Derleme/Review
Makale Dili "Türkçe"/Article Language "Turkish"

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

# Nitrik oksitin kanser gelişimi ve metastaz üzerine etkileri

## The effects of nitric oxide on cancer development and metastasis

Mehmet Kürşat DERİCİ[1], Emine DEMİREL-YILMAZ[2]

**ÖZET**

Nitrik oksit (NO), birçok hücre içi ya da hücreler arası uyarı yolağında görev alan benzersiz bir moleküldür. Farklı kanser hücrelerinde ve dokularında saptanan değişik NO düzeylerinin, farklı düzenleyici etkiler ortaya koyduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Yapısal olarak üretilen NO, kanser hücresi fenotipinin ortaya konmasında önemli rol üstlenmektedir. Bu; kanserin çevre dokulara penetre olmasını, uzak bölgelere yayılmasını ve gelişimi için gerekli olan kaynaklara ulaşabilmesi sağlayacak, en yüksek kan akımını alacağı damarlanma işlevini; kapsamaktadır. Genel olarak, dokuda düşük derişimlerde sentezlenen NO'in etkileri pro-kanseröz olarak değerlendirilebilir. Çok yüksek derişimlerde ise NO, apopitozu, nekrozu uyararak veya anjiyojenezi inhibe ederek, güçlü bir anti-kanser madde olarak görev yapmaktadır. Öte yandan, NO düzeylerindeki artışın, metastaz basamakları üzerine olan etkileri sebebiyle kanserin farklı lokalizasyonlarda büyümesini ve ilerleyişini arttırabildiği ortaya konmuştur. Metastazda NO'in oynadığı rol, hücre tipi, NO derişimi, katılan organlar veya NO'in kanseral sürece katıldığı dönem gibi, farklı faktörlerden etkilenmektedir. NO'in bu çok yönlü ve farklı etkileri, kanserin büyümesini yavaşlatmak ve kemoterapi/radyoterapi etkinliğini arttırmak amacıyla, kanserin birçok preklinik modellerinde kullanılmaktadır. Bu yaklaşımlar yeni anti-kanser stratejileri olarak ön görülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Nitrik oksit, tümör, metastaz

**ABSTRACT**

Nitric oxide (NO) is unique molecule involved in many intracellular or intercellular signaling pathways and its importance varies from cell to cell. It is demonstrated that heterogeneous regulating responses to various NO levels have been observed in in different types of tumors. Constitutively expressed NO plays an important role in drawing up the phenotype of tumor cells. The roles of NO in tumor growth cover the tumor penetration into the surrounding tissues to spread to remote areas and the development of the neovascularization to obtain the highest blood flow for the necessary resources. Generally, effects of NO at low concentrations considered as pro-tumoral. In very high concentrations of NO, it serves as a potent anti-tumor agent by inhibiting angiogenesis or inducing apoptosis and/or necrosis. While NOS activation is expected to show anti-tumor effect, it has been demonstrated that NO may increase the progression and propagation of cancer due to the effects on metastasis process. The effect of NO on metastasis is affected by different factors such as cell type, dose, the types of participating organs or the period in which NO involved in the tumor development. These different characteristic effects of NO expression are used therapeutically in many preclinical models of cancer in order to increase the inhibition of tumor growth and chemotherapy/radiotherapy efficiency. These approaches are envisaged as new anticancer strategies.

**Key Words:** Nitric oxide, neoplasms, metastasis

[1]Hitit Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Çorum
[2]Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara

İletişim / Corresponding Author : Mehmet Kürşat DERİCİ
Hitit Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Çorum - Türkiye
Tel : +90 532 348 07 67 E-posta / E-mail : mkursatderici@hitit.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 17.11.2016
Kabul Tarihi / Accepted : 10.03.2016

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2017.00378

Derici MK, Demirel-Yılmaz E. Nitrik oksitin kanser gelişimi ve metastaz üzerine etkileri. Turk Hij Den Biyol Derg, 2017; 74(2): 161-174

## GİRİŞ

Nitrik oksit (NO)'in kanser hücrelerine sitotoksik ve sitostatik etkileri ile ilgili farklı bulgular vardır. Kanser biyolojisinde bulunan hücre proliferasyonu, apopitozis, hücre migrasyonu, invazyonu, anjiogenezis gibi birçok farklı biyolojik yolakta NO'in etkileri araştırılmakta olup prokanserojen ya da antikanserojen olduğunu iddia eden çalışmalar bulunmaktadır.

NO son yıllarda tanınan ve düz kas gevşemesi, trombosit agregasyonu ve nöronal uyarı iletimi gibi birçok biyolojik olayda önemli rolü olduğu kanıtlanan, çok kısa yarı ömürlü bir serbest radikaldir. NO, L-argininden NO sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla sentezlenir. NOS'ın nöronal (nNOS: NOS-1,) uyarılabilir (iNOS: NOS-2) ve endoteliyal nitrik oksit sentaz (eNOS: NOS3) olmak üzere, farklı üç izoformu tesbit edilmiştir (1). Farklı NOS tipleri, farklı birçok hücre tarafından eksprese edilirler. eNOS ve nNOS hücrelerde yapısal olarak bulunur ve kalsiyum/kalmodulin bağımlıdır. Hücre içi serbest kalsiyum iyonu artışı ile aktive olurlar. Kısa süreli olarak ve az miktarda NO üretimine yol açarlar. nNOS temel olarak sinir hücrelerinde bulunur ve nöronal iletimde rol alır (2). Bunun yanısıra nNOS enziminin iskelet kası, kalp kası ve akciğer epitel hücreleri gibi nöronal olmayan hücrelerde de eksprese edildiği gösterilmiştir (3, 4). İlk kez damar endotelinde varlığı gösterilen eNOS'un; kardiyak miyositlerde ve hipokampal piramidal hücrelerde de bulunduğu ortaya konmuştur (5). iNOS enzimi, diğer tiplerin aksine transkripsiyonel olarak düzenlenir ve aktivasyonu için, hücre içi kalsiyum artışına gereksinim duymaz. Hücreye TNF-alfa, interferon, interleukin-1, endotoksin, hipoksi, okside LDL ve liposakkaritler gibi farklı inflamatuvar ajanların etkisiyle, ekspresyonu uyarılır (6). Makrofajlar, karaciğer kuffer hücreleri, osteoklastlar, mikrogliyalar, astrositler, epitelyal hücreler ve miyositler gibi çok değişik hücre tiplerinin iNOS eksprese edebildiği gösterilmiştir (7).

Her üç tip enzim tarafından sentezlenen NO, yağda eriyen bir molekül olduğundan kolayca hücre zarlarını geçer ve hedef hücreleri etkiler. NO'in hedef hücrede cGMP'i arttırması ilk ortaya konan etki mekanizmasıdır. Daha sonra, cGMP'den bağımsız etkiler de tanımlanmıştır. Günümüzde NO'in üç farklı kimyasal tepkime aracılığıyla etki gösterdiği kabul edilmektedir.

1) Nitrozilasyon: Hücrede NO'in bazı proteinlerin metal çekirdeklerine bağlanmasıdır (metal nitrozilasyonu). Birçok proteinin yapısında bulunan demir, bakır, çinko gibi metallerle tepkimeye girerek, onların işlevlerini değiştirebilmektedir (8, 9). İlk ortaya konan etki mekanizması olan cGMP artışı, NO'in hücrenin suda çözünen bölümünde bulunan "çözünen guanilat siklaz" (soluble guanylate cyclase: sGC) enziminin aktivasyonu sonucudur. Sitokrom C enziminin NO'le inhibisyonu da, enzimin bakır çekirdeğiyle oluşan tepkime sonucudur (10).

cGMP yolağı, NO'in etkilerini göstermesinde kullandığı ana mekanizma olup bu yolakda NO, çözünebilir Guanilat Siklaz (sGC) enziminin "hem" çekirdeğine bağlanarak GTP'den cGMP'nin sentezlenmesine neden olur. Protein kinaz G (PKG), cGMP'ye seçici bir enzimdir ve cGMP'nin ana hedefi konumundadır. 10 cAMP ve cGMP'yi parçalayan fosfodiesteraz (PDE) enzimleri, cGMP'nin önemli hedefleri arasındadır. PDE enzimleri, dizi benzerliğine, cAMP veya cGMP seçiciliğine ve düzenlenme mekanizmalarına göre 11 farklı gen ailesi olarak gruplandırılmıştır. PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 ve PDE11 hem cAMP hem de cGMP'yi hidrolize edebilen seçici olmayan enzimlerdir. PDE4, PDE7 ve PDE8 yalnızca cAMP'yi; PDE5, PDE6 ve PDE9 ise yalnızca cGMP'yi hidrolize edebilen seçici enzimlerdir. cGMP PDE2'yi aktive ederken, PDE3'ü inhibe etmekte ve böylece hücre içi cAMP düzeylerini de etkilemektedir. cGMP, HCN ve CNG kanallarını da uyarabilmektedir (11,12).

Diğer iki yolak "cGMP'den bağımsız yolak olarak adlandırılmaktadır.

2) Nitrozasyon: NO, proteinlerin tiyol gruplarına bağlanarak S-nitrozotiyolleri oluşturmaktadır. Bu tepkime S-nitrozilasyon olarak da adlandırılmıştır.

3) Nitrasyon İle Oksidasyon: Proteinler, lipidler ve alkollere bir nitrozo grubunun bağlanması nitrasyon olarak bilinmektedir. Ortamın oksijen, karbondioksit ve pH düzeyine bağlı olarak; NO ve süperoksit radikalinin arttığı durumlarda, ortaya çıkan tepkimelerdir. Nitrozatif stres olarak adlandırılan bu durumda, peroksinitrit radikali (ONOO-) en çok suçlanan radikaldir (13). NO'in hangi etki mekanizmasını kullanacağı, ortamın redoks dengesine ve NO derişimine bağlıdır. Ortamdaki NO/süperoksit ($O^{\cdot}2^{-}$) oranının, oluşacak tepkimeyi belirlediği söylenmektedir (14,15).

Dokuda bulunan NOS enzimlerinin farklı mekanizmalar ile uyarılması sonucu sentezlenen NO'in sentez hızı ve miktarına, dokunun yapısal özelliklerine (16) ya da dokularda bulunan farklı fosfodiesteraz türlerine bağlı olarak farklılıklar gösterebilir (17). Bunun yanı sıra, nNOS ve eNOS tarafından sentezlenen NO biyolojik işlevini, cGMP bağımlı yolaklar üzerinden gösterirken; iNOS aktivasyonu sonucu ortaya çıkan NO'in daha çok cGMP bağımsız yolaklar aracılığı ile biyolojik ve patolojik etkiler gösterdiği ortaya konulmuştur (18). Yapısal olan nNOS ve eNOS uyarılması ile üretilen NO, kısa süreli ve nanomolar düzeyleri gibi düşük NO derişimleri ile salgılanmaktadır. Uyarının tipine ve süresine bağlı olmakla beraber iNOS tarafından üretilen NO miktarı ise, uzun süreli (saatler, günler) ve yüksek derişimde (normalin 40 katına kadar çıkabilmekte) salgılanmaktadır (19, 20). Enzimlerin aktivasyonlarından kaynaklanan NO'in salınım farklılıkları da etkinlikte fark yaratan önemli bir unsur olarak karşımıza çıkar. NO'in yapısal NOS enzimleri tarafından düzenli atımlar şeklinde üretilmesi ya da iNOS aktivasyonu sonucunda devamlı ve yüksek miktarlarda üretilmesi, NO'in biyolojik haberci ya da sitotoksik ajan işlevi görmesi arasındaki belirleyicidir. Örneğin iNOS aktivasyonu sonucu üretilen NO'in, aktive edilmiş fare makrofajları üzerinde anti-proliferatif etkili olduğu gösterilmiştir (21). Buna ek olarak iNOS retiküloendotelyal hücrelerin bakteriostatik etkilerinde ve makrofajlar ile T lenfositlerinin immunojenik ve sitotoksik etkilerinde önemli bir rol oynamaktadır (22).

## Kanser Hücresi Gelişimindeki NO'in Rolü

Hücrelerde sentezlenen nitrit ve nitratların bakteriyel hücreler ya da kanserli hücreler üzerinde sitotoksik etkileri ilk olarak fare makrofajlarında gösterilmiştir (23, 24). Öte yandan, kanserli dokularda, özellikle santral sinir sisteminin malign kanserlerinde ve mesane kanserlerinde, NOS enziminin büyük oranda eksprese edildiği ve genellikle up-regüle olduğu (örneğin santral sinir sisteminin malign kanserlerinde ve mesane kanserlerinde) birçok çalışmada ortaya konmuştur (25). Buna ek olarak, artmış iNOS ekspresyonu ile mide ve kolorektal kanserlerin yüksek metastaz insidansı ve kötü prognozu arasında, paralel bir ilişki olduğu da iddia edilmektedir. İnsan meme kanserinde NOS ekspresyonunun ve total NOS aktivitesinin yaklaşık beş kat arttığı gösterilmiştir (26). Ancak NO'in hem pro-kanser hem de anti-kanser aktivite gösterebileceği, birçok farklı çalışmaya ait veri ile ortaya çıkmıştır (27).

NOS ekspresyonu ve kanser cevabı arasında doz bağımlı bir ilişkinin bulunmaktadır. NO ile yüksek derişimlerde anti-neoblastik bir etki dikkati çekerken, düşük derişimlerde pro-anjiogenik ve pro-kanseröz etkiler ağır basmaktadır. Yüksek NO düzeylerinin programlı hücre ölümüne (apopitoz) neden olduğu, düşük NO düzeylerinin ise hücreleri apopitozdan koruduğu, iddia edilmektedir (28).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, kanser dokusunda endojen NO düzeyinin normal dokuya oranla yüksek bulunduğu gösterilmiştir. Kanser NOS enzimlerinin NOS inhibitörleri ile bloke edilmesi ile

kanser büyümesinin gerilediği görülmüş ve bu da biyolojik olarak anti-tümoral aktivite gösteren ilaçlar için bir mekanizma olarak düşünülmüştür. Aksine NO sentezinin aşırı arttığı durumlar ise hücrelerin yüksek oksidatif strese maruz kalmalarına bağlı olarak hücre ölümü yolaklarının aktive olmasına neden olmaktadır (29).

Tümoral dokudaki NOS ekspresyonuna dair ilk çalışma insan adeno kanser hücre hattında yapılmıştır. Hem primer kanser hem de metastatik kanserde Ca-bağımsız NOS aktivitesi saptanmış ve NOS aktivitesinin inhibisyonu, primer kanserin metastatik potansiyelini, metastatik kanser düzeyine çıkarmıştır. Bu bilgi NO'in kanser progresyonundaki destekleyici etkisinin ilk kanıtı olmuştur (30).

Solid kanserlerin bulunduğu bölgede gelişimi ve büyümesinde en önemli faktör anjiogenez yani yeni damar oluşumudur. Anjiogenezin yeteri kadar bulunmadığı durumlarda solid kanserler sadece pasif difüzyon ile gelişebilirler. Yapılan çalışmalarda, in vivo kanser implantasyonundan sonra, aktif anjiogenez gelişiminin olmadığı durumlarda kanser büyümesinin ancak 2 mm'ye kadar mümkün olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle NO'in doz bağımlı pro-anjiojenik ve anti-anjiogenik etkisi merak uyandırmıştır. Jones ve ark. çalışmalarında NO donörü olan S-nitro-N-acetyl-penicillamine (SNAP) kullanarak yaptıkları çalışmada, düşük SNAP (0,1-0,3 mM) derişimlerinde %46'ya ulaşan anlamlı anjiogenez artışı, yüksek derişimlerde pro-anjiogenik etkinin bozulmaya başladığı ve yüksek SNAP düzeyinde (4 mM) %80 oranda anjiogenezi inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır (31).Bunun yanısıra Protein Kinaz C (PKC), Ekstraselluler Signal-regulated Protein Kinaz (ERK) ve Aktivator Protein-1 (AP1) gibi protein kinazların yüksek SNAP derişimlerinde inhibe olduğu, düşük derişimlerde ise up-regule olduğu da gösterilmiştir (32). Bu bulgular kanser gelişiminde ve anjiogenezis üzerinde NO'in doz bağımlı etkisinin olduğunu düşündürmektedir.

### A. NO'in Kanser Oluşumunu ve Gelişimini Arttırıcı Etkileri

GNO'in kanser oluşumu ve prognozu üzerine karmaşık bir rolü bulunmaktadır. NO'in kanser gelişimi üzerine etkisi birçok in vivo, in vitro ve ex vivo kanser modellerinde çalışılmıştır. Bu çalışmalarda kanser dokularında NOS ekspresyonunun düzeyinin yüksek olması, NO'in kanser gelişimini destekleyici etkinliği ile ilişkilendirilmiştir. Son yıllarda gerçekleştirilen bir çalışmada iNOS pozitif kanserlerde kansere bağlı ölümlerin, iNOS negatif kanserlere göre daha fazla olduğu görülmüş ve yüksek iNOS ekspresyonunun kanserden ölüm riskini arttırdığı belirlenmiştir (33). Andrade ve ark. oral L-NAME (NG-nitro-L-arginine methyl ester, seçici olmayan NOS inhibitörü) uygulanması ile fare adenokanseri ve melanom modeli üzerinde çalışmışlar ve NOS'in farmakolojik olarak inhibisyonu ile tümor kan akımının azaldığını göstermişlerdir. Bu azalma L-arginin verilmesi ile geriye çevrilmektedir (34). Kennovin ve ark. eksvivo kanser preparatında yaptıkları araştırmada, kanserli dokuyu besleyen epigastrik arterden L-NMMA (NOS inhibitörü) perfüzyonu ve artan dozlarda fenilefrin (vazokonstriksiyon yapıcı madde) perfüzyonu uygulamışlardır. NOS inhibitörü uygulanan tümoral dokuyu besleyen arterlerde, normal dokuları besleyen arterlere göre daha yüksek internal perfuzat basıncı değerleri ortaya çıkmış ve bu etki 1 mM L-Arginin (NO öncüsü) perfüzyonu ile kontrol değerlerine geri dönmüştür. Kanser dokusunu ya da normal dokuyu besleyen epigastrik arterler arasında fenilefrine karşı verilen arteriyel cevapta görülen bu farklılık, NO tarafından ortaya çıkarılan vazodilatasyonun kaybı olarak yorumlanmıştır (35). Kanser dokusunu besleyen arterlerin farklı cevaplarına neden olan etkinin, kanser dokusundaki artmış iNOS ekspresyonu olduğu konusunda ön bulgular elde etmişlerdir.

Kanser dokusundaki patolojik iNOS yüksekliğinin, kanserin seçici olarak hedeflenmesinde potansiyel bir mekanizma olarak kullanılabileceği düşünülmüştür. NOS inhibitörlerinin anti-kanser etkileri, invivo olarak

yapılan deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Sıçan p22 karsino-sarkomalarında yapılan bir çalışmada oral olarak L-arginin ve L-NAME kullanılmış ve kanser büyümesi takip edilmiştir. İçme sularına L-NAME katılan fare gruplarında kanser büyümesi kontrol farelere göre anlamlı olarak baskılanmıştır (36). NOS inhibitörleri kullanarak kanser damarlanmasının azaltılması ile ilgili çalışmalar giderek önem kazanmıştır. Değişik L-arginin analogları aracılığıyla NOS inhibisyonu sonucu ortaya çıkan anti-kanser etkiler gösterilmiş olmasına karşın; tek başına etkili bir tedavi yönteminin olduğunu konusunda henüz kesin veriler elde edilmemiştir. Bu nedenle, farklı yöntemlerin kullanımı ile NOS ekspresyonunun inhibisyonu tedavisinin, diğer etkin tedavi edici yöntemler ile kombine edilerek sonuç alınabileceği düşünülmektedir.

NOS inhibisyonu ile kanser gelişiminin baskılanmasının anjiogenezden farklı mekanizmalar yolu ile de olabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Orucevic ve Lala'nın çalışmalarında hem normal hem de kanserli hayvanlarda L-NAME uygulamasının kapiller sızıntıyı düzeltici etkisinin olduğu ve bu sayede güçlü bir anti-kanser etkinin ortaya çıktığı gözlenmiştir (37). Bu düzelmenin, IL-2 dağılımı ile ilgili olduğu yapılan çalışma sonucu düşünülmektedir (37). Ortaya çıkan anti-kanser etkinin yalnızca kanseri besleyen damarsal yapılarda görülen bir vazokonstriksiyon nedeniyle olmadığı, buna ek olarak lenfokin ile aktive olan öldürücü (Lymphokine Activated Killer/ LAK) hücrelerin uyarılması ile aktive olan, immün cevap yoluyla ortaya çıkan, bir ikincil etkinin önemi vurgulanmaktadır.

Sıçan izole perfüze organ modelinin kullanıldığı bir başka çalışmada, Tümör Nekroze Edici Faktör (TNF), alkilleyici grup anti-kanser bir ajan olan melphalan ve L-NAME'in farklı kombinasyonlarının etkisi, BN175 sarkom kanserlerinde incelenmiştir (38). Tek başına kullanıldıklarında etkisiz ya da sınırlı etkileri gözlenen L-NAME, TNF ve melphalan infüzyonlarının; aynı anda kullanılması ile hayvanların %100'ünde kısmi cevaba, %70'inde ise kanserin tamamen gerilemesine yol açtığı; kanıtlanmıştır. L-NAME'in tedavi edici etkinliğinin birinci nedeni, kanseri besleyen damarsal yapılarda ortaya çıkan daralma ve bu nedenle kanserli dokunun ihtiyacı olan besin maddelerinin kısıtlanması olabilir. İkinci nedeni ise, TNF tedavisinin ana kısıtlayıcı komplikasyonu olan hipotansiyonun engellenmesidir. Bu durumda, TNF'nin NOS inhibitörleri ile kombinasyonu, TNF'nin tedavi etkinliğini ciddi olarak arttırmaktadır (38).

Bu faktörlere ek olarak, yakın zamanlı araştırmalarda kanser mikroçevresi üzerinde giderek daha fazla durulmaktadır. Östrojen reseptörü içermeyen meme kanserlerinde, iNOS tarafından düzensiz olarak oluşturulan NO'in, kanser mikroçevresinde COX-2 aktivitesi artışı ve Hipoksi ile Uyarılan Faktör-1 (HIF-1) proteini stabilizasyonu gibi yolaklar üzerinden, prognozu kötüleştirdiği ifade edilmektedir (39).

Genel olarak, NO'in kanser gelişimi üzerindeki destekleyici etkisinin mekanizmaları şu şekilde ifade edilebilir:

1. Apopitozis üzerine olan baskılayıcı etkiler.
   - Kaspaz enzimlerinin (Kaspaz 1,2,3,4, 6,7,8) S-nitrozilasyonu ile inhibisyonu.
   - APAF-1/Kaspaz-9 kompleksinin bozulmasına yol açması.
   - Isı şoku proteini-70 (Heat-shock protein-70: HSP-70) artışı.
   - p53 mutasyonuna neden olması.
   - Siloksijenaz-2 (Cox-2) aktivasyonu.
2. Onkogenlerin aktive olmasına bağlı hücre proliferasyonu.
3. Anjiogenezisin uyarılması.
4. Reaktif oksijen radikallerinin neden olduğu DNA hasarı.
5. DNA bazlarının deaminasyonuna bağlı genotoksik hasar.
6. DNA onarım enzimlerinin inhibisyonuna neden

olan biyolojik aminlerdeki nitrosazyon.

7. NO'in ortaya çıkardığı toksik bileşiklerin neden olduğu protein yapıdaki bozulmalar.

### B. NO'in Kanser Oluşumunu ve Gelişimini Baskılayıcı Etkileri

Aşırı NO üretiminin anjiogenezi inhibe ederek anti-kanser etkiler gösterdiği, Jones ve ark. tarafından ortaya konmasından sonra, NO'in doğrudan anti-kanser etkileri olabileceği iddia edilmiştir (31). iNOS ekspresyonunun artışı ile anti-kanser etkinlik arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacı ile yüksek metastatik karakterli melanomalar ile non-metastatik tipler karşılaştırılmış ve non-metastatik klonların daha yüksek düzeylerde endojen NOS eksprese ettiğini ortaya konmuştur (40). Buna ek olarak; non-metastatik türlerde kültür medyumunda nitrit düzeylerinin daha yüksek olduğu, metastatik tiplerde ise daha düşük bulunduğu, bu düşüklüğün L-NMA (NG-Methyl-L-arginine, NOS inhibitörü) varlığında ortadan kalktığı gösterilmiştir. Buna ek olarak; RNA ve protein analizleri ve toksisite deneyleri, İnterferon gama uygulanan farelerde iNOS aktivitesinin arttığını ve kanser hücrelerinde apopitoz oranının yükseldiğini göstermiştir. L-NMA uygulaması ile NO'in anti-kanser etkileri tamamı ile ortadan kalkmıştır (41). Kanserde NO düzeylerini dokuda yükseltmek için diğer yaklaşımlar; NO donörü kullanmak ya da fonksiyonel iNOS geninin transfeksiyonudur. Genellikle NO donörünün sistemik yüksek düzeylerde uygulaması hipotansiyona neden olmaktadır. Ancak Glutatyon S-transferaz tarafından aktive edilen NO donörleri kanser tedavisinde umut vadetmektedir (42). Bu ajanlardan JS-K (4ug/mL) intravenöz olarak uygulanması, subkutanöz implantasyon ile oluşturulmuş fare Multiple Myelom kanserini anlamlı olarak baskılamıştır. Bu etkinin altında kanser apopitozisinin yattığı görülmüştür. Xie ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, yüksek metastatik tipte ve düşük endojen NO üretimi bulunan K-1735 hücreleri implante edilen farelere, iNOS geni transfeksiyonu yapıldıktan sonra, kanser büyümesinin yavaşladığı gösterilmiştir (43). Gelişmekte olan bir kanser dokusu için besin kaynağı sağlayan kan damarı gelişiminin hayati önemi bulunmaktadır. Worthington ve ark. fare kuyruk veninde yaptıkları bir araştırmada, kanser gelişimini engellemek için, seçici olarak kanser mikrovasküler yatağının hedeflenmesinin gerektiğini belirtmişlerdir.

Eş zamanlı olarak hipoksik kanser dokusunun tespit edilmesi sağlanarak konvensiyonel fraksiyone radyoterapi uygulanmasının, tedavinin gücünü arttıracağı yapılan çalışmalarda ifade edilmiştir (44). NO'in kanser hücrelerinde radyosensitiviteyi arttırdığını iddia eden başka çalışmalar da bulunmaktadır. iNOS transfeksiyonu yapılan kanser hücrelerin radyoterapiye daha hassas oldukları gösterilmiştir. RIF-1 ve HT-29 kanser hücreleri ile yapılan fare modeli kullanılan bir çalışmada, WAF1/iNOS gen transfeksiyonu ile beraberinde radyoterapi uygulanmıştır. Hem RIF-1 hem de HT29 kanserlerinde hedefleme ile uygulanan WAF1/iNOS radyosensitizasyon yöntemi ile kanserde istatistiksel anlamlı oranda gerileme görülmüştür (45). Adenovirus kullanılarak uygulanan iNOS gen tedavisinin de benzer şekilde, in vivo kolorektal adenokanser hücrelerini öldürdüğü ve onları radyasyona hassas hale getirdiği gösterilmiştir (46). Transfeksiyon yapılan kanserlerde damarlanma ve apopitozisin arttığı ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda bu çalışmada hücre ölüm uyarı yolağının bir bölümünün p53 bağlantılı olduğu gözlenmiştir. Bu bulgulara paralel olarak radyoterapiye karşı görülen bu hassasiyet artışının, anoksik ortamda ve 40 ppM düzeyinde NO derişimlerinde belirginleştiği de gözlenmiştir (47).

iNOS ile p53 bağlantısı, oral kavitede gelişen skuamoz hücreli kanserlerde de araştırılmıştır. Bu çalışma kanser evresi ve patolojik grade ile uyumlu olarak kanser dokusundaki iNOS ve p53 ekspresyonları arasında ilişki olduğunu göstermiştir. Ancak ilginç olarak kanserin lenf bezi metastazlarından alınan örneklerde bu ilişki görülememiştir (48).

NO'in birçok etkisini matriks metalloproteinaz enzimleri (MMP) düzeylerini etkileyerek gösterdiği kanıtlanmıştır. NO aktivitesi ile görülen bu etkinin özellikle metastaz süreçlerinin başlatılması ya da inhibe edilmesine yol açtığı görülmüştür. Bu etkinin mekanizmasının belli MMP enzimlerinin sentezinin artması ya da azalması yolu ile olduğu düşünülmektedir. Phillips ve ark., birlikte kültüre edilen küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleri ile insan endotel hücrelerinin, Spermine-NONOate ya da SIN-1 ile muamele edilmesi ile anlamlı olarak anti-tümor etki görüldüğünü rapor etmişlerdir. Bir hücre iskeleti proteini olan Caveolin-1 (Cav-1), çoğu hücre tipinde bulunan plazma zarlarındaki kaveola yapısının ana bileşenidir. eNOS enziminin plazma memranındaki bu kaveola yapısı içinde bulunduğu ve Cav-1 proteini ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (49). Lazer konfokal mikroskopi kullanılarak incelenen preparatlarda normal endojen NO üretimi altında, MMP-9 ve Caveolin-1 (Cav-1) proteininin komşuluk içinde bulunduğu görülmüştür. Ancak artmış NO düzeylerinde doz bağımlı olarak bu iki proteinin birbirinden ayrıldığı ve bunun anjiojenik cevap ile sonuçlandığı tespit edilmiştir (50).

Apopitozun indüksiyonu ile ilişkili olduğu bilinen bir faktör de mitokondriden sitoplazma içerisine Sitokrom C'nin (Sit C) salınımıdır. NO, mitokondride bulunan Mitokondrial Permeabilite Geçiş Porları (Mitochondrial Permeability Transition pore/ MPTP) üzerinde değişikliğe yol açarak, SitC'nin salınımına yol açmaktadır. Bu olay sonrası, Apopitotik Proteaz Aktive-edici Faktor-1 (Apoptotic protease activating factor-1/ APAF-1), ATP varlığında Kaspaz 9 aktivasyonuna neden olan yapısal proteinler veya dATP (deoksiadenozin trifosfat) bağlanması gibi birçok mekanizma yolu ile kaspazlar aktive hale gelir (51). Aktivasyon bir kere başladıktan sonra kaspaz 9, kaspaz 3 ve 7'yi ayırarak aktive olmalarına neden olur. Buna ek olarak salınan Sit-C, İnositol Trifosfat yolu ile (IP3) büyük miktarda hücresel kalsiyum salınımına neden olarak hücre ölümü ile sonuçlanır. Sit-C'nin bu kadar önemli rolü olmasına karşın MCF-7 meme kanseri hücrelerine direkt olarak mikro-injeksiyon yolu ile SitC verilmesinin herhangi bir apopitotik cevaba neden olmadığı gösterilmiştir. Böylece, NO'in apopitotik etkisindeki tek faktörün Sit-C olmadığı anlaşılmıştır (52). Diğer yandan NO düzeyinin artışı ile aktive olan ve hücre sitoplazmasında bulunan çözünebilir guanilat siklaz (Soluble guanylyl cyclase / sGC) enziminin bradikinin ya da NO donörü sodyum nitroprussid (SNP) tarafından uyarılmasının, kısmen promotor metilasyonu üzerinden insan meme kanseri hücrelerinde hücre çoğalmasını ve yaşam süresini baskıladığı gösterilmiştir (53). Ayrıca östrojen reseptörü içermeyen insan meme kanseri hücrelerinde (MDA-MB-231) NO donörü DEA/NO ile bazı genlerin ifade seviyesinin değiştiği ve bunun ileride tedavi protokolleri açısından önemli olabileceği görüşü ortaya konmuştur (54). İnsan karaciğer kanseri hücreleri (HepG2) üzerine SNP (Sodyum Nitroprussid) uygulanarak NO'in kanser davranışı üzerine olan etkisinin araştırıldığı çalışmada, SNP'nin HepG2 hücrelerinin apopitoz oranlarını doz bağımlı şekilde yükselttiği ve kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyon kapasitelerini efektif olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (55).

NO donörlerinin kanser hücrelerini kemoterapi ilaçlarına hassas hale getirdiği (özellikle alkile edici ajanlar için) ortaya konmuştur (56). Bu etkiden kısmen alkiltransferaz gibi DNA onarımını yapan enzimlerin kritik tiol gruplarının nitrozilasyonu sorumlu tutulmuştur (57).

NO'in anti-tümoral etkilerinin mekanizmalarını özetleyecek olursak:

1. Apopitozisin uyarılması

- p53 up-regülasyonu
- anti-apopitotik mediyatörlerin proteosomal parçalanması
- Smac salınımının artışı
- Sit-C salınımına yol açan mitokondriyel geçirgenliğin artışı
- p53 seviyelerinde artışa neden olan

perosinitrit radikali (ONOO-) oluşumu

2. Proliferasyonun inhibisyonu

- Makrofajlar tarafından üretilen yüksek NO miktarları nedeniyle kanser hücrelerinde görülen sitotoksite
- Hücre döngüsünün duraklaması (yüksek NO derişimleri gerektirir)
- Nekroz sonucunda hücrelerin ölümü

3. Anjiogenezin baskılanması

4. Kansere komşu mikrodamarlarda NO üretimi ile kanser metastazına karşı koruma

5. Antioksidan etki ile radikallerin etkisinin azalmasına bağlı sitoprotektif etki

Neoplastik gelişim ile iNOS ilişkisi birçok in vivo, ex vivo ve in vitro çalışma gösterilmiş olsa da kanser dokuda normal dokuya göre daha yüksek iNOS aktivitesi gözlenmeyen çalışmalar da bulunmaktadır. İnsan servikal kanserleri üzerinde yapılan bir araştırmada kanser dokuların sadece %25'inde yüksek iNOS aktivitesi gösterilebilmiştir (58).

### C. NO'in Kanser Metastaz Süreçi ile ilişkisi

Kanser metastazı, kanser hücrelerinin ilk olarak gelişim gösterdiği dokudan, farklı organlara doğru invazyonu, kolonizasyonu, proliferasyonu ve anjiogenez olarak tarif edilebilir. Tedavi edilmelerinin zorluğu nedeniyle sıklıkla ölüme neden olurlar. Son yıllarda kanser oluşumu, progresyonu ve metastazında NO'in etkileri yoğun olarak araştırılmaktadır. Örneğin; primer safra kesesi kanserleri üzerinde yapılan bir araştırmada anjiogenez düzeyi ile kanser düzeyi arasında anlamlı bir ilişki olduğu gözlenmiştir (59). Meme kanserlerinde NO'in, hücre motilitesini inhibe ederek ve hücre adezyonunu güçlendirerek metastatik karakterizasyonu baskıladığı ve meme kanseri saldırganlığını azalttığı gösterilmiştir (60). Farelere iNOS negatif retrovirus transfekte edilmesinin çok sayıda akciğer metastazına ve agresif subkutanöz kanserlere neden olduğu görülmüştür. iNOS-pozitif retrovirus ile yapılan transfeksiyon ise az sayıda metastaz ve düşük agresyona ile sonuçlanmıştır (61). Buna ek olarak fare metastatik M5076 hücrelerine fonksiyonel iNOS geninin transfekte edilmesi, hepatik lezyonların ve kanser gelişiminin baskılanması ile sonuçlanmıştır (62). Bu çalışmalar, NO'in metastazı büyük ölçüde azaltabileceğini, hatta durdurabileceğini göstermektedir.

Öte yandan, NO'in kanser metastazı üzerinde bu olumlu etkisi organa ve kanser türüne özgü gibi görünmektedir. Fu ve ark. microRNA-335 ve 543 ile eNOS'u hedefleyerek prostat kanserlerinde kemik metastazlarını baskılamayı başarmışlardır (63). Bu etkiyi araştıran başka bir çalışma fare kolon kanserinin akciğer ve karaciğer metazlazlarına, eNOS inhibitörü olan L-NAME etkisini gözlemlemiştir. L-NAME uygulanan grupta 24 saat sonrasında daha yüksek sayıda kanser hücresi olduğu, aynı farelerde 18 gün sonra artmış pulmoner metastaz görülmesine karşın, kontrol hücreleri ile aynı sayıda karaciğer metastazı tespit edilmiştir. Böylece eNOS inhibisyonunun pulmoner metastazlar üzerinde anti-kanserojenik etki gösterirken karaciğer metastazları üzerine etkisiz olduğu ortaya konulmuştur. Sonuçlar, NO'in pro-metastatik ya da anti-metastatik olarak ifade edilmesinin, deney düzeneği ve çalışılan organlara göre farklı olabileceğini göstermiştir (64).

Önceki bölümde bahsedildiği gibi NO antikanser etkinliğini, invitro ve invivo koşullarda, sitotoksiteyi ve apopitozisi artırarak göstermekte olup benzer şekilde kanser metastazını da etkilemektedir. Galektin-3, hücre-hücre ve hücre-matriks arası ilişkilerde görev yapan ve kanser metastazında önemi bulunan karbonhidrat bağlayıcı bir proteindir. NO'in Galektin-3 tarafından artırılan metastaz ile ilişkili olduğu bulunmuştur. İnsan meme kanseri hücrelerinde (BT549) Galektin-3'ün, kanserde metastatik potansiyeli arttırdığı ve kanser hücrelerini iNOS'un sitotoksik etkilerinden koruduğu gösterilmiştir (65). Bir anti-kanserojen ajan olan paklitaksel'in kanser hücrelerindeki sitotoksik etkinliğini HepG2 (insan karaciğer kanseri hücrelerinde) NO üretimini artırarak yaptığı ortaya konmuştur (66). Sitotoksite üzerinden yaptığı anti-kanser etkilere ek olarak, NO'in apopitoz üzerinden de antikanserojen etkiler gösterdiğine ve

metastaz yeteneğini arttırdığına yönelik kanıtlar da vardır. Birçok kanser türü apopitozisi başlatan genleri baskılayarak apopitozise dayanıklılık göstermektedir. Bu dayanıklılık, doku homeostazisini etkileyerek ve tedavinin etkisini azaltarak kötü prognoza yol açmaktadır (67, 68). Bu bilgilerin ışığında NO ekspresyonunun dolaylı olarak kanserin metastatik yeteneğini, trombosit agregasyonunu inhibe ederek, eşzamanlı olarak kapiller yataktaki kanser hücrelerinin embolisini azaltarak veya NO ile indüklenen apopitozis yolu ile direkt olarak azaltabileceği ifade edilse de, NO'in kanser progresyonu üzerinde iki yönlü bir etkisi olduğu anlaşılmaktadır. Birçok bulgu hemen hemen kanser metastazının invazyon, anjiogenez, intravazasyon, ekstravazasyon ve kolonizasyon gibi her basamağında NO'in rol oynadığını göstermektedir.

**İnvazyon**, kanser hücrelerinin hücre dışı matrikse (ECM) adezyonunda bir değişiklik sonucunda, kanserli dokunun proteolitik bozulması ve kanser hücrelerinin göçü ile oluşur. İnvazyon sırasında MMP enzimleri ECM'in degradasyonunda başlıca rol alan proteolitik enzimlerdir (69). Malign hücrelerde MMP düzeylerinin normal hücrelere göre yüksek olduğu ve NO'in MMP ekspresyonunu ve dolayısı ile hücre invazyonunu regüle ettiği bilinmektedir. NO ekspresyonunun, çeşitli MMP aktivasyonu yolu ile kanser gelişimini artırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. İnsan melanoma hücre dizisi ile yapılan bir çalışmada, hücreler, değişen NO düzeylerine maruz bırakılmış ve RT-PCR metodu ile 12 farklı MMP cevabı araştırılmıştır. MMP-1, 3, 10 ve 13 düzeylerinin; değişen SNAP (NO donörü) derişimleri ile arttığı gösterilmiştir. NO tarafından ERK ve p38 yolakları üzerinden MMP-1'in transkripsiyonunu artırdığı ve bu yolakların tümoral inflamasyon gelişiminde etkili olduğu rapor edilmiştir (70). TPA (12-O-tetradekanoylphorbol13-acetate) ile indüklenen MMP-9 ekspresyonu üzerine NO'in invazyon inhibe edici etkisi, insan meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) çalışılmıştır. NO vericisi uygulaması ile MMP-9 mRNA düzeylerinde azalma olduğu ve MMP-9 translasyonunda azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (71). Bu farklı bulgular NO'in MMP ekspresyonu ve invazyon üzerine olan etkilerinin de hücre tipine bağlı olduğunu göstermektedir.

İntegrinler, hücre-hücre ve hücre- matriks yapışmalarını düzenleyen ve kanser hücre adezyonunu kontrol eden hücre yüzeyi protein ailesidir. Bu özellikleri ile kanser hücre hareketliliğine ve dolayısı ile kanser invazyonuna katkı sağlarlar (72, 73). NO, özellikle a2b1 integrin ile düzenlenen trombosit adezyonunu inhibe ederek kollejeni immobilize etmektedir (74). Bu nedenle, NO'in, integrin ekspresyonunun inhibisyonu yoluyla kanser yapışmasını azalttığı ve bu nedenle metastaz yeteneğini artırdığı kabul edilmektedir (72-74).

**Anjiogenez** orjinal vasküler yataktan kaynaklanan yeni kan damarı büyümesi olarak tarif edilir ve kanserin gelişmesi ve metastazı için gerekli olan bir basamaktır (75). Normal karaciğer dokuları ve karaciğer kanseri dokularında yapılmış bir çalışmada iNOS'un MMP-9 ekspresyonunu arttırdığı, bu sayede kanser hücre anjiogenezini, invazyonunu ve metastazını kolaylaştırdığı ortaya konmuştur (76). Benzer durum, baş ve boyun kanserlerinde de gözlenmiştir (77-78). Damarlanmada, düzenleyici bir sitokin olan IL-33'ün endotelyal NO tarafından uyarılarak proliferasyonu, migrasyonu, anjiogenezisi ve damar geçirgenliğini arttırdığı gösterilmiştir. NO ile uyarılan bu etki ST2/TRAF6 (TNF receptor-associated factor-6) yolağı üzerinden eNOS enziminin aktivasyonu ile ortaya çıkmaktadır (79). Buna ek olarak, NO üretiminin "knock-down" (genin silinmesi) ya da siRNA uygulamaları ile bloke edilmesi, anjiogenezis üzerinde inhibitor etki gösterirken, NO donörleri ile bu etkinin iki kat arttığı rapor edilmiştir (80).

**İntravazasyon**, kanser hücrelerinin kan damarları ya da lenf damarları bazal membranına invazyonu anlamına gelmektedir. Diğer basamaklara göre daha az araştırılmış olsa da NO'in bu basamağa da katkıları bulunduğu bilinmektedir. Lökositler kanser hücrelerinin, damar duvarına invazyonuna engel olmak için çalışırlar. NO ve hücreler arası yapışma molekülü-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1/ ICAM-1) etkileri incelendiğinde bunların, kanser damarlardaki endotel üzerinde lökositlerin intravazasyon, adezyon ve etkinliklerini önemli

ölçüde azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca NO'in inhibe edilmesi ile kanser dokusunun mikro-damarlardaki lökosit adezyonu kısmen geri döndürülebilmektedir. Bu durum NO'in intravazasyonu kolaylaştırıcı bir etkisinin olduğunu göstermektedir (81). Bununla birlikte L-NMMA ile eNOS inhibisyonunun, MDA-MB-231 meme kanserinde kanser hücrelerinin mikrodamarlara adezyonunu fizyolojik koşullarda bloke ettiği gösterilmiştir (82).

**Ekstravazasyon** ve **kolonizasyon** sürecinde kanser hücreleri endotelyal kasılmaya neden olarak kanser hücrelerinin subendotelyal ECM'e adezyonunu kolaylaştırırlar. Kanser hücreleri fibrin, trombin ya da fibrinojen gibi koagülasyon faktörlerine yapıştığı zaman bir emboli oluşumu ortaya çıkmaktadır. Daha sonra bu oluşum, E ve P selektinlerin de desteği ile, kapiller yatakta bloke olmaktadır. NO, NF-kappaB inaktivasyonu yolu ile E-selektin ekspresyonunun azalmasına neden olmakta bunun sonucu olarak anti-metastatik bir etki gözlenmektedir (83).

**Lenfatik metastaz** ve **vasküler permeabilite artışı**, kanser patogenezinde ortak ve önemli bir faktördür. Lenf nodları birçok kanser türünde ilk metastaz bölgesidir ve hastanın prognozunun tespit edilmesinde kritik rolü bulunmaktadır (84). Lenfatik metastazları başlatan iki önemli faktör; lenfangiogenezi uyaran Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü-C (VEGF-C) ve lenf nodu metastazına katkısı olduğu gösterilen Kemokin Reseptör-4 (CXCR4) dür. Bir NO donörü olan DETA-NONOate uygulanması ile VEGF-C artmaktadır. Aksine NO üretiminin N-nitro-L-arginine (L-NNA) ile bloke edilmesinin VEGF-C üretimini azalttığı gösterilmiştir (85). Bunun yanı sıra NO insan meme kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada CXCR4 ekspresyonunu uyarmıştır ve bu etkiler nedeni ile NO'in lenfatik metastazın olası kolaylaştırıcı bir faktör olduğu iddia edilmiştir (86).

NO'in süperoksit ile reaksiyonu sonrasında peroksinitrit oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Bu peroksinitrit, artmış vasküler permeabiliteden ve dolayısı ile metastatik potansiyelden sorumlu tutulmaktadır. Wu ve ark. peroksinitritin 50 nmol üzerindeki derişimlerinde fare sırt derisinde vasküler geçirgenliği arttığını göstermişlerdir (87). Vasküler geçirgenliğin değerlendirildiği bu araştırmada fare sarkomu hücreleri (S-180) kullanılmıştır. Peroksinitrit yakalayıcısı (Ebselen ve Ürik asit) ve MMP inhibitörü uygulandığında, peroksinitrit ile uyarılan geçirgenliğin geri döndüğü gözlenmiştir. Bu nedenle peroksinitrit tarafından aktive edilen MMP'ların, vasküler geçirgenliği artırarak kanser metastazında en azından kısmi etkileri olduğu kabul edilmektedir. Kanser dokuda artmış NO oluşumu, artmış VEGF üretimi ile sonuçlanmaktadır. Serum VEGF ve NO düzeylerinin yüksekliğinin kolorektal kanserlerde prognostik olarak önemli olduğu gösterilmiştir (88). Ayrıca bu üretim artışının sadece hemanjiogenez ile değil aynı zamanda lenfanjiogenez ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir. Çalışmalarda VEGF-3 up-regülasyonu bulunmasının daha yüksek metastaz potansiyeli ve düşük prognoz ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (89).

## SONUÇ

Nitrik Oksit (NO) kanser gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. NO'in kanser hücreleri üzerinde toksik etki göstererek, T lenfosit proliferasyonunu inhibe ederek, metastatik hücre göçünü destekleyerek ve anjiogenezi uyararak kanserin gelişimine yol açtığı bilinmektedir. Ancak NO'in kanserde hücre ölümünü arttırdığı ya da inhibe ettiği ile ilgili karşı görüşler birçok araştırmanın konusu olmaktadır. Bu farklı etkiler, NO biyolojisinin ileri düzeyde karmaşık olması, kanserogenez mekanizmalarının tam anlaşılamaması ve kanser hücrelerinin sınırsız büyüme potansiyelleri temellerinde farklı yorumlanmaktadır. Kanser mikro çe"vresi, hücrenin yapısal özellikleri, ortamdaki NO'in miktarı, bulunma süresi gibi birçok değişken, gözlenen bu çelişkili etkileri açıklamakta öne sürülmektedir. Yeni NO donörleri, NOS inhibitörleri ya da hücresel NO seviyesini değiştiren farklı genetik uygulamaların geliştirilmesi ile NO'in onkolojik süreçlerdeki rolü daha iyi anlaşılabilecektir.

## KAYNAKLAR


1. Huerta S, Chilka S, Bonavida B. Nitric oxide donors: Novel cancer therapeutics. Int J Oncol, 2008; 33: 909-27.
2. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. Neuron, 1992; 8: 3-11.
3. Stamler JS, Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. Physiol Rev, 2001;81: 209-37.
4. Wang Y, Newton DC, Marsden PA. Neuronal NOS: gene structure, mRNA diversity and functional relevance. Crit Rev Neurobiol, 1999; 13: 21-43.
5. Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. J Biol Chem, 1992; 267: 14519-22.
6. Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. Clin Exp Immunol, 1998; 113: 147-156.
7. Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. Clin Exp Immunol, 1998; 113: 147-156.
8. Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F. NO, nitrotyrosine and cyclic GMP in signal transduction. Med Sci Monit, 2001; 7(4): 801-19.
9. Gow AJ, Ischiropoulos H. Nitric oxide chemistry and cellular signaling. J Cell Physiol, 2001; 187(3): 277- 82.
10. Mocellin S, Bronte V, Nitti D. Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: Searching for therapeutic opportunities. Med. Res. Rev, 2007; 27: 317-52.
11. Zaccolo M, Movsesian MA. cAMP and cGMP Signaling Cross-Talk Role of Phosphodiesterases and Implications for Cardiac Pathophysiology. Circulation Research, 2007; 8; 100(11):1569-78.
12. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. Nat Rev Cancer, 2006; 6(7), 521-34.
13. Foster MW, Mc Mahon TJ, Stamler JS. S-nitrosylation in health and disease. Trends Mol Med, 2003; 9(4): 160 -8.
14. Szabo C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. Toxicol Lett, 2003;140-141:105-112.
15. Blaise GA, Gauvin D, Gangal M, Authier S. Nitric oxide, cell signaling and cell death. Toxicology, 2005; 208: 177-92.
16. Demirel-Yilmaz E, Cenik B, Ozcan G, Derici MK. Various phosphodiesterase activities in different regions of the heart alter the cardiac effects of nitric oxide. J Cardiovasc Pharmacol, 2012; 60(3): 283-92.
17. Derici K, Samsar U, Demirel-Yilmaz E. Nitric oxide effects depend on different mechanisms in different regions of the rat heart. Heart Vessels, 2012; 27(1): 89-97.
18. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol, 1997;15: 323-50.
19. Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection - how, why, when and where? Nitric Oxide, 1997; 1: 107-120.
20. Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. Lancet Oncol, 2001; 2: 149-156.
21. Laurent M, Lepoivre M, Tenu JP. Kinetic modelling of the nitric oxide gradient generated in vitro by adherent cells expressing inducible nitric oxide synthase. Biochem J, 1996; 3141: 109-113.
22. Brennan PA, Downie IP, Langdon JD, Zaki GA. Emerging role of nitric oxide in cancer. Br J Oral Maxillofac Surg, 1999; 37: 370-73.
23. Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. Proc Natl Acad Sci USA, 1985; 82: 7738-42.
24. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. Science, 1987; 235: 473-76.
25. Mocellin S, Bronte V, Nitti D. Nitric oxide, a double edged sword in cancerbiology: searching for therapeutic opportunities. Med Res Rev, 2007; 27(3): 317-52.
26. Fitzpatrick B, Mehibel M, Cowen RL, Stratford IJ. iNOS as a therapeutic target for treatment of human tumors. Nitric Oxide. 2008;19(2):217-24.
27. Bonavida B, Khineche S, Huerta-Yepez S, Garban H. Therapeutic potential of nitric oxide in cancer, Drug Resist. Updat. 2006; 9(3):157-173.
28. Chinje EC, Stratford IJ. Role of nitric oxide in growth of solid tumours: a balancing act. Essays Biochem, 1997; 32: 61-72.

29. Gauthier N, Arnould L, Chantome A, Reisser D, Bettaieb A, Reveneau S. et al., To stimulate or to inhibit nitric oxide production in mammary tumors? Bull Cancer, 2004; 91(9): 705-12.

30. Radomski MW, Jenkins DC, Holmes L, Moncada S. Human colorectal adenocarcinoma cells: differential nitric oxide synthesis determines their ability to aggregate platelets. Cancer Res, 1991; 51(22): 6073-78.

31. Jones MK, Tsugawa K, Tarnawski AS, Baatar D. Dual actions of nitric oxide on angiogenesis: possible roles of PKC, ERK, and AP-1. Biochem Biophys Res Commun, 2004; 318(2): 520-28.

32. Thomsen LL, Lawton FG, Knowles RG, Beesley JE, Riveros-Moreno V, Moncada S. Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. Cancer Res, 1994; 54: 1352-54.

33. Zafirellis K, Zachaki A, Agrogiannis G, Gravani K. Inducible nitric oxide synthase expression and its prognostic significance in colorectal cancer. APMIS, 2010;118(2): 115-24.

34. Andrade SP, Hart IR, Piper PJ. Inhibitors of nitric oxide synthase selectively reduce flow in tumor-associated neovasculature. Br J Pharmacol, 1992;107(4):1092-95.

35. Kennovin GD, Flitney FW, Hirst DG. "Upstream" modification of vasoconstrictor responses in rat epigastric artery supplying an implanted tumour. Adv Exp Med Biol, 1994; 345: 411-16.

36. Kennovin G.D et al, Biology of Nitric Oxide, Portland Press, 1994; 473-79.

37. Orucevic A, Lala PK. Effects of N(g)-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis, on interleukin-2-induced capillary leakage and antitumor responses in healthy and tumor-bearing mice. Cancer Immunol Immunother, 1996: 42(1): 38-46.

38. de Wilt JH, Manusama ER, van Etten B, van Tiel ST, Jorna AS, Seynhaeve AL et al. Nitric oxide synthase inhibition results in synergistic anti-tumour activity with melphalan and tumour necrosis factor alpha-based isolated limb perfusions. Br J Cancer, 2000; 83(9): 1176-82.

39. Basudhar D, Somasundaram V, de Oliveira GA, Kesarwala A, Heinecke JL, Cheng RY et al. Nitric Oxide Synthase-2-Derived Nitric Oxide Drives Multiple Pathways of Breast Cancer Progression. Antioxid Redox Signal, 2016 [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27464521.

40. Dong Z, Staroselsky A.H, Qi X, Xie K, Fidler I.J. Inverse correlation between expression of inducible nitric oxide synthase activity and production of metastasis in K-1735 murine melanoma cells, Cancer Res, 1994; 54(3): 789-93.

41. Sarih M, Souvannavong V, Adam A. Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis, Biochem. Biophys. Res Commun, 1993; 191(2): 503-8.

42. Kiziltepe T, Hideshima T, Ishitsuka K, Ocio EM, Raje N, Catley L et al. JS-K, a GST-activated nitric oxide generator, induces DNA double-strand breaks, activates DNA damage response pathways and induces apoptosis in vitro and in vivo in human multiple myeloma cells. Blood, 2007; 110(2):709-18.

43. Xie K, Fidler IJ. Therapy of cancer metastasis by activation of the inducible nitric oxide synthase. Cancer Metastasis Rev, 1998;17(1): 55-75.

44. Worthington J, Robson T, Murray M, O'Rourke M, Keilty G, Hirst DG. Modification of vascular tone using iNOS under the control of a radiation-inducible promoter. Gene Ther, 2000:7 (13):1126-31.

45. Worthington J, Robson T, O'Keeffe M, Hirst DG. Tumour cell radiosensitization using constitutive (CMV) and radiation inducible (WAF1) promoters to drive the iNOS gene: a novel suicide gene therapy. Gene Ther, 2002; 9(4): 263-69.

46. Wang Z, Cook T, Alber S, Liu K, Kovesdi I, Watkins SK et al. Adenoviral gene transfer of the human inducible nitric oxide synthase gene enhances the radiation response of human colorectal cancer associated with alterations in tumor vascularity. Cancer Res. 2004; 64(4): 1386-95.

47. Wardman P, Rothkamm K, Folkes LK, Woodcock M, Johnston PJ. Radiosensitization by nitric oxide at low radiation doses. Radiat Res, 2007; 167: 475-484.

48. Yang L, Wang Y, Guo L, Wang L, Chen W, Shi B. The Expression and Correlation of iNOS and p53 in Oral Squamous Cell Carcinoma. Biomed Res Int, 2015; 637853 doi: 10.1155/2015/637853.

49. García-Cardeña G, Fan R, Stern DF, Liu J, Sessa WC. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. J Biol Chem, 1996; 271(44): 27237-40.

50. Phillips PG, Birnby LM. Nitric oxide modulates caveolin-1 and matrix metalloproteinase-9 expression and distribution at the endothelial cell/tumor cell interface. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol, 2004; 286(5): L1055- L1065.

51. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. J. Biol. Chem, 1999; 274(17): 11549-56.

52. Li F, Srinivasan A, Wang Y, Armstrong R.C, Tomaselli K.J, Fritz L.C. Cell- specific induction of apoptosis by microinjection of cytochrome c. Bcl-xL has activity independent of cytochrome c release. J. Biol. Chem, 1997; 272(48): 30299-305.

53. Wen HC, Chuu CP, Chen CY, Shiah SG, Kung HJ, King KL et al. Elevation of soluble guanylate cyclase suppresses proliferation and survival of human breast cancer cells. PLoS One. 2015; 30:10(4): e0125518.

54. Cheng RY, Basudhar D, Ridnour LA, Heinecke JL, Kesarwala AH, Glynn S et al. Gene expression profiles of NO- and HNO-donor treated breast cancer cells: insights into tumor response and resistance pathways. Nitric Oxide, 2014; 1(43): 17-28.

55. Zhou L, Zhang H, Wu J. Effects of nitric oxide on the biological behavior of HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. Experimental and Therapeutic Medicine, 2016;11 (5): 1875-80.

56. Bonavida B, Garban H. Nitric oxide-mediated sensitization of resistant tumor cells to apoptosis by chemo-immunotherapeutics. Redox Biol. 2015; 6: 486-94.

57. Coulter JA, McCarthy HO, Xiang J, Roedl W, Wagner E, Robson T et al. Nitric oxide-a novel therapeutic for cancer. Nitric Oxide, 2008;19(2):192-8.

58. Williams EL, Djamgoz MB. Nitric oxide and metastatic cell behaviour, BioEssays, 2005;27(12);1228-38.

59. Niu XJ, Wang ZR, Wu SL, Geng ZM, Zhang YF, Qing XL. Relationship between inducible nitric oxide synthase expression and angiogenesis in primary gallbladder carcinoma tissue. World J. Gastroenterol, 2004;10(5): 725-28.

60. Lahiri M, Martin JH. Nitric oxide decreases motility and increases adhesion in human breast cancer cells. Oncol Rep, 2009; 21(2): 275-81.

61. Juang SH, Xie K, Xu L, Wang Y, Yoneda J, Fidler IJ. Use of retroviral vectors encoding murine inducible nitric oxide synthase gene to suppress tumorigenicity and cancer metastasis of murine melanoma. Cancer Biother Radiopharm, 1997; 12(3): 167-175.

62. Xie K, Huang S, Dong Z, Juang SH, Gutman M, Xie QW et al. Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells. J Exp Med, 1995;181(4): 1333-43.

63. Fu Q, Liu X, Liu Y, Yang J, Lv G, Dong S. MicroRNA-335 and -543 suppress bone metastasis in prostate cancer via targeting endothelial nitric oxide synthase. Int J Mol Med, 2015;36(5):1417-25.

64. Ishikawa T, Yoshida N, Higashihara H, Inoue M, Uchiyama K, Takagi T et al. Different effects of constitutive nitric oxide synthase and heme oxygenase on pulmonary or liver metastasis of colon cancer in mice. Clin. Exp. Metastasis, 2003;20(5): 445-50.

65. Moon BK, Lee YJ, Battle P, Jessup JM, Raz A, Kim HR. Galectin-3 protects human breast carcinoma cells against nitric oxide-induced apoptosis: implication of galectin-3 function during metastasis. Am J Pathol, 2001; 159 (3):1055-60.

66. Sayed-Ahmad MM, Mohamad MA. Contribution of nitric oxide and epidermal growth factor receptor in anti-metastatic potential of paclitaxel in human liver cancer cell (HepG2). J Egypt Natl Canc Inst 2005; 17(1): 35-41.

67. Fulda S. Apoptosis pathways and their therapeutic exploitation in pancreatic cancer. J Cell Mol Med, 2009;13 (7):1221-27.

68. Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. J. Med. Genet, 2009; 46(8): 497-510.

69. Gupta SK, Vlahakis NE. Integrin alpha9 beta1 mediates enhanced cell migration through nitric oxide synthase activity regulated by Src tyrosine kinase. J Cell Sci, 2009;122 (Pt 12:2043-54).

70. Ishii Y, Ogura T, Tatemichi M, Fujisawa H, Otsuka F, Esumi H. Induction of matrix metalloproteinase gene transcription by nitric oxide and mechanisms of MMP-1 gene induction in human melanoma cell lines. Int J Cancer, 2003;103(2):161-68.

71. Jespersen C, Doller A, Akool el S, Bachmann M, Muller R, Gutwein P et al. Molecular mechanisms of nitric oxide- dependent inhibition of TPA-induced matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in MCF-7 cells. J Cell Physiol, 2009; 219 (2): 276-87.

72. Sun Y, Liu J, Qian F, Xu Q. Nitric oxide inhibits T cell adhesion and migration by down-regulation of beta1-integrin expression in immunologically liver- injured mice, Int. Immunopharmacol. 2006; 6(4):616-26.

73. Roberts W, Riba R, Homer-Vanniasinkam S, Farndale RW, Naseem KM. Nitric oxide specifically inhibits integrin-mediated platelet adhesion and spreading on collagen. J. Thromb Haemost, 2008; 6(12): 2175-85.

74. Conran N, Gambero A, Ferreira HH, Antunes E, de Nucci G. Nitric oxide has a role in regulating VLA-4-integrin expression on the human neutrophil cell surface. Biochem Pharmacol, 2003;1; 66(1): 43-50.

75. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Semin Oncol, 2002;29 (6 Suppl)16: 15-18.

76. Sun MH, Han XC, Jia MK, Jiang WD, Wang M, Zhang H et al. Expressions of inducible nitric oxide synthase and matrix metalloproteinase-9 and their effects on angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol, 2005:14;11(38): 5931-7.

77. Gallo O, Masini E, Morbidelli L, Franchi A, Fini-Storchi I, Vergari WA et al. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. J Natl Cancer Inst, 1998;15;90(8): 587-96.

78. Jiang T, Yu JT, Zhu XC, Zhang QQ, Tan MS, Cao L et al. Angiotensin-(1-7) induces cerebral ischaemic tolerance by promoting brain angiogenesis in a Mas/eNOS-dependent pathway. Br J Pharmacol, 2014; 171(18): 4222-32.

79. Choi YS, Choi HJ, Min JK, Pyun BJ, Maeng YS, Park H et al. Interleukin-33 induces angiogenesis and vascular permeability through ST2/TRAF6-mediated endothelial nitric oxide production. Blood, 2009;1; 114(14): 3117-26.

80. Kolluru GK, Sinha S, Majumder S, Muley A, Siamwala JH, Gupta R et al. Shear stress promotes nitric oxide production in endothelial cells by sub-cellular delocalization of eNOS: A basis for shear stress mediated angiogenesis. Nitric Oxide, 2010; 15;22(4):304-15.

81. Bessa X, Elizalde JI, Mitjans F, Piñol V, Miquel R, Panés J, Piulats J, Piqué JM, Castells A. Leukocyte recruitment in colon cancer: role of cell adhesion molecules, nitric oxide, and transforming growth factor beta1. Gastroenterology, 2002;122(4):1122-32.

82. Zhang L, Zeng M, Fu BM. Inhibition of endothelial nitric oxide synthase decreases breast cancer cell MDA-MB-231 adhesion to intact microvessels under physiological flows. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016;310(11): H1735-47.

83. Spiecker M, Darius H, Kaboth K, Hübner F, Liao JK. Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. J Leukoc Biol, 1998;63(6):732-9.

84. Cao Y. Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. Nat Rev Cancer, 2005; 5(9): 735-43.

85. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Yoshidome K, Nakahara M, Nakao K et al. Nitric oxide in breast cancer: induction of vascular endothelial growth factor-C and correlation with metastasis and poor prognosis. Clin Cancer Res, 2006; 15; 12(4): 1201-7.

86. Yasuoka H, Tsujimoto M, Yoshidome K, Nakahara M, Kodama R, Sanke T, Nakamura Y. Cytoplasmic CXCR4 expression in breast cancer: induction by nitric oxide and correlation with lymph node metastasis and poor prognosis. BMC Cancer, 2008; 23(8): 340.

87. Wu J, Akaike T, Hayashida K, Okamoto T, Okuyama A, Maeda H. Enhanced vascular permeability in solid tumor involving peroxynitrite and matrix metalloproteinases. Jpn J Cancer Res, 2001; 92(4): 439-51.

88. Akbulut H, Altuntas F, Akbulut KG, Ozturk G, Cindoruk M, Unal E, Icli F. Prognostic role of serum vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor and nitric oxide in patients with colorectal carcinoma. Cytokine, 2002; 24; 20(4):184-90.

89. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Yang Q, Tsukiyama A, Imabun S et al. Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor-C in breast carcinoma with long-term follow-up. Mod Pathol, 2003;16(4):309-14.