bilinmektedir [18,19].

İnsan kanserlerinin gelişmesinden sorumlu moleküler mekanizmalar konusunda bugün ulaştığımız bilgi düzeyine rağmen, kanser bilimsel ilgi alanının ötesinde, pek çok insanın hayatını elinden alan korkutucu bir hastalık olmaya devam etmektedir. Bu yüzden hem günümüzde, hem de gelecekteki araştırmaların başlıca hedefi, bilginin bu hastalıktan korunma ve sağaltım konusunda pratik gelişmelere dönüşmesi olmalıdır. Kanserinin moleküler biyolojisini aydınlatmaya yönelik gelişmeler, kanserden korunma ve tedavi konusunda yeni yaklaşımların ortaya çıkmasına katkıda bulunmaktadır [34].

Kaynaklar

- Altınöz MA, Bilir A. Inflammation, nonsteroid and steroid anti-inflammatory agents and ovarian cancer In: Bardos PA, ed. Treatment of Ovarian Cancer. New York: Nova Science Publishers; 2005. p. 97-111.
- Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. Cell 1991; 64: 327-336.
- Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Ankara: Güneş Basımevi; 2000.
- Gemcitabine®, Preparat reçetesi (Lilly).
- Ali S, El-Rayes BF, Aranha O, Sarkar FH, Philip PA. Sequence dependent potentiation of gemcitabine by flavopiridol in human breast cancer Cells. Breast Cancer Res Treat 2005; 90: 25-31.
- İkizler M, Dernek S, Erkasap N, Kaygısız Z, Sevin B, Kural T. The hemodynamic efficacy of resveratrol on reperfüzyon. Injury in isolated rat hearts. Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahi Dergisi 2003; 11: 91-99.
- Wenzel E, Somoza V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. Mol Nutr Food Res 2005; 4: 49.
- Aggarwal BB, Shishir S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. J Biochem Pharmacol 2006; 71: 1397-1421.
- İgnorro JJ, Byrns RE, Wood KS. Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radicals. In: Vanhoutte PM, ed. Vasodilatation. New York: Raven Press; 1998. p. 427-436.
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factors. Nature 1988; 327: 524-526.
- Vakkala M, Kahlos K, Lakkari E, Paakko P. Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis, and angiogenesis in in situ and invasive breast carcinoma. Clin Cancer Res 2000; 6: 2408-2416.
- Şahin F, Avcu F, Saydam G, ve ark. Kırmızı üzüm çekirdeği ekstraktı ve ana bileşenlerinden resveratrol ve boraks malign hücre dizileri üzerinde sitotoksik etki göstermektedir. Turkish Journal of Haematology; 2004; 21 Suppl 3: 53-54. [Abstract]
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Resveratrol>
- Benitez DA, Pozo-Guisado E, Alvarez-Barrientos A, Fernandez-Salguero PM, Castellon EA. Mechanisms involved in resveratrol-induced apoptosis and cell cycle arrest in prostate cancer-derived cell lines. J Androl 2006; 7: 333-335.
- Riles WL, Erickson J, Nayyar S, Atten MJ, Attar BM, Holian O. Resveratrol engages selective apoptotic signals in gastric adenocarcinoma cells. World J Gastroenterol 2006; 12: 5628-5634.
- Turna H., Demir G. Pankreas Kanseri Tedavisine Medikal Onkolojik Yaklaşım. İstanbul: İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitim Etkinlikleri; 2002. s. 231-236.
- Zhu GH, Wong BCY, Ching CK, Lai KC, Lam SK. Differential apoptosis by indomethacin in gastric epithelial cells through the constitutive expression of wild-Type p53 and/or Up-regulation of c-myc. Biochem Pharmacol 1999; 58: 193-200.
- Bernardi A, Jacques-Silva MC, Delgado-Canedo A, Lenz G, Battastini M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit the growth of C6 and U138-MG glioma Cell Lines. Eur J Pharmacol; 2006; 532: 214-222.

19. Joki T, Carrol RS, Dunn IF, Zhang J, Abe T, Black PM. Assesment of alteration in gene expression in reccurent malignant glioma after radiotherapy using complemantary deoxyribonucleic acid microarrays. *Neurosurgery* 2001; 48: 195-201.
20. Özdemirler G, Aykaç G, Uysal M, et al. Liver lipid peroxidation and glutathione-related defence enzyme systems in mice treated with paracetamol. *J Appl Toxicol* 1994; 14: 297-299.
21. Bilir A, Altinoz MA, Atar E, Erkan M, Aydiner A. Acetaminophen modulations of chemotherapy efficacy in MDAH 2774 human endometrioid ovarian cancer cells in vitro. *Neoplasma* 2002; 49: 38-42.
22. Yip-Schneider TM., Sweeney J, Jung S, Crowell PL, Marshall MS. Cell cycle effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and enhanced growth inhibition in combination with gemcitabine in pancreatic carcinoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 976-985.
23. Öktem G. MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Hattında Doksorubisin ve Dositakselin Sitotoksitesi ve İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz Ekspresyonu Üzerine Etkileri. Uzmanlık Tezi. İzmir: Ege Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı: 2002.
24. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6: 3051-3064.
25. Farais-Eisner R, Sherman MP, Aeberhard E, et al. Nitric oxide is an important mediator for tumorocidal activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9407-9411.
26. Stuehr DJ, Nathan JF. Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 1989; 169: 1543-1545.
27. Thomsen LJ, Lawton FG, Knowles RG. Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 1352-1354.
28. Thomsen LJ, Scott JM, Topley P, Knowles RG, Keerie AJ, Frend AJ. Selective inhibition of inducible nitric oxide sythase inhibits tumor growth in vivo: studies with 1400 W, a novel inhibitor. *Cancer Res* 1997; 57: 3300-3304.
29. Xie K, Huang S, Dong Z, Gutman M. Direct correlation between expression of endogenous inducible nitric oxide synthase and regression of M5076 reticulum cell sarcoma hepatic metastases in mice treated with liposomes containing lipopeptide CGP 31362. *Cancer Res* 1995; 55: 3123-3131.
30. Thomsen LL, Miles DW. Role of nitric oxide in tumor progression: Lessons from human tumors. *Cancer and Met Rew* 1998; 17: 107-118.
31. Lechner M, Lirk P, Rieder J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Semin Cancer Biol* 2005; 15: 277-89.
32. Darh A, Brindley JM, Stark C, Citro ML, Keefer LK. Nitric oxide does not mediate but inhibits transformation and tumor phenotype. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 1285-1293.
33. Zeybek DN, Inan S, Ekerbicer N, Vatansever SH. The effects of gemcitabine and vinorelbine on inducible nitric oxide synthase (iNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) distribution of MCF-7 breast cancer cells. *Acta Histochem* 2009; doi:10.1016/j.acthis.2009.07.006
34. Cooper MG, Hausman ER. Hücre - Moleküler Yaklaşım. Çev. ed.: Sakızlı M, Atabey N. İzmir: İzmir Tıp Kitabevi; 2006. s. 664-665.