SAĞLIK BİLİMLERİ DERGİSİ
JOURNAL OF HEALTH SCIENCES
Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yayın Organıdır

Araştırma Yazısı **2017; 26: 39-46**

AVEMAR HT29 KOLON KANSERİ HÜCRELERİNDEKİ ANTİ- ANJİYOJENİK ETKİSİNİ COX-2 VE VEGF EKSPRESYONLARINI İNHİBE EDEREK GÖSTERİR*

AVEMAR EXHIBITS ANTI-ANGIOGENIC EFFECT MEDIATED BY INHIBITION OF COX-2 AND VEGF GENE EXPRESSION ON HT29 COLON CARCİNOMA CELLS

Nilüfer Gülmen İMİR[1,2]

[1] *Akdeniz Üniversitesi, Eğitim Fakültesi Biyoloji AD, Antalya*

[2] *Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji AD, Antalya*

ÖZ

Fermente buğday tohumu özütünden elde edilen Avemar, tamamen doğal, klinikte özellikle kemoterapi ve radyoterapi tedavisi gören kanser hastalarında diyet desteği olarak kullanılan non-toksik bir bileşiktir. Çalışmada, birçok biyolojik aktiviteye sahip olan bu ekstraktın insan kolon kanseri hücrelerinde anti-anjiyojenik özelliğinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla, Avemar 800, 1600 ve 3200 µg/ml dozlarında HT-29 hücrelerine uygulandı ve sonrasında, en önemli anjiyogenez belirteçlerinden olan VEGF (Vasküler Endotel Büyüme Faktörü) ve Cox-2 (Siklooksijenaz-2) protein ve mRNA miktarlarındaki değişiklikler araştırıldı. Protein miktarlarındaki değişiklikler Elisa yöntemi ile, mRNA düzeylerindeki değişiklikler ise gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlendi. Avemar uygulanan hücrelerdeki VEGF ve Cox-2 protein ve mRNA düzeyleri, uygulanmayan HT-29 hücrelerine göre önemli derecede azalma gösterdi. Araştırma sonunda elde edilen veriler, Avemar'ın kolon kanseri hücreleri üzerinde anti-anjiyojenik etkisinin olabileceği yönünde yorumlandı ve tıp dünyasına kolon kanserinin anti-anjiyojenik tedavisinde aday bir ekstrakt olarak aktarıldı.

Anahtar kelimeler: Avemar, anjiyogenez, kolon kanseri, vasküler endotel büyüme faktörü, siklooksijenaz-2

ABSTRACT

Avemar, obtained from fermented wheat germ extract, is a completely natural and non-toxic compound which is clinically used in particular as diet support in cancer patients treated with chemotherapy and radiotherapy. The purpose of this study is to determine whether avemar has an anti-angiogenic effects on human colon cancer cells. For this aim, HT29 cells were exposed to 400, 800, 1600 and 3200 µg/ml concentrations of Avemar, subsequently, protein amounts and mRNA levels of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) and Cox-2 (Cyclooxygenase-2), which are the most important angiogenic markers, were investigated. While the change in the amount of protein was measured by Elisa assay, the alterations at the mRNA levels were determined by real time PCR. Avemar exhibited significantly important decrease in the both of protein and mRNA levels of VEGF and Cox-2 genes on HT29 cells treated with avemar, compared to non-treated cells. The results of this study led us to interpret that Avemar might be an anti-angiogenic effect on colon cancer cells, and Avemar was ssuggested to medical community as a candidate extract for the therapy of colon cancer.

Keywords: Avemar, Angiogenesis, Colon cancer, Vascular endothelial growth factor, Cyclooxygenase-2.

*Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2014.01.0110.001 nolu proje ile desteklenmiştir.

Makale Geliş Tarihi : 17.05.2016
Makale Kabul Tarihi: 17.03.2017

Corresponding Author: Yrd.Doç.Dr. Nilüfer Gülmen İMİR
İş Adresi: Akdeniz Üniversitesi, Eğitim Fakültesi Biyoloji AD, Antalya
Telefon: 0 242 310 6935
Fax: 0 242 226 1953

GİRİŞ

Son yıllarda kanser tedavisi ile ilgili araştırmalar, tümör çoğalması ve metastaz mekanizmalarının anlaşılması üzerine odaklanmıştır ve bu mekanizmaları hedef alan tedaviler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu bağlamda anti-anjiojenik tedavi, gerek tek başına gerekse konvansiyonel tedavilere ek olarak kullanılmaya başlanmış ve yan etkilerinin klasik ilaçlara göre daha az olmasıyla kanser tedavisinde önemli bir yer bulmuştur. Fermente buğday tohumu özütünden elde edilen Avemar, 1990'lı yıllarda Prof. Mate Hidvegi tarafından Macaristan'da keşfedilen ve birden fazla etken maddeye sahip bitkisel kökenli, tamamen doğal, klinikte özellikle kemoterapi ve radyoterapi tedavisi gören kanser hastalarında diyet desteği olarak kullanılan non-toksik bir bileşiktir (1-3). İçeriğindeki 2-metoksi benzokuinon ve 2,6-dimetoksi benzokuinonun çeşitli biyolojik etkiler gösterdiği bilinmektedir. Avemar'ın anaerobik glikoliz, pentoz siklusu ve ribonukleotid redüktaz enzimleriyle olan ilişkisi gösterilmiştir (1,2). Ayrıca Avemar önemli antiproliferatif etkilere ve kaspaz-PARP (Poly ADP Riboz Polimeraz) yolağıyla apopitozu indükleyerek tümör hücrelerini öldürebilme özelliğine sahiptir (4,5). Bu ekstraktın kanser tedavisinde kullanılan çeşitli ilaçlarla sinerjistik etkiye sahip olduğu da gösterilmiştir (6). Avemar'ın immün cevabın düzenlenmesinde de rolü olduğuna dair çalışmalar vardır (7-10). İmmün sistemde, tümör hücreleri NK (Natural Killer, doğal öldürücü) hücrelerinin öldürücü aktivitesinden kaçmak için MHC-I (Major Histocompatibility Complex-I) moleküllerini eksprese eder ve böylece immün sistem tarafından yok edilmekten kurtulur. Avemar'ın tümör hücrelerindeki MHC-I ekspresyon düzeylerini azaltarak bu hücrelerin NK hücreleri tarafından tanınıp öldürülmesini sağladığı gösterilmiştir (7). Avemar immün sistemdeki bir diğer rolünü de ICAM-1 (İntraselülar Adezyon Molekülü-1) üzerinden gerçekleştirmektedir. Bazı tümörlerin damarlarının iç hücreleri normal hücrelere nazaran daha az ICAM-1 eksprese etmektedir. Bu durum, etkin lökosit infiltrasyonunun bozulmasından dolayı immün sistemden kaçış mekanizması olarak kabul edilmektedir. Avemar'ın damar hücrelerinde ICAM-1 ekspresyonunu arttırarak lökositlerin tümör infiltrasyonuna yardımcı olduğu gösterilmiştir (8).

Tüm bu özelliklerinin yanı sıra, Avemar'ın in vitro (cell-free) ortamda siklooksijenaz 1 ve 2 (Cox-1 ve 2) enzimlerinin aktivitesini inhibe ettiği de gösterilmiştir (11). Bu enzimler araşidonik asidi, prostaglandin (PG) ve thromboxan'a çevirir. Cox-2'nin oluşturduğu prostaglandin E2 (PGE2) reseptörlerine bağlanarak tümör büyümesini teşvik eder ve sinyal yolaklarını aktive ederek hücre çoğalmasını, göçünü, apopitozu ve anjiyogenezi kontrol eder (12,13). Başta kolorektal kanserler (14-17) olmak üzere gastrik karsinoma (18,19), servikal kanserler (20,21), küçük hücre dışı akciğer kanserleri (NSCLC) (22) gibi kanserlerde Cox-2 ekspresyonunun tümörlü dokularda normal dokulara oranla daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalarda Cox-2 ekspresyonu ile VEGF (Vasküler Endotel Büyüme Faktörü) ve metalloproteinazlar gibi anjiojenik faktörler arasında pozitif korelasyonlar olduğu bulunmuştur.

VEGF kolon kanserlerinde yeni damar oluşumunda önemli rolü olan güçlü bir anjiyojenik faktördür (23). Kolon kanseri hücreleri bazal seviyede VEGF üretir, fakat, bu tümör hücrelerinden atipik VEGF üretiminin indüksiyonundan, tirozin kinaz büyüme faktörü reseptörlerinin otokrin aktivasyonu (24,25), çeşitli gen mutasyonları (p53, ras ve src) (25-28) ve düşük oksijen desteği gibi birçok faktörün sorumlu olduğu tanımlanmıştır. Ayrıca, son zamanlarda, prostoglandin biyosentezinden sorumlu enzimlerden biri olan Cox-2'nin kolon kanseri hücrelerinden salınan ve anjiyojenik faktör olan VEGF'yi modüle edebildiği gösterilmiştir (29). Cox-2 ekspresyonunu barsak hücrelerinde normal olarak mümkün değilken kolorektal karsinomlarda Cox-2 ekspresyonunun %85'lere kadar çıktığı gözlenmiştir (30).

Bu çalışmada, Avemar'ın cell-free ortamda gösterilen Cox-2 inhibitörü özelliğinden yola çıkılarak bu özütün, özellikle Cox-2 ekspresyonunun yüksek olduğu bilinen insan kolon kanseri HT29 hücrelerinde, anti-anjiojenik etkisinin olup olmadığının in vitro olarak belirlenmesi hedeflenmiştir.

GEREÇ-YÖNTEM

Avemar, Biropharma USA (Newyork) Şirketi tarafından hediye edildi. HT29 hücre hattı ATCC (American Types of Cell Culture Collection)'den temin edildi. Avemar, toz olarak +4^{o}C'de saklandı, deneye başlamadan hemen önce taze olarak, son konsantrasyonu 400 µg/ml olacak şekilde steril distile su ile hazırlandı ve 0.22 µm'lik filtrelerden geçirildi. Hücreler DMEM besiyerinde %10 fetal bovin serumla tamamlanarak %5 CO_2'li ortamda ve 37^{o}C'de çoğaltıldı.

Elisa Yöntemi ile Cox-2 ve VEGF proteinlerinin miktar tayini

Cox-2 miktarının belirlenmesi için hücreler, kitte önerildiği şekilde, 1x10^{7} hücre/kuyucuk olacak şekilde bölündü ve 400, 800, 1600 ve 3200 µg/ml' lik konsantrasyondaki (31) Avemar ile 24 ve 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücre lizatlarındaki Cox-2 miktarı insan Cox-2 kiti (Enzo Life Science) kullanılarak belirlendi. HT29 hücrelerinde VEGF miktarının belirlenmesi için ise insan VEGF elisa kiti (Enzo Life Science) kullanılarak belirlendi. Kitteki yönergeye göre hücreler 96-kuyucuklu plaklara bölündü ve 400, 800, 1600 ve 3200 µg/ml' lik konsantrasyondaki Avemar ile 24 ve 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda besiyerleri alınarak hücrelerden salınan VEGF miktarları belirlendi. Tüm Elisa deneyleri 4 kuyucukta üç tekrarlı gerçekleştirildi.

RT-PCR ile Cox-2 ve VEGF mRNA düzeylerinin belirlenmesi

RNA izolasyonu için 5x10^{5} (hücre/10mm petri) HT29 hücreleri 400 ve 3200 µg/ml' lik konsantrasyondaki Avemar ile 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kitte verilen yönergeye göre RNA izolasyonu yapıldı (RNAeasy mini kit, Qiagen). İzole edilen RNA'ların miktarları spektrofotometrede 260 nm'deki absorbans değerleri okunarak hesaplandı. Tüm RNA'lar QuantiTect® reverse transkriptaz kiti (Qiagen) kullanılarak cDNA'ya çevrildi. Elde edilen cDNA'lar (100 ng) kalıp olarak kullanılıp aşağıdaki tabloda dizileri verilen primerler (Tablo I) ve SYBR Green I (QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Qiagen) ile StepOnePlus™ Real-Time PCR (ThermoFisher Scientific) cihazında gerçek zamanlı PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. PCR şartları, başlangıç denatürasyon 94 ^{o}C'de 5 dakika, 35 döngü olmak üzere denatürasyon 94 ^{o}C'de 30 saniye, annealing 58

Tablo I. Real-time PCR Reaksiyonunda Kullanılan Primer dizileri.

	Forward Primer	**Reverse Primer**
Cox-2	5'-TCACGCATCAGTTTTTCAAGA-3'	5'-TCACCGTAAATATGATTTAAGTCCAC-3'
VEGF	5'-AGG CCA GCA CAT AGG AGA GA-3'.	5'-TTT CCC TTT CCT CGA ACT GA-3'
GAPDH	5'-TCACCAGGGCTGCTTTTAACC T-3'	5'-CAC GCC ACA GTT TCC CGG AG-3'

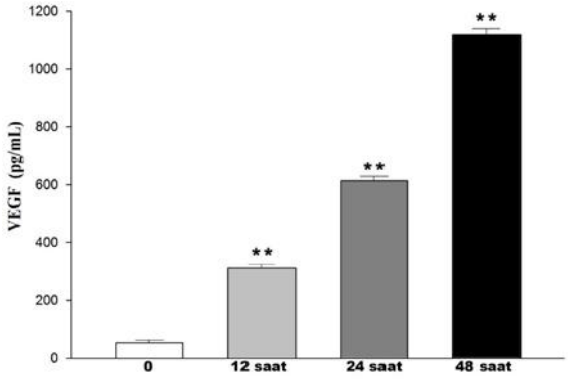
°C'de 45 saniye, zincir uzama 72 °C'de 45 saniye ve son zincir uzama 72 °C'de 5 dakika şeklindedir. Oluşan ürünler, GAPDH geninin ekspresyon düzeyi referans alınarak normalize edilip kantite edildi. Kantitasyon için Livak metodu kullanıldı (32). Tüm PCR reaksiyonları en az üç tekrarlı yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen sonuçların istatistikleri tek yönlü ANOVA ve Dunnutt's multiple comparisons test (GraphPad In Stat, USA) ile yapıldı. Gerçek zamanlı PCR sonuçları StepOnePlus software programında değerlendirildi. Grafik çizimleri için ise Sigma Plot version 10.0 (SPSS Inc, USA) software programı kullanıldı.

BULGULAR

HT29 kolon kanseri hücreleri bazal düzeyde VEGF üretirler, ancak Jung ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 48 saat boyunca serum açlığına bırakılan HT29 hücrelerinden VEGF salınımının arttığı gösterilmiştir (33). Bu çalışmada da, HT29 hücreleri önce 48 saat serum açlığına maruz bırakıldı ve bu süre sonunda hücrelerdeki VEGF protein miktarları elisa ile gösterildi (Şekil 1). Elisa deneyi gereç ve yöntemde belirtildiği gibi 4 kuyucukta üç tekrarlı (n=12) yapılarak VEGF protein miktarları belirlendi ve ortalama ve standart hataları hesaplandı (Tablo II). Ardından, serumsuz ortamda, Avemar'ın dört farklı dozuyla 24 ve 48 saat boyunca muamele edilen hücrelerde, VEGF protein ve mRNA düzeylerindeki değişiklikler elisa ve RT-PCR ile gösterildi. Elisa deneyi gereç ve yöntemde belirtildiği gibi 4 kuyucukta üç tekrarlı (n=12) yapılarak VEGF protein miktarları belirlendi ve ortalama ve standart hataları hesaplandı (Tablo III). Elisa sonuçlarına göre (Şekil 2), kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, avemar ile muamele edilmiş HT29 hücrelerinde, VEGF protein miktarında tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon gözlendi ($p<0.01$). Ardından, protein düzeyindeki bu inhibisyonun transkripsiyonel düzeyde de benzer şekilde olup olmadığını belirlemek amacıyla RT-PCR ile VEGF mRNA düzeyleri gösterildi. Bunun için elisa deneyinde kullanılan dört dozdan 48. saatte en az (%29) ve en çok (%65) inhibisyon gösteren 400 ve 3200 µg/ml'lik doz seçildi. Şekil 3'den de görüleceği üzere serum açlığının indüklediği VEGF artışının Avemar ile inhibe olduğu mRNA düzeyindeki azalışla da gösterildi (Tablo IV). Avemarın 400 µg/ml'lik dozunun VEGF mRNA düzeyinde 1.08 ($p<0.05$), 3200 µg/ml'lik dozunun 4 katlık ($p<0.01$) azalışa sebep olduğu istatistiksel olarak doğrulandı.



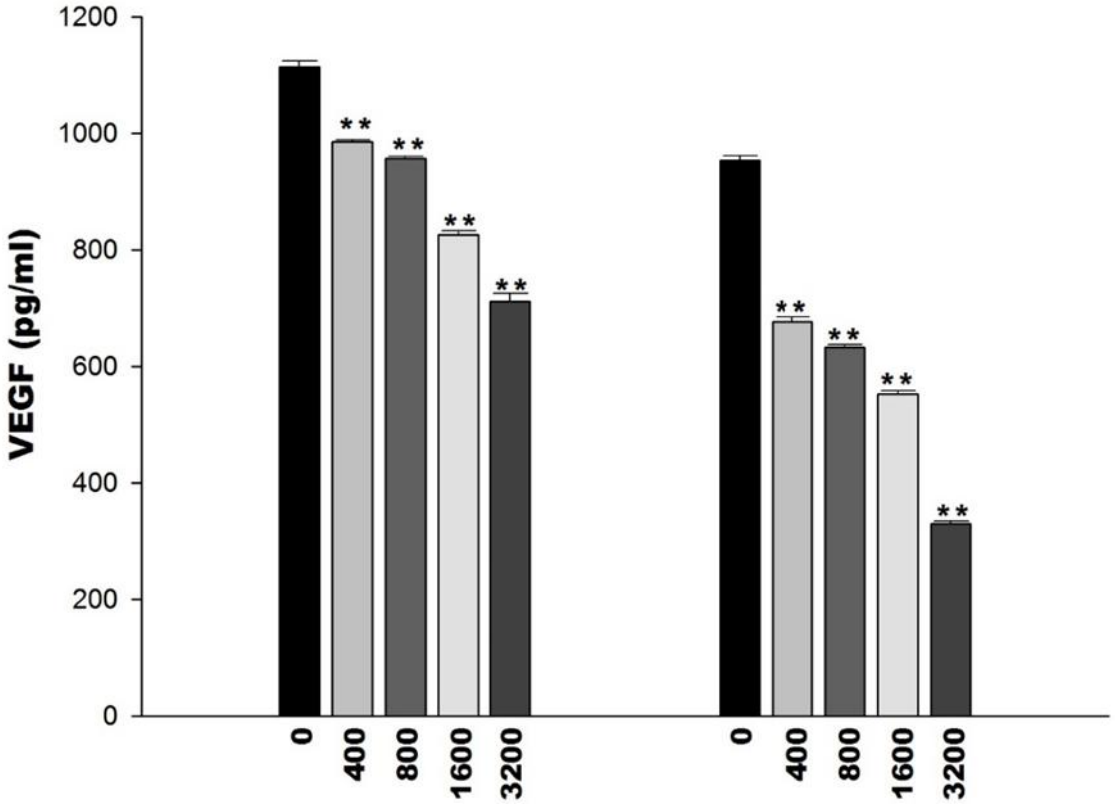
Şekil 1. HT29 hücrelerinde serum açlığı sonrası VEGF protein miktarları (ELISA) (** $p<0.01$). Hücreler 48 saat boyunca serum açlığına bırakıldı ve 0., 12, 24. ve 48. saatlerde Elisa deneyi gereç ve yöntemde belirtildiği gibi 4 kuyucukta üç tekrarlı (n=12) yapılarak VEGF protein miktarları belirlendi.

Tablo II. HT29 hücrelerinde serum açlığı sonrası VEGF protein miktarlarının ortalama ve standart hata değerleri (n=12).

Zaman	VEGF protein miktarı (pg/ml) (Ortalama ± Standart hata)
saat	52.97 ± 1.13
12. saat **	312.46 ± 4.88
24. saat **	613.84 ± 2.04
48. saat **	1118.7 ± 3.77

** : $p< 0.01$

Çalışmanın bundan sonraki hedefi, HT29 hücrelerinde Avemarın sebep olduğu VEGF inhibisyonunun Cox-2 tarafından gerçekleşip gerçekleşmediğini test etmekti. Bunun için serum açlığına maruz bırakılan bu hücrelerde Avemar muamelesinin Cox-2 üzerine etkisini ortaya koymak için Cox-2 protein ve mRNA düzeyleri belirlendi. Elisa sonuçlarına göre (Şekil 4), kontrolle karşılaştırıldığında, 24. saatte Avemarın 400 µg/ml'lik dozu hariç ($p>0.05$) diğer üç dozunun Cox-2 protein düzeyindeki inhibisyonu istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.01$). Şekil 4'de görüldüğü gibi 48. saatteki 3200 µg/

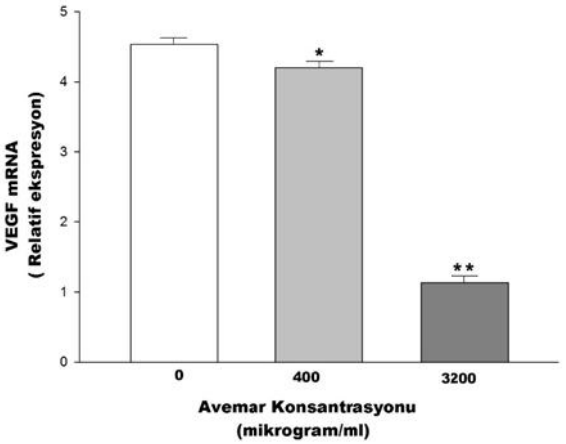


Şekil 2. Serum açlığıyla indüklenen VEGF protein miktarına Avemarın etkisi (ELISA). (** p<0.01). Serum açlığına maruz bırakılan HT29 hücreleri farklı dozlarda Avemar ile muamele edilerek 24 ve 48. saatteki VEGF protein miktarına olan etkisi gereç-yöntemde belirtildiği şekilde Elisa deneyi ile gerçekleştirildi. 4 kuyucukta üç tekrarlı (n=12) şekilde belirlendi. Ortalama ve standart hata

Tablo III. Avemar ile muamele edilen HT29 hücrelerinde VEGF protein miktarlarının ortalama ve standart hata değerleri. (n=12)

Avemar Konsantrasyonu (µg/ml)	VEGF protein miktarı (pg/ml) (Ortalama ± Standart hata)	
	24. saat	48. saat
0	1113.9 ± 9.73	953.75 ± 7.89
400**	984.75 ± 3.86	676.56 ± 8.42
800**	957.16 ± 3.66	632.55 ± 4.11
1600**	825.87 ± 6.03	551.85 ± 5.89
3200**	712.26 ± 12.82	329.49 ± 5.47

ml'lik Avemar uygulaması yaklaşık %77 oranındaki inhibisyonla Cox-2 protein miktarında en fazla azalmayı gösterdi (p<0.01). Bu inhibisyonun Cox-2 mRNA düzeylerinde de gerçekleştiği belirlendi (Şekil 5). Avemarın 400 µg/ml'lik dozunun Cox-2 mRNA düzeyinde 1.07 (p>0.05), 3200 µg/ml'lik dozunun 3.2 katlık (p<0.01) azalışa sebep olduğu istatistiksel olarak doğrulandı.

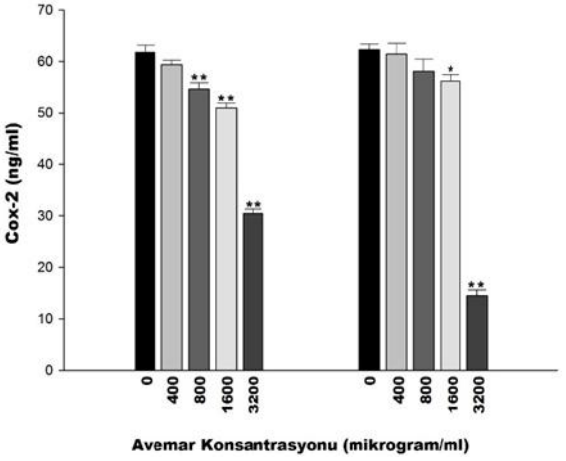


Şekil 3. Avemarın VEGF mRNA düzeyindeki inhibisyon etkisi. Avemarın en yüksek ve en düşük dozlarıyla muamele edilen HT29 hücrelerinde VEGF mRNA düzeyindeki etkisi gereç-yöntemde belirtildiği gibi üç tekrarlı RT-PCR ile gösterildi. (* p<0.05 ; ** p<0.01)

Tablo IV. Avemar ile muamele edilen HT29 hücrelerinde VEGF mRNA düzeylerinin ortalama ve standart hata değerleri.

Avemar Konsantrasyonu (µg/ml)	VEGF mRNA (Relatif ekspresyon) (Ortalama ± Standart hata)
0	4.536 ± 0.08
400*	4.200 ± 0.08
3200**	1.133 ± 0.09

* p<0.05 ; ** p<0.01

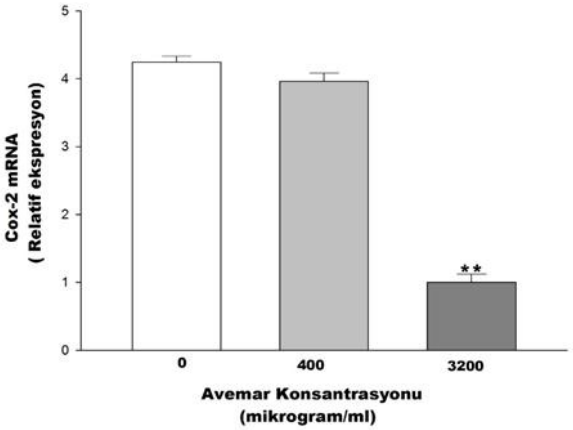


Şekil 4. Avemarın Cox-2 protein miktarlarına etkisi (ELISA). HT29 hücreleri farklı dozlarda Avemar ile muamele edilerek VEGF protein miktarına olan etkisi gereç-yöntemde belirtildiği şekilde Elisa deneyi ile gerçekleştirildi. 4 kuyucukta üç tekrarlı (n=12) şekilde belirlendi. Ortalama ve standart hata hesaplandı (* p<0.05 ; ** p<0.01).

Tablo V. Avemar ile muamele edilen HT29 hücrelerinde Cox-2 protein miktarlarının ortalama ve standart hata değerleri.

Avemar Konsantrasyonu (µg/ml)	Cox-2 protein miktarı (ng/ml) (Ortalama ± Standart hata)	
	24. saat	48. saat
0	61.79 ± 1.34	62.25 ± 1.10
400	59.41 ± 0.82	61.45 ± 2.01
800	54.65 ± 1.21 **	58.10 ± 2.35
1600	50.93 ± 0.93 **	56.14 ± 1.25 *
3200	30.50 ± 0.84 **	14.46± 1.12 **

* p<0.05 ; ** p<0.01



Şekil 5. Avemarın Cox-2 mRNA düzeyindeki inhibisyon etkisi. Avemarın en yüksek ve en düşük dozlarıyla muamele edilen HT29 hücrelerinde VEGF mRNA düzeyindeki etkisi gereç-yöntemde belirtildiği gibi üç tekrarlı RT-PCR ile gösterildi. (** p<0.01)

Tablo VI. Avemar ile muamele edilen HT29 hücrelerinde Cox-2 mRNA düzeylerinin ortalama ve standart hata değerleri

Avemar Konsantrasyonu (µg/ml)	Cox-2 mRNA (Relatif ekspresyon) (Ortalama ± Standart hata)
0	4.245 ± 0.08
400	3.962 ± 0.12
3200 **	1.002 ± 0.11

** p<0.01

TARTIŞMA

Fermente buğday tohumu özütünden elde edilen Avemar, kanser hastalarında özel amaçlar için kullanılan besin takviyesi olarak kabul görmüş bir üründür ve 5-Florourasil ve dacarbazine gibi anti-kanser ajanlarının etkisini sinerjistik olarak artırdığı gösterilmiştir (34). Bazı hayvan modellerinde metastaz oluşumunu azaltıcı etkisi olduğu ve deri graftlarında proliferasyonu inhibe ederek sağ kalım zamanını arttırdığı gösterilmiştir (35,36). Ayrıca, ileri kolorektal kanser hastalarında Avemarın oral kullanımı, tümör metastaz oluşumunu inhibe etmiş ve cerrahi operasyon ve kemoterapiden sonraki sağ kalım süresini uzatmıştır (37,38). Çalışmam, Avemar'ın HT29 insan kolon kanseri hücreleri üzerinde anti-anjiyogenik etkisini VEGF ve Cox-2 gen ekspresyonunu inhibe ederek gerçekleştirdiğini gösteren ilk in vitro çalışmadır.

Yeni kan damarı oluşturma yeteneği, yani anjiyogenez, malignant tümörlerin önemli bir özelliğidir. Yeni oluşturulan tümör damarları, sadece tümörün büyümesi için gerekli beslenmeyi değil tümörün başka organlara metastaz yaparak yayılması için bir kaçış yolu sağlar. En yaygın anjiyogenez uyarıcısı olarak kabul edilen VEGF, kan damarlarını kaplayan endotel hücreler üzerindeki VEGF reseptörlerine bağlanarak yeni damar oluşumunu teşvik eder. Son yıllarda VEGF yolağını bloke edebilen ilaçlar kanser tedavisinin önemli bir bileşeni haline gelmiştir (39). Anjiyogenez sürecinde önemli düzenleyicilerden bir diğeri de Cox-2 molekülüdür. Cox-2 ve VEGF anjiyogenez kaskadının düzenlenmesi yolağında birbirleriyle sıkı bir ilişki içerisindedir (40). Besinlerin içeriğindeki birçok biyoaktif molekülün anti-anjiyogenik etkisi ve bunların kanser gibi anjigenezle ilişkili patojenezlerin önlenmesinde ve tedavisindeki rolleri daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (41). Bu çalışmada da, bitkisel kökenli bir takviye gıda olarak bilinen Avemar'ın, HT29 kolon kanseri hücrelerinde, serum açlığı tarafından uyarılan VEGF indüksiyonunu, Cox-2 gen ekspresyonunu bloke ederek gerçekleştirdiği iddia edilmiştir. Tümör hücrelerinde Cox-2'nin ya direkt olarak VEGF ekspresyonunu artırdığı ya da dolaylı olarak PGE_2 oluşumuna sebep olarak HIF-1α (Hipoksiya indükleyici faktör-1alfa)'yı up regüle ettiği ve bunun da NF-kB (nüklear faktör kappa-B)'yi aktive ederek VEGF gen ekspresyonunu indüklediği bilinmektedir (42). Elde edilen bulgular, Avemar'ın HT29 insan kolon kanseri hücreleri üzerindeki olası anti-anjiyojenik özelliklerine dikkat çekmiştir. Illmer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Avemar'ın yine HT29 hücrelerinde anti-metastatik etkilerini hücre kolonilerinin büyümesini inhibe ederek gösterdiği bulunmuştur, ancak bu çalışmada herhangi bir anti-anjiyojenik faktörün düzeyleri araştırılmamıştır (11). Dolayısıyla elde edilen bulgular, Illmer ve grubunun çalışmasına katkı getirici niteliktedir. Oral kanser hücrelerinde yapılan bir başka çalışmada ise, anjiyogenezde önemli bir diğer molekül olan metalloproteinazlar (MMP) üzerine olan etkileri değerlendirilmiş ve Avemarın anti-metastatik etkisini bu hücrelerde MMP-2'yi inhibe ederek gösterdiği bulunmuştur (31). Bu durumda, Avemarın anti-anjiyojenik etkisinin kanser tipine özgül olduğu iddia edilebilir, ancak bunun için çok daha fazla sayıda kanser hücre tiplerinde benzer çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır ve bunların bir kısmı laboratuarımızda devam etmektedir.

Avemar kullanımının güvenli olduğunu gösteren çok sayıda in vitro, deneysel ve klinik çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin Avemar lenfoid tümör hücrelerinde apopitoza sebep olurken sağlıklı mononüklear hücrelerde apopitozu indüklemediği gösterilmiştir (7) Akut ve sub-akut hayvan çalışmalarında hiçbir toksisiteye ve klinikte yaygın olarak kullanılan sitostatik ilaçlarla kombinasyonunun hiçbir dezavantaja sahip olmadığı rapor edilmiştir (43). Bu fermente buğday özütünün standart kemoterapi ile birlikte uygulanması melanomada hastalığın ilerlemesini yavaşlattığı (44) ve akciğer kanseri hastalarında da yorgunluk hissini azalttığı ve yaşam kalitesini artırdığı gösterilmiştir (45). Son zamanlarda, Avemarın sürekli verilmesi, pediatrik kanser hastalarında sitostatik tedaviye bağlı yan etkilerden en önemlisi olan febril nötropeni insidansını azalttığı gösterilmiştir (46). Şimdiye kadar insanlarda Avemar kullanımına ilişkin toksik yan etkinin bildirilmemiş olmasına bu noktada dikkat çekmek gerekmektedir. Dolayısıyla, yakın gelecekte, Avemarın bu çalışmada gösterilen in vitro anti-anjiyojenik etkilerinin doğrulanması için önce hayvan deneyleri, ardından da klinik çalışmalarda kullanılması için hiçbir sakınca yoktur.

KAYNAKLAR

1. Mueller T, Voigt W. Fermented wheat germ extract-nutrional supplement or anticancer drug? Nutrition Journal 2011; 10: 89.
2. Saiko P, Ozsvar-Kozma M, Madlener S, et al. Avemar, a nontoxic fermented wheat germ extract, induces apoptosis and inhibits ribonucleotide reductase in human HL-60 promyelocytic leukemia cells. Cancer Letters 2007; 250: 323-328.
3. http://www.avemar.com/what_is_avemar
4. Comin-Anduix B, Boros LG, Marin S, et al. Fermented wheat germ extract inhibits glycolysis/ pentose cycle enzymes and induces apoptosis through Poly(ADP-riboz) polymerase activation in Jurkat T-cell leukemia tumor cells. The J Biol Chem 2002; 277 (29): 46408-46414.
5. Mueller T, Jordan K, Voigt W. Promising cytotoxic profile of fermented wheat germ extract (Avemar) in human cancer cell lines. JExp Clin Cancer Res 2011; 30: 42.
6. Telekes A, Kiss-Toth E, Nagy T, et al. Synergistic effect of Avemar on Proinflammatory cytokine production and Ras-mediated cell activation. Ann NY Acad Sci 2005; 1051: 515-528.
7. Fajka-Boja R, Hidvegi M, Shoenfeld Y, et al. Fermented wheat germ extract induces apoptosis and downregulation of major histocompatibility complex I proteins in tumour T and B cell lines. Int J Oncol 2002; 20: 563-570.
8. Telekes A, Hidvegi M. Avemar's mechanism of action (2)- Immunological effects. Nögyogyaszati Onkologia 2001; 6: 40-41.
9. Boros LG, Nıchelatti M, Shoenfeld Y. Fermented wheat germ extract (Avemar) in the treatment of cancer and autoimmune diseases. Ann NY Acad Sci 2005; 1051: 529-542.
10. Hidvegi M, Raso E, Tömösközi-Farkas R, Lapis K, Szende B. Effect of MSC on the immune response of mice. Immunopharmacology 1999; 41: 183-186.

11. Illmer C, Madlener S, Horvath Z, et al. Immunologic and biochemical effects of fermented wheat germ extract Avemar. Exp Biol Med 2004; 230: 144-149.
12. Du Bois RN, Abramson SB, Crofford L, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. FASEB J 1998; 12: 1063-1073.
13. Shiff SJ, Shiprasad P, Santini DL. Cyclooxygenase inhibitors: drugs for cancer prevention. Curr Opin Pharmacol 2003; 3: 352-361.
14. Xiong B, Sun TJ, Hu WD, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer and its clinical significance. World J Gastroenterol 2005; 28; 11 (8): 1105-1108.
15. Zhou ZG, Wu XJ, LiL R, et al. A multivariate analysis of prognostic determinants for stage II and III colorectal cancer in 141 patients. Chin Med J (Engl) 2011; 124(14): 2132-2135.
16. Nakamoto RH, Uetake H, Iida S, et al. Correlations between cyclooxygenase expression and angiogenic factors in primary tumors and liver metastases in colorectal cancer. Jpn J Clin Oncol 2007; 37 (9): 679-685.
17. Kobayashi H, Sugihara K, Uetake H, et al. Messenger RNA expression of cox-2 and angiogenic factors in primary colorectal cancer and corresponding liver metastasis. Int J Oncol 2009; 34(4): 1147-1153.
18. Kolev Y, Uetake H, Iida S, et al. Prognostic significance VEGF expression in correlation with Cox-2, microvessel density, and clinicopathological characteristics in human gastric carcinoma. Ann Surg Oncol 2007; 14(10): 2738-2747.
19. Yang Q, Ye ZY, Zhang JX, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 mRNA and vascular endothelial growth factor protein in gastric carcinoma and its relationship to its pathological features and prognosis. Anat Rec (Hoboken) 2010; 293(12): 2012-2019.
20. Noriyuki M, Sumi T, Zhi X, et al. Vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinases, and cyclooxygenase-2 influence prognosis of uterine cervical cancer in young women. Int J Oncol 2007; 31(3): 531-536.
21. Gaffney DK, Haslam D, Tsodikov A, et al. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and vaskular endothelial growth factor negativelly affect overall survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2003; 56 (4): 922-928.
22. Byun JH, Lee MA, Roh SY, et al. Association between cyclooxygenase-2 and matrixmetalloproteinase-2 expression in non-small cell lung cancer. Jpn J Clin Oncol 2006; 36(5): 263-268.
23. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a Mouse model of experimental liver metastasis. J Clin Invest 1995; 95: 1789-1797.
24. Reinmuth N, Liu W, Fan F, et al. Blockade of insulin -like growth factor I receptor function inhibits growth and angiogenesis of colon cancer. Clin Cancer Res 2002; 8: 3259-3269.
25. Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, et al. Inhibition of growth factor production and angiogenesis in human cancer cells by ZD1839 (Iressa), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. Clin Cancer Res 2001; 7: 1459-1465.
26. Takahashi Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. p53, vessel count and vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer. Int J Cancer 1998; 79: 34-38.
27. Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, et al. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. Cancer Res 1995; 55: 4575-4580.
28. Ellis LM, Staley CA, Liu W, et al. Down-regulation of vascular endothelial growth factor in a human colon carcinoma cell line transfected with an antisense expression vector specific for c-src. J Biol Chem 1998; 273: 1052-1057.
29. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. Cell 1998; 93: 705-716.
30. Tsujii M, Kawano S and DuBois RN. Cyclooxygenase -2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 3336-3340.
31. Yang MD, Chang WS, Tsai CW, et al. Inhibitory effects of AVEMAR on proliferation and metastasis of oral cancer cells. Nutrition and Cancer 2016; 68(3): 473-480.
32. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(−delta delta C(T)) method. Methods 2001; 25 (4), 402-408.
33. Jung YD, Nakano K, Liu W, Gallick GE and Ellis LM. Extracellular signal-regulated kinase activation is required for up-regulation of vascular endothelial growth factor by serum starvation in human colon carcinoma cells. Cancer Res 1999; 59, 4804-4807.
34. Hidvegi M, Raso E, Tomoskozi-Farkas R, et al. MSC, a new benzoquinone-containing natural product with antimetastatic effect. Cancer Biother Radiopharm 1999; 14: 277-289.
35. Szende B, Raso E, Hidvegi M, et al. A new benzoquinone-containing antimetastatic product. Orv Hetil 1998; 139: 2893-2897.
36. Hidvegi M, Raso E, Tomoskozi Farkas R, et al. Effect of MSC on the immune response of mice. Immunopharmacology 1999; 41: 183-186.
37. Jakab F, Shoenfeld Y, Balogh A, et al. A medical nutriment has supportive value in the treatment of colorectal cancer. Br J Cancer 2003; 89: 465-469.
38. Zhang JY, Xiao X, Dong Y, et al. Effect of fermented wheat germ extract with lactobacillus plantarum dy-1 on HT-29 cell proliferation and apoptosis. J Agric Food Chem 2015; 63: 2449-2457.
39. R. S. Kerbel, Tumor angiogenesis. N Engl J Med 2008; 358: 2039-2049.
40. Taleb H, Morris RK, Withycombe CE, et al. Date syrup derived polyphenols attenuate angiogenic responses and exhibits anti-inflammatory activity mediated by VEGF and COX-2 expression in endothelial cells. Nutrition Research 2016; doi: 10.1016/j.nutres.2016.02.010.
41. Fan TP, Yeh JC, Leung KW, et al. Angiogenesis: from plants to blood vessels. Trends Pharmacol Sci 2006; 27: 297-309.

42. Angelo LS and Kurzrock R. Vascular Endothelial Growth Factor and Its Relationship to InflammatoryMediators. Clin Cancer Res 2007; 13(10): 2825 -2830.
43. Szende B, Marcsek Z, Kocsis Z, Tompa A. Effect of simultaneous administration of Avemar and cytostatic drugs on viability of cell cultures, growth of experimental tumors, and survival of tumor-bearing mice. Cancer Biother Radiopharm 2004; 19: 343-349.
44. Demidov LV, Manzjuk LV, Kharkevitch GY, Artamonova EV, Pirogova NA. Antimetastatic effect of Avemar in high-risk melanoma patients Int J Cancer 2002; 100 (Suppl 13): 408.
45. Hidvegi M, Moldvay J, Lapis K, Ajkay Z. Fermented wheat germ extract improves quality of life in lung cancer patients [English translation]. Medicus Anonymus/ Pulmono 2003; 11(Suppl 1):13-14.
46. Garami M, Schuler D, Babosa M, et al. Fermented wheat germ extract reduces chemotherapy induced febrile neutropenia in pediatric cancer patients. J Pediatr Hematol Oncol 2004; 26: 631-635.