

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NOVALGİN (METAMİZOL SODYUM)’İN İNSAN GLİOBLASTOMA HÜCRE  
HATTI U-87 MG ÜZERİNE POTANSİYEL ANJİOGENİK ETKİSİNİN *İN*  
*VİTRO* ARAŞTIRILMASI**

**Orhan KOÇAK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**2017**

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NOVALGİN (METAMİZOL SODYUM)'İN İNSAN GLİOBLASTOMA HÜCRE  
HATTI U-87 MG ÜZERİNE POTANSİYEL ANJİOGENİK ETKİSİNİN İN  
VİTRO ARAŞTIRILMASI**

**Orhan KOÇAK**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**(Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FYL-  
2016-857 nolu proje ile desteklenmiştir.)**

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NOVALGİN (METAMİZOL SODYUM)'İN İNSAN GLİOBLASTOMA HÜCRE**  
**HATTI U-87 MG ÜZERİNE POTANSİYEL ANJİOGENİK ETKİSİNİN İN**  
**VİTRO ARAŞTIRILMASI**

**Orhan KOÇAK**

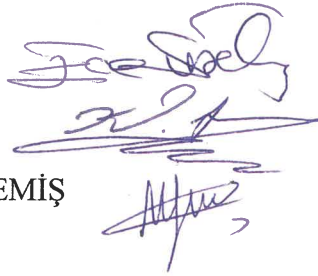
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 15/06/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Ece ŞİMŞEK

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ



## ÖZET

# NOVALGİN (METAMİZOL SODYUM)'İN İNSAN GLİOBLASTOMA HÜCRE HATTI U-87 MG ÜZERİNE POTANSİYEL ANJİYOGENİK ETKİSİNİN *İN VİTRO* ARAŞTIRILMASI

Orhan KOÇAK

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ece ŞİMŞEK

Haziran 2017, 49 sayfa

Kanser, temel ve klinik bilimlerde kaydedilen ilerlemelere rağmen, en büyük sağlık sorunlarından biri olmaya devam etmektedir. Glioblastoma, yetişkinlerde primer beyin tümörünün en yaygın olanıdır. Glioblastomanın, tedavisinde anjiyogeneze hedefli ajanların etkili olabileceği düşünülmektedir.

Kanser tedavisi sürecince ağrı kesiciler hastaların ağrılarının giderilmesi amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Metamizol, piralozon türevli opioid olmayan bir ağrı kesicidir. Metamizol hafif ve orta dereceli ağrılarda tek başına kullanıldığı gibi, opioid grubu ağrı kesicilerle de birlikte kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, Novalgin (metamizol sodyum)'in çeşitli konsantrasyonlarda, U-87 MG glioblastoma hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, sitotoksik etkinin görülmediği dozlarda, Novalgin'in hücrelerden besiyerine salınan önemli proanjiyogenik faktörlerden VEGF, MMP-9 ve Substance P maddelerinin miktarları üzerine etkileri de belirlenmiştir.

Sonuç olarak, Metamizol U-87 MG hücre hattında, doza bağlı olarak hem sitotoksik hem de proliferatif etki göstermiştir. Metamizol 24 ve 48 saat için 25 µg/mL ve 12,5 µg/mL'lik konsantrasyonda U-87 hücrelerinden salınan Substance P miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmazken; 24 saat için 1 µg/mL'lik dozda 1.03 kat artışa neden olmaktadır. Metamizol 25 µg/mL'lik dozda, besiyerine salınan VEGF miktarında 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 1.68 kat artışa, 1 µg/mL'lik dozda ise 4.13 kat artışa neden olmaktadır. U-87 MG hücrelerinden salınan MMP-9 enzim miktarı, 25 µg/mL'lik ve 12,5 µg/mL'lik metamizol uygulamasını takiben 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda kontrol grubuna oranla 1.35 ve 1.34 kat artmıştır.

**ANAHTAR KELİMELEER:** Novalgin, Metamizol, U-87 MG, Substance P, VEGF, MMP-9.

**JÜRİ:** Yrd. Doç. Dr. Ece ŞİMŞEK (Danışman)

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ

## **ABSTRACT**

### **THE *IN VITRO* INVESTIGATION OF THE POTENTIAL ANGIOGENIC EFFECTS OF NOVALGIN (METAMIZOLE SODIUM) ON HUMAN GLIOBLASTOMA CELL LINE U-87 MG**

**ORHAN KOÇAK**

**MSc Thesis in Biology**

**Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ece ŞİMŞEK**

**June 2017, 49 pages**

Despite the progression in basic and clinical sciences, cancer continues to be one of the major health problems. Glioblastoma is the most common type of primary brain tumors in adults. It has been suggested that the angiogenesis-targeted agents may be effective in the treatment of glioblastoma.

During cancer therapy painkillers are frequently used to relieve the pain of patients. Metamizole, a Pyrazolone-derived, is a non-opioid analgesic. Metamizole is used both alone and in combination with other opioid group painkillers in mild and moderate pain.

In this study, it has been shown that Novalgin (metamizol sodium), inhibits the growth of U-87 MG glioblastoma cells at various concentrations. Nevertheless, at determined non-proliferative doses, the effects of Novalgine on the levels of three proangiogenic factors (VEGF, MMP-9 and Substance P) released from the cells were also determined.

As a result, Metamizole showed cytotoxic and proliferative effects on U-87 MG cells. Metamizole did not cause a statistically significant increase in Substance P activity in the U-87 cell line at concentrations of 25 µg / mL and 12,5 µg / mL for 24 and 48 hours. 1 µg / mL Metamizole caused a 1.03-fold increase in Substance P levels for 24 hour incubation period. 25 µg/mL Metamizole causes a 1.68-fold increase and 1 µg / mL caused a 4.13-fold increase in the amount of VEGF release at the end of the 24-hour incubation period respectively. The amount of MMP-9 enzyme released from U-87 MG cells increased by 1.35 and 1.34 times compared to the control group at the end of the 48 hour incubation period with 25 µg / mL and 12,5 µg / mL metamizole treatment.

**KEYWORDS:** Novalgin, Metamizole, U-87 MG, Substance P, VEGF, MMP-9.

**COMMITTEE:** Asst. Prof. Dr. Ece ŞİMŞEK (Supervisor)

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Assoc. Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ

## ÖNSÖZ

Ağrı hoş olmayan duygusal ve duyusal bir deneyim olsa da en basit ifadeyle bizi bedensel hasarlardan korur. Ancak çoğu kanser türü bütün bedene yayılncaya kadar sessiz sedasız ilerlemeye devam eder. Hastalığın son evresinde olan hastanın tıbbi, psikolojik ve sosyal bakımdan içinde bulunduğu durum nedeniyle kanser ağrısının normalden daha ızdırap verici bir duruma dönüştüğü görülebilir.

Kanser ağrısı tümör kütlelerinin yarattığı fiziksel baskı, kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavilerin yan etkisi olarak veya primer tümörün uzaklaştırılması amaçlanan ameliyatlardan sonrasında ortaya çıkmaktadır. Kanser kemikte ve ağrıya duyarlı diğer organlarda yapısal aksaklıklara yol açarak, iyileşme sürecinin hızlanması için gelişmiş ağrı reflekslerini tetikler. Bu ağrının giderilmesi için opioid ve opioid olmayan ilaçlar sıklıkla kullanılmaktadır. Anesteziklerin keşfi ile cerrahi tıbbın tarihi değişmiştir. Çünkü ağrı hissini baskılamadan ya da hasta uyutulmadan primer tümör ameliyatları gibi zor operasyonların yapılması mümkün değildi. Opioidler bu konuda o kadar etkiliydi ki bugün de halen kullanım sıklığı artan ilaçlar arasındadır. Opioid olmayan ağrı kesicilerin en önemli avantajı ağrının hangi evresi olursa olsun hem tek başlarına hem de opioid ağrı kesicilerle birlikte yıllardır kullanılıyor olmasıdır. Özellikle kanser ağrısının dindirilmesi amacı ile kullanılan bu ilaçlarla ilgili son yıllarda yapılan çalışmalarda kanser nüksüne neden olabileceğine dair birçok rapor sunulmuştur. Opioid grubundan morfin, fentanil gibi güçlü narkotik ağrı kesiciler kanser nüksü ile ilgili çalışmalarda kullanılmıştır. Opioid olmayan ağrı kesici ve kanser ile ilgili çalışmalarda çoğunlukla siklooksijenazlar ve prostaglandin ilişkisi araştırılmıştır. Metamizol'ün siklooksijenaz enzimi ilişkisi dışında opioidderjik sistem ve kannabinoid sistemle ilgili olan mekanizmaları ağrının her evresinde sıklıkla kullanılan metamizol'ün etkinliğinin anlaşılmasında büyük rol oynayacak gibi görünmektedir. Literatürde Metamizol'ün U-87 MG hücrelerine uygulandığı herhangi bir *in vitro* çalışmaya rastlanmamıştır. Tez kapsamında U-87 MG hücrelerine metamizol uygulayarak hücre canlılığının inhibe edilmediği konsantrasyonlarda önemli anjiyogenik faktörlerden Substance P, VEGF ve MMP-9 aktivitesindeki değişiklikler saptandı.

Metamizol'ün belirli konsantrasyonlarda gösterdiği proliferasyona rağmen anjiyogenik faktörler üzerinde belirgin aktivite değişikliği göstermediği görüldü. Ancak buna rağmen metamizol'ün etki mekanizmasının iyi bilinmediği göz önüne alınırsa, proliferasyon gösterdiği dozlarda farklı yollardan anjiyogenik süreci tetikleyebileceği söylenebilir. Ayrıca yapılan diğer bazı çalışmalarda morfin ile sergilediği sinerjistik etki Metamizol'ün opioidderjik sistem ile ilgili mekanizmasını bir kez daha akla getirmektedir.

Metamizol'ün *in vitro* ve *in vivo* farklı kanser tiplerinde göstereceği etkilerin araştırılması, hem ağrı kesici hem de kanser nüksü ile ilgili mekanizmaların aydınlatılmasında önemli çalışmalar olacaktır. Ayrıca metamizol'ün anjiyogenik faktörlerin reseptörleri ve opioid reseptörlerle gösterdiği moleküler etkileşimlerin belirlenmesi, ileride yeni sentetik ağrı kesicilerin geliştirilmesinde özellikle morfin toleransı gibi ağrıya karşı çaresiz kalınan durumlarda hastanın yaşam kalitesini daha da iyileştirmede önemli kazanımlar olacaktır.

Böylesine güzel ve zevkli bir konuda bana yüksek lisans yapabilme fırsatı sunan, maddi manevi her konuda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bana farklı bakış açısından bakabilmeyi öğreten, karanlıkta bir ışık gibi yolumu aydınlatan ve aydınlatmaya devam eden bilgisi, deneyimi ve kazanımlarıyla kendime rol model aldığım akademik danışmanım, sevgili hocam ve ablam, Yrd. Doç. Dr. Ece ŞİMŞEK'e, yüksek lisans eğitimim süresince ve akademik hayatımda önemini hatırlayacağım bilgi ve tecrübelerini aktarmaktan mutluluk duyan saygı değer hocalarım Sayın Yrd. Doç. Dr. Esra AYDEMİR'e ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Nilüfer İMİR'e, maddi manevi desteğini hep yanımda bulduğum beni kardeşinden ayırmayan hocam Cansu KİLİT'e, birlikte başladığımız bu yolda gerek akademik gerekse sosyal hayatta bana çok şey katan, en zor zamanlarımda yanımda olmaktan bir an bile geri durmayan meslektaşım, kardeşim Aykut KURUOĞLU'na, yüksek lisansa başladığım günden beri neşesi, enerjisi ve desteği ile yardımını esirgemeyen meslektaşım, kardeşim Bircan ÖNEL'e, lisans ve yüksek lisans hayatım boyunca her konuda beyin fırtınası yapabildiğim bana çok şey katan meslektaşım can kardeşim Mustafa ŞEN'e teşekkür ediyorum.

Ve hayatımın her alanında bana sonsuz güvenen, inanan hayatta olma sebebim biricik ailem annem Gülmay KOÇAK babam, Ehliman KOÇAK, abim Cihan KOÇAK'a sonsuz saygı ve sevgilerimi sunuyorum.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ÖZET .....                                                                                           | i   |
| ABSTRACT .....                                                                                       | ii  |
| ÖNSÖZ .....                                                                                          | iii |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                                    | v   |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....                                                                 | vii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                                | ix  |
| 1. GİRİŞ .....                                                                                       | 1   |
| 2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI .....                                                      | 4   |
| 2.1. Kanser ve Ağrı .....                                                                            | 4   |
| 2.1.1. Ağrı .....                                                                                    | 4   |
| 2.1.1.1. Kanser ağrısı .....                                                                         | 5   |
| 2.2. Kanser Ağrısının Yönetimi .....                                                                 | 7   |
| 2.3. Kanser Ağrısında Kullanılan İlaçlar .....                                                       | 9   |
| 2.3.1. Opioidler .....                                                                               | 9   |
| 2.3.2. Opioid olmayan ağrı kesiciler .....                                                           | 10  |
| 2.3.2.1. Metamizol .....                                                                             | 11  |
| 2.4. Steroid Olmayan Anti İnflamatuvar İlaçlar ve Kanser .....                                       | 12  |
| 3. MATERYAL VE METOT .....                                                                           | 16  |
| 3.1. Hücreler ve Kültür Koşulları .....                                                              | 16  |
| 3.2. Besiyerlerinin Hazırlanması .....                                                               | 16  |
| 3.2.1. %10'luk FBS içeren DMEM besiyerinin hazırlanması .....                                        | 16  |
| 3.2.2. %1'lik FBS içeren DMEM besiyerinin hazırlanması .....                                         | 16  |
| 3.2.3. Dondurma besiyerinin hazırlanması .....                                                       | 16  |
| 3.3. Novalgin'nin Hazırlanması .....                                                                 | 16  |
| 3.4. Hücrelerin Deneyler İçin Bölünmesi .....                                                        | 17  |
| 3.4.1. Hücrelerin tripsinasyonu .....                                                                | 17  |
| 3.4.2. Hücrelerin proliferasyon deneyleri için 96-Kuyucuklu<br>Plate'lere bölünmesi .....            | 17  |
| 3.4.3. Hücrelerin proliferasyon deneyleri için 6-Kuyucuklu<br>Plate'lere bölünmesi .....             | 17  |
| 3.5. Novalgin'in Kanser Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerine Etkileri .....                           | 17  |
| 3.5.1. İlaç uygulamaları .....                                                                       | 17  |
| 3.5.2. Deneylerin sonlandırılması .....                                                              | 18  |
| 3.6. Hücrelerden Besiyerine Salınan Pro-Anjiyogenik Faktörlerin<br>Miktarın Belirlenmesi .....       | 18  |
| 3.6.1. İlaç uygulamaları .....                                                                       | 18  |
| 3.6.2. U-87 MG hücrelerinden besiyerine salınan Substance P miktarının<br>belirlenmesi .....         | 18  |
| 3.6.3. U-87 MG hücrelerinden besiyerine salınan VEGF miktarının<br>belirlenmesi .....                | 19  |
| 3.6.4. U-87 MG hücrelerinden besiyerine salınan MMP-9<br>miktarının belirlenmesi .....               | 19  |
| 3.7. İstatiksel Analizler .....                                                                      | 20  |
| 4. BULGULAR .....                                                                                    | 21  |
| 4.1. Metamizol'ün U-87 MG Hücre Hattı Üzerine Gösterdiği Sitotoksik ve<br>Proliferatif Etkiler ..... | 21  |

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2. Metamizol'ün U-87 MG Hücrelerinden Salınan Substance P Miktarı Üzerine Etkisi ..... | 27 |
| 4.3. Metamizol'ün U-87 MG Hücrelerinden Salınan VEGF Miktarı Üzerindeki Etkisi .....     | 29 |
| 4.4. Metamizol'ün U-87 MG Hücrelerinden Salınan MMP-9 Enzim Miktarı Üzerine Etkisi ..... | 30 |
| 5. TARTIŞMA .....                                                                        | 32 |
| 6. SONUÇ .....                                                                           | 37 |
| 7. KAYNAKLAR .....                                                                       | 38 |
| ÖZGEÇMİŞ                                                                                 |    |



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

|                |                  |
|----------------|------------------|
| %              | Yüzde            |
| °C             | Santigrat Derece |
| Mg             | Miligram         |
| mL             | Mililitre        |
| nm             | Nanometre        |
| µg             | Mikrogram        |
| µM             | Mikromolar       |
| K <sup>+</sup> | Potasyum İyonu   |
| H <sup>+</sup> | Hidrojen İyonu   |
| δ,Δ            | Delta            |
| β              | Beta             |

### Kısaltmalar

|                 |                                         |
|-----------------|-----------------------------------------|
| 26-L5           | Kolon Kanseri Hücre Hattı               |
| AA              | 4-aminoantipirin                        |
| ACTH            | Adrenokortikotropik Hormon              |
| ATCC            | Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu         |
| ATP             | Adenozintrifosfat                       |
| bFGF            | Temel Fibroblast Büyüme Faktörü         |
| cAMP            | Siklik Adenozinmonofosfat               |
| c-myc           | Selüler protoonkogen                    |
| CB1             | Kannabinoit Reseptör 1                  |
| cGMP            | Siklik Guanozinmonofosfat               |
| CO <sub>2</sub> | Karbondioksit                           |
| COX -1,2,3      | Siklooksijenaz-1,2,3                    |
| CRH             | Kortikotropin Salan Hormon              |
| CXCL-1          | (C-X-C motif) Ligand 1                  |
| CXCR4           | Kemokin Reseptör 4                      |
| Cyclin D1       | Siklin Bağımlı Kinaz D1                 |
| DMEM            | Dulbecco' nun Modifiye Edilmiş Besiyeri |
| DMSO            | Dimetil Sülfoksit                       |
| ECM             | Ekstraselüler Matriks                   |
| EDTA            | Etilendiamin Tetraasetik Asit           |
| ERK1/2          | Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinaz  |
| FBS             | Fetal Bovin Serum                       |
| GABA            | Gamma Aminobütirikasit                  |
| GH              | Büyüme Hormonu                          |
| GPCR            | G-Protein Bağlı Reseptör                |
| HeLa            | Servikal Adenokarsinom Hücre Hattı      |
| HIF-1           | Hipoksi İndükleyici Faktör 1            |
| IgG             | İmmünoglobulin G                        |
| MAA             | 4-metilaminoantipirin                   |

|         |                                       |
|---------|---------------------------------------|
| MAP     | Mitojen Aktif Protein                 |
| MCF-7   | Meme Kanseri Hücre Hattı              |
| MMP     | Matriks Metalloproteaz                |
| MOR     | Mu Opioid Reseptör                    |
| NF-kB   | Nükleer Faktör kappa B                |
| NGF     | Sinir Büyüme Faktörü                  |
| NK      | Doğal Öldürücü                        |
| NK-1    | Nörokinin Reseptör-1                  |
| NMDA    | N-metil-D-aspartik asit               |
| NO      | Nitrik Oksit                          |
| NSAID   | Steroid Olmayan Antiinflamatuvar ilaç |
| P38MAPK | p38 Mitojen Aktif Protein Kinaz       |
| P2X3    | Purinerjik Reseptör                   |
| PAG     | Periaguktural Gri Cevher              |
| PBS     | Fosfat Tampon Tuzu                    |
| PG      | Prostaglandin                         |
| SP      | P Maddesi                             |
| SRC     | Protoonkogenik Tirozin Kinaz          |
| T98G    | Glioblastoma Hücre Hattı              |
| TCF-4   | Transkripsiyon Faktör 4               |
| Tie-2   | Tirozin-Protein Kinaz Reseptör        |
| TMB     | Tetrametilbenzidin                    |
| TrkA    | Tropomiyozin Reseptör Kinaz A         |
| TSH     | Tiroid Uyarıcı Hormon                 |
| U-87 MG | Glioblastoma Hücre Hattı              |
| VEGF    | Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü    |
| WST     | Suda Çözünebilir Tetrazolyum Tuzu     |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. Tümörler tarafından üretilen zararlı uyarıların duyu nöronları tarafından algılanması. ....                        | 6  |
| Şekil 2.2. Tümör ve nosiseptör bağlantısı. ....                                                                               | 7  |
| Şekil 2.3. Dünya Sağlık Örgütü'nün kanser ağrısı tedavisi basamakları. ....                                                   | 8  |
| Şekil 2.4. Metamizol sodyumun açık formülü. ....                                                                              | 11 |
| Şekil 4.1. Metamizol'ün 1. Set 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi. ....  | 21 |
| Şekil 4.2. Metamizol'ün 2. Set 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi. ....  | 22 |
| Şekil 4.3. Metamizol'ün 3. Set 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi. ....  | 22 |
| Şekil 4.4. Metamizol'ün 4. Set 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi. ....  | 23 |
| Şekil 4.5. Metamizol'ün 1. Set 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi. ....  | 23 |
| Şekil 4.6. Metamizol'ün 2. Set 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi. ....  | 24 |
| Şekil 4.7. Metamizol'ün 3. Set 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi. ....  | 24 |
| Şekil 4.8. Metamizol'ün 4. Set 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi. ....  | 25 |
| Şekil 4.9. Metamizol'ün 1. Set 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi. ....  | 25 |
| Şekil 4.10. Metamizol'ün 2. Set 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi. .... | 26 |
| Şekil 4.11. Metamizol'ün 3. Set 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi. .... | 26 |
| Şekil 4.12. Metamizol'ün 4. Set 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi. .... | 27 |

|                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.13. 24 saat inkübasyon sonunda 25 µg/mL, 12,5 µg/mL ve 1 µg/mL metamizol'ün U-87 MG hücrelerinden salınan Substance P miktarı üzerine etkisi. ....    | 28 |
| Şekil 4.14. 48 saat inkübasyon sonunda 25 µg/mL, 12,5 µg/mL ve 1 µg/mL metamizol'ün U-87 MG hücrelerinden salınan Substance P miktarı üzerine etkisi. ....    | 28 |
| Şekil 4.15. 24 saat inkübasyon sonunda 25 µg/mL, 12,5 µg/mL ve 1 µg/mL metamizol'ün U-87 MG hücrelerinden salınan VEGF miktarı üzerine etkisi. ....           | 29 |
| Şekil 4.16. 48 saat inkübasyon sonunda 25 µg/mL, 12,5 µg/mL ve 1 µg/mL metamizol'ün U-87 MG hücrelerinden salınan VEGF miktarı üzerine etkisi. ....           | 30 |
| Şekil 4.17. 24 saat inkübasyon sonunda 25 µg/mL, 12,5 µg/mL ve 1 µg/mL metamizol'ün U-87 MG hücrelerinden salınan MMP-9 enzim aktivitesi üzerine etkisi. .... | 31 |
| Şekil 4.18. 48 saat inkübasyon sonunda 25 µg/mL, 12,5 µg/mL ve 1 µg/mL metamizol'ün U-87 MG hücrelerinden salınan MMP-9 enzim aktivitesi üzerine etkisi. .... | 31 |
| Şekil 5.1. Metamizol'ün muhtemel ağrı kesicisi mekanizması. ....                                                                                              | 32 |

## 1. GİRİŞ

Ölümcül hastalıklar arasında, kalp-damar rahatsızlıklarından sonra en yaygın ikinci sırada olan kanser, günümüz araştırmalarının hedef noktası haline gelmiştir. Bilimsel çalışmalar ile her geçen gün kanserle ilişkisi olan yeni birçok mekanizma ortaya çıkarılmaktadır (Doucas ve Berry 2006).

Klinik açıdan, özellikle tümörün cerrahi operasyonu sonrası ve kronik kanser ağrısının tedavisinde anestetik ve analjezik ilaçlar kullanılmaktadır. Kanser hastalarının çok büyük bir kısmında görülen en önemli yan etkilerden biri kronik ağrıdır. Ağrı, tümörün bulunduğu bölgede, tümörün hacmine bağlı olarak oluşan fiziksel baskı sonucu meydana gelebildiği gibi, tedavi amaçlı kullanılan kemoteröpatiklerin ve radyoterapinin yan etkisi ile de ortaya çıkabilir. Bununla birlikte ağrı, cerrahi müdahale ile primer tümörün uzaklaştırılması sonrasında da ortaya çıkabilir (Colvin vd 2006). Kanser ağrısının da %70'inden fazlası, vücutta tümör ve tümörle ilişkili sekonder yapısal değişikliklerden kaynaklanmaktadır (Yıldırım vd 2005).

Ağrı gerçek ya da potansiyel doku hasarıyla ilişkili veya böyle hasarların neden olduğu "hoş olmayan duyuşsal ve duygusal deneyim" olarak tanımlanır. Ağrı genellikle akut veya kronik olarak sınıflandırılır. Akut ağrıya yaralanma, hastalık süreci ya da anormal çalışan bir kas ya da iç organ neden olur. Diğer taraftan kronik ağrı, akut ağrının aksine hastalık sürecinin önüne geçerek altı aydan daha uzun sürer. Ağrının ortaya çıkma süreci, temel mekanizmalarla ilişkilidir. Nosiseptörler, zararlı uyarana veya etkisi uzun sürerse zararlı olabilecek uyaranlara duyarlıdır. Zararlı uyarıyı algılayan nosiseptörler, nosiseptif ağrıyı meydana getirir. Nosiseptörler, çoğunlukla küçük sinir lifleri olan Aδ ve C liflerine sahiptir. Zararlı kimyasallara, mekanik ve termal uyaranlara tepki verirler. Aδ lifleri miyelinsiz ve iyi lokalize olup, bilgiyi hızlı iletirken; C lifleri miyelinsizdir ve daha yavaş mesaj gönderirler. Nosiseptörlerce algılanan zararlı uyarılar, ilk olarak merkezi sinir sistemine daha sonra beyin sapı ve talamusa iletilir. Bireyin psikolojik etkileşimi ve duyuşsal deneyimleri sonucu ağrı uyarısı algılanır (Russo 2001). Pek çok hasta için ağrı, kanserin ilk belirtisidir ve tüm kanser tiplerinin yüzde 30-50'sinde hastalar orta veya şiddetli derecede ağrı çekerler. Kanser, hastalığın seyri boyunca herhangi bir zamanda ağrıya neden olabilir, ancak ağrı sıklığı ve şiddeti ileri evrelerde artma eğilimindedir. Aslında metastatik veya ileri evre kanser hastalarının yüzde 75-95'i kanser kaynaklı ağrıları yaşamaktadır (Mantyh vd 2002).

Kanser ağrısının tedavisinde farklı terapiler kullanılmaktadır. Bunlar NSAID'ler, opioidler, radyasyon, sistemik radyoizotoplar, kortikosteroidler, lokal anestetikler, antidepresanlar ve bisfosfonatlardır. Tedavide kullanılan ve kabaca; opioid olmayan ağrı kesiciler (steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaçlar; (NSAID)), opioid ağrı kesiciler ve sentetik ağrı kesiciler olmak üzere üç gruba ayrılabilen bu ilaçlar, periferik ve merkezi sinir sisteminin farklı bileşenlerini hedef alır (Mantyh vd 2002, Moore 2009).

Opioidler (Opiyatlar) uzun zamandır kanserle ilişkili, hem orta-şiddetli ve nöropatik ağrının tedavisinde hem de operasyon sonrası ağrının önlenmesinde etkili olarak kullanılmaktadır. Hafiften orta şiddette kadar ağrı tedavisinde kodein, oksikodon ve hidrokodon kullanılır.

Bu ilaçlardan daha güçlü olan morfin ve fentanil gibi opiyatlar anestezi olarak kullanıldıkları gibi, kronik ağrının sıkı denetim altına alınmasında da etkin bir şekilde kullanılmaktadırlar. Kodein, asetaminofen ve NSAID'lerle kombine edildiğinde hafif veya orta derecede ağrıya karşı da etkilidir (Hargreaves ve Abbott 2005, Salerno vd 2006).

Opioid olmayan ağrı kesiciler, genellikle akut ve kronik ağrının tedavisinde tüm dünyada en sık kullanılan ilaç grubudur. Son 20 yılda özellikle operasyon sonrası ağrının tedavisinde, hafif ve orta derecedeki ağrılar için tek başına kullanılan bu grup ilaçlar, son zamanlarda, çok yönlü ağrı kesicilerin bileşenleri olarak da sıklıkla kullanılmaktadır (White 2005). Opioid olmayan ağrı kesiciler, asit ve asit olmayan antipiretik ilaçlar olarak da sınıflandırılabilir (Brune ve Zeilhofer 2006). Asit olmayan antipiretik ilaçlar, anilin türevli parasetamol ve fenazon türevlerinden dipiron ile temsil edilir. Bu ilaçlar ağrı kesici ve antipiretik olmalarına rağmen, anti-inflamatuvar değildir.

Tez çalışmasında kullanılan ticari ismi Novalgin olan ağrı kesicinin etken maddesi metamizol sodyumdur. Metamizol (dipiron), parasetamol benzeri, asidik olmayan anti-piretik ağrı kesici bir pirazolon türevidir. İlk olarak 1920'de sentezlenen metamizol, halen klinik kullanımda olan bu grubun ana temsilcisidir. Metamizol'un farmakolojik mekanizması belirsizliğini korumaya devam etse de; yaygın görüş metamizol'un siklooksijenaz-3 (COX-3) izoenziminin bir engelleyicisi olabileceği ve böylece omuriliğin dorsal boynuzunda prostaglandin sentezinin azaltarak etkisini gösterdiği yönündedir (Chandrasekharan vd 2002, Schug ve Manopas 2007). Prostaglandin, K<sup>+</sup> ve bradikinin gibi ağrı oluşturan etmenler doku hasarı durumlarında salgılanmaktadır. Nosiseptörler de duyu sinirlerinin C fiberlerinden Substance P maddesini salgırlar. Substance P damar genişletici etkiye sahip, mast hücresi degranülasyonu yapan, histamin ve serotonin artışına neden olan bir nörotransmitterdir (Bang vd 2003).

Substance P (SP), omurgalı ve omurgasız hayvanlarda evrimsel süreç boyunca korunmuş, peptid karakterdeki hormonların bir ailesi olan Takikinin'lerin parçalanması sonucu açığa çıkan bir maddedir (Erin ve Ulusoy 2009). P maddesinin NK-1 reseptörüne bağlanması G proteinini aktive eder ve bu aktivasyon sonucunda SP, NK-1,  $\beta$ -arrestin, SRC (Protoonkogenik Tirozin Kinaz), ERK1/2 (Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinaz) proteinlerini de içeren karmaşık bir protein kompleksi aktive edilir. Aktive olan bu kompleks, nükleusa doğru hareket eder ve hücre proliferasyonunu artırır ayrıca Mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAP)'ların aktivasyonunu sağlayarak hücreyi apoptozdan korur (Esteban vd 2009). SP'nin, kemik iliğindeki metastazik nöroblastoma hücrelerinin %90'ında, invaziv malignant melanomaların %68'inde, metastazik melanomaların %40'da, in situ melanomaların %60'ında eksprese edildiği gösterilmiştir. Pek çok tümörde, özellikle de tümörün çevresinde bulunduğu saptanmıştır (Munoz ve Covenas 2010). Tümör hücrelerinde, tümoral ve peritümoral dokularda (inflamatuvar hücreler, fibroblastlar, kan damarları, sinirler vb.) yüksek miktarda eksprese edilen SP/NK-1 yolağı, tümör anjiogenezini ve tümoral kütlenin büyümesini arttırmaktadır (Friess vd 2003). SP'nin anjiyogenik özellikte olduğu da son yıllarda açığa çıkarılmıştır. Bu nedenle hem ağrı yolağında yer alan bir nörotransmitter olması hem de anjiyogenik bir faktör olması dolayısıyla Tez kapsamında öncelikle kanser hücrelerinden salınan SP miktarı üzerine Novalgin'in etkisini araştırdık.

Kısaca, var olan kan damarlarından yenilerinin oluşması olarak tanımlanan anjiyogenez tümörün büyümesi, saldırganlığı ve metastazı için oldukça önemli, karmaşık bir süreçtir (Radisky vd 2001). Anjiyogenez, pro ve anti- anjiyogenik faktörlerce dengede tutulan dinamik çok basamaklı bir süreçtir. Novalgin'in tümör hücreleri üzerindeki olası pro-anjiyogenik etkisini belirlemek için tez kapsamında baktığımız diğer bir faktör de vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)'dür. VEGF, kanser hücrelerinden salınan en önemli pro-anjiyogenik faktördür. VEGF, hızlı ve tam bir anjiyogenik yanıtın oluşumunu indükleyen, endotel hücreler için potansiyel ve seçici bir mitojendir (Boudreau ve Myers 2003). Tümörün tetiklediği anjiyogenez, hem tümör hücrelerinden hem de tümör stromasındaki hücreler tarafından sentezlenen VEGF'nin ekspresyonunun artışı ile ilişkilendirilmiştir (Bouis vd 2006).

Anjiyogenez sürecindeki en önemli değişimlerden birisi de Ekstraselüler Matriks (ECM)'nin yeniden şekillendirilmesidir. Bu şekillendirmede esas olan, tümör ile stromal fibroblastlar arasında iletişimin sağlanmasıdır. Bu anlamda, ECM'nin yeniden şekillendirilmesinden sorumlu en önemli enzimler ise Matriks-metallo-proteazlar (MMP)'dir. MMP'ler, pro-anjiyogenik faktörlerin içinde bulunduğu ECM'ye bağlı büyüme faktörlerinin serbest kalmasına da neden olur. MMP'ler aynı zamanda, tümör büyümesi, anjiyogenez ve metastazı kontrol eden farklı sinyal yollarını düzenlerler. MMP ailesinin en önemli enzimlerinden biri de MMP-9'dur. MMP-9'un miktarının artması pek çok tümörle ilişkilendirilmiştir ve kanserin invazyon ve metastazı ile korelasyon göstermektedir (Kast ve Halatsch 2012). Herhangi bir etken madde pro ve/veya anti-anjiyogenik özelliğini, anjiyogenez sürecinde yer alan pek çok farklı proteinin ekspresyonlarını değiştirerek gösterebilir. Bu nedenle Novalgin'in anjiyogenez sürecinde önemli bir rol oynayan MMP-9 üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığı da tez kapsamında araştırılmıştır.

Novalgin, NSAID gurubundan bir ilaç olduğu için hafif ila orta şiddette ağrının tedavisinde etkili bir ağrı kesicidir. Tümör hücrelerinin, konakçıya ait anti-tümör bağışıklık sistemlerinden, prostaglandin aracılı immün baskılanmadan ve IL-12 aracılı down regülasyondan kaçabildiği varsayılmıştır. Prostaglandin sentezini siklooksijenaz enzimlerinin inhibisyonu yoluyla zayıflatan NSAID'ler, tümör hücrelerinin bağışıklıktan kaçmasının bastırılmasında ideal maddeler olarak gösterilmektedir (Meserve vd 2014). Her ne kadar NSAID'lerin COX ve prostaglandin aracılı mekanizmalar üzerine etkileri anti-kanser etkiye işaret etse de; metamizol'ün kanser hücreleri üzerine olan çoğaltıcı ve dolayısıyla anjiyogenik dinamikleri henüz net değildir. Temel olarak, tez çalışmasının hedefi, kanser hastalarında cerrahi müdahale öncesi ve sonrasında hafif-orta şiddetli ağrıların giderilmesi amacıyla kullanılan ilaçlardan olan Novalgin'in potansiyel anjiyogenik etkisi ile kanserin ilerlemesine neden olup olamayacağının araştırılmasıdır. Bu bağlamda, tez kapsamında, en yüksek damarlanma gösteren tümörlerden biri olan insan glioblastoma hücre hattı rol-model olarak seçilmiştir. Böylece anjiyogenez sürecinin temel ve önemli basamaklarındaki faktörler aracılığı ile Novalgin'in potansiyel anjiyogenik bir etkiye sahip olup olmadığı sorusuna cevap aranması amaçlanmıştır.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

### 2.1. Kanser ve Ağrı

Kanser, temel olarak hücrelerin çoklu değişiklikler geçirerek, kontrolsüz ve aşırı çoğalmalarına neden olan bir hastalıktır. Geçirdikleri değişiklikler hücre bölünme döngüsünü, bağışıklık sisteminin denetiminden kaçma veya savaşma yeteneğini, diğer hücrelerle olan iletişimini kontrol eden modifikasyonların bir sonucudur. Kanser, halen dünya çapında hastalık ve ölüm oranlarının ana nedenlerinden biridir. Kanser tedavisinde önemli gelişmeler sağlansa da kanserin görülme oranı artmaya devam etmektedir (Harrington 2016).

Dünya Sağlık Örgütü'nün araştırmalarına göre, 2021 yılında dünyada 15 milyon yeni kanser vakası görüleceği tahmin edilmektedir. Kanserde, yaşam süresini uzatan yeni tedaviler umut verici olsa da; madalyonun diğer yüzünden bakıldığında kanser hastaları, hastalık ve hastalık tedavisinden kaynaklanan ağrılara daha uzun süre maruz kalacaklardır. Kanserde ağrı önemli bir belirtirdir ve hastanın yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Metastazı olan hastaların % 50'sinden fazlasında ve ileri evreli hastaların % 90'ından fazlasında ağrı bulgularının olduğu tahmin edilmektedir. Kanser ağrısının % 70'inden fazlası, özellikle tümör ve tümörle ilişkili ikincil yapısal değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Her yıl dünya genelinde 4-5 milyon kişi kansere bağlı nedenlerle ölmektedir. Bu durum göz önüne alındığında, kanser hastaları hayatlarının son dönemlerini ağrılar içerisinde geçirmektedir. Bu durum sadece tıbbi bir sorun olarak kalmamakta aynı zamanda sosyal bir sorun olarak da karşımıza çıkmaktadır (Erdine 2002, Yıldırım 2005, Wargo ve Burton 2005).

Anestezi ilaçlarının kanser ağrısının tedavisindeki kullanım amaçları; primer tümörün uzaklaştırılması amacı ile cerrahi operasyon öncesi hastanın uyutulması, akut cerrahinin neden olduğu ağrıların giderilmesi ve hastalık yükü, tedavi gibi faktörlerden kaynaklanan kronik ağrının iyileştirilmesi olarak tanımlanabilir. Ancak, yapılan değerlendirmelere göre, operasyon sonrası uygulanan teknikler ve ağrı kesicilerin, kanser hücrelerini uyararak hastanın anti-kanser bağışıklığını baskılayabileceğini düşündürmektedir (Gottschalk vd 2010, Taverre vd 2012, Meserve vd 2014).

#### 2.1.1. Ağrı

Ağrı, sinir sisteminin hayati bir fonksiyonudur ve vücuda potansiyel ya da fiilli yaralanma uyarısı verir. Ağrı, geçmiş deneyimler, korku ve kaygı gibi psikolojik faktörlerden de etkilenen duyuşsal ve duygusal bir deneyimdir. Ağrı reseptörleri, ağrı sinyallerinin iletim mekanizmaları ve ağrı yolları kanser ağrısının ortaya çıkışında ve tedavisinde önemli hedefler olarak karşımıza çıkmaktadır.

Birincil duyuşsal sensör sinirleri, periferik dokulardan alınan duyu bilgisinin omurilik ve beyine iletildiği "ağ geçidi"dir. Bu nöronlar cildi ve vücudun hemen her iç organını sarmaktadır. Baş ve vücudun sinir sistemini bağladığı duyuşsal liflerin hücre gövdeleri, sırasıyla trigeminal sinir düğümü ve arka kök sinir düğümü'dür. Bu sinir düğümleri iki ana kategoriye ayrılabilir. Bunlar Miyelinli A-lifleri ve daha küçük çaplı,

miyelinsiz C-liflerdir. Hemen hemen tüm büyük çaplı miyelinli A- $\beta$  lifleri, normal olarak cilde, eklemlere ve kaslara uygulanan zararlı olmayan uyarıları iletirler.

Bu nedenle, normal bir durumda, bu büyük duyu nöronları zararlı uyarılara geçit vermez. Buna karşılık, en küçük çaplı duyu lifleri, miyelinsiz C lifleri ve ince miyelinli A- $\delta$  lifleri, nosiseptörler olarak bilinen uzmanlaşmış duyu nöronlarıdır. Nosiseptörlerin ana işlevi, zararlı olarak algılanan çevre uyarılarını, merkezi sinir sistemine iletilen elektrokimyasal sinyallere dönüştürmektir. Görme ya da koku alma ile ilgili olan birincil duyu nöronlarının aksine, ağrı yolunun bireysel birincil duyu nöronları, fiziksel ya da kimyasal özellikli olanlar da dahil olmak üzere geniş bir yelpazede uyarıcı tanıma anlamında önemli bir kabiliyete sahiptir. Bunu gerçekleştirmek için, nosiseptörler, termal, mekanik ve kimyasal gibi zararlı uyarın şekillerini algılayabilen birçok reseptör çeşitliliğine ve geçiş moleküllerine sahiptir. (Basbaum ve Jessel 2000, Julius ve Basbaum 2001).

Duyu sinirleri, doku hasarını tespit eden kanalları ve reseptörleri eksprese etmenin yanı sıra, periferik yaralanmaya yanıt olarak fenotiplerini değiştirebilmeleri bakımından son derece esnekler. Doku zedelenmesinden sonra, birçok nosiseptör sinyal peptid modellerini ve büyüme faktörü ekspresyonunu değiştirir. Duyusal sinirin fenotipindeki bu değişiklik, nosiseptör eşik seviyesinin aktivasyonunun azaldığı periferik duyarlılıkla ilgilidir. Normalde hafif derecede zararlı bir uyarı olarak algılanacak olan şey, çok zararlı “hyperalgesia” olarak algılanır veya normalde zehirsiz olarak algılanacak uyarılar zehirli “allodynia” olarak algılanır. Çevresel bir dokunun hasar görmesi sonucu, daha önce sessiz olan veya “uyku nosiseptörleri” olarak bilinen reseptörlerin aktive edildiği gösterilmiştir. Bu durumda nosiseptörler normalde zararlı olmayan uyarılara veya hafif derecede zararlı uyarılara karşı fazla tepki vermektedir (Woolf ve Salter 2000).

#### 2.1.1.1. Kanser ağrısı

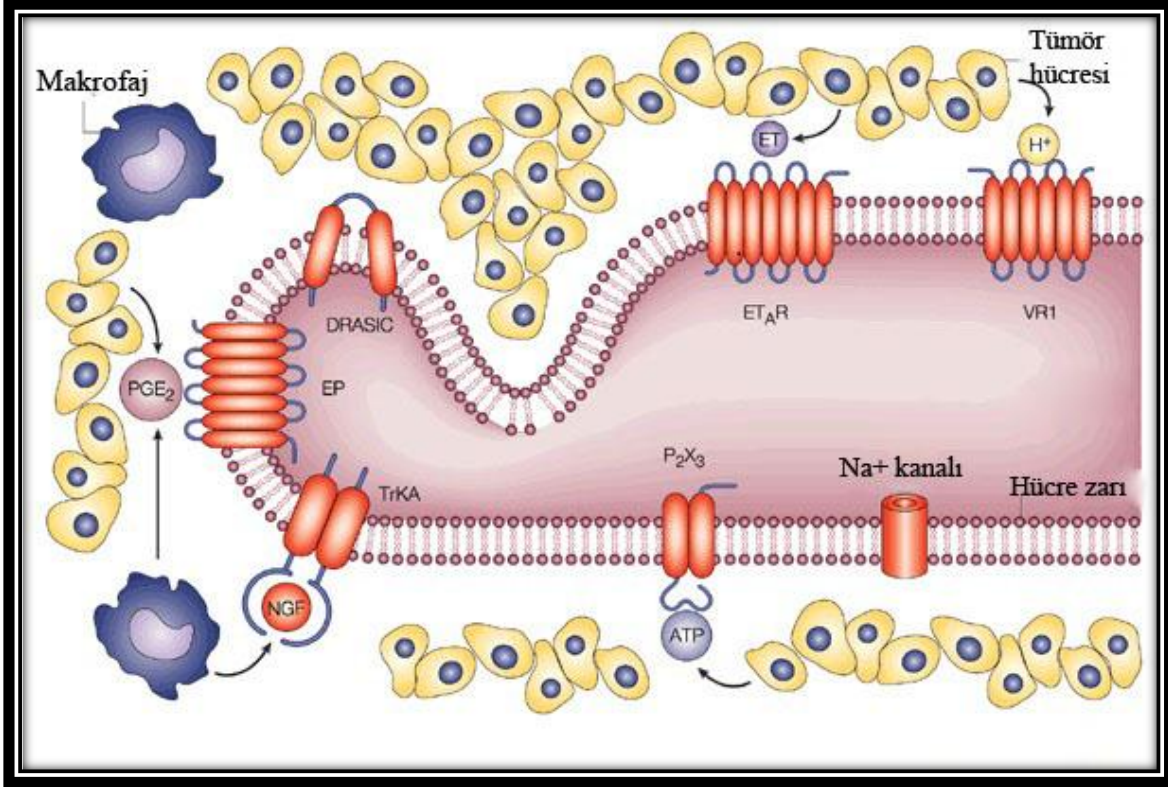
Günümüzde, kansere bağlı ağrı düzeylerini azaltmaya yönelik bir dizi yaklaşım uygulanmaktadır. Radyasyon, kemoterapi ve / veya ameliyat gibi tümörün boyutunu küçültmeye yönelik tedaviler genellikle etkindir; fakat bunlar ağır tedavilerdir ve önemli oranda istenmeyen yan etkilere neden olabilir. Büyük bir çoğunlukla tedavi ile ilişkili yan etkiler nedeniyle, kanser hastalarının % 45’inde yeteriz ve kalıcı olmayan ağrı kontrolü olduğu bildirilmiştir (Meuser vd 2001, de Wit vd 2001).

Bir tümör, makrofajlar, nötrofiller ve T hücreleri gibi bağışıklık sistemi hücreleri de dahil olmak üzere kanser hücreleri dışındaki pek çok hücre tipinden oluşur. Bunlar birincil duyu sinirleri hassaslaştıran veya doğrudan uyarın çeşitli faktörleri salgırlar. Prostaglandinler, tümör nekroz faktör- $\alpha$  ve endotelin’ler bu faktörlerden birkaçıdır (Nadler vd 2000, de Leo ve Yazierski 2001).

Nosiseptör, kanser hücreleri veya tümör mikro çevresi tarafından üretilen zararlı uyarılara ilişkin sinyalleri algılamak ve iletmekle görevli birkaç farklı reseptörü tanımlamak için kullanılan genel bir terimdir. Örneğin, Vanilloid reseptör-1, kanser hücreleri tarafından üretilen hücre dışı protonları (H<sup>+</sup>) tespit ederken, endotelin-A reseptörleri kanser hücreleri tarafından salınan endotelin’leri tespit eder. Duyusal

nöronlar tarafından eksprese edilen diğer reseptörler arasında, kanser ve iltihap hücreleri tarafından üretilen prostaglandin  $E_2$ 'yi saptayan prostaglandin reseptörleri bulunmaktadır.

Makrofajlar tarafından salınan sinir büyüme faktörü (NGF), Tirozin Kinaz A (TrKA) reseptörüne bağlanır. Bu sırada, hücre dışı ATP, purinerjik P2X3 reseptörüne bağlanır. Bu reseptörlerin aktivasyonu, sodyum kanalının fosforilasyonunu uyararak, nosiseptörün uyarılabilirliğini artırır. (Mantyh vd 2002, Julius ve Basbaum 2001).

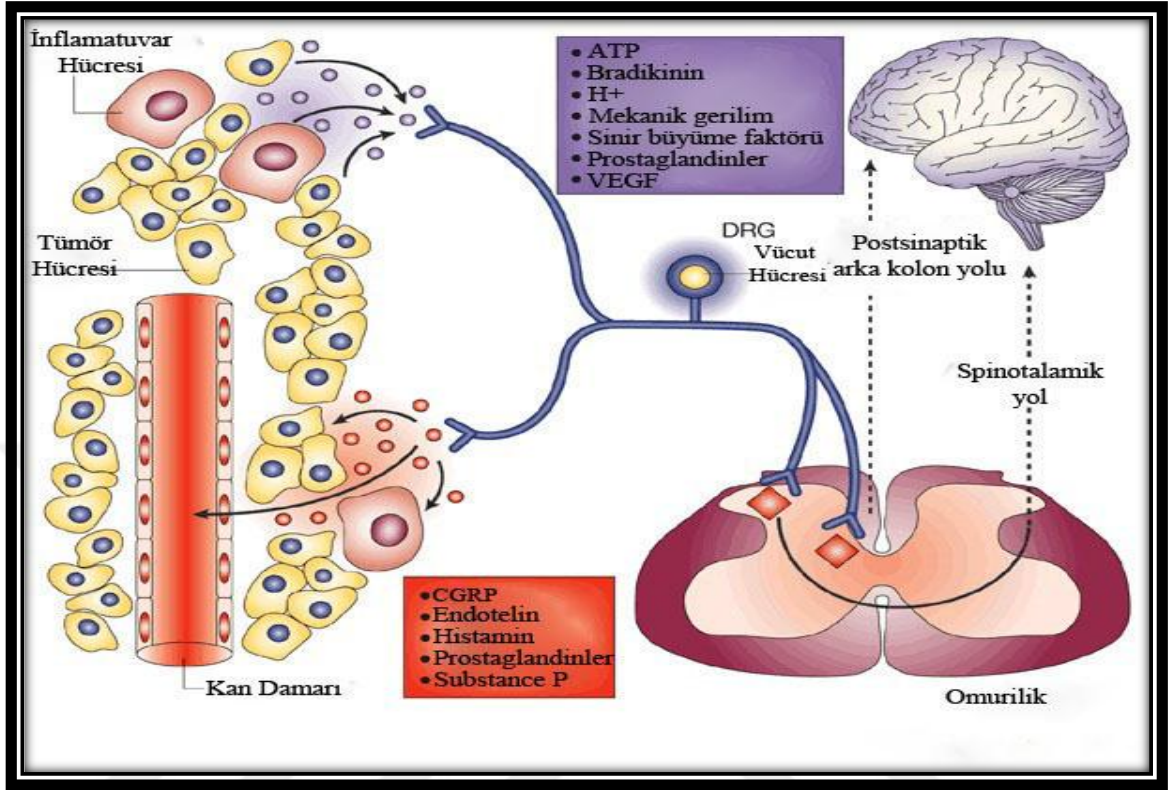


Şekil 2.1. Tümörler tarafından üretilen zararlı uyarıların duyu nöronları tarafından algılanması (Mantyh vd 2002, Julius ve Basbaum 2001).

Kanser hücrelerine ek olarak, tümörler inflamatuvar hücrelerden ve kan damarlarından oluşur. Yine tümörler çoğunlukla birincil duyu nöronlarına bitişiktirler. Kanser hücreleri ve inflamatuvar hücreler, nosiseptörü uyararak veya hassaslaştıran ATP, bradikinin,  $H^+$ , sinir büyüme faktörü, prostaglandinler ve damar endotel büyüme faktörü gibi çeşitli ürünleri serbest bırakır. Ağrılı uyarılar, arka kök sinir düğümünde bulunan hücre cisimcikleri olan nosiseptörler tarafından saptanır ve omurilikteki nöronlara iletilir. Sinyal daha sonra beyindeki yüksek merkezlere iletilir. Kansere bağlı ağrı sinyallerinin, beyne en az iki omurilik kordonu yolu ile yani spinotalamik yol ve arka kolon yolu ile ulaştığı tahmin edilmektedir.

Nosiseptör aktivasyonu, kalsitonin genine-bağlı peptid, endotelin, histamin, glutamat ve substance P gibi nörotransmitterlerin salınımı ile sonuçlanır. Nosiseptör aktivasyonu aynı zamanda duyu liflerinin periferik uçlarından prostaglandinlerin salınmasına neden olur. Bu duyu lifleri aynı zamanda, plazmanın damar dışına

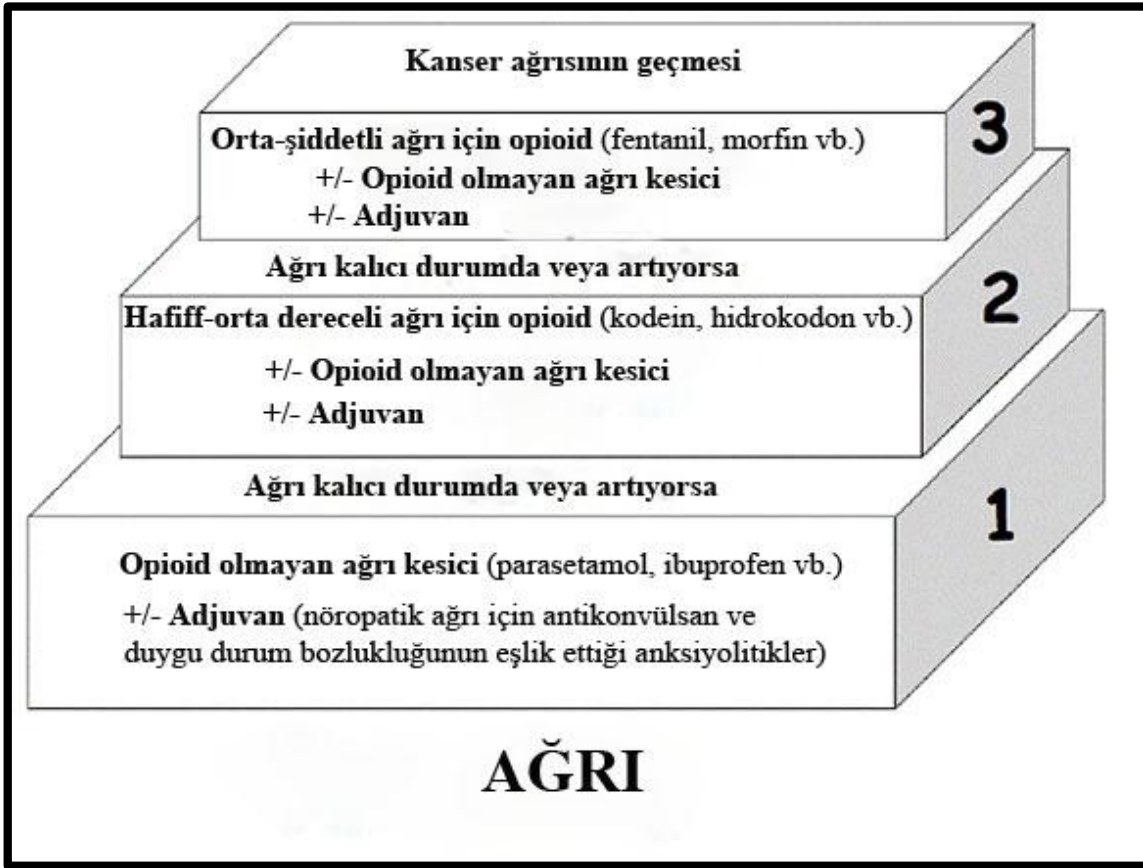
sızmasına, bağışıklık hücrelerinin aktivasyonuna ve damar genişlemesine neden olabilir (Manthy vd 2002).



Şekil 2.2. Tümör ve nosiseptör bağlantısı (Manthy vd 2002).

## 2.2. Kanser Ağrısının Yönetimi

Dünya Sağlık Örgütü, 1986 yılında kanser ağrısı tedavisi için bir strateji belirlemiştir. Bu stratejiye göre, ağrı yoğunluğu göz önünde bulundurularak, opioid olmayan ağrı kesicilerden zayıf opioidlere ve güçlü opioidlere kadar sıralı üç aşamalı bir analjezik merdiven basamağı tedavisi önerilmiştir. İlk baskısından yirmi yıl sonra bile, Dünya Sağlık Örgütü kanser ağrı kesici programı, ağrı yönetiminin referansı olmaya devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, opioid ağrı kesiciler ağrı tedavisinin temel dayanağıdır ve ağrıyı hafif-orta, orta-şiddetli yoğunluğa kadar kontrol etme yeteneklerine göre sınıflandırılmıştır (World Health Organization, 1996).



Şekil 2.3. Dünya Sağlık Örgütü'nün kanser ağrısı tedavisi basamakları (Dünya Sağlık Örgütü 1996).

Ağrı tedavisine, ağrının derecesine uygun olarak, Dünya Sağlık Örgütü'nün ağrı basamaklarında belirttiği ilaçlarla başlanmalıdır. Çoğu kanser hastasında ağrı, birincil anti-tümör tedaviler, sistemik ağrı kesici tedavileri ve psikolojik müdahaleler gibi yaklaşımlarla tedavi edilebilir. Hafif ağrının tedavisinde, asetaminofen/parasetamol veya bir NSAID gibi opioide olmayan ağrı kesiciler yaygın olarak kullanılmaktadır. Tek doz çalışmalarında kanser ağrısının hafifletilmesinde NSAID'ler plaseboya göre daha üstündür. Tek bir güçlü bir opioide ile kanser hastalarının küçük bir yüzdesiyle rastgele yapılan klinik bir araştırmada parasetamolün ağrı ve refahı iyileştirdiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu sonuçlar diğer çalışmalar tarafından doğrulanmamıştır. Parasetamol ve/veya steroidal olmayan anti-inflamatuar bir ilaç, hafif ağrının tedavisinde etkilidir. Parasetamol ve NSAID'ler, Dünya Sağlık Örgütü ağrı kesici basamaklarının herhangi bir aşamasında kanser ağrısı tedavisinin evrensel bir parçası olarak kabul edilmektedir (Stockler vd 2004, McNicol vd 2005).

Geleneksel olarak hafif-orta derece ağrıya sahip hastalar, asetaminofen, aspirin veya NSAID ve ayrıca kodein, dihidrokodon, tramadol veya propoksifen gibi zayıf ani salımlı opioide içeren bir bileşim ürünü ile tedavi edilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü ağrı tedavisinin ikinci basamağında, ilaç kullanımı ile ilgili çok sayıda tartışma mevcuttur. Bu tartışmaların nedenlerinden ilki, zayıf opioidelerin etkinliğini gösteren kesin bir kanıtın olmamasıdır. Klinik denemelerden elde edilen verilerin meta-analizinde, tek

başına opioid olmayan analjezikler ile bunların zayıf opioidlerle birleşimi arasındaki etkinlikte anlamlı bir fark bulunamamıştır. Mevcut çalışmalar, ilaçların birinci ve ikinci basamaklar arasındaki etkinliğinde anlamlı bir fark göstermemektedir. Zayıf opioidlerin kullanımındaki bir başka kısıtlama ise doz eşliğinin ilacın etkinliğini arttıramayacağı, ancak yan etkileri ise arttıracığı yönündeki görüştür. Birçok bilimadamı, düşük dozlarda morfinin daha erken kullanılmasını ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından belirlenen “ağrı kesici merdiveninin” ikinci adımının kaldırılmasını önermiştir. Ancak öneri, konuyla ilgili incelenen hasta örneklerinin hem sayıca az hem de temsil edilebilirliğinin düşük olması nedeniyle reddedilmiştir (Eisenberg vd 1994, Marinangeli vd 2004, Mercadante vd 2006).

Güçlü opioidler, kansere bağlı orta-şiddetli derecedeki ağrı tedavisinin temel dayanak noktasıdır. Morfin, metadon, oksikodon, hidromorfon, fentanil, alfentanil, buprenorfin, levorfanol ve oksimorfon, Avrupa'da en çok kullanılan güçlü opioidlerdir. Orta ila şiddetli kanser ağrısı için ilk tercih edilen opioid oral morfindir. Birçok ülkede 1977 yılından bu yana oral morfin, ağrıyı hafifleten, şiddetli kronik kanser ağrısının tedavisinde tercih edilmiştir. Bunun yansıra, morfin geniş ölçüde tolere edilebilir ve ucuz bir ilaç olması nedeni ile de sıkça tercih edilmektedir Hidromorfon veya oksikodon, oral morfine alternatif etkili ilaçlardır. Transdermal fentanil ve transdermal buprenorfin morfin toleransları düşük ve uyumsuzluğu kötü olan hastalar için tercih edilen ağrı kesicilerdir (Ripamonti vd 2011).

### **2.3. Kanser Ağrısında Kullanılan İlaçlar**

Farmakolojik tedaviler kanser ağrı yönetiminin temelidir. Çeşitli antikanser terapilerin yanı sıra bu terapiler arasında, opioidler, opioid olmayan ağrı kesiciler ve adjuvan ağrı kesiciler bulunmaktadır (Paice ve Ferrell 2011).

#### **2.3.1 Opioidler**

Opioid ilaç terapisi, 1803 yılında Serturmer tarafından morfinin izole edilmesi ile kanser ve cerrahi ağrı tedavisinde temel dayanak noktası olmuştur. Opioidler, doğal (kodein ve morfin), yarı sentetik (oksikodon ve hidrokodon) ve tamamen sentetik (fentanil, metadon ve tramadol) olmak üzere üç büyük grupta incelenir. Dört farklı opioid reseptörü (mu, delta, kappa ve nosiseptin), merkezi sinir sisteminde endojen ve eksojen opioid bağlanmasını gerçekleştirir. Son 15 yılda, doğrudan (reseptör stimülasyonu) ve dolaylı (immunosüpresif ve endokrin modülasyon) yollardan opioidlerin tümör hücresi büyümesi üzerine etkilerini araştıran çalışmalar hız kazanmıştır. Ağrı kesici etkilerine ek olarak opioidler, hücrel immüniteyi de azaltmaktadır. Opioidler, başta makrofajlar, nötrofiller, T hücreler ve Natural Killer (NK) hücreler olmak üzere neredeyse tüm immün sistem hücrelerini etkilemektedirler. Morfin, kodein ve fentanil'in her birinin NK hücre fonksiyonunu baskıladığı gösterilmiştir.

İnsanlarda opioid uygulamaları: Adrenokortikotropik hormon (ACTH), Kortokotropin salgılatıcı hormon (CRH) ve kortizol seviyelerini azaltır. Büyüme hormonu (GH), prolaktin ve Troid düzenleyici hormon (TSH) salınımını artırırken, hiperglisemiye neden olmaktadır. Deney hayvanlarında ise; T hücre apoptozunu, GH

ve Prolaktin salınımını artırdığı, TSH salınımını ise azalttığı gösterilmiştir (Snyder vd 2010, Vuong vd 2010, Wang vd 2003).

Hücre kültürü ve deney hayvanları ile yapılan çalışmaların sonuçları ise opioidlerin tümör büyümesini, tümör hücreleri üzerinde pro-anjiyogenik etki göstererek artırabileceğini desteklemektedir. Gupta vd (2002) tarafından yapılan bir çalışmada, meme kanseri oluşturulmuş farelere, klinikte uygulanan morfin dozunun verilmesinin tümör damarlanmasında artışa ve tümörün büyümesine neden olduğu gösterilmiştir.

Lennon ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış oldukları çalışma da oldukça önemlidir. Bu çalışmada, sentetik opioidlerin anjiyogenez için en önemli basamaklardan birisi olan endotel hücre migrasyonu (göçünü) ve proliferasyonunu, VEGF sinyal yolağını tetikleyerek artırdığını göstermişlerdir. Ayrıca, aynı çalışmada, normal hücrelere oranla kanser hücrelerinde opioid reseptörlerinin ekspresyonlarında bariz bir artış olduğu da gösterilmiştir (Lenon vd 2012).

Diğer taraftan, opioidlerin, tümör adezyonunu, migrasyonu ve çoğalmasını azalttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Morfinin, MMP'leri azalttığı ve doz bağımlı bir şekilde MMP inhibitörlerini artırdığı gösterilmiştir. Nitrik oksit sistemi aracılığında morfin, göğüs kanseri hücre hattı MCF-7 ve 26-L5 kolon kanseri hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 üretimini inhibe etmiştir. Klinik doz uygulamalarında morfin, akciğer kanseri ve promiyelositik lösemi hücre hatlarında *in vitro* apoptozu da uyarmıştır (Harimaya vd 2002, Hatsukari vd 2007, Hsiao vd 2009, Gach vd 2011).

### 2.3.2 Opioid olmayan ağrı kesiciler

Opioid olmayan ilaçlar operasyon sonrası ağrı tedavisinde önemli rol oynamaktadır. Opioidler oldukça etkili ağrı kesiciler olmalarına rağmen; bulantı, kusma, solunum depresyonu gibi yan etkilere sahip olmaları nedeniyle, alternatif ağrı kesicilerin kullanımı önemli hale gelmeye devam etmektedir. Opioid olmayan ağrı kesiciler, spesifik ve spesifik olmayan ağrı kesiciler olarak iki gruba ayrılabilir. Spesifik ağrı kesiciler; steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçlar (NSAID'ler), parasetamol (asetaminofen) ve asetilasetik asit gibi ilaçlardır. Genellikle, hafif ve orta dereceli ağrı tedavisinde yaygın olarak kullanılırlar. Spesifik olmayan ağrı kesiciler ise; NMDA reseptör antagonistleri, ketamin,  $\alpha_2$ -reseptör agonistleri, trisiklik antidepresanlar ve amitriptilin gibi diğer ilaçları içerir (Dahl ve Raeder 2000).

Parasetamol 19. Yüzyılın sonunda keşfedilen antipiretik bir ağrı kesicidir. Parasetamol düşük yüzeydeki yan etkileri ve kanıtlanmış ağrı kesici etkinliği nedeniyle, dünya çapında en yaygın olarak kullanılan ilaçlardandır. Parasetamol için endojen bağlanma alanları henüz tanımlanmamıştır; ancak NSAID'lerin periferik siklooksijenaz aktivitesi üzerindeki inhibe edici etkisinden yoksun oldukları bilinmektedir.

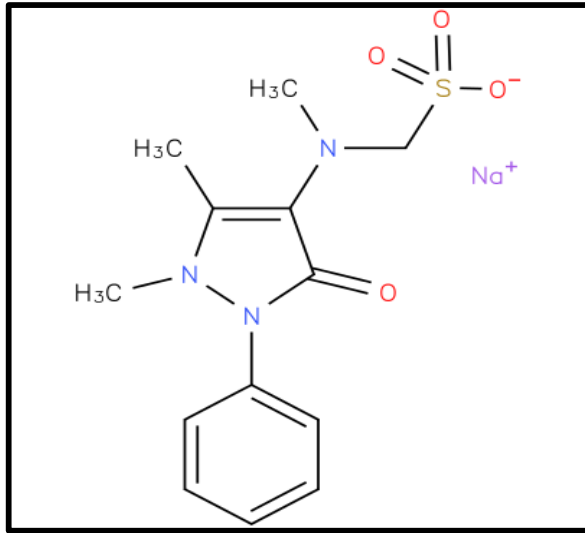
Parasetamol'un ağrı kesici etkisi için; "COX-2 aktivitesini inhibe ettiği" ve "serotoninerjik yolak aktivitesini uyararak serotonerjik antinosiseptif sistemi modüle ettiği" gibi farklı mekanizmalar öne sürülmüştür. Ancak tam mekanizma bilinmemektedir (Pelissier vd 1996, Brune vd 1997, Bonnefont vd 2003, Schwab vd 2003).

NSAID'ler, orta ila şiddetli ağrıya sahip olan hastalarda, akut ve kronik ağrıların kontrolü için sıklıkla kullanılır. Kemik metastazı, safra kesesi ve üriner spazm ağrısı gibi düşük opioid hassasiyeti olan bazı ağrı türleri içinde NSAID'ler ağrı kesici özellikleri nedeniyle kullanılmaktadır. NSAID'ler karaciğer tarafından hızla emilir ve metabolize edilir. NSAID'lerin bazı ağrı türleri için parasetamol (asetaminofen)'den daha etkili olduğu gösterilmiştir. Akut ağrı tedavisi için başlangıç dozu opioid ilaç dozlarıyla aynıdır (Dahl ve Kehlet 1991, Edwards vd 2000).

NSAID'lerin en önemli etki mekanizması, prostaglandinlerin (PG) öncüllerinin sentezinde yer alan enzimler olan siklooksijenaz (COX) enzimlerini inhibe etmektir. Ayrıca, bazı NSAID'ler COX'i inhibe etme yeteneklerinden bağımsız olan antinosiseptif etkilere de sahiptir. COX aracılı olmayan antinosiseptif etki periferik dokular üzerine de etki eder. Bunun dışında NSAID'ler antinosiseptif etkilerini merkezi sinir sisteminde, spinal kord ve periakuduktal gri madde (PAG) üzerinde gösterirler (Vanegas ve Schaible 2001, Vanegas ve Tortorici 2002, Nikolova vd 2012).

### 2.3.2.1. Metamizol

Metamizol, analjezik ve antipiretik etkinliğe sahip pirazolon türevidir, steroid olmayan anti-inflamatuar bir ilaçtır. Kimyasal adı sodyum N- (2,3-dimetil-5-okso-1-fenil-3-pirazolin-4-yl) -N-metil amino metansülfonattır. Moleküler formülü  $C_{13}H_{16}N_3NaO_4S$ 'dir. Metamizol beyaz veya neredeyse beyaza yakın kristal bir toz halindedir. En fazla suda çözünür. Ayrıca alkolde de çözünür. Avrupa Farmakopesi'nde tek başlık altında incelenen metamizol, NSAID'ler, narkotik olmayan ağrı kesici terapötik grubunda bulunur (Nikolova vd 2012).



Şekil 2.4. Metamizol sodyumun açık formülü.

Farklı araştırma grupları, COX'in metamizol ile *in vitro* ve *in vivo* inhibisyonunu ortaya koymuştur. Bu bulgulara dayanarak, metamizolün analjezik ve antipiretik etkilerinin en azından kısmen COX inhibisyonuna ve dolayısıyla azalmış PGE<sub>2</sub> sentezine bağlı olduğu öne sürülmüştür. Bununla birlikte, metamizolün analjezik etkisi ile prostaglandinleri inhibe etme kabiliyeti arasında herhangi bir ilişki bulunmadığı bilinmektedir. Metamizolün COX-3 izoenziminin bir inhibitörü olabileceği ve böylece

omuriliğin dorsal boynuzunda prostaglandin sentezini azalttığı varsayılmaktadır (Campos vd 1999, Geisslinger vd 1996, Warner vd 2002, Hinz vd 2007, Pierre vd 2007).

Metamizolün etki şekli henüz açıklığa kavuşmamıştır. Metamizol, analjezik etkilerini çeşitli mekanizmalar ile ortaya koymaktadır. En iyi tanımlanan mekanizmalar, COX inhibisyonu, çevredeki ve omurilikte L-arjinin / NO / siklik guanozin monofosfat (cGMP) / K<sup>+</sup> kanal yolağının gecikmeli aktivasyonu, engelleyici ağrı kontrol sisteminin aktifleştirilmesi, glutamaterjik sistem ile etkileşim ve endojen opioid peptidlerin salınmasıdır.

Metamizolün merkezi etkileri endojen opioid sistemi ile ilişkilendirilmiştir çünkü antinöseptif etki nalokson tarafından engellenmiştir ve bu ilacın hipofiz ve hipotalamik  $\beta$ -endorfinlerin salınımını uyarabildiğine dair kanıtlar vardır. Buna ek olarak, cerrahiden önce metamizol uygulamasının postoperatif morfin tüketimini azalttığı bildirilmiştir (Burian ve Geisslinger 2005, da Silva vd 2008, Ortiz vd 2003 Dogrul vd 2007).

Metamizolün güçlü antipiretik etkisinin altında yatan nörokimyasal mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak ateşi azaltmak için hipotalamik ısı düzenleyici merkezde etkili olduğunu ya da merkezi sinir sistemindeki prostaglandin sentezinin inhibisyonunun (veya prostaglandin E<sub>2</sub> oluşumundan önceki bir basamağın), antipiretik etkisine katkıda bulunabileceğine dair kanıtlar vardır. Ancak, Malvar vd (2011) metamizolün antipiretik etkisinin mekanik olarak hipotalamik prostaglandin E<sub>2</sub> sentezinin inhibisyonu ile bağlantılı olmadığını göstermiştir.

Metamizol zayıf anti-inflamatuar etkinliğe sahiptir. Kronik inflamasyon modeli ile yapılan bir çalışmada metamizol, indometasin ve deksametazonun analjezik ve anti-inflamatuar etkileri incelendiğinde; metamizolün, analjezik olarak daha güçlü olduğu gösterilmişken, indometasin ve deksametazonun da belirgin bir anti-inflamatuar etki ortaya çıkarılmıştır. Metamizolün anti-inflamatuar aktivitesi, iltihaplı dokular gibi peroksit bakımından yüksek ortamlarda COX'ın düşük afinitesinden dolayı zayıftır (Nikolova vd 2012).

#### 2.4. NSAID'ler ve Kanser

Kanser progresyonunda ana mediatörler olan COX-2 ve PGE<sub>2</sub> üzerindeki etkileri nedeniyle NSAID'lerin güçlü ve potansiyel bir anti kanser etkisi vardır. COX-2 inhibisyonuna bağlı olarak PGE<sub>2</sub> üretiminin inhibisyonu, kanser hücresinin çoğalması ve hayatta kalma üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olabilir. NSAID'lerin prostaglandin, siklooksijenaz (COX-1 ve COX-2) prototipik hedeflerinin üretimini kontrol eden anahtar enzimler sıklıkla kanser ilerlemesinde aşırı eksprese edilir veya düzensizleşir. COX-2 ekspresyonu, kemik iliği metastazı da dahil olmak üzere metastaz sürecinin birçok yönüyle ilişkilendirilmiştir (Singh vd 2007, Singh vd 2011). Göğüs kanserinin fare modellerinde, COX-2'nin osteoklastogenesis (Interlökin-11 yoluyla) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca COX-2, programlı hücre ölümünün bir türü olan anoiki'teye direnç ve aynı zamanda kemoterapötik ajanlara (doksorubisin dahil) karşı direnç de dahil olmak üzere, hücre siklusu regülasyonunda genomik instabilite ve değişikliklere yol açan artmış tümör varlığı ve klonojenisite ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte COX-2 kanser hücre gücüyle de ilişkilendirilmiştir. Karnezis vd (2012)

yaptığı çalışmada lenfatik damarlanma yoluyla metastatik yayılımın kontrolünde lenfanjiyojenik büyüme faktörü sinyali ile prostaglandin yollarının kesişimini önermektedir (Singh vd 2006, Hussain vd 2012, Forget vd 2013).

COX-2 ifadesi ile kanser nüksü ve hayatta kalma arasındaki ilişki birçok kanser tipinde incelenmiştir. COX-2 ekspresyonu, artmış kanser nüksü ile ilişkilidir Lee vd (2013) yumurtalık kanseri hastalarıyla ilgili yapmış oldukları bir meta-analizde artmış COX-2 ekspresyonunun genel sağkalımda bağımsız bir risk faktörü olabileceğini öne sürmüşlerdir (Al-Maghrabi vd 2012, Ke vd 2012, Brand vd 2013, Chen vd 2013).

Ağrının ortaya çıkışındaki önemli belirtilerden olan periferik sensitizasyonun, ilk yaralanma anında başladığı bilinmektedir. Hasarın bulunduğu bölgede serbest bırakılırlar. Böylece hem nosiseptörü daha fazla uyarır hem de yaralı bölgenin hassasiyetini artırır. Nosiseptörler; arterlerin genişlemesi, mast hücresi degranülasyonu ve artışı gibi işlevlerin dışında ağrı iletiminden birinci derecede sorumlu olan substance P'yi serbest bırakır (Bang vd 2003, Russo 2001).

Substance P peptit karakterdeki hormonların bir ailesi olan Takikininler'in parçalanması sonucu açığa çıkan bir maddedir. Substance P, nörokinin-1 (NK-1) reseptörüne yüksek bir afinite ile bağlanır. SP-NK-1 reseptör bağlanması, hücrel uyarılabilirlik ve hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde çeşitli efektör mekanizmaları tetikleyen ikincil haberciler (adenilat siklaz uyarımı yoluyla cAMP birikimi, fosfolipaz C/fosfatidil inositol yolu ile kalsiyum mobilizasyonu, fosfolipaz A2 yoluyla araşidonik asit mobilizasyonu) üretebilir. Substance P, sitoplazmada ve tümör hücrelerinin çekirdeğinde tespit edilmiştir. Bu nedenle, tümör hücrelerinin çekirdeğinde Substance P'nin yüksek olması, peptid'in tümör hücrelerinin nükleer aktivitesini düzenleyebileceği anlamına gelir ve aslında SP'nin bu hücrelerdeki mitojeniteyi düzenlediği bilinmektedir (Munoz vd 2010, Munoz vd 2011).

NK-1 reseptörü, insan kanser hücre hatları ve / veya primer tümörlerde (örn., glioma, astrositom, retinoblastoma, gangliyonöroblastom, lösemi, nöroblastom, karsinomalarda) gösterilmiştir. Bunun yanında, araştırılan tümörlerin çoğunda NK-1 reseptörleri, intra-ve peri-tümöral kan damarlarında bulunmuştur. Bu NK-1 reseptörünün anjiyojenez ile ilişkisi açısından oldukça önemlidir. NK-1 reseptörlerinin glioblastoma, göğüs kanseri, retinoblastoma, larinks, pankreas, gastrik ve kolon karsinoma hücrelerinde aşırı eksprese edildiği bilinmektedir (Hennig vd 1995, Esteban vd 2009).

Son yıllarda, nöro-immün mekanizmaların (özellikle SP / NK1 reseptör yolağı) lokal tümör gelişiminde, karsinogenezde ve uzak metastazda önemli bir rol oynadığı kabul edilmiştir. SP'nin nörojenik inflamasyonda, yerel enflamatuvar yanıtları ve anjiyogenezi önemli derecede indüklediği bilinmektedir (Şimşek vd 2011, Grimsholm vd 2008). Tümör gelişiminin en belirgin özelliklerinden biri olan neoanjiyogenezi SP tarafından uyarılır. İncelenen çoğu tümörde hem SP hem de NK-1 reseptörleri intra-ve peri-tümöral kan damarlarında bulunur, aslında neoanjiyogenezi sırasında doku innervasyonu ve NK-1 reseptörlerinin ekspresyonu artar (Ziche vd 1990, Munoz vd 2011).

Hem ağrı iletiminde oynadığı önemli rol hem de anjiyogenik bir faktör olma özelliklerinden dolayı SP, Metamizol'un potansiyel anjiyogenik etkisini belirlemek üzere, tez kapsamında incelemek için belirlediğimiz faktörlerden birincisidir. Bu nedenle, çalışmamızda, Metamizol'un tümör hücrelerinden salınan P maddesi miktarı üzerine olası etkileri araştırılmıştır.

Anjiyogenez terimi ilk kez 1971'de Judahh Folkman tarafından ortaya atılmıştır. Tümör büyümesinde angiogenezin önemi ise ilk kez yine Folkman tarafından hipotez edilmiştir. Folkman'a göre tümör sınırlı kaynaklara sahiptir ve kanser hücreleri bu kaynakları kullanabilmek için bu sınırlı kaynağa ulaşmak adına birbirleriyle savaşır. Tümör içerisinde artan basınç da besin ve oksijenin difüzyonuna engel olur. Bu koşullar, tümör hücrelerini, var olan damarlardan yenilerini oluşturması için uyarır.

Oluşturulan bu damar ağı sayesinde, tümör hücreleri yaşama ve çoğalmaları için gerekli besin ve oksijene ulaşmış olurlar. Tümörler ancak anjiyogenik şalteri açmak suretiyle anjiyogenik bir fenotip kazanabilirler. Anjiyogenik şalter ise pro- ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki denge ile kontrol edilir. Bu bağlamda, kanser, metastaz ve kanserin nüksü arasındaki bağlantıda en önemli yolak anjiyogenezdır.

Bu faktörlerden en önemlisi vasküler endotel büyüme faktörüdür (VEGF). VEGF kanser hücrelerinden salınan en önemli pro-anjiyogenik faktördür. VEGF, hızlı ve tam bir anjiyogenik yanıtın oluşumunu indükleyen, endotel hücreler için potansiyel ve seçici bir mitojendir. İnsanda en baskın form VEGF-A'dır. VEGF-A, grup içerisinde en çok çalışılan ve tümörün tetiklediği anjiyogenez ile en çok ilişkilendirilen üyedir. VEGF ailesi üyelerinin ve bunların reseptörlerinin anjiyogeneзде merkezi ve önemli bir role sahip oldukları uzun zamandır bilinmektedir. VEGF birkaç normal hücre tipi tarafından üretilip salınsa da tümör hücrelerinde VEGF ekspresyonunun bariz şekilde arttığı gösterilmiştir. VEGF bilinen en iyi pro-anjiyogenik büyüme faktörüdür ve neoplastik anjiyogeneздеki en önemli faktör olduğu düşünülmektedir. Tümörün tetiklediği anjiyogeneз, hem tümör hücrelerinden hem de tümör stromasındaki hücreler tarafından sentezlenen VEGF'nin ekspresyonunun artışı ile ilişkilendirilmiştir (Jain 1987, Radisky vd 2001, Bouis vd 2006, Mravec vd 2008).

Ekstraselüler matriks (ECM)'i parçalayan enzimler uzun zamandan beri tümör progresyonu için gerekli görülmüştür. Tümör hücreleri, tümörü çevreleyen matriks engellerini yok eden enzimleri üretirler; bu enzimler bağ dokuları içine kan damarlarına girişi çıkışı ve uzak organlara metastaz yapmaya izin verir. Matriks metalloproteinazlar (MMP) bu faaliyetler için başlıca adaydır çünkü MMP aile üyeleri, ECM'nin tüm yapısal bileşenlerini topluca parçalamaktadır. Tümörle ilişkilendirilen en önemli üyesi MMP-9'dur. MMP-9 bazal membran tip IV kollajeni parçalar. Hem *in vitro* hem de *in vivo* tümör büyümesinde ekspresyonlarının arttığı bilinmektedir. Bununla birlikte, MMP-9'un miktarının artması pek çok tümörle ilişkilendirilmiştir ve kanserin invazyon ve metastazı ile korelasyon göstermektedir. MMP'ler tümör hücresinin invazyon ve migrasyonun belirleyicileridir. Bening tümörlerle karşılaştırıldığında malignant tümörlerde MMP ekspresyonlarının arttığı bilinmektedir. Bununla birlikte MMP-9 tümör büyümesi, invazyonu ve metastazı ile yakından ilişkilendirilmiş en önemli MMP'lerden birisidir (Cox vd 2000, Kast ve Halatsch 2012).

Bu nedenlerle, Metamizol'ün anjiyogenik etkisini belirlemek için seçtiğimiz diğer iki faktör de VEGF ve MMP-9'dur. Tez çalışmamızda, Metamizol'ün tümör hücrelerinden salınan VEGF ve MMP-9 miktarları üzerine bir etkisi olup olmadığı da araştırılmıştır.

Glioblastoma, beyin tümörlerinin en öldürücü olanıdır ve merkezi sinir sistemi kanserlerinin en sık rastlanılan formudur. Yaşam süresi oldukça kısa olan (<12 ay) Glioblastoma, klasik kemoterapi ve radyoterapi tedavilerine oldukça dirençlidir. Faklı organlara metastazı nadir olmakla birlikte, nüks oranı oldukça yüksektir. Bununla birlikte, Glioblastoma damarlanması en fazla olan tümörlerden birisidir. Tümörün damarlanması, düşük oksijen difüzyonu, kan-beyin bariyerinin bozulması, nitrik oksitin düşük geçirgenliği ve oksijen perfüzyonunu engelleyen genel nekroz gibi nedenlere bağlıdır (Bar vd 2007). Glioblastomada da görülen güçlü kan damarlarının oluşumunda, tümörün çekirdeğinde hipoksi oluşumuna bağlı olarak görülen endotel hücre çoğalması ile daha önce var olan damarlardan kapillerin oluşumu da rol oynamaktadır. Bu bağlamda, damarlaşmaya yani anjiyogeneze neden olan faktörlerin salınımı da büyük önem arz etmektedir (Das ve Marsden 2013). Bu nedenle Metamizol'ün kanser hücrelerinden salınan pro-anjiyogenik faktörler üzerine etkilerini araştırmak için İnsan Glioblastoma hücre hattı U-87 MG rol-model olarak seçilmiştir.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Hücreler ve Kültür Koşulları

Tez çalışması kapsamındaki tüm deneylerde ATCC'den temin edilen İnsan Glioblastoma hücre hattı U-87 MG (ATCC HTB-14) kullanıldı. Hücreler, %10 FBS ve %2 glutamin ile desteklenmiş DMEM (ATCC Kat No: 30-2006) besiyerinde çoğaltılarak, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37°C'de inkübe edildi. ATCC'nin önerdiği şekilde hücrelerin tripsinasyonu için %0,25 tripsin, %0,03 EDTA karışımı kullanıldı. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak pasajlama oranı 1:2 veya 1:3 olarak belirlendi. Hücreler %95 besiyeri ve %5 DMSO içeren “dondurma” besiyeri içerisinde kısa süreli olarak -80 °C derin dondurucuda uzun vadede sıvı azot tankları içerisinde saklandı.

#### 3.2. Besiyerlerinin Hazırlanması

##### 3.2.1. %10'luk FBS içeren DMEM besiyerinin hazırlanması

%10'luk FBS içeren DMEM besiyeri hazırlamak için 500 mL'lik besiyeri içerisine 50 mL FBS (Fetal Sığır Serum), 5 mL esansiyel olmayan amino asit solüsyonu, 10 mL L-Glutamin, 2,5 mL sodyum piruvat ve 1 mL antibiyotik çözeltisi ilave edilerek iyice karışması sağlandı. Üzerine o günün tarihi yazılarak +4°C'ye kaldırıldı.

##### 3.2.2. %1'lik FBS içeren DMEM besiyerinin hazırlanması

%1'lik FBS içeren DMEM besiyeri hazırlamak için 500 mL'lik besiyeri içerisine 5 mL FBS (Fetal Sığır Serum), 5 mL esansiyel olmayan amino asit solüsyonu, 10 mL L-Glutamin, 2,5 mL sodyum piruvat ve 1 mL antibiyotik çözeltisi ilave edilerek iyice karışması sağlandı. Üzerine o günün tarihi yazılarak +4°C'ye kaldırıldı.

##### 3.2.3. Dondurma besiyerinin hazırlanması

Dondurma besiyeri için 97,5 mL FBS'nin içine 2,5 mL DMSO (Dimetil sülfoksit) sıvısı eklenerek karıştırıldı ve +4°C'de muhafaza edildi.

#### 3.3. Novalgin'in Hazırlanması

Novalgin ticari olarak metamizol sodyum şeklinde enjeksiyona hazır formda satılmaktadır. İlaç içeriği; metamizol sodyum (1000 mg/2 mL) ve sudan oluşmaktadır. İlacın tek seferde enjekte edilen dozu 500 mg/mL'dir. Novalgin, ilacın besiyerindeki proteinlerle etkileşimini en aza indirebilmek için %1 serum içeren besi yerinde, en yüksek dozu 1000 µg/mL olacak şekilde, her seferinde ½ kez seyreltme yapılarak seri dilüsyon halinde hazırlandı ve hemen hücrelere uygulandı.

### 3.4. Hücrelerin Deneyler İçin Bölünmesi

#### 3.4.1. Hücrelerin tripsinasyonu

Petri kabını en az %70 oranında dolduran hücreler, hücre kültürü kabine alındı. Burada petri kaplarındaki besiyeri pipetör ile çekilerek atıldı. %0,25 tripsin, %0,03 EDTA karışımından büyük petriler (150x25 mm) için 4 mL küçük petriler (100x20 mm) için 2 mL eklendi. Mikroskop ile kontrol edilerek tüm hücrelerin kalkmaları beklendi. Kalkan hücreler %10'luk FBS içeren DMEM besiyeri ile falkon tüplere aktarıldı ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst kısımdaki supernatan atıldı. Dipte kalan hücre peleti diğer işlemler için kullanıldı.

#### 3.4.2. Hücrelerin proliferasyon deneyleri için 96-Kuyucuklu Plate'lere bölünmesi

Tripsinasyon işlemi ile santrifüj sonrası falkon tüpte elde edilen hücreler üzerine 10 mL %10'luk FBS içeren DMEM besiyeri eklenerek iyice karışması sağlandı. Daha sonra endorf tüpün içerisine 900 µL %10'luk DMEM besiyeri, 100 µL de içerisinde hücre bulunan besiyerinden eklenerek 10 kat sulandırıldı. Bu hücre karışımı Thoma lamında sayıldı. Dört tane 16 karenin bulunduğu Thoma lamında bu alanlardaki hücrelerin sayısının ortalaması alındı. Bu ortalama değer sulandırma katsayısı ve  $10^4$  ile çarpılarak mL'deki hücre sayısı elde edildi. Hücreler 96 kuyucuklu plaklara her kuyucuk başına  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde bölündü.

#### 3.4.3 Hücrelerin ELİZA deneyleri için 6-Kuyucuklu Plate'lere bölünmesi

Tripsinasyon işlemi ile santrifüj sonrası falkon tüpte elde edilen hücreler üzerine 10 mL %10'luk FBS içeren DMEM besiyeri eklenerek iyice karışması sağlandı. Daha sonra endorf tüpün içerisine 900 µL %10'luk DMEM besiyeri, 100 µL de içerisinde hücre bulunan besiyerinden eklenerek 10 kat sulandırıldı. Bu hücre karışımı Thoma lamında sayıldı. Dört tane 16 karenin bulunduğu Thoma lamında bu alanlardaki hücrelerin sayısının ortalaması alındı. Bu ortalama değer sulandırma katsayısı ve  $10^4$  ile çarpılarak mL'deki hücre sayısı elde edildi. Hücreler 6 kuyucuklu plaklara her kuyucuk başına  $2 \times 10^5$  hücre olacak şekilde bölündü.

### 3.5 Novalgin'in Kanser Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerine Etkileri

#### 3.5.1. İlaç uygulamaları

Novalgin'in kanser hücre hatları üzerindeki etkilerini inceleyen *in vitro* bir çalışma olmadığı için, U-87 MG hücrelerinin proliferasyonları üzerine etkisini belirlemek amacı ile öncelikle bir doz taraması yapıldı. Bu amaçla, hücreler 5.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara bölündü ve yapışmaları için 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin besiyerleri çekilerek her bir kuyucuğa farklı konsantrasyonlardaki (1000-100-50-25-12,5-10-1-0,1 µg/mL) Novalgin 100µl/kuyucuk olacak şekilde uygulandı.

### 3.5.2 Deneylerin sonlandırılması

Novalgin'in kanser hücrelerinin büyümesini üzerine etkisi olup olmadığı Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kat. No: CK04-11) kullanılarak belirlendi. Dojindo'nun yüksek oranda suda çözünen tetrazolyum tuzu, WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodyum tuzu] canlı hücrelerdeki dehidrogenaz aktiviteleriyle redüklenerek sarı renkli formazana dönüşür. Test sonucu ortaya çıkan renk yaşayan hücre sayısı ile doğru orantılıdır.

İlaç uygulamasının hemen arkasından, başlangıçtaki hücre sayısını belirlemek için başlangıç zamanı (Time Zero (T0)) okuması yapıldı. Bunun için T0 olarak belirlenen kuyucuklardaki besi yeri çekilerek yerine 90 µl serum içermeyen besi yeri koyuldu ve içerisine kit içerisindeki WST-8 solüsyonun'dan 10 µl eklendi. 4 saatlik inkübasyon süresi sonunda plate kapağı açılmadan absorbans değerleri Eliza kit okuyucuda 450 nm'de okundu. Bu okumanın ardından hücreler 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda inkübe edildi. Her bir inkübasyon süresi sonunda deneyler T0 okumasındaki gibi sonlandırıldı. Her biri kendi içinde 8 tekrarlı olmak üzere birbirinden bağımsız 4 farklı deney sonucu Instad 4.0 istatistik programında tek yönlü ANOVA Testi ve Dunnett Testi ile değerlendirilip, kontrol grubu (ilaç uygulanmamış grup) ile karşılaştırılarak yorumlandı.

## 3.6. Hücrelerden Besiyerine Salınan Pro-Anjiyogenik Faktörlerin Miktarının Belirlenmesi

### 3.6.1 İlaç uygulamaları

Pro-anjiyogenik faktörler üzerine Novalgin'in etkisinin belirlenebilmesi için, WST-8 testi sonuçlarına göre proliferasyonun inhibe edildiği en yüksek doz (1000 µg/mL) ve proliferasyonun inhibe edilmediği en yüksek 3 doz (25-12,5-1 µg/mL) seçildi.

Hücreler 200000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6-kuyucuklu plaklara bölündü ve yapışmaları için 24 saat inkübe edildi. Hücreler yapıştıktan sonra belirlenen dozlar (1000; 25; 12,5; ve 1 µg/ml) 2ml/kuyucuk olacak şekilde hücrelere uygulandı ve 24 ile 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süreleri sonunda besi yerleri toplanarak kit prosedürlerine uygun şekilde çalışıldı.

### 3.6.2. U-87 MG hücrelerinden besiyerine salınan Substance P miktarının belirlenmesi

U-87 MG glioblastoma hücrelerinden besiyerin salınan Substance P miktarları, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda Substance P EIA Kit (Cayman Chemical Kat. No: 583751) kullanılarak belirlenmiştir. Bu kit içerisinde bulunan fare monoklonal anti-tavşan IgG antikoruna kaplı 96 kuyucuklu plakalara her örnekten 50 µl eklendi. Örneklerin üzerine 50 µl belirteç (Substance P'ye bağlı asetilkolinesteraz) 50 µl antiserum (Substance P'ye özel antiserum) eklenerek plakanın üzeri kapatıldı ve +4 °C'de 1 gece inkübe edildi. Bütün kuyucuklara, 1:400 oranında ultra saf su ile seyreltilen ve içinde viskoz bir sıvı Polisorbat 20 (0,5mL/L) içeren yıkama tamponundan her kuyucuğa 200 µL koyulup çalkalanarak beş kez yıkandı. Sonra her

kuyucugun üzerine, kit içerisindeki Elman solusyonundan 200 µL eklenerek plaka'nın üzeri kapatıldı ve 2 saat karanlık ortamda çalkalayıcı ile inkübe edildi. Örneklerle ait absorbans değerleri eliza kit okuyucuda 420 nm dalga boyunda okundu.

### 3.6.3. U-87 MG hücrelerinden besiyerine salınan VEGF miktarının belirlenmesi

U-87 MG glioblastoma hücrelerinden besiyerin salınan VEGF miktarları, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda VEGF Human ELISA Kit ( BosterBio, Kat. No: EK0539) kullanılarak belirlenmiştir. Bu kit, hücre kültürü süpernatantlarında doğal ve rekombinant insan VEGF'nin kantitatif olarak belirlenmesini sağlamaktadır. Kit içerisinde VEGF'e özel monoklonal antikor ile kaplanmış 96 kuyucuklu plaklar bulunmaktadır. Belirlenen dozlarda Novalgin uygulaması yapılan deney gruplarından (25-12,5-1 µg/mL) ve kontrol gruplarından 100'er µL alınarak bu kuyucuklara eklendi. 37°C'de 90 dakika inkübe edildi. Örneklerin bulunduğu içerik atıldıktan sonra her bir kuyucuğa 100 µL biotinlenmiş VEGF antikoruna ilave edildi. 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sonrası her bir kuyucuk 300 µL PBS (Fosfat Tampon Tuzu) ile üç kez yıkandı. Her bir kuyucuğa Avidin-Biotin-Peroksidaz solüsyonu 100 µL eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra her bir kuyucuk 300 µL PBS ile beş kez yıkandı. Ardından 90 µL TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) renk değiştirici ajan eklenerek 37°C'de 20 dakika karanlık ortamda inkübe edildi. Süre sonunda kuyucuklara bağlanan VEGF'in miktarına bağlı olarak mavi renk oluşumu gözlemlendi. Durdurma solüsyonu (Sülfürik asit; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) eklendiğinde reaksiyona bağlı olarak maviden sarıya renk değişimi gözlemlendi. Örneklerdeki VEGF miktarlarına ait absorbans değerleri eliza kit okuyucuda 450 nm'de okundu.

### 3.6.4. U-87 MG hücrelerinden besiyerine salınan MMP-9 miktarının belirlenmesi

U-87 MG glioblastoma hücrelerinden besiyerin salınan MMP-9 miktarları, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda Human MMP-9 ELISA Kit (BioLegend Kat. No: 440707) kullanılarak belirlenmiştir. Bu kit hücre kültürü süpernatantlarında MMP-9'un hem pro hem de aktif formunun kantitatif olarak belirlenmesini sağlamaktadır. Kit içerisinde MMP-9'a özel monoklonal antikor ile kaplanmış 96 kuyucuklu plate vardır. Deneye başlamadan önce her bir kuyucuk dört kez 300 µL 1x yıkama tamponu (Tween 20 ve PBS karışımı) ile yıkandı. Deney ve kontrol gruplarını içerecek her bir kuyucuğa 50 µL Test Tamponu B eklendi. Belirlenen dozlarda Novalgin uygulaması yapılan deney gruplarından (25-12,5-1 µg/mL) ve kontrol gruplarından 50'şer µL alınarak bu kuyucuklara eklendi. İki saat oda sıcaklığında 200 rpm'de çalkalayıcıda inkübe edildi. Her bir kuyucuk dört kez 300 µL 1x yıkama tamponu ile yıkandı. Daha sonra her kuyucuğa 100 µL İnsan MMP-9 Antikoru üzerine ilave edildi. Bir saat oda sıcaklığında çalkalayıcı ile inkübasyona bırakıldı. Her bir kuyucuk dört kez 300 µL 1x yıkama tamponu ile yıkandı. Her kuyucuğa 100 µL Avidin-HRP A (Avidin Yabanturpu Peroksidaz A) solüsyonu eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı ile inkübe edildi. Her bir kuyucuk beş kez 300 µL 1x yıkama tamponu ile yıkandı. Her bir kuyucuğa 100 µL Substrat F (yüksek hassasiyetli TMB) solüsyonunun eklenerek 10 dakika oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edildi. Sonrasında kuyucuklara bağlanan MMP-9'un miktarına bağlı olarak mavi renk oluşumu gözlemlendi. Her kuyucuğa 100 µL durdurma solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve renk maviden sarıya döndü. Örneklerle ait absorbans değerleri Eliza kit okuyucuda 450 nm'de okundu.

### 3.7. İstatiksel Analizler

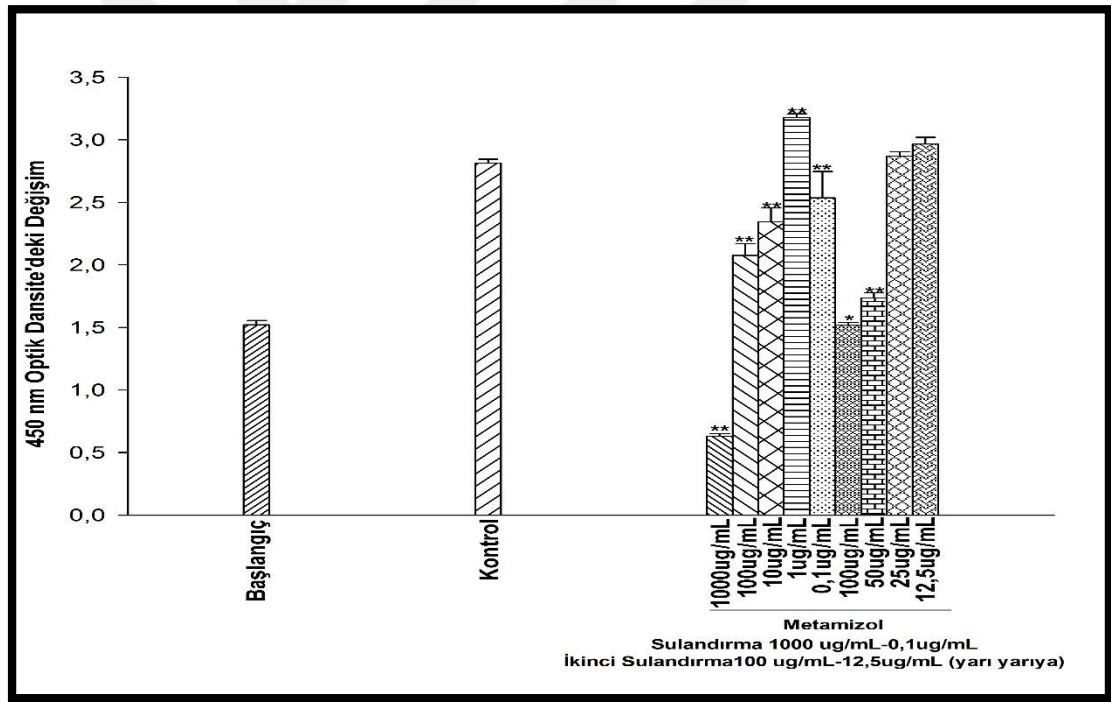
Çalışmadan elde edilen veriler kullanılarak grup içi değerlendirmeler için Dunnett's Multiple Comparison post-test, gruplar arası değişimlerin değerlendirilmesi için ise Tukey-Kramer multiple comparison test, the Student's paired t-test ve ANOVA testleri kullanıldı ( $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi). Elde edilen sonuçlar Sigma Plot 10.0 (SPSS Inc., USA) programı ile grafiklendirildi.



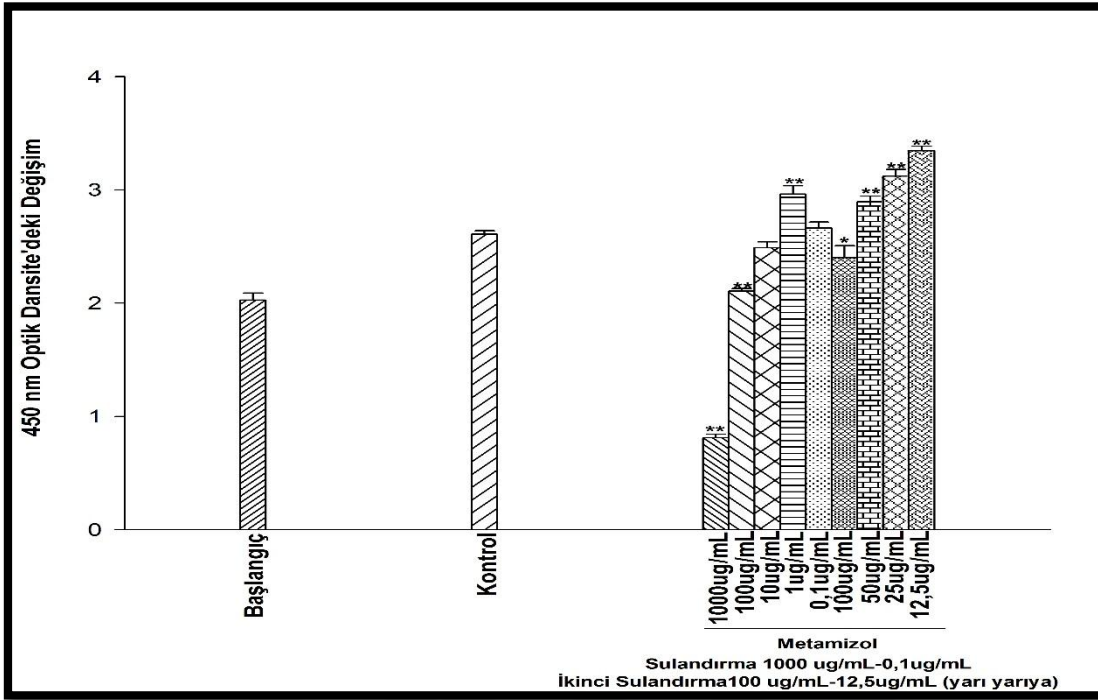
#### 4. BULGULAR

##### 4.1. Metamizol'ün U-87 MG Hücre Hattı Üzerine Gösterdiği Sitotoksik ve Proliferatif Etkiler

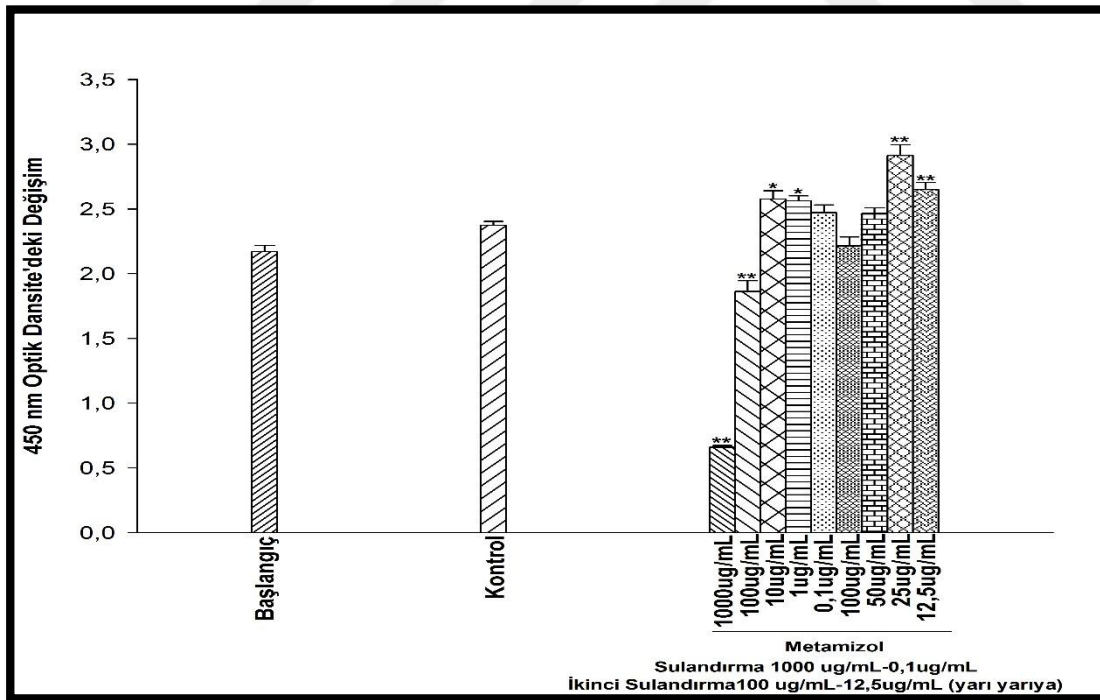
Kendi içerisinde sekiz tekrar ve birbirinden bağımsız dört deney seti halinde gerçekleştirilen başlangıç doz tarama çalışmalarında, metamizol U-87 MG hücreleri üzerine her bir inkübasyon süresi için farklı dozlarda sitotoksik ve proliferatif etkiler gösterdi. 1000 µg/mL ve 100 µg/mL metamizol uygulaması 24, 48, 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda U-87 MG hücreleri üzerinde sitotoksik bir etki göstermiştir (\*\*,  $p<0.01$ ). 1 µg/mL, 12,5 µg/mL ve 25 µg/mL metamizol uygulaması ise 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda U-87 MG hücre proliferasyonu artırıcı bir etki göstermiştir (\*\*,  $p<0.01$ ). 10 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL ve 50 µg/mL metamizol uygulanan hücrelerde 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda proliferasyon istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde artmıştır (\*\*,  $p<0.01$ ; \*,  $p<0.05$ ). Metamizol'ün, farklı dozlarda üç inkübasyon süresi sonunda U-87 MG hücreleri üzerindeki etkileri aşağıdaki grafiklerde sunulmuştur (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12).



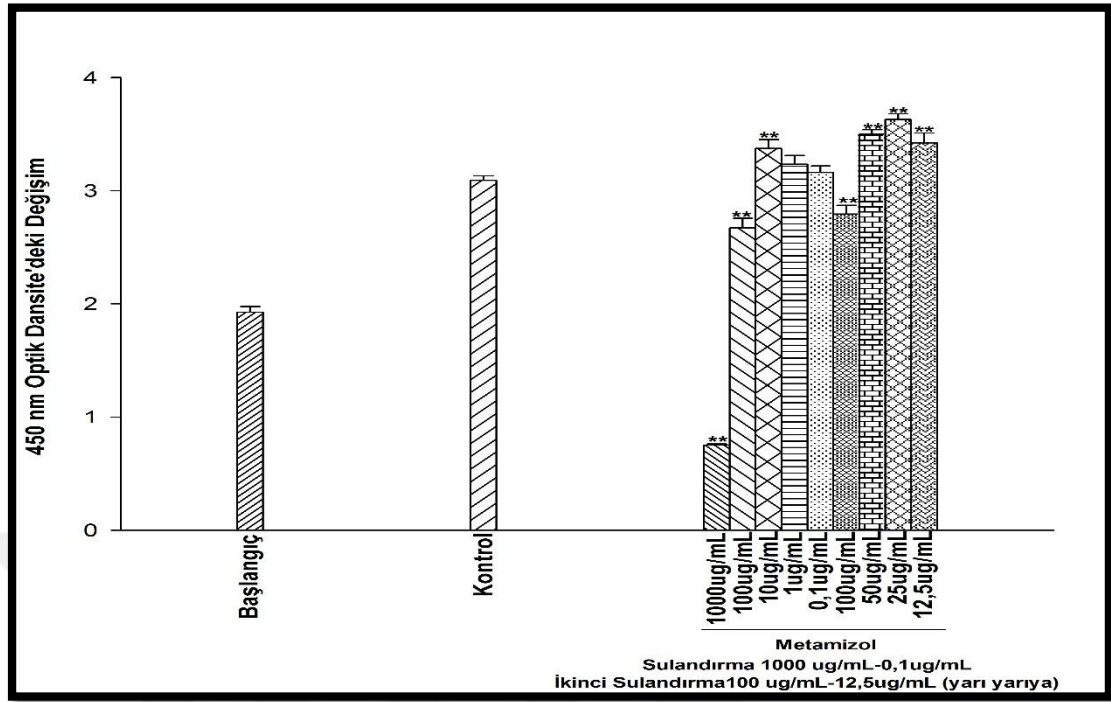
Şekil 4.1. Metamizol'ün 1. Set 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi (\*\*,  $p<0.01$ ; \*,  $p<0.05$  kontrole kıyasla).



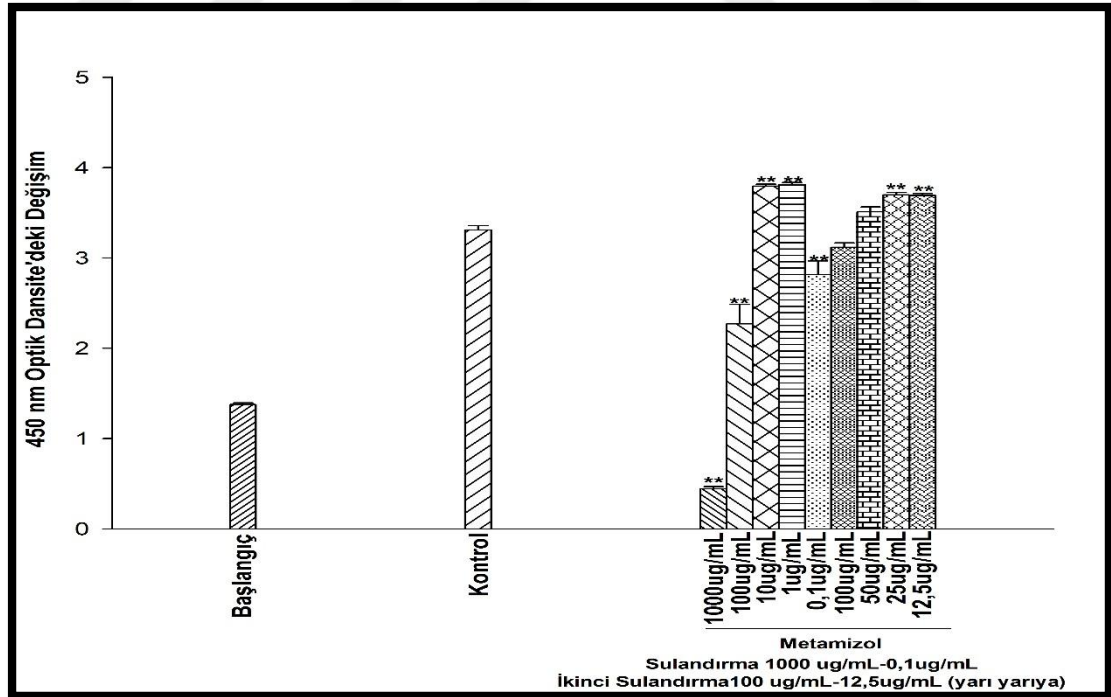
Şekil 4.2. Metamizol'ün 2. Set 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi (\*\*,  $p<0.01$ ; \*,  $p<0.05$  kontrole kıyasla).



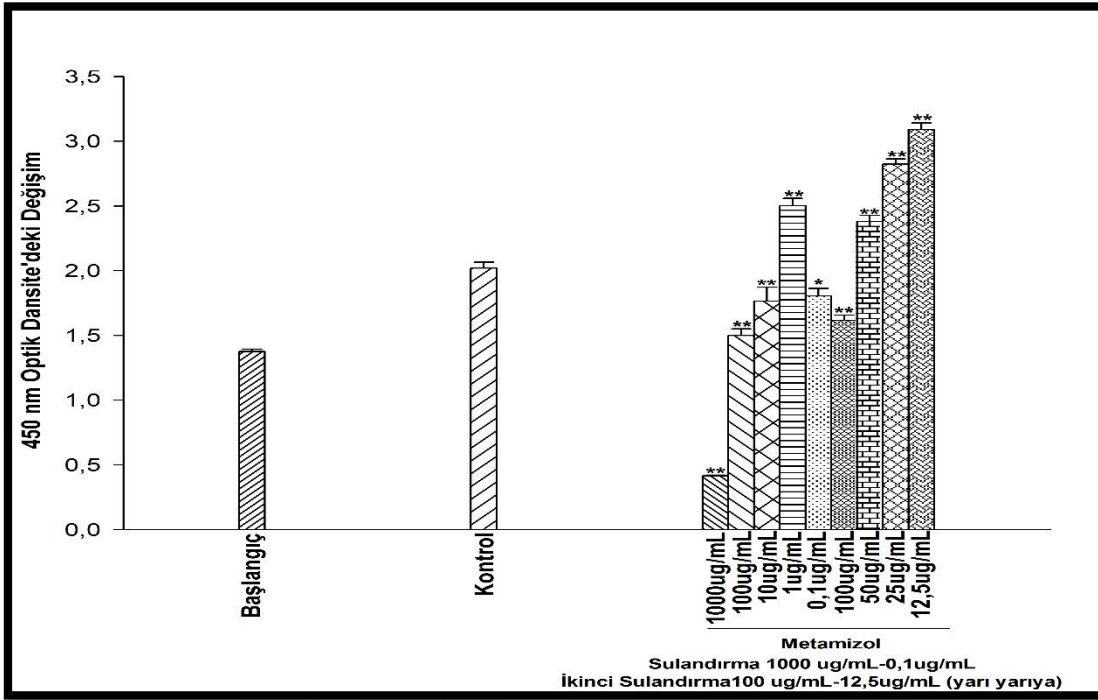
Şekil 4.3. Metamizol'ün 3. Set 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi (\*\*,  $p<0.01$ ; \*,  $p<0.05$  kontrole kıyasla).



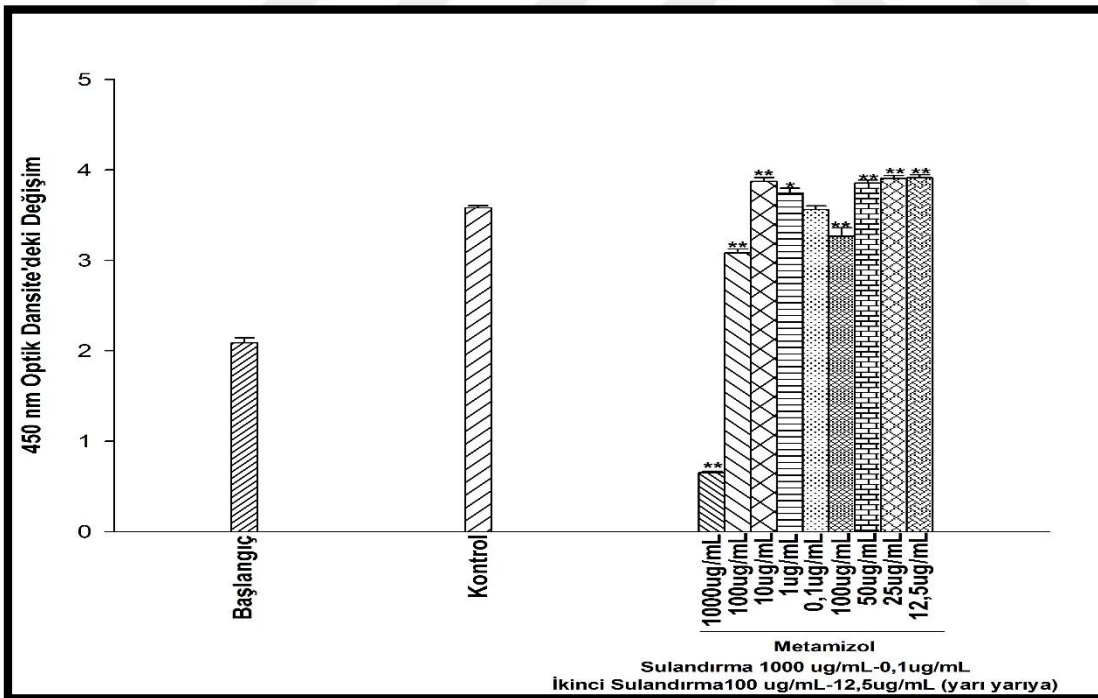
Şekil 4.4. Metamizol'ün 4. Set 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi (\*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$  kontrole kıyasla).



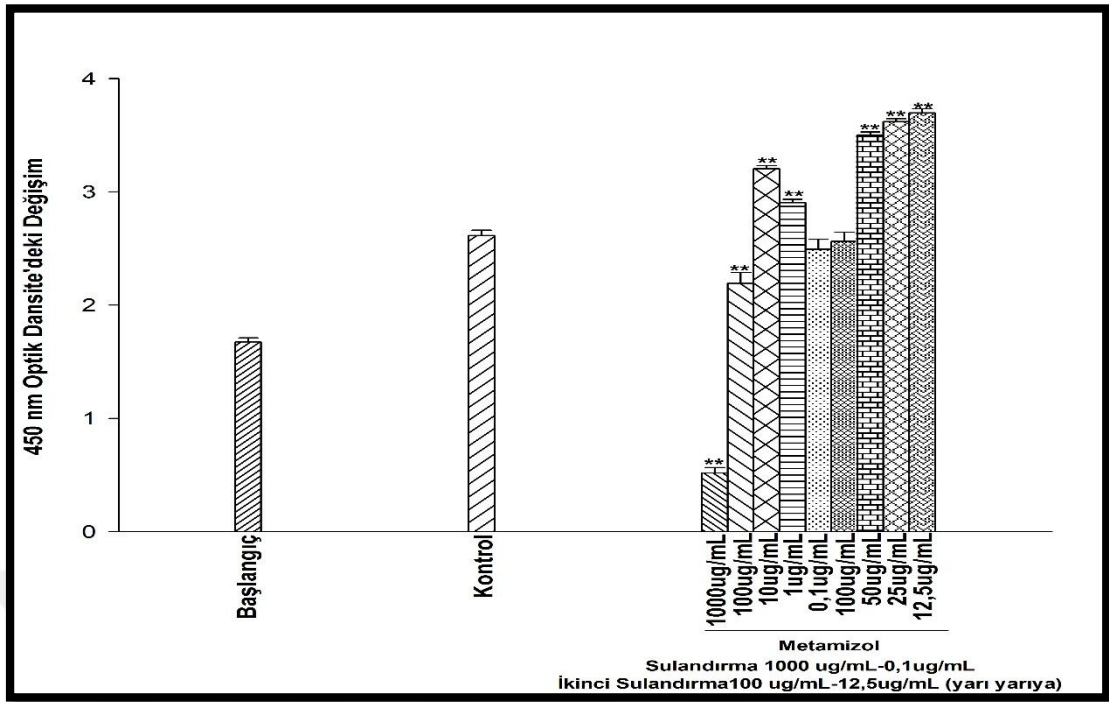
Şekil 4.5. Metamizol'ün 1. Set 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi (\*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$  kontrole kıyasla).



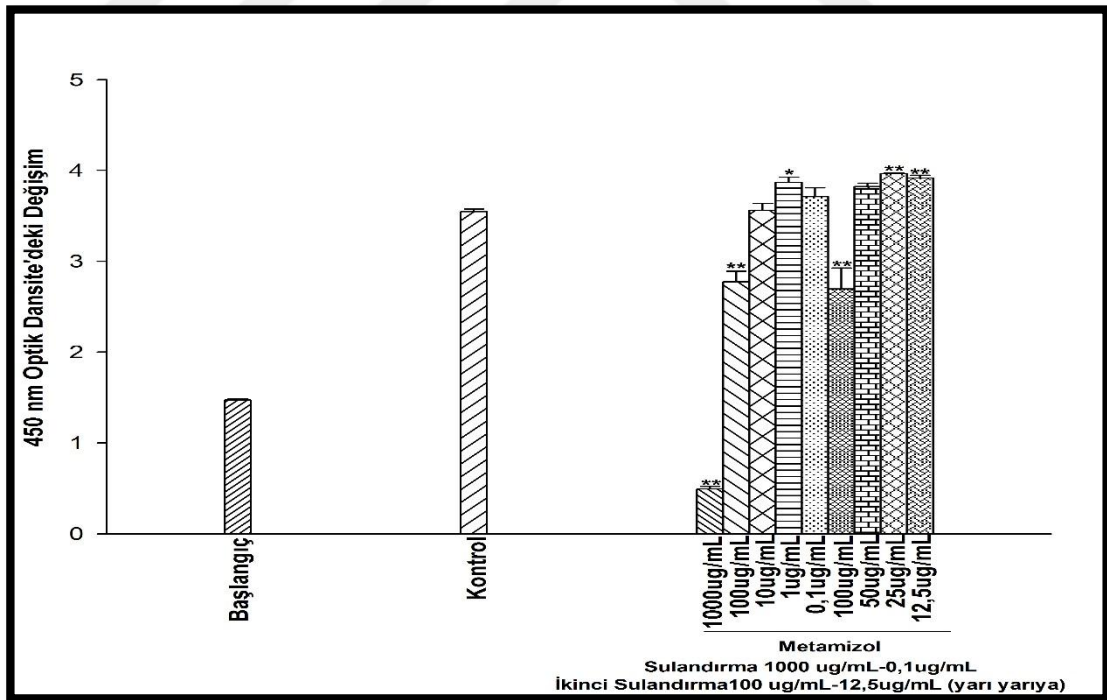
Şekil 4.6. Metamizol'ün 2. Set 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi (\*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$  kontrole kıyasla).



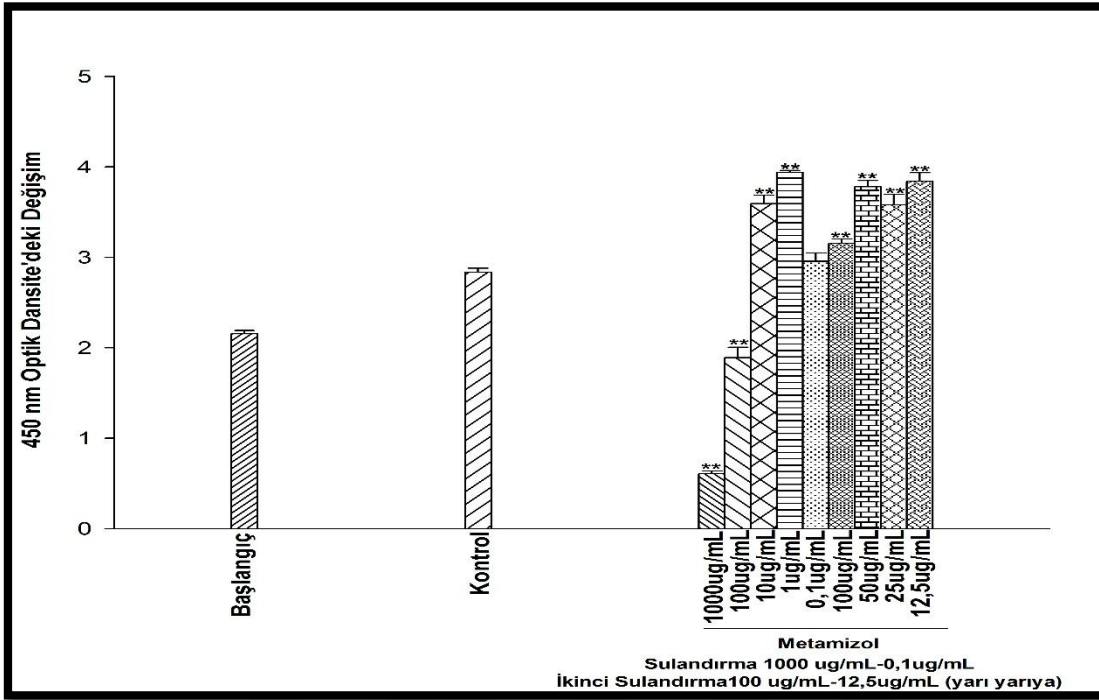
Şekil 4.7. Metamizol'ün 3. Set 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi (\*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$  kontrole kıyasla).



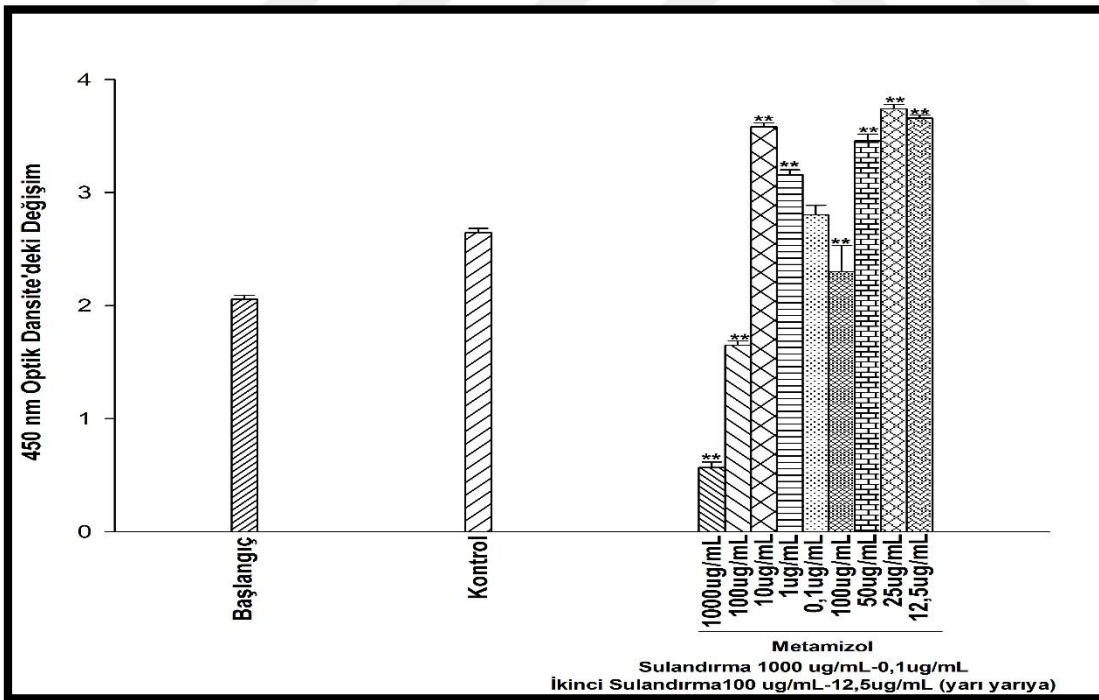
Şekil 4.8. Metamizol'ün 4. Set 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi (\*\*,  $p<0.01$ ; \*,  $p<0.05$  kontrole kıyasla).



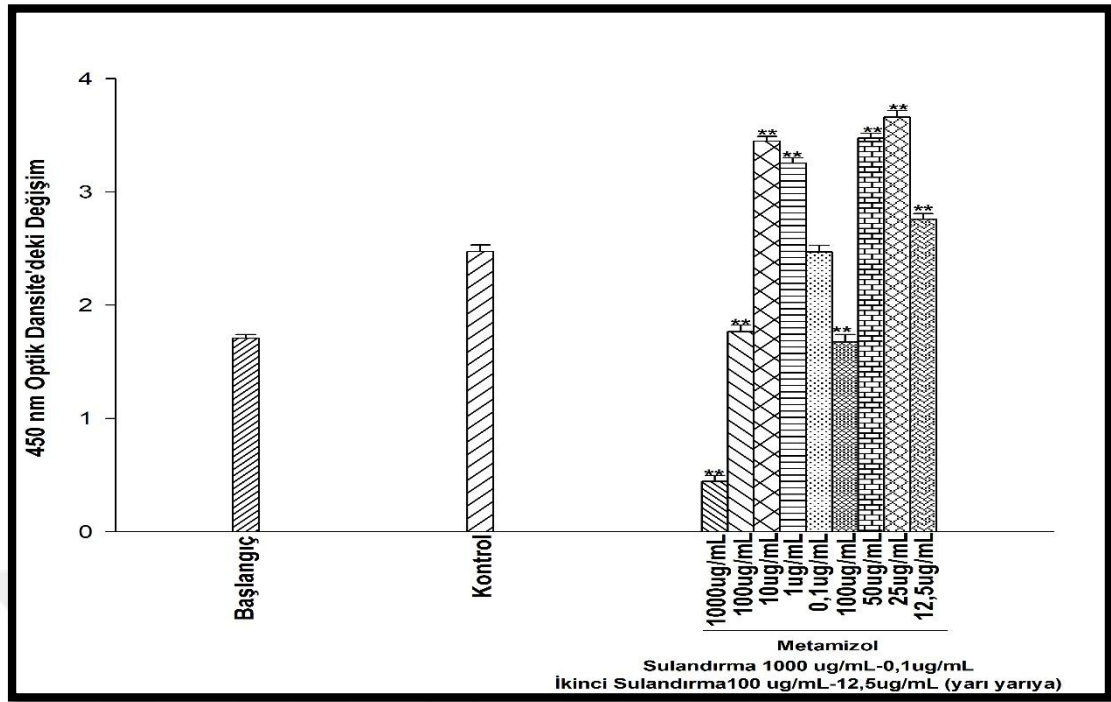
Şekil 4.9. Metamizol'ün 1. Set 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi (\*\*,  $p<0.01$ ; \*,  $p<0.05$  kontrole kıyasla).



Şekil 4.10. Metamizol'ün 2. Set 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi (\*\*,  $p<0.01$ ; \*,  $p<0.05$  kontrole kıyasla).



Şekil 4.11. Metamizol'ün 3. Set 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi (\*\*,  $p<0.01$ ; \*,  $p<0.05$  kontrole kıyasla).



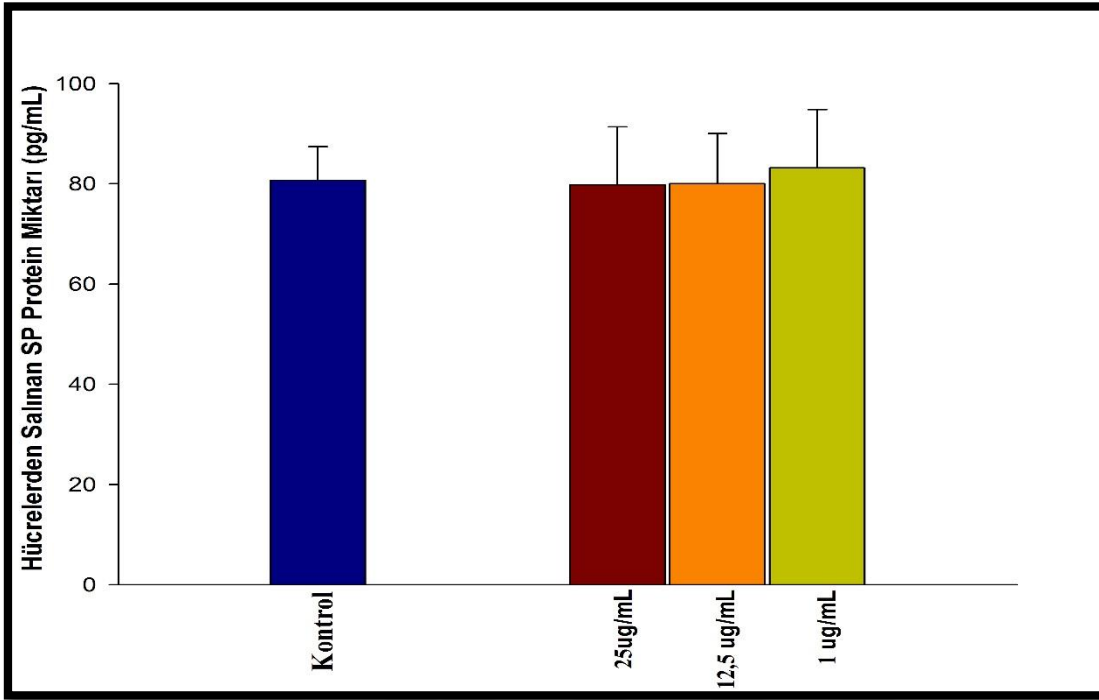
Şekil 4.12. Metamizol'ün 4. Set 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, U-87 MG hücre viabilitesindeki değişikliğe etkisi (\*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$  kontrole kıyasla).

Deney sonuçlarına göre, metamizol'ün 1  $\mu\text{g/mL}$ , 12,5  $\mu\text{g/mL}$  ve 25  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonlarında U-87 MG hücre hattı üzerine zaman bağlı olarak proliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle metamizol'ün 1  $\mu\text{g/mL}$ , 12,5  $\mu\text{g/mL}$  ve 25  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonları için Substance P, MMP-9 ve VEGF elisa kitlerinin çalışılmasına karar verilmiştir.

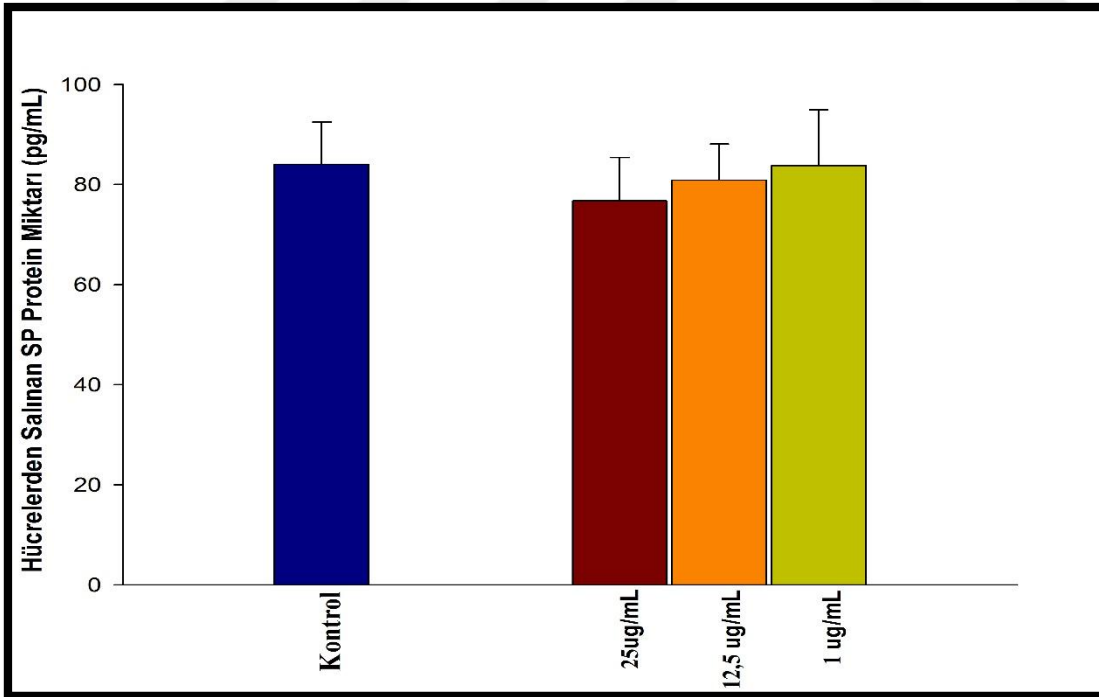
#### 4.2. Metamizol'ün U-87 MG Hücrelerinden Salınan Substance P Miktarı Üzerine Etkisi

24 saat inkübasyon süresi sonunda, 25  $\mu\text{g/mL}$  metamizol uygulanan U-87 MG hücrelerinde Substance P miktarında 1.00 kat artış gözlenirken, 1  $\mu\text{g/mL}$  metamizol uygulanan U-87 MG hücre hattında 1.03 kat artış gözlemlendi. ( $p > 0.05$ ). 12,5  $\mu\text{g/mL}$  metamizol uygulamasının U-87 MG hücrelerinden salınan Substance P miktarı üzerine bir etkisi yoktur. Benzer şekilde, 25  $\mu\text{g/mL}$  ve 1  $\mu\text{g/mL}$  metamizol uygulaması 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda U-87 MG hücrelerinden salınan Substance P miktarı üzerinde istatistiksel anlamda önemli bir etki göstermemiştir.

48 saat inkübasyon süresi sonunda da 25  $\mu\text{g/mL}$ , 12,5  $\mu\text{g/mL}$  ve 1  $\mu\text{g/mL}$  metamizol uygulanan U-87 MG hücrelerinde besiyerine salınan Substance P miktarında istatistiksel anlamda önemli bir değişiklik görülmemiştir. Sonuçlar Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'de sunulmuştur.



Şekil 4.13. 24 saat inkübasyon sonunda 25  $\mu\text{g/mL}$ , 12,5  $\mu\text{g/mL}$  ve 1  $\mu\text{g/mL}$  metamizol'ün U-87 MG hücrelerinden salınan Substance P miktarı üzerine etkisi.

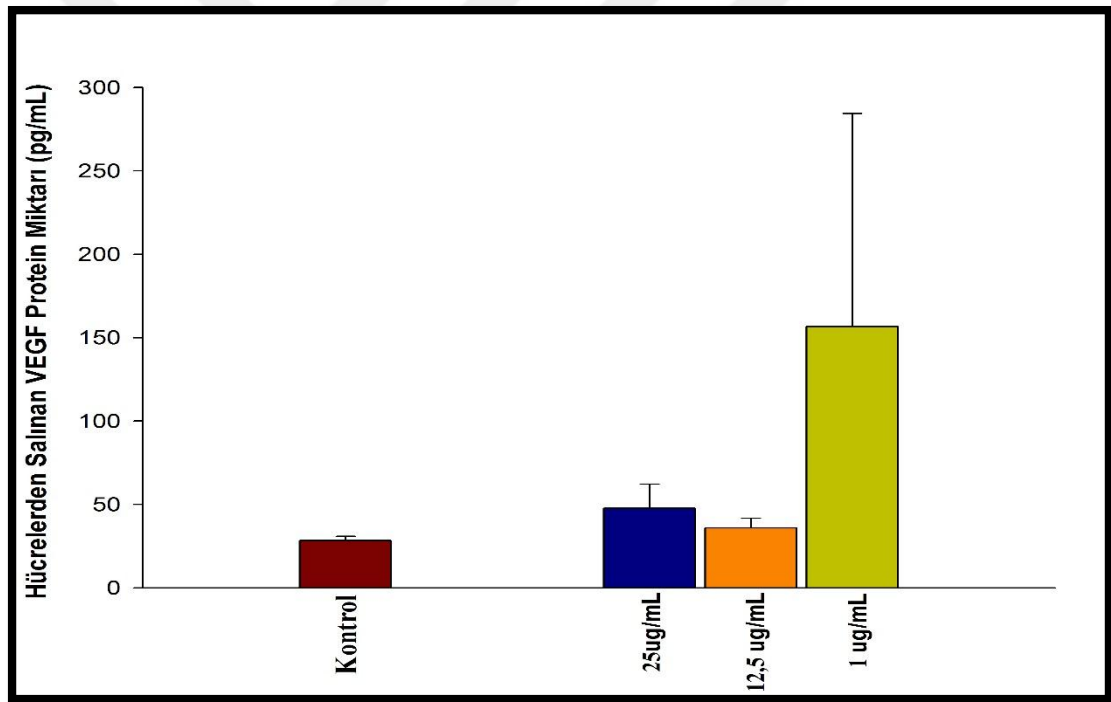


Şekil 4.14. 48 saat inkübasyon sonunda 25  $\mu\text{g/mL}$ , 12,5  $\mu\text{g/mL}$  ve 1  $\mu\text{g/mL}$  metamizol'ün U-87 MG hücrelerinde salınan Substance P miktarı üzerine etkisi.

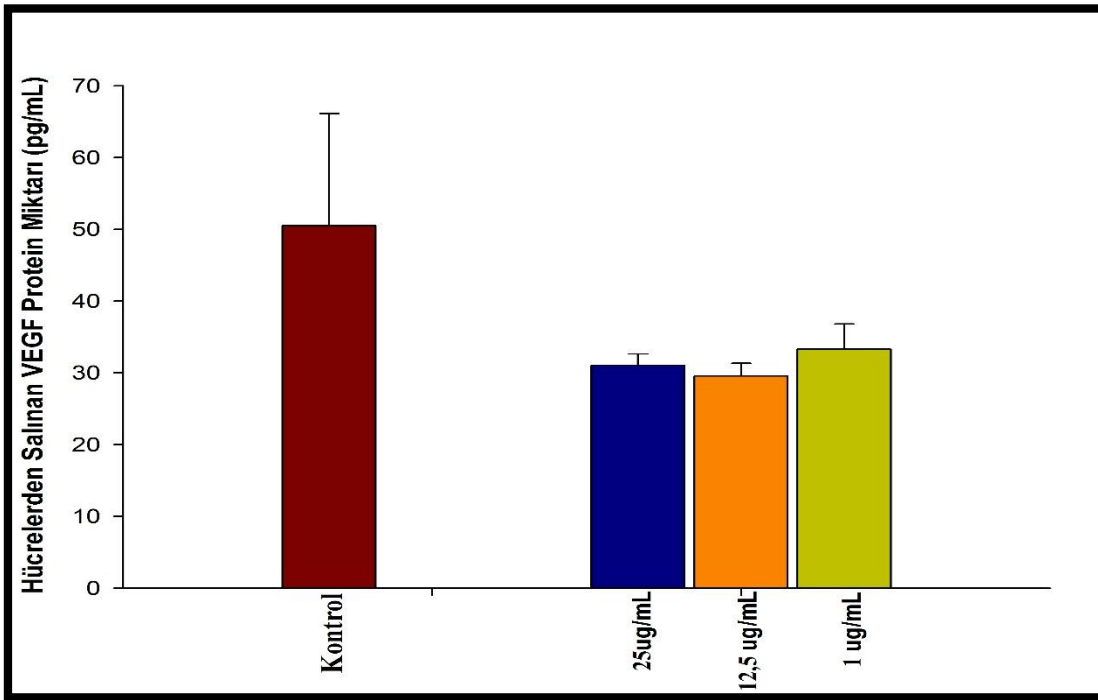
#### 4.3. Metamizol'ün U-87 MG Hücrelerinden Salınan VEGF Miktarı Üzerindeki Etkisi

24 saat inkübasyon süresi sonunda 25 µg/mL metamizol uygulanan U-87 MG hücre hattında, VEGF miktarında 1.68 kat artış gözlenirken ( $p > 0.05$ ), 12,5 µg/mL metamizol uygulanan U-87 MG hücre hattında 1.27 kat artış gözlemlendi ( $p > 0.05$ ). 1 µg/mL metamizol uygulanan U-87 MG hücre hattında ise VEGF miktarında, 4.12 kat artış gözlemlendi; fakat bu artış istatistik anlamda önemli değildir ( $p > 0.05$ ). Bunun nedeni ise 1 µg/mL metamizol uygulanan U-87 MG hücrelerinin besiyeri ortamına saldığı VEGF miktarı çalışılırken tek bir kuyucukta yüksek oranda absorbans değeri tespit edilmesinden kaynaklanmaktadır. Metamizol'ün U-87 MG hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda VEGF miktarı üzerindeki etkisi Şekil 4.15' de gösterilmiştir.

48 saat inkübasyon süresi sonunda 25 µg/mL 12,5 µg/mL ve 1 µg/mL metamizol uygulanan U-87 MG hücre hattında, VEGF miktarında kontrol grubuna oranla artış görülmedi. Metamizol'ün U-87 MG hücre hattında, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda VEGF miktarı üzerindeki etkisi Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.15. 24 saat inkübasyon sonunda 25 µg/mL, 12,5 µg/mL ve 1 µg/mL metamizol'ün U-87 MG hücrelerinden salınan VEGF miktarı üzerine etkisi.

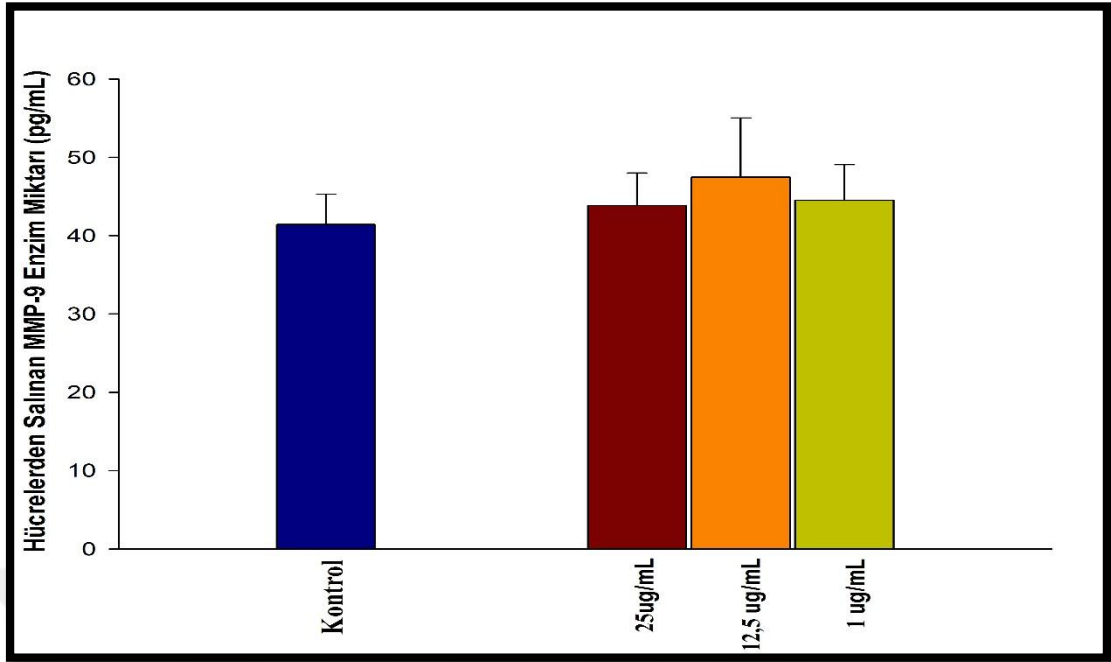


Şekil 4.16. 48 saat inkübasyon sonunda 25 µg/mL, 12,5 µg/mL ve 1 µg/mL metamizol'ün U-87 MG hücrelerinden salınan VEGF miktarı üzerine etkisi.

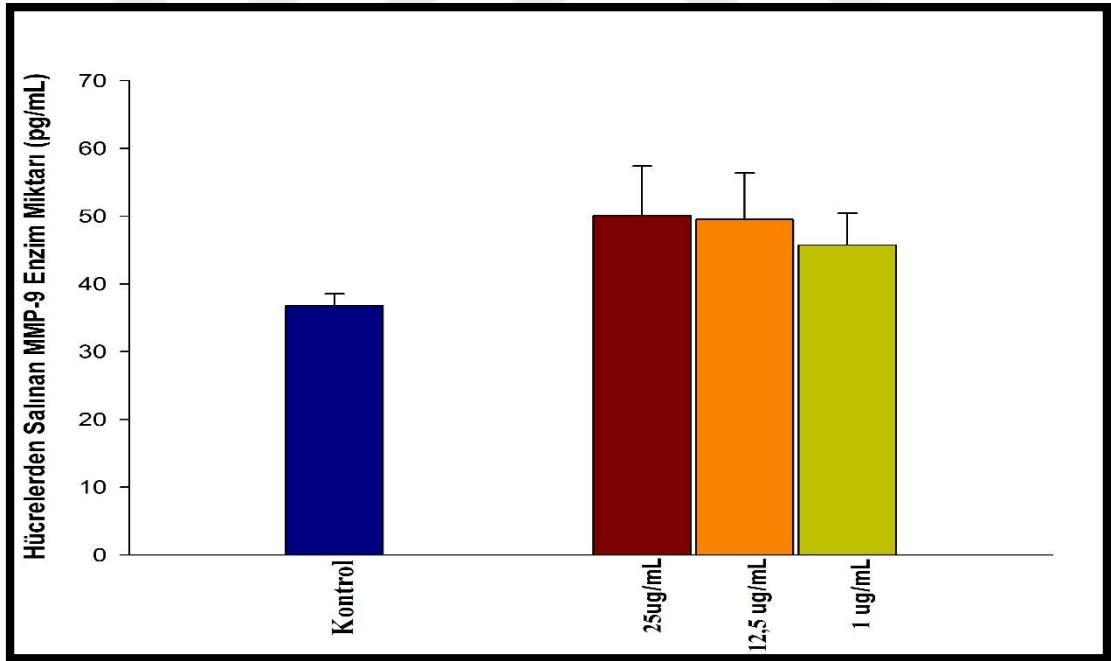
#### 4.4. Metamizol'ün U-87 MG Hücrelerinde MMP-9 Enzimi Üzerindeki Etkisi

24 saat inkübasyon süresi sonunda 25 µg/mL metamizol uygulanan U-87 MG hücrelerinden besiyerine salınan MMP-9 miktarında 1.06 kat artış gözlenirken ( $p > 0.05$ ), 12,5 µg/mL metamizol uygulanan U-87 MG hücrelerinden salınan MMP-9 miktarı kontrol grubuna oranla 1.14 kat artmıştır ( $p > 0.05$ ). 1 µg/mL metamizol uygulanan U-87 MG hücrelerinde ise salınan MMP-9 miktarında 1.07 kat artış gözlemlendi ( $p > 0.05$ ). Metamizol'ün U-87 MG hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda MMP-9 miktarı üzerindeki etkileri Şekil 4.17'de gösterilmiştir.

48 saat inkübasyon süresi sonunda 25 µg/mL ve 12,5 µg/mL metamizol uygulanan U-87 MG hücrelerinden salınan MMP-9 miktarlarında sırasıyla 1.35 ve 1.34 kat artış gözlemlendi ( $p > 0.05$ ). 1 µg/mL metamizol uygulaması ise MMP-9 salınımını 1.24 kat artırmıştır ( $p > 0.05$ ). Metamizol'ün U-87 MG hücrelerinden 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda besiyerine salınan MMP-9 miktarı üzerindeki etkileri Şekil 4.18'de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. 24 saat inkübasyon sonunda 25  $\mu\text{g/mL}$ , 12,5  $\mu\text{g/mL}$  ve 1  $\mu\text{g/mL}$  metamizol'ün U-87 MG hücrelerinden salınan MMP-9 enzim miktarı üzerine etkisi.



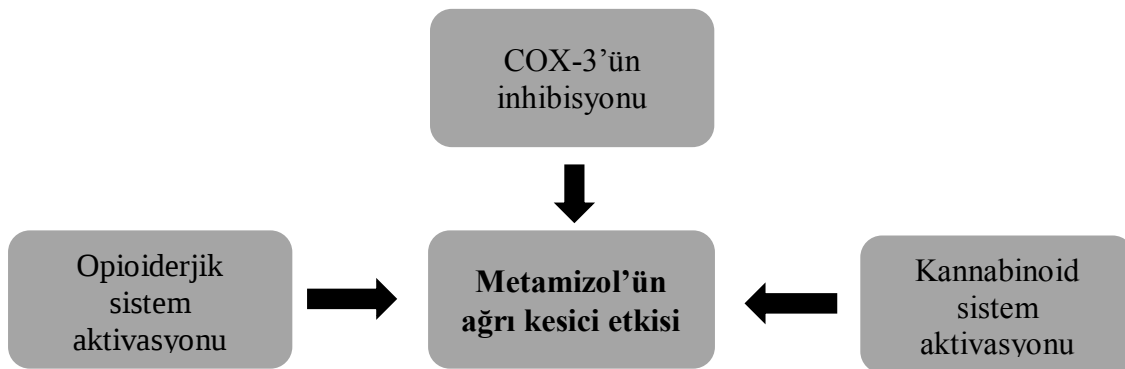
Şekil 4.18. 48 saat inkübasyon sonunda 25  $\mu\text{g/mL}$ , 12,5  $\mu\text{g/mL}$  ve 1  $\mu\text{g/mL}$  metamizol'ün U-87 MG hücrelerinden salınan MMP-9 enzim miktarı üzerine etkisi.

## 5. TARTIŞMA

Metamizol hekimlikte kullanılan en güçlü opioid olmayan ağrı kesicilerden birisidir (Baumgartner vd 2009). Her ne kadar metamizol opioid olmayan ağrı kesici olarak sınıflandırılrsa da yıllardır steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaçlara ait olduğu iddia edilmiştir (Vazquez vd 2005, Batu ve Erol 2007, Lopez-Munoz vd 2008, Smith vd 2008, Dominguez-Ramirez vd 2010, Chaparro vd 2012, Escobar vd 2012). Bugün ki bilgiler ışığında NSAID'lerin aksine, metamizolun etki mekanizmasında merkezi bir siklooksijenaz-3 (COX-3)'ün inhibisyonu olduğu düşünülmektedir (Chandrasekharan vd 2002, Munoz vd 2010).

Metamizolün farmakokinetik özelliklerini tartışırken, aslında metabolitlerinin özellikleri kastedilmektedir; çünkü metamizol sulu bir ortamda çok sayıda metabolik ürüne rastgele parçalanan bir ön ilaçtır (Vlahov vd 1990, Levy vd 1995). Bu metabolitler arasında 4-metilaminoantipirin (MAA), 4-formilaminoantipirin (FAA), 4-aminoantipirin (AA) ve 4-asetilaminoantipirin (AAA) bulunmaktadır (Vlahov vd 1990, Levy vd 1995, Rogosch vd 2012). MAA, AA, FAA, AAA metabolitlerinin kan-beyin bariyerini geçebildikleri ve plazmadan daha düşük konsantrasyonlarda olsalar da, beyin-omurilik sıvısında terapötik bir etki oluşturabilecek kadar yüksek olduğu bilinmektedir (Cohen vd 1998).

Metamizol 90 yıldan beri başarıyla kullanılmasına rağmen, etki mekanizması tamamen aydınlatılamamıştır. Uzun bir süre metamizol, seçici olmayan bir COX-1 ve COX-2 inhibitörü olarak düşünülmüştür (Hinz vd 2007, Pierre vd 2007, Rogosch vd 2012). Şekil 5.1'de metamizol'ün tahmin edilen etki mekanizması verilmiştir. Muhtemelen metamizol'ün ağrı kesici etkisi hem COX-3'ün hem de opioidderjik sistem ve kanabinoid sistem üzerindeki etkisiyle sağlanmaktadır.



Şekil 5.1. Metamizol'ün muhtemel ağrı kesicisi mekanizması (Jasiecka vd 2014).

Mevcut çalışmalara göre, metamizol COX-3'ü bloke ederek ağrı kesici olarak işlev görür. Chandrasekharan vd (2002) köpek beyinlerinde asetaminofen, fenasetin veya antipirin gibi metamizolün de COX-3 aktivitesinde önleyici bir etkisi olduğu sonucuna varmışlardır. COX-3, esasen merkezi sinir sisteminde görülen COX-1'in bir

varyantıdır. COX-3'ün engellenmesi, prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) sentezinde bir azalmaya yol açar. Merkezi sinir sisteminde PGE<sub>2</sub> sentezinin bloke edilmesinin bir sonucu olarak, nosiseptörlerin (diğer bir deyişle periferik ağrı reseptörlerinin) ağrıya olan duyarlılığı azalır. Böylece ağrı reseptörlerinin uyarılabilme özelliği azalır ve analjezik bir etki elde edilir (Chandrasekharan vd 2002, Schug and Manopas 2007, Munoz vd 2010).

PGE<sub>2</sub> sentezinin inhibisyonuna bakılmaksızın, diğer mekanizmalar metamizolün ağrı kesici etkisinin oluşumunda rol oynar. Ağrı duyusunun düzenlenmesinde önemli rol aldığı tahmin edilen kannabinoid sistem bu mekanizmalardan birisidir. Rogosch vd (2012), metamizolün aktif metabolitlerinin, yani MAA ve AA'nın araşidonoil amidlerinin tip 1 (CB1) kannabinoid alıcılarına karşı agonistik olduğunu belirlemiştir. CB1 reseptörlerinin aktivasyonunun periağuduktal gri cevherde (PAG) GABAerjik transmisyonu azalttığı iyi bilinmektedir. Escobar vd (2012), kannabinoid sistemin metamizolün analjezik mekanizmasına olan katkısını çalışmalarında göstermişlerdir.

Metamizol analjezik etkisinin ortaya çıkması ile ilgili en olası üçüncü mekanizma endojen opioidergik sistemin aktivasyonudur. Tortorici ve Vanegas (2000) yaptıkları çalışmada, metamizolün PAG mikroenjeksiyonunun uyanık sıçanlarda antinosisepsiyon oluşturduğunu ve tekrar tekrar uygulandığında metamizol toleransı ve morfine çapraz tolerans (PAG, opioidergik analjezinin ana alanıdır) başlattığını gösterdiler. Ayrıca, bu araştırmacılar, PAG ile mikroenjeksiyon yapılan metamizol'ün etkileri aynı bölgede nalokson (bir opioidergik reseptör antagonisti)'un mikroenjeksiyonu ile azaldığından, bu etkilerin lokal endojen opioidlerle ilişkili olması gerektiğini öne sürdüler. Bu çalışmayı Vazquez vd (2005) sıçan PAG'sine uygulanan nalokson'un sistematik olarak uygulanmış metamizol'ün antinosiseptif etkisini ortadan kaldırdığını göstererek desteklemiştir.

NSAID'ler, fosfolipaz A<sub>2</sub>'nin etkisi ile plazma membranından salınan araşidonik asitten prostaglandinlerin sentezlenmesinde önemli bir rol oynayan COX enzimlerini inhibe eder. COX'un siklooksijenaz aktivitesi ile başlayan süreçte PGE<sub>2</sub>'nin oluşumu tamamlanır. PGE<sub>2</sub>, sadece iltihaplanma ve bağışıklık modülasyonu gibi süreçler aktivite göstermez aynı zamanda kanser de hücre çoğalması, hayatta kalma ve anjiyogenez gibi süreçlerde de rol alır. COX hem temel, housekeeping bir enzim (COX-1) olarak hem de inflamatuvar ve tümörjenik düzenlemeyi indükleyen bir enzim (COX-2) olarak iki ayrı formda bulunur. COX-2 seviyeleri kolorektal karsinomaların çoğunda yükselir ve COX-2'nin anormal ekspresyonu PGE<sub>2</sub>'de bir artışa neden olur. NSAID'lerin çoğunluğu COX-2'yi inhibe eder (veya PGE<sub>2</sub> sentezini azaltır). Bununla birlikte, bazı NSAID'ler aslında COX-2 ekspresyonunu indükleyebilir (PGE<sub>2</sub> sentezinin artışı). Bu nedenle, NSAID'lerin kanserdeki rolü tam olarak açık değildir (Paik vd 2000).

PGE<sub>2</sub> sinyalizasyonunu hücrelere proliferasyon etkileri kısmen hücreleri progenitör benzeri bir durumda muhafaza eden birkaç anahtar transkripsiyon faktörünün up regülasyonu ile sağlanır. PGE<sub>2</sub> ile indüklenen TCF4 (Transkripsiyon Faktör-4) transkripsiyonunun hedefleri, çoğu hücre büyümesi ve proliferasyonunun iyi bilinen mediatörleri olan c-myc, cyclin D1 ve c-jun'u içerir. COX-2 / PGE<sub>2</sub> sinyali ile aktive olan HIF1 (Hipoksi İndükleyici Faktör 1), tümörler içinde kan damarı oluşumunu teşvik eden ve böylelikle büyümelerini sürdüren anjiyogenik faktörleri, VEGF'yi ve bFGF'yi (Temel Fibroblast Büyüme Faktörü) up regüle edebilir; buna karşın NSAID'ler COX-2 /

PGE2 kaynaklı transkripsiyonu inhibe eder. Ayrıca, COX-2/PGE2, her ikisi de anjiyogenezi uyarmak için işlev gören VEGF ve bFGF ile indüklenen CXCR4 (kemokin reseptör-4) ve CXCL-1 (kemokin (C-X-C motif) ligand 1) ekspresyonunu artırır. Tez çalışmasında 1000 µg/mL metamizol uygulamasının 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda U-87 MG hücrelerinin proliferasyonunu azaltması yönündeki etkisi COX-3/PGE<sub>2</sub> etkileşiminin inhibisyonu sonucu gerçekleşmiş olabilir. Ayrıca, 1 µg/mL metamizol uygulamasının 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda anjiyogenik faktörlerden Substance P miktarını az da olsa artırması, COX-3 / PGE<sub>2</sub> etkileşiminin inhibisyonunun azalması ile ilgili olabilir (May 2009).

Metamizol'un ağrı kesici etkisi ile ilgili önerilen mekanizmalardan kannabinoid sistem aktivasyonu G-protein bağlı reseptör (GPCR) sınıfları ile heterodimerizasyonla ilgili olabilir. Bazı çalışmalar, opioid reseptörlerinin GPCR'nin diğer sınıflarıyla heterodimerize olabileceğini göstermiştir. Örneğin Mu Opioid Reseptör (MOR), CB1 ile etkileşebilir ve potansiyel olarak heterodimerize olabilir (Hojo vd 2008, Rios vd 2006). MOR ve kannabinoid reseptör-1 reseptörleri arasındaki etkileşimlerin, bu reseptörlerin tek tek etkilerini modüle edebildiğini göstermiştir. Δ9-tetrahidrokanabinol, bir cannabinoid reseptör 1 agonisti, morfin gibi opioidlerin potansiyelini artırabilir (Cichewicz 2004). Buna ek olarak, eş zamanlı olarak MOR veya kanabinoid reseptör 1 heterodimerlerinin birlikte aktivasyonu, her birinin kendi aktivasyonunu ile karşılaştırıldığında ERK aktivitesinin belirgin bir şekilde zayıflamasına yol açar (Rios vd 2006).

Substance P'nin NK-1 reseptörüne bağlanıp G proteinini aktive ederek bu aktivasyon sonucunda SP, NK-1, β-arrestin, SRC, ERK1/2 proteinlerini de içeren bir kompleksin oluşumunun aktive edildiği ve kompleksteki ERK1/2'nin nükleusta hücre proliferasyonunu arttırdığı göz önüne alındığında, Metamizolünde bu yolak üzerinden etki edebileceğini düşündük. Bu nedenle, tez çalışmasında metamizolün SP miktarları üzerine etkisini inceledik. Ancak, Hücrelerden salınan SP miktarında anlamlı bir değişiklik tespit edemedik. Bununla birlikte, 1000 µg/mL'lik metamizol'ün 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonucu U-87 MG hücrelerinin proliferasyonunda ki azalma SP'nin miktarını değiştirmeksizin, kannabioid reseptörüne daha fazla metamizol ve metamizol'ün metabolitlerinin bağlanmasıyla MOR ve CB1 heterodimerizasyonda artışına neden oluyor olabilir. Bu da ERK aktivitesinde azalmaya neden olarak hücrenin ölümüne neden olabilir. Buna zıt olarak metamizol'ün 25, 12,5, 1 µg/mL konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde U-87 MG hücrelerinde proliferasyona neden olması, metamizol ve onun metabolitlerinin daha az CB1 reseptörüne bağlanarak MOR ile oluşabilecek heterodimerizasyonun azalarak ERK aktivesindeki artışa bağlı proliferatif etkinin ortaya çıkması söz konusu olabilir.

Metamizol'un ağrı kesici mekanizması ile ilgili en olası opioidlerjik sistem aktivasyonu morfin ve metamizol'ün beraber uygulandığı çalışmalarda gösterdiği sinerjistik etki ile açıklanabilir. Dominguez-Ramirez vd (2010) tarafından yapılan bir çalışmada her iki ilacın da metabolizmalarının aynı enzimatik mekanizma için karşılıklı rekabetinden kaynaklandığını iddia etmiştir. Bu nedenle, büyük olasılıkla metamizol ile morfin antinosisepsiyonun potensiyasyon (sinir uyarılarının kuvvetinde artış)'u, sadece farmakodinamik seviyedeki etkileşimden değil aynı zamanda morfin farmakokinetiklerinin modifikasyonundan kaynaklanmaktadır.

Kanser ağrısının tedavisinde metamizol'ün tek başına etkinliği hakkındaki bilgiler kısıtlıdır. Aslında opioid olmayan bir ilaç ile kanser ağrısını tek başına tedavi etmek yeterli bir uygulama değildir, metamizol daha ziyade, opioidlerin yeterli bir ağrı kesici etki gösteremediği durumlarda gerekli analjezik etkiyi sağlamak için bu ilaçlar ek tedavide kullanılmaktadır. Aslında metamizol kanser hastalarında yaygın olarak kullanılan bir ilave terapötiktir (Zernikow vd 2006). Rodriguez vd (1994) tarafından yapılan klinik bir çalışmada kanser ağrısı tedavisinde her 8 saatte bir metamizolün 2 gr'lık analjezik etkisinin, her 4 saatte bir 10 mg morfinle benzer olduğu sonucuna varmıştır. Klinik denemeler göre metamizol, morfin gibi opioidler ve diğer analjeziklerle tamamlayıcı olarak hareket eder.

Lopez-Munoz vd (2008) tarafından yürütülen bir deneyde metamizol ve morfin arasındaki sinerjizmin süper aditif bir nitelik taşıdığı iddia edilmiştir. Bu araştırmacılar, iki ilacın birlikte uygulanmasının, tek tek verilen her bir ilaçtan veya bunların beklenen teorik toplanmış etkilerinden daha iyi bir antinöseptif etki sağladığını gösterdiler. Bu bulgu, metamizol ve morfin arasındaki sinerjinin varlığını doğrular.

Opioidlerjik sistemin aktivasyonu, ağrı iletiminin en önemli modülatörlerinden olan SP'nin NK-1 ile etkileşimi üzerinden downstream G proteinlerinin aktivasyonuna neden olur. Bu aktif G-proteini, diğer efektör proteinlerle etkileşime girebilir ve potansiyel olarak farklı sinyal yollarını uyarabilir. Örneğin mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolağı bunlardan biridir. Opioidlerjik sistem içerisinde endotel olmayan hücrelerde MAPK / ERK yolağı aktive olur ve hücre proliferasyonu desteklenir (Chuang vd 1997, Law vd 1997). Bu bulgular, nitrik oksit (NO)'ya bağlı MAPK / ERK fosforilasyonunu ve endotel hücresine spesifik büyüme ve hayatta kalma faktörü, vasküler geçirgenlik faktörü / VEGF ile indüklenen anjiyogeneziyi anımsatmaktadır (Kroll ve Waltenberger 1997, Gille vd 2001, Gupta vd 2002).

Lazarczyk vd (2010) T98G insan glioblastoma hücrelerinde morfinin *in vitro* etkileri araştırdıkları çalışmalarında morfinin bu hücreleri uyardığını hatta morfinin 20 µM ve 40 µM konsantrasyonlarında metastaz yeteğinin arttığını göstermişlerdir.

Tez çalışmasında U-87 MG hücre hattı üzerinde metamizol'ün 25 µg/mL, 12,5 µg/mL ve 1 µg/mL konsantrasyonlarında uygulanan dozlarının proliferatif etki göstermesi ilk başta anjiyogenik faktörler üzerinde pozitif bir etkiye neden olabileceğini akla getirmektedir. Ancak metamizol'ün COX-3/PGE<sub>2</sub>, kannabinoid sistem ve opioidlerjik sistem aktivasyonlarının aracılığı gösterdiği düşünülen bu üç mekanizma tam olarak aydınlatılmış değildir. Metamizol'ün 25 µg/mL, 12,5 µg/mL ve 1 µg/mL konsantrasyonlarında ortaya çıkan muhtemel anjiyogenik etkiyi farklı bir mekanizma üzerinden gerçekleştiriyor olabilir. Metamizol endotel olmayan hücrelerde de anjiyogenez aktivatörü olarak iş gören damar oluşumunu dengeleyen Angiopoietin-1 ve transmembran tirozin-protein kinaz reseptör (Tie2) molekülleri yolu ile anjiyogeneze katkı sağlamış olabilir (Carmeliet ve Jain 2000).

Metamizol'ün U-87 MG'ye uygulanarak 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonunda SP, VEGF ve MMP-9 aktivitesi üzerine gösterdiği küçük artamalar ya da azalmalar metamizol uygulama süresinin kısa olması nedeniyle net değildir. Kronik ağrı tedavisi gören hastalarda 72 saatlik sürenin üzerinde uygulanan tedavi, hastanın birikimsel

olarak doz stabilitesi sağlamasıyla anjiyogenik faktörlerin artışına neden olabilir. Bu durum metamizol ile akut ve kronik ağrı tedavisi uygulanan *in vivo* deneylerle desteklenerek netleştirilebilir. Metamizol'ün metabolizması sonucu ortaya çıkan aktif metabolitleri MAA ve AA'dan herhangi birisi 48 saatlik uygulama sonucu VEGF yolağını inhibe ederek miktarında azalmaya sebep olmuş olabilir. Metamizol'ün 48 saatlik inkübasyonu sonrasında MMP-9 miktarındaki artış, ilacın kronik ağrı tedavisi ile uzun süreli kullanımına bağlı olarak artabilir.

Doksorubisin (0.01 mg/mL), sisplatin (1 mg/mL) ve metamizol (50, 5, 0,5 µg/mL) gibi sitotoksik ilaçların köpek (D-17) ve insan osteokarsinom (U2-OS) hücreleri üzerinde doksorubisin ve sisplatin ile kombine şekilde ve tek başına 72 saat uygulanan metamizolün her iki osteokarsinom hücresinin çoğalmasını uyardığı ve bu çoğalmanın ilacın konsantrasyonuna bağlı olduğunu vurgulamışlardır. Dahası, metamizolün konsantrasyona bağlı anti kanser ilaç veya farklı uyaranlara karşı hücre koruyucu bir aktivite sergilediğini belirterek; metamizolün böylesi bir faaliyeti, bu ilacın neoplastik bir hastalıkla ilişkili ağrıyı hafifletmek için kullanılmaması gerektiğini önermektedir (Poradowski ve Obminska-Mrukowicz 2015). Tez çalışmasında gözlediğimiz metamizolün neden olduğu proliferasyon artışı da bu makaleyi desteklemektedir.

Valter vd (1999) U-87 MG ve A-172 insan malignant glioma hücrelerinin VEGF sentezi ve salınımı ile ilgili yaptıkları *in vitro* bir çalışmada farklı inkübasyon sürelerinde VEGF miktarlarını ölçmüşlerdir.  $5 \times 10^5$  olarak bölünen U-87 MG hücrelerinin 6 saat sonunda ortama saldıkları VEGF miktarını 7,8 ng/mL, 24 saat sonundaki miktarı 29,1 ng/mL ve son olarak 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası salınan VEGF miktarını 50,2 ng/mL olarak kaydetmişlerdir.

Huang vd (2001)'de beş farklı insan prostat kanserinde NF-kB aktivitesinin engellenmesi ile ilgili yaptıkları farklı bir *in vitro* çalışmada  $10^6$  hücre sayısı ile kurulan deney setinin 48 saatin sonunda hücrelerin ortama saldıkları VEGF miktarını 400-1200 pg/ $10^6$  hücre olduğunu ortaya koymuşlardır.

VEGF'in bazal seviyede miktarının belirlendiği başka bir *in vitro* çalışma Yoshino vd (2006) tarafından yapılmıştır. İçlerinde U-87 MG'nin de bulunduğu dört farklı insan malignant glioma hücrelerinde p38 MAPK yolağının VEGF ile ilişkisi araştırılmıştır. Deneylerde kullanılan ve sayısı  $10^4$  olan U-87 MG hücrelerinden 48 saat inkübasyon süresi sonunda salınan VEGF miktarını yaklaşık 400 pg/mL olarak belirlemişlerdir.

Tez çalışmasında  $2 \times 10^5$  hücre sayısı ile bölünen U-87 MG hücrelerinin metamizol uygulamasından sonraki 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda ortama saldıgı VEGF miktarı, kontrol grubunda 31,2 pg/mL, 25 µg/mL metamizol uygulanan grupta yaklaşık 50 pg/mL ve 12,5 µg/mL uygulanan grupta yaklaşık 40 pg/mL'dir. Buna karşılık 1 µg/mL'lik grupta bu değer yaklaşık 140 pg/mL'dir. Aynı şekilde 48 saat için yapılan metamizol uygulamasında kontrol de dahil olmak üzere VEGF miktarları kontrol grubunda 52 pg/mL iken bu miktar 25, 12,5 ve 1 µg/mL'lik metamizol dozlarında yaklaşık olarak 32 pg/mL olarak hesaplanmıştır.

Angiyogenezin önemli bir diğeri faktörü olan MMP-9 ile ilgili Gilet vd (2015) insan lösemi hücrelerinde aktif ve toplam MMP-9 seviyelerini belirlemişlerdir.  $10^8$  hücre ile 24 saat inkübasyon sonunda toplam MMP-9 miktarını yaklaşık 20 ng/mL; aktif MMP-9 miktarını yaklaşık 10 ng/mL olduğunu belirlemişlerdir.

Metamizol'ün anjiyogenezle ilişkisinin araştırıldığı tez çalışmasında 24 ve 48 saat sonunda  $2 \times 10^5$  U-87 MG hücresinden salınan MMP-9 miktarı kontrol gruplarında 40 pg/mL 25, 12,5 ve 1 µg/mL'lik dozlarda 43-50 pg/mL arasında değişmektedir.

DMSO'nun HeLa hücreleri üzerindeki anjiyogenik etkilerinin Şimşek vd (2015) tarafından araştırılan bir çalışmada  $2 \times 10^5$  hücre ile 24 saat inkübasyon sonunda HeLa hücrelerinin kontrol gruplarında ortama salınan SP miktarı 142 pg/mL olarak belirlenmiştir. Tez çalışmamızda U-87 MG hücrelerinde ( $2 \times 10^5$ ) 24 saat inkübasyon sonrası metamizol uygulanmayan kontrol grubunda SP miktarı 80 pg/mL, 48 saat için ise 85 pg/mL olarak kaydedilmiştir.

Tez kapsamında U-87 MG hücre hattına uygulanan 25 µg/mL, 12,5 µg/mL ve 1 µg/mL konsantrasyonlarda ki metamizol dozlarının gösterdiği proliferatif etki, proanjiyogenik faktörlerin artışına neden olmadan anti-anjiyogenik faktörlerin miktarını da azaltmış olabilir. Metamizol'ün 1 µg/mL'lik dozunda 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda VEGF miktarında ortaya çıkan artışa rağmen 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda VEGF miktarında ki azalma, metamizol'ün anti-anjiyogenik faktörlerin miktarına yönelik negatif etkiyi desteklemektedir.

Projenin önerilmesi aşamasında kurduğumuz hipotez özellikle Substance P miktarı üzerine metamizol'ün etki gösterip göstermeyeceğini belirlemektir. Ağrı iletimindeki en önemli nörotransmitter olan SP'nin aynı zamanda anjiyogenik etkiye sahip olması nedeniyle, ağrı kesici özellikteki bir ilacın temel anjiyogenik faktörler üzerine de bir etki gösterip göstermeyeceğini araştırmayı planlamıştık. Tez kapsamında elde ettiğimiz tüm sonuçlar göz önüne alındığında, metamizol uygulanan U-87 MG hücrelerinde anjiyogenezin ortaya çıkışında aktif rol oynayan VEGF, MMP-9 ve SP seviyelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde istatistiksel anlamda önemli bir artış görülmemiştir.

İn vitro çalışmalarda, hücreler besinsizlikten ölmeleri engellenerek en fazla birkaç gün kadar inkübe edilebilmektedir. Ancak, kronik ağrı tedavisinde kullanılan metamizol, hem uzun süre kullanılmakta hem de vücutta metabolize olarak aktif metabolitlerine ayrılmaktadır. Bu bağlamda, ilacın anjiyogenez üzerine etkisinin olup olmaması konusunda *in vivo* testlerle de denemesi gerektiğini düşünmekteyiz. Tez kapsamında elde ettiğimiz hücre proliferasyonunda ki artış dikkate alındığında, *in vivo* çalışma sonuçlarının bu noktada daha da önem kazanacağı kaçınılmazdır.

## 6. SONUÇ

Tüm bu verilerle birlikte;

1. Tez kapsamında gerçekleştirilen hücre canlılığı test sonuçlarına göre; U-87 MG hücre hattında metamizol'ün 1000 µg/mL'lik dozda 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığında istatistiksel anlamda önemli azalma görüldü ( $p<0.01$ ).

2. Tez kapsamında gerçekleştirilen hücre canlılığı test sonuçlarına göre; U-87 MG hücre hattında metamizol'ün 1, 12,5, 25 ve 50 µg/mL'lik dozlarında 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığında istatistiksel anlamda önemli artış gözlemlendi.

3. Tez kapsamında gerçekleştirilen Substance P Elisa sonuçlarına göre; U-87 MG hücre hattında metamizol'ün 1, 12,5 ve 25 µg/mL'lik dozlarında 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda istatistiksel olarak önemli bir artış görülmemiştir.

4. Tez kapsamında gerçekleştirilen MMP-9 Elisa sonuçlarına göre; U-87 MG hücre hattında metamizol'ün 1, 12,5 ve 25 µg/mL'lik dozlarında 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda istatistiksel olarak önemli bir artış görülmemiştir.

5. Tez kapsamında gerçekleştirilen VEGF Elisa sonuçlarına göre; U-87 MG hücre hattında metamizol'ün 12,5 ve 25 µg/mL'lik dozlarında 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda istatistiksel olarak önemli bir artış görülmemiştir. Metamizol'ün 1 µg/mL'lik dozunda 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 4.12 kat artış gözlemlendi. Aynı dozun 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda kontrole kıyasla önemli bir artış görülmemiştir.

6. Yukarıdaki beş sonuca bağlı olarak Metamizol'ün U-87 MG hücrelerinin çoğalma ve hayatta kalmalarına 1, 12,5, 25 ve 50 µg/mL'lik dozlarında 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda neden olduğu; 1000 µg/mL'lik Metamizol dozunda 24, 48 ve 72 saat sonunda U-87 MG hücrelerini inhibe ettiği VEGF faktörlerinin baskılandığı gözlemlenmiştir.

## 7. KAYNAKLAR

- AL-MAGHRABI, J., BUHMEIDA, A., EMAM, E. et al. 2012. Cyclooxygenase-2 expression as a predictor of outcome in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol*, 18(15):1793–9.
- BANG, R., SASS, G., K. KIEMER, A., M. VOLLMAR, A., NEUHUBER, W.L., TIEGS, G. 2003. Neurokinin-1 Receptor Antagonists CP-96,345 and L-733,060 Protect Mice from Cytokine-Mediated Liver Injury. *JPET*, 305: 31–39.
- BAR, E.E. et al. 2007. Cyclopamine-Mediated Hedgehog Pathway Inhibition Depletes Stem-Like Cancer Cells in Glioblastoma. *Stem Cells*, 25(10): 2524-2533.
- BASBAUM, A. I. and JESSEL, T. M. 2000. in Principles of Neural Science, pp. 472–490, New York.
- BATU, O.S. and EROL, K. 2007. The effects of some nonsteroidal anti-inflammatory drugs on experimental induced gastric ulcers in rats. *Inflammopharmacology*, 15: 260-265.
- BAUMGARTNER, C.M., KOENIGHAUS, H., EBNER, J.K., HENKE, J., SCHUSTER, T., ERHARDT, W.D. 2009. Cardiovascular effects of dipyrone and propofol on hemodynamic function in rabbits. *Am J Vet Res*, 70: 1407-1415.
- BONNEFONT, J., COURADE, J.P., ALLOUI, A., ESCHALIER, A. 2003. Antinociceptive mechanism of action of paracetamol. *Drugs*, 63 (2): 1-4.
- BOUDREAU, N. and MYERS, C. 2003. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast Cancer Research*, 5(3): 140-146.
- BOUIS, D., KUSUMANTO, Y., MEIJER, C., MULDER, N.H., HOSPERS, G.A.P. 2006. A review on pro- and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention, *Pharmacological Research* 53: 89-103.
- BRAND, L., MUNDING, J., POX, C.P. et al. 2013. ss-catenin, Cox-2 and p53 immunostaining in colorectal adenomas to predict recurrence after endoscopic polypectomy. *Int J Colorectal Dis*, 28(8):1091–1098.
- BRUNE K. 1997. The early history of non-opioid analgesics. *Acute Pain*, 1(1): 33-40.
- BRUNE, K. and ZEILHOFER, H.U. 2006. Antipyretic analgesics: basic aspects. In S McMahon ve M Koltzenburg (eds.). Wall and Melzack's Textbook of Pain. Elsevier, pp. 459-470, Amsterdam.
- BURIAN, M. and GEISLINGER, G. 2005. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. *Pharmacol Ther*, 107(2): 139-154.

- CAMPOS, C., GREGORIO, R.D., GARCIA-NIETO, R., GAGO, F., ORTÍZ, P., ALEMANY, S. 1999. Regulation of cyclooxygenase activity by metamizol. *Eur. J. Pharmacol*, 378(3): 339-347.
- CARMELIET, P. And JAIN, R.K. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407: 249-257.
- CHANDRASEKHARAN, N.V., DAI, H., ROOS, K.L., EVANSON, N.K., TOMSIK, J., ELTON, T.S., SIMMONS, D.L. 2002. COX-3, a cyclooxygenase- 1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 13926-13931.
- CHAPARRO, L.E., LEZCANO, W., ALVAREZ, H.D., JOAQUI, W. 2012. Analgesic effectiveness of dipyrone (metamizol) for postoperative pain after herniorrhaphy: a randomized, double-blind, dose-response study. *Pain Pract*, 12: 142-147.
- CHEN, Y.F., LUO, R.Z., LI, Y. et al. High expression levels of COX-2 and P300 are associated with unfavorable survival in laryngeal squamous cell carcinoma. 2013. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 270(3): 1009–1017.
- CHUANG, L. F., KILLAM Jr, K.F., CHUANG, R.Y. 1997. Induction and activation of mitogen-activated protein kinases of human lymphocytes as one of the signaling pathways of the immunomodulatory effects of morphine sulfate. *J. Biol. Chem*, 272: 26815–26817.
- CICHEWICZ, D.L. 2004. Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics. *Life Sci*, 74: 1317–1324.
- COHEN, O., ZYLBER-KATZ, E., CARACO, Y., GRANIT, L., LEVY, M. 1998. Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of dipyrone metabolites after a single oral dose of dipyrone. *Eur J Clin Pharmacol*, 54: 549-553.
- COLVIN, L., Karen FORBES, K. and Marie FALLON, M. 2006. ABC of palliative care Difficult pain. *BMJ*, 332(7549): 1081–1083.
- COX, G., JONES, J.L., O'BYRNE, K. J. 2000. Matrix Metalloproteinase 9 and the Epidermal Growth Factor Signal Pathway in Operable Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, 6(6): 2349–2355.
- da SILVA, S.L. et al. 2008. Molecular modeling of the inhibition of enzyme PLA2 from snake venom by dipyrone and 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone. *Int. J. Quantum Chem*, 108(13): 2576-2585.
- DAHL, J.B. and KEHLET, H. 1991. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: rationale for use in severe postoperative pain. *Br J Anaesth*, 66: 703–712.

- DAHL, V. and RAEDER, J. C. 2000. Non-opioid postoperative analgesia *Acta Anaesthesiol Scand*, 44(10): 1191–1203.
- DAS, S. and MARSDEN, P.A. 2013. Angiogenesis in Glioblastoma. *N Engl J Med*, 369: 1561-1563.
- de LEO, J. A. and YEZIERSKI, R. P. 2001. The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain* 90: 1–6.
- de WIT, R., van DAM, F., LOONSTRA, S., ZANDBELT, L., van BUUREN, A., van der HEIJDEN, K., LEENHOUTS, G., ABU-SAAD, H.H. 2001. The Amsterdam Pain Management Index compared to eight frequently used outcome measures to evaluate the adequacy of pain treatment in cancer patients with chronic pain. *Pain*, 91(3): 339-349.
- DOGRUL, A., GÜLMEZ, S.E., DEVECİ, M.S., GUL, H., OSSIPOV, M.H., PORRECA, F., TULUNAY, F.C. 2007. The Local Antinociceptive Actions of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs in the Mouse Radiant Heat Tail-Flick Test. *Anesth. Analg*, 104(4): 927-935.
- DOMINGUEZ-RAMIREZ, A.M., CORTS-ARROYO, A.R., Y DE LA PENA, M.H., LOPEZ, J.R., LOPEZ-MUNOZ, F.J. 2010. Effect of metamizol on morphine pharmacokinetics and pharmacodynamics after acute and subchronic administration in arthritic rats. *Eur J Pharmacol*, 645: 94-101.
- DOUCAS, H. and BERRY, D.P. 2006. Basic principles of the molecular biology of cancer I. *Surgery (Oxford)*, 24 (2): 43-47.
- EDWARDS, J.E., LOKE, Y.K., MOORE, R.A., MCQUAY, H.J. 2000. Single dose piroxicam for acute postoperative pain. *Cochrane Database Syst Rev*, (4): CD002762.
- EISENBERG, E., BERKEY, C., CARR, D.B., MOSTELLER, F., CHALMERS, C. 1994. Efficacy and safety of nonsteroidal antinflammatory drugs for cancer pain: a meta-analysis. *J Clin Oncol*, 12: 2756–2765.
- ERDİNE, S. Kanser ağrısı. 2002. Kanser hastasına yaklaşım: Tanı, tedavi, takipte sorunlar. Nobel Tıp Kitabevleri, pp. 261-274, İstanbul.
- ERİN, N. and ULUSOY, O. 2009. Differentiation of neuronal from non-neuronal Substance P. *Regul. Pept*, 152: 108-113.
- ESCOBAR, W., RAMIREZ, K., AVILA, C., LIMONGI, R., VANEGAS, H., VAZQUEZ, E. 2012. Metamizol, a non-opioid analgesic, acts via endocannabinoids in the PAG-RVM axis during inflammation in rats. *Eur J Pain*, 16: 676-689.

- ESTEBAN, F., GONZALEZ-MOLES, M.A., CASTRO, D., MARTIN-JAEN, M.M., REDONDO, M., RUIZ-AVILA, I., MUNOZ, M. 2009. Expression of substance P and neurokinin-1-receptor in laryngeal cancer: linking chronic inflammation to cancer promotion and progression. *Histopathology*, 54(2): 258–260.
- FORGET, P., COULIE, P.G., RETSKY, M. et al. 2013. Is there a rationale for an anesthesiologist's role against cancer recurrence? *Acta Anaesthesiol Belg*, 64(1): 15–24.
- FRIESS, H. et.al. 2003. Neurokinin-1 receptor expression and its potential effects on tumor growth in human pancreatic cancer, *Lab Invest*, 83: 731-742.
- GACH, K., SZEMRAJ, J., WYREBSKA, A., JANECKA, A. 2011. The influence of opioids on matrix metalloproteinase-2 and -9 secretion and mRNA levels in MCF-7 breast cancer cell line. *Mol Biol Rep*, 38(2):1231–1236.
- GEISSLINGER, G., BOCKER R., LEVY, M. 1996. High-performance liquid chromatographic analysis of dipyrone metabolites to study their formation in human liver microsomes. *Pharmacol. Res*, 13(8): 1272-1275.
- GILET, A., ZOU, F., BOUMENİR, F., FRIPPIAT, J. P., THORNTON, S.N., LACOLLEY, P., ROPARS, A. 2015. Aldosterone up-regulatesMMP-9andMMP-9/NGAL expression in human neutrophils through p38, ERK1/2 and PI3K pathways. *Experimental Cell Research*, 331: 152-163.
- GILLE, H., KOWALSKI, J., LI, B., LECOUTER, J., MOFFAT, B., ZIONCHECK, T.F., POLLETIER, N., FERRARA, N. 2001. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). *J. Biol. Chem*, 276: 3222–3230.
- GOTTSCHALK, A., SHARMA, S., FORD, J., DURIEUX, M. E., TİOURİRİNE, M. 2010. Review article: the role of the perioperative period in recurrence after cancer surgery. *Anesth Analg*, 110(6): 1636-1643.
- GRIMSHOLM, O., RANTAPAA-DAHLQVIST, S., DALEN, T., FORSGREN, S. 2008. Observations favouring the occurrence of local production and marked effects of bombesin/ gastrin-releasing peptide in the synovial tissue of the human knee joint-comparisons with substance P and the NK-1 receptor. *Neuropeptides*, 42 (2): 133–145.
- GUPTA, K., KSHİRSAGAR, S., CHANG, L., SCHWARTZ, R., LAW, P.Y., YEE, D., HEBBEL, R.P. 2002. Morphine stimulatesangiogenesis by activating proangiogenic and survival- promoting signaling and promotes breast tumor growth. *Cancer Res*, 62(15): 4491-4498.
- HARGREAVES, J. and ABBOTT P.V. 2005. Drugs for pain management in dentistry. *Aust Dent J*, 50: 14-22.

- HARIMAYA, Y., KOIZUMI, K., ANDOH, T., NOJIMA, H., KURAISHI, Y., SAIKI, I. 2002. Potential ability of morphine to inhibit the adhesion, invasion and metastasis of metastatic colon 26-L5 carcinoma cells. *Cancer Lett*, 187(1–2):121–127.
- HARRINGTON K.J. 2016. The biology of cancer. *Medicine*, 44(1): 1-5.
- HATSUKARI, I., HITOSUGI, N., OHNO, R., HASHIMOTO, K., NAKAMURA, S., SATOH, K., NAGASAKA, H., MATSUMOTO, I., SAKAGAMI, H. 2007. Induction of apoptosis by morphine in human tumor cell lines *in vitro*. *Anticancer Res*, 27(2):857–864.
- HENNIG, I.M., LAISSUE, J.A., HORISBERGER, U., REUBI, J.C. 1995. Substance-P receptors in human primary neoplasms: tumoral and vascular localization. *Int J Cancer*, 61(6): 786–792.
- HINZ, B., CHEREMINA, O., BACHMAKOV, J., RENNER, B., ZOLK, O., FROMM, M.F., BRUNE, K. 2007. Dipyrone elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic. *FASEB J*, 21(10): 2343-2351.
- HOJO, M., SUDO, Y., ANDO, Y., MINAMI, K., TAKADA, M., MATSUBARA, T., KANAIDE, M., TANIYAMA, K., SUMIKAWA, K., UEZONO, Y. 2008. mu-Opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid CB1 receptor: Electrophysiological and FRET assay analysis. *J Pharmacol Sci*, 108: 308 –319.
- HSIAO, P.N., CHANG, M.C., CHENG, W.F., CHEN, C.A., LIN, H.W., HSIEH, C.Y., SUN, W.Z. 2009. Morphine induces apoptosis of human endothelial cells through nitric oxide and reactive oxygen species pathways. *Toxicology*, 256(1–2): 83–91.
- HUANG, S., PETTAWAY, C.A., UEHARA, H., BUCANA, C.D., FIDLER, I.C. 2001. Blockade of NF-kB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene*, 20: 4188-4197.
- HUSSAIN, M., JAVEED, A., ASHRAF, M. et al. 2012. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, tumour immunity and immunotherapy. *Pharmacol Res*, 66(1): 7–18.
- JAIN, R.K. 1987. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Research*, 47(12): 3039-3051.
- JASIECKA, A., MASLANKA, T., JAROSZEWSKI, J.J. 2014. Pharmacological characteristics of metamizole. *Pol. J. Vet. Sci*, 17(1): 207-214.
- JULIUS, D. AND BASBAUM, A. I. 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413: 203–210.

- KARNEZIS, T., SHAYAN, R., CAESAR, C. et al. 2012. VEGF-D promotes tumour metastasis by regulating prostaglandins produced by the collecting lymphatic endothelium. *Cancer Cell*, 21(2): 181–195.
- KAST, R.E. and HALATSCH, M.E. 2012. Matrix Metalloproteinase-2 and -9 in Glioblastoma: a trio of 1d drugs-Captopril, Disulfiram and Melfinavir-Are inhibitors with potential as adjunctive treatments in glioblastoma. *Archives of Medical Research*, 43(3): 243-247.
- KE, H.L., TU, H.P., LIN, H.H. et al. 2012. Cyclooxygenase-2 (COX-2) up-regulation is a prognostic marker for poor clinical outcome of upper tract urothelial cancer. *Anticancer Res*, 32(9): 4111–4116.
- KROLL, J., WALTENBERGER, J. 1997. The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *J. Biol Chem*, 272: 32521–32527.
- LAW, P.Y., MCGINN, T.M., CAMPBELL, K.M., ERICKSON, L.E., LOH, H.H. 1997. Agonist activation of opioid receptor but not  $\mu$ -opioid receptor potentiates fetal calf serum or tyrosine kinase receptor-mediated cell proliferation in a cell-line-specific manner. *Mol. Pharmacol*, 51: 152–160.
- LAZARCZYK, M., MATYJA, E., LIPKOWSKI, A.W. 2010. A comparative study of morphine stimulation and buprenorphine inhibition of human glioblastoma T98G cell proliferation *in vitro*. *Peptides*, 31: 1606-1612.
- LEE, J.Y., MYUNG, S.K., SONG, Y.S. 2013. Prognostic role of cyclooxygenase-2 in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis of observational studies. *Gynecol Oncol*, 129(3):613–619.
- LENNON, F.E., MIRZAPOLIAZOVA, T., MAMBETSARIEV, B., SALGIA, R., MOSS, J., SINGLETON, P.A. 2012. Overexpression of the  $\mu$ -opioid receptor in human non-small cell lung cancer promotes Akt and mTOR activation, tumor growth, and metastasis, *Anesthesiology* 116(4): 857-867.
- LEVY, M., ZYLBER-KATZ, E., ROSENKRANZ, B. 1995. Clinical pharmacokinetics of dipyrone and its metabolites. *Clin Pharmacokinet*, 28: 216-234.
- LOPEZ-MUNOZ, F.J., GODINEZ-CHAPARRO, B., HUERTA-CRUZ, J.C., GUEVARA-LOPEZ, U., DOMÍNGUEZ-RAMÍREZ, A.M., CORTÉS-ARROYO, A.R. 2008. The antinociceptive efficacy of morphine, metamizol, or their combination in an experimental rat model with different levels of inflammatory pain. *Pharmacol Biochem Behav*, 91: 196-201.
- MALVAR, D.do.C., SOARES, D.M., FABRICIO, A.S., KANASHIRO, A., MACHADO, R.R., FIGUEIREDO, M.J., RAE, G.A., SOUZA, G. EP. de. 2011.

The antipyretic effect of dipyron is unrelated to inhibition of PGE2 synthesis in the hypothalamus. *Br. J. Pharmacol*, 162(6): 1401-1409.

MANTYH, P.W., CLOHİSY, D.R., Martin KOLTZENBURG, M., HUNT, S.P. 2002. molecular mechanisms of cancer pain. *Nature Reviews Cancer*, 2: 201-209.

MARINANGELİİF, CICCIOZZİ A, LEONARDİS M., ALOISIO, L., MAZZEI, A., PALADINI, A., PORZIO, G., MARCHETTI, P., VARRASSI, G., 2004. Use of strong opioids in advanced cancer pain: a randomized trial. *J Pain Symptom Manage*, 27(5): 409–416.

MAY, O. 2009. COX-2/PGE2 Signaling: a target for colorectal cancer prevention. <https://www.caymanchem.com/news/cox-2-pge2-signaling>

MCNICOL, E., STRASSELS, S., GOUDS, L., LAU, J., CARR, D., 2005 NSAIDs or paracetamol, alone or combined with opioids, for cancer pain. *Cochrane Database Syst Rev*, 1: CD005180.

MERCADANTE S, PORZİO G, FERRERA P., FULFARO, F., AILELLI, F., FICORELLA, C., VERNA, L., TIRELLI, W., VILLARI, P. 2006. Low morphine doses in opioid-naïve cancer patients with pain. *J Pain Symptom Manage*, 31: 242–247.

MESERVE, J.R., KAYE, A.D., PRABHAKAR, A., URMAN, R.D. 2014. The role of analgesics in cancer propagation. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 28(2): 139-151.

MEUSER, T., PIETRUCK, C., RADBRUCH, L., STUTE, P., LEHMANN, K.A., GROND, S. 2001. Symptoms during cancer pain treatment following WHO-guidelines: a longitudinal follow-up study of symptom prevalence, severity and etiology. *Pain*, 93(3): 247–257.

MOORE, N.D. 2009. In search of an ideal analgesic for common acute pain. *Acute Pain*, 11: 129-137.

MRAVEC, B., GIDRON, Y., HULIN, I. 2008. Neurobiology of cancer: interactions between nervous, endocrine and immune systems as a base for monitoring and modulating the tumorigenesis by the brain. *Semin Cancer Biol*, 18(3): 150–163.

MUNOZ, J., NAVARRO, C., NORIEGA, V., PINARDI, G., SIERRALTA, F., PRIETO, J.C., MIRANDA, H.F. 2010. Synergism between COX-3 inhibitors in two animal models of pain. *Inflammopharmacology*, 18: 65-71.

MUNOZ, M. and COVENAS, R. 2010. Neurokinin-1 receptor: A new promising target in the treatment of cancer. *Discovery Medicine*, 10(53): 305-313.

MUNOZ, M., ROSSO, M., COVENAS, R. 2010. A new frontier in the treatment of cancer: NK-1 receptor antagonists. *Curr Med Chem*, 17(6): 504–516.

- MUNOZ, M., ROSSO, M., COVENAS, R. 2011. The NK-1 receptor: a new target in cancer therapy. *Curr Drug Targets*, 12(6): 909–921.
- NADLER, R. B., KOCH, A. E., CALHOUN, E.A., CAMPBELL, P.L., PRUDEN, D.L., BENNETT, C.L., YARNOLD, P.R., SCHAEFFER, A.J. 2000. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in prostatic secretions are indicators in the evaluation of men with chronic prostatitis. *J. Urol.* 164: 214-218.
- NIKOLOVA, I., TENCHEVA, J., VOINIKOV, J., PETKOVA, V., BENBASAT, N., DANCHEV, N. 2012. Metamizole: A Review Profile of a Well-Known “Forgotten” Drug. Part I: Pharmaceutical and Nonclinical Profile. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 26(6): 3329-3337.
- ORTIZ, M.I., CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, G., GRANADOS-SOTO, V. 2003. Possible involvement of potassium channels in peripheral antinociception induced by metamizol: lack of participation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Pharmacol. Biochem. Behav*, 74(2): 465-470.
- PAICE, J.A. and FERREL, B. 2011. The Management of Cancer Pain. *Ca Cancer J Clin*, 61(3): 157-182.
- PAIK, J.H., JU, J.H., LEE, J.Y., BOUDREAU, M.D., HWANG, D.H. 2000. Two Opposing Effects of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs on the Expression of the Inducible Cyclooxygenase MEDIATION THROUGH DIFFERENT SIGNALING PATHWAYS. *J. Biol. Chem.* 275, 28173-28179.
- PELISSIER, T., ALLOUI, A., CAUSSADE, F., DUBRAY, C., CLOAREC, A., LAVARENNE, J., ESCHALIER, A. 1996. Paracetamol exerts a spinal antinociceptive effect involving an indirect interaction with 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptors: *in vivo* and *in vitro* evidence. *JPET*, 278(1): 8-14.
- PIERRE, S.C., SCHMIDT, R., BRENNEIS C., MICHAELIS, M., GEISSLINGER, G., SCHOLICH, K. 2007. Inhibition of Cyclooxygenases by Dipyrone. *Br. J. Pharmacol*, 151(4): 494-503.
- PORADOWSKI, D. and OBMINSKA-MRUKOWICZ, B. 2015. *in vitro* study of the interaction between metamizole with selected anticancer drugs on the canine (D-17) and human (U2-OS) osteosarcoma cell lines. *J. Comp. Path*, 154: 58-123.
- RADISKY, D., HAGIOS, C., BISSEL, M.J. 2001. Tumors are unique organs defined by abnormal signaling and context, *Seminars in Cancer Biology*, 11(2), 87-95,
- RIOS, C., GOMES, I., DEVI, L.A. 2006. Mu opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: Reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis. *Br J Pharmacol*, 148: 387–395.

- RIPAMONTI, C.I., BANDIERI, E., ROILA, F. 2011. Management of cancer pain: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology*, 22(6): 69-77.
- RODRIGUEZ, M., BARUTELL, C., RULL, M., GALVEZ, R., PALLARES, R., VIDAL, F., ALIAGA, L., MORENO, J., PUERTA, P., ORTÍZ, P. 1994. Efficacy and tolerance of oral dipyrone versus oral morphine for cancer pain. *Eur. J. Cancer*, 30(5): 584-587.
- ROGOSCH, T., SINNING, C., PODLEWSKI, A., WATZER, B., SCHLOSBERG, J., LICHTMAN, A.H., CASCIO, M.G., BISOGNO, T., DI MARZO V., NU SING, R., IMMING, P. 2012. Novel bioactive metabolites of dipyrone (metamizol). *Bioorg Med Chem*, 20: 101-107.
- RUSSO, C.M. 2001. Pain: Control. Els <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0002205/full>.
- SALERNO, A. and HERMANN, R. 2006. Efficacy and safety of steroid use for postoperative pain relief. *J Bone Joint Surg Am*, 88: 1361-1372.
- SCHUG, S. A. and MANOPAS, A. 2007. Update on the role of non-opioids for postoperative pain treatment. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 21(1): 15-30.
- SCHWAB, J.M., SCHLUESENER, H.J., LAUFER, S. 2003. COX-3: just another COX or the solitary elusive target of paracetamol? *Lancet*, 361(9362): 981-982.
- SIMSEK, O.E., AYDEMİR, E., KORCUM, A.F., FISKIN, K. 2011. Thalidomide and irradiation combination therapy increases substance P levels *in vitro*. *Exp Ther Med*, 2(3): 529-535.
- ŞİMŞEK, E., AYDEMİR E.A., İMİR, N., KOÇAK, O., KURUOĞLU, A., FIŞKIN, K. 2015. Dimethyl sulfoxide-caused changes in pro- and anti-angiogenic factor levels could contribute to an anti-angiogenic response in HeLa cells. *Neuropeptides*, 53: 37-43.
- SINGH, B., BERRY, J.A., SHOHER, A., LUCCI, A. 2006. COX-2 induces IL-11 production in human breast cancer cells. *J Surg Res*, 131(2): 267-75.
- SINGH, B., BERRY, J.A., SHOHER, A. WEI, C., LUCCI, A. 2007. COX-2 involvement in breast cancer metastasis to bone. *Oncogene*, 26(26): 3789-96.
- SINGH, B., COOK, K.R., VINCENT, L. HALL, C.S., MARTIN, C., LUCCI, A. 2011. Role of COX-2 in tumorspheres derived from a breast cancer cell line. *J Surg Res*, 168(1): 39-49.
- SMITH, G. W., DAVIS, J.L., TELL, L.A., WEBB, A.I., RIVIERE, J.E. 2008. Extralabel use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cattle. *J Am Vet Med Assoc*, 232: 697-701.

- SNYDER, G.L. and GREENBERG, S. 2010. Effect of anaesthetic technique and other perioperative factors on cancer recurrence. *Br J Anaesth*, 105(2): 106-115.
- STOCKLER, M., VARDY, J., PILLAI, A., WARR, D. 2004. Acetaminophen (paracetamol) improves pain and well-being in people with advanced cancer already receiving a strong opioid regimen: a randomized, double-blind, placebo-controlled cross-over trial. *J Clin Oncol*, 22: 3389–3394.
- TAVARE, A.N., PERRY, N.J., BENZONANA, L.L., TAKATA, M., MA, D. 2012. Cancer recurrence after surgery: direct and indirect effects of anesthetic agents. *Int J Cancer*, 130(6): 1237-1250.
- TORTORICI, V. and VANEGAS, H. 2000. Opioid tolerance induced by metamizol (dipyrone) microinjections into the periaqueductal grey of rats. *Eur J Neurosci*, 12: 4074-4080.
- VALTER, M.M., WIESTLER, O.M., PIETSCH, 1999. Differential control of VEGF synthesis and secretion in human glioma cells by IL-1 and EGF. *Int. J. Devl Neuroscience*, 17: 565-577.
- VANEGAS, H. and SCHAIBLE H.G. 2001. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Prog Neurobiol* 64: 327-363.
- VANEGAS, H. and TORTORICI, V. 2002. Opioidergic Effects of Nonopioid Analgesics on the Central Nervous System. *Cellul Mol Neurobiol*, 22: 655-661.
- VAZQUEZ, E., HERNANDEZ, N., ESCOBAR, W., VANEGAS, H. 2005. Antinociception induced by intravenous dipyrone (metamizol) upon dorsal horn neurons: involvement of endogenous opioids at the periaqueductal gray matter, the nucleus raphe magnus, and the spinal cord in rats. *Brain Res*, 1048: 211-217.
- VLAHOV, V., BADIAN, M., VERHO, M., BACRACHEVA, N. 1990. Pharmacokinetics of metamizol metabolites in healthy subjects after a single oral dose of metamizol sodium. *Eur J Clin Pharmacol*, 38: 61-65.
- VUONG, C., VAN UUM, S.H.M., O'DELL, L.E., LUTFY, K., FRIEDMAN, T.C. 2010. The effects of opioids and opioid analogs on animal and human endocrine systems. *Endocr Rev*, 31(1): 98-132.
- WANG, J., BARKE, R.A., CHARBONEAU, R., LOH, H.H., ROY, S. 2003. Morphine negatively regulates interferon-gamma promoter activity in activated murine T cells through two distinct cyclic AMP –dependent pathways. *J Biol Chem*, 278(39): 37622-37631.
- WARGO, B.W. and BURTON A.W. 2005. Cancer Pain. In, M.S. Wallace, P.S. Staats. editorso Pain Medicine and Management Just the Facts. International Edition, McGraw Hill Company, pp. 183-189.

- WARNER, T.D., MITCHELL, J.A., VANE, J.R. 2002. Cyclo-oxygenase-2 inhibitors and cardiovascular events. *Lancet*, 360: 1700-1701.
- WHITE, P.F. 2005. The changing role of non-opioid analgesic techniques in the management of postoperative pain. *Anesthesia and Analgesia*, 101: 5-22.
- WOOLF, C. J. and SALTER, M. W. 2000. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, 5472(288): 1765–1769.
- WORLD HEALTH ORGANİZATIÖN. 1996. Cancer Pain Relief, 2nd edn. Geneva: World Health Organization.
- YILDIRIM, Y.K., UYAR, M., FADILLIOĞLU, Ç. 2005. Kanser ağrısı ve yaşam kalitesine etkisi. *Ağrı*, 4: 17-22.
- YOSHINO, Y., AOYAGI, M., TAMAKI, M., DUAN, L., MORIMOTO, T., OHNO, K. 2006. Activation of p38 MAPK and/or JNK contributes to increased levels of VEGF secretion in human malignant glioma cells. *Int J Oncol*, 29: 981-987.
- ZERNIKOW, B., SMALE, H., MICHEL, E., HASAN, C., JORCH, N., ANDLER, W. 2006. Paediatric cancer pain management using the WHO analgesic ladder — results of a prospective analysis from 2265 treatment days during a quality improvement study *Eur. J. Pain*, 10(7): 587-595.
- ZICHE, M., MORBIDELLI, L., PACINI, M., GEPETTI, P., ALESSANDRI, G., MAGGI, C.A. 1990. Substance P stimulates neovascularization *in vivo* and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res*, 40(2): 264-278.



## ÖZGEÇMİŞ



Orhan KOÇAK 1989 yılında Aksaray'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Cumhuriyet İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimini Hazım Kulak Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2008 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümün'den 2012 yılında Biyolog olarak mezun oldu. 2014 yılı, Ocak ayı itibari ile Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne bağlı Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Eğitimine başladı.

