

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Karbonik Anhidraz-IX Enziminin Asetazolamid ile İnhibisyonunun Glutatyon Redüktaz ve Glutatyon Peroksidaz Aktiviteleri Üzerine Olan Etkisinin İncelenmesi

Emine TERZİ, Beyza Ecem ÖZ BEDİR, Özen ÖZENSOY GÜLER

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZET

Oksidatif stres, renal kanser için önemli parametrelerden birisidir. Antioksidan sistem renal kanser oluşumunda devreye girerek oksidatif strese karşı koyar. Endojen antioksidanlar olarak tanımlanan GR ve GPx, böbreklerin antioksidan sistemindeki önemli enzimlerdir. Renal kanserdeki önemli parametrelerden biri olan CA-IX, bir pH pompası olarak görev yaparak tümör mikroçevresinin asidifikasyonuna sebep olur ve karsinogenezde rol oynar. Çalışmamızın temel amacı, bir karbonik anhidraz enzim inhibitörü olan AZA'nın glutatyon mekanizması üzerine olan etkisinin renal kanserde incelenmesidir. Deneysel çalışmalarda öncelikle renal kanser hücre hattı olan CAKI-2 çoğaltılarak WST-1 sitotoksitesite testi ile AZA'nın uygun dozu 48. saatte 8.65 µM olarak bulunmuştur. AZA'nın CAKI-2 hücrelerinde CA-IX enzimi üzerine olan etkisi belirlenmek için ELISA testi yapılmıştır. CAKI-2 hücrelerine AZA uygulandıktan sonra GR ve GPx üzerine olan etkisini belirlemek için "Glutathione Reductase Assay Kit" ve "Glutathione Peroxidase Assay Kit" kullanılarak Epoch™ Microplate Spectrophotometer cihazında 340 nm'de ölçüm yapılmıştır. AZA uygulaması sonrası GR ve GPx enzim aktivitelerinde artış görülmüştür (p≤0.05). Çalışmanın sonucu olarak AZA inhibisyonunun, renal kanserde glutatyon mekanizmasının devreye girmesi için önemli bir ajan olabileceği söylenebilir. Renal kanserde hem CA-IX enziminin önemli bir terapötik biyobelirteç olması hem de glutatyon mekanizmasının bu kanser türündeki öneminden dolayı çalışmamız literatüre önemli bir katkı sağlamaktadır. Bu çalışmanın devamı niteliğinde olması planlanan diğer endojen antioksidan enzim aktivitelerinin renal kanserde araştırılması yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesini sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Asetazolamid. Glutatyon peroksidaz. Glutatyon redüktaz. Karbonik anhidraz. Renal Kanser.

Investigation of the Effect of Carbonic Anhydrase-IX Enzyme Inhibition with Acetazolamide on Glutathione Reductase and Glutathione Peroxidase Activities

ABSTRACT

Oxidative stress is one of the important parameters for renal cancer. The antioxidant system plays a prominent role and resists oxidative stress in the development of renal cancer. The endogenous antioxidants GPx and GR, are defined as crucial enzymes in the antioxidant system of the kidneys. The main purpose of this study is to determine the effect of AZA, a carbonic anhydrase classical enzyme inhibitor in the renal cancer cell line CAKI-2 to evaluate the GPx and GR enzyme activities. The optimal dose of AZA was found to be 8.65 µM at the 48th hour by WST-1 cytotoxicity test. ELISA test was performed to determine the effect of AZA on CA-IX enzyme in CAKI-2 cells. All measurements were performed at 340 nm by Epoch™ Microplate Spectrophotometer using "Glutathione Reductase Assay Kit" and "Glutathione Peroxidase Activity Assay Kit". After AZA application, an increase was observed in GR and GPx enzyme activities (p≤0.05). As a consequence, AZA may be an important therapeutic agent for the glutathione mechanism related to renal cancer. Our study makes a valuable contribution to the literature due to the importance of the CA-IX enzyme related to renal cancer. The investigation of other endogenous antioxidant enzymes in renal cancer may be designed for further prospective studies.

Key Words: Acetazolamide. Carbonic anhydrase. Glutathione peroxidase. Glutathione reductase. Renal Cancer.

Geliş Tarihi: 02.Haziran.2022

Kabul Tarihi: 30.Haziran.2022

Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER
Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,
Ankara.
Tel: 0312 324 15 55
E-posta: oozensoy@hotmail.com

Yazarların ORCID Bilgileri:

Emine TERZİ: 0000-0001-9106-3848
Beyza Ecem ÖZ BEDİR: 0000-0002-0596-834X
Özen ÖZENSOY GÜLER: 0000-0003-0389-9624

Kanser ilerlemesi ve tedaviye direncin önemli sebeplerinden birisi yüksek seviyelerdeki reaktif oksijen türlerinin (ROS)¹. Sitokrom p450 sistemi hücrel ROS üretimine sebep olur ve bu durum kanser gelişiminde etkin rol oynar. Hücreler ROS moleküllerini uzaklaştırmak ve bu moleküllerin sebep olduğu etkileri onarmak için antioksidan enzimleri devreye sokar^{2,3}. Antioksidanlar, ROS'un oksidatif süreçlerini, zararlı etkilerini azaltmak için insan vücudunda hayati bir rol oynamaktadır⁴ ve endojen/ekzojen olmak üzere iki grupta sınıflandırılır⁵.

Endojen antioksidanlardan, glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon peroksidaz (GPx) hücrel redoks kontrolünde rol oynayan glutatyon mekanizmasının bileşenleridir⁶. GR, oksitlenmiş glutatyonu (GSSG), indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüştüren, NADPH tarafından indirgenen, prostetik grup olarak iki FAD molekülü içeren bir flavoproteindir ve hücrelerde yeterli düzeyde GSH'ın bulunmasını sağlar. Ayrıca bu enzim, organizmayı kimyasal ve oksidatif strese korur⁷. GPx ise hidrojen peroksiti (H_2O_2), suya (H_2O) ve alkole dönüştüren önemli bir hücre içi enzimdir. GPx, lipid peroksidasyonunu inhibe ederek hücreleri oksidatif strese korur⁸. Sitolitik bir protein olan GPx'ler GSH'ı GSSG'ye çevirerek ROS'un detoksifikasyonunda önemli bir rol oynar ve yüksek seviyelerde ROS altında aktive olan ilk enzim olduğu bilinmektedir⁹.

Kanserde düşük oksijen miktarı nedeniyle glikozun oksidatif fosforilasyonu bozulur ve bu durum laktik asit oluşumuna yol açar. Önemli bir enzim ailesi olan karbonik anhidraz enzim ailesi (CA, E.C.4.2.1.1) de, en basit kimyasal reaksiyonlardan biri olan karbondioksitin (CO_2), bikarbonat (HCO_3^-) ve protona (H^+) dönüşümünü katalize ederek kanser mikroçevresinin asidifikasyonunu daha da artırır. Bu sebeple CA inhibitörlerinin klinik kullanımı, son yıllarda oldukça dikkat çekmektedir. Biyosentetik reaksiyonlarda ve tümörögenizde önemli fizyolojik rollere sahip olmalarından dolayı, CA enzim ailesinin farklı izoformlarının inhibitörleri; glokom, retinopati, hemolitik anemi, epilepsi, obezite ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisi için klinikte uygulamaya başlanmıştır^{10, 11}. Asetazolamid (AZA), 1956 yılından beri araştırılmakta olup klinikte kullanılan, en iyi bilinen CA inhibitörüdür ayrıca bu ilacın konjugatları metastatik böbrek kanseri tedavisi için umut verici ajanlara aday gösterilmektedir¹².

ROS'un zararlı etkilerine karşı koyan antioksidan enzimler böbreklerde mevcuttur. Böbreklerdeki antioksidan sistem GSH ve ROS'u katalitik olarak daha az zararlı formlara dönüştüren enzimler içerir. GPx ve GR, böbreklerin antioksidan yeteneğine katkıda bulunan glutatyon bağımlı enzimlerdir¹³. Böbreklerde ekspresyonunun yüksek olduğu bilinen bir diğer enzim olan CA-IX da önemli bir tümör belirteci olup renal kanserde yüksek ekspresyon göstermektedir. CA-IX enziminin AZA ile inhibisyonu ortam asiditesini değiştirerek kanser mikroçevresinin pH'sı üzerinden glutatyon mekanizmasını etkileyeceğini düşünmekteyiz. Hem glutatyon mekanizmasının hem de CA-IX'un renal kanserdeki öneminden dolayı bu çalışmada, klinikte kullanılan bir CA inhibitörü olan AZA'nın renal kanser hücrelerinde glutatyon enzimleri üzerine olan etkisini incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Hücre Kültürü

CAKI-2 berrak hücreli renal karsinom hücre hattı Bilkent Üniversitesi'nden temin edilmiştir. Hücreler, %10 Fetal Bovin Serum (FBS, sıcaklık inaktif, Capricorn, CP17-1756), %1 penisilin-streptomisin (Capricorn, CP17-1828) ve %1 non-esansiyel aminoasit (Biowest, MS00LD2019) içeren Low Glucose DMEM (Diagnovum, D823) besiyerinde 37 °C ve %5 CO_2 koşullarında büyütülmüştür. Besiyeri, hücrelerin canlılıklarını koruyabilmesi için her iki günde bir değiştirilmiştir. Hücreler %80-90 yoğunluğa ulaştığında pasajlama işlemi yapılmıştır. Pasajlama işleminde, hücreleri kaldırmak için Tripsin-EDTA (Gibco, 25200-056) solüsyonu kullanılmıştır.

İnhibitör Hazırlanması

Çalışmada kullanılan inhibitör olan AZA (Sigma, BCBZ9159), konsantrasyonu 300 μM olacak şekilde DMSO içerisinde çözülerek stok çözelti olarak hazırlanmıştır. Daha sonra 24. ve 48. saatlerde; 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 μM 'lık konsantrasyonlarda hazırlanıp test edilmiştir.

Sitotoksosite Analizi

AZA'nın hücreler üzerindeki uygun dozunun belirlenmesi için WST-1 testi yapılmıştır. Bu canlılık testinin prensibi hücrel mitokondriyal dehidrojenazlar tarafından tetrazolyum tuzu olan WST-1'in formazan kristallerine dönüşmesi esasına dayanır. Canlı hücrelerin sayısı ne kadar fazla ise mitokondriyal dehidrojenazların aktivitesi de o kadar yüksek olur ve bu da oluşan formazan boyasının miktarını artırır¹⁴.

WST-1 testi için CAKI-2 hücreleri 96 kuyucuklu plakelere ekilip inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra hücrelere sırasıyla 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 μM 'lık konsantrasyonlarda hazırlanan AZA uygulanmıştır. Ölçüm 24. ve 48. saatlerde yapılmıştır. İnhibitörün çözdürüldüğü DMSO'nun etkisini ortadan kaldırmak için negatif kontrol kuyucuklarına besiyeri ile birlikte AZA'nın çözdürüldüğü oranda DMSO da eklenmiştir. Her bir kuyucuğa 10 μL WST-1 solüsyonu (Cayman Chemical, 10008883) ilave edilip 37 °C'de 2-4 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası 450 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak hücreler için uygun olan inhibitör konsantrasyonu belirlenmiştir.

Hücrelerin canlılık değerleri hesaplanırken;

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{(\text{Ort. absorbans}_{\text{inhibitör}} \times 100) \div \text{Ort. absorbans}_{\text{kontrol}}}{\text{Ort. absorbans}_{\text{kontrol}}}$$

İnhibisyon değeri hesaplanırken;

Glutasyon Mekanizmasında CA-IX İnhibisyonu

% İnhibisyon = $100 - ((\text{Ort. absorban}_{\text{inhibitör}} \times 100) \div \text{Ort. absorban}_{\text{kontrol}})$ formülü kullanılmıştır.

Sonrasında bulunan inhibitör konsantrasyonu değerleri Graphpad Prism 9.1.0 programına girilerek grafiğe dönüştürülmüş ve hücrelerin % 50'sini inhibe eden inhibitör dozu (IC₅₀) değeri hesaplanmıştır.

Hücre Lizatı Hazırlanması

Hücre lizatı hazırlamak için öncelikle hücreler fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanmış sonrasında ise 50 mM Tris, 150 µM NaCl, %1 NP-40 (Intron Biotechnology, IBS-BN015) ve proteinaz inhibitor faktörü (Intron Biotechnology, PIC001) içeren lizis tamponu ile lize edilmiştir. Lizis tamponu hazırlanıp pH'sı 6.0 olarak ayarlanmıştır. Hücreler lize edildikten sonra santrifüj edilmiştir (+4°C, 17000 g, 15 dk). Daha sonra, süpernatant kısmı alınmış ve iki kez PBS ile yıkanmıştır.

ELISA

CAKI-2 hücre hattında AZA'nın CA-IX düzeylerinde yaptığı değişimi belirlemek için ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada BT Lab marka Human Carbonic Anhydrase IX ELISA Kit (E2273Ha) kullanılmıştır. ELISA protokolü için öncelikle standart çözeltiler hazırlanmıştır. Standart çözelti 20 ng/mL standart stok solüsyon oluşturmak için 120 µL standardı (40 ng/mL) ve 120 µL standart seyrelticiyi içerir. Standart stok solüsyonu 1: 2 oranında dilüe edilerek sırasıyla 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2.5 ng/mL ve 1.25 ng/mL standart çözeltiler elde edilmiştir. Standart koyulacak olan kuyucuklara tüm standartlar 50 µL olarak eklenmiştir. Örneklerin konulacağı kuyucuklara 40 µL numune eklenmiş daha sonra 10 µL biyotinlenmiş anti-CA-IX antikor eklenmiştir. Ardından tüm kuyucuklara 50µL Streptavidin-HRP eklenmiş ve 37°C'de 60 dk inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonrası kuyucuklar 5 kez yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Daha sonra her bir kuyucuğa 50 µL substrat solüsyonu A ve 50 µL substrat solüsyonu B eklenmiş. 37°C'de karanlıkta 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu eklenmiş ve ardından Epoch Microplate Reader cihazında 450 nm'de okuma yapılmıştır.

Glutasyon Redüktaz ve Peroksidaz Aktivitesinin Ölçümü

GR ve GPx aktivitelerinin ölçümü için sırasıyla Glutathione Reductase Assay Kit (Sigma, 124M4055V) ve Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay Kit (Sigma, SLBH8190V) kullanılmıştır. GR aktivitesi ölçülürken kör küveti için 500 µL Oxidized Glutathione, 50 µL NADPH, 450 µL Assay Buffer kullanılmıştır. Örnek küveti için 500 µL Oxidized Glutathione, 50 µL NADPH, 400 µL Assay

Buffer ve 50 µL hücre lizatı kullanılmıştır. GPx aktivitesinin ölçümü için ise kör küveti için 940 µL GPx Assay Buffer, 50 µL NADPH Assay Reagent ve 10 µL Tert-Bütil Hidroperoksit (t-Bu-OOH) kullanılmıştır. Örnek küveti için 910 µL GPx Assay Buffer, 50 µL NADPH Assay Reagent, 30 µL hücre lizatı 10 µL Tert-Bütil Hidroperoksit (t-Bu-OOH) kullanılmıştır. Örnekler Epoch™ Microplate Spectrophotometer cihazında 340 nm'de okutulmuştur.

GR ve GPx aktiviteleri;

$$(\Delta A_{340} \times DF) / (6,22 \times V)$$

ΔA_{340} : 340 nm'de ölçülen 1 dk'daki absorban değişimi

DF: Dilüsyon Faktörü

V: Örnek hacmi

formülüne göre hesaplanmıştır.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz GraphPad Prism 9.1.0 programında Student's t testi kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi p≤0.05 olarak kabul edilmiştir.

Bulgular

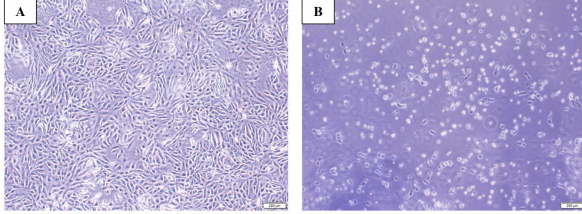
WST-1 Sonuçları

CAKI-2 hücrelerine 24. ve 48. saat dilimlerinde 0, 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 µM dozlarında AZA uygulaması yapılmış ve hücreler için uygun olan sitotoksik doz belirlenmiştir. WST-1 sonuçlarına göre AZA ile 24 saat muamele edilen CAKI-2 hücreleri için 100, 50, 25, 10, 5, 2.5, 0 konsantrasyonlarında sırasıyla canlılık oranları %100, %98.6, %96.1, %90.5, %84.2, %72.8, %70 olarak bulunmuştur. AZA ile 48 saat muamele edilen CAKI-2 hücreleri için 100, 50, 25, 10, 5, 2.5, 0 konsantrasyonlarında sırasıyla canlılık oranları %100, %100, %67, %35.5, %32.2, %29.2, %25 olarak bulunmuştur (**Tablo I**). Bu sonuçlara göre, CAKI-2 hücreleri için uygulanacak AZA konsantrasyonu 8,65 µM olarak belirlenmiştir.

Tablo I. AZA konsantrasyonlarının 24. ve 48. saatte hücre canlılığı üzerine etkisi

AZA (µM)	Hücre Canlılığı 24. saat (%)	Hücre Canlılığı 48. saat (%)
0	100	100
2,5	98,6	100
5	96,1	67
10	90,5	35,5
25	84,2	32,2
50	72,8	29,2
100	70	25

Hücrelerin yapısını incelemek amacıyla 48 saatlik AZA uygulamasından sonra Inverted mikroskop kullanılmıştır ve iğsi yapıda bir morfolojiye sahip olan CAKI-2 hücrelerinin bu süre sonunda sayısının azalarak hücre morfolojilerinin iğsi yapıdan farklılaştığı gözlemlenmiştir (Şekil 1).

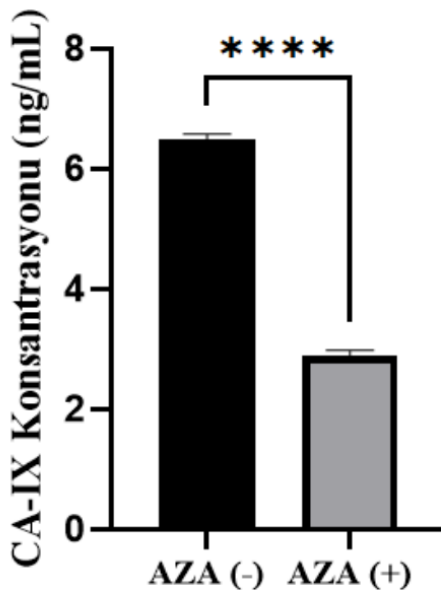


Şekil 1.

AZA uygulaması öncesi ve sonrası CAKI-2 hücrelerine ait inverted mikroskop görüntüleri. A) CAKI-2 hücrelerinin AZA uygulanmadan önceki görüntüsü B) CAKI-2 hücrelerinin AZA uygulandıktan 48 saat sonraki görüntüsü (Bar= 200 µm).

ELISA Sonuçları

CAKI-2 hücrelerinde AZA uygulanmasının CA-IX üzerine olan etkisinin belirlenmesi için ELISA testi yapılmıştır. AZA uygulanan ve uygulanmayan hücrelerdeki absorban değerleri ölçülerek CA-IX düzeylerindeki değişim belirlenmiştir. Yapılan ölçümler sonucu AZA uygulanmamış CAKI-2 hücrelerinde CA-IX konsantrasyonu 6.48 ng/mL, AZA uygulanmış CAKI-2 hücrelerinde ise 2,88 ng/mL olarak bulunmuştur (Şekil 2). AZA uygulanan CAKI-2 hücrelerinde CA-IX düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ($p \leq 0.0001$).

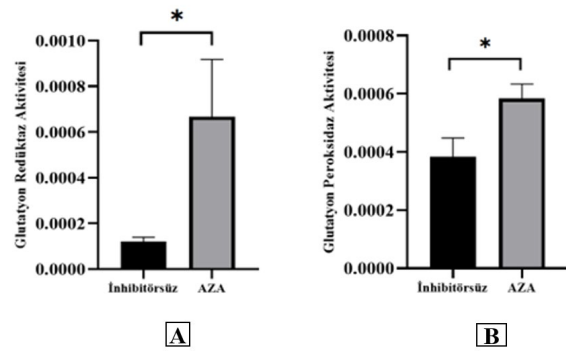


Şekil 2.

*AZA uygulanan ve uygulanmayan CAKI-2 hücrelerinde CA-IX konsantrasyonları (****: $p \leq 0.0001$).*

Glutasyon Redüktaz ve Peroksidaz Aktivitelerinin Ölçümü

AZA'nın CAKI-2 hücrelerinde GR üzerine olan etkisinin belirlenmesi için spektrofotometrik olarak enzim aktivitesi ölçümü yapılmıştır. AZA uygulanan CAKI-2 hücrelerinde uygulanmayanlara göre GR aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği görülmüştür ($p \leq 0.05$). AZA'nın CAKI-2 hücrelerinde GPx üzerine olan etkisinin belirlenmesi spektrofotometrik olarak enzim aktivitesi ölçümü yapılmıştır. AZA uygulanan CAKI-2 hücrelerinde uygulanmayanlara göre GPx aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği görülmüştür ($p \leq 0.05$) (Şekil 3).



Şekil 3.

AZA uygulamasının glutasyon mekanizması üzerine olan etkisi. A) AZA uygulamasının GR aktivitesi üzerine olan etkisi B) AZA uygulamasının GPx aktivitesi üzerine olan etkisi (: $p \leq 0.05$).*

Tartışma ve Sonuç

Renal hücreli karsinom (RCC), renal tübüler epitel hücrelerinden köken alan ve birincil renal neoplazilerin % 85'ini kapsayan bir kanser türüdür¹⁵. Renal asidifikasyondan sorumlu CA-IX enzimi hücre dışı asidik pH'ı koruyarak kanser hücrelerinin büyümesine ve metastaz yapmasına yardımcı olur. Bu süreçte hücre içi nötral pH'ı korumak için tümör hücrelerinden elimine edilmesi gereken fazla proton ve CO₂ üretilir^{16,17}. Bu sürecin tetiklediği oksidatif stres ve antioksidan savunma sistemindeki zayıflama renal hücre karsinomunun gelişimine katkıda bulunur¹⁸. Bu antioksidan sistemdeki en önemli enzimler olan GR ve GPx'deki aktivite değişikliklerinin gösterilmesi tümör bağımlı bir enzim olan CA-IX ile olan direkt ilişkisini düşündürmektedir.

Böbreklerin antioksidan sistemi, glutasyon enzim sistemi ve ROS'u katalitik olarak daha az zararlı formlara dönüştüren enzimleri içermektedir¹³. Bu çalışmadaki amacımız, bir CA inhibitörü olan AZA'nın renal kanser hücrelerine uygulanarak GR ve

Glutasyon Mekanizmasında CA-IX İnhibisyonu

GPx enzim aktivitesi üzerine olan etkilerinin belirlenmesidir. Tümör ilişkili bir CA izoenzimi olan CA-IX renal kanserde yüksek aktivite gösteren bir biyobelirteçtir¹⁹. Biz de çalışmamızda bu amaçla CA-IX ekspresyonunun yüksek olduğu renal kanser hücre hattı olan CAKI-2 hücre hattında AZA'nın glutasyon enzimleri üzerine olan etkisini inceledik.

Oksidatif stres DNA hasarına sebep olarak hücre içi sinyal iletim yollarını etkiler, hücre proliferasyonu ve migrasyonunu artırdığı için böbrek kanseri gelişiminde de önemli rol oynar²⁰. Ganesamoni ve ark.'ları renal kanser hastalarında oksidatif stres seviyelerinin arttığını belirlemiştir²¹. Antioksidan sistemin önemli enzimlerden olan GR ve GPx renal kanserde çalışılmış ve önemli bulgular elde edilmiştir. Pirinççi ve ark.ları renal kanser hastalarında kontrol grubuna göre düşük düzeyde GPx ve GR enzim düzeyleri saptamıştır²². Lusi ve ark.'ları, evre I ve evre II renal karsinomda düşük GPx ve GR enzim düzeyleri bulmuştur ve RCC'nin farklı evrelerinde glutasyon antioksidan sisteminde çeşitli varyasyonların bulunduğunu göstermiştir²³. Pljesa-Ercegovac ve ark.'ları tarafından renal kanserde GPx ve GR seviyelerinin sağlıklı dokuya kıyasla azaldığı belirtilmiştir²⁴. Cheng ve ark.'ları GPx1'in yüksek ekspresyonunun renal hücre karsinomunun kötü prognozuna sebep olduğunu doğrulamıştır. Ayrıca bu grup GPx1'in, berrak hücreli renal karsinom (ccRCC) hastalarının teşhisi ve prognozu için umut verici bir biyobelirteç olma potansiyeline sahip olduğunu belirtmiştir²⁵. Biz de çalışmamızda renal kanser hücrelerine bir CA inhibitörü olan AZA'yı uyguladığımızda GR ve GPx seviyelerinde anlamlı bir artış olduğunu gözlemledik ve AZA'nın bir inhibitör olarak kullanımının glutasyon mekanizması üzerine olan etkisini gösterdik.

Kanser mikroçevresinin asidik özellik kazanmasında önemli bir rolü olan CA-IX izoenzimi renal kanserde yüksek ekspresyonu sebebiyle oldukça dikkat çekmektedir. Renal kanserin gelişiminde glutasyon enzim sisteminin önemi CA-IX'un yüksek ekspresyonu ile birlikte değerlendirildiğinde çalışmamız öncü çalışma niteliği taşımaktadır. Çalışmamızda CA-IX izoenziminin glutasyon sistem ile ilişkisi gösterilmiş olup bundan sonraki yapılacak çalışmalarda, CA-IX inhibisyonunun renal kanserde glutasyon mekanizması hariç diğer antioksidan sistemler üzerine etkisinin gösterilecek olması da oksidatif strese karşı dirençte bu izoenzimin önemini ortaya çıkaracaktır.

Etik Kurul Onay Bilgisi:

Çalışmada hücre kültürü çalışması olduğu için etik kurul onay bilgisine ihtiyaç duyulmamıştır.

Araştırmacı Katkı Beyanı:

Fikir ve tasarım: E.T., B.E.Ö.B., Ö.Ö.G.; Veri toplama ve işleme: E.T., B.E.Ö.B.; Analiz ve verilerin yorumlanması: B.E.Ö.B., Ö.Ö.G.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: Ö.Ö.G.

Destek ve Teşekkür Beyanı:

Yazarlar finansal desteği kendi bütçelerinden sağlamışlardır.

Çıkar Çatışması Beyanı:

Makale yazarlarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

Kaynaklar

1. Kumari S, Badana AK, Malla R. Reactive oxygen species: a key constituent in cancer survival. *Biomarker Insights*. 2018; 13:1177271918755391.
2. Saikolappan S, Kumar B, Shishodia G, Koul S, Koul HK. Reactive oxygen species and cancer: A complex interaction. *Cancer letters*. 2019; 452:132-143.
3. Veith A, Moorthy B. Role of cytochrome P450s in the generation and metabolism of reactive oxygen species. *Current opinion in toxicology*. 2018; 7, 44-51.
4. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of toxicology*. 2020; 94(3):651-715.
5. Harris IS, DeNicola GM. The complex interplay between antioxidants and ROS in cancer. *Trends in cell biology*. 2020; 30(6):440-451.
6. Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free radical biology and medicine*. 2016; 95:27-42.
7. Adwas AA, Elsayed A, Azab AE, Quwaydir FA. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. *J. Appl. Biotechnol. Bioeng*. 2019; 6(1):43-47.
8. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*. 2018; 54(4):287-293.
9. Ali SS, Ahsan H, Zia MK, Siddiqui T, Khan FH. Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *Journal of food biochemistry*. 2020; 44(3):e13145.
10. Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors and their potential in a range of therapeutic areas. *Expert opinion on therapeutic patents*. 2018; 28(10):709-712.
11. Kumar S, Rulhania S, Jaswal S, Monga V. Recent advances in the medicinal chemistry of carbonic anhydrase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021; 209: 112923.
12. Cazzamalli S, Dal Corso A, Neri D. Acetazolamide serves as selective delivery vehicle for dipeptide-linked drugs to renal cell carcinoma. *Molecular cancer therapeutics*. 2016; 15(12):2926-2935.
13. Pavlović I, Pejić S, Radojević-Škodrić S, Todorović A, Stojiljković V, Gavrilović L, Popović N, Basta-Jovanović G, Džamić Z, Pajović SB. The effect of antioxidant status on overall survival in renal cell carcinoma. *Archives of Medical Science*. 2020; 16(1): 94.
14. <https://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/protocols/biology/roche/cell-proliferation-reagent-wst-1.html>. 9 Nisan 2021.
15. Nabi S, Kessler ER, Bernard B, Flaig TW, Lam ET. Renal cell carcinoma: a review of biology and pathophysiology. *F1000Research*. 2018; 7:307.
16. Ivanov, S., Liao, S. Y., Ivanova, A., Danilkovitch-Miagkova, A., Tarasova, N., Weirich, G., Stanbridge, E. J. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *The American journal of pathology*, 2001; 158(3), 905-919.
17. Pastorekova, S., Ratcliffe, P. J., & Pastorek, J. (2008). Molecular mechanisms of carbonic anhydrase IX-mediated pH regulation under hypoxia. *BJU international*, 101, 8-15.

18. Ho WJ, Simon MS, Yildiz VO, Shikany JM, Kato I, Beebe-Dimmer JL, CetnarJP, Bock CH. Antioxidant micronutrients and the risk of renal cell carcinoma in the Women's Health Initiative cohort. *Cancer*. 2015;121(4):580-588.
19. Liao SY, Aurelio ON, Jan K, Zavada J SE. Identification of the MN/CA9 protein as a reliable diagnostic biomarker of clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res*. 1997; 57(14):2827-31.
20. Frederiks WM, Bosch KS, Hoeben KA, van Marle J, Langbein S. Renal cell carcinoma and oxidative stress: the lack of peroxisomes. *Acta histochemica*. 2010; 112(4), 364-371.
21. Ganesamoni R, Bhattacharyya S, Kumar S, Chauhan A, Mete UK, Agarwal MM, Mavuduru R, Kaushik G, Mandal AK, Singh SK. Status of oxidative stress in patients with renal cell carcinoma. *J Urol*. 2012;187:1172-6.
22. Piriñçi N, Kaba M, Geçit İ, Güneş M, Yüksel, MB, TanıkS, Arslan A, Demir, H. Serum prolidase activity, oxidative stress, and antioxidant enzyme levels in patients with renal cell carcinoma. *Toxicology and Industrial Health*. 2016; 32(2):193-199.
23. Lusini L, Tripodi SA, Rossi R, Giannerini F, Giustarini G, Del Vecchio MT, Barbanti G, Cintorino M, Tosi P, Di Simplicio P. Altered (glutathione anti-oxidant metabolism during tumor progression in human renal-cell, carcinoma. *Int. J. Cancer*. 2001;91:55-59.
24. Pljesa-Ercegovac M, Mimic-Oka J, DragicevicD, Savic-Radojevic A, Opacic M, Pljesa S, Radosavljevic R, Simic T. Altered antioxidant capacity in human renal cell carcinoma: role of glutathione associated enzymes. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2008;26(2):175-181.
25. Cheng, Y, Xu T, Li S,Ruan H. GPX1, a biomarker for the diagnosis and prognosis of kidney cancer, promotes the progression of kidney cancer. *Aging (Albany NY)*. 2019; 11(24):12165.