T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Eczacılık Farmakoloji Anabilim Dalı

6-GİNGEROL ve 6-SHOGAOL'ÜN MATRİKS METALLOPROTEİNAZ ENZİM 2 ve 9 ÜZERİNDEKİ İNHİBİTÖR ETKİSİNİN A549 AKCİĞER KANSER HÜCRE HATTINDA ARAŞTIRILMASI

Hazırlayan
Onur HODA

Danışman
Doç. Dr. Mükerrem Betül AYCAN
Yardımcı Danışman
Yrd. Doç. Dr. Eren Demirpolat

Yüksek Lisans Tezi

Mayıs 2017
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

6-GİNGEROL ve 6-SHOGAOL'ÜN MATRİKS METALLOPROTEİNAZ ENZİM 2 ve 9 ÜZERİNDEKİ İNHİBİTÖR ETKİSİNİN A549 AKCİĞER KANSER HÜCRE HATTINDA ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Onur HODA

Danışman
Doç. Dr. Mükerrem Betül AYCAN
Yardımcı Danışman
Yrd. Doç. Dr. Eren DEMİRPOLAT

Bu Çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından TYL-2015-6081 Kodlu Proje ile Desteklenmiştir

Mayıs 2017
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Onur HODA

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

"6-Gingerol ve 6-Shogaol'ün matriks metalloproteinaz enzim 2 ve 9 üzerindeki inhibitör etkisinin A549 akciğer kanser hücre hattında araştırılması" adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan
Onur HODA

Danışman
Doç. Dr. Mükerrem Betül AYCAN

Yardımcı Danışman
Yrd. Doç. Dr. Eren DEMİRPOLAT

Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı
Doç. Dr. Mükerrem Betül Aycan

Doç. Dr. Mükerrem Betül AYCAN danışmanlığında **Onur HODA** tarafından hazırlanan **"6-Gingerol ve 6-Shogaol'ün matriks metalloproteinaz enzim 2 ve 9 üzerindeki inhibitör etkisinin A549 akciğer kanser hücre hattında araştırılması"** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Farmakoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

.../.../2017

Danışman	: Doç. Dr. M. Betül AYCAN (Tıbbi Farmakoloji ABD)	.....
Y. Danışman	: Yrd. Doç. Dr. Eren DEMİRPOLAT (Farmakoloji ABD)	.....
Üye	: Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU (Farmakoloji ABD)	.....
Üye	: Doç. Dr. Ahmet CUMAOĞLU (Biyokimya ABD)	.....
Üye	: Doç. Dr. Seyhan ŞAHAN FIRAT (Farmakoloji ABD)	.....

ONAY

Bu tezin kabülü Enstitü Yönetim Kurulunun ……..tarih ve ……. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.../.../2017

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan, ilgisini ve önerilerini göstermekten kaçınmayan Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli danışman hocam Doç. Dr. Mükerrem Betül AYCAN'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardım, bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli destek olan başta Yrd. Doç. Dr. Eren Demirpolat olmak üzere Eczacılık bölümündeki tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca yardımını hiç esirgemeyen başta eşim Şebnem Hoda'ya ve maddi manevi destekleriyle bizi hiçbir zaman yalnız bırakmayan ailelerimize de sonsuz teşekkürler ederim.

Onur HODA

Nisan 2017, KAYSERİ

6-GİNGEROL ve 6-SHOGAOL'ÜN MATRİKS METALLOPROTEİNAZ ENZİM 2 VE 9 ÜZERİNDEKİ İNHİBİTÖR ETKİSİNİN A549 AKCİĞER KANSER HÜCRE HATTINDA ARAŞTIRILMASI

Onur HODA

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Eczacılık Farmakoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi: Mayıs/2017
Danışman: Doç. Dr. Mükerrem Betül AYCAN
Yardımcı Danışman: Yrd. Doç. Dr. Eren DEMİRPOLAT

ÖZET

MMP enzimleri metastaz, invazyon, anjiyogenez, apoptozun engellenmesi gibi antitümör savunma mekanizmaları yoluyla kanser oluşum sürecinde yer aldıkları için kanser araştırmaları için hedef konumuna gelmişlerdir. Kanser tedavisi ile ilgili çalışmaların odaklandığı konulardan birisi de, daha az toksik ve daha etkili MMP inhibitörleri geliştirilmesidir. Gingerol ve Shogaol *Zingiber officinale* bitkisinin etkin temel bileşenlerindendir. Onlar aromatik tek halkalı bileşiklerdendirler ve kurkumine kimyasal olarak oldukça yakındırlar. Enflamasyondan kansere kadar pek çok patolojide etkilidirler. Çalışmamız, "Gingerol ve Shogaol, Matriks Metalloproteinaz 2 ve 9' un mRNA ekspresyonlarını ve kanser hücrelerinin invazyonunu azaltır" hipotezine dayandırılmıştır.

Çalışmada, kanserli hücrelerin invazyon sürecinde etkin olan MMP-2 ve MMP-9'un aktivitesini uyaran LPS ile A549 hücrelerinde, 6-gingerol ve 6-shogaol'ün değişik konsantrasyonlarının etkisi araştırılmıştır. Gruplarda MMP-2 ve 9 mRNA düzeyleri üzerinde etkileri qPCR yöntemiyle incelenmiştir.

Araştırma bulguları değerlendirildiğinde, 6-gingerol ve 6-shogaol'ün MMP-2 ve MMP-9 mRNA düzeylerini doz bağımlı olarak değiştirebileceği ve etkin dozun belirlenmesi için ileri araştırmalara ihtiyaç duyulduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: 6-Gingerol, 6-Shogaol, Kurkumin, MMP-2, MMP-9, A549 hücre hattı

THE INHIBITORY EFFECT OF 6-GINGEROL AND 6-SHOGAOL ON MATRIX METALLOPROTEINASE-2 AND 9 IN A549 LUNG CANCER CELL LINE

Onur HODA

Erciyes University Institute of Health Sciences
Department of Pharmacology
M. Sc. Thesis, May/2017
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mükerrem Betül AYCAN
Vice-Supervisor: Assist. Prof. Dr. Eren DEMİRPOLAT

ABSTRACT

Since MMP enzymes are involved in the cancer formation process through antitumor defense mechanisms such as metastasis, invasion, angiogenesis, apoptosis inhibition, they have come to the target position for cancer research. One of the focuses of studies on cancer therapy is the development of less toxic and more effective MMP inhibitors. 6-Gingerol and 6-Shogaol are active ingredients of the *Zingiber officinale* plant. They are aromatic monocyclic compounds and chemically very close to Curcumin. They are effective in many pathologies from inflammation to cancer. Our study was based on the hypothesis that "Gingerol and Shagaol reduce mRNA expression of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 and invasion of cancer cells".

In our study, the effects of different concentrations of 6-gingerol and 6-shogaol on MMP-2 and MMP-9 mRNA levels which are effective in the invasion process of cancer cells on LPS induced A549 cell lines have been investigated. Effects on MMP-2 and 9 mRNA levels were examined by qPCR method in all groups.

According to our results, 6-gingerol and 6-shogaol can alter MMP-2 and MMP-9 mRNA levels dose-dependently. Further studies are needed to determine the effective dose.

Key words: 6-Gingerol, 6-Shagaol, Curcumin, MMP-2, MMP-9, A549 cell line

İÇİNDEKİLER

6-GİNGEROL ve 6-SHOGAOL'ÜN MATRİKS METALLOPROTEİNAZ ENZİM 2 ve 9 ÜZERİNDEKİ İNHİBİTÖR ETKİSİNİN A549 AKCİĞER KANSER HÜCRE HATTINDA ARAŞTIRILMASI

Sayfa

İÇ KAPAK ..... **i**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK ..... **ii**

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI ..... **iii**

KABUL VE ONAY ..... **iv**

TEŞEKKÜR ..... **v**

ÖZET ..... **vi**

ABSTRACT ..... **vii**

KISALTMALAR ..... **x**

ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **xiii**

1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**

2. GENEL BİLGİLER **5**

2.1. MMP'lerin genel özellikleri 5

2.1.1. Kanser ve MMP'ler 7

2.2. Kurkumin 10

2.3. 6-GİNGEROL 13

2.4. 6-SHOGAOL 14

2.5. A549 HÜCRE HATTI 15

2.6. LİPOPOLİSAKKARİT (LPS) 16

2.7. EPİGALLOKATEŞİN 16

3. GEREÇ VE YÖNTEM **18**

3.1. Besi Yeri Hazırlanışı 18

3.2. Hücre Bakımı 19

3.3. Tripsinleme İşlemleri 20
3.4. Hücre Sayımı, Dağıtımı ve Maddelerin Uygulanması 20
3.5. RNA İzolasyonu 21
3.6. İstatistiksel Analiz 23
4. BULGULAR 24
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 28
6. KAYNAKLAR 34
ÖZ GEÇMİŞ 45

KISALTMALAR

bFGF : Temel fibroblast büyüme faktörü

CDK1 : Siklin- bağımlı kinaz

cIAP1 : Hücresel inhibitör apoptoz proteini 1

COX2 : Siklooksijenaz-2

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EDTA : Etilendiamin tetraasetik asit

EGFR : Epidermal büyüme faktör reseptör

ERK : Extracellular signal-regulated kinases

IL-1β : İnterlökin 1β

iNOS : İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

LNCaP : Androjen-duyarlı insan prostat adenokarsinoma hücreleri

LPS : Lipopolisakkarit

MAPK : Mitojenle aktive olan protein kinaz

MDA-MB-231 : Meme kanseri hücre hattı

MMP : Matriks metalloproteinaz

MMP-2 : Matriks metalloproteinaz-2

MMP-7 : Matriks metalloproteinaz-7

MMP-9 : Matriks metalloproteinaz-9

MT1-MMP : Membran tip 1-matriks metalloproteinaz

mTOR : Rapamisinin mekanistik hedefi

NF-κB : Nükleer faktör kappa-hafif zincir ile aktive olan B hücreler

PANC-1 : Pankreas duktal adenokarsinoma hücre hattı

PAR-1 : Proteinazla aktive olan reseptör 1

PBS : Fosfat Tamponu

PC-3 : Prostat kanser hücre hattı

PGE2 : Prostaglandin E2

PI3K : Fosfo inositol 3 kinaz

RhoA : Ras homolog gene family, member A

ROCK1 **:** Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1

ROCK2 **:** Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2

STAT3 **:** Signal iletici ve aktive edici protein 3

TIMP1 **:** Metalloproteinaz 1'nin doku inhibitörü

TIMP2 **:** Metalloproteinaz 2'nin doku inhibitörü

TNFα **:** Tümör nekroz faktör α

TPA **:** 12-O-tetradekanoilflorbolde 13-asetatla

uPA **:** ürokinaz-tip plasminojen aktivatörü

VEGF **:** Vasküler endotelyal büyüme faktörü

XIAP **:** X-bağlantılı inhibitör apoptoz proteini

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Deney grupları 18

Tablo 2. cDNA sentez reaksiyonu karışımı içeriği 22

Tablo 3. RT-PCR reaktifleri 23

Tablo 4. RT-PCR sıcaklık döngüleri 23

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: MMP'lerin tümör gelişimi ve metastaz mekanizmasındaki rolü.....3

Şekil 2. MMP'lerın yapısal özellikleri ve sınıflandırılması.....6

Şekil 3. MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonunun şematik açıklaması 7

Şekil 4. Metastazda epitelyal mezenşimal geçiş ve ekstraselüler matriks yıkımı.....8

Şekil 5. MMP lerin tümör metatstaz mekanizmasındaki rölünü gösteren şema.....9

Şekil 6. Zerdeçal bitkisi, çiçeği ve rizomu. 11

Şekil 7. Zerdeçal ve kurkumin metabolitlerinin doğal analogları 12

Şekil 8. *Zingiber officinale* Roscoe (Zencefil) bitkisi, çiçeği ve rizomu. 14

Şekil 9. 6-Gingerol ve 6-Shogaol'ün moleküler yapısı. 14

Şekil 10. A549 Hücreleri (DMEM besi ortamında) 15

Şekil 11. Epigallokateşin-3-gallat'ın moleküler yapısı.....16

Şekil 12. Deney gruplarının 12 kuyulu plakada dağılımı. 19

Şekil 13: Farklı konsantrasyonlarda uygulanan kurkumin, 6-shogaol ve 6-gingerol, epigallokateşin-3-gallat maddelerinin, LPS uygulanmış A549 hücre hattında MMP-2 mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisinin qPCR analiz sonuçları.....25

Şekil 14. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan kurkumin, 6-shogaol ve 6-gingerol, epigallokateşin-3-gallat maddelerinin, LPS uygulanmış A549 hücre hattında MMP-9 mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisinin qPCR analiz sonuçları.....26

.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser günümüzde 100'den fazla çeşidiyle insanlar için en ölümcül hastalık grubundan birisidir. Büyük oranda çevresel faktörlerin etkisiyle, kalıtım materyalinin taşıdığı genlerde meydana gelen değişiklikler sonucunda hücrelerin kontrolsüz bölünmesiyle başlar. Aşırı proliferasyon sonucu oluşan tümör kitlesinden, hücresel göçle farklı organ ve sistemlere metastaz sonucunda organ ve sistem fonksiyonlarının bozulmasıyla ölümcül tablo gerçekleşir. Kanserin etkinliği kontrolsüz çoğalmaya ek olarak invasiv özellik kazanmasına bağlıdır (1). Tümör metastazının en önemli basamağını hücresel migrasyon ve invazyon için gerekli olan ekstraselüler matriks (ESM) degradasyonudur. ESM yapısında proteinler ve proteoglikanlar içeren, organizmalarda yapısal destek, hücre proliferasyonu, göç ve farklanma gibi olaylarda önemli işlevlere sahip olan oldukça dinamik bir yapıdır. ESM oluşum, degradasyon ve yeniden modellenme süreçlerinde, hücresel dizayn ve fonksiyonlarında Matriks metalloproteinazlar (MMPs) görev alır (1,2).

Matriks metalloproteinazlar; ESM ile bazal membran komponentlerini parçalama yeteneğine sahip olan ve aktif bölgesinde çinko içeren homolog bir enzim ailesidir. Nötral pH'da aktivasyon gösteren multigenik endopeptidaz ailesine mensup olan MMP'ler proenzim olarak fibroblastlar, osteblastlar, kondrositler, endotel hücreleri, makrofajlar, nötrofiller gibi bağ dokusu hücrelerince sentezlenerek salgılanır (1,2).

MMP'ler yıkıcı fonksiyon gösteren enzim grubu olmasına rağmen önemli fizyolojik işlevlerde kilit rol oynamaktadırlar. Yara iyileşmesi, kemik yapımı, reproduktif organlardan uterus, ovaryum (ovulasyon, implantasyon, embriyogenez) fonksiyonlarının düzenlenmesi, laktasyon gibi fizyolojik aktivitelerin gerçekleştirilmesinde etkinlik gösteren moleküllerdir. Fizyolojik süreçlere katılımın yanı sıra birçok patolojinin oluşumunda da etkin olarak rol oynamaktadırlar (1, 2).

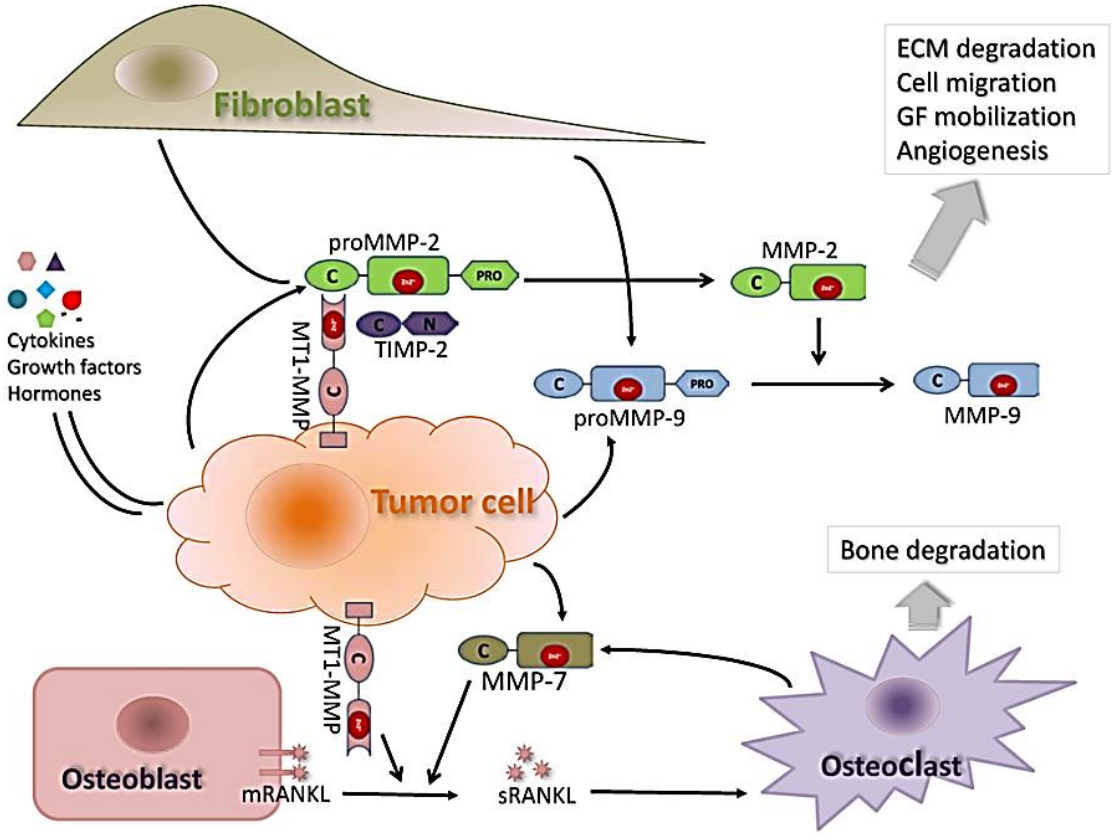
Tümör invazyon ve metastazında anahtar moleküllerden biri ESM elemanlarıdır (2). ESM tümör dokusunun büyümesi ve tümör hücresinin yayılımını önlemek için primer bir bariyer olarak görev yapar. Kanser hücreleri, bu bariyeri aşmak için matriks metalloproteazları kullanırlar (Şekil 1) (3, 4). Bu enzimler; metastaz ve invazyon, anjiyogenez, apopitozun engellenmesi gibi tümörle ilişkili patolojik olaylarda rol oynarlar.

Kanser hücreleri primer odak oluştururken tümör içerisinde kendileri için uygun yaşama ortamını da hazırlarlar. Primer odaktan metastazı gerçekleştirebilmesi için tümör çevresinde bulunan ESM moleküllerince oluşturulan, tümör için sınırlandırıcı görev gören moleküler bariyerin aşılması gereklidir. Belirli bir boyuta eriştikten sonra tümör hücrelerinin indüksiyonuyla ESM degradasyonu gerçekleştirilerek bu bariyer bozulur ve hücreler primer odaktan ayrılıp, periferik ve lenfatik dolaşıma ulaşmak için migrasyona başlarlar. Matastaz için ilk adım olan bu göç MMP lerin ESM üzerinde yapacakları degradasyonla gerçekleştilir. Bu nedenle tümörün büyümesi, özellikle metastatik aktivitede MMP fonkisyonu çok önemli işleve sahiptir.

Kanser oluşum ve gelişmesi sürecinde yer almaları nedeni ile kanser araştırmaları için potansiyel terapötik hedef konumuna gelmişlerdir. Kanser tedavisinde strateji olarak MMP inhibisyonu yoluyla ESM degredasyonunun veya yeniden modellenmesinin baskılanması yaklaşımı, araştırmacıların odaklandığı önemli bir konudur. Araştırmalarda ESM degredasyonunu baskılayan biyoaktif moleküllerin keşfinin yanı sıra, kullandıkları moleküler mekanizmalar ve etkinlik düzeylerinin belirlenmesi hedeflenmektedir.

Yapılan son araştırmalar, diyetin antioksidan içeriği ile kanser arasında ilişki olduğunu göstermektedir. Antioksidan özelliği olan biyoaktif bileşenlerden zengin diyet tüketen toplumlarda kanser insidansının daha düşük olduğu saptanmıştır (6, 7). Ayrıca bu faktörlerin sadece kanser hücre oluşumunda değil aynı zamanda kanser hücresinin gelişim ve ilerleyiş evrelerinde de etkili olabileceği bilinmektedir. Polifenoller, bitkilerde bol miktarda bulunan ve kanser hücresi proliferasyonunu, tümör büyümesini, anjiyogenezi, metastazı ve inflamasyonu antiapoptotik etkileriyle inhibe eden maddelerdir. Bu maddelerin ve sinerjik etkili molekülleri içeren çeşitli karışımların, kanser tedavisindeki etkinliğine yönelik birçok araştırma sonucu yayınlanmaktadır. Hastalığın insidansı yüksek olduğu için, hastalığın gelişimini önlemeye yardımcı

ajanların geliştirilmesi, hastalıkla ilişkili mortaliteyi, morbiditeyi ve maliyeti azaltabilmek açısından son derece önemlidir. Biyoaktif bileşenler de bu alanda umut vaat eden, toksisite riski düşük ve etkin maliyetli bileşenler olarak dikkat çekmektedir (8, 9).



Şekil 1: MMP'lerin tümör gelişimi ve metastaz mekanizmasındaki rolü (5)

Preklinik çalışmalarda Zingiberaceae ailesinden zerdeçal (*Curcuma longa* L.) ve zencefil (*Zingiber officinale* R.) bitkileri içeriğinde bulunan biyoaktif bileşiklerinin kemopreventif, antineoplastik etkilerinin olduğu öne sürülmektedir (10-13). 6-gingerol ve 6-shogaol'ün kurkuminle benzer yapıda olması ona benzer antineoplastik etkiler gösterebileceğini düşündürmektedir. Son yıllarda geleneksel tedavi yöntemelerinde, birçok hastalık ve kansere karşı koruyucu ve tedavi edici etkilerinin sürekli gündemde tutulması nedeniyle, bir baharat olarak yiyeceklere lezzet katan katkı olmanın yanısıra, sağlıklı kalma ve sağlığa kavuşma amacıyla kullanımı halk arasında oldukça yaygın hale gelmiştir. Çalışmamız bu bitkilerde bulunan biyoaktif maddelerden 6-gingerol ve 6-shagaol'un kanser hücreleri aktivasyonu üzerien etkilerini hedeflemiştir. Bu maddelerin MMP'ler üzerine etkilerine yönelik çalışma oldukça sınırlı sayıdadır.

Çalışmamız, “6-gingerol ve 6-shogaol, MMP2 ve MMP9’un mRNA ekspresyonlarını ve kanser hücrelerinin invazyonunu azaltır” hipotezine dayandırılmıştır ve bu hipotezi araştırmak için lipopolisakkarit ile inkübe edilmiş küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu metoduyla ilgili matriks metalloproteazların ekspresyon düzeylerine bakılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MMP'lerin genel özellikleri

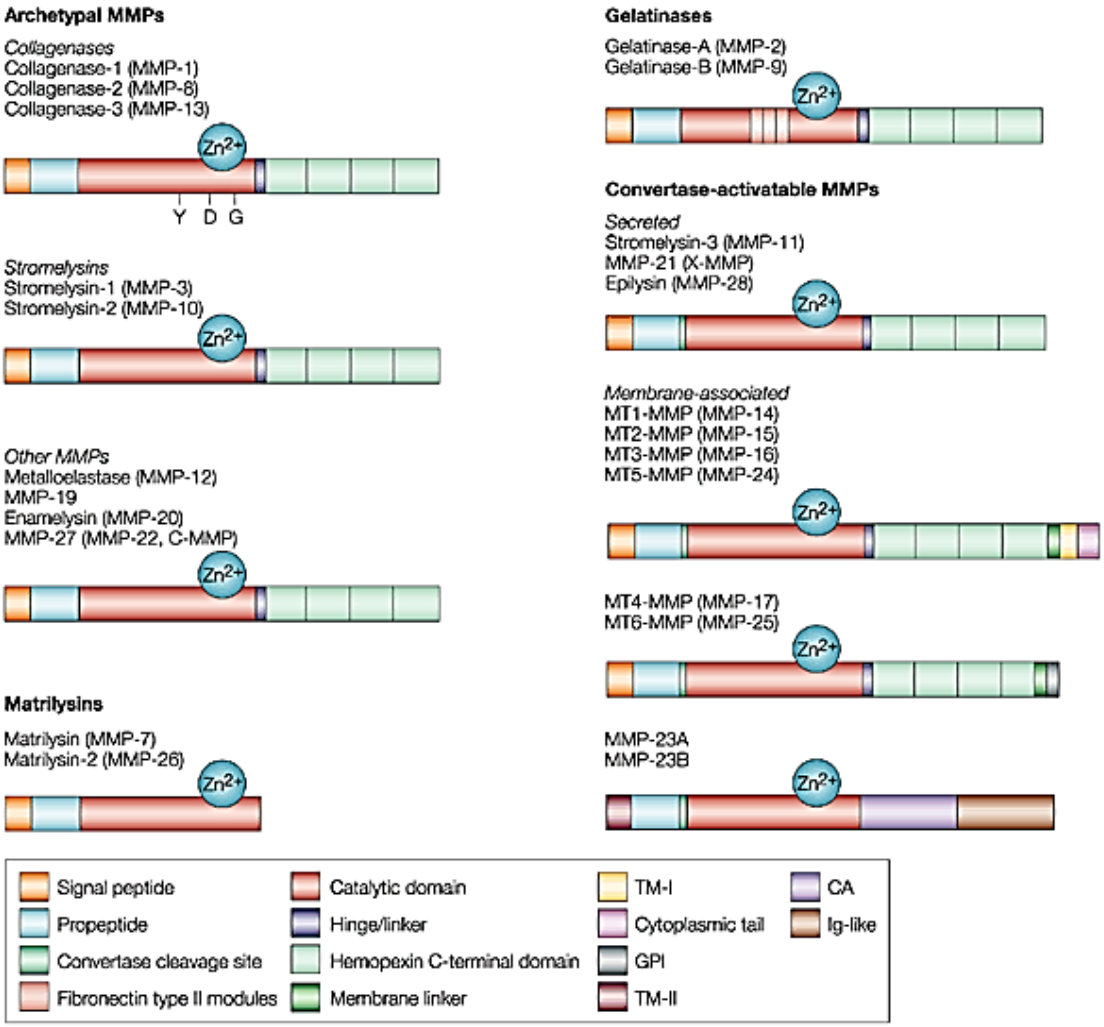
ESM, yapısında proteinler ve proteoglikanlar içeren, organizmalarda yapısal destek, hücre proliferasyonu, göç ve farklanma gibi olayalarda önemli işlevlere sahip oldukça dinamik bir yapıdır (1).

Ekstraselüler matriks ve bazal lamina degredasyonu; sistein proteazlar, aspartin proteazlar, serin proteazlar ve metalloproteazlar olmak üzere 4 enzim grubu tarafından gerçekleştirilir. Kanserde invazyon ve metastaz aktivitesinde en etkili proteazlar ise serin proteazlar ve MMP'lerdir (14). MMP'ler 1962 yılında Jerome Gross ve Charls Lapier tarafından ilk kez tanımlanmış olup (15), önceleri; kollejenazlar, strolisinler, jelatinazlar, membran tipi MMP'ler, sınıflandırılamayan MMP'ler olmak üzere 5 alt grupta toplanırken (16), günümüzde insana ait 24 MMP; "Archetypal", "Matrilysins", "Gelatinases" ve "Convertase-activatable MMPs" olmak üzere 4 grup altında toplanmıştır (17). MMP'ler sinyal peptit, propeptit, çinko bağlayıcı katalizör bölüm, hemopeksin benzeri kısım, hemopeksin kısmını katalizöre bağlayan kısım olmak üzere 5 ana bölümden oluşurlar (Şekil 2) (18).

İlk bölge sinyal peptid kısmıdır, molekülü sekresyon için hedefleyen, daha sonra uzaklaştırılan ve inaktif latend enzimde bulunmayan 80-90 civarında aminoasit içeren aminoterminal propeptid dizisidir. Propeptid domain enzim aktif olduğunda çıkarılan yüksek derecede korunmuş PRCGVPDV dizisi içeren bölümdür. Sistein rezidülerinin enzimin latent formunun korunmasında fonksiyonel olduğu düşünülmektedir. Bu domeinin çıkarılması enzimin aktif forma dönüşmesini sağlamaktadır (17,18).

Katalitik bölge histidin rezidüleri içeren, fonksiyonel stabilitenin korunmasından sorumlu çinko iyonu içeren bölgedir. Hemopeksin benzeri kısım, "hem" bağlayan moleküllere benzerliği nedeniyle hemopeksin olarak adlandırılmaktadır. Bu bölge N ve C terminal bölgelerini bağlayan disülfit bağlarını içermektedir. Prolinden zengin 5-10

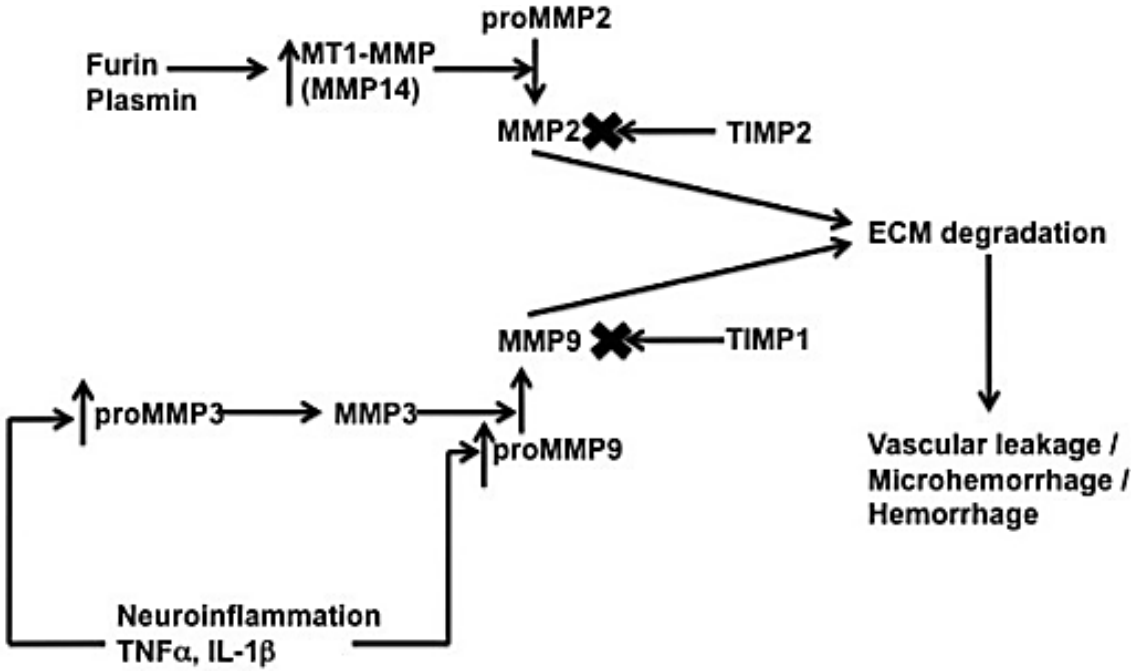
aminoasitlik bölge ile bağlanmaktadır. Matrilisin hariç bütün aile üyelerinde bulunmaktadır. Hücre yüzey reseptör alanının tanınmasında fonksiyonel olduğu düşünülmektedir (17,18).



Şekil 2. MMP'lerın yapısal özellikleri ve sınıflandırılması (18).

Jelatinaz A ve Jelatinaz B genel yapıdan farklı olarak, katalitik bölgelerinde fibronektinin kollajen bağlayan bölgesi ile ilişkili sisteinden zengin jelatin bağlayan ek bir domain daha içerirler. Membran tipi Metalloproteinazlar (MT-MMP) ve Stromelysin3 furin benzeri enzimlerin tanımlama sekanslarına homolg olan 10 aminoasitlik bir bölge içermektedirler. Jelatinazlar ve MT-MMP'ler tipV kollajenin α zincirinin benzeri bir kısım içerir. MT-MMP buna ek olarak katalitik domeinde bir transmembran domein taşımaktadır (4, 19, 20).

MMP sentezi, MT1-MMP furin ve plasmin vasıtasıyla indüklenir. Metalloproteinaz 2'nin doku inhibitörü (TIMP2) aktif MMP-2, TIMP1 aktif MMP-9'un endojen inhibitörüdür. MMP-3 proformda salgılanır ve proformda salgılanan MMP-9'u aktif forma çevirir. Hempro MMP-3 hem de MMP-9 proinflamatuvar sitokinler tümör nekroz faktör α (TNF-α) ve interlökin 1 β (IL-1β) tarafından indüklenir (Şekil 3) (21).



Şekil 3. MMP-2 ve MMP-9 aktivasyonunun şematik açıklaması (21).

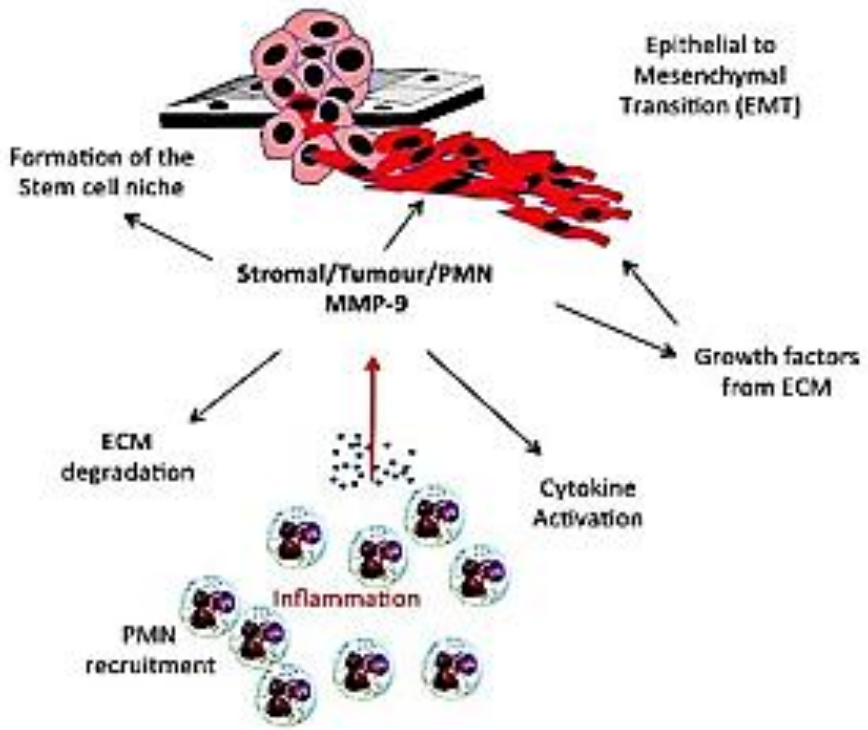
MMP'ler fonksiyonel olarak ESM'yi oluşturan komponentlerden en az birisini paraçalama yeteneğine sahip proteinaz ailesidir. Zn^{+2} iyonu içermeleri nedeniyle şelatlayıcı maddelerle fonksiyonları baskılanabilmektedir. Sentelezldiklerinde aktif formda değilerdir, proteolitik özlliklerini kazanmaları için aktive edilmeleri gerekir. "Tissue inhibitors of matrix metaloproteinases (TIMPs)" tarafından MMP'lerin aktivasyonları baskılanır. Aile mensuplarının birbiriyle aminoasit benzerlikleri oldukça yüksektir (17, 21).

2.1.1. Kanser ve MMP'ler

MMP'ler fetal gelişim ve doku tamiri gibi fizyolojik olaylarda önemli rol oynarken, kanser gibi patolojilerin gelişmesi ve yayılımında da etkili olan ekstraselüler proteazlardır (16, 22). MMP'ler ve kanser ilişkisi yaklaşık 45 yıldır araştırılmaktadır. İnsanlarda kanserle infiltre olmuş stromal hücrelerde ESM'i yıkan proteaz sistemlerine ait moleküllerin varlığı uzun süredir bilinmektedir. MMP aktivitesi sonucu oluşan

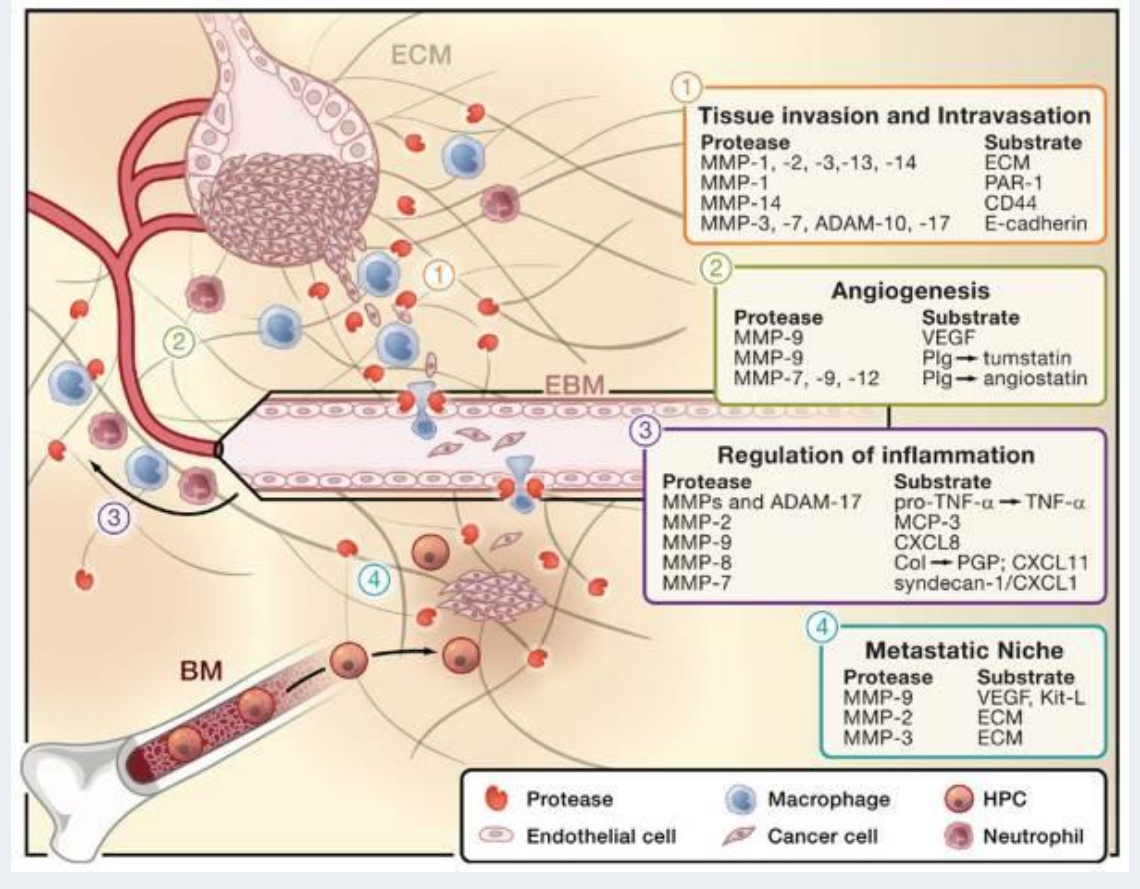
ekstraselüler matriks degredasyonu, hücre migrasyonunun da önemli aktörlerinden birisidir. Hem tümörün büyümesinde hem de primer tümör alanından hücrelerin ayrılıp metastatik aktivite gerçekleştirmesinde etkindirler. MMP'ler invazyon ve metastazda epitelyal mezenkimal geçiş aşamasında rol alırlar (Şekil 4).

Kanser invazyonunda ekstraselüler matriks ve bazal membran parçalanması, nonneoplasti doku oluşumunda olduğu gibi önemli bir basamaktır.



Şekil 4. Metastazda epitelyal mezenşimal geçiş ve ekstraselüler matriks yıkımı (23).

Bu süreç birçok ekstraselüler proteolitik enzimin işbirliğinde gerçekleştirilir. Bu süreç serin proteaz ailesi, MMPler, proenzim aktivatörleri (urokinase-type plasminogen activator-UPA, MT-MMPler), spesifik inhibitörler (PAIler, TIMPler) ve hücre yüzey reseptörlerinin (UPAR) etkili olduğu bir olaylar zincirini içermektedir. Matriks parçalanmasını sağlayan bu olaylar; ESM komponentlerinin üretimi, proteinaz üretimi, proteinaz inhibitör üretiminden oluşan üç basamakta gerçekleştirilir. Bu süreç tümör oluşumu ve metastatik göç ve invazyonda olduğu gibi fizyolojik gereksinimleri sağlayan normal fonksiyonlarda da geçerlidir(25).



Şekil 5. MMP lerin tümör metatstaz mekanizmasındaki rölünü gösteren şema (24).

Dokuya invazyon, intravazasyon ve anjiyogenez aşamasında MMPler bir çok moleküler hedefe yönelik aktivite gösterirler (Şekil 4). İnvazyon ve intravazasyonda MMP1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-13, MMP-14; anjiyogenezde MMP-9, MMP-7, MMP-12; inflamasyonun regülasyonunda MMP-2, MMP-7, MMP-8, MMP-9; matastatik nişin kurulumunda MMP-2, MMP-3, MMP-9 aktivasyonu etkilidir (Şekil-5)(24).

MMP'ler aktivitelerinin artmasına ilave olarak invazyon boyunca belli bir yerde odaklanırlar. MMP-2, MMP-9, MMP-14 ESM parçalanması için birlikte çalışırlar. Metaztaz ve tümör büyümesinde MMP aracılı sinyal regülasyonu önemli bir mekanizmadır. Akciğer, meme ve kolon kanserlerinde proteinazla aktive olan reseptörler (PAR-1) artış gösterir (25). Metaztaz ve tümör büyümesinde MMP aracılı sinyal regülasyonu önemli bir mekanizmadır. Akciğer, meme ve kolon kanserlerinde proteinazla aktive olan reseptör (PAR-1) artış gösterir (26). Kemik metastazında MMP-7 osteklast aktivitesi ve osteoliziste RANK-RANKL etkileşimini artırarak osteoklast öncülerini artırıcı etki yapar (24, 27).

MMP'lerin doğal ve edinsel bağışıklıkta önemli düzenleyici rolleri vardır. İnflamasyon sürecinde bağışıklık hücrlerince salınan sitokinler, kanser oluşumunda rol oynayabilmektedir. Önemli proinflamatuar sitokinlerden olan TNF-α T lenfosit ve makrofajlarda membran bağlı prokürsör olarak sentezlenir. Pro TNF- α'nın çözünür formu için dönüştürücü enzime veya MMP'lere gereksinimi vardır. MMP9 artışı, meme kanserinde tümörle ilişkili nötrofil, makrofaj ve lenfosit artışına ve tümör ilişkili inflamasyona neden olur (28). MMP'lerin aktivasyonunun inhibisyonu, tümör gelişimi ve metastatik aktivitenin engellenmesinde etkili bir strateji olarak düşünülmektedir (27).

Günümüzde kanser tedavisi ile ilgili çalışmalar, daha az toksik ve daha etkili MMP inhibitörleri geliştirilmesine odaklanmaktadır. Bu alanda yapılan çalışmaların sayısı her geçen gün artarak devam etmektedir. Polifenoller bitkilerde bol miktarda bulunan ve kanser hücresi proliferasyonunun, tümör büyümesini, angiogenezi, metastazı ve inflamasyonu antiapoptotik etkileriyle inhibe eden maddelerdir. Bu maddelerin ve sinerjik etkili molekülleri içeren çeşitli karışımların kanser tedavisindeki etkinliğine yönelik birçok araştırma sonucu yayınlanmaktadır. Polifenol içerikli kombinasyonların kanser oluşum ve gelişimine karşı güvenle kullanılabilecek etkili ajanlar olarak değerlendirilebileceği ifade edilmektedir (30). Bu maddelerin ve sinerjik etkili molekülleri içeren çeşitli karışımların kanser tedavisindeki etkinliğine yönelik birçok araştırma sonucu yayınlanmaktadır.

2.2. Kurkumin

Kurkumin (curcumin) (diferuloilmetan), *Curcuma longa* L. bitkisinin sarı renkli ana pigmentidir. Ülkemizde zerdeçal, zerdeçöp ya da hint safranı olarak bilinen bu bitkinin rizomları yemeklere aroma katmak ve sarı rengiyle yemeklerin görünümünü güzelleştirmek için baharat olarak kullanılmaktadır (Şekil 6). Bunun yanı sıra bu bitki, tarih boyunca özellikle Asya'da tıbbi amaçlı olarak da kullanılmıştır. Birçok inflamatuvar ve kronik hastalıkların geleneksel yöntemlerle tedavisinde (Ayurveda, Geleneksel Çin Tıbbı vb.) yer almıştır. Halk arasındaki bu kullanımı zamanla bilim dünyasının ilgisini çekmiş ve geleneksel özelliklerinin birçoğu, hücre ve hayvan modellerinde deneysel olarak da gösterilmiştir.

Bitkinin rizomlarından ekstre edilen fenolik yapıdaki kurkumin molekülünün ve aktif metabolitlerinin (Şekil 6) antikanserojen ve antiinflamatuvar özellikleri günümüzde de yaygın olarak çalışılmakta (30) ve kemopreventif bir ajan olarak umut vaat etmektedir.

Kolon kanseri, pankreas kanseri, safra kesesi kanseri ve oral kanserler gibi farklı kanser türleri ve Alzheimer, ülseratif kolit, diyabet, obezite ve epilepsi gibi çeşitli hastalıklarla olan ilişkisi klinik çalışmalarda da incelenmiştir (31). Kanser hücreleri üzerine olan etkisi ve etki mekanizmaları da *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda sıkça araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda kurkuminin diğer biyoaktif bileşenlerde olduğu gibi kanser gelişimini farklı basamaklarda etkileyebileceği gösterilmiştir (30).

Şekil 6. Zerdeçal bitkisi, çiçeği ve rizomu.

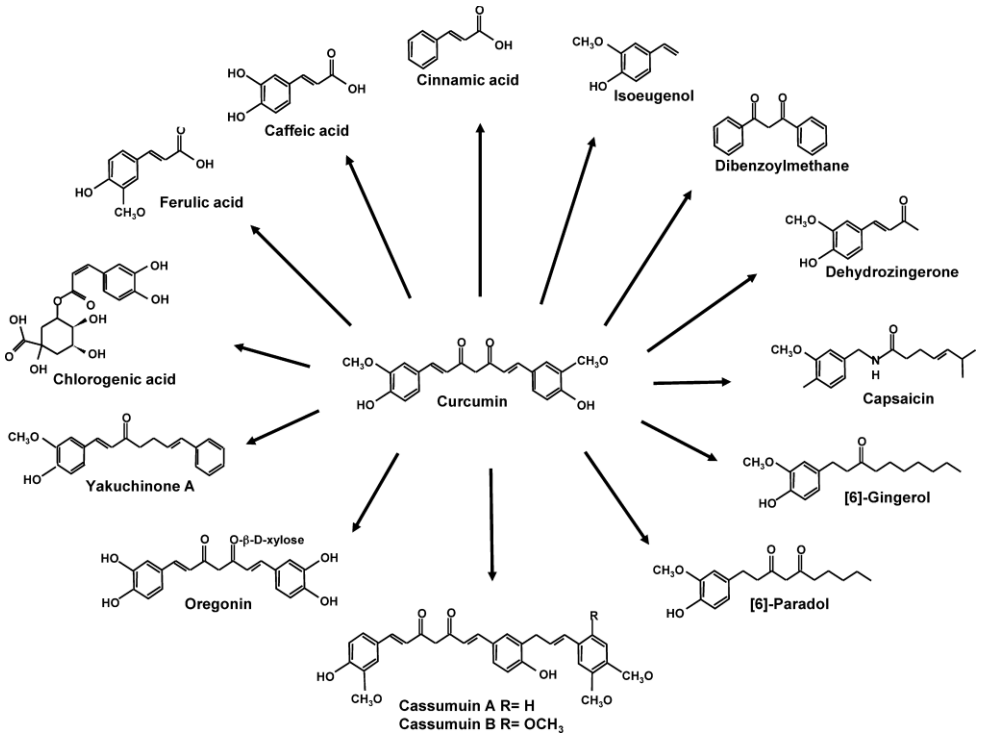
Kurkuminin büyüme faktörlerini, adezyon moleküllerini, apoptozla ilişkili genleri, anjiyogenez düzenleyicilerini ve hücresel sinyal moleküllerini etkileyerek metabolizmada birçok yolakta işlev gösterebileceği saptanmıştır. Kanserli hücrelerde, hücre çoğalmasını, hücre döngüsünü etkilediği, kanser invazyonunu ve metastazını engellediği ve inflamatuvar yanıtı düzenlediği iddia edilmektedir (32, 33).

Kurkuminin hücre çoğalması üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, LNCaP (androgen-sensitive human prostate adenocarcinoma cells) ve PC-3 (human prostate cancer cells) hücrelerinde kurkumin uygulamasının epidermal büyüme faktör reseptör (EGFR) sinyalinin potansiyel bir inhibitörü olduğu, bu inhibisyonu da EGFR ekspresyonunu baskılayarak ve EGFR tirozin kinaz aktivitesini engelleyerek gerçekleştirdiği gösterilmiştir (34). Yapılan *in vivo* bir çalışmada 6 hafta süreyle %2 kurkumin içeren diyetin, LNCaP hücreleri enjekte edilen farelerde tümör hücre çoğalmasını azalttığı ve apoptozu anlamlı şekilde arttırdığı gösterilmiştir (33, 34).

Kurkuminin tümör invazyonu ve metastazı üzerine olan etkisi de çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda araştırılmıştır. Hong ve ark. tarafından yapılan çalışmada tümör invazyonu ve metastazı için önemli olan MMP'ler incelenmiştir. Çalışmada, kurkuminin kanser hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 aktivitelerini azalttığı gösterilmiştir. Aynı zamanda kurkumin tedavisi ile tümör hacminde azalma meydana geldiği de bildirilmiştir.

Aynı zamanda kurkumin tedavisi ile tümör hacminde azalma meydana geldiği de bildirilmiştir. Çalışmanın *in vivo* olarak yürütülen kısmında kurkumin ile tedavi edilen grupta metastatik nodüllerin daha az olduğu saptanmıştır (36). Yapılan *in vivo* toksisite çalışmasında kurkuminin MMP-9 expresyonunun düşürdüğü, TIMP-1 (metalloproteinazın doku inhibitörü) ekspresyonunu değiştirdiği tespit edimiştir (37).

Kurkuminin inflamatuvar yanıt üzerinde de önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Kurkuminin nükleer faktör kappa B (NF-κB) aktivasyonunu ve siklooksigenaz-2 (COX-2) ekspresyonunu azalttığı ve IL-6, IL-8, TNF-α üretimini baskıladığı bildirilmiştir. *In vitro* olarak yapılan çalışmalarda da kurkuminin inflamatuar göstergelerin aktivasyonunu ve ekpresyonunu düzenleyerek apoptozu arttırdığı, hücre çoğalmasını engellediği ve metastazı teşvik eden faktörleri azalttığı gösterilmiştir (38).



Şekil 7. Zerdeçal ve kurkumin metabolitlerinin doğal analogları (35)

Kurkuminin *in vivo* ve *in vitro* olarak çok sayıda çalışması mevcut olmakla birlikte, klinik çalışmalarına yakın zamanda başlanmıştır. Farmakokinetiğini incelemeye yönelik Faz 1 ve Faz 2 klinik çalışma sonuçlarına göre kurkuminin iyi tolere edilebilen, güvenilir bir molekül olduğu belirtilmiştir. İleri düzey kolorektal kanseri olan 15 kişi ile yapılan bir çalışmada 4 aya kadar günde 180 mg kurkumin verilmesinin iyi tolere edilebildiği gösterilmiştir. Bununla beraber insanlarda biyoyararlılığının düşük olduğu da kaydedilmiştir. Kurkuminin 3 ay süreyle 8 grama kadar kullanımının güvenilir olduğu bildirilmiştir. Pankreas kanseri olan 21 hastayla yapılan bir Faz II çalışmasında, günde 8 gram kurkuminin 18 aya kadar kullanılmasının herhangi bir toksisite göstermediği belirlenmiştir. Bu çalışmada da kurkuminin biyoyararlanımının düşük olduğu, buna karşın biyolojik aktivitesinin mevcut olduğu bildirilmiştir (39).

Klinik çalışma aşamasına henüz yeni geçilmiş olsa da *in vitro* ve *in vivo* sonuçlar ile klinik farmakokinetik verilerine dayanarak kurkuminin toksisitesi düşük, güvenilir ve etkili bir molekül olarak umut vaat ettiği söylenebilir. Kurkuminin, şu an için klinikte kullanımına ilişkin en büyük engel, suda az çözünmesi, yarı ömrünün kısa olması ve düşük biyoyararlanıma sahip olmasıdır. Kurkuminin yüksek biyoyararlılığa sahip yeni formları geliştirilmekte ve bunlara ilişkin farmakokinetik çalışmalar yapılmaktadır (8, 40, 41, 42)

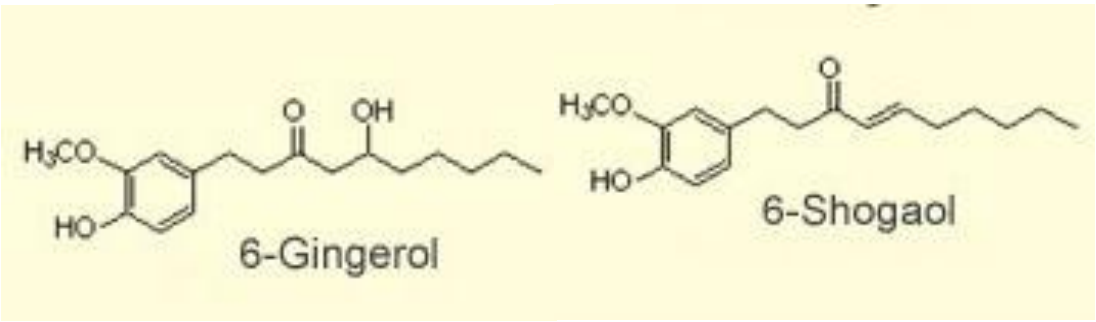
2.3. 6-GİNGEROL

Preklinik çalışmalarda zencefil (*Zingiber officinale* R., Zingiberaceae) (Şekil 8) ve bileşiklerinin kemopreventif, antineoplastik etkilerinin olduğu öne sürülmüştür (10-13). Zencefilin kanseri önlemedeki rolünü serbest radikalleri yok etme (43), gen ekspresyonları değişimi ve apoptozun indüksiyonu (44) gibi mekanizmalar aracılığıyla tümörün oluşumu ve ilerlemesini azaltacağına dair etkisinin olduğu hususu birçok bilimsel araştırmaya konu olmuştur. 6-gingerol (Şekil 9), zencefilin acı keskin maddesi olup, antibakteriyel, anti-inflamatuvar ve antitümör özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Kim ve ark., 6-gingerol'un VEGF (vasküler endotelyal growth factor) ve bFGF (Basic fibroblast growth factor**)** ile indüklenmiş insan endotelyal hücrelerinin yayılımını inhibe ettiğini ve G1 fazında hücre döngüsünü durdurduğunu belirlemişlerdir (45, 46). Damarların VEGF'e verdiği yanıt bloke edildiğinde, farede korneada yeni damar oluşumu inhibe edilmiştir (47). Melanoma hücrelerine enjekte edildiği çalışmada metastazı azalttığı bildirilmiş. Deneylerde tubulin ve mikrotubulinin yapı ve fonksiyonel

görevleri kaybolarak, hücrelerde anti-mitotik sonuçlar elde edildiğinden anti-kanserojenik etki gösterdiği sonucuna varılmıştır (48).

Şekil 8. *Zingiber officinale* Roscoe (Zencefil) bitkisi, çiçeği ve rizomu.

6-gingerolün deri kanserlerinin tedavisinde etkili bir şekilde kullanılabileceğini bildiren çalışmalar da mevcuttur (49).



Şekil 9. 6-Gingerol ve 6-Shogaol'ün moleküler yapısı.

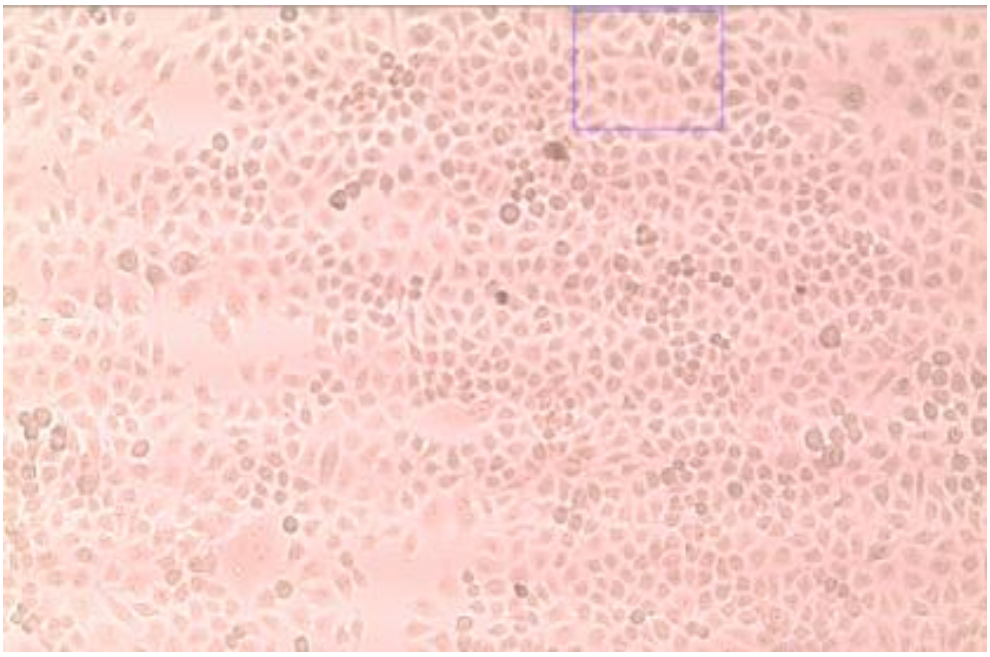
2.4. 6-SHOGAOL

Zencefilin içeriğinde yer alan, fenilpropanoid türevi bir biyoaktif madde olan 6-shogaol, antienflamatuvar, antikanserojenik, bulantı engelleyici etkilere sahip bir moleküldür. Hung ve arkadaşlarının 6-shogaol'ün (Şekil 9) antikanserojenik etkilerini araştırdıkları bir çalışmada 6-shogaol'ün otofajik hücre ölümünü indükleyerek hücre yayılımını inhibe ettiğini bildirmişlerdir (antiproliferatif etki). Kanser metaztazında etkili olduğu bildirilen aktin içeriğinden zengin hücre membran çıkıntılarıyla (invadopodia) ilişkili

proteinlerin bloklanmasıyla tümör metastazının engellenebileceği ileri sürülmektedir. 6-shogaol uygulanan agresif meme kanseri hücrelerinde (MDA-MB-231) MMP-2 ve 9, invadopodia maturasyonunda etkili olan c-Src kinaz, cortactin, ve MT1-MMP) düzeylerini düşürerek metastazı inhibe ettiği belirtilmiştir (50). 6-shogaol; AKT/mTOR sinyal yolağınıda bloke ederek AKT ve alt hedeflerin bloke edilmesini sağlamaktadır. mTOR yolağı kanserde mutasyonlarla aktive olur. mTOR aktivasyonu ile etkilenen anahtar proteinler; hücre döngü düzenleyicileri, aminoasit ve glukoz taşıyıcıları, DNA onarımı ve hücre yaşamı, proanjiyogenik faktörlerdir. mTOR aktivasyonu, metabolizma, hücre büyümesi, çoğalma, anjiyogenez, için önemli proteinlerin sentezini uyararak, kanser hücresinin aktivasyonunu sağlar. Bu yolağın inhibisyonu ve diğer bulgular küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde kullanılabileceğine dair hedef oluşturabilmektedir (51)

2.5. A549 HÜCRE HATTI

A549 hücre hattı, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olarak da isimlendirilen insan alveolar bazal epitelyum hücresi kaynaklı bir hücre hattıdır. Alveolar bazal epitelyal hücreler akciğerin dışarıdan gelecek zararlı uyaranlara karşı birincil koruma bariyeri olarak görev alır. Bu hücre hattı, gerek transfeksiyon gerekse sitotoksite ve ilaç yanıtı çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir hücre hattıdır (Şekil 10) (52).



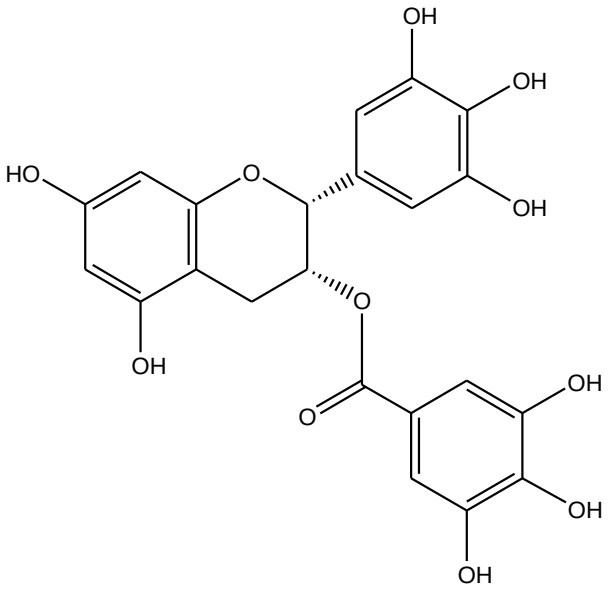
Şekil 10. A549 Hücreleri (DMEM besi ortamında)

2.6. LİPOPOLİSAKKARİT (LPS)

Lipopolisakkarit (LPS), gram negatif bakterilerin dış membran komponenti olup, inflamatuar sitokinlerin aşırı üretimine yol açarak septik şok ve çeşitli inflamatuvar hastalıkların patogenezinde önemli rol oynar (53). Bunun yanı sıra LPS NF-kappaB ve MAPK kaskadını ve PI3K aktive ederken Rapamisin bu etkiyi negatif etkilemektedir (54). Küçük hücreli olmayan karsinoma hücre hattında LPS uygulanması, MMP2 ve MMP9 ekspresyonunda artışa sebep olduğu araştırma sonuçlarında belirtilmiştir (55). Bu nedenle LPS ile indüklenmiş kanser hücre hattı kültürleri MMP araştırmaları için uygun deneysel modeli oluşturmaktadır.

2.7. EPİGALLOKATEŞİN-3-GALLAT

Epigallokateşin, gastrointestinal sistem kanserlerinde koruyucu etkisi olduğu ileri sürülen (56), yeşil çayda bulunan bir polifenoldur (Şekil 11). Epigallokateşinin tümör hücresi üzerinde bulunan aril hidrokarbon reseptöre bağlanarak, hücre büyümesini ve proliferasyonunu önlediği bildirilmiştir (57).



Şekil 11. Epigallokateşin-3-gallat'ın moleküler yapısı.

Bu çalışmada, kurkumine kimyasal olarak oldukça yakın, tek aromatik halkalı bileşikler olan; enflamasyondan kansere bir çok patolojide etkin olduğu gösterilen, PGE_2 üzerinden antienflamatuvar, antikanserojen etkinlik gösterdiği düşünülen 6-gingerol ve 6-shagaol'ün farklı konsantrasyonlarının, epigallokateşinin ve kurkuminin kanser

hücrelerinin invasyon sürecinde etkin olduğu belirlenen MMP2 ve MMP9 aktivitesini uyaran LPS ile kombinasyonlarının A549 hücrelerinde mRNA düzeyleri belirlenerek invazyon sürecine etkileri değerlendirilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Hadiye Kılıçer Moleküler Hücre Kültürü Laboratuvarında bulunan altyapı ve teknik materyallerle gerçekleştirildi.

Çalışmada 6-gingerol ve 6-shogaol'ün farklı konsantrasyonlarını, kurkuminin 20 µM ve epigallokateşinin 10 µM konsantrasyonlarını içeren besiyerleri kullanılarak A549 hücre hattında 11 grup oluşturuldu (Tablo 1).

Tablo 1. Deney grupları

Kontrol LPS (-)
Kontrol LPS (+)
Kurkumin 20 µM LPS (+)
6-gingerol 80 µM LPS (+)
6-gingerol 160 µM LPS (+)
6-gingerol 240 µM LPS (+)
6-shogaol 30 µM LPS (+)
6-shogaol 60 µM LPS (+)
6-shogaol 120 µM LPS (+)
Epigallokateşin-3-gallat LPS (+)

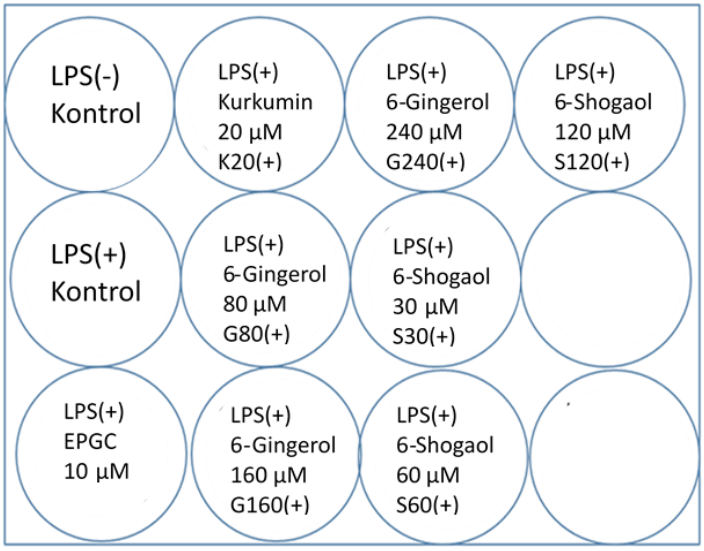
3.1. Besi Yeri Hazırlanışı

Hücre kültürü çalışmalarında A549 hücre pasajları için Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kullanıldı. Besiyeri içerisine % 10 Fetal Sığır (Bovine) serumu (FBS) eklendi. n yapılarla birleşip hücrelerin kültür kabına tutunmasını ve hızlı prolifere olmasını sağlar. Serumdan gelebilecek kirlenmenin olup olmadığını görmek için

besiyeri tekrar 37 ^{o}C'deki CO_2 etüvünde 2-3 gün bekletildi. Bu süre sonunda serumdan kaynaklanan bir kontaminasyon izlenmeyen besiyerine son konsantrasyonları 10 U/mL penisilin, 100µg/ml streptomisin olacak şekilde antibiyotik karışımı eklendi ve kullanılıncaya kadar +4 ^{o}C'de muhafaza edildi.

3.2. Hücre Bakımı

Donmuş halde bulunan hücreler çözdürüldükten sonra içerisinde 10 ml besiyeri bulunan 75 cm^{2}' lik kültür kabına konuldu. Hücreler 37 ^{o}C'de %5 CO_2 sağlanan inkübatörde haftada 2-3 kez besiyerini değiştirmek suretiyle çoğaltıldı. Hücrelerin aşırı büyüyerek strese girmelerini engellemek amacıyla hücrelerin kültür kabındaki doluluk oranının %80' i geçmemesine özen gösterildi. İnkübasyon süresince kültür kapları yatık vaziyette inkübatörde bekletildi. Taze besiyeri eklenmesi işlemi, eski besiyerinin steril pipetle uzaklaştırılıp 10 mL yeni besiyeri eklenerek gerçekleştirildi. Hücre sayımı için kültür kabının tabanına yapışmış olan hücreler kalsiyum-magnezyum içermeyen fosfat tamponlu tuz solusyonu (Phosphated Buffer Salt; PBS) ile yıkandıktan sonra tripsin/EDTA ile muamele edilerek kaldırıldı (Şekil 12) (48).



Şekil 12. Deney gruplarının 12 kuyulu plakada dağılımı.

3.3. Tripsinleme İşlemleri

Tripsinleme işlemi tripsin, arjinin ve lizin aminoasitlerinin karboksil grubunun katıldığı peptid bağlarını kırmak suretiyle, hücrelerin kültür kabının tabanından ve birbirlerinden ayrılmasını sağlamaktadır (44); ancak tripsinle muamele süresinin uzaması hücre canlılığını azaltmaktadır. Bu amaçla tripsinleme işleminde plaka doluluğuna bağlı olarak 10 dk' lık sürenin geçirilmemesine özen gösterildi. PBS ile yıkanan hücrelerin üzerine 3 mL tripsin/EDTA ortalama 5 dk inkübatörde bekletildi. Bu sürenin sonunda kültür kabında bulunan tripsinli hücre süspansiyonu derhal şişeden alınıp santrifüj tüpüne eklendi. İçerisinde hücre süspansiyonu bulunan santrifüj tüpü, 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılıp dibe çökmüş hücrelerden oluşan çökeltinin üzerine hücre yoğunluğuna bağlı olarak 1-2 ml besiyeri eklenip pipetle birkaç kez pipetaj işlemi yapıldı. Bu şekilde hücreler kültür şişesinin tabanından tripsinleme yoluyla kaldırılıp (tek hücre süspansiyonu haline getirilip) sayılacak duruma getirildi (58).

3.4. Hücre Sayımı, Dağıtımı ve Maddelerin Uygulanması

Tripan mavisi ile sayım ölü hücrelerin içerisine giren daha yoğun boya nedeniyle canlı hücrelere oranla daha koyu boyanması dikkate alınarak yapılan sayımla hesaplanmaktadır. Bunun için 0.5 ml' lik bir ependorf tüpüne 10 µg/ml olacak şekilde PBS'de hazırlanan tripan mavisi çözeltisinden ve santrifüj tüpünde bulunan hücre süspansiyonundan birebir oranda olacak şekilde 100'er µL konulup karıştırıldı. Hücre sayısına bağlı olarak agregasyonu düşürmek için sayım numunesinde 1:5, 1:10 oranında besiyeri ile dilüsyon yapıldı.

Hücreler 12 kuyucuklu plakalara her kuyuda 200.000 hücre olacak şekilde 450 µL besiyeri içinde dağıtıldıktan sonra 1 gece inkübasyona bırakıldılar ve kontrol grubu haricinde tüm hücrelere 25 µg/ml LPS uygulandı. LPS ile 2 sa inkübasyondan sonra taze besiyeri içinde 6-gingerol (80, 160, 240 µM), 6-shogaol (30, 60, 120 µM), kurkumin (20 µM), epigallokateşin gallat (10 µM) olacak şekilde hücrelerin üzerine eklendi. LPS ve ilaç grupları 10 kat konsantre hazırlanarak daha önceden 450 µL besiyeri bulunan plaka içine 50 µL olacak şekilde 1X konsantrasyona düşürüldüler. 24 sa boyunca inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda kuyu içeriği uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerden total RNA izolasyonuna geçildi.

3.5. RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu tripure izolasyon kiti (Roche 000000011667157001) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

- Plaka kuyusuna 0.4 mL Tripure® Reagent eklenip pipetaj yapıldı ve 5 dakika bekletildi.
- Hücreler ependorf tüplere alındı.
- Eppendorflara 100 µL kloroform eklenerek, elle sertçe ve iyice karıştırılıp 3 dakika bekletildi.
- 4 ºC, 12,000 g, 15 dakika santrifüj edildi.
- Yüzeyden RNA alınarak yeni ependerflara aktarıldı.
- 0.25 mL % 100'lük RNA çöktürülmesi için isopropanol eklenerek 10 dakika bekletildi.
- 4 ºC, 12,000 g, 10 dakika santrifüj sonrasında süpernatantı atılıp pelet bırakıldı.
- Pelet üzerine 0.5 mL % 75 etanol ekleyip vortekste karıştırıldı.
- 7500 g, 5 dakika, 4 ºC santrifüj ettikten sonra süpernatant atıldı ve iyice kurulandı.
- Üzerine otoklavlanmış steril bidistile su (20 µL) eklendi.
- 10-15 dakika 55-60 ºC'de bekletildikten sonra NanoDrop (ND-1000), spectrophotometer'de ölçüldü.
- DNAse buffer (2.5 µL) ve DNAse (1 µL) her bir örnek hücrenin üzerine eklenerek 37 ºC'de 30 dakika bekletildi.
- Sonra her bir örnek üzerine 5 µL DNAse inactive eklendi ve 2 dakika bekletildi.
- 1000 rpm, 4 ºC'de 1 dakika santrifüj adildi ve ependorflardaki süpernatantı alınıp başka bir eppendorf tüpüne aktarıldı.
- Aktarılan bu süpernatant sadece RNA'dan oluştuğundan, NanoDrop (ND-1000) spectrophotometer'de ölçüm yapıldı. Total RNA 1 µg için gereken hacimler hesaplanarak cDNA sentez reaksiyonuna geçildi. A 260/ A 280 oranının yuksek seviyede saflaştırılmış RNA eldesi için ölçümü yapıldı. Bu değerin 1,8 ile 2,1 arasında olması ile saf RNA ölçümü açısından bilgi verdi.

cDNA sentezi Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche 04379012001) ile iki aşamalı prosedüre göre yapılmıştır. Reaksiyon sırasında kullanılan reaktiflere Tablo-2' de yer verilmiştir. Birinci aşamada ortama total RNA, anchored

oligo (dT_{18}) primer ve random hexamer primer konulmuş ve Biorad thermal cycler cihazında 65 ºC de 10 dakika ısıtarak RNA denature edildi.

Tablo 2. cDNA sentez reaksiyonu karışımı içeriği

Bileşen	**Hacim**	**Son Konsantrasyon**
Total RNA	Nanodrop ölçümüne göre ihtiyaç duyulan değişken µL' de	1 µg total RNA
Anchored-oligo(dT_{18}) primer 50 pmol/µL (flakon 5)	1 µL	2,5 µM
Random Hexamer Primer, 600 pmol/µL (flakon 6)	2 µL	60 µM
PCR kalitesinde Su, (flakon 7 veya 9)	13 µL' ye tamamlayacak şekilde ihtiyaç duyulan µL	-
65 ºC de 10 dk denatürasyon		
Transcriptor Reverse Transcriptase, 20 U/µL (flakon 1)	0.5 µL	10 U
Transcriptor Reverse Transcriptase Buffer, 5 x conc. (flakon 2)	4 µL	1 x (8 mM MgCl2)
Protector Rnase Inhibitor, 40 U/µL (flakon 3)	0.5 µL	20 U
Deoxynucleotide Mix, 10 mM each (flakon 4)	2 µL	1 mM each
TOPLAM	20 µL	-
10 dk 29°C, 60 dk 48°C, 5 dk 85°C' de reaksiyon döngüsü (1 kez)		

Denatürasyon aşaması kit prosedüründe opsiyonel olarak sunulsa da 65 ºC' de ısıtılan RNA' nın sekonder yapılarının giderilmesi ve istenen cDNA' nın tam uzunlukta sentezlenmesi anlamında verimi artırdığı düşünülmektedir. Ortama Tablo 2' de yer alan flakon 1, 2, 3 ve 4' te reaktifler eklendi. Kullanılan primer ve hedef mRNA uzunluğuna bağlı olarak RT reaksiyonu inkübasyon işlemi Tablo 3' teki gibi gerçekleştirildi.

Sentezi yapılan 20 µL' lik cDNA' lar 1:5 oranında PCR suyu ile seyreltilerek toplam hacim 100 µL' ye tamamlandı ve MMP2 ile MMP9 ekspresyon düzeylerinin ölçülebilmesi için q-PCR aşamasına geçildi.

Tablo 3. RT-PCR reaktifleri

Reaktif	**Hacim**
H_2O	10 µL
Parametre RT ready assay (20X)	1 µL
Master mix (5X)	4 µL
cDNA	5 µL
Toplam	20 µL

MMP2 ve MMP9 mRNA düzeylerinin belirlenebilmesi için Roche real time ready assay kiti kullanılmıştır. Bu kitte hidroliz prob ve türe özgü olarak bakılarak cDNA' lar için kullanılması gereken primerler paket halinde gönderilmektedir. Kantitatif -PCR işlemi kit prosedürüne göre Tablo 4' te yer alan reaktifler kullanılarak ve Tablo 5' te yer alan sıcaklık döngüleriyle gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4. RT-PCR sıcaklık döngüleri

Döngü	**Sıcaklık ve süre**
Denatürasyon	95°C' de 10 dk 1 döngü
2 aşamalı Amplifikasyon	60 ^{o}C' de 30 sn ve 72 ^{o}C' de 1 sn (45 döngü)
Soğutma	40 ^{o}C

Kantitatif-PCR işleminde MMP-2 ve MMP-9 ct değerleri β-actin'e normalize edilmiştir ve Sonuçlar % değişim olarak aşağıda yer aldığı şekilde hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Değişim} = \frac{2^{-[(C_t \text{ hedef})-(C_t \text{ hedef housekeeping})]}}{2^{-[(C_t \text{ kontrol})-(C_t \text{ kontrol housekeeping})]}} \text{ x } 100$$

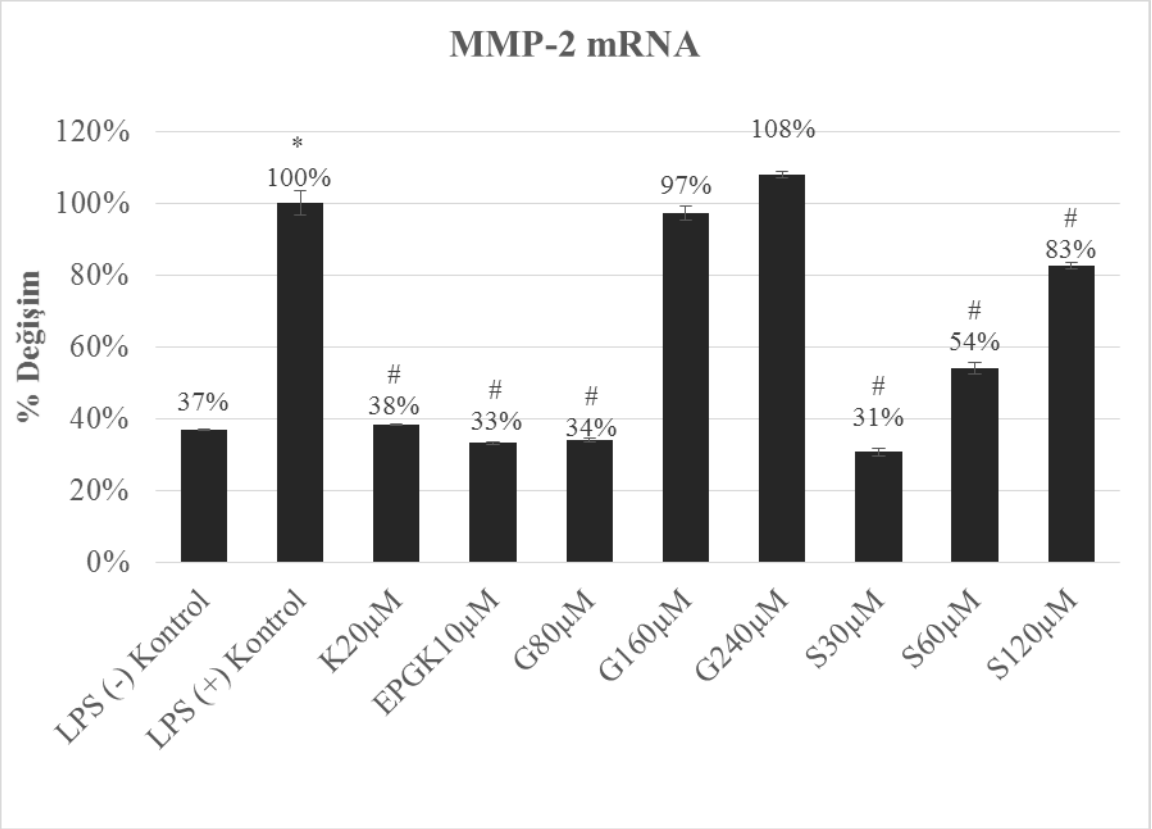
3.6. İstatistiksel Analiz

Grupların arası istatistiksel anlamlılık verilerin normal dağılım gösterip göstermemesine göre Student-t ve Mann-Whitney U testleri ile gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ ve $p<0,001$ olarak ifade edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmada küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücre hattı olan A549 hücreleri kullanılmıştır. Hücrelerde LPS ile inflamatuvar yanıtlar tetiklenmiş ve bu koşullarda metastazdan sorumlu olan matriks metalloproteinazlardan olan MMP-2 ve MMP-9 gen ekspresyonlarının 6-gingerol ve 6-shogaol uygulaması ile nasıl etkilendiği ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştr. Kurkumin, MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunu inhibe ettiği bilinen ve yapıca 6-gingerol ve 6-shogaol'e benzeyen bir madde olduğundan çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca her üç maddenin etkileri yine MMP2 ve MMP9 inhibitör etkisi bilinen epigallokateşin-3-gallat ile karşılaştırılmıştır. Öncelikle kontrol grubu ile LPS uygulanan grup karşılaştırıldığında; kanser hücrelerinde LPS uygulanması, MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyonunda artışa sebep olmuştur (Şekil 13,14). Her iki maddenin farklı konsantrasyonları ile 20 µM kurkumin, LPS ile indüklenmiş olan A549 hücre hattı gruplarına uygulanmıştır. Antiinflamatuvar özelliği ile bilinen kurkuminin 20 µM uygulandığı gruplarda MMP2 mRNA ekspresyonu ($p<0,05$) azalmıştır. 6-Gingerol'ün uygulanan en düşük (80 µM) dozda, kontrole göre MMP2 mRNA ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bir azalma, 160 ve 240 µM'lık dozlarında ise MMP-2 mRNA ekspresyonunda LPS(+) kontrol grubuna göre herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 13). Shogaol ise uygulanan tüm dozlarda MMP mRNA ekspresyonunu anlamlı derecede ($p<0,05$) azaltmıştır. Tüm gruplar içerisinde en belirgin azalma, 30 µM 6-shogaol grubunda izlenmiştir. 6-Shogaol düşük dozda MMP-2 üzerine güçlü inhibitör etkinlik göstermekle birlikte doza bağımlı olarak MMP-2 mRNA ekspresyonunu inhibe edici etkisi doza bağımlı olarak azalmıştır. Hem 6-shogaol hem de 6-gingerol uygulamasında en düşük dozlarda MMP-2 mRNA ekspresyonu azalmıştır. Bu azalma maddelerin düşük dozlarının tümör invazyonunu azaltması açısından en etkili doz olabileceğini düşündürmektedir.

Kurkumin ve epigallokateşin-3-gallat MMP-2 mRNA ekspresyonunu LPS uygulanan gruba göre anlamlı ($p<0,05$) düzeyde azaltmıştır. Bu sonuçlar düşük dozda 6-gingerol ve 6-shogaol'ün MMP-2 mRNA ekspresyonunu inhibe edici etkisinin kurkumin ve epigallokateşin-3-gallat ile hemen hemen aynı olduğunu göstermektedir.



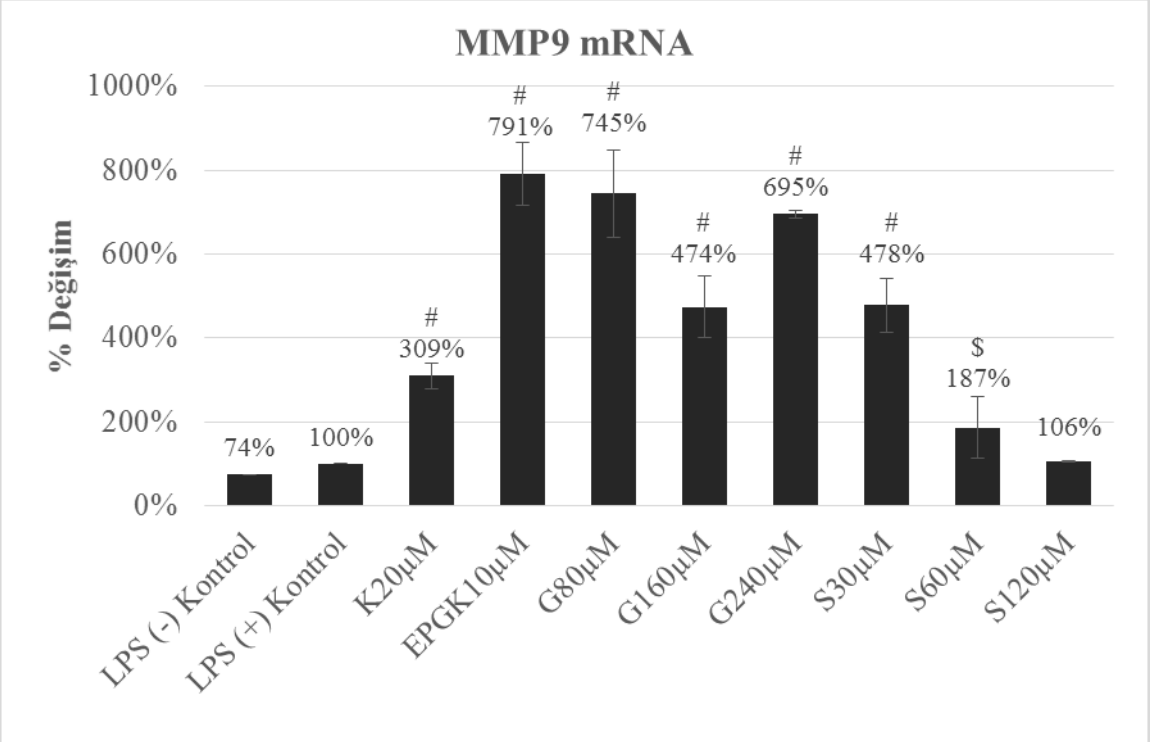
Şekil 13: Farklı konsantrasyonlarda uygulanan kurkumin, 6-shogaol ve 6-gingerol, epigallokateşin-3-gallat maddelerinin, LPS uygulanmış A549 hücre hattında MMP2 mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisinin qPCR analiz sonuçları.

LPS(-) Kontrol: LPS uygulanmayan kontrol grubu LPS(+): LPS uygulanan kontrol grubu. K20:Kurkumin 20µM, EPGK10: Epigallokateşin-3-gallat 10 µM, G80: 6-gingerol 80 µM, G160: 6-gingerol 160 µM, G240: 6-gingerol 240 µM, S30: 6-shogaol 30 µM, S60: 6-shogaol 60 µM, S120: 6-shogaol 120 µM. * LPS(-) grubuna göre $p<0,05$. # LPS(+) grubuna göre $p<0,05$.

A549 akciğer karsinoma hücre hattında, LPS uygulanması, MMP9 mRNA ekspresyonunda beklendiği şekilde artışa ($p<0,05$) sebep olmuştur. 6-Gingerol uygulamasının tüm konsantrasyonlarında MMP9 mRNA ekspresyonu artış göstermiştir ($p<0,001$) (Şekil 14).

6-Shogaol'ün 30 µM ($p<0,001$) ve 60 ($p<0,05$) µM dozlarında kontrole göre MMP9 mRNA ekspresyonu yüksek iken, 120 µM uygulaması MMP9 mRNA ekspresyonunu kontrol değerlerine yaklaştıracak kadar inhibe etmiştir (Şekil 14). Tüm gruplar içerisinde en belirgin MMP9 mRNA ekspresyonu inhibisyonu 6-shogaol 120 µM'da izlenmiştir.

Kurkumin ve epigallokateşin-3-gallat MMP9 mRNA ekspresyonunu anlamlı derecede arttırmıştır ($p<0,001$)



Şekil 14. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan kurkumin, 6-shogaol ve 6-gingerol, epigallokateşin-3-gallat maddelerinin, LPS uygulanmış A549 hücre hattında MMP-9 mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisinin qPCR analiz sonuçları.

LPS(-) Kontrol: LPS uygulanmayan kontrol grubu LPS(+): LPS uygulanan kontrol grubu. K20:Kurkumin 20µM, EPGK10: Epigallokateşin-3-gallat 10 µM, G80: 6-gingerol 80 µM, G160: 6-gingerol 160 µM, G240: 6-gingerol 240 µM, S30: 6-shogaol 30 µM, S60: 6-shogaol 60 µM, S120: 6-shogaol 120 µM. # LPS(+) grubuna göre $p<0,001$. $ LPS (+) grubuna göre $p<0,05$.

Tüm bu sonuçlara dayanarak 6-gingerol'ün MMP-2'nin mRNA düzeylerini sadece düşük dozda inhibe edebildiği, MMP-9'u ise her dozda artırdığı; 6-shogaol'ün ise MMP-2 mRNA ekspresyonunu doza bağımlı olarak artırırken, MMP-9 mRNA ekspresyonunu doza bağımlı bir şekilde azalttığı söylenebilir.

Kurkumin ve epigallokateşin-3-gallat da benzer şekilde A549 hücrelerinde uygulanan dozlarda MMP-2 mRNA ekspresyonunu azaltırken, MMP-9 mRNA düzeylerini artırmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akciğer kanseri birçok ülkede görülen en malignant kanserlerden biridir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri metastaz potansiyeli yüksek olan zayıf prognozlu akciğer kanserlerinin neredeyse %80'nini oluşturur (59). Akciğer kanseri hücreleri oldukça invaziftir ve sonuç olarak yüksek mortalite oranlarına sahiptir. İnvazyon ve metastazın baskılanması akciğer kanserinin tedavisinde en etkili yöntem olarak düşünülebilir. Kanser metastazı, primer tümörden hücrelerin ayrılması, ESM lokal proteolizi, kılcal damar ve lenfatik damarların bazal membran aracılığıyla penetrasyonu, intravazasyon ve daha sonra yeni dokuya invaze olup ve büyümeyi kapsayan çok koordine ve ardışık bir süreçtir (60, 61). Tümör mikroçevresinin inflamatuvar hücreleri ve bu hücrelerin salgıladıkları mediyatörler akciğer kanser ilerlemesinde kritik rol oynayabilir. Adenokarsinom A549 hücre hattına nötrofillerin ilavesinin, tümör hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı ve ko-kültürleri yapıldığında ortamda COX2 kökenli PGE2 ve elastaz mediatörlerinin salınımının olduğu, bu mediyatörlerin inhibisyonunda tümör hücrelerinin çoğalmasının ortadan kalktığı gösterilmiştir (62). Artan inflamasyon akciğer kanserinin invazyonu ve metastazı ile ilişkili olduğu görülmektedir. Bu nedenle çalışmamızda A549 hücre hatlarında proliferasyon, invazyon ve metastaz olaylarının LPS ile inflamatuvar süreçlerin başlatılması ile tetiklenmesi sağlanmıştır.

Zn^{+2}'ye bağlı endopeptidazlardan bir ailenin oluşturduğu MMP'ler, tümör hücresi migrasyonu, yayılımı, doku istilası ve metastazına katkıda bulunan başlıca proteazlardır (63). Metastatik süreçte proteazların aktivasyonunun kritik olduğu düşünülmektedir (64, 65). MMP-2 ve MMP-9'un inhibe edilmesinin hücrelerin invazif ve metastatik özelliklerini baskılaması, yeni tedavi hedefleri arasında yer almasına neden olmuştur (66).

Zerdeçalın (*Curcuma longa*) içeriğinde bulunan kurkumin antioksidan anti-tümoral ve anti-metastatik aktiviteye sahip geniş spektrumlu farmakolojik özellikler gösteren

önemli bir doğal polifenoldur. Kurkumin'in pankreatik kanser migrasyonunu ve invasyonunu ROS/ERK/NF-kappaB sinyal yolağını inhibe etmek ve MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunu baskılamak suretiyle, pankreas kanseri için önemli bir antikanser ajan olarak değerlendirilmesine neden olmuştur (67). Kurkumin'in septik hayvanların beyin (68), akciğer (69), böbrek (70), karaciğer (71) ve kalplerinde (72) antiinflamatuvar ve antioksidan etki yarattığı önceki çalışmalarda yayınlanmıştı. Kurkuminin antiinflamatuvar etkisinin peroxisome PPAR-γ'nın upregülasyonu aracılığı ile olduğu düşünülmektedir. Kurkumin tarafından PPAR-γ'nın artmış ekspresyonu NF-κ-β'nin baskılanmasına yol açmakta ve TNF-α, IL-1 ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını azalmaktadır (73). NF-κβ yolağının invazyon ve metastazda kritik rol oynadığına yönelik araştırma sonuçlarıda yayınlanmıştır (74). Akut monositik lösemi SHI-1 hücreleriyle yapılan bir çalışmada kurkuminin hücre apoptozunu indüklemekle kalmayıp, JNK, P38, MAPK, ve ERK sinyali üzerinden tetiklenen hücre invasyonunun MMP-2 ve MMP-9 transkripsiyonunu ve salımını düşürerek baskıladığı bildirilmiştir (30). Meme kanseri şiddetli invasyon ve metastaz özelliği nedeniyle zayıf prognoza sahip kanser türüdür. Lizofosfatidik asit (LPA) RhoA/ROCK/MMP sinyali üzerinden kanser invasyonunun ve metastazının şiddetlenmesine neden olur. MCF-7 meme kanseri hücreleriyle yapılan çalışmada kurkuminin RhoA, ROCK1, ROCK2, MMP-2 ve MMP-9' un hem transkripsiyon hem de translasyon düzeyleri incelenmiş ve kurkuminin bu yolağı baskılayarak hücre invasyonunun düşürdüğü belirlenmiştir (75). Önemli bir mono-karbonil kurkumin analoğu olan MC37'nin intraselüler mikrotübül oluşumunu inhibe edip, siklin-bağımlı kinaz 1 (CDK1) ekspresyonunu değiştirerek nihayetinde G2/M fazında durdurarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Hatta mitokondriyal membran potansiyelini bozduğu, Bax/Bcl-2 oranını artırdığı, kaspaz 9/3 kaskadını aktifleştirerek kanser hücre apoptozuna neden olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle MC37'nin potansiyel anti-kolorektal kanser ajanı olarak değerlendirilebileceği bildirilmiştir (8). Çalışmamızda, küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücre hattında kurkuminin MMP-2 ve MMP-9 üzerine etkileri incelendiğinde, inflamasyon LPS ile tetiklendiğinde 20 µM kurkumin uygulanması sonucunda MMP-2 ekspresyonu azalırken, MMP-9 ekspresyonun arttığı gözlemlenmiştir. MMP-9 ekspresyonunu inhibe etmemiş olması küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisinde klinik kullanımını kısıtlandırabilir. Bulgularımız, Kurkuminin A549 hücreleri üzerinde MMP-2'yi baskıladığını gösteren Liao ve ark. (76) 'nın çalışmasını desteklemektedir. Fan ve ark.

(77) kurkuminin A549 hücrelerinde MMP-9'u baskıladığını göstermişlerdir Ancak 30 μM'dan daha yüksek dozalrda inhibitör etkinliği ve invazyonu inhibe edici etkisi olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda 20 μM kurkumin bu nedenle MMP-9'u baskılamamış olabilir.

Epigallokateşin-3-gallatın glioma hücrelerinde (U251) apoptozu indüklediği ve hücrelerin invasyonunu ve proliferasyonunu düşürdüğü bilinmektedir. Bu etkisini MMP-2 ve MMP-9 mRNA düzeylerini düşürerek gerçekleştirdiği belirlenmiştir (78). Epigallocatechin-3-gallate hepatosellular karsinoma hücre hattında apoptozu indüklerken normal karaciğer hücrelerinde etki göstermediği bildirilmektedir (56). Kondrosarkoma (SW-1353), fibrosarkoma (HT-1080), liposarkoma (SW-872) ve sinovyal sarkoma (SW-982) hücre dizilerinde, epigallokateşin-3-gallat'ın MMP-2 ve MMP-9'u inhibe ettiği bildirilmiştir (79-80). Epigallokateşin gallat'ın çeşitli kanser hücre hatlarında MMP-2 ve MMP-9'u inhibe ettiği gösterilmiş olsa da, A549 hücre hattında MMP-9 üzerine etkisi ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda epigallokateşin-3-gallat, 10 μM uygulandığında kurkumine benzer bir şekilde MMP2 mRNA ekspresyonu azaltırken, MMP-9 mRNA ekspresyonunu artırmıştır.

Halk arasında zencefil olarak bilinen *Zingiber officinale*'nin rizomları küresel açıdan önemli bir baharattır. Zencefilin temel bileşeni, Zencefil fitokimyasal maddeleri, özellikle 6-gingerol antioksidan, anti-inflamatuvar ve antitümör özelliklere sahiptir (81-84). 6-gingerol endojen antioksidan enzimleri artırarak serbest radikallerin üretimini azaltır. Osteoartrit kondrositleriyle yapılan *in vitro* çalışmada 6-gingerol'ün hücre canlılığını, mitokondral metabolizmayı koruduğu, kıkırdağın korunmasında, osteoartrit patogenezi oluşumunda etkili faktörlerin berteraf edilmesinde esansiyel olduğu da bildirilmiştir (83). 6–gingerol'ün, ERK fosforilasyonunun baskılanmasını modüle ederek, PANC-1 hücrelerinde ERK aracılığıyla NF-κB/Snail ile ilişkili olarak metastazı baskıladığı gösterilmiştir (84). Weng ve arkadaşları 6-shogaol and 6-gingerol un Hep3B hücrelerinin invasyon ve metasatazının MMPler ve ürokinaz-tip1 plasminojen aktivatör (uPA) transcripsiyonu ve translasyon mekanizmalarına odaklanarak yaptıkları *in vitro* çalışmada MMP-2 ve 9 ekspresyonunu MAPK and PI3k/Akt yolağı, NF-kappaB, STAT3 aktivitelerini baskılıyarak süprese ettiği ve anjiyogenezi blokladığını belirlemişlerdir (85). Ayrıca 6-gingerol'ün sıkı bağlantı ilişkili proteinler üzerinde etki ederek metastatik invazyonu baskıladığı bu etkisini de NF-κB/Snail ve ERK yolağını

etkileyerek gerçekleştirdiği bildirilmiştir (84). MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre dizisinde 6-gingerol'ün adezyon, invazyon, motilite, aktivite ve MMP-2 veya -9 miktarı üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, MDA-MB-231 hücreleri, farklı dozlarda 6-gingerolun (0, 2.5, 5 ve 10 μM) varlığında MMP-9 protein düzeylerinde bir değişiklik olmamasına rağmen, MMP-2 proteininin miktarı doz bağımlı bir şekilde azalttığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada 6-gingerol tedavisi ile hem MMP-2 hem de MMP-9 mRNA ekspresyonun azaldığı bildirilmiştir (86). Bizim çalışmamızda 6-gingerol'ün uygulanan en düşük (80 μM) konsnatrasyonunda, kontrole göre MMP-2 ekspresyonunda azalma, 160 ve 240 μM'lık doz uygulamalarında ise MMP-2 ekspresyonunda kontrol grubuna göre artış olduğu gözlenmiştir. 6-gingerolün düşük konsantrasyonlarının MMP-2 ekspresyonunu baskılayarak tümör invazyonunu azalttığı, ancak yüksek dozlarda inhibitör etkinliğini olmadığı söylenebilir. MMP-2 nin tersine 6-gingerol'ün uygulanan tüm konsantrasyonlarında MMP-9 ekspresyonu artış göstermiştir. 6-gingerolün MMP-9 mRNA ekspresyonunu baskılaması ve sonuç olarak antiinflamatuvar ve anti metastatik özellik gösterebilmesi için daha yüksek dozlara çıkılması ya da çok daha düşük doz kullanımı gerekli olabilir.

6-Shogaol yine *Zingiber officinale* içeriğinde bulunan antiinflamatuar ve antikanser etkinliği olan bir bioaktif maddedir. Çalışmada tümör nekroz faktör-ilişkili apoptoz içeren ligand (TRAIL) a bağlı apoptozis çeşitli kanser hücre hatlarında (renal Caki hücreleri, meme MDA-MB-231 hücreleri ve glioma U118MG hücreleri) *in vitro* olarak incelenmiştir. 6-shogaol'ün TRAIL'a bağlı apoptozu indüklediği belirlenmiştir (87). 6-Gingerol ve 6-shogaol ile yapılan deneysel çalışmalarda bu maddelerin gastrointestinal sistem kanserlerine karşı etkili oldukları belirlenmiş, hepatoma hücrelerinde invasif aktiviteyi MMP9 ve TIMP regülasyonuyla engellediği bildirilmiştir (88). Bu etkiyi NF-kappaB, STAT3, MAPK, PI3K, ERK1/2, Akt, TNF-alfa, COX-2, cyclin D1, MMP-9, survivin, cIAP-1, XIAP, Bcl-2, kaspazlar ve diğer hücre büyüme düzenleyicilerine ait yolaklarda yaptıkları düzenlemelerle sağladıkları belirlenmiştir (89). 6-shogarol'ün topikal uygulanmasının, fare derisinde 12-O-tetradekanoilflorbolde 13-asetatla (TPA) uyarılmış iNOS ve COX-2 mRNA ekspresyonunu, kurkumin ve 6-gingerol'den daha etkili şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada 6-Shogaol, TPA'nın indüklediği IκBα ve p65 fosforilasyonunu azalttıp IκBα'nın bozunmasına neden olduğu belirlenmiştir. 6-shogaol, 7,12-dimetilbenz [a] antrasen/TPA kaynaklı deri tümörü oluşumunu önemli ölçüde inhibe ettiği de gösterilen çalışmada, 6-shogaol'un fare

derisinde inflamatuvar iNOS ve COX-2 gen ekspresyonunu downregüle ederek etkili bir anti-tümör ajanı etkisi gösterdiği bildirilmiştir. Araştırmanın sonucunda 6-shogaol'un inflamasyona bağlı tümörogenezi önleyebilen yeni bir fonksiyonel madde olduğu ileri sürülmüştür (90). 6-shogaol ile pankreatik kansere yönelik gerçekleştirilen *in vitro* ve *in vivo* bir çalışmada, 6-shogaol'ün toll like receptor 4 (TLR4)/NF-kappaB yolağını ve anahtar hücre canlılık düzenleyicileri olan COX-2, cyclinD1, survivin, cIAP-1, XIAP, Bcl-2 sinyalini ve MMP-9 üretimini baskıladığı, hücrelerin gemsitabin duyarlılığını artırdığı, sonuç olarak da tümörogenezi baskıladığını bildirilmiştir (91). Bizim çalışmamızda da 6-shogaol tüm dozlarında kontrole göre MMP-2 ekspresyonunu düşürmüş, gruplar içerisinde en belirgin azalma 30 μM'da izlenmiştir.

Bulgularımız 6-shogaol'ün diğer gruplara göre en etkili antiinflamatuvar ve anti metastatik özeliklere sahip madde olabileceğini düşündürmektedir. Hem 6-shogaol hem de 6-gingerol uygulamasında en düşük dozlarda MMP-2 mRNA ekspresyonunun azalmış olması, her iki maddenin de düşük dozlarının MMP-2 üzerinden tümör invazyonunu azaltması açısından en etkili doz olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda 6-Shogaol'ün 30 ve 60 μM dozlarında kontrole göre MMP-9 mRNA ekspresyonu yükselmişken, 120 μM uygulamasıyla kontrole oranla MMP-9 mRNA ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olmuştur. Tüm gruplar içerisinde en belirgin MMP-9 mRNA ekspresyonu inhibisyonu 6-shogaol 120 μM'da izlenmiştir. Tüm bu sonuçlar MMP-9 ekspresyonun azalabilmesi için bu maddelerin yüksek dozlarının çok daha etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Kanser tedavisinde en önemli yaklaşımlardan birisi de apoptozun indüksiyonudur. MMPler birçok biyopaktif molekül yoluyla apoptoz üzerinde pozitif ve negatif yönde etki oluşturabilirler. MMP-7 membrana bağlı Fas ligandı (FasL veya CD95L) serbestleştirerek Fas reseptörüne bağlanmasını sağlayarak apoptopzu pozitif yönde tetikler (92). Diğer yandan MMP-7 ErbB4 tirozin kinaz reseptörleri aktivasyonuyla heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EGF) üzerinden apoptozu inhibe edebilmektedir. Apoptoz üzerine yapılan çalışmalarda MMP-3'ün aktive edici (93), MMP-11'in ise inhibe edici etkisine yönelik (94) sonuçlar yayınlanmıştır. MMP'lerin paralelinde inhibitörleriyle birlikte çalışılan, apoptotoik etkilerinin araştıran çalışmaların karşılaştırmalı sonuçları oldukça önemlidir. Zira Timplerin apoptoz uzerindekiş etkileri de MMPlere benzer şekilde iki yönlüdür. TIMP3'ün apoptozu indüklediği gibi aynı

zamanda baskıladığı yönünde bulgıuların yanısıra, TIMP1, TIMP2 ve TIMP4'ün apoptozu baskılayıcı antiapoptotik etkilerini belirleyen çalışmalar mevcuttur. 6-gingerol (95, 96) ve 6-shogaol'un (97-99) apoptotik etkileriyle ilgili yayınların yanı sıra TIMP ler üzerindeki etkilerini de araştırmak, apoptotik etkinlik bakımından önemli sonuçlar verecektir (100-102). Zira bu konuda oldukça sınırlı sayıda araştırma mevcuttur (88). Kurkumin ve Epigallocatechin in apoptoz ve TIMP bağlantısını araştırmış çalışma sayısıda oldukça sınırlı sayıda bulunmaktadır (103). Bu nedenle önemli bilgi eksikliği bulunan bu konularda yapılacak araştırmalar bu maddelerin kanser etkinliğine önemli katkılarda bulunacaktır.

Kurkumin ve epigallokateşin-3-gallat LPS ile indüklenmiş A549 hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 üzerinde 6-shogaol'e benzer bir davranış sergilemiştir.

Çalışma grubumuz tarafından daha önce gerçekleştirilen bir çalışmada (104), 6-gingerol, 6-shogaol ve kurkumin'in IL-1β ile indüklenmiş A549 hücre hattında mPGES1, PGE2, COX-2 ve GSK-3β/β-catenin yolağı üzerinden antiinflamatuvar etkinliği araştırılmış ve o çalışmada da kurkumin ve 6-shogaol benzer antiinflamatuvar etkilere sahipken, 6-gingerol etkili bulunmamıştır. Ayrıca yine aynı çalışmada bu çalışmadaki ile aynı dozlarda 6-gingerol ve 6-shogaol'ün IL-1β ile indüklenmiş A549 hücre hattındaki gerçek zamanlı etkileri xCELLigence sistemi ile değerlendirildiğinde, IL-1β uygulamasının hücrelerin proliferasyon hızını artırdığı ve daha agresif hücreler haline getirerek adezyon yeteneğini de artırdığı gösterilmiştir. Söz konusu çalışmada 6-shogaol ve kurkumin IL-1β'nın bu etkisini azaltmış ve hücrelerin gerçek zamanlı büyüme eğrilerinni kontrol grubuna yakın değerler haline getirdiği sonucuna ulaşılmıştır. Yine bu sonuçlar deneyimizn bulgularını destekler niteliktedir.

Günümüzde kanser tedavisi ile ilgili çalışmalar, daha az toksik ve daha etkili MMP inhibitörleri geliştirilmesine odaklanmaktadır. Bu alanda yapılan çalışmaların sayısı her geçen gün artarak devam etmektedir. *Zingiber officinale* bitkisinde bulunan 6-shogaol ve 6-gingerol, A549 hücre hattında MMP-2 yi özellikle düşük dozlarında baskılamıştır. Bu nedenle ayrı ayrı ve birlikte en etkin inhibitör dozun belirlenmesine yönelik yapılacak ileri çalışmalarla, bu maddelerin MMP ekspresyon inhibisyonu, antiinflamatuvar, antiinvazyon ve antitümoral etki mekanizmaları aydınlatılabilir.

6. KAYNAKLAR

1. M A. Temel kanser fizyopatolojisi. Klinik Gelişim 2009; 22(3): 46-49.
2. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. Cell 1991; 64(2): 327-336.
3. Hewitt R, Dano K. Stromal cell expression of components of matrix-degrading protease systems in human cancer. Enzyme & Protein 1996; 49(1-3): 163-173.
4. Sethi CS, Bailey TA, Luthert PJ, et al. Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders. The British Journal of Ophthalmology 2000; 84(6): 654-666.
5. Gong Y, Chippada-Venkata UD,Oh WK. Roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in prostate cancer progression. Cancers 2014; 6(3): 1298-1327.
6. Manson MM. Cancer prevention the potential for diet to modulate molecular signalling. Trends in Molecular Medicine 2003; 9(1): 11-18.
7. Surh YJ. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. Nature reviews. Cancer 2003; 3(10): 768-780.
8. Liang B, Liu Z, Cao Y, et al. MC37, a new mono-carbonyl curcumin analog, induces G2/M cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human colorectal cancer cells. European Journal of Pharmacology 2017; 796: 139-148.
9. Rogers AE, Zeisel SH, Groopman J. Diet and carcinogenesis. Carcinogenesis 1993; 14(11): 2205-2217.
10. Zheng J, Zhou Y, Li Y, et al. Spices for Prevention and Treatment of Cancers. Nutrients 2016; 8(8).

11. Abdel-Lateef E, Mahmoud F, Hammam O, et al. Bioactive chemical constituents of Curcuma longa L. rhizomes extract inhibit the growth of human hepatoma cell line (HepG2). Acta Pharmaceutica 2016; 66(3): 387-398.

12. Aravind SR, Krishnan LK. Curcumin-albumin conjugates as an effective anti-cancer agent with immunomodulatory properties. International Immunopharmacology 2016; 34: 78-85.

13. Kathiresan S, Govindhan A. [6]-Shogaol, a Novel Chemopreventor in 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene-induced Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis. Phytotherapy Research : PTR, 2016; 30(4): 646-653.

14. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. Circulation Research 1995; 77(5): 863-868.

15. Krizkova S, Zitka O, Masarik M, et al. Clinical importance of matrix metalloproteinases. Bratislavske Lekarske Listy 2011; 112(8): 435-440.

16. Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. Journal of the National Cancer Institute 2001; 93(3): 178-193.

17. Overall CM, Lopez-Otin C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. Nature reviews. Cancer 2002; 2(9): 657-672.

18. Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. Seminars in Cancer Biology 2010; 20(3): 161-168.

19. Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. Trends in genetics : TIG 1990; 6(4): 121-125.

20. Evans JD, Ghaneh P, Kawesha A, et al. Role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. Digestion 1997; 58(6): 520-528.

21. Wilcock DM, Morgan D, Gordon MN, et al. Activation of matrix metalloproteinases following anti-Abeta immunotherapy; implications for microhemorrhage occurrence. Journal of Neuroinflammation 2011; 8: 115.

22. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. The Journal of Pathology 1999; 189(3): 300-308.

23. Farina AR, Mackay AR. Gelatinase B/MMP-9 in Tumour Pathogenesis and Progression. Cancers 2014; 6(1): 240-296.

24. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. Cell 2010; 141(1): 52-67.

25. Aksun SA OD, Bayındır O. Mataloproteinases, their inhibitors, and related physiological and pathological conditions. T. Klin. Tıp Bil. 2001; 21: 332-342.

26. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. Nature 2005; 438(7069): 820-827.

27. Lynch CC, Hikosaka A, Acuff HB, et al. MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. Cancer Cell 2005; 7(5): 485-496.

28. Lin WW,Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. The Journal of Clinical Investigation 2007; 117(5): 1175-1183.

29. Niedzwiecki A, Roomi MW, Kalinovsky T, et al. Anticancer Efficacy of Polyphenols and Their Combinations. Nutrients 2016; 8(9).

30. Zhu GH, Dai HP, Shen Q, et al. Curcumin induces apoptosis and suppresses invasion through MAPK and MMP signaling in human monocytic leukemia SHI-1 cells. Pharmaceutical Biology 2016; 54(8): 1303-1311.

31. Surh YJ, Ferguson LR. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential--highlights of a symposium. Mutation Research 2003; 523-524: 1-8.

32. Doll R. The lessons of life: keynote address to the nutrition and cancer conference. Cancer Research 1992; 52(7): 2024-2029.

33. Gosslau A, Chen KY. Nutraceuticals, apoptosis, and disease prevention. Nutrition 2004; 20(1): 95-102.

34. Park EJ,Pezzuto JM. Botanicals in cancer chemoprevention. Cancer Metastasis Reviews 2002; 21(3-4): 231-255.

35. Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, et al.Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. Biochemical Pharmacology 2008; 76(11): 1590-1611.

36. Hong JH, Ahn KS, Bae E, et al. The effects of curcumin on the invasiveness of prostate cancer in vitro and in vivo. Prostate Cancer and Prostatic Diseases 2006; 9(2): 147-152.

37. Tyagi N, Dash D,Singh R. Curcumin inhibits paraquat induced lung inflammation and fibrosis by extracellular matrix modifications in mouse model. Inflammopharmacology 2016; 24(6): 335-345.

38. Killian PH, Kronski E, Michalik KM, et al. Curcumin inhibits prostate cancer metastasis in vivo by targeting the inflammatory cytokines CXCL1 and -2. Carcinogenesis 2012; 33(12): 2507-2519.

39. Aeschbach R, Loliger J, Scott BC, et al. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. Food and Chemical Toxicology : an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association 1994; 32(1): 31-36.

40. Ling H, Yang H, Tan SH, et al. 6-Shogaol, an active constituent of ginger, inhibits breast cancer cell invasion by reducing matrix metalloproteinase-9 expression via blockade of nuclear factor-kappaB activation. British Journal of Pharmacology 2010; 161(8): 1763-1777.

41. Safe S, Kasiappan R. Natural Products as Mechanism-based Anticancer Agents: Sp Transcription Factors as Targets. Phytotherapy Research : PTR, 2016; 30(11): 1723-1732.

42. Szczepanowicz K, Jantas D, Piotrowski M, et al. Encapsulation of curcumin in polyelectrolyte nanocapsules and their neuroprotective activity. Nanotechnology 2016; 27(35): 355101.

43. Balasubramanian S, Roselin P, Singh KK, et al. Postharvest Processing and Benefits of Black Pepper, Coriander, Cinnamon, Fenugreek, and Turmeric Spices. Critical Reviews in Food Science And Nutrition 2016; 56(10): 1585-1607.

44. Listyawati S, Sismindari, Mubarika S, et al. Anti-Proliferative Activity and Apoptosis Induction of an Ethanolic Extract of Boesenbergia pandurata (Roxb.)

Schlecht. against HeLa and Vero Cell Lines. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP 2016; 17(1): 183-187.

45. Wei QY, Ma JP, Cai YJ, et al. Cytotoxic and apoptotic activities of diarylheptanoids and gingerol-related compounds from the rhizome of Chinese ginger. Journal of Ethnopharmacology 2005; 102(2): 177-184.

46. Masuda Y, Kikuzaki H, Hisamoto M, et al. Antioxidant properties of gingerol related compounds from ginger. BioFactors 2004; 21(1-4): 293-296.

47. Sharma JN, Srivastava KC,Gan EK. Suppressive effects of eugenol and ginger oil on arthritic rats. Pharmacology 1994; 49(5): 314-318.

48. Bozcuk H. ÖM, Aykurt O,Topçuoglu F., et al. Urginea maritima extract induces more cytotoxicity than standart chemotherapeutics in A549 non-small cell lung cancer cell line Turkish Journal of Medical Science 2011; 41: 1001-1008.

49. Nigam N, Bhui K, Prasad S, George J, Shukla Y. [6]-Gingerol induces reactive oxygen species regulated mitochondrial cell death pathway in human epidermoid carcinoma A431 cells. Chemico-Biological Interactions 2009; 181(1): 77-84.

50. Hong BH, Wu CH, Yeh CT, et al. Invadopodia-associated proteins blockade as a novel mechanism for 6-shogaol and pterostilbene to reduce breast cancer cell motility and invasion. Molecular Nutrition & Food Research 2013; 57(5): 886-895.

51. Hung JY, Hsu YL, Li CT,et al. 6-Shogaol, an active constituent of dietary ginger, induces autophagy by inhibiting the AKT/mTOR pathway in human non-small cell lung cancer A549 cells. Journal of Agricultural And Food Chemistry 2009; 57(20): 9809-9816.

52. Ozturk OH, Bozcuk H, Burgucu D, et al. Cisplatin cytotoxicity is enhanced with zoledronic acid in A549 lung cancer cell line: preliminary results of an in vitro study. Cell Biology International 2007; 31(9): 1069-1071.

53. Zhong W, Qian K, Xiong J, et al. Curcumin alleviates lipopolysaccharide induced sepsis and liver failure by suppression of oxidative stress-related inflammation via PI3K/AKT and NF-kappaB related signaling. Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie 2016; 83: 302-313.

54. Mendes Sdos S, Candi A, Vansteenbrugge M, et al. Microarray analyses of the effects of NF-kappaB or PI3K pathway inhibitors on the LPS-induced gene expression profile in RAW264.7 cells: synergistic effects of rapamycin on LPS-induced MMP9-overexpression. Cellular Signalling 2009; 21(7): 1109-1122.

55. Roomi MW, Kalinovsky T, Rath M, et al. Cytokines, inducers and inhibitors modulate MMP-2 and MMP9 secretion by human Fanconi anemia immortalized fibroblasts. Oncology Reports 2017; 37(3): 1842-1848.

56. Zhang Y, Duan W, Owusu L, et al. Epigallocatechin-3-gallate induces the apoptosis of hepatocellular carcinoma LM6 cells but not non-cancerous liver cells. International Journal Of Molecular Medicine 2015; 35(1): 117-124.

57. Palermo CM, Westlake CA, Gasiewicz TA. Epigallocatechin gallate inhibits aryl hydrocarbon receptor gene transcription through an indirect mechanism involving binding to a 90 kDa heat shock protein. Biochemistry 2005; 44(13): 5041-5052.

58. M. Y. Hücre İzolasyonu-IV, Tripsinizasyon, , Hücre Çalışmalarında SOP Örnekleri. 2003.

59. Shivapurkar N, Reddy J, Chaudhary PM, et al. Apoptosis and lung cancer: a review. Journal of Cellular Biochemistry 2003; 88(5): 885-898.

60. Gupta GP,Massague J. Cancer metastasis: building a framework. Cell 2006; 127(4): 679-695.

61. Meyer T,Hart IR. Mechanisms of tumour metastasis. European Journal of Cancer 1998; 34(2): 214-221.

62. Hattar K, Franz K, Ludwig M, et al. Interactions between neutrophils and non-small cell lung cancer cells: enhancement of tumor proliferation and inflammatory mediator synthesis. Cancer immunology, immunotherapy : CII 2014; 63(12): 1297-1306.

63. Itoh Y,Nagase H. Matrix metalloproteinases in cancer. Essays in Biochemistry 2002; 38: 21-36.

64. Bernhard EJ, Gruber SB,Muschel RJ. Direct evidence linking expression of matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/collagenase) to the metastatic

phenotype in transformed rat embryo cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1994; 91(10): 4293-4297.

65. Emmert-Buck MR, Roth MJ, Zhuang Z, et al. Increased gelatinase A (MMP-2) and cathepsin B activity in invasive tumor regions of human colon cancer samples. The American Journal of Pathology 1994; 145(6): 1285-1290.

66. Mook OR, Frederiks WM,Van Noorden CJ. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. Biochimica Et Biophysica Acta 2004; 1705(2): 69-89.

67. Cao L, Liu J, Zhang L, et al. Curcumin inhibits H2O2-induced invasion and migration of human pancreatic cancer via suppression of the ERK/NF-kappaB pathway. Oncology Reports 2016; 36(4): 2245-2251.

68. Vachharajani V, Wang SW, Mishra N, et al. Curcumin modulates leukocyte and platelet adhesion in murine sepsis. Microcirculation 2010; 17(6): 407-416.

69. Xiao X, Yang M, Sun D, et al. Curcumin protects against sepsis-induced acute lung injury in rats. The Journal of Surgical Research 2012; 176(1): 31-39.

70. Yilmaz Savcun G, Ozkan E, Dulundu E, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcumin against hepatorenal oxidative injury in an experimental sepsis model in rats. Ulusal travma ve acil cerrahi dergisi = Turkish journal of trauma & emergency surgery : TJTES 2013; 19(6): 507-515.

71. Seehofer D, Schirmeier A, Bengmark S, et al. Curcumin attenuates oxidative stress and inflammatory response in the early phase after partial hepatectomy with simultaneous intraabdominal infection in rats. The Journal of Surgical Research 2010; 159(1): 497-502.

72. Yang C, Su X, Liu A, et al. Advances in clinical study of curcumin. Current Pharmaceutical Design 2013; 19(11): 1966-1973.

73. Siddiqui AM, Cui X, Wu R, et al. The anti-inflammatory effect of curcumin in an experimental model of sepsis is mediated by up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. Critical Care Medicine 2006; 34(7): 1874-1882.

74. Shishodia S, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB activation mediates cellular transformation, proliferation, invasion angiogenesis and metastasis of cancer. Cancer Treatment and Research 2004; 119: 139-173.

75. Sun K, Duan X, Cai H, et al. Curcumin inhibits LPA-induced invasion by attenuating RhoA/ROCK/MMPs pathway in MCF7 breast cancer cells. Clinical and Experimental Medicine 2016; 16(1): 37-47.

76. Liao H, Wang Z, Deng Z, Ren H, Li X Curcumin inhibits lung cancer invasion and metastasis by attenuating GLUT1/MT1-MMP/MMP2 pathway. Int J Clin Exp Med. 2015 Jun 15; 8(6): 8948-57.

77. Fan Z, Duan X, Cai H, Wang L, Li M, Qu J, Li W, Wang Y, Wang J. Curcumin inhibits the invasion of lung cancer cells by modulating the PKCα/Nox-2/ROS/ATF-2/MMP-9 signaling pathway. Oncol Rep. 2015 Aug;34(2):691-8.

78. Li H, Li Z, Xu YM, Wu Y, Yu KK, Zhang C, Ji YH, Ding G,Chen FX. Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis, inhibits proliferation and decreases invasion of glioma cell. Neuroscience bulletin, 2014; 30(1): 67-73.

79 Roomi MW, Kalinovsky T, Monterrey J, Rath M,Niedzwiecki A. In vitro modulation of MMP-2 and MMP-9 in adult human sarcoma cell lines by cytokines, inducers and inhibitors. International journal of oncology, 2013; 43(6): 1787-98.

80. Roomi MW, Monterrey JC, Kalinovsky T, Rath M, Niedzwiecki A. Comparative effects of EGCG, green tea and a nutrient mixture on the patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in cancer cell lines. Oncol Rep. 2010 Sep;24(3):747-57.

81. Jung KW, Won YJ, Kong HJ, et al. Cancer statistics in Korea: incidence, mortality, survival and prevalence in 2010. Cancer research and treatment : official journal of Korean Cancer Association 2013; 45(1): 1-14.

82. Devesa SS, Blot WJ, Stone BJ, et al. Jr. Recent cancer trends in the United States. Journal Of The National Cancer Institute 1995; 87(3): 175-182.

83. Abusarah J, Benabdoune H, Shi Q, et al. Elucidating the Role of Protandim and 6-Gingerol in Protection Against Osteoarthritis. Journal Of Cellular Biochemistry 2017; 118(5): 1003-1013.

84. Kim SO,Kim MR. [6]-Gingerol Prevents Disassembly of Cell Junctions and Activities of MMPs in Invasive Human Pancreas Cancer Cells through ERK/NF-kappa B/Snail Signal Transduction Pathway. Evidence-based complementary and alternative medicine : Ecam 2013; 2013: 761852.

85. Weng CJ, Chou CP, Ho CT, et al. Molecular mechanism inhibiting human hepatocarcinoma cell invasion by 6-shogaol and 6-gingerol. Molecular Nutrition & Food Research 2012; 56(8): 1304-1314.

86. Lee HS, Seo EY, Kang NE, et al. [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells. The Journal Of Nutritional Biochemistry 2008; 19(5): 313-319.

87. Aghaie S, Nikzad H, Mahabadi JA, et al. Protective effect of combined pumpkin seed and ginger extracts on sperm characteristics, biochemical parameters and epididymal histology in adult male rats treated with cyclophosphamide. Anatomical Science International 2016; 91(4): 382-390.

88. Weng CJ, Wu CF, Huang HW, et al. Anti-invasion effects of 6-shogaol and 6-gingerol, two active components in ginger, on human hepatocarcinoma cells. Molecular Nutrition & Food Research 2010; 54(11): 1618-1627.

89. Prasad S,Tyagi AK. Ginger and its constituents: role in prevention and treatment of gastrointestinal cancer. Gastroenterology Research And Practice 2015; 2015: 142979.

90. Wu H, Hsieh MC, Lo CY, et al. 6-Shogaol is more effective than 6-gingerol and curcumin in inhibiting 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced tumor promotion in mice. Molecular Nutrition & Food Research 2010; 54(9): 1296-1306.

91. Zhou L, Qi L, Jiang L, et al. Antitumor activity of gemcitabine can be potentiated in pancreatic cancer through modulation of TLR4/NF-kappaB signaling by 6-shogaol. The AAPS Journal 2014; 16(2): 246-257.

92. Nakahara H, Howard L, Thompson EW, et al. Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1997; 94(15): 7959-7964.

93. Kajita M, Itoh Y, Chiba T, et al. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. The Journal of Cell Biology 2001; 153(5): 893-904.

94. Yu WH, Woessner JF, McNeish JD, et al. CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. Genes & Development 2002; 16(3): 307-323.

95. Nigam N, George J, Srivastava S, et al. Induction of apoptosis by [6]-gingerol associated with the modulation of p53 and involvement of mitochondrial signaling pathway in B[a]P-induced mouse skin tumorigenesis. Cancer Chemotherapy and Pharmacology 2010; 65(4): 687-696.

96. Lee E,Surh YJ. Induction of apoptosis in HL-60 cells by pungent vanilloids, [6]-gingerol and [6]-paradol. Cancer Letters 1998; 134(2): 163-168.

97. Annamalai G, Kathiresan S,Kannappan N. [6]-Shogaol, a dietary phenolic compound, induces oxidative stress mediated mitochondrial dependant apoptosis through activation of proapoptotic factors in Hep-2 cells. Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie 2016; 82: 226-236.

98. Kim SM, Kim C, Bae H, et al. 6-Shogaol exerts anti-proliferative and pro-apoptotic effects through the modulation of STAT3 and MAPKs signaling pathways. Molecular Carcinogenesis 2015; 54(10): 1132-1146.

99. Kim SC, Lee JR,Park SJ. Role of 6-shogaol in tert -butyl hydroperoxide-induced apoptosis of HepG2 cells. Pharmacology 2014; 93(3-4): 137-144.

100. Alexander CM, Howard EW, Bissell MJ, et al. Rescue of mammary epithelial cell apoptosis and entactin degradation by a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 transgene. The Journal of Cell Biology 1996; 135(6 Pt 1): 1669-1677.

101. Wu E, Mari BP, Wang F, et al. Stromelysin-3 suppresses tumor cell apoptosis in a murine model. Journal of Cellular Biochemistry 2001; 82(4): 549-555.

102. Fata JE, Leco KJ, Voura EB, et al. Accelerated apoptosis in the Timp-3-deficient mammary gland. The Journal of Clinical Investigation 2001; 108(6): 831-841.

103. Kakuta Y, Okumi M, Isaka Y, et al. Epigallocatechin-3-gallate protects kidneys from ischemia reperfusion injury by HO-1 upregulation and inhibition of macrophage infiltration. Transplant International : Official Journal of the European Society for Organ Transplantation 2011; 24(5): 514-522.

104. Demirpolat Eren, Yerer Mukerrem Betul. Revealing the effect of 6-gingerol, 6-shogaol and curcumin on mPGES-1, GSK-3β and β-catenin pathway in A549 cell line. Chemico-Biological Interactions 258; (2016): 257-265

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Onur HODA

Uyruğu: Türkiye T.C.

Doğum Tarihi ve Yeri:Antalya 19.04.1984

Medeni Durumu: Evli

Tel: 0533 438 2330

e-mail: onurhoda@hotmail.com

Yazışma Adresi: Gürsu Mahallesi Viola Sitesi A blok 8A/16 Konyaaltı Antalya

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2006
Lise	Antalya Anadolu Lisesi	2002

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2006-2010	Aspendos Eczanesi / Antalya	Serbest Eczacı
2010-2011	Bozok Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi / Yozgat	Hastane Eczanesi
2011-Halen	Onur Eczanesi Antalya	Serbest Eczacı

YABANCI DİL

İngilizce: İyi düzey

Almanca: Orta düzey