



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DENEYSEL FİBROSARKOM MODELİNDE CURCUMİN'İN APOPTOZ ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

DR. ECE MİNE DEMİR

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Mukadder SERTER

AYDIN-2009

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DENEYSEL FİBROSARKOM MODELİNDE CURCUMİN'İN APOPTOZ ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

DR. ECE MİNE DEMİR

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Mukadder SERTER

AYDIN-2009

Bu araştırma ADÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından TPF 08009
sayı ile desteklenmiştir.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Fibrosarkomun da içinde yer aldığı yumuşak doku sarkomları birbirinden farklı histolojik tipte ve sağ kalım ile tedavi yaklaşımları açısından çeşitli farklılıklar gösteren bir grup kötü huylu tümörü içerir. Tedavide geniş lokal eksizyon ve radyoterapi (RT) temel yaklaşımlardır ve bazı histolojik alt tiplerde kemoterapi (KT) de tedaviye ilave edilmektedir. Ancak uygulanan bu tedavilere rağmen yüksek riskli hastaların yaklaşık yarısı uzak metastazlara bağlı olarak erken dönemde kaybedilmektedir.

Apoptoz Yunan dilinde; çiçeğin yapraklarının düşmesi, dökülmesi anlamına gelen bir sözcüktür. Apoptoz aynı zamanda programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı ve fizyolojik hücre ölümü ile eş anlamda da kullanılmaktadır (1,2). Çok hücreli canlılarda asıl amaç hem yeni hücre üretmek ve hem de hücreler yaşlandığında veya aşırı çoğalmaya başladığında bu hücrelerin apoptoza gitmesini sağlayarak organizmanın homeostazını korumaktır (3,4). Apoptoz terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve ark tarafından özel morfoloji gösteren hücre ölümleri için kullanılmıştır (5-7).

Apoptozun düzenlenmesine birden çok mekanizma yardımcı olmaktadır. Bunlardan bir tanesi Bcl-2 ailesi genleri ve bunların ürünleri olan proteinlerdir. Bcl-2 ailesine ait olan Bcl-2 proteini anti-apoptotik, Bax proteini ise apoptotik etki oluştururlar.

Bcl-2, 26 kDa molekül ağırlığında ve hidrofobik kısmıyla intraselüler membranlara yerleşen ve geri kalan kısmının sitozolde kaldığı bir membran proteindir. Subsellüler lokalizasyon çalışmaları Bcl-2'nin mitokondriyal dış membranda, nükleer membran ve endoplazmik retikulumda yerleştiğini göstermiştir (8). Bcl-2 apoptoz sırasında bir çok işlev görür. Proapoptotik aile üyelerine bağlanarak onları inhibe eder, mitokondri membranından iyon akışını düzenler, sit-c salınımını düzenler. Apoptotik proteaz aktivasyon faktörlerine (Apaf-1) bağlanarak onların inhibisyonunu sağlar. Bcl-2 proteinlerinin mitokondriyal yolları endoplazmik retikulum (ER) ile de birleşir. ER kalsiyum deposunun salınımı, bir yandan sitoplazmik ölüm yollarını aktive ederken diğer yandan mitokondri için direkt proapoptotik uyarı göndermektedir (9).

Bax 21 kDa moleküler ağırlığında bir proteindir. İnaktif Bax ya

sitoplazmada ya da zayıf olarak membrana bağılı şekilde bulunur. Ölüm sinyali mitokondrideki inaktif Bax'ın aktivite kazanmasına yol açar. Bax'ın aktifleşmesiyle beraber apoptotik yollar uyarılır (10).

Kanser tedavilerinde kullanılan kemoterapötiklerin ve radyoterapinin önemli yan etkilerinin olduğu ve bazı tümörlerde kemoterapiye karşı direnç geliştiği bilinmektedir. Bu sorunların çözümü için, özellikle kanserli hücrelerde apoptozu uyaran buna karşılık normal dokulara zarar vermeyen doğal maddeler araştırılmaktadır. Bu özelliklere sahip doğal maddelerden birinin de curcumin olabileceğine ilişkin çalışmalar vardır. Curcuminin günlük beslenme sırasında alınan dozu toksik değildir ve bu dozlarda curcuminin başlangıç aşamasındaki kansere karşı kullanılabileceği bildirilmiştir (11). Bazı çalışmalarda curcuminin apoptotik etki yaptığı (12) ve antikanserojen (13) etkili olduğu, bazı çalışmalarda ise tam tersine antiapoptotik etkili olduğu (14), hatta kanserojen etki (15), yaratabildiği ileri sürülmüştür.

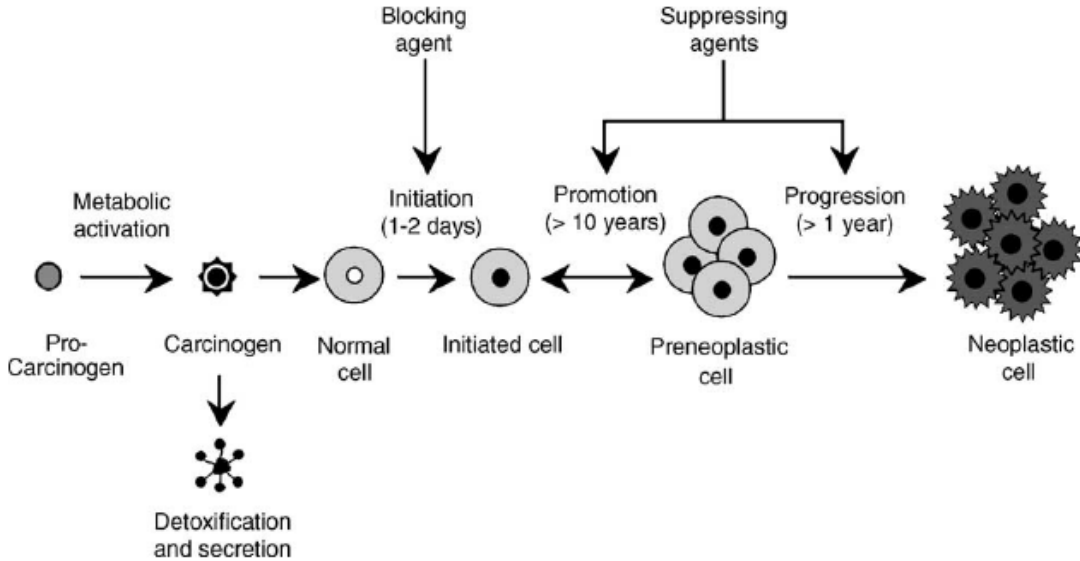
Biz bu çalışmamızda, bir kimyasal karsinojen olan 3-metilkolantren kullanarak fibrosarkom modeli oluşturduğumuz sıçanlara curcumin uyguladık. Daha sonra sıçanların fibrosarkom dokularında Tunel yöntemini kullanarak apoptozu inceledik ve apoptozda rolü olan Bcl-2 ve Bax proteinlerinin ekspresyonlarını immünohistokimya ve Western blot yöntemleri ile gösterdik.

Çalışmadaki amacımız, kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçlara alternatif doğal maddelerden biri olarak gösterilen curcuminin fibrosarkom üzerine apoptotik etkisi olup olmadığını ve Bcl-2 ve Bax proteinleri ekspresyonlarının nasıl etkilendiğini incelemektir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. NEOPLAZİ: Kansere tüm dünyada ölüm nedenleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Bu nedenle son yıllarda kanserin oluş mekanizmalarını anlamak için pek çok çalışma yapılmaktadır.

Neoplazinin sözcük anlamı yeni büyümedir. Neoplazi, normal dokuları aşan, onlarla uyumlu olmayan ve değişime yol açan, uyarı durduktan sonra bile aynı şekilde aşırı büyümeye devam eden bir doku kitlesi olarak tanımlanabilir. Tüm neoplazilerin kökeninde normal büyümenin kontrol mekanizmalarına verilen yanıtın kaybolması bulunmaktadır. Herhangi bir prokarsinojenin herhangi bir metabolik aktivasyonu ile tetiklenen bir dizi aşamadan sonra neoplastik hücre oluşmaktadır (Şekil 1). Tıp dilinde neoplazmlar genel olarak "tümör" adıyla anılır. Aslında tümör yalnızca bir dokuda ödem, hemoraji ve başka bir şekilde oluşturulan şişlik anlamına gelmektedir (16).



Şekil 1. Tümör hücresi oluşum aşamaları (17).

Onkolojide neoplazmların iyi ve kötü huylu sınıflaması en önemli konuyu oluşturur. Bu sınıflandırma neoplazmin olası klinik davranışının değerlendirilmesine dayanır. Kötü huylu tümörlerin hepsi kanser olarak adlandırılır. Kansere sözcüğü Latince yengeç anlamına gelmekte ve tümörün bedeninin herhangi bir bölgesine bir yengeç gibi ayrılmaz bir şekilde yapıştığını tanımlamak üzere kullanılmaktadır. "Kötü huylu" terimi de neoplazmin komşu yapılara invaziv olup, onları harap edebileceğini

ve metastaz yaparak ölüme yol açabileceğini anlatır.

Mezenkim dokusu ve türevlerinden kaynaklanan kötü huylu neoplazmlar sarkom adını alırlar. Fibröz dokudan köken alırsa fibrosarkom, kondrositlerden köken alırsa kondrosarkom olarak adlandırılırlar. Epitel hücre kökenli neoplazmlara ise karsinom denmektedir (16,18).

2.2. İYİ VE KÖTÜ HUYLU TÜMÖRLERİN ÖZELLİKLERİ

Genel olarak iyi huylu ve kötü huylu tümörlerin ayrımı için bazı kriterler (büyüme hızı, lokal invazyon, diferansiasyon, anaplazi, metastaz) belirlenmiştir.

2.2.1. Büyüme hızı: Genelleme olarak iyi huylu tümörlerin yıllar içerisinde yavaş yavaş büyüdüğü, kanserlerin ise hızla büyüüp yayılarak konakçının ölümüne neden olduğu kabul edilmektedir. Ancak bu genellemenin dışında kalan bazı iyi huylu tümörler, kötü huylu tümörlere oranla daha hızlı büyüme gösterebilmektedir. Ayrıca iyi huylu ve kötü huylu neoplazmların büyüme hızı, hormonlara, yeterli kan akımının sağlanmasına ve diğer birçok bilinmeyen faktörlere de bağlıdır. Tümörlerin büyüme hızları, diferansiasyon hızları ile de korelasyon göstermektedir (18).

2.2.2. Lokal invazyon: Çoğunlukla tüm iyi huylu tümörler kaynaklandıkları dokuda lokalize kalan, infiltrasyon ve metastaz kapasitesi olmayan kitleler olarak gelişmektedir. İyi huylu tümörler genellikle fibröz bir kapsül ile tamamen çevrelenmiş yani sınırlanmıştır. Kötü huylu tümörler ise fibröz bir kapsüle sahip olmadıklarından ilerleyici infiltrasyon ve invazyon gösterirler, böylece çevre dokuların hasarlanması olaya eşlik eder. Metastaz gelişinceye kadar kötü huylu tümörleri, iyi huylu olanlardan ayıran en önemli özellik invaziv olmalarıdır (16).

2.2.3. Diferansiasyon ve anaplazi: Diferansiasyon normal hücrelerle karşılaştırıldığında parankim hücrelerinin fonksiyonel ve morfolojik olarak benzerliğinin derecesini tanımlamaktadır. İyi diferansiye olan tümörler, neoplazmın kaynaklandığı dokunun normal olgunlaşmış hücrelerine benzeyen hücrelerden meydana gelmektedir. Diferansiasyonu yetersiz tümörler ise özelleşmemiş, ilkel görünümlü hücreler içermektedir.

Anaplazi, birçok morfolojik ve fonksiyonel değişikliği ifade etmektedir. Hücre ve çekirdek polimorfizmi görülmekte, hücreler çok büyük ya da çok küçük

olabilmektedirler. Karakteristik olarak bol miktarlarda DNA içeren çekirdek koyu renkte boyanmaktadır (hiperkromatik). Çekirdek hücreye oranla büyüktür ve çekirdek/sitoplazma oranı 1 civarındadır (18). Tümör çekirdekleri çoğunlukla bol miktarda DNA taşıyan, çekirdek/sitoplazma oranları artmış, kromatinleri topaklanmış, değişik mitotik şekiller sergileyen hücrelerdir. Uzun süreli ve çok basamaklı genetik bir süreç olan kanserin ilk basamağında daima bir DNA hasarı bulunmaktadır. Bu hasarlanmanın ardından kromozomun yıkılması ve yeniden düzenlenmesi mitoz kontrolü bozulmuş bir fenotipin üretilmesine yol açmaktadır. Mitozun hasarlı kopyalanmış DNA ile devamı kötü huylu tümör hücresi ile sonlanmaktadır. Son aşamada oluşan bu kötü huylu tümör hücresi onkogen ekspresyonunu başlatmaktadır. Onkogenler, hücrelerin transformasyonunu başlatma ve sürdürme kapasitesine sahiptirler. Bu süreç içindeki bir bölüm prekanser olarak isimlendirilmektedir. İleri dönemde kansere dönüşmesi olası, morfolojik olarak farklı atipik hücre veya diferansiasyon gösteren lezyon olarak tanımlanan bu süreç kanserin klinik olarak ortaya çıkmasından önceki evredir. Spontan regresyonlar bu dönemin içinde olmaktadır (16).

2.2.4. Metastaz: Metastatik fenotip kanser hücrelerinin ulaşacağı son aşamadır. Tümör dokusunu terk eden ve dolaşıma geçen bu fenotipteki hücreler, dolaşımda kendilerini bağışıklık sisteminin gözetiminden kurtarmak için lökosit ve trombositlerden oluşan bir pıhtı ile anormal antiijenlerini kapatmaktadırlar. Bu şekilde uzak dokulara ulaşabilen ekstrasvazasyona uğrayan kanserli hücreler doku içinde kendilerine yer açmakta ve metastaz oluşturmaktadırlar (18).

2.3. ONKOGENEZ VE KANSER

Onkogenler, normal büyüme ve diferansiasyonu destekleyen hücresel genler olan protoonkogenlerden köken almaktadır. Bu hücresel genler ilk olarak akut transforme edici retrovirüslerin genomunda taşınan birer yolcu olarak tanımlanmışlardır. Hayvan tümörlerinde hızlı bir indüksiyon ile *in vitro* olarak transformasyona neden olan bu retrovirüslerin genomlarının moleküler incelemesinde, transforme olmayan retrovirüs genomlarında bulunmayan ve transformasyona yol açan özel bir dizilime rastlanılmıştır. Evrim sırasında retroviral onkogenlerin, virüs ile enfekte konakçı hücre DNA molekülüne virüs aracılığı ile

ekleme yapılarak aktarıldığı öne sürülmüştür. Başlangıçta viral genler olarak keşfedilen protoonkogenler, viral genlerin homologları olarak tanımlanmışlardır.

DNA hasarının düzenlenmesinde görev alan DNA onarım genleri karsinogenezis ile ilgilidir. DNA onarım genleri, organizmanın diğer genlerdeki (protoonkogenler, tümör supresör genleri, apoptozu düzenleyen genler) ölümcül olmayan hasarları onarım yeteneğini etkileyerek dolaylı olarak hücre proliferasyonunu ve yaşamını etkilemektedir. DNA onarım genindeki yetersizlik, neoplastik transformasyon ve genomda mutasyonlara yatkınlık yaratmaktadır. Bu tür bir genomik bozukluk için DNA onarım genlerinin her iki allelinin birden inaktive olması gerekmektedir. Bu nedenle DNA onarım genlerinin tümör supresör genler gibi davrandığı düşünülmektedir (16,19).

2.3.1. Büyüme faktörleri: Büyüme faktörlerini kodlayan genlerin mutasyonu, büyüme faktörlerini onkogenik hale getirmektedir. Örneğin simian sarkom virüsünde bulunan trombositten kaynaklanan büyüme faktörü (PDGF) protoonkogene benzer şekilde onkogenik özellik kazanmaktadır. Çoğunlukla kendisi değişmeyen ya da mutasyona uğramayan büyüme faktör geninin ras gibi onkogen türleri, büyüme faktör genlerinin aşırı yapılmasına yol açmakta ve hücreyi transforme edici büyüme faktörü alfa (TNF- α) gibi büyüme faktörlerinin aşırı salınımına yönlendirmektedir (16,19-24).

2.3.2. Büyüme faktör reseptörleri: Büyüme faktör reseptörlerinin normal şekillerinin mutasyona uğradığı ve patolojik olarak aşırı miktarda yapıldığı değişik tümörlerde gösterilmiştir. Normal sitoplazmik uyarı ileten proteinlerin fonksiyonlarını taklit eden onkoproteinlere sıklıkla rastlanmaktadır. Aktif büyüme faktör reseptörlerinden uyarı alan ve çekirdeğe ulaştıran bu onkoproteinlerin önemli üyeleri arasında c-ras ve c-alb bulunmaktadır (16,19).

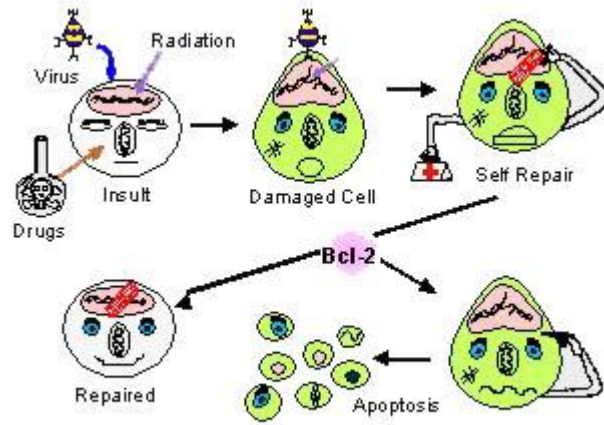
2.3.3. Çekirdekte kopyalama faktörleri: DNA kopyalanmasını düzenleyen genleri ilgilendiren mutasyonlar kötü huylu değişimlere neden olmaktadır. Myc, myb, jun, fos ve rel onkogen ürünleri başta olmak üzere tüm konakçı onkoproteinleri çekirdekte bulunmaktadır. İnsan tümörleri ile ilişkili olan ve en yaygın bulunan myc geni, hücreye sinyal ulaştığında hücreyi hızla bölünmeye götürmektedir. Normalde myc düzeyi, hücre döngüsü başlamadan hemen önce bazal düzeyine ulaşmaktadır. Buna karşılık onkogenik myc geninin devamlı salınımı sonucu hücrede sürekli

proliferasyon görülmektedir (16,19).

2.3.4. Kanser baskılayıcı genler: Hücre büyümesini uyaran proteinleri protoonkogenler kodlamakta, hücre çoğalmasını ise tümör baskılayıcı gen ürünleri yavaşlatmaktadır. İlk bulunan prototip kanser supresör geni çocukluk çağı nadir tümörlerinden olan retinablastomun retinoblastom (Rb) genidir. Araştırmalar Rb loküsünde heterozigot olan hücrenin normal olduğunu, normal Rb geninde heterozigot kaybının kanser gelişimine neden olduğunu göstermiştir. Rb geni normal kopyalarının her ikisinin kaybı ile neoplastik değişimin ortaya çıktığı için bu ve diğer supresör genler, sıklıkla resesif kanser genleri olarak isimlendirilmektedir. Rb geninin homozigot kaybına osteosarkom, meme kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri ve bazı beyin tümörlerinde rastlanmaktadır (19,25).

2.3.5. Tümör baskılayıcı genlerin protein ürünleri: Tümör baskılayıcı genler büyüme inhibitör yolunun değişik bileşenlerini kodlamaktadır. Bir tümör supresör geni olan p53, büyümeyi inhibe etmektedir. Mutajenik kimyasal veya iyonize radyasyonun etkisi ile görülen DNA hasarında p53 geni ilk olarak etkilidir. Mutajenik etki sonrasında normal p53 çekirdekte hızla birikmekte ve bir CDK (Sikline bağımlı kinazlar) inhibitörü olan p21 kopyalanarak siklin/CDK kompleksi inhibe olmaktadır. Bu şekilde hücrenin S fazına girmesi için gerekli Rb fosforilasyonu gerçekleşmemekte ve hücre G1 fazında bekletilmektedir. p53 etkisi ile hücre döngüsünde gerçekleşen bu duraklama, mutajen ile ortaya çıkan DNA hasarının onarımı için yeterli zamanı sağlamaktadır. Bazı DNA onarım enzimlerinin kopyalanmasını kolaylaştıran p53 doğrudan etkili olmaktadır (16).

2.3.6. DNA onarım genleri: İyonizan radyasyon, güneş ışığı, diyetle bulunan karsinojenler ve DNA hasarı yapan çevresel karsinojenler gibi çeşitli etkenlerin etkisinde olmalarına rağmen insanlarda kanser nadiren ortaya çıkmaktadır. İnsanlar DNA hasarını onarabilme yeteneğine sahiptirler (Şekil 2). Çevresel etkenlerin yanı sıra normal koşullarda bölünmekte olan hücrelerde replikasyon sırasında DNA molekülünde oluşan spontan hasarların hemen onarılmaması halinde hücre, neoplastik değişime uğramaktadır. DNA onarım proteinlerin kalıtsal mutasyon bulunanlarda kanser gelişim riski bulunmaktadır (18,25).



Şekil 2. Hücrenin kendi kendisini onarımı (26).

2.4. KİMYASAL KARSİNOGENEZ

Tümörlerin etiyojisine ilişkin araştırmalar bu yüzyılda yapılan en önemli araştırma alanını oluşturmaktadır. Etiyolojik faktörler ekstrensek (ekzojen) karsinojen etkenler ve intrinsek (endojen) karsinojen etkenler olmak üzere 2 grupta incelenir. Ekstrensek etkenler; kimyasal maddeler, fiziksel nedenler ve biyolojik etkenlerdir. İntrinsek olanlar ise hormonal ve genetik faktörlerdir (16,27-30).

Kimyasal maddelerin kanser yapabileceği ilk kez 18. yüzyılda İngiltere'de baca temizleyicilerinde, meslek hastalığı olarak skrotum kanserlerinin fazla olmasının gözlemlenmesi ile ortaya konulmuştur. Bu işçilerde, skrotum derisinin bacalardaki kuruma kronik bir şekilde maruz kaldığı ve kurum içindeki polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) kansere yol açtığı bulunmuştur. Kimyasal karsinogenezin deneysel olarak kanıtlanması, 21. yüzyılın başlarında deney hayvanlarının derisi üzerine kömür katranı uygulanması sonucu deri kanserlerinin oluştuğunu göstermek suretiyle kanıtlanmıştır (16,28,29).

Bir kimyasal etkenin insanda epidemiyolojik incelemeler sırasında ve deney hayvanlarındaki deneysel incelemeler sırasında karsinojen olduğunu belirleyen üç ana kriter vardır.

- Etkenin kontrol grubundaki deneylerde görülmeyen kendine özgü tümör çeşitlerini oluşturması
- Kontrol grubunda da görülen doğal tümörlerin insidensini artırması

c) Kontrol grubunda görülen tümör çeşitlerini daha erken yaşta veya birey başına daha fazla sayıda oluşturması (32).

Karsinojen kimyasal etkenler, hücre DNA'sının yapısını bozup bozmamasına bağlı olarak iki ana gruba ayrılırlar.

a) Genotoksik veya DNA reaktif karsinojenler: Bu maddeler onkogenler dahil hücre büyümesi, bölünmesi ve farklılaşma ile ilgili genlerde DNA ile kovalent bir şekilde bağlanarak karsinojen etki oluştururlar. Bu şekildeki bağlanma sonucu, genotoksik madde DNA eklentisi haline geçer. İnsandan alınan lenfositlerde özel kimyasal yöntemler ile DNA eklentileri belirlenebilir ve ölçülebilir; bu şekilde kişinin geçmişte genotoksik karsinojenlere maruz kalma derecesi belirlenebilir. Bu tür karsinojenler genellikle mutajenik etki yaparlar.

b) Epigenetik (non-genotoksik) karsinojenler: Genellikle mutajenik değildirler, DNA ile kovalent bir reaksiyona girmezler. Ancak bir kısmı reaktif oksijen radikali oluşturma gibi indirekt mekanizmalarla karsinogenezisi tetikler. Etkilerini genellikle hücre membranı, sitoplazma ve ribozomal protein sentezi gibi olaylar üzerinde yaparlar. Bu olaylar, hücre bölünmesinin uyarılmasına veya bölünmenin ya da farklılaşmanın kontrolü ile ilgili mesajların, reseptörlerin ve transmitterlerin kontrolsüz büyüme yönünde modifiye edilmesine yol açarlar. Epigenetik nitelikteki karsinojenlerin tümör oluşturmadaki mekanizmalar, sitotoksikite ve kronik doku zedelenmesi, hormonal dengenin ve bunu sağlayan negatif feed-back inhibisyonunun bozulması ve bağışıklık gibi olaylar üzerinden olabilir. Epigenetik etkenlerin bazıları daha önce genotoksik etkenlere maruz kalmış hücreleri etkileyerek teşvik edici etkileri ile tümör oluştururlar. Epigenetik karsinojenlerin başlıca örnekleri poliklorlu hidrokarbonlar ve poliklorlu bifeniller, östrojenler, sakarin ve fiziksel kitlesi ile karsinojenik etki yapan plastikler ve diğer katı maddelerdir (28,32).

2.4.1. Kimyasal Karsinogeneziste Rol Oynayan Diğer Faktörler

Kimyasal karsinogeneziste, kanser gelişmesini sadece kimyasal etkenin özellikleri değil konakçının özellikleri de etkiler. Konakçının kimyasal karsinogenezis ile ilgili özellikleri şunlardır.

2.4.1.1. Tür ve metabolizma kalıbı: Aflatoksin erişkin ferelerde karsinojenik etki yapmadığı halde, kuşlarda, balıklarda, sıçan ve maymunlarda hepatomaya sebep olur. Karsinojenik

etkinin türe göre değişimi, etkenin ön-karsinojen olması ve bazı türlerde aktif şekle dönüşmesinin mümkün olmaması yani maddenin metabolizma kalıbının türe göre değişmesi ile ilgilidir. Diğer taraftan tür farkı DNA onarım sisteminde de ortaya çıkmaktadır. Hamsterler, metilnitrozaminle indüklenen karaciğer kanserine, sıçanlara göre daha duyarlıdır. Çünkü hamsterlerde DNA içindeki guaninin 0-6 pozisyonunda alkilenmesi ile olan değişimin onarımı olamamaktadır (32,33).

2.4.1.2. Genetik yatkınlık: Belirli bir hayvan türünün belirli ırkları gerek kimyasal karsinogeneze, gerekse spontan kansere diğer ırklardan daha fazla eğilim gösterirler. Farelerde deneysel olarak, spontan kanser insidensinin %90'a kadar çıktığı ırklar elde etmek mümkün olmuş ve bunlarda belirli bir madde ile oluşturulan kimyasal karsinogenezis oranı da yüksek bulunmuştur. Sıçanlarda dimetilbenzantrasene bağlı meme kanseri sıklığı bazı ırklarda (Wistar veya Sprague-Dawley gibi), diğerlerine (Marshall ve Long Evans gibi) göre çok yüksek bulunmuştur. İnsanlarda spontan kansere karşı genetik yatkınlığın bulunduğu ve bazı ailelerde belirli kanser tiplerinin (meme ve kolon kanserleri gibi) fazla olduğu saptanmıştır (32,34).

2.4.1.3. Doz: Deney hayvanlarında yapılan incelemeler karsinojenik etkinin doza bağımlı olduğunu göstermiştir. Belirli bir doz sınırının altında karsinojenik etkinlik kaybolur. Bazı karsinojenik maddeler, aflatoksinler gibi, güçlü karsinojenik etki yaparlar (32).

2.4.1.4. Cinsiyet ve hormon dengesi: Dimetilbenzantrasen deriye sürüldüğünde erkek farelerde, dişilerden çok daha fazla sıklıkta deri kanseri yapar. Bazı azo boyaları ise bu türde, cilt altına verildiklerinde dişilerde erkeklerde olduğundan daha fazla hepatoma yaparlar. Meme kanseri yapan ilaçlar bu etkilerini, dişi cinsten, erkekte olduğundan daha sık oluştururlar.

2.4.1.5. Yaş: Yeni doğmuş deney hayvanları, genellikle karsinojenlere erişkin hayvanlardan daha duyarlıdır. Yeni doğan farelerde aflatoksin kolayca hepatoma yaptığı halde, erişkin farelerde pek yapmaz (34). Genotoksik karsinojenler, çok düşük dozlarda bile genç hayvanlarda uygulamadan bir yıl sonra özellikle karaciğer ve akciğer tümörüne neden olurlar. Yeni doğanlarda genç hayvan ve insanlarda hücre çoğalma hızı, DNA sentezi, hormonlara duyarlı organlardaki mitoz olaylarındaki uzun süreli gelişme bu duyarlılığa neden olmaktadır (28).

2.4.1.6. Diyet: Diyet içinde var olan mikotoksinler, pestisid kalıntıları ve diğer bazı faktörler

ilaca bağılı kanser sıklığını değiştirebilirler veya diyet bu kalıntılar nedeniyle karsinojenik etki gösterebilir.

2.4.1.7. Çevresel faktörler: Birçok çalışmada araştırıcılar, güneş ışığı, kronik alkol kullanımı, benzen, arsenik, krom, nikel, asbestoz gibi kanserojenlere maruz kalınmasının insanda kanser oluşumunda önemli rol oynadığını bildirmişlerdir (16,32).

2.4.1.8. Bağışıklık savunma mekanizmalarının zayıflaması: İnsan kaynaklı kötü huylu hücreler timusu olmayan nude farelere cilt altına enjekte edilirse kanser oluştururlar; aynı işlemin normal farelerde kansere yol açma olasılığı azdır (28,32). Petersen ve ark nın yaptığı bir çalışmada nude fareler ile bağışıklık sistemi normal farelere 3-MC (3-Metilkolantren) indükleyerek tümör gelişimini araştırmışlar, iki grup arasında tümör insidansında farklılık bulmuşlardır (35).

2.4.2. Başlıca Karsinojenik Maddeler

DeneySEL kanser oluşturma çalışmaları sırasında veya ilaç geliştirme ya da endüstriyel, çevresel ve diğer bakımlardan önemi olan binlerce maddenin karsinojenik etki bakımından taranması sırasında birçok maddenin karsinojen olduğu bulunmuştur. Bunlardan en çok bilinenleri şunlardır:

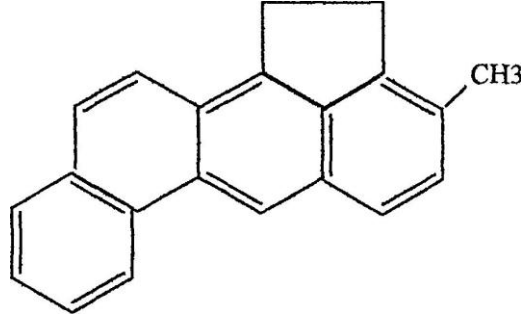
- Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
- Alkil nitrozaminler ve nitrozoguanidinler
- Antineoplastik ilaçlar ve immunosüpresif ilaçlar
- Aromatik amin ve amidler
- Nitro aromatik bileşikler ve nitrofuronlar
- Azo boyaları
- Bazı bitkisel kanserojenler
- Karsinojenik metaller, mineraller
- Halojenli hidrokarbonlar
- Tütün dumanı
- Seks steroidleri ve hormon modifikatörleri
- Psöriazisin fotokemoterapisinde kullanılan etkenler

- Formaldehid
- 1,3-Butadien

2.4.2.1. 3-Metilkolantren ve Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) karsinojen maddeler arasında en çok araştırılan gruptur. Çevremizde bu bileşikler (3,4-benzopren, 1,2-benzantresen, 3-metilkolantren, 5-metilkrizen gibi) katran, is, katı ve sıvı yakıtlar yoluyla havada, egzoz gazında, sigara dumanında, işlenmiş besin maddelerinde ve bazı endüstri işyerleri havasında yaygın olarak bulunmaktadır. Bu maddelerin deney hayvanlarında (fare ve sıçanlarda) çeşitli yollarla kanser oluşturduğu saptanmıştır. Karsinojen olan PAH'lar, vücutta sitokrom p450 bağımlı oksidazlar tarafından hidrokarbon iskeletinin çeşitli pozisyonlarında epoksitlere metabolize edilirler, böylece asıl kanserojen metabolitleri meydana gelmiş olur (28,32,36).

3-Metilkolantren (3-MC); kolik asit, deoksikolik asit ya da kolesterolün pirolitik degradasyonu ile sentezlenen, oldukça karsinojenik bir polisiklik aromatik hidrokarbondur. Bir mutajenik etki oluşturabilmek için metabolik aktivasyon gerektiren bir prokarsinojendir ve laboratuvarlarda kimyasal karsinogenezis çalışmaları için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. 3-MC soluk sarı renktedir. Kaynama noktası 80 mmHg'da 280°C, erime noktası 179°C, molekül formülü C₂₁H₁₆, molekül ağırlığı 268,34 g/mol, yoğunluğu 20°C'de 1,28'dir. 3-MC'nin kimyasal yapısı Şekil 3'te görülmektedir. 3-MC toprağa salınırsa çok kuvvetli bir şekilde toprağa absorbe olmakta ve süzülemediğinden yeraltı sularına karışmamaktadır. Toprakta yıkılmaz (biodegrade olmaz) ve/veya hidrolize olmaz. 3-MC atmosfere salınırsa güneş ışığında doğrudan fotolize uğrayabilir ve peroksil radikalleri ile reaksiyona girebilir. Atmosferdeki tahmin edilen yarılanma süresi, fotokimyasal olarak üretilen hidroksil radikalleri ile reaksiyonun sonucu olarak 2,81 saattir (36).



Şekil 3. 3-Metilkolantren' in kimyasal yapısı (37).

3-MC çeşitli bileşiklerin biyoaktivasyonunu katalizleyen sitokrom p450 ailesinin güçlü bir indükleyicisidir. Çeşitli genleri özellikle sitokrom p450 genlerini düzenler (32). Sitokrom p450 (CYP) monooksijenaz sistemi, hayvanlarda endojen ve ekzojen kimyasalların oksidatif metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. Sitokrom p450 enzimlerinden olan CYP1A1 ve CYP1A2, halojenlenmiş aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler ve PAH'ı da içine alan bazı çevresel karsinojenlerin aktivasyonu ve metabolizmasında önemli rol oynamaktadır (21,20,38). PAH'lar, sitokrom p450 bağımlı oksidazlar tarafından asıl kanserojen metabolitleri olan epoksitlere metabolize edilmektedirler.

3-MC, deney hayvanlarında çeşitli kanser modelleri oluşturmak üzere çok yaygın olarak kullanılmaktadır. 3-MC'nin kanser modeli oluşturmak amacıyla deney hayvanlarına verilme şekli ve dozu çalışmalarda farklılık göstermektedir. Örneğin, Kabler ve ark yüksek doz trans plasental 3-MC kullanarak, gebe ratların fetuslarında adenom ve akciğer adenokarsinomunun oluşumunda hem maternal hem de fetal metabolik fenotiplerin etkisini göstermişlerdir (39). Bu araştırmacılar, gebe sıçanlara hamileliğin 17.günü 10-30mg/kg 3-MC tek doz olarak uygulamışlardır. 10 mg/kg 3-MC uygulaması ile daha az sayıda tümör oluşurken, daha yüksek dozlarda akciğer tümör insidensinin arttığı saptanmıştır (39). Huggins ve ark da sıçanlar üzerinde 3-MC ile yaptıkları çalışmada 3-MC'yi, 10 mg/sıçan dozunda 0.2 mL susam yağı içinde çözülerek sıçanların boyun, ense ve bacaklarına 50 gün boyunca subkutan olarak enjekte etmişlerdir (40).

3-MC, deney hayvanlarında fibrosarkom modeli oluşturmak amacıyla da kullanılmaktadır. Örneğin Fish ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, 3-MC tek doz subkutan uygulayarak fibrosarkom oluşturmuşlardır (41). Devens ve arkadaşlarının

yaptıkları çalışmada ise 3-MC karsinojenik (0,5 mg/fare) ve subkarsinojenik (0.025 mg/fare) dozlarda farelere tek doz ve subkutan olarak uygulanmıştır. 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)'nın, 10 microgram/fare dozunda subkutan ve intraperitoneal olarak düşük doz 3-MC uygulanan farelere verilmesiyle fibrosarkom olduğu, karsinojen dozda 3-MC verilen farelere TPA uygulanmasıyla da fibrosarkom oluşumunun hızlandığı görülmüştür (42). Patiroğlu ve ark da sıçanlarda 3-MC uygulayarak oluşturdukları fibrosarkom modelinde magnezyumun destek tedavi olarak verilmesinin fibrosarkom oluşum sürecine etkisini incelemişlerdir (43).

2.5. APOPTOZ

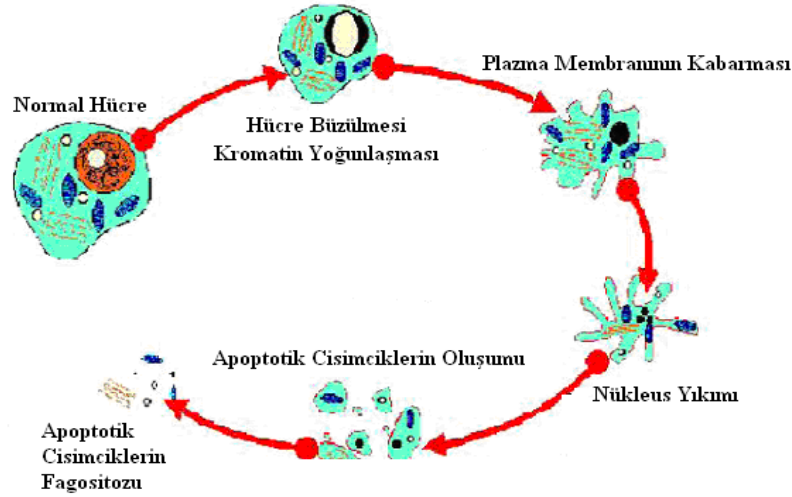
Yunan dilinde apoptoz; çiçeğin yapraklarının düşmesi, dökülmesi anlamına gelen bir sözcüktür. Aynı zamanda apoptoz programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı ve fizyolojik hücre ölümü ile eş anlamda da kullanılmaktadır. Çok hücreli canlılarda asıl amaç hem yeni hücre üretmek hem de hücreler yaşlandığında veya aşırı çoğalmaya başladığında bu hücrelerin apoptoza gitmesini sağlayarak organizmanın homeostazını korumaktır (3,7).

Apoptoz terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve ark tarafından özel bir morfoloji gösteren hücre ölümleri için kullanılmıştır. Yaptıkları çalışmalarda apoptoza uğrayan hücrelerin çekirdeklerinin yoğunlaştığını ve hücre içeriklerinin membran ile çevrili kesecikler içine alındığını belirlemişler ve bunların komşu hücreler tarafından elendiğini gözlemlemişlerdir (7).

Genel olarak canlı organizmalarda iki ana hücre ölüm tipi vardır. Bunlardan biri nekroz, diğeri apoptozdur. Nekroz, hücre yaralanmaları sonucu hücrenin zarar görerek şişmesi ve patlayarak ölmesidir. Apoptozda ise hücreler birçok uyararla ölüme giderler; ancak bu ölüm programlı, kontrollü ve düzenli bir şekilde gerçekleşir. Bu süreç nekrotik hücre ölümünden farklıdır. Nekrotik ölümden hücre kontrolsüz biçimde ölüme gider, hücre parçalanır, enflamasyon görülürken apoptozda hücre kendi ölümü sırasında aktif rol alır ve kendi ölümünün her aşamasına katkıda bulunur. Bu nedenle de apoptoz hücre intiharı olarak bilinir. Nekrozda patlayan hücre içerikleri komşu hücrelere zarar verirken, apoptozda çevre hücreler zarar görmez ve ölen hücreden etkilenmez (44).

Apoptozda hücre büzülür ve komşu hücrelerden ayrılır. Hücre yüzeyinde

kabarcıklar oluşur. Bu kabarcıklar kaynamayı andıran bir görüntü oluşturur. Hücre içi organeller yapılarını korurken çekirdekte dağınık halde bulunan kromatin, çekirdek zarında yoğun heterokromatin birikintiler şeklinde gözlenir. Ayrıca apoptoz izlenen hücrelerde daha ileri değişikliklerin tipik göstergesi; çekirdeğin parçalara ayrılması ve hücrenin "apoptotik cisimcik" adı verilen çok sayıda yuvarlak biçimde yapılara bölünmesidir (Şekil 4), (7).



Şekil 4. Apoptoza giden hücrede morfolojik değişiklikler (45).

Apoptotik hücreler, dokuda 4-9 saat boyunca tanınabilir haldedirler ve diğer organeller gibi lizozomları da bozulmadan kalır. Apoptotik cisimler makrofajlar veya makrofaj aktivitesi gösterebilen hücreler tarafından fagosite edilirler. Apoptotik cisimciklerin makrofajlar tarafından tanınmasında trombospondin, Fas ve Cd-36'nın rol oynadığı bildirilmiştir (7).

2.5.1. Organizmada Apoptotik Hücre Ölümünün Gözlendiği Durumlar

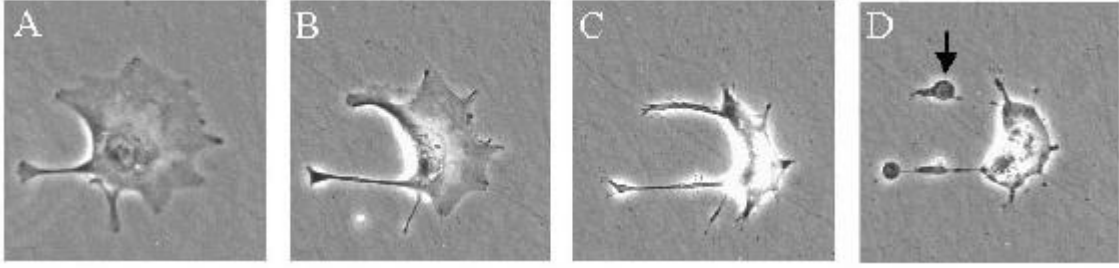
Embriyonal ve fötal dönemde, özellikle sinir sisteminin ve bağışıklık sisteminin normal gelişiminde apoptoz önemli görev almaktadır. Bu, sinir sisteminin gelişimi sırasında oluşan çok fazla sayıdaki nöronların hedef sayıya indirilmesi, aksonları hedeflerine ulaşmayan nöronları ortadan kaldırarak nöronlarla hedef organlar arasında oluşan bağlantı hatalarının onarılması, bağışıklık sisteminde oluşan fazla ve otoreaktif hücrelerin ortadan kaldırılarak bunların embriyoya ve fetüse zararının engellenmesi şeklinde olur (46).

Apoptoz erişkinlerde hormonal yetmezliğe bağı organ gerilemelerinde, özellikle menstruasyonda endometriyal hücre yıkımı, menopozda over folliküllerinin atrezisi, laktasyon sonrasında meme bezi gerilemesi ve orşiektomi sonrasında prostat atrofisinin gelişmesinde rol oynamaktadır.

Proliferasyona uğrayan hücre topluluklarında rol oynayarak dokulardaki hücre homeostazının sağlanmasında, tümörlerin regresyona gittikleri dönemlerde de apoptoz görülmektedir. Ayrıca T ve B lenfositlerindeki sitokin yetersizliğinde hücreler apoptozla ortadan kaldırılabilir. Hücrel red ve graft versus host reaksiyonlarında sitotoksik T lenfositleri aracılığıyla apoptoz oluşmaktadır. Pankreas, parotis ve böbrek gibi organlarda kanal tıkanıklıklarına bağı gelişen atrofilerde, viral hepatit gibi çeşitli viral hastalıklarda, hücrelerdeki hasarlanma durumlarında (ısı, radyasyon, antikanser ilaçlar, hipoksi vb.) ve yaşlılıkta apoptoz izlenmektedir (47).

2.5.2 Apoptozun Aşamaları

- Apoptozun indüksiyonu
- Hücre yüzey ölüm reseptörlerinin uyarılması
- Sitokrom-c'nin salıverilmesi
- Apoptozom oluşumu (sitokrom-c + Apaf-1 + kaspaz-9)
- Mitokondriyal transmembran potansiyelin değışmesi
- Kaspazların aktivasyonu
- Fosfatidilserinin hücre membranının iç yüzünden dış yüze transloke olması
- DNA'azın aktivasyonu sonucu DNA'nın fragmantasyonu (internükleozomal DNA fragmantasyonu)
- Yapısal proteinlerin yıkılmasına bağı olarak apoptoze özgü morfolojik değışikliklerin meydana gelmesi (44,46), (Şekil 5).

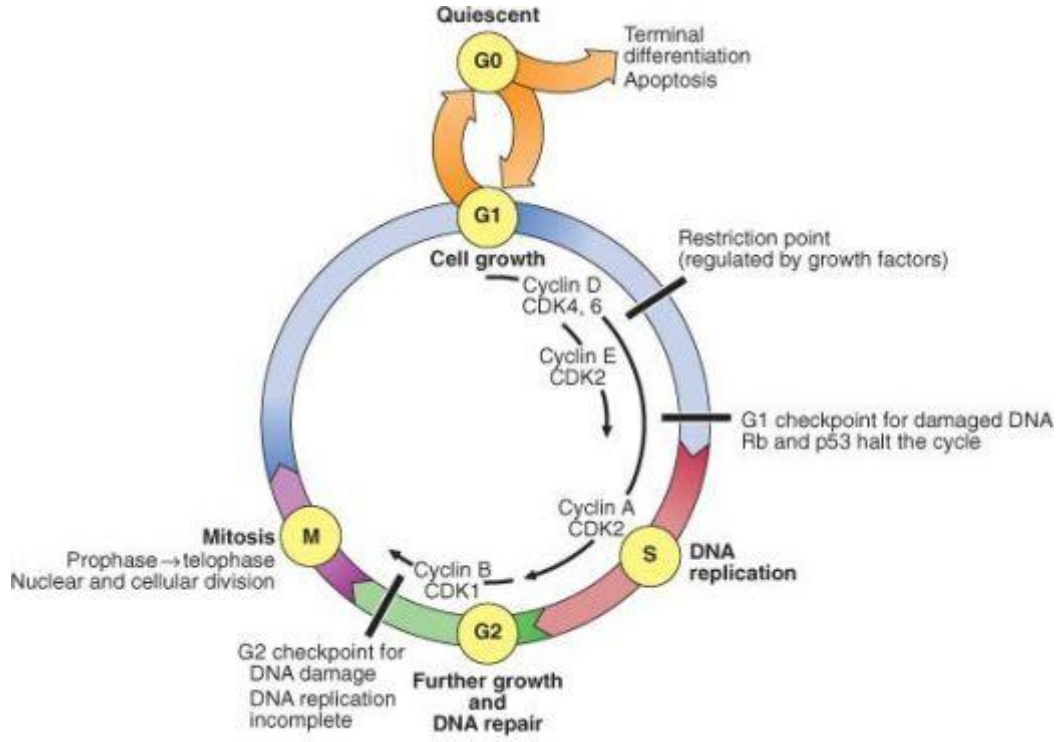


Şekil 5. Apoptotik cisimciklerin oluşumu (48).

2.5.3. Apoptozun Başlatılması (Sinyal Üretici Yollar)

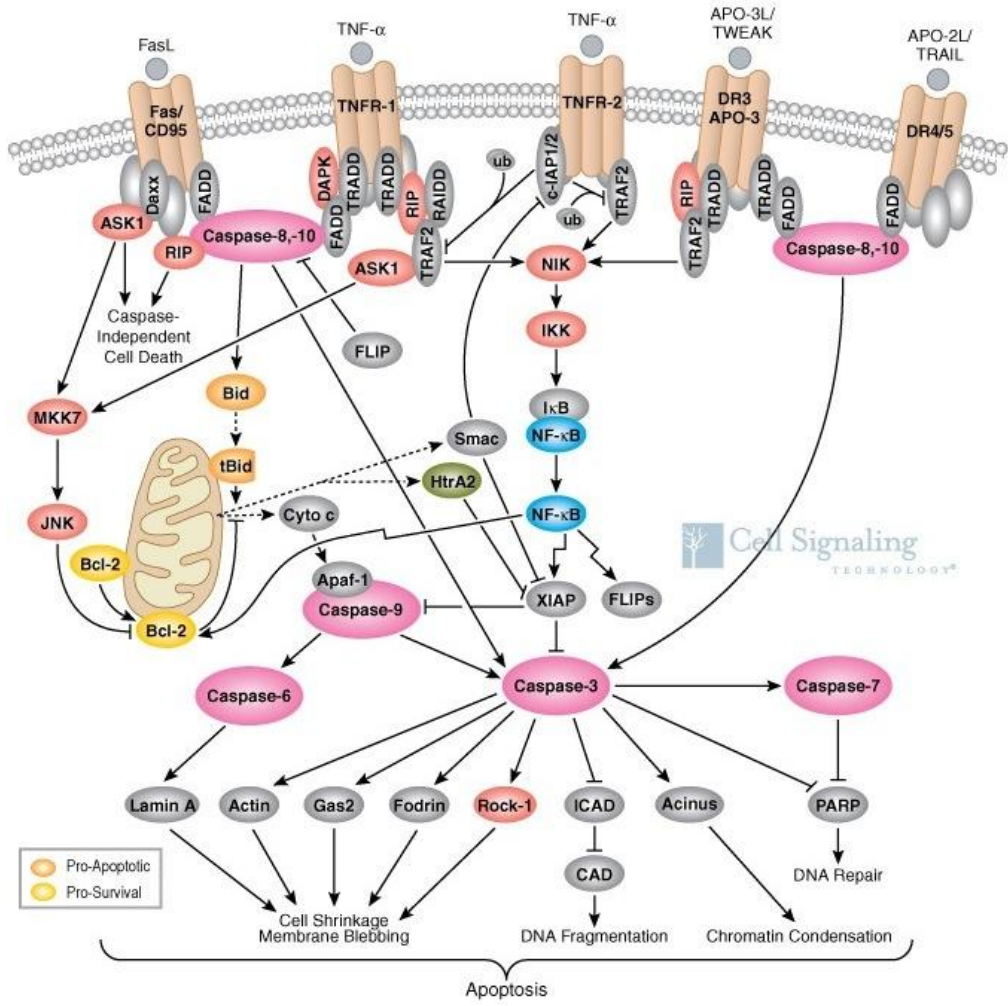
1) Hipoksi, ısı, antikanser ilaçlar, radyasyon, gamma ve ultraviyole ışınlar gibi etkenler apoptoza neden olabilirler. Bu etkenler DNA hasarı oluşturarak apoptoz meydana getirirler (46).

2) Çevresel yaşam sinyallerinin ve büyüme faktörlerinin yetersizliği: Hücreler çevre hücrelerden ve hücre dışı matriksten gelen yaşam sinyallerine, büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar. Bu sinyaller düzenli bir şekilde ve yeterli miktarda olmazsa hücreler apoptoza giderler (49). Normal hücre döngüsünde büyüyen ve fonksiyon gösteren hücreler interfaz safhasında beklerler. İnterfaz, gap 1 (G) fazı ve gap 2 fazından oluşur. G1 fazı, mitoz (M) fazı ve S fazı arasında gerçekleşir. S fazında DNA replikasyonu başlar. G2 fazı ise DNA replikasyonu ve mitoz arasında oluşur. Hücre G1 fazında metabolik olarak aktiftir, hücrede RNA ve protein sentezi gerçekleşir. Hücre bölünmek için hazırlanır ve DNA replikasyonu için S fazına girer. Daha sonra hücre mitotik bölünme öncesi oluşan yeni DNA'nın onarımı için G2 fazına girer (Şekil 6). Bu şekilde gerçekleşen hücre siklusu çok sıkı bir şekilde denetlenmektedir. G1 ve S fazları arasında ya da G2 fazı ile mitoz arasında oluşabilecek hasarlanma, kromozomların yanlış hizalanmaları ya da DNA'nın replike olamaması sonucunda hücre denetiminden geçemez ve hücrenin onarımı gerçekleştirilir. Çevreden gelen sinyallerin kesilmesi ile hücre ölümünün nasıl başladığı tam olarak bilinmemektedir. Büyüme faktörüne bağımlı hücrelerin kültürlerinde, büyüme faktörleri çekildiği zaman, hücrelerin metabolizmalarında ani bozulmalar ve hücre döngüsünde duraklama olduğu izlenmiştir (7,46).



Şekil 6. Hücre siklusu (50).

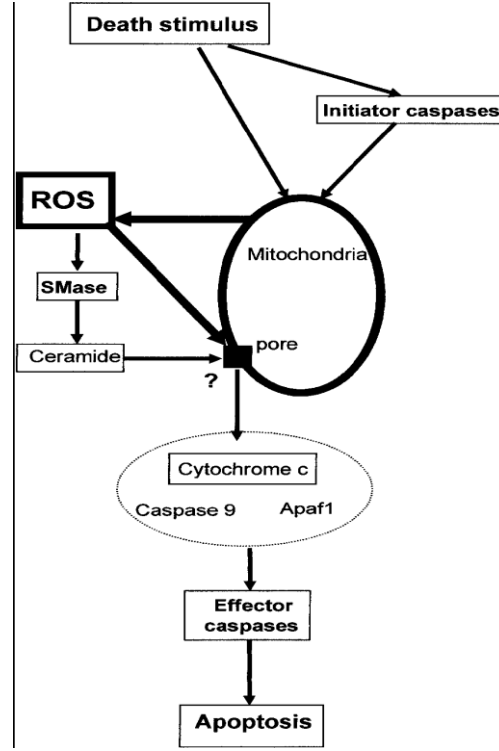
3) Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (Reseptör Ligand etkileşmesi): Bazı sitokinler hücre membranında bulunan reseptörlere bağlanarak ölüm programını harekete geçiren sinyaller üretebilirler. Apoptozda rol alan membran reseptörleri içinde en önemli grup "tümör nekrozis faktör reseptör (TNFR)" ailesidir. Bu reseptör grubunun en az 19 üyesi vardır. Bu reseptörlerin biyolojik etkileri çeşitlidir ve apoptoz ile sınırlı değildir (63). Bir kısmı apoptoz oluştururken, bir kısmı proliferasyona neden olur. Bir kısmı ise her ikisini de oluşturur. TNFR içinde apoptoz oluşturan reseptörlerden en önemlileri Fas ve TNFR1'dir. Bu reseptörler uyarıldıklarında, hücrenin sitoplazmasında bulunan parçaları, "adaptör proteinlere" bağlanır. Adaptör proteinlerin ölüm efektör parçaları vardır. Bunlar da apoptoz için başlatıcı olan kaspazlara (örn. prokaspaz 8) bağlanırlar (7, 46), (Şekil 7).



Şekil 7. Ölüm reseptörleri, mitokondri ve apoptoz (51).

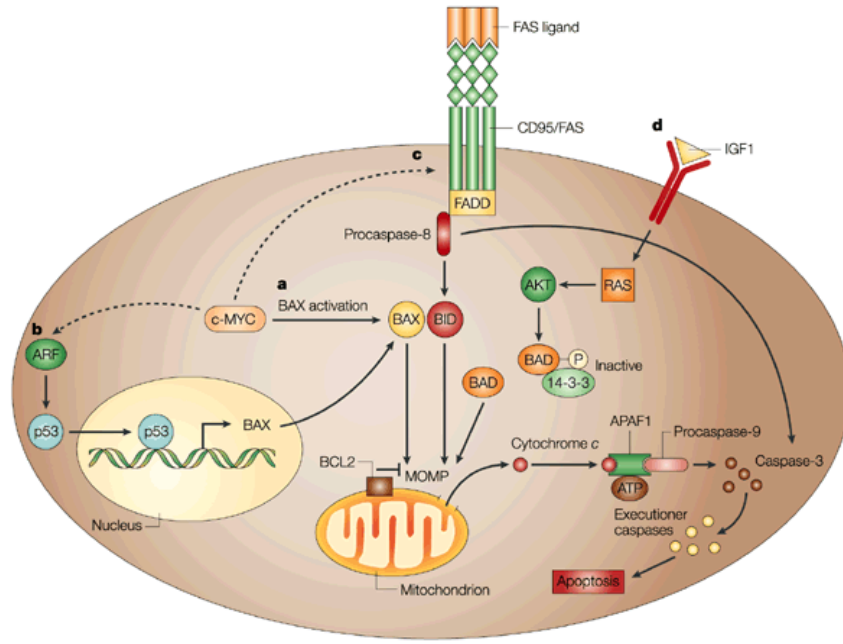
4) ROS Aracılı Apoptoz:

Apoptoz oluşumunda rol oynadığı ileri sürülen mekanizmalardan biri de ROS üretiminin artışı sonucunda apoptoz oluşumudur (52). Buna göre ROS seramid üzerinden veya doğrudan mitokondriyi uyararak sitokrom-c salınımına yol açmakta ve bu da kaspaz aktivasyonu sonucunda apoptoz oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Şekil 8).



Şekil 8. ROS aracılı apoptoz (52).

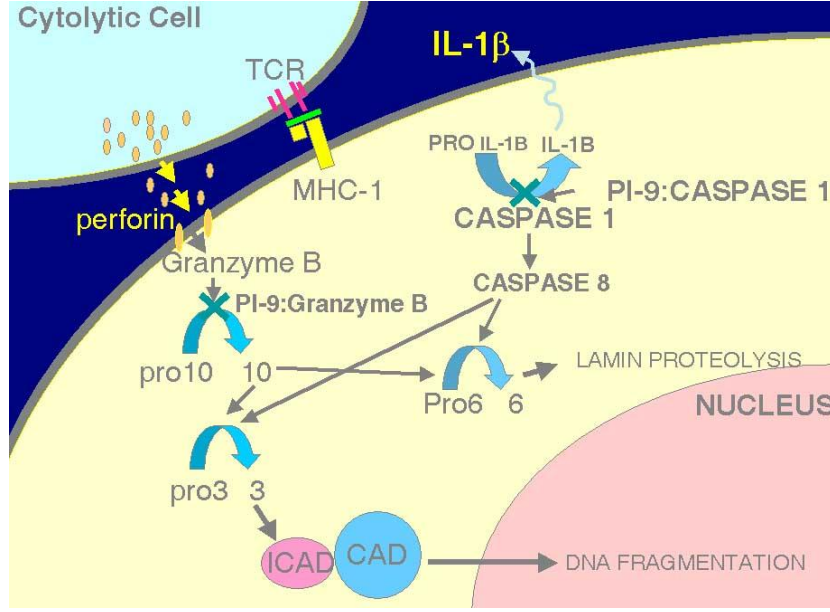
5) Fas-Fas ligand aracılı apoptoz: Bu tip apoptoz hücre yüzey reseptörü Fas aracılığı ile oluşur. Fas ligandın Fas reseptörüne bağlanması ile Fas reseptörünün hücre içinde bulunan parçası, Fas adaptör proteinle birleşerek ölüm başlatan sinyal kompleksini oluşturur. Bu da prokaspaz 8'in aktifleşmesini sağlar (Şekil 9). Fas ligand membrana bağlı veya solubl olabilir. Solubl fas ligand (FasL) bağışıklık sistem hücreleri tarafından oluşturulur. Bu ligandın T hücreleri membranında bulunan Fas reseptörüne bağlanmasıyla, bağışıklık reaksiyonuyla aktive olmuş ve görevlerini tamamlamış olan lenfositlerin apoptoz ile yok edilmeleri sağlanmış olur (46).



Nature Reviews | Cancer

Şekil 9. Fas ligand aracılı apoptoz (53).

6) Sitotoksik T lenfosit aracılı apoptoz: Sitotoksik T lenfositler enfekte olmuş olan konakçı hücrelerin yüzeyinde bulunan yabancı antijenleri tanırırlar. Sitotoksik T lenfositlerin ana görevi kötü huylu ve/veya virüs ile enfekte olmuş olan hücrelerin öldürülmesidir (64,69). Yabancı antijenleri tanıdıklarında yüzeylerinde Fas ligand oluşur. Hedef hücrelerin Fas reseptörlerine tutunurlar. Sitotoksik T lenfositler sitoplazmalarında granzyme B (serin proteaz) ve perforin adı verilen ve apoptoz oluşmasını sağlayan proteinler içeren sitoplazmik granüllere sahiptirler. Perforin, transmembran por oluşturu bir proteindir. Sitotoksik T lenfositler hedef hücrelerin membranlarında perforin ile porlar oluşturarak, sitoplazmalarına granzyme B salgırlar. Granzyme B hedef hücrelere girerek kaspazları aktive eder (7), (Şekil 10).

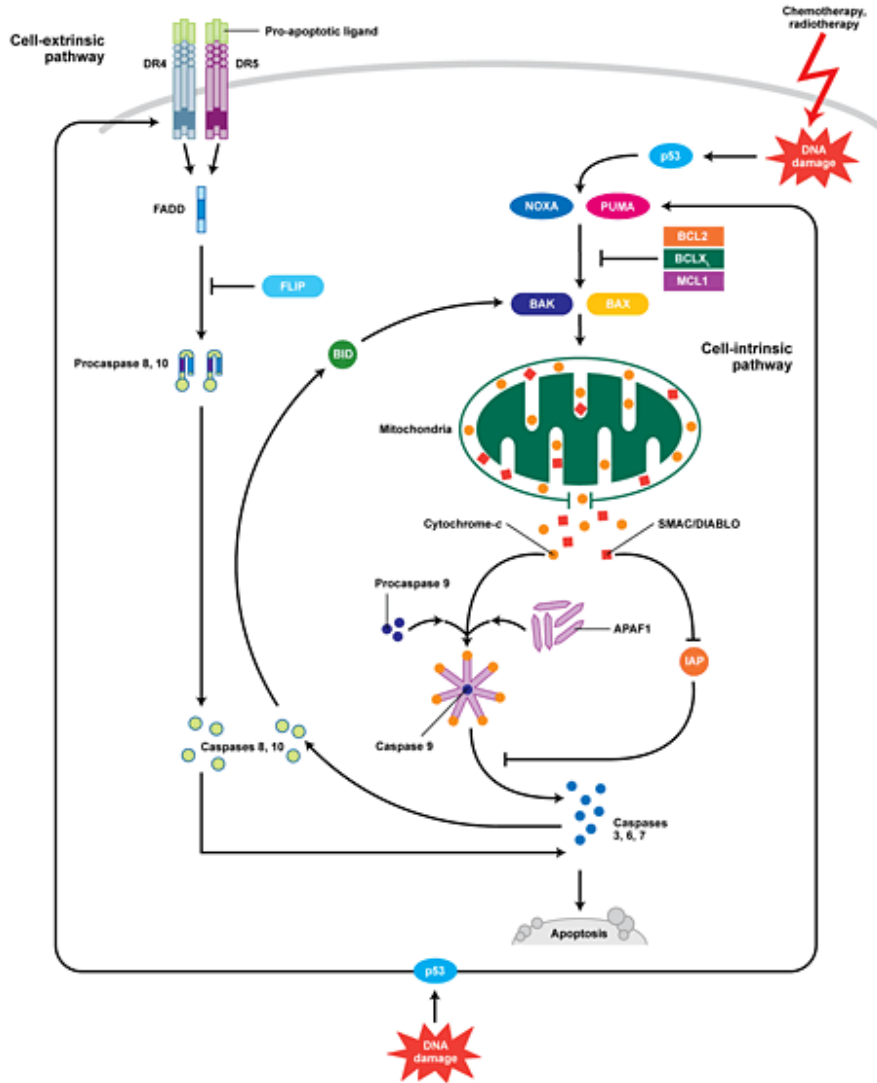


Şekil 10. Sitotoksik hücreler ve apoptoz (54)

7) Kaspazlar: Zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptozda rol almaktadır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir yolağa (şelale tarzı reaksiyon dizisi) neden olurlar. Bazıları (kaspaz 2,8,9,10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken bazıları da (3,6,7) efektör kaspazlar olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri [örneğin; hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan poli ADP-riboz polimeraz (PARP)] parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar.(Şekil 11). İlk tanımlanan enzim ICE (interlökin 1 dönüştürücü enzim)'dir ve prokaspaz 1 olarak bilinir. Kaspaz yolağı, sitokrom-c'nin sitoplazmaya salıverilmesiyle prokaspaz 9'un aktivasyonu yoluyla aktifleştirildiği gibi, kaspazlar da sitokrom-c'nin salıverilmesine neden olabilirler.

Bir kaspaz inhibitör ailesi olan IAP (inhibitors of apoptosis) kaspazları seçici olarak inhibe eder, böylece apoptotik mekanizmayı durdurur. Bu inhibitörler birçok kötü huylu hücreler tarafından aşırı eksprese edilmektedirler. IAP ayrıca hücre

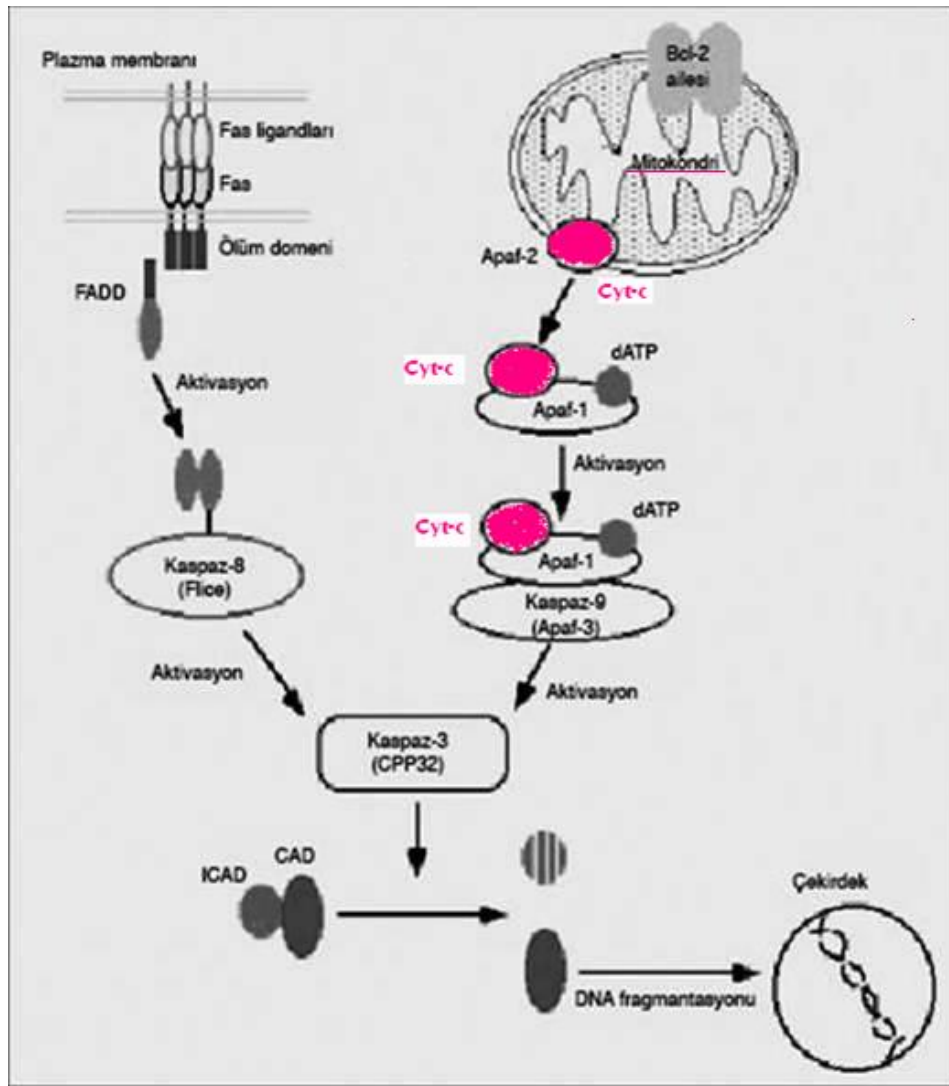
döngüsünü de etkileyerek apoptozu durdurabilir. Kaspazlardaki defektler otoimmün hastalıklara, kansere ve bazı nörolojik bozuklukların oluşumuna katkıda bulunabilir. Hatta kaspaz 8'in nöroblastomada tümör supresörü olarak işlev gördüğü bulunmuştur (55).



Şekil.11. Kaspazlar ve apoptoz (56).

8) Sitokrom-c (sit-c) ve mitokondri: Sitokrom-c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir. Apoptoz sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya saliverilmesi apoptoz yoluna girmiş bir hücrede geri dönüşümsüz döneme girildiğini işaret eder. Mitokondriden apoptoz indükleyici faktör (AIF) ile birlikte sitoplazmaya salınır. Sitokrom-c sitoplazmik protein olan Apaf-1'e bağlanır ve onu aktive eder, ardından

ATP'nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive eder. Aktif kaspaz-3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD) inaktifleştirir, böylece ICAD'ın bağladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD) serbestleşir ve bu da apoptozun karakteristik bulgularından biri olan kromatin yoğunlaşmasına ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur (Şekil 12). Kaspaz bağımsız apoptoz varlığı da bilinmektedir. Kaspaz bağımsız apoptoz yine mitokondriden salınan bir faktör olan AIF etkisiyle gerçekleştirilir (7).

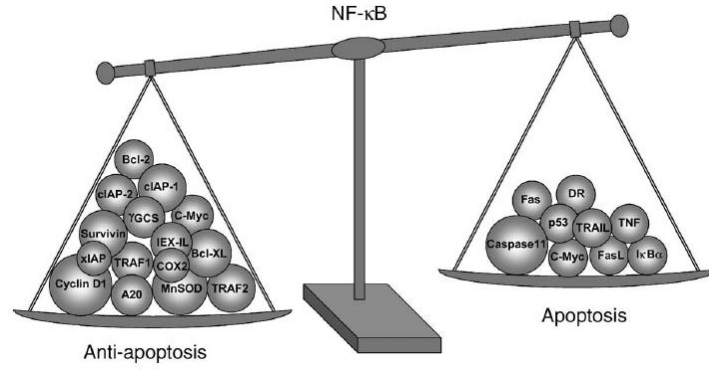


Şeki.12. Sitokrom-c ve mitokondrinin apoptozdaki yeri (45).

9) NF- κ B aracılı apoptoz: NF- κ B, Ranjan Sen ve David Baltimore tarafından 1986'da B lenfositlerin çekirdeklerinde bağışıklık globulin kappa hafif zinciri geninde enhancer bölgesine bağlanan bir faktör olarak tanımlanmıştır (57). Sonraki çalışmalarda bu faktörün Drosophila'dan insana dek her hücre tipinde sitoplazmada yaygın olarak bulunduğu gösterilmiştir. Çekirdeğe sadece aktive olduğunda geçmekte ve burada bağışıklık sistemi, büyüme ve enflamasyonu denetleyen 200'ün üzerinde geni kontrol etmektedir (58).

NF- κ B'nin apoptozdaki işlevi iki yönlüdür. Bazı araştırmacılar NF- κ B'nin apoptoza aracılık ettiğini bildirmektedirler. Kühnel ve ark insan hepatoma Huh7 ve Hep G2 hücre kültürleri ile çalışmışlar ve karaciğer adenovirüs enfeksiyonunun erken evresinde NF- κ B'nin proapoptotik etkili olduğunu göstermişlerdir (59). Nakai ve ark sıçanlara intrasitriyal kainik asit (KA) (1,25 - 5 nmol) infüze etmişler ve KA'nın sitriyal nöronlar üzerindeki apoptotik etkisini NF- κ B'yi aktive ederek gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada NF- κ B aktivasyonunun birden fazla indirekt mekanizma ile glialar ve astrositler gibi nöronal hücreler üzerinde apoptoz oluşturarak hasara neden olduğu gösterilmiştir (49).

Bazı araştırmacılar ise NF- κ B'nin antiapoptotik etkisini bildirmişlerdir. Beg ve ark Rel/NF- κ B proteinlerini kodlayan genleri delesyona uğratılmış farelerde ("knock-out" fareler) yaptıkları çalışmada karaciğer apoptozu, hafif veya ağır derecede bağışıklıkla ilişkili yetmezlikler veya başka gelişimsel anomaliler saptamışlardır (60). Shishir Shishodia ve ark NF- κ B'nin bu iki yönlü etkisinin hücre tipine ve/veya uyarı tipine göre belirlendiğini bildirmektedirler (61). NF- κ B'nin farklı yollarının aktivasyonu ya apoptotik (Fas, c-myc, p43) veya antiapoptotik (Bcl-2 gibi) proteinlerin ekspresyonuna yol açarak apoptozu indüklenmekte veya inhibe edilmektedir (Şekil 13). Ayrıca NF- κ B, cyclin, CDK2 kinaz gibi hücre döngüsü proteinlerinin düzenlenimini denetlemektedir.

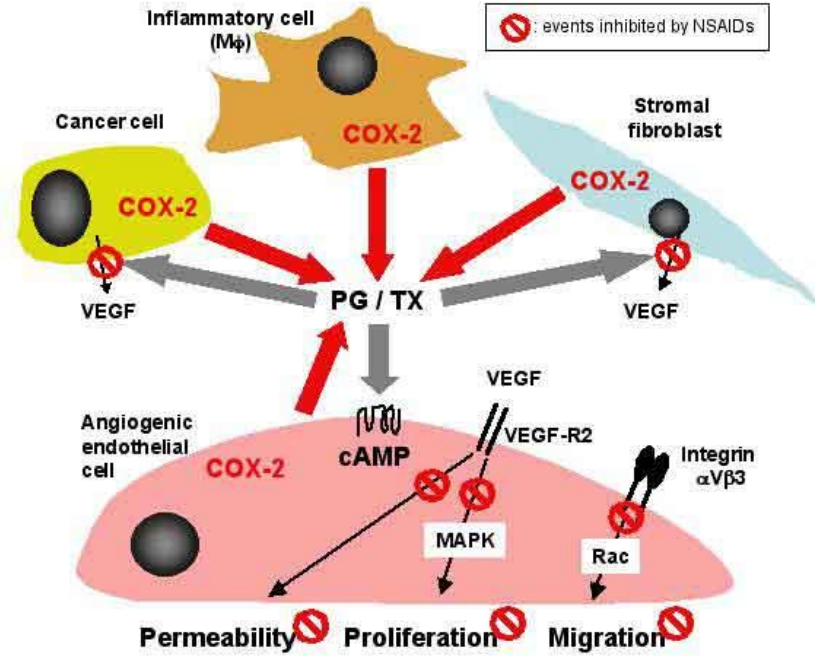


Şekil 13. NF-κB'nin apoptoz üzerine iki yönlü etkisi (61).

10) Cox-2 aracılı apoptoz: Cox-2, çeşitli stimuluslar tarafından uyarılan, enflamasyon, tümör oluşumu ve bağışıklık denetimde rol oynayan bir enzimdir (Şekil 14). Bir çok çalışmada Cox-2 aşırı salınımının VEGF, bFGF, TGF, PDGF ve endotelin gibi yeni damar oluşumunu uyarın faktörlerin salınımına neden olduğu gösterilmiştir. VEGF neovaskülarizasyon ve kanser progresyonunda kritik role sahip bir anjiogenik faktördür. VEGF regülasyonunda en önemli etken hipoksi olup; hipoksi, araşidonik asitten PGE₂ dönüşümünü sağlayan Cox-2'yi de artırmaktadır. PGE₂, (HIF)-1 alfa'nın (hipoksi inducible factor) sitozolden çekirdeğe taşınmasına, VEGF'nin transkripsiyonunun indüklenmesine neden olmaktadır. Ayrıca, yapılan bazı çalışmalarda Cox-2 ekspresyonu ile matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) arasında da ilişki bulunmuştur. MMP-2 bazal membranın kollajen matriksini sindirmekte ve tümör hücrelerinin dokudaki invazivliğini arttırmaktadır (62). Bundan başka, Cox-1'nin araşidonik asidi metabolize etmesiyle bazı mutajenler oluşmaktadır. Araşidonik asidin oksidasyon ürünleri örneğin malondialdehit oldukça reaktif olup bu madde DNA'da hasara yol açabilmektedir (63).

Cox-2, hücre proliferasyonu, mitoz, hücre adezyonu, apoptoz, immünosupresyon ve anjiogenez üzerinde etkileri ile kötü huylu transformasyon ve tümör progresyonunda yer almaktadır. Radikal sistektomi ile tedavi edilen kasa invaze olmuş mesane kanserli hastalarda Cox-2 bağışıklık reaktivitesinin derecesi ve boyanma yoğunluğu patolojik tümör derecesi, evresi ve sağ kalım ile korele bulunmuştur (64). Cox-2 düzeylerinin artması bazı meme kanserlerinde da kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur (65). Bilindiği gibi NSAİ ilaçların hedefi siklooksijenaz enzimidir. Düzenli olarak bu ilaçların kullanımının meme kanserine karşı koruyucu etki oluşturabileceğini

öne süren epidemiyolojik çalışmalar bulunmaktadır. Benzer biçimde bu ilaçların kolon, akciğer gibi diğer tümörlerde potansiyel koruyucu ajan olarak etki edebileceği belirtilmiştir (66).



Şekil 14. Cox-2'nin farklı hücre tipleri üzerine etkileri (67).

2.5.4. Apoptozun Düzenlenmesinde Görev Alan Genler

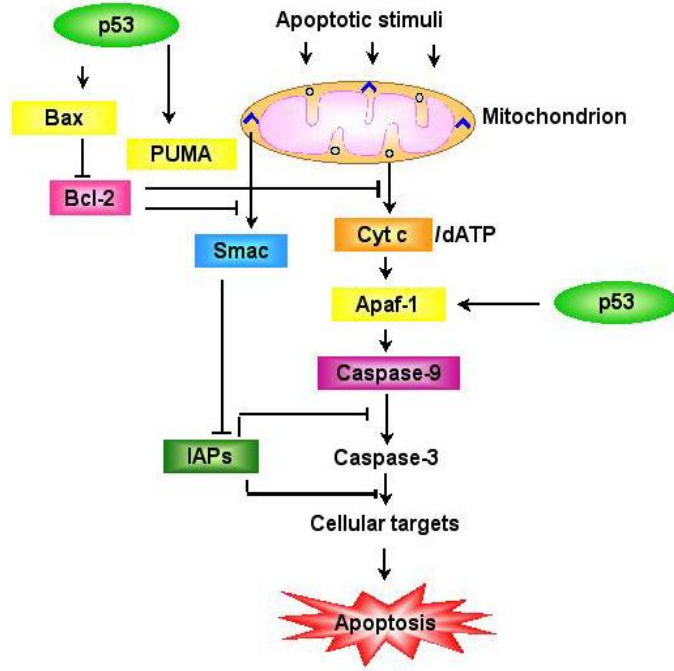
Çok sayıda gen apoptozda görev alır. Bu genlerin bir bölümü hücre yüzeyinde bir bölümü ise hücre içi sinyal ileti yollarında görev yapar.

2.5.4.1. p53 geni

Günümüzde sitogenetik, moleküler, immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak insan kanserlerinde en sık saptanan gen değişikliğinin, p53 tümör supresör geninde olduğu saptanmıştır. Tümör supresör gen ailesinin bir üyesi olarak kabul edilen p53 geni, 17. kromozomun kısa kolu üzerinde yerleşmiştir. p53 geni, DNA sentezi, onarımı ve programlı hücre ölümünün kontrolünde rol oynamaktadır. Bu genin inaktive olması ya da fonksiyonunu kaybetmesi karsinogenezisin ilk basamağını oluşturan önemli bir süreçtir (68). p53'ün hangi biyokimyasal

basamaklarla apoptozi indüklediği henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Öne sürülen bir mekanizmaya göre p53, Bcl-2 gen ailesinden olan Bax'ın transkripsiyonunu Bcl-2'ye oranla daha fazla arttırarak apoptozu sağlamaktadır. İkinci bir yol Bcl-2'nin transkripsiyonunun baskılanması, üçüncü bir yol ise Bcl-2 ailesinin diğer üyelerinin etkilerinin modifikasyonudur (Şekil 15). Gen ekspresyonu gerektirmeyen diğer bir yol ise p53'ün apoptozla ilgili proteinle kompleks oluşturmasıdır. Normal hücreler DNA hasarına maruz kaldıklarında iki şekilde cevap verirler: Hücre döngüsünün durması (arrest) veya apoptoz. p53 bu yolların her ikisinde de yer almaktadır. Bunlardan hangisinin görüleceği hücre tipi ve etki eden ajana bağlıdır (69).

Normal p53 proteini çok kısa bir yarı ömre sahiptir. Aslında histolojik kesitlerde görülmez. Apoptozun indüklenmesinde etkisiz olan mutant p53 ise, karsinomların hemen hemen yarısında kolayca saptanabilir. Bunlar arasında sıklıkla kötü prognoza sahip meme, kolon, pankreas karsinomları sayılabilir (70,71). İnsan kötü huylu tümör hücrelerinde sıklıkla mutasyona uğrayan p53 tümör supresör geni, DNA hasarı ardından apoptozun başlamasında kritik öneme sahiptir. DNA hasarına karşı G1/S kontrol noktasında hücre döngüsünü durdurur. İyonize radyasyon ardından radyasyona uğrayan hücrelerde p53 proteini seviyeleri artar. DNA tamiri için zaman sağlanır. Eğer tamir mümkün değilse hasarlı hücreler apoptozla ortadan kaldırılır (70).



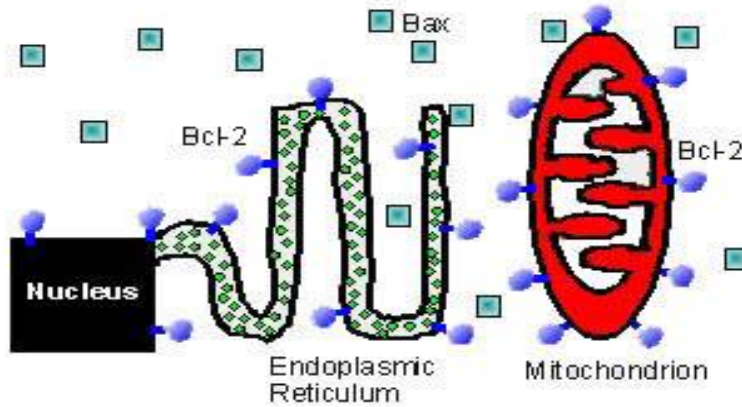
Şekil 15. p53 aracılı apoptoz (72).

2.5.4.2. Bcl-2 Ailesi genleri

Bcl-2 ailesi proteinlerinin programlı hücre ölümünün kontrol noktalarında işlevi vardır. Bcl-2 kurucu üyedir ve B hücre lenfomasında tanımlandığından bu adı almıştır. 1988 yılında Bcl-2 proteininin apoptozu inhibe ettiği ve kanser gelişimine neden olduğu bildirilmiştir. Bcl-2, 26 kDa molekül ağırlığında ve hidrofobik kısmı ile hücre içi membranlara yerleşen ve geri kalan kısmının sitozolde kaldığı bir membran proteindir (Şekil 16). Subsellüler lokalizasyon çalışmaları Bcl-2'nin mitokondrial dış membranda, nükleer membran ve endoplazmik retikulumda yerleştiğini göstermiştir (7,73).

Bcl-2, apoptozda görülen çekirdek kondensasyonu ve hacim daralmasını engeller. Memeli hücreleri Bcl-2 ailesinin tüm üyelerine sahiptir. Daha sonraki yıllarda, bu ailede bulunan proteinlerin bazılarının apoptozu hızlandırırken (proapoptotikler) bir kısmının apoptozu inhibe ettiği (antiapoptotikler) saptanmıştır. Bcl-2 ailesi bir düzineden fazla proteini kapsar ve üç tane işlevsel gruba ayrılır (7), (Şekil 17).

- Grup 1 (antiapoptotik): Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1, A1, NR-13, Ced-9
- Grup 2 (proapoptotik): Bax, Bak, Bok, Bcl-xs.
- Grup 3 (BH3 only): Bad, Bik, Bid, Bim, Noxa

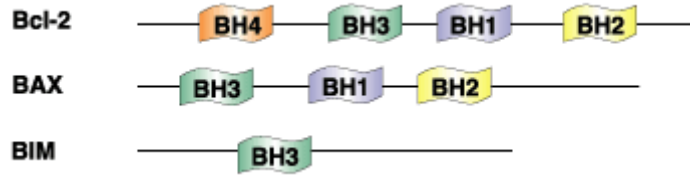


Şekil 16. Bcl-2 ve Bax'ın organeller üzerindeki yerleşimleri(74).

Proapoptotik olanlar (Grup 2), sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya saliverilmesini indüklerler ve hücreleri ölüme sürüklerler. Antiapoptotikler (Grup 1) ise sitokrom-c saliverilmesini baskırlar ve hücreleri ölümden korurlar. Grup 2'nin üyeleri yapısal olarak grup 1 üyelere benzer. Yapılarındaki BH1, BH2, ve BH3 bölgeleri hidrofobik cep'i oluşturur. Amfipatik α -heliks, BH3 bölgesinde yer alır. Hidrofobik cep sayesinde bir diğer Bcl-2 üyesinin BH3 bölgesine bağlanabilirler (7).

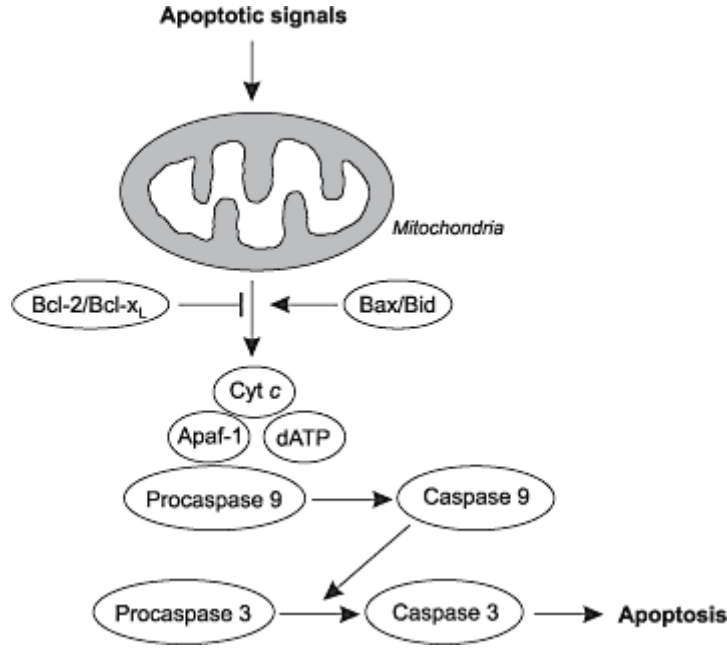
Proapoptotik üyeler (Grup 2) kendi içinde iki alt gruba ayrılırlar. Bu alt gruplardan biri yapılarında her üç bölgeyi (BH1, BH2, BH3) de içeren üyelerden (örn; Bax, Bak), diğeri ise sadece BH3 bölgesini içeren üyelerden (Bid, Bad, Bim) oluşur. Anti-apoptotik üyelerde ayrıca BH4 bölgesi bulunur. Bu bölgenin, apoptozun diğeri hücrel yollarla "pathway" ilişkisini kurduğu düşünülmektedir. Grup 2'nin hidrofik kuyruk kısımları vardır, ancak BH4 domaini taşımazlar. Grup 3'te yer alan üyeler yapısal olarak çeşitlilik gösterir. Ortak yanları yaklaşık 12-16 amino asitlik BH3

domaini taşımalarıdır. Bu nedenle BH3-only olarak adlandırılırlar.



Şekil 17. Bcl-2 ailesi gen örnekleri (75).

Antiaoptotik genler (Grup 1)'den olan Bcl-2 apoptoz sırasında bir çok işlev görür. Proapoptotik aile üyelerine bağlanarak onları inhibe eder, mitokondri membranından iyon akışını düzenler, sit-c salınımını düzenler, apoptotik proteaz aktivasyon faktörleri (Apaf-1)'ne bağlanarak inhibisyonunu sağlar. Sitokrom-c ile Apaf-1 bağlanması gerçekleşmez ve apoptozun önemli basamaklarından olan apoptozom oluşamaz, kaspaz 9 aktivasyonu gerçekleşmez (Şekil 18). Bcl-2 proteinlerinin mitokondriyal yolakları endoplazmik retikulum (ER) ile de birleşir. Bu organel de apoptozte önemli rol oynamaktadır. ER kalsiyum deposunun salınımı bir yandan sitoplazmik ölüm yolaklarının aktive ederken diğer yandan mitokondri için doğrudan proapoptotik uyarı gönderir. ER, Fas ve p53 aracılıklı apoptoze katkıda bulunur (7). CHOP (C/EBP homolog proteini) özellikle ER stresi ile ekspresyonu artan apoptoz ilerletici bir faktördür. CHOP'un, Bcl-2 proteinlerinin fonksiyonlarını kontrol ettiği özellikle Bax proteinlerinin ekspresyonunu artırarak apoptotik yol ile bağlantı kurduğu gösterilmiştir (76).



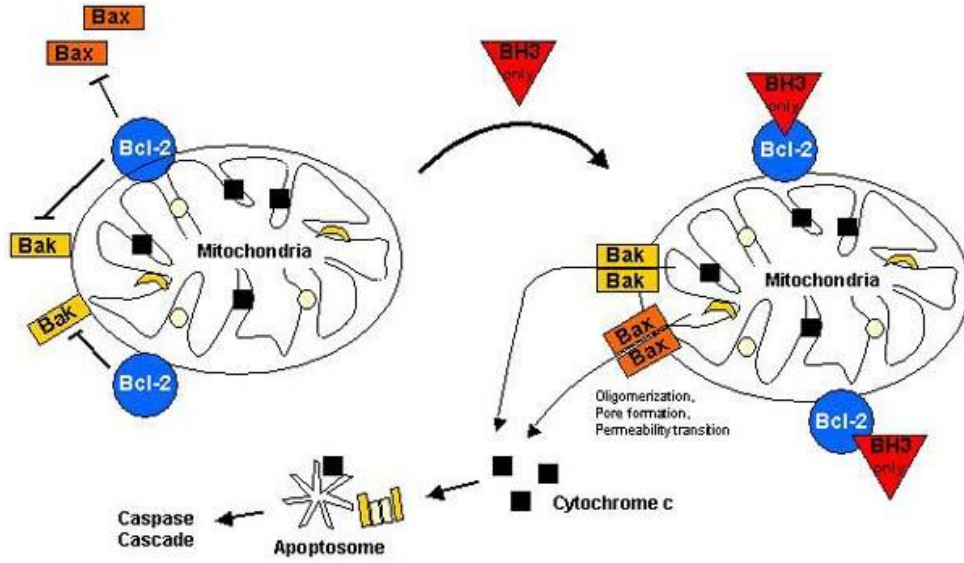
Şekil 18. Bcl-2 gen ailesi üyeleri ve apoptoz (77).

Bcl-2 geni kromozom 18q21'de lokalize bir protoonkogendir ve ilk olarak 1984 yılında B-hücreli lösemi ve foliküler non-Hodgkin lenfomada gözlenen t(14;18) kromozom translokasyonu çalışmalarında saptanmıştır (78). Bu translokasyon sonucunda 18. kromozomda lokalize gen, 14.kromozomdaki ağır zincir bağışıklık globulin geninin (IgH) yanına yerleşir ve Bcl-2/IgH füzyon geni oluşarak artan miktarda Bcl-2 ekspresyonu olur. Bcl-2 ekspresyonunun önceleri sadece t(14;18) translokasyonu gösteren B hücre kötü huylu tümörlerinde görüldüğü düşünülmüştür. Ancak daha sonraki çalışmalar, Bcl-2 ekspresyonunun bu kromozomal anormalliği göstermeyen lenfoproliferatif hastalıklarda ve normal lenfoid hücrelerde de olduğunu göstermiştir (79).

Bcl-2 proteinlerinde bulunan yaklaşık 16 aminoasitten meydana gelen BH3 domaini taklit edilerek apoptoz indüklenebilir ve bu durum, kanser tedavisinde araştırılması gereken bir stratejiyi oluşturmaktadır (80), (Şekil 19).

Bcl-2'nin fonksiyonel bütünlüğü bir Bcl-2 proteininin Bax proteini ile heterodimerize olması ile sağlanır. Bu Bcl-2/Bax heterodimeri, hücre ölümünü engelleyen fonksiyonel birimi meydana getirir. Örneğin yüksek oranda Bcl-2 eksprese eden timositlerde apoptoza karşı direnç geliştiği görülmüştür. Bu yolla hücre hayatının devamını

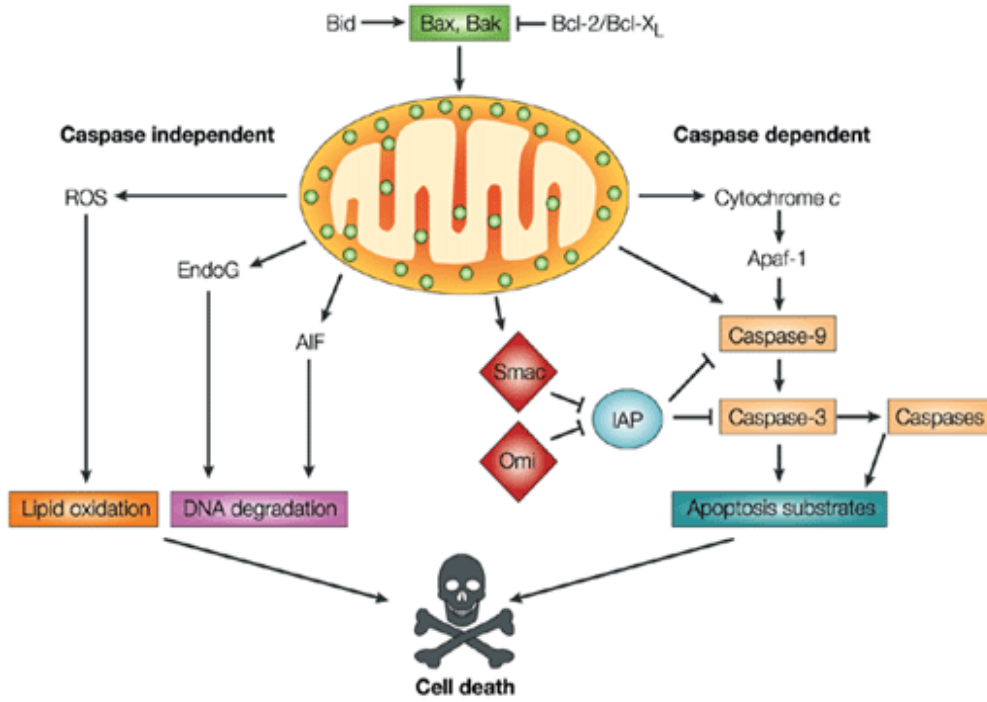
destekleyen Bcl-2 mutasyonları, kötü huylu transformasyonu kolaylaştırır. Meme, akciğer ve kolon kansinomlarında Bcl-2'nin artmış ekspresyonu tedavi yöntemlerine cevap verip vermemelerinde etkili olabilir (81). Farklı lösemi türlerinin ilaç tedavisine duyarlılıklarının incelendiği bir çalışmada, yüksek seviyede Bcl-2 ekspresyonu ile bazı kanserlerin kemoterapötik ilaçlara karşı kuvvetli direnç göstermeleri arasındaki korelasyon gösterilmiştir (82).



Şekil. 19. Bcl-2 proteinleri ve apoptoz (83).

Bax, proapoptotik genler (Grup 2) grubuna aittir. Canlı hücrelerde çoklu domaine sahip Bax ve Bak monomer olarak bulunurlar. Bax 21 kDa büyüklüğünde bir proteindir. İnaktif Bax ya sitoplazmada ya da zayıf olarak membrana bağlı olarak bulunur ve bu proteinin hidrofobik cebi C-terminalindeki heliks ile doldurulmuş durumdadır. Ölüm sinyali alındığında mitokondride bulunan Bax homodimerize olur ve mitokondri dış membranına girer. Mitokondrideki inaktif Bak, bu ölüm sinyaline yanıt verirken yapısal değişim geçirir, dimerize olur, aktivite kazanır. Böylece mitokondri dış membranı geçirgen bir yapı kazanır. Bu geçirgenlik sit-c'yi de kapsayan diğer intermembran boşluk proteinlerinin salınmasına ve ayrıca ROS üretimine yol açar (Şekil 20). Bax proteininin aşırı üretimine bağlı olarak, Bax dimerleri kendi aralarında dimerize olurlar ve Bax/Bax homodimerleri meydana getirirler. Bu durumda Bcl-2'nin homoloğu olarak bax'ın fonksiyonunda Bcl-2'ye göre farklılık meydana gelir. Bu farklılığın apoptozu tetikleme yönünde değil de yalnızca

apoptoz hızına ivme kazandırma yönünde olduğu düşünülmektedir (84).



Şekil 20. Bax proteini ve apoptoz (85).

Bax, p53 için transkripsiyonel bir hedefdir. Yapılan hayvan çalışmalarında Bax'ın p53 bağımlı apoptozda efektör olduğu görülmüştür (86). Ancak Bax, p53 mutasyona uğradığı zaman bile tek başına apoptozu indükleyebilmektedir (87,88). Shibata ve ark yaptıkları çalışmada C3(1)/Tag transgenik farelerde meme kanseri modelinin erken döneminde, Bax ekspresyonunun artmasıyla apoptozun arttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada Bax geninin tek allelinin kaybı tümörün büyümesini ve kanser gelişimini arttırmıştır. Bax tipik bir tümör baskılayıcı gen gibi davranmamasına karşın tümör büyümesinin durdurulması için gerekli olduğu ve bu modelde Bax'ın indüklediği apoptozun, p53'ün fonksiyonlarından bağımsız olarak gelişmekte olduğu sonucuna varılmıştır (89). Hayvan çalışmalarının yanısıra insan malignansileri üzerine yapılan çalışmalarda da Bax'ın tümör süpresyonu üzerinde önemli rolü olduğu saptanmıştır. Kolorektal kanser, mide kanseri ve akut lenfoblastik lösemide Bax geninin mutasyonlarına rastlanmıştır (90-93). Over, metastatik akciğer kanseri ve

skumöz hücreli kanserlerde bax ekspresyonunun azalması ve kötü klinik gidiş arasında ilişki gösterilmiştir (93-95).

Ancak, bütün bulguların tersine, Knudson ve ark, tek başına Bax geninin yoksunluğunda ya da p53 geni ile kombine yoksunluğunda malignansiye eğilimin artmadığını göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmada Bax'ın fazla yapımının p53 geninden yoksun alt yapıda onkogenezi arttırdığı bulunmuştur (96).

Bax ve Bcl-2 proteinlerinin birbirine oranı hücrenin apoptoza gittiğini gösteren bir marker olarak kullanılabilir. Ancak, Bcl-2/Bax oranının azalmasının apoptozun tetiklendiğini göstermede tek başına kullanılacak parametre olmadığı Bcl-2'den yoksun fare çalışmalarında ve Bcl-2 ekspresyonu azaltılması için kullanılan antisense yaklaşımli deneylerde gösterilmiştir (87).

2.5.5. Bcl-2 proteinleri Aracılığıyla Apoptozun Düzenlenmesi

Apoptoz mekanizmasında anahtar rol kaspaz aktivasyonudur. Kaspazların aktivasyonu çeşitli moleküller tarafından sıkı biçimde denetlenir. Bu moleküller arasında en önemli yeri tutan ise Bcl-2 ailesidir. Bu proteinlerin aktiviteleri, transkripsiyonel düzeyde kontrol, fosforilasyon, dimerizasyon, translokasyon ve proteolitik yıkım (cleavage) ile düzenlenir (46).

2.5.5.1. Transkripsiyon: Bcl-2'nin transkripsiyonel düzeyde kontrolü, apoptozun düzenlenmesinde kritik rol oynar. Örneğin kanser hücrelerinde Bcl-2 düzeyinin arttığı, enflamasyonda ise azaldığı belirlenmiştir. Proapoptotik üyelerin de transkripsiyon düzeyinde kontrol edildiği belirlenmiştir. Sağlıklı hücrelerde toksisiteden korunmak için hücreler Bcl-2 proteinlerini inaktif formda tutarlar. Bcl-2 ekspresyon düzeyi düşüktür. Ölüm sinyalinin alınmasıyla birlikte bu genlerin transkripsiyonu ve regülasyonu başlar.

2.5.5.2. Dimerizasyon: Bu proteinler homodimer ve heterodimerler oluşturdukları için hem tek başlarına hem de bir diğer üyeye beraber apoptozun düzenlenmesini sağlarlar. Bcl-2, Bax ile heterodimer oluşturduğunda Bcl-2 etkisini antagonize eder. Ancak hangisinin efektör hangisinin düzenleyici olduğu bilinmemektedir.

2.5.5.3 Fosforilasyon: BH3-only proteinlerden Bad'in işlevi fosforilasyonla hızlı

biçimde değişir. Bu fosforilasyon hem proteinin hücre içi yerleşimini hem de protein-protein etkileşimini değiştirir.

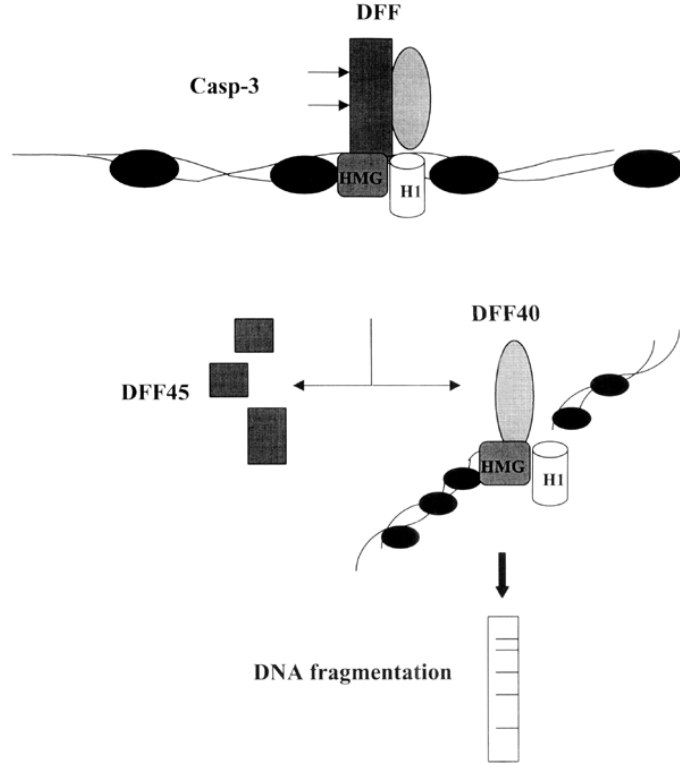
2.5.5.4. Proteolitik Kesme: BH3-only proteinlerden Bad, zararsız bir formda, küçük, esnek bir halkasal yapıya sahip olarak sitoplazmada bulunur. Belirli hücre tiplerinde ölüm ligandları hücreyi uyardığında kaspaz-8 aktive olur ve Bid'in esnek halkasal yapısını keser. Bid mitokondriye girerek proteinlerle etkileşerek apoptozu indükler.

2.5.5.5. Translokasyon: Bax aktivasyonu için hem translokasyon hem de dimerizasyon gerekir. Normal durumda sağlıklı hücrelerde Bax sitoplazmada monomer halde bulunur. Apoptotik sinyal bu proteinin Bax/Bax homodimerleri biçiminde sitoplazmada birikmesine neden olur. Homodimer konumuna geçen Bax daha sonra mitokondriye transloke olarak membrana entegre olur. Bim mitokondriye transloke olan başka bir Bcl-2 ailesi üyesidir. Mitokondriye transloke olunca Bcl-2 ya da onun homologlarından biriyle etkileşime girerek antiapoptotik etkiyi antagonize eder (7).

2.5.6. Apoptozda hücredeki değişiklikler

1. Biyokimyasal Değişiklikler: Sonlandırıcı kaspazlar aktive olduktan sonra sitoplazmada ve çekirdek içinde hedef proteinleri yıkarlar.

a) DNA kırıklarının oluşması: Hedef proteinlerden bir tanesi DNA endonükleaz ile bağ yapan bir proteindir. Kaspazlar bu proteini yıkarak endonükleazı serbestleştirirler. Çekirdek içine giren Ca^{+2} - Mg^{+2} bağımlı endonükleaz, DNA kırıkları oluşturur. Kırıklar nükleozomların arasından mono veya oligonükleozomal olarak meydana gelir. 180 baz çifti ve katları şeklinde kırılma oluşur (46,47).



Şekil 21. DNA kırıklarının oluşumu ve apoptoz (98).

b) Hücre iskeletinin yıkılması: Kaspazların aktifleştirdiği bir başka protein ise hücre iskeletinin ana bileşenlerinden olan aktini yıkan bir proteindir. Aktin filamanlarının yıkılması ile hücre normal şeklini kaybeder (7).

c) Hücre membran değişiklikleri: Kaspazların etkisiyle hücre membranının asimetrisi bozular. Plazmanın iç yüzünde bulunan fosfatidilserin yer değiştirerek membranın dış yüzüne yerleşir. Ayrıca bazı apoptotik hücreler hücre membranlarında thrombospondin denilen adheziv bir glikoprotein ve bazı hücre adezyon moleküllerini içerirler. Bütün bu membran değişiklikleri apoptotik hücrelerin çevre fagositler tarafından fark edilmelerini ve fagositozlarını sağlamaktadır. Transglutaminaz aktivasyonu ile membran proteinlerde oluşan çapraz bağlanmalar, membranların parçalanmasını ve apoptotik cisimciklerin oluşmasını sağlar (46).

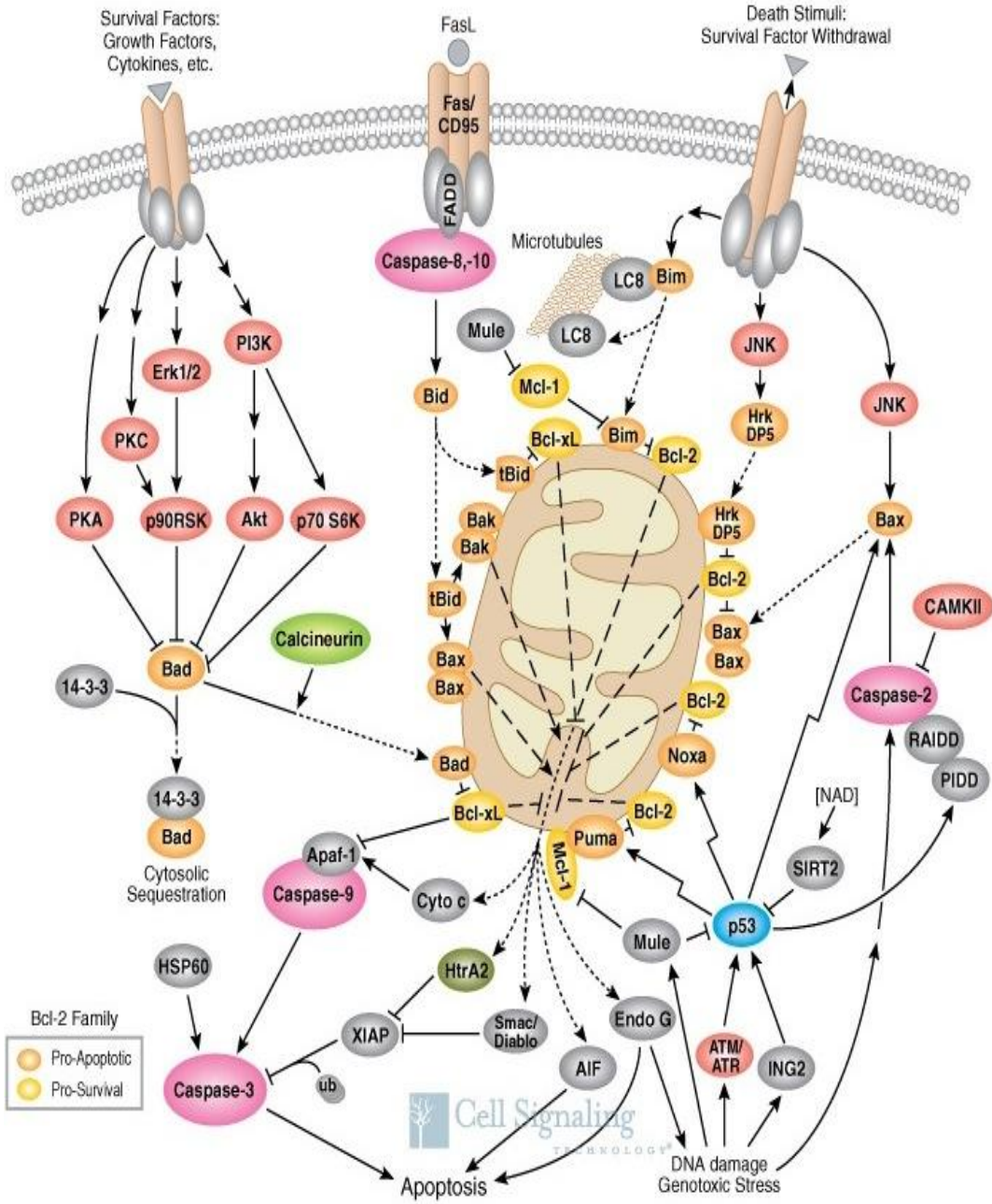
2. Morfolojik Değişiklikler: Hücreler özelleşmiş yüzeysel yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler. Su kaybederek küçülürler, büzülürler. Sitoplazmanın yoğunlaştığı, organellerin birbirlerine yakınlaştığı izlenir. Membranlar bütünlüklerini korurlar.

Organeller genel olarak sağlamdır. Bazen ribozomlarda çökme izlenebilir. Sitoplazmada yüzeye paralel yerleşmiş mikroflaman kümeleşmeleri ve endoplazmik retikulumda geçici genişlemeler görülür. Bu genişlemelerin sitoplazmadaki suyun endoplazmik retikuluma geçmesi ile oluştuğu sanılmaktadır. Dilatasyona uğrayan sisternalar hücrenin yüzeyi ile birleşerek yüzeyde krater manzarası oluşturur. Mitokondriler genellikle normal yapılarını korurlar (47).

En önemli değişiklikler çekirdekte izlenir. Kromatin çekirdek membranına yakın kısımlarda yoğunlaşarak, değişik şekil ve büyüklüklerde çöker. Elektron mikroskop ile bakıldığında kromatinin yoğun granüler yarım ay, hilal veya yüzük şeklinde çekirdek membranının iç yüzünde yerleştiği izlenir. Çekirdek de hücre gibi büzülür. Bazen membranla sarılı olarak birkaç parçaya ayrılabilir. Nükleer porlar kromatinin membrana komşu olmadığı bölgelerde yoğunlaşırlar.

Apoptoz hematoksilen eozin ile boyanmış kesitlerde ışık mikroskopik seviyede de izlenebilir. Hücreler koyu eozinofilik sitoplazmalı, bir veya birkaç parçalı piknotik çekirdekli olarak görülür. Çekirdek, kromatinin çekirdek membranının iç yüzüne yerleşmesi nedeniyle hilal veya yarım ay şeklinde izlenebilir (44).

Apoptotik süreç ilerledikçe hücrelerde sitoplazmik çıkıntılar oluşur. Hücre daha sonra membranla çevrili küçük parçalara bölünür. Bunlara "apoptotik cisim" adı verilir. İçlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller bulunur. Bazılarında çekirdek parçaları da mevcuttur. Aslında, hücre içerisinde apoptoz ile ilişkili tüm yolaklar birbirleri ile ilişkilidir (Şekil 22).



Şekil 22. Hücre içerisinde apoptoz ile ilişkili tüm yolların birbirleri ile ilişkileri (99).

2.5.7. Apoptozun saptanmasında kullanılan yöntemler

Apoptozu saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptoz terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa, günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanısıra apoptozla özgü

olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örn. aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir.

İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptoz, 80'li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının oluştuğunun ortaya çıkarılmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlandı. 90'ların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştiği bulundu. Böylece, kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik yöntemler ile saptanabilen apoptoz, 90'ların sonuna doğru fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlandı. Apoptozun belirlenmesine yönelik geliştirilen tüm yöntemleri, 2000'li yılların başlarında, sadece apoptotik epitelial hücrelerde olmak üzere kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18'in kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikorların kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etti (44).

Apoptozun belirlenmesinde kullanılan başlıca yöntemler şunlardır:

- Morfolojik görüntüleme yöntemleri
- İmmünohistokimyasal yöntemler
- Biyokimyasal yöntemler
- İmmünolojik yöntemler
- Moleküler biyolojik yöntemler

2.5.7.1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri:

1. Işık Mikroskobu

- a. Hematoksilen boyama
- b. Giemsa boyama

2. Floresan Mikroskobu/ Lazerli Konfokal Mikroskop

- a. Propidium iyodür (PI)
- b. Hoechst boyası

3. Elektron Mikroskobu

4. Faz Kontrast Mikroskobu

1. Işık mikroskobu

a. Hematoksilen boyama: Morfolojik görüntüleme yöntemleri içinde en ucuz ve kolay olanı hematoksilen ile boyamadır. Hematoksilen ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelenir. Hematoksilen boyama hem hücre kültürü çalışmalarında hem de doku boyamalarında kolaylıkla kullanılabilir. Apoptotik hücrelerin saptanmasında genellikle ilk yöntem olarak başlanması uygundur ve çeşitli açılardan diğer yöntemlere karşı avantaj sağlar. Hematoksilen boyamada, hematoksilen boyası kromatini boyadığından apoptotik hücreler çekirdek morfolojisine göre değerlendirilir. Apoptoza özgü değişiklikler iyi bir boyama yapılmışsa kolayca gözlenebilir. Fakat yine de deneyim gerektirmektedir. Çünkü bazı durumlarda mitotik hücreler ile apoptotik hücreler karıştırılabilir. Gözlenebilen değişiklikler şunlardır: Hücre küçülmesi (cell shrinkage) veya sitoplazmik küçülme (cytoplasmic shrinkage), kromatinin kondanse olması (nuclear condensation) ve nukleus zarının periferinde toplanması, nukleusun küçülmesi (pyknosis) veya parçalara bölünmesi (nuclear fragmentation).

b. Giemsa boyama: Giemsa ile boyamada da hematoksilenle boyamada olduğu gibi çekirdek morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır. Sitoplazma sınırları hematoksilen boyamaya göre daha iyi seçilebilmekle birlikte hematoksilen boyamaya belirgin bir üstünlüğü yoktur (7).

2. Floresan mikroskobu/Lazerli konfokal mikroskop

Floresan maddelerin (örn. Hoechst boyası, propidium iyodür) kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla çekirdeği görünür hale gelebilir. Floresan sistemler ışık mikroskobuna göre çok daha pahalıdır. Fakat, eğer hücre kültürü çalışmasında kullanılırlarsa, canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanır. Oysa, hematoksilen ya da Giemsa boyamanın kullanıldığı örneklerde hücrelerin tamamı yöntemin prensibi gereği zaten ölmektedirler. Canlı ve ölü hücre ayırımını yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (örn; Hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya (örn; propidium iyodür) beraber kullanılır. Bu boyama yöntemindeki prensip şudur: Bu yöntemlerde canlılığın belirleyicisi, hücrenin plazma membranının (hücre zarının) intakt olup olmadığıdır. Membranı intakt olan (canlı) hücreler propidium iyodür gibi sadece membran

bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyayan bir boya ile boyanmazlarken, Hoechst boyası gibi ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen boyalar ise ortamdaki tüm hücreleri boyayarak ölü veya canlı hücre ayırımına olanak sağlarlar. Bu şekilde boyanan hücreler bir floresan mikroskobu ile tanınabilirler. Kuşkusuz, bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptozle veya nekrozisile ölüp ölmediklerinin ayırımı hematoksilen boyamada olduğu gibi çekirdek morfolojisine bakılarak yapılır. Kromatin kondensasyonu veya çekirdek fragmentasyonu olan hücreler apoptotik hücreler olduklarını düşündürür (44).

3. Elektron mikroskobu: Elektron mikroskobu ile değerlendirme apoptozte en değerli yöntem olarak düşünülmektedir. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözleendiği yöntemdir. Üstelik subsellüler ayrıntılar (örn; mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da çekirdek membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi) da incelenebilir (99).

4 Faz kontrast mikroskobu: Bu tür mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında, flask veya plateelerde büyütüldüğü çalışmalarda, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır. Ölen hücreler yapıştıkları "substratum"dan ayrılacakları için besiyeri içinde yüzmeye başlarlar. Bu hücreler faz kontrast mikroskobu ile gözlenebilirler. Mitoza giden hücreler de faz kontrast mikroskobuyla gözlenebilirler, fakat bu hücreler aynı zamanda apoptotik hücrelerin erken evredeki görüntüleri ile karışabilirler. O yüzden ayırımları zordur. Gerek mitozda gerekse apoptozin erken evresinde hücreler üzerine yapıştıkları "substratum"a yayılmış halde değil, tam tersine yuvarlaklaşmış ve küçülmüş olarak görülürler. Faz kontrast mikroskobu ile apoptotik hücreler üzerinde gelişen cecikler (blebs) izlenebilir.

Hücreler henüz "substratum"a yayılmış haldeler ise hücrelerin sitoplazmasında ortaya çıkan vakuoller de gözlenebilir. Ayrıca, bazı hücre tiplerinde "blister"olarak adlandırılan hücrenin sitoplazmasından dışarıya taşar gibi görülen bir veya birkaç tane büyük vakuoller de gözlenebilir. Bu vakuoller hücreden ayrılıp besiyeri içinde yüzebilirler. İçleri boş küresel yapılar olarak gözükürler. Bu vakuoller olasılıkla bazı araştırmacıların hayalet hücre (ghost cell) olarak adlandırdıkları yapılardır. Hücre kültürü ortamında apoptoza giden hücrelerin başlangıçta hücre membranları intakt olmasına rağmen ileri dönemlerde sekonder nekroz gelişir ve böylece membran bütünlükleri bozulur. Sekonder nekroz aşamasına kadar olan süre

içinde non-vital boyalar denen (örn; propidium iyodür) boyalarla boyanacak olurlarsa apoptoz başlamış olmasına rağmen hücreler bu boyalarla boyanmazlar. Çünkü membran bütünlüğü halen tamdır. Sekonder nekrozis geliştikten sonra membran bütünlüğü bozulur ve hücreler non-vital boyalarla boyanma özelliği kazanmaya başlarlar.

Blisterlerin oluştuğu aşamada membran bütünlüğü halen tamdır ve bu aşamada nukleus morfolojisindeki değişiklikler floresan boyalarla gözlenebilir. Fakat bu dönem uzun sürmez dakikalar içinde membran bütünlüğü bozulur. Faz kontrast mikroskopunda hücreleri gözlemek için normalde boya kullanmaya gerek yoktur ama istenirse yukarıda belirtildiği gibi hem faz kontrast mikroskopisi hem de floresan mikroskopisi aynı anda kullanılabilir. Böylece, örneğin çekirdeği renklendirilmiş ve belirgin bir şekilde ortaya konmuş hücrelerin faz kontrast mikroskopisi fotoğrafları elde edilebilir (44,100).

2.5.7.2. Histokimyasal yöntemler:

1. Anneksin V Yöntemi

2. İn Situ DNA Uç İşaretleme Tekniği (TUNEL), (TUNEL Yöntemi), (terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUDP-biotin nick and labeling)

3. M30 Yöntemi

4. Kaspaz-3 Yöntemi

1. Anneksin V Yöntemi: Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan fosfatidilserin molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Dış yüze transloke olan fosfatidilserinler floresan bir madde ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilirler. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur (7).

2. TUNEL Yöntemi: DNA kırıklarının *in situ* olarak tanınmasını sağlar. Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya plâtelere ekilmiş ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozun varlığı bu yöntem ile saptanabilir.

3. M30 Yöntemi: M30 yönteminde apoptotik hücreler sitokeratin 18'in kaspazların

etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immünohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenir. Sadece sitokeratin 18'i eksprese eden dokularda kullanılması mümkündür. Bu dokular epitelyal kaynaklı dokulardır.

4. Kaspaz-3 Yöntemi: Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptoza yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir. Ancak, bu bilinirse apoptotik hücreler bu yöntemle tespit edilebilirler (100).

2.5.7.3. *Biyokimyasal Yöntemler*

1. Agaroz Jel Elektroforezi

2. Western blot yöntemi

3. Flow Sitometri

1. Agaroz Jel Elektroforezi: DNA kırıklarının gösterilebildiği bir başka yöntemdir. Apoptozda DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan (internükleozomal bölgelerden) kırıldığı için merdiven görüntüsü (ladder pattern) oluşur. Bu bulgu apoptozun karakteristik özelliğidir ve nekrozda görülmez. O yüzden apoptozu nekrozdan ayırmada faydalı yöntemlerden biridir (44).

2. Western Blot yöntemi: Bu yöntem yardımıyla apoptoza özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn; Bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn; kaspaz-3) saptanması mümkündür. Sitokrom-c'nin mitokondriye çıkıp çıkmadığının belirlenmesi de bu yöntem ile belirlenebilir. Yalnız, sitokrom-c tespitinde önce alt-fraksiyonlama yapılarak hücrelerin mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonları ayrılır. Ardından, normalde sitoplazmik fraksiyonda bulunması beklenmeyen sitokrom-c'nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptoze gittikleri anlaşılır (101).

3. Flow Sitometri: Flow sitometri yardımıyla floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptoz deteksiyonu açısından kullanışlıdır. Özellikle iki şekilde apoptoz deteksiyonu yapılır. a. Floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak, b. Anneksin V kullanılarak. Birincisinde, kompleks bilgisayar işlemlerinin kullanılarak hücre boyutu ile

içerdiği DNA miktarının kıyaslanarak, azalan DNA miktarının apoptoz lehine olduğu gerçeğinden hareketle, apoptotik hücre popülasyonu (sub-G1 piki) tayin edilir. İkincisinde, floresan mikroskopuyla uzun zaman alan sayma işlemi saniyeler içinde yapılarak sonuç alınır (44).

2.5.7.4. İmmunolojik Yöntemler

1. ELISA

2. Fluorimetrik Yöntem

1. ELISA: ELISA (Enzim linked immunosorbent assay) ile gerek kültürü yapılmış hücre popülasyonlarında gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür. Aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkündür (101).

2. Fluorimetrik Yöntem: Hücre kültürlerinde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde ilgili kaspazın antikorunun bulunduğu platalere hücre lizatlarının konulması ile kaspaz molekülleri tutulur ve sonra ortama kaspazların parçaladığı ve kendisine floresan bir maddenin tutunduğu bir substrat ilave edilir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan floresanın şiddeti fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi saptanır.

2.5.7.5. Moleküler Biyolojik Yöntemler

1. DNA Microarray: DNA microarray teknolojisi henüz çok yeni ve çok pahalı bir yöntemdir. Fakat, yakın bir gelecekte tıp pratiğini radikal bir biçimde değiştirme iddiası taşıyan bu teknoloji ile aynı anda ve kısa bir süre içinde (önceden aylarca sürerken) yüzlerce hatta binlerce genin ekspresyon derecelerinin (mRNA'larının) tespiti mümkün olabilecektir. Böylece, apoptoza özgü hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ekspresyon durumları hakkında geniş bilgi edinme olanağı doğacaktır (102).

2.6. FİBROSARKOM

Fibrosarkomun da içinde yer aldığı yumuşak doku sarkomları birbirinden farklı histolojik tipte ve sağ kalım ve tedavi yaklaşımları açısından çeşitli farklılıklar gösteren bir grup kötü huylu tümörü içerir. Bu tümörler embriyonik mezodermden köken alırlar ve vücudun herhangi bir bölgesinde ağrısız kitle şeklinde kendilerini gösterirler. Yumuşak doku sarkomları, tüm kanserlerin yaklaşık %1'ini oluşturmaktadır ve en sık yerleşim yerleri ekstremitelerdir (%59). Diğer başlıca lokalizasyonları ise, gövde (%20), retroperiton (%15) ve baş-boyun bölgeleridir. Tümörün histolojik derecesi sağ kalım açısından en önemli belirleyici olup, tümör boyutu ve derinliği de diğer önemli prognostik faktörlerdir. Geniş lokal eksizyon ve radyoterapi (RT) temel tedavi yaklaşımlarıdır ve bazı histolojik alt tiplerde kemoterapi (KT) de tedaviye ilave edilmektedir. Ancak uygulanan bu tedavilere rağmen yüksek riskli hastaların yaklaşık yarısı uzak metastazlara bağlı olarak erken dönemde kaybedilmektedir (103).

2.6.1. Epidemiyoloji

Fibrosarkomların görülme sıklığı %2-3 tür. Sıklık açısından cinsiyet arasında anlamlı bir fark yoktur (Erkek/Kadın=1.1/1). Olguların yaklaşık yarısı 60 yaş ve üzerinde gözlenir. Kırk yaş altında görülme sıklıkları yaklaşık %20'dir. En sık metastaz şekli hematogen yayılımdır. Lenf nodu metastazı sıklığı %5'in altındadır (104).

2.6.2. Etiyoloji ve Risk Faktörleri

Çeşitli çalışmalarda daha önce RT almış olan hastalarda, radyoterapi alanları içinde sarkom gelişme riskinin 50 kat kadar arttığı gösterilmiştir. Ayrıca kseroderma pigmentozumda, yanık sonrasında, lupus vulgaris skarlarında da görülür.

Risk, alınan radyasyon dozundan bağımsızdır ve RT sonrası sarkom gelişme süresi yaklaşık 10 yıldır. Bu tip sarkomlar sıklıkla RT sahalarının nispeten daha düşük doz almış olan alan kenarlarına yakın bölgelerde lokalizedirler ve genellikle yüksek derecedir.

Bazı kimyasal ajanlara maruz kalınması da fibrosarkom gelişme riskini

arttırır. Bunların başlıcaları; fenoksisidik asit türevleri, klorofenoller, thorotrast, vinil klorid ve arseniktir.

Daha önce KT almış olmak da yumuşak doku sarkomu gelişme riskini artıran diğer bir faktördür. Özellikle çocukluk çağında akut lenfositik lösemi nedeniyle alkilleyici ajanlar içeren (siklofosamid, prokarbazin, nitrozüre, klorambusil) KT rejimleri ile tedavi edilmiş olan çocuklarda ileriki yaşlarda fibrosarkom gelişme sıklığında artış saptanmıştır.

Vücutta yabancı maddelere maruz kalma (şarapnel, kurşun, implant vb.) veya travma sonucu gelişen kronik enflamasyonun da sarkom gelişme riskini atırdığı yönünde çeşitli yayınlar vardır, ancak kronik enflamasyon ile fibrosarkom gelişimi arasındaki ilişki kesin olarak ispatlanamamıştır.

Genetik yapıdaki bazı değişkenliklerin de fibrosarkom gelişme riskini artırdığı saptanmıştır. Ras onkogen ailesi ve N-myc, MDM-2, c-erb2 gibi onkogenlerdeki mutasyonlar ve p53 tümör supresör geni mutasyonları sıkça izlenir. Bu onkogenlerin varlığı, kötü prognoz göstergesi olarak kabul edilmektedir (105).

2.6.3. Tanı

Sıklıkla ilk bulgu asemptomatik bir kitledir. Ekstremitelerde yerleşen tümörler, gövde veya retroperitonda yerleşen tümörlerden daha erken saptanabildiklerinden, tanı anındaki boyutları, gövde veya batındakilerden daha küçüktür. Özellikle retroperitoneal bölge yerleşimli tümörlerin boyutları tanı anında genellikle 10 cm veya üzerindedir. Boyut arttıkça, çevredeki dokulara yaptıkları basıya bağlı olarak çeşitli semptomlar gelişebilir (sinir basısına bağlı nörolojik bulgular veya obstrüksiyon bulguları gibi).

Fizik muayeneyi takiben özellikle ekstremit ve pelvis yerleşimli lezyonlarda tercih edilmesi gereken görüntüleme yöntemi manyetik rezonans görüntülemedir (MRG). Retroperiton veya abdomenin görüntülenmesinde ise bilgisayarlı tomografi (BT) yeterli olabilir. Yüksek dereceli veya 5 cm'nin üzerinde tümörü olan kişilerde, akciğere yönelik BT ile de metastaz açısından tarama önerilmektedir. Retroperitoneal veya intraabdominal fibrosarkomlarda en sık metastaz bölgesi ise karaciğer olduğundan, karaciğere yönelik ayrıntılı görüntüleme (BT veya ultrasonografi ile) de tedavi yaklaşımını belirlemede dikkate alınmalıdır.

2.6.4. Patoloji

Tümör, anaplastik iğsi hücrelerden oluşur. Bu hücrelerde genellikle pleomorfizm gözlenir. İyiferansiye tipleri yoğun kollajen içerir.

2.6.5. Evreleme

Evrelemede Amerikan Birleşik Kanseri Komitesi (AJCC) tarafından yapılan son evreleme sistemi kullanılmaktadır. Bu evreleme, dermatofibrosarkoma protuberans hariç tüm histolojik tipler için geçerli olup, tümörler iyiferansiye ile indiferansiye arasında değişen dört farklı histolojik derece ayrılmışlardır. Tümör boyutu ve histolojik derecelendirme, klinik evreyi belirleyen en önemli parametrelerdir. Lenf nodu metastazı ise, yaklaşık %5 oranında görülmekle birlikte nodal tutulum direkt olarak evre IV kabul edilmektedir (106).

2.6.6. Tedavi Yaklaşımları

2.6.6.1. Cerrahi yaklaşım:

Cerrahi, yumuşak doku sarkomlarının tedavisinde en önemli basamağı oluşturmaktadır. Ancak cerrahi yöntemlerinde son yıllarda önemli değişiklikler gözle çarpılmaktadır. Daha önceki yıllarda radikal amputatif cerrahiler uygulanmakta iken son yıllarda radyoterapi ve KT'nin de katkıları ile organ koruyucu cerrahiler ön plana çıkmıştır. 1985 yılında Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü Konsensüs'ünde, yüksek dereceli sarkomlar da dahil olmak üzere yumuşak doku sarkomlarının tedavisinde organ koruyucu tedavilerin uygulanması önerilmiştir.

Cerrahi tedavinin temel prensibi; tümörün, cerrahi sınırlar negatif olacak şekilde geniş bir rezeksiyon ile eksize edilmesidir. Lokal nüks açısından, cerrahi sınıra olan mesafe önem kazanmaktadır ve genel olarak 2 cm'lik bir temiz sınır yeterli olarak kabul edilmektedir. Özellikle düşük dereceli ve 5 cm'den küçük sarkomların tedavisinde, bu şekilde yapılacak bir cerrahinin tek başına yeterli olduğu ve lokal nüks oranlarının %10'ların altında olduğu belirlenmiştir.

Fibrosarkomların çevresinde, psödokapsül olarak adlandırılan tümör çevresindeki reaktif dokuların oluşturduğu bir yapı mevcuttur. Ancak sadece tümör ve bu kapsülün çıkartılması cerrahi açıdan yeterli değildir; çünkü, mikroskopik olarak tümör hücreleri kapsülü aşarak çevre dokuları da invaze etmiş olabilirler.

Tümör boyutu veya lokalizasyon nedeniyle yeterli cerrahi sınır elde edilemeyeceği düşünülen olgularda ameliyat öncesi radyoterapi uygulanmalıdır. Cerrahi sınır pozitifliği lokal nüks oranını anlamlı şekilde artırmaktadır. Ancak baş-boyun bölgesi gibi bazı anatomik lokalizasyonlarda çoğu zaman, istenen cerrahi sınırlar elde edilemez. Bu gibi durumlarda ameliyat sonrası radyoterapi mutlaka uygulanmalıdır. Ayrıca cerrahi sınır pozitifliği, lokal nüks üzerine etkili olup, genel sağ kalımı anlamlı olarak etkilemediğinden, temiz sınırlar elde etmek için amputasyon vb. radikal girişimler önerilmemektedir (103).

2.6.6.2. Radyoterapi:

Amputasyon uygulansa dahi hastalarda uzak metastaza bağlı yüksek ölüm oranlarının saptanmasını takiben fibrosarkom tedavisinde radyoterapinin rolü yumuşak doku sarkomlarının tedavisinde organ koruyucu cerrahi teknikleri ve radyoterapi uygulamaları ön plana çıkmaya başlamıştır. Çalışmalarda, radyoterapinin, ameliyat öncesi veya sonrası dönemlerde uygulanması veya KT ile kombine edilmesi ile, hastalarda amputasyona gerek kalmaksızın uzun süreli sağ kalımlar elde edilmeye çalışılmıştır (105).

2.7. CURCUMİN

Curcumin, kaynağı Curcuma Longa olan (E,E)-1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-1,6-heptadiene-3,5,dionediferuloxylmethane kimyasal yapısında bir moleküldür (107), (Şekil 24).

. Curcuma Longa, Hindistan ve Çin'de yaygın olarak bulunan Zingiberaceae ailesine ait bir bitkidir. Curcuma Longa'nın diğer bir adı da Turmerik'tir. Bu bitkinin köklerinden elde edilen Curcumin, Hindistan'da yüzyıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır. Curcuma Longa'nın aktif maddesi olan Curcumin (CUR), portakal sarısı rengi ile gıda boyası olarak da kullanılmaktadır (Şekil 23). Çok iyi bilinen ve sıklıkla kullanılan köri baharatının ana komponentidir.



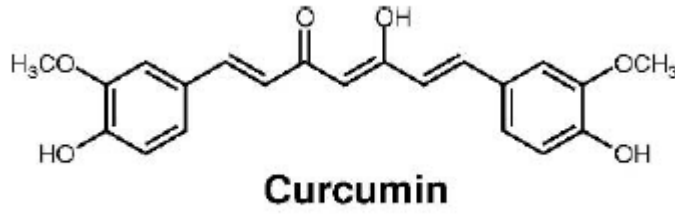
Şekil 23. Curcuminin toz halinde görünümü (108).

CUR'un yerel paramedikal kullanımı son yıllarda birçok araştırmacı için zihinlerinde yanıt bekleyen sorular oluşturmuştur (109). Turmerik'ten ilk kez yazılı olarak Marco Polo'nun 1280 yılında Çin ve Hindistan'a yaptığı gezilerde bahsedilmiştir. Avrupa'ya ise ilk defa 13.yy'da Arabistanlı tüccarlar tarafından getirilmiştir. Curcuma Longa; curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, zingiberene, curcumenol, curcumol, eugenol, tetrahydrocurcumin, triethylcurcumin, turmerin, turmeron ve turmeronol gibi bir çok fitokimyasal maddeyi içerir. Ticari Curcuma Longa aseton içinde eritildikten sonra kromatografik yöntemle subfraksiyonlarına ayrıldığında %77 CUR , %17 dimetoksicurcumin ve %3 bisdemetoksicurcumin izole edilmektedir (110,111).

2.7.1. Moleküler Özellikleri

Curcuminler genel olarak doğal ve yapay curcuminler şeklinde sınıflandırılmaktadır. Curcuma Longa üç farklı curcumin analogunu içerir. Bunlar, CUR, demetoksicurcumin, ve bisdimetoksicurcumin'dir. Bunlar doğal olarak bulunan bileşiklerdir. Suda erimez, etanol, keton, asetik asit ve kloroform gibi maddelerle çözünürler.

Yapılan araştırmalar sonucu doğal CUR'un kimyasal koruyucu, antioksidan ve benzeri olumlu etkilerinin kanıtlanması ile araştırmacılar benzer yapıda ancak farklı içerikteki sentetik curcuminlere de yönelmişlerdir (112).



Şekil 24. Curcuminin kimyasal yapısı (113).

2.7.2. Metabolizması

Curcumin suda çözünmez, hücre membranının hidrofobik ceplerinde lokalize olur. CUR moleküler özellikleri nedeniyle hücrelere hızlıca penetre olmakta, plazma membranından kolayca geçerek sitozole girmektedir. Sitoplazmada biriken CUR çekirdeğe girmez. Lipofilik özelliklerinden dolayı plazma membranı, endoplazmik retikulum ve çekirdek kılıfı gibi membranöz yapıların içinde yoğunlaşmaktadır. CUR dolaşımında çok düşük düzeyde veya hiç bulunmamaktadır (114). Curcumin bağırsaklardan emilimi sırasında renksiz ve daha az polar olan tetrahydrocurcumin adlı metabolitine dönüşmektedir. Tetrahydrocurcumin bağırsaklardan emilerek tüm dokulara dağılmaktadır. Tetrahydrocurcumin karaciğerde glukuronlanarak safra yolu ile atılmaktadır. Ağızdan alınan CUR'un yaklaşık %75'i feçes ile geri kalan kısmı idrarla atılmaktadır. İntraperitoneal uygulamalarda da vücuttan atılımı benzerdir, ancak %1'i dekonjuge olarak safra ile atılmaktadır (113).

Kansere karşı koruyucu olarak kullanılan ilaç tedavilerinde hedef kitle, sağlıklı insanlar ve kansere karşı yatkınlığı bulunan kişilerdir. Bu tedavilerde en önemli nokta, ilacın toksik etkilerinin olmaması ve oral alınabilir olmasıdır. Bazı araştırmacılara göre curcumin gastrointestinal sistemde birçok metabolik konjugasyon ve redüksiyon olaylarına maruz kalmakta dolayısıyla bu durum, etkinliğini azaltmaktadır (115). Lázaro M. L. bazı insan çalışmalarında, oral alımla curcumin konsantrasyonunun plazmada nanomolar gibi çok düşük düzeyde olduğunu, kolorektal dokularda ise bundan daha yüksek mikromolar konsantrasyonlarda olduğunu bildirmektedir. Buna göre curcuminin kanserle ilgili etkisi invivo olarak

gastrointestinal sistem dışında yeterli değildir ve curcumin oral alındıktan sonra dokulardan ve plazmadan hızlı şekilde temizlenerek apoptoz için yeterli etkiyi gösteremeyebilir (116). Sharma R. A. ve ark da ilerlemiş ve ilaç tedavisine dirençli 15 kolorektal kanserli hastaya 3.6 g/gün dozunda 4 ay oral yoldan curcumin vermişlerdir. Tedaviden kısmi sonuç alınmış ya da tümör belirteçlerinde düşüşler görülmüştür. Bu sonuçlara göre çalışmacılar curcuminin oral yolla değil de başka yollarla verilmesinin daha uygun olabileceğini bildirmişlerdir (117).

Birçok insan çalışmasında da 3-4 ay gibi kısa süreli 3600 mg/gün dozunda curcuminin çok düşük düzeyde toksik etki yarattığı saptanmıştır. Bu doz normal bir insanın günlük diyetle aldığı miktarın 20 katıdır. Bu bulguların ışığında araştırmacılar, bu dozlarda ve kısa süreli olarak curcuminin oral kullanımının toksik etki yaratmadığını kullanımının güvenli olduğunu bildirmişlerdir (117). Bir başka çalışmada Cheng. A. L ve ark insanlarda ağızdan 3 ay süreyle kullanılan curcuminin günde 8 g'a kadar toksik etki yapmadığını göstermişlerdir. Bu araştırmada, Lázaro M. L ve ark'nın bulgularının tersine, curcuminin günde 8 g dozda kullanımı durumunda kanda 1 saat sonra pik yaptığı ve 12 saat süreyle saptanabilir düzeyde kaldığı görülmüştür (118).

2.7.3. Curcuminin Etkileri

2.7.3.1. Antioksidan/oksidan etki:

Yapılan birçok çalışmada curcuminin antioksidan etkisi bildirilmiştir. Thiyagarajan M. ve ark'nın yaptığı bir çalışmada curcuminin böbrek, kalp, beyin dokusu ile karaciğer İ/R hasarında oksidatif stresi ve doku hasarını azalttığı gösterilmiştir (119). Bala K ve ark ise çalışmalarında curcuminin serbest radikal süpürücü etkisi sonucunda nöroprotektif etki gösterdiğini bildirmişlerdir (120). Tripathy ve ark da curcuminin sıçanları, orta serebral arter tıkanmasından koruduğunu göstermişlerdir (121).

CUR'un antioksidan etkisi; XD (ksantin dehidrogenaz)'nin XO (ksantin oksidaz) ya dönüşümünün önlenmesi, lipid peroksidasyonu oluşumunun engellenmesi ve iskemik ortamda bulunan ROS'ların temizlenmesi mekanizmaları ile olmaktadır. CUR, Katalaz (CAT), Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Glutatyon Peroksidaz (GPx) enzimlerinin aktivitelerini arttırarak hücre zarında bulunan lipidlerin

peroksidasyonunu azaltmaktadır. Özellikle fenolik yapıdaki curcuminoidler olmak üzere, sentetik curcuminoidler serbest radikallerden hücreleri koruyarak anti oksidan etki gösterirler (122).

Antioksidan enzimlerin aktiviteleri üzerine CUR'un etkileri doza bağımlı olarak incelendiğinde doz artışına paralel olarak GPx enzim aktivitelerinde artış görülmektedir. Piper JT. ve ark 1 mg/kg ile 500 mg/kg arasında değişen dozlarda CUR uygulaması sonucunda GPx enzim düzeylerinde anlamlı değişiklikler tespit etmişlerdir. En yüksek düzey 75-500 mg/kg dozlarında sağlanmıştır. Bu dozlarda kontrol grubuna kıyasla 2.1 kat artış saptanmaktadır (123).

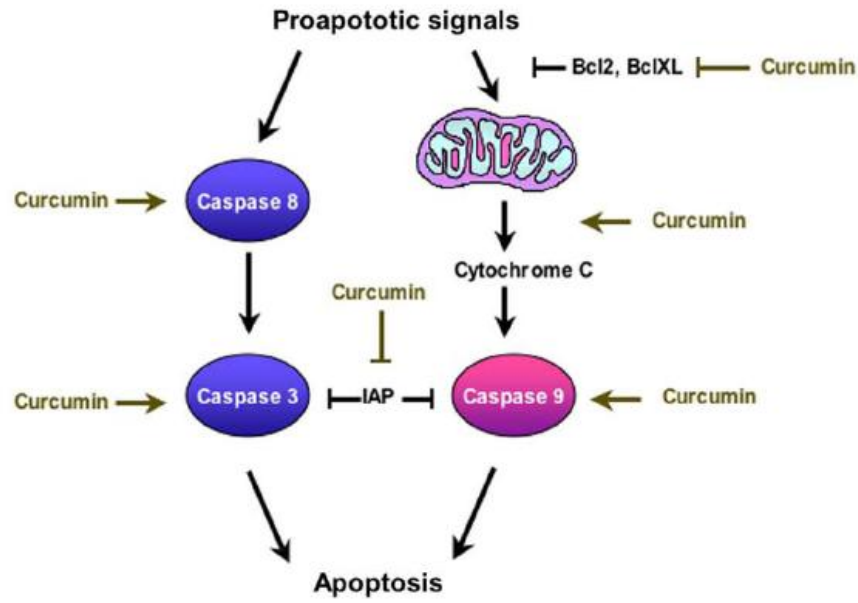
Ancak bazı araştırmacılar tam tersine curcuminin oksidan etkili olabileceğini bildirmektedirler. Jun Cao ve ark curcuminin HepG2 hücreleri üzerine etkilerini incelemişlerdir. Hücreler 2.5 µg/ml curcumin ile 1 saat enkübe edildiklerinde hücre içi ROS düzeyinde bir değişiklik saptamamışlar ancak curcuminin 5 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında ROS düzeyinin arttığını ve doz 20 ve 40 µg/ml'a çıktığında ROS düzeyinde artışın anlamlı şekilde devam ettiğini saptamışlardır (124). Stephen J. ve ark da HUH7 insan hepatoma hücrelerinde çalışmışlar; curcuminin 10 ve 25 µM dozlarında ROS üretiminin en yüksek düzeyde olduğunu bildirmişlerdir (125). Arnab Banerjee ve ark ise bir azo bileşiği olan 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH) ile muamele ederek hemolize ettikleri eritrositler üzerine curcuminin etkisini araştırmışlardır. 5-10 µM konsantrasyondaki curcumin uygulamasının eritrositlerdeki GSH düzeyini arttırdığını, ancak daha yüksek konsantrasyonlardaki curcumin uygulamasının eritrosit GSH düzeyini yeniden düşürdüğünü göstermişlerdir (126).

2.7.3.2. Apoptotik/antiapoptotik etki

Curcumin antikanser etkileri yönünden son yıllarda çok araştırılan bir moleküldür. Curcuminin potansiyel antikanser etkinliği bazı araştırmacılar tarafından sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanserli hücrelerde apoptoz oluşturmaya bağlanmaktadır. Hidrofobik bir molekül oluşu için plazma membranından kolaylıkla geçerek sitozole giren curcumin, fosfatidilserin indüklenmesi, plazma membran permeabilite artışı, mitokondriyal membran potansiyelinde azalma ve hücre büzülmesi gibi apoptotik hücrelerde gözlemlenen tipik özelliklere yol açmaktadır (127). Yapılan bir araştırmada AK-5 tümör hücrelerinin büyümeleri üzerine curcumin

etkileri araştırılmış; kontrol grubunun hepsinde peritoneal şişkinlik oluştuğu ve 10. günün sonunda %90 ölüm gerçekleştiği bildirilmiştir. Curcumin verilen grupta ise peritoneal şişkinlik %80 oranında kalmış ve gruptaki hayvanlar 40. günden sonraya kadar hayatta kalmışlardır. Curcumin 10 µM konsantrasyonda apoptozu 4. saat sonunda %40, 18'inci saat sonunda %100 indüklemektedir (127).

Curcuminin apoptotik etki mekanizmaları ile ilgili birçok çalışma vardır. Aggarwal S. ve ark curcuminin apoptozu Bcl-2, cyclinD1, IL-6, siklooksijenaz-2(Cox-2), MMP-9 yapımını azaltıp kaspazları aktive ederek arttırdığını göstermişlerdir (128), (Şekil 25). Bir başka çalışmada curcuminin doku kültüründe MCF-7 meme kanser hücrelerinde Bax düzeyini artırarak apoptoza neden olduğu bildirilmiştir (129). Pal S. ve ark curcuminin hücrede Bcl-2 ailesine ait olan Bax'ın pozitif düzenlenmesini sağlayarak, sitokrom-c'nin mitokondriden salınıp ve kaspaz-3'ün aktive olmasıyla hücrenin apoptozuna gitmesine neden olduğunu bildirmişlerdir (130). Anto JR. ve ark. curcuminin muhtemelen ilk aktivitesinin kaspaz-8 üzerine olduğunu bildirmişlerdir. Bu aktivasyon sonucunda Bid proteini (BID) kırılarak mitokondri membranına gidip yerleşmekte ve mitokondriyal membran potansiyelinde değişikliğe neden olarak sitokrom-c salınımını uyarmaktadır. Yine Anto JR. ve ark. tarafından curcuminin apoptozu bir çok mekanizma ile indüklediği ve bu mekanizmaların antiapoptotik proteinlerden Bcl-2 ve Bcl-xl tarafından negatif düzenlendiği ileri sürülmektedir (131). Ju-Hyung Woo ve ark insan böbrek karsinom hücrelerinde yaptıkları çalışmada curcuminin caspase-3'ü aktive ederek, sitokrom-c salınımını artırarak ve Bcl-2'yi azaltarak, ayrıca tümör hücrelerinde ROS üretimini artırarak apoptotik etki gösterdiğini bildirmişlerdir (132). Villegas ve ark T hücreli lösemi hücrelerinde curcuminin doz bağımlı olarak JAK ve STAT fosforilasyonunu azaltarak hücre ölümünü ve apoptoza arttırdığını göstermişlerdir (133). Aggarwal ve ark curcuminin, NF-κB sinyal yolu ile aktive edilen IKK ve Akt yolağını suprese ederek apoptotik etki gösterdiğini belirtmişlerdir (134).



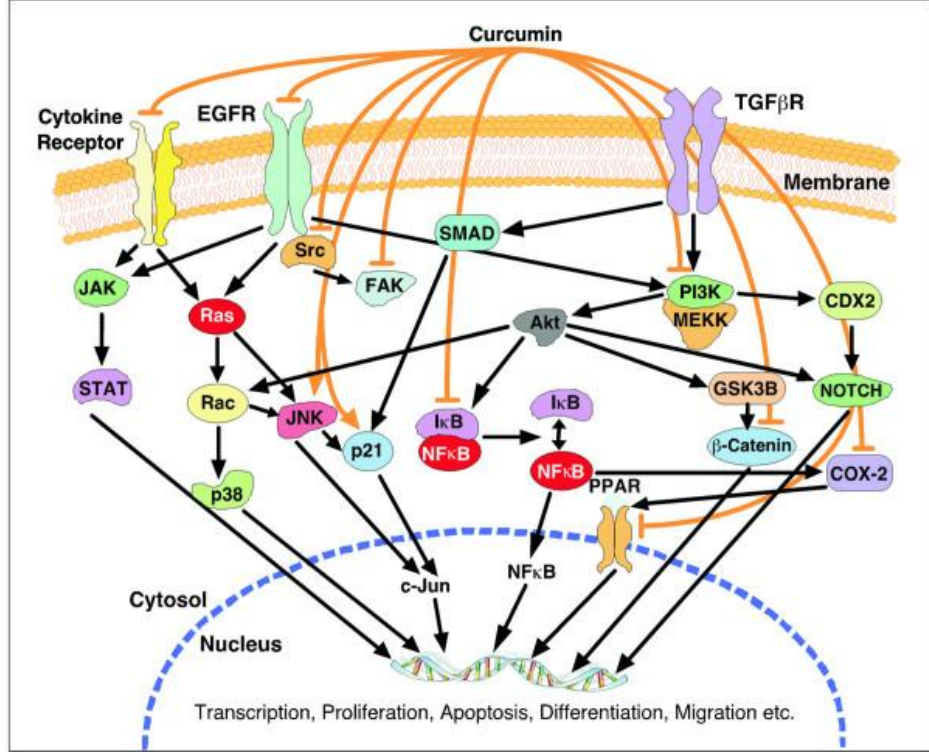
Şekil 25. Curcuminin apoptoz etki mekanizmaları (135)

Birçok çalışma, curcuminin apoptotik etkisinin hücre fazına göre değiştiğini bildirmektedir. Gautam ve arkadaşları, curcuminin transforme ve nontransforme hücrelerdeki etkilerinin aynı olup olmadığını araştırmışlardır. Çalışmalarında, 6.25 μM konsantrasyondaki curcuminin etkisiyle transforme hücrelerin apoptoza uğradıklarını ancak nontransforme hücrelerin proliferasyonunun devam ettiğini, 12.5 μM ve daha fazla curcumin dozlarında ise konsantrasyon artışına paralel olarak özellikle 25 μM - 50 μM konsantrasyonlarında tüm hücre tiplerinde proliferasyonun inhibe olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca, çok yüksek curcumin dozunda (50 μM) nonprolifere hücrelerde ölümün apoptoz nedeniyle değil de nekroz gibi mekanizmalarla gerçekleştiğini göstermişlerdir (136).

Curcuminin apoptotik etkisi uygulama süresi ve dozu ile de ilişki göstermektedir. Bhamik S. ve ark.'nın AK-5 rat histiositoma hücreleri ile yaptığı çalışmada hücrelere yaklaşık 50 μM olacak şekilde curcumin verilmiş ve akım sitometride 1'er saat arayla 4 kez apoptoz yüzdesi ölçülmüştür. 1 saat sonunda %7,13; 4 saat sonunda ise %86,52 oranında apoptoz görülmüştür (137). Bir başka çalışmada HL-60 lösemi hücrelerine curcuminin apoptotik etkisinin 3,5 $\mu\text{g/mL}$ dozunda başladığı, 14 $\mu\text{g/mL}$ dozu aşıldığında ise elektron mikroskopik incelemeler

hücrelerde apoptotik değil nekrotik ölüm belirtilerini gösterdiği bildirilmiştir (138).

Curcuminin apoptotik etkili olduğu ve mekanizmalarına ilişkin bu çalışmalara karşın, curcuminin, bazı hücrelerde apoptozu indüklediğini, bildiren çalışmalar da vardır. Anto RJ ve ark yaptıkları çalışmada L-929, fare fibrosarkom hücre kültüründe 10^{-4} M dozunda curcuminin apoptotik etkisine karşı direnç geliştiğini göstermişlerdir (14). Başka bir grup araştırmacı ise sıçan timositleri ile yaptıkları çalışmada curcuminin antiapoptotik etkisinden bahsetmişlerdir. Bu araştırmacılar in vitro sıçan timositlerinde curcumin uygulamasının ardından hücre büzülmesi, fosfadiitlerinin açığa çıkması, membran geçirgenliğinin artması ve mitokondrial membran potansiyelinde azalmanın gözlemlendiğini, curcumin etkisiyle ortaya çıkan ve apoptozda gözlenen bu olayların ani, kısmen geri dönüşümlü olduğunu bildirmektedirler. Ayrıca hücre membranında görülen apoptotik değişikliklerin de kısa sürede ortadan kalkabildiğini söylemektedirler. Bunun yanı sıra curcuminin ortaya çıkardığı membrandaki değişikliklerin apoptotik programa bağlı olmadığını bildirmişlerdir (139). Aynı şekilde prostat kanseri hücrelerinde yapılan çalışmada bir retinoik asit analogu olan *N*-(4-Hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR) kullanılarak apoptotik etki elde edilmiştir. 4-HPR, apoptotik etkisini c-Jun N-terminal kinaz (JNK)'i aktive ederek göstermektedir. apoptoz oluşan prostat kanseri hücrelerine daha sonra curcumin uygulanmış ve apoptozun azaldığı saptanmıştır. Bu bulguların ışığında Chen Y ve ark curcuminin apoptozu baskıladığını bildirmişlerdir. (140,141).

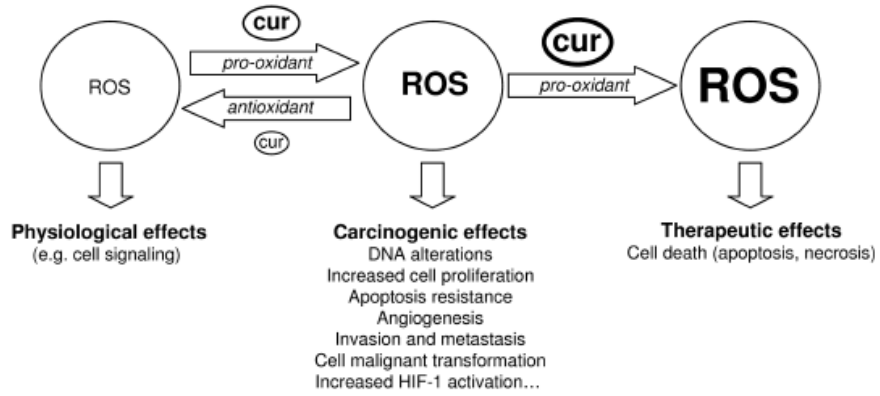


Şekil 26. Curcuminin apoptotik ve antiapoptotik yollar üzerine etkileri (142).

2.7.3.3. Antikanser/kanserojen etki

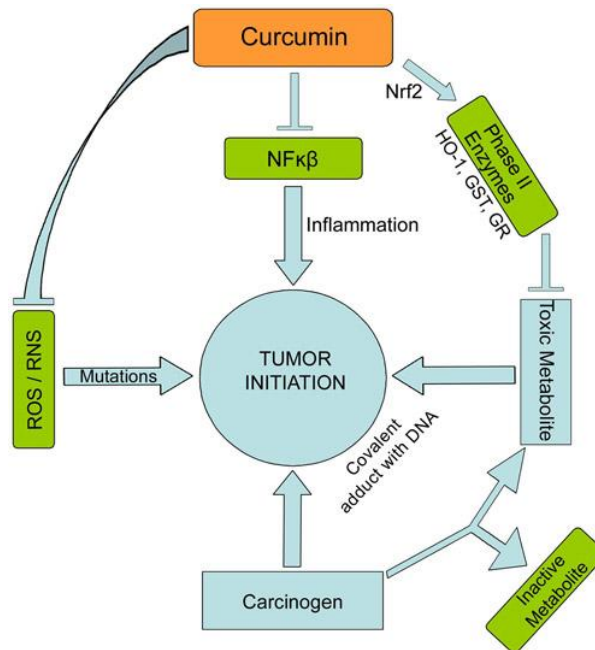
Bazı araştırmacılar curcuminin antikanser etkisinin apoptoz dışında başka mekanizmalara da bağlı olduğunu bildirmektedirler.

Kronik enflamasyon ve sitokinler NO[•](nitrik oksit) sentezini indükleyerek DNA hasarına ve kansere yol açan peroksinitrit ve nitrit oluşumuna yol açarlar. Yapılan pek çok çalışmada curcuminin NO[•] sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir (143,144,145). Böylece curcumin antikanserojen etki oluşturmaktadır. Ayrıca curcumin ROS'un kanserojenik etkilerini önlemekte ve tedavi edici etki göstermektedir (Şekil 27).



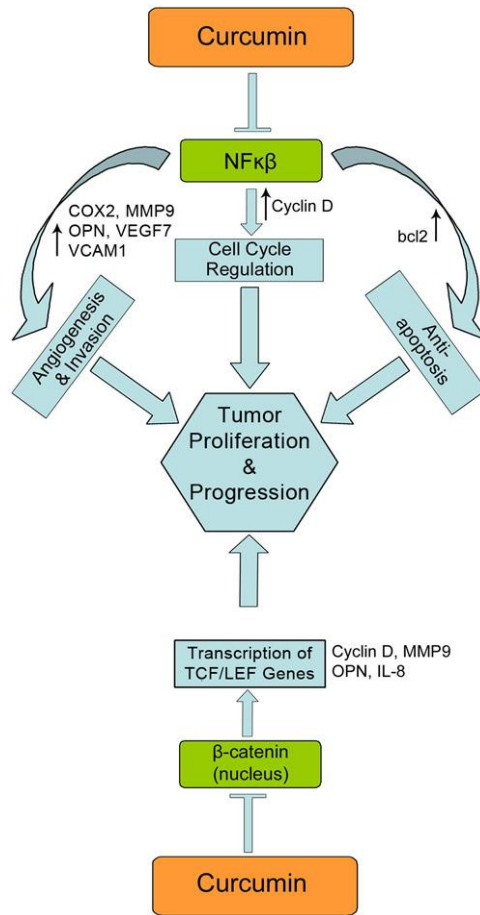
Şekil 27. Curcuminin ROS üzerinden antikanserojen etkisi (146).

Keratin hücrelerinde radyasyon maruziyeti sonrası IL-6, IL-18 gibi enflamatuar sitokinler ve bunlara eşlik eden NF- κ B yapımlarının artışı da doza bağımlı olarak curcumin tedavisi uygulanmasıyla kontrol edilmiş ve azaltılmıştır (147). Curcumin tedavisi ile NF- κ B'nin enflamasyonu uyarıcı etkisi gerçekleşmemekte ve sonuçta NF- κ B'nin tümör gelişimi üzerine etkisi önlenmiş olmaktadır (Şekil 28).



Şekil 28. Curcuminin Nf- κ B üzerinden tümör gelişimi üzerine önleyici etkisi (148).

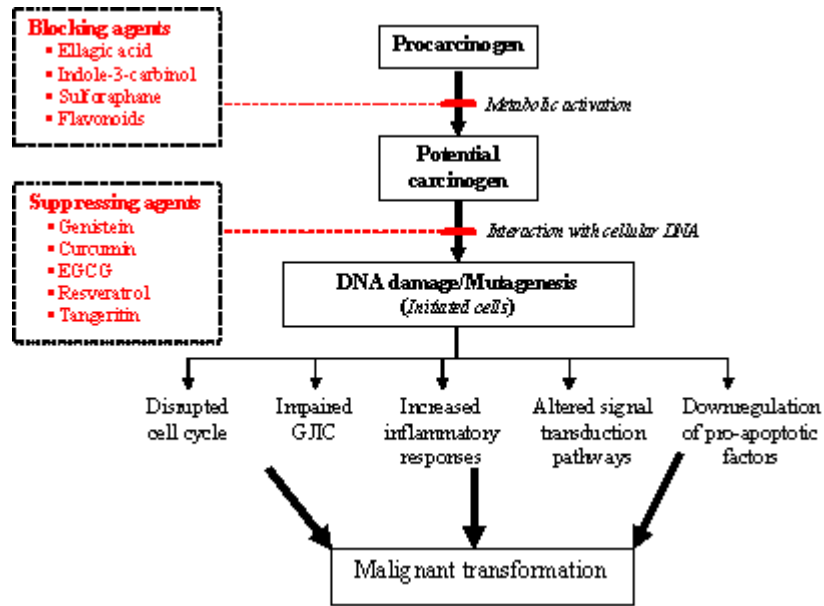
Cox-2, araşidonik asitten prostaglandin oluşum basamağının hız kısıtlayıcı enzimidir ve karsinogeneziste kritik rol oynamaktadır. Cox-2'nin aşırı üretimi kötü huylu hücrelerin proliferasyon ve invazyonuna neden olur. Bu etkisi antienflamatuar ilaçlarla geri döndürülebilir. Bu nedenle Cox-2 inhibitörleri kanser tedavisinde önemli role sahiptir (149). Cox-2, NF- κ B'nin hücre içi sinyal iletiminde rol almaktadır. Yapılan çalışmalarda curcuminin Cox-2'nin yapımını azaltmak yoluyla birçok kanser hücresinde proliferasyonu azalttığı görülmüştür (150,151), (Şekil 29).



Şekil 29. Curcuminin Cox-2 üzerinden tümör gelişimini önleyici etkisi (148).

Curcuminin hücre büyümesi üzerine inhibe edici etkisi de antikanser etki ile sonuçlanmaktadır. Lopez ve ark 20 μ g/ mL dozda curcuminin K-562 insan kronik miyelojen lösemi hücrelerinde büyümeyi %50 oranında durduğunu göstermişlerdir

(152). Curcuminle oluşturulan büyüme inhibisyonu doza bağlıdır ve CUR'in uzaklaştırılmasıyla beraber geri dönüşümlüdür. CUR'un sebep olduğu büyüme inhibisyonu büyüme faktörlerinin ortama konulması ile geri döndürülemez, bu da CUR'un hücre döngü olaylarına etki ettiğini göstermektedir. CUR ile enkübe edilen hücre kültürlerinde, hücrelerin DNA içeriklerinin G₁/S fazında yoğunlaştığı gösterilmiştir. S fazındaki hücre sayıları ve hücre proliferasyonundaki inhibisyon hücrelerin S fazında yavaşladıklarını veya durduklarını ve DNA sentezinin, CUR'suz gruba göre aktif olmadığını düşündürmektedir (153,154). Mehta K ve ark da hormona bağımlı ve hormondan bağımsız meme tümör hücrelerinde çalışmışlar ve curcuminin hücre büyümesini apoptoz veya Bcl-2 ve Bax düzeylerini etkilemeden durdurduğunu göstermişlerdir. Ayrıca çalışmalarında curcuminin bu etkisinin zamana ve doza bağımlı bir etki olduğunu da saptamışlardır (154).



Şekil 30. Curcuminin antikanserojen etki mekanizmaları (155).

Curcuminin antikanser etkilerinin tersine, bazı çalışmalarda kanserojen özelliklerinden de söz edilmektedir. Şekil 30'da görüldüğü gibi curcumin potansiyel bir karsinojenin hücre DNA'sı ile etkileşimini önlemekte ve sonuçta karsinojenik etki meydana gelememektedir. Yapılan bir çalışmada sıçanlar %0,1, %0,5, %1, %2,5, %5 gibi değişik konsantrasyonlarda curcumin ekstre içerikli diyetle 3 ay ve 2 yıl beslenmişlerdir. Üç ay süreyle %5 turmerik ekstre ile beslenen sıçanların kolon mukozalarında hiperplazi geliştiği saptanmıştır. İki yıl süreyle %5 curcumin ekstre ile

beslenen sıçanlarda ise toksik ve karsinojenik etkiler ortaya çıkmıştır (156).

2.7.3.4. Antianjiogenetik etkisi

Anjiogenez, özellikle solid tümörlerde tümör büyümesinde ve metastazda asıl sorumlu faktördür. Anjiogenezin başlaması tümör hücrelerinden bazı moleküllerin salınıp çevre normal dokuya iletilen sinyaller yolu ile gerçekleşir. Bu moleküller çok sayıda farklı proteinlerden (bFGF, EGF, granülosit uyarıcı faktör, IL-8, PDGF, TNF, VEGF), ve küçük moleküllerden (adenozin, prostoglandin E) oluşmuştur. Bu moleküller arasından VEGF ve bFGF'nin tümör büyümesi için çok önemli oldukları açıkça görülmüştür. Bu moleküller birçok kanser hücresi tarafından üretilmektedirler.

Anjiogenez mekanizmaları tam olarak aydınlatılamasa da büyüme faktörlerinin, anjiogenezde önemli rol oynayan endotel hücrelerinde proliferasyonu artırıcı etkilerinin olduğu bilinmektedir (157). Yapılan *in vitro* çalışmalarda curcuminin insan endotel hücrelerinde proliferasyonu azattığı, *in vivo* çalışmalarda da FGF-2 ile oluşan anjiogenik cevabın ortadan kalktığı görülmüştür (153,158). Çinko bağımlı bir metalloproteinaz olan CD13/aminopeptidase N (APN), tümör invazyon ve anjiogenezde önemli rol oynar. Shim ve ark curcuminin APN'ye bağlanarak aktivitesini geri dönüşümsüz olarak inhibe ettiğini göstermişlerdir (159). Dorai ve ark LNCaP prostat kanser hücrelerinde curcuminin anjiogenezi inhibe ettiğini göstermişlerdir (160). Curcumin, melanoma ve prostat kanserleri gibi agresif tümörlerde MMP-2'yi inhibe eder. jelatinaz A (MMP-2) ve Jelatinaz B (MMP-9), yeni kapiller oluşumundan ve büyüme faktörlerinin aktive edilmesinden sorumludurlar. Curcumin salınan 53 ve 72 kDa'luk MMP'ların jelatinolitik aktivitelerini ve 72-kDa MMP'in ekspresyon ve transkripsiyonunu baskılar. Jelatinaz B, FGF-2'nin düzenlenmesinde görevli transkripsiyon faktörü AP-1'in yapımını artırır, bu olay curcumin tarafından baskılanır (157), Kanser hücreleri endotel hücrelerini taklit ederek endotel ilişkili genleri yapabilirler. Bu genler (VE-Cadherin, Src, FAK, PI-3) curcumin için iyi birer hedeftirler. Curcumin VEGF'nin ekspresyonuna, hipoksi, Cox'un aşırı yapımı, hidrojen peroksit salınması, uygunsuz EGRF, Src ve NF-κB sinyal üretimi gibi durumlarda müdahale edebilir (157).

2.7.3.5. Antienflamatuar etki:

Curcuminin diyetle alınımı durumunda kolonik mukozadaki siklooksigenaz ve lipooksigenaz enzimlerinin aktivitelerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu enzimlerin inhibe olması sonucu enflamatuar yanıtta rol alan araşidonik asit metabolizması önlenerek anti enflamatuar etki ortaya çıkmaktadır.

Curcuminin antienflamatuar etkisinin ortaya çıkmasında proenflamatuar genlerin ekspresyonunu kontrol ederek NF- κ B'nin etkisinin baskılanması, Cox-2'nin ekspresyonunun, proenflamatuar enzim olan 5-LOX'un ekspresyonunun, enflamasyonla ilgili birçok yüzey adezyon molekülünün yapımının azaltılması, TNF, IL-1, IL-6, IL-8 gibi enflamatuar sitokinlerin yapımının baskılanması gibi, başka mekanizmalar da öne sürülmüştür (6).

2.7.3.6. Ateroskleroza önleyici etki:

Kompleks ve çok basamaklı bir süreç olan ateroskleroz gelişimi üzerine curcuminin önleyici etkileri vardır. Okside LDL (düşük dansiteli lipoprotein)'nin aterojenik etkili olduğu *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla kanıtlanmıştır. Düşük dansiteli lipoproteinlerin oksidasyonu ateroskleroz gelişiminde rol oynamaktadır. CUR'un plazma kolesterol, lipoproteinler ve trigliserit düzeylerini azaltarak ateroskleroz gelişimini önlediği ileri sürülmüştür. Tortosa Ramirez ve ark aterosklerotik tavşan modellerinde curcuminin etkilerini araştırmışlar ve kontrol grubunun okside LDL düzeylerine kıyasla curcumin grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük okside LDL düzeyleri tespit etmişlerdir (161).

2.7.3.7. Antitrombotik etki:

Curcumin güçlü bir antitrombotik ajandır. Siklooksijenaz enziminin aktive ettiği sinyal yolağında hücre içi kalsiyum miktarı artmakta, trombositler aktive olmakta ve sonuçta trombotik etki oluşmaktadır. Curcumin siklooksigenaz aktivitesini baskılayarak antitrombotik etki gerçekleştirmektedir (162).

2.7.3.8. Deri hastalıklarından koruyucu etki:

Curcumin koruyucu ve tedavi edici ajan olarak skleroderma, psöriazis ve deri kanserlerinde kullanılmaktadır. Bu etkisini, serbest radikalleri bağlayarak ve Nf- κ B'yi inhibe edip enflamasyonu azaltarak yapar. Böylece deride oluşan kollojen depozitleri, fibroblast miktarı ve damarlanma azalır (163).

CUR psöriyasizli hastalarda topikal kullanıldığında klinik, histolojik ve immunolojik kriterlere göre psöriyazisi geriletmedi gösterilmiştir. CUR'un bu etkisinin immunomodölatör ve antienflamatuar etkilerinin yanı sıra siklooksijenaz inhibisyonundan dolayı olduğu öne sürölmüştür (111).

2.7.3.9. Curcuminin diğer etkileri:

Curcumin enflamatuar sitokinlerin (IL-1b, IL-6, IL-12, TNF- α IFN- γ) etkilerini ve sinyal iletim yolaklarını (JAK-STAT, AP-1 ve NF- κ B) düzenler. İmmun hücrelerde gösterdiği bu etkilerden dolayı otoimmün hastalıkların (Multipl skleroz, Tip 1 DM, enflamatuar barsak hastalığı, miyokardit, tiroidit) tedavisinde kullanılmaktadır (164).

Diyabetin çeşitli komplikasyonlarından ileri glikozilasyon son ürünleri sorumlu tutulmaktadır. Sajithlal ve arkadaşları glikozilasyon son ürünleri üzerine curcuminin etkilerini araştırmışlar ve artmış glikolizasyon son ürünleri birikiminin curcumin tarafından önlendiği sonucuna varmışlardır (14).

Ayrıca Curcumin, alerji, astım, bronşit, AIDS, renal iskemi gibi hastalıklarda da kullanılmaktadır (162).

Literatürde, curcuminin fibrosarkom üzerine apoptozun etkisini araştıran yalnızca iki çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan ilkinde Ruby ve arkadaşları L-929 fibrosarkom hücre serilerinde curcumininin apoptotik etkisini NF- κ B üzerinden araştırmışlardır (14). Diğer çalışmada ise Mitra ve arkadaşları farelerde oluşturdukları deneysel fibrosarkom modelinde curcuminin yine NF- κ B üzerinden etkilerini incelemişlerdir (165). Sıçanlarda deneysel fibrosarkom oluşturulmasıyla curcuminin oral verilerek apoptoz üzerine etkilerini Bax, Bcl-2 proteinleri üzerinden araştıran çalışmaya rastlanmamıştır.

Yakın gelecekte kanser tedavisinde geleneksel radyoterapi ve kemoterapi ile apoptoza duyarlı stratejiler beraber kullanılacak gibi görünmektedir. Böyle bir tedavi protokolü hem kemoterapi ve radyoterapi dozunun azaltılabilme şansını sağlayabileceği için hastayı bu tedavilerin istenmeyen yan etkilerinden kurtarabilecek ve hem de belki tümör hücrelerinde apoptoz oluşumunun daha güçlü olmasını sağlayarak daha etkin bir tedavi şansı sunabilecektir. Bu nedenle curcumin gibi apoptozu uyarıcı etkisi olabilecek yeni tedavilerin denenmesi önem taşımaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 DENEYSEL FİBROSARKOM OLUŞTURULMASI

Bu çalışmada, sekiz-on haftalık ortalama 150–200 gram ağırlıklarında 24 adet erkek Wistar Albino türü sıçan kullanıldı. Deneme süresince hayvanlar Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları laboratuvarında % 20 protein içeren kuru pelet yemle beslendi, ışık (12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık) ve ısı ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) kontrollü odalarda izlendi.

Gereçler

- 1) Curcumin (SIGMA, SIC1386)
- 2) 3-metilkolantren %98 (ALDRICH, AL213942)
- 3) Spektrofotometre (Shimadzu UV-16AA)
- 4) Santrifüj cihazı (Hettich, Micro 200R, Almanya)
- 5) Hassas terazi
- 6) Otomatik pipet :BIOHIT 2-20 μL , eppendorf 20-200 μl , RAININ 0-5000 μl
- 7) Eppendorf tüpleri (kapaklı): Sarf malzemesi
- 8) Pipet uçları (mavi ve sarı renkli): Sarf malzemesi
- 9) Derin dondurucu (Nuair; -85°C Ultralow Freezer)

Deney gruplarının oluşturulması ve 3-metilkolantren'in deney hayvanlarına uygulanması

Sıçanlar; kontrol (grup A, n=8), fibrosarkom (grup B, n=6), curcumin ile tedavi edilen fibrosarkom (grup C, n=5) ve yalnızca curcumin grubu (grup D, n=5) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Deney öncesi tüm hayvanların genel sağlık durumları kontrol edilip, palpasyonla deri altı herhangi bir anormal oluşum olup olmadığı incelendi ve herhangi bir anormal bulgu olmadığı doğrulandı.

Deneye 46 sıçan ile başlandı. Bunların 33 tanesine 3-MC enjeksiyonu yapıldı. 12 tanesinde fibrosarkom oluştu, 18 tanesi fibrosarkom oluşmadan öldü, sağ kalan sıçanlardan 3 tanesinde fibrosarkom oluşturulamadı. Fibrosarkom meydana gelen sıçanların 6 tanesine curcumin tedavisine başlandı, bunlardan 1 tanesi öldü. sonuçta B grubunda 6, C grubunda 5 sıçanımız kalmış oldu.

- Deneysel fibrosarkom modeli Sawick ve ark'nın yöntemine göre oluşturuldu. 0,25 mL susam yağı içinde çözdürülen 0,2 mg 3-metilkolantren A ve C grubundaki sıçanların sırt bölgelerinin deri altı dokusuna tek doz olarak enjekte edildi (166).
- A ve D grubundaki sıçanlara ise 0,25 mL susam yağı sırt bölgelerinin deri altı dokusuna tek doz olarak enjekte edildi
- Deney süresi 150-300 gün arasında oldu. Deney süresi içerisinde hayvanlar ilk üç ayda haftada bir, daha sonraki süre içerisinde ise gūnaşırı kontrol edilip tümöral oluşum yönünden palpe edildi. Tümöral oluşumları palpe edilebilir hale geldiğinde A ve B gruplarındaki sıçanlara eter anestezisi altında ötenazi uygulanarak tümöral dokular ve deri altı bağ dokusu oluştuğu bölgeden çıkarıldı.
- C ve D gruplarındaki sıçanlara tümör oluşumu saptandığı günden itibaren on gün boyunca 200 mg/sıçan dozunda curcumin, metil selüloz içinde homojenize edilerek gavaj yoluyla verildi. Tedavileri biten bu iki gruptaki sıçanların tümöral oluşumlarının boyutları ölçüldükten sonra eter anestezisi altında ötenazi uygulanarak, tümöral dokular ve deri altı bağ dokusu çıkarıldı.

Tedaviye başlamadan önce ve tedavi bitiminde tümör boyutları ölçüldü. Numasaki ve arkadaşlarının uyguladıkları formüle göre ($ab^2/2$, a büyük çap, b küçük çap tümör hacimleri hesaplandı (167).



Resim 1. Sıçanın sırt bölgesinde tümör oluşumu.

Çıkarılan tümöral oluşumların yarısı immunohistokimya ve apoptotik hücrelerin tayini için % 10'luk tamponlu nötr formalin solüsyonu içerisinde tespit edildi. Diğer yarısı ise Western Blot yöntemi ile analiz yapılana kadar - 80°C 'de saklandı.

Nötr formalin solusyonu içerisinde 24 saat tespit edilen dokular daha sonra akan çeşme suyu altında bir gece bekletilip ertesi gün rutin doku takip işlemlerinden sonra parafinde bloklandılar.

3.2.TUNEL YÖNTEMİ İLE APOPTOTİK HÜCRELERİN TESPİTİ:

Tunel yöntemi için kullanılan malzemeler

- In Situ Cell Death Detection Kit, POD (Roche, Cat. No. 1 684 817)
- Yıkama solüsyonu: PBS
- Bloklama solüsyonu: Metanol içinde hazırlanmış %3'lük H₂O₂
- Tunel reaksiyonu için karışım çözeltisi: Label (bağlayıcı) solüsyonundan 450 µL alınarak 50 µL enzim solüsyonu ile karıştırılarak hazırlandı.

Deney aşaması

- Doku kesitleri deparafinize edildi.
- Preparatlar 37°C'de 45 dakika tripsin ile muamele edildi.
- Prepratlar PBS içeren şalelere alınarak ikişer kere yıkandı.
- Metanol içinde hazırlanmış %3'lük H₂O₂ ile 10 dakika muamele edildi.
- %3 BSA ve %20 normal sığır serumu eklenerek 30 dakika beklenildi.
- PBS içerisinde ikişer kere yıkama yapıldı.
- Her preparata 50 µL Tunel reaksiyon karışım çözeltisinden eklenerek 60 dakika 37°C'de karanlıkta bekletildi.
- Preparatlar üç kere PBS ile yıkandı. Bu aşamada mikroskop altında immünfloresan incelemeleri yapılarak fotoğraflar çekildi.
- Preparatların çevresi kurularak 50 µL Converter- POD eklenerek 37°C'de 30 dakika beklenildi.
- PBS ile üç kere yıkama yapıldı.
- Her preparata 100 µL DAB substrat eklendi, 25°C'de 10 dakika bekletildi.
- PBS ile üç kere yıkama yapılarak preparatların üzerleri lamel ile kapatılıp mikroskopta incelenmek üzere hazır hale getirildi.

Olympus BX50 marka mikroskoba immünfloresan aparatı takılarak, doku kesitlerinde, nekroz ve hemoraji alanları içermeyen 10 farklı alanda büyük büyütme (X400) ile nükleer boyanma gösteren hücreler sayıldı. Bu alanlara karşılık gelen hematoksilen-eozin preparatlarda yeniden değerlendirme yapıldı.

3.3 DOKUDA Bcl-2 ve Bax PROTEİNLERİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK TESPİTİ

Gereçler

- 1) Poly-L-lysin lam (MikroSlides Snowcoat X-tra, Surgipath, Richmond, IL, USA)
- 2) Etüv (Mettler UM500)
- 3) Xylol (Merck)
- 4) Etanol (Merck)
- 5) Metanol (Merck)
- 6) AEC Substrat kit (DBS, K003)

AEC Substrat kit içeriği:

- a) Konsantre tampon
 - b) AEC
 - c) H₂O₂
- 7) Peroksidaz Mouse & Rabbit Kit, Background Blocker (DBS, KP-500, K023)
 - 8) Goat serum (ZYMED 16210064)
 - 9) Hidrojen Peroksit (H₂O₂, Sigma 31642)
 - 10) Bcl-2 primer antikoru (DELTABIOLABS A18)
 - 11) Bax primer antikoru (DELTABIOLABS A20)
 - 12) HRP Immunostaining Kit (For Mouse and Rabbit Primary Antibodies) (DBS, KP-500)

HRP Immunostaining Kit içeriği

- a) Linker solüsyonu, biotinlenmiş anti-mouse ve anti-rabbit immunoglobulinler içerir (kullanıma hazır).
 - b) Tracer solüsyonu horseradish peroksidaz ile konjuge streptavidin içerir (kullanıma hazır).
- 13) Faramount mounting medium (Daco, S3025)

14) Hemalum boyası (Surgipath)

Analiz aşaması

Bcl-2 ve Bax proteinlerinin immünohistokimyasal olarak tespiti Avidin-Biotin Peroksidaz yöntemi ile yapıldı.

- Hazırlanmış olan parafin bloklardan üç µm kalınlığında, poly-L-lysin (MikroSlides Snowcoat X-tra, Surgipath, Richmond, IL, USA) lamlara seri kesitler alındı.

- Seri alınan kesitler bir gece etüvde (37°C) bekletildi.

- Ertesi gün xylol I'de beş dakika, xylol II'de beş dakika, %100'lük alkol I'de üç dakika, %100 alkol II'de üç dakika, %96'lık alkol' de bir dakika ve %80'lik alkol'de bir dakika bekletildi. Sonra distile su içine alınıp etüvde (37°C) beş dakika bekletildi. Nemlendirilmiş 37°C'lik etüvde proteazda 15 dakika inkübe edildi. Ardından on dakika oda ısısında tutuldu.

- Kesitler iki dakika ikişer kez PBS (fosfat tamponu) ile yıkandı. Kesitlerde dokuların kenarı temizlendikten sonra metanolde hazırlanmış %3'lük H₂O₂'de 15 dakika bekletildi. Takiben iki dakika üçer kez PBS'de bekletildi.

- Lamların kenarları kurulanıp % 1,5' luk normal keçi serumu (15 µL keçi serumu ve 985 µL PBS) damlatıldı ve bir saat bekletildi.

- Lamlar silkelendi ve üzerlerine background solüsyonu eklendi, on dakika inkübasyona bırakıldı.

-Ardından primer antikorda bir saat bekletildi [15 µL keçi serumu, 980 µL PBS ve 25 µL primer antikor (Bax, Bcl-2)]. Üç kez PBS' de beşer dakika tutularak yıkama işlemi yapıldı.

- Üzerlerine linker solüsyonu (kullanıma hazır) konularak 25 dakika bekletildi. Ardından üç kere PBS ile lamlar yıkandı, tracer solüsyonu (kullanıma hazır) konularak 25 dakika beklendi. Üç kere PBS ile lamlar yıkandı ve üzerlerine Substrat/Kromojen solüsyonu eklendi.

Substrat/Kromojen solüsyonunun hazırlanması

1) 5 ml'lik distile su içeren test tüpüne Konsantre tampon çözeltisinde iki damla damlatıldı.

2) Dilüe edilen tampon içine iki damla AEC ve iki damla H₂O₂ damlatıldı ve çalışma solüsyonu hazırlandı.

- On dakika bekleme süresi sonunda mikroskop altında hücre sitoplazmalarının boyandığı görüldü ve lamalar, içinde PBS olan şale içine alındı. En fazla 10 dakika bekletildikten sonra lamalar şaleden çıkarılıp Hemalum boyasında 2-3 saniye bekletildi. Çeşme suyu altında yıkandı ve ardından distile su ile yıkayıp lamaların üzerine faramount mounting medium sürülerek lamel kapatıldı ve mikroskopta incelenerek fotoğrafları çekildi.

- Her preparatta rastgele 10 adet saha tarandı ve boyanma yoğunluğuna göre hafif boyananlara +1, orta derecede boyananlara +2, güçlü boyananlara +3 puan verildi.

3.4. DOKULARDA Bcl-2 ve Bax PROTEİNLERİNİN WESTERN BLOT YÖNTEMİYLE TESPİTİ

Homojenizasyona kadar -80°C'de saklanan dokular lizis tamponu kullanılarak homojenize edildi. Homojenatlar 10000 g'de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatantları ayrıldı. Süpernatantlar, protein tespiti ve Western Blot işlemleri için -80°C'de saklandı. Protein miktarı Lowry yöntemine göre tespit edildi (168).

Gereçler

- 1) Bcl-2 primer antikoru (DELTABIOLABS DB001)
- 2) Bax primer antikoru (DELTABIOLABS DB005)
- 3) Acrylamide (SIGMA A9099)
- 4) N,N'-Methylene bis-acrylamide (SIGMA M-7279)
- 5) N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED, SIGMA T7D24)
- 6) Sodium dodecyl sulfate (SIGMA L4390)
- 7) Bromophenol Blue sodium salt (SIGMA B8026)
- 8) Pepstatin (SIGMA P5318)
- 9) Leupeptin (SIGMA L2884)
- 10) Aprotinin (SIGMA A4529)
- 11) Tween 20 (SIGMA P1379)
- 12) BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)/NBT (nitro blue tetrazolium) (SIGMA B6404)
- 13) Glycine (SIGMA G-8898)
- 14) Trizma Base (SIGMA T-8404)
- 15) Ammonium Persulfate (SIGMA A-3678)

- 16) Triton X-100 (SIGMA T-8532)
- 17) Sodium chloride (Riedel 13423)
- 18) Bcl-2 pozitif kontrol (Deltabiolabs A18)
- 19) Bax pozitif kontrol (Deltabiolabs A20)
- 20) Sekonder antikor (anti-Rabbit IgG+AP DB2009)
- 21) Polyvinylidene Fluoride(PVDF) membran 0.45µm (santa cruz sc3723)
- 22) Low Range Marker (Santa cruz sc-2360)
- 23) PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride, SIGMA P7626)
- 24) HEPES [4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid sodium salt, SIGMA H7006]
- 25) 2-Propanol (SIGMA I9516)
- 26) Jel görüntüleme sistemi (tarayıcı) VILBER LOURMA marka
- 27) Mini elektroforez sistemi (Bio-Rad, Mini Protean III, US)
- 28) Elektroforez güç kaynağı (Bio-Rad, Power Pac, US)
- 29) Trichloroacetic acid (TCA, SIGMA T9156)
- 30) Glycerol (SIGMA 5516)

Lizis tamponu hazırlanışı

Lizis tampon, içerisinde 150 mM NaCl, 50 mM Tris (pH:8.0), %1'lik Triton X-100, 1µg/mL Leupeptin, 1µg/mL Aprotinin, 1µg/mL Pepstatin, 1mM PMSF olacak şekilde hazırlandı.

Lizis tamponu için stok solüsyonların hazırlanması

- Leupeptin: Distile su ile 10 mg/mL'lik stok hazırlanarak aliquatlara paylaştırıldı (-20°C'de 6 ay stabil).
- Pepstatin: Etanol %70 ile 1mg/mL'lik stok hazırlandı (-20°C'de 1 ay stabil)
- Aprotinin: 1 mL HEPES (0.01 M, pH:8) içinde 10 mg Aprotinin olacak şekilde stok hazırlandı (-20°C'de 6 ay stabil)
- PMSF: İsoopropanol içinde 10 mM'lık stok hazırlandı. Aliquatlara paylaştırıldı (-20°C'de 1 ay stabil).

NaCl 17.532 g, Tris 1.211 g, Triton X-100 2 mL, Leupeptin 20 µL(stok) , Aprotinin 20 µL(stok), Pepstatin 20 µL(stok), PMSF 20 µL(stok) alınarak az miktarda distile su

içinde çözüldürüldüler, pH:8'e ayarlandı ve volüm 200 mL'ye distile su ile tamamlandı.

Lowry yöntemine göre dokuda protein miktarı tayini

Gereçler

- 1) Sodium carbonate (FLUKA 71347)
- 2) Sodium hydroxide (SIGMA 8045)
- 3) Potassium sodium tartarate tetrahydrat (SIGMA S6570)
- 4) Copper(II) sulfate pentahydrat (SIGMA C8072)
- 5) Folin-Ciocalteu's phenol (SIGMA F9252)

Analiz aşaması

- Na₂CO₃ 2g ve 0,05g Na-K-tartarat, 0,1 N NaOH içinde çözümlenerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.
- 100 mg CuSO₄. 5H₂O 100 mL distile suda çözümlenerek hazırlandı.
- Alkali bakır çalışma çözeltisi: CuSO₄. 5H₂O/ Na₂CO₃ 0,1 M NaOH, 0,7 M Na-K-tartarat (1/9) oranında karıştırılarak hazırlandı.
- Seyreltik folin: Folin, 1/2 su ile seyreltildi.
- Deney tüplerine 2,5 mL Alkali bakır çözeltisi ve 50 µL numune konularak 15 dakika oda ısısında bekletildi
- Üzerine 250µL seyreltik fenol çözeltisinden eklendi ve 45 dakika oda ısısında bekletildi.
- Numuneler spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda köre karşı okundu.

3.4.1. Elektroforez

Protein elektroforezi Laemmli yöntemine göre SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel) kullanılarak yapıldı (169).

- Cam levhalar arasında sızıntı olup olmadığı kontrol edildikten sonra, % 10'luk ayırma jeli, hava kabarcığı kalmayacak şekilde otomatik pipet ile mini elektroforez (Bio-Rad, Mini Protean III, US) camları arasına döküldü (Resim 2).
- Jelin hava ile temasını kesmek için üzeri % 70'lik etil alkol ile kapatıldı ve jelin polimerleşmesi için bir saat beklendi. Süre sonunda jel üzerindeki alkol, kurutma kağıdı kullanılarak jele temas etmeden yavaş yavaş uzaklaştırıldı.

- Ayırma jelinin üzerine % 5'lik yoğunlaştırma jeli yine otomatik pipet ile döküldü. Taraklar, yoğunlaştırma jeli döküldükten sonra fazla beklemeden jel ile arasında hava kabarcığı kalmamasına ve ayırma jeline temas etmemesine dikkat edilerek takıldı. Jelin polimerleşmesi için bir saat kadar beklendi.



Resim 2. Jelin döküleceği elektroforez camlarının düzenek üzerine yerleştirilmesi.

Tablo I. Ayırma jelinin içeriği (% 10'luk)

Kullanılan Malzeme	Mini Elektroforez (Çift jel için)
Distile su	4 mL
1.5 M Tris tamponu (pH 8.8)	2.5 mL
% 30'luk Akrilamid/Bis akrilamid	3.3 mL
%10'luk SDS	100 µL
% 10'luk Amonyum Persülfat,	100 µL
TEMED	4 µL

Tablo II.Yoğunlaştırma jelinin içeriği (% 5'lik)

Kullanılan Malzeme	Mini Elektroforez (Çift jel için)
Distile su	3,4 mL
1 M Tris tamponu (pH 6,8)	630 µL
% 30'luk Akrilamid/Bis akrilamid	830 µL
%10'luk SDS	50 µL
% 10'luk Amonyum Persülfat	50 µL
TEMED	5 µL

Örneklerin Hazırlanışı ve Jele Uygulanışı

Taraklar jele zarar vermeden çekildi.

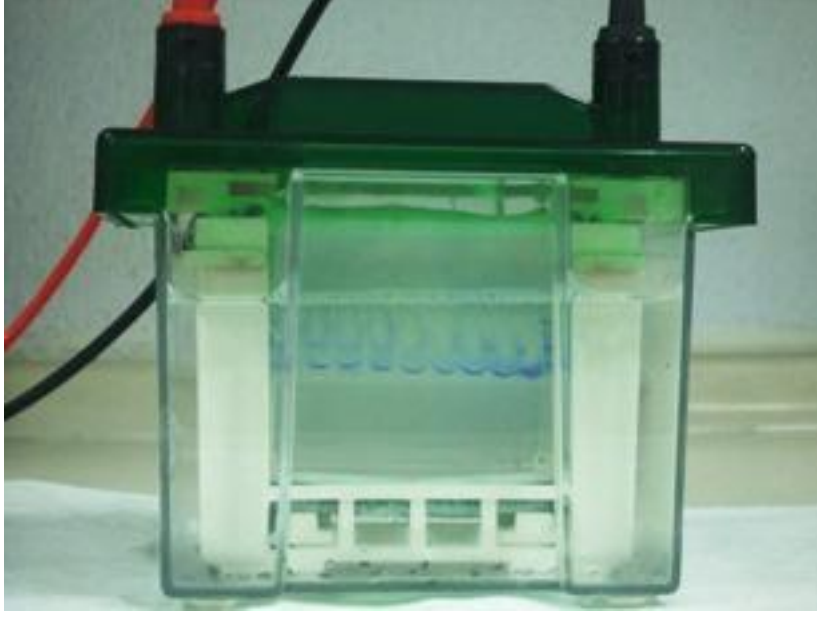
-Tarak çıkarıldıktan sonra oluşan kuyucuklara elektrot tamponu eklendi.

-Uygun seyreltilmeleri yapılan örneklerden 23 µL, yükleme tamponundan ise 4 µL eppendorf tüplerine alındı ve bu tüpler kaynar su banyosunda 100°C'de üç dakika kaynatıldı. Kaynatma işleminden sonra örnekler buz üzerinde soğutuldu.

-Daha sonra jeldeki ilk kuyucuğa ön boyama yapılmış (prestained) moleküler ağırlık standardı, diğer kuyucuklara ise 27 µL yükleme tamponu ile muamele edilmiş örnek yüklendi. Böylece her kuyucuğa 100 µg örnek yüklenmesi sağlandı.

-Örnekler jele yüklendikten sonra jel elektroforez tankı içerisine yerleştirildi ve kuyucukların üzerine elektrot tamponu eklendi.

-Proteinleri ayırma işleminde üst jele 100 V, alt jele ise 200 V (Bio-Rad, Power Pac, US) elektrik akımı uygulandı (Resim 3).



Resim 3. Numunelerin elektroforez tankı içinde jel üzerinde yürümeleri

Elektroforez İçin Gerekli Çözeltiler

-Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi % 30'luk

Akrilamiden 29 g, bisakrilamid'den 1 g tartıldı ve distile su ile volüm 100 mL'ye tamamlandı.

-1.5 M Tris Tamponu

Az miktarda saf su içerisinde 34,344 g tris-baz çözdürüldükten sonra, konsantre HCl kullanılarak pH'sı 8,8'e ayarlandı. Son volüm saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan tampon oda sıcaklığında bir ay süre ile saklanabilmektedir.

-1M Tris Tamponu

Tris-baz (12,11 g) az miktarda distile su içerisinde çözüldükten sonra üzerine konsantre HCl koyularak çözeltinin pH'sı 6,8'ye ayarlandı ve volüm 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan tampon oda sıcaklığında bir ay süre ile saklanabilmektedir.

-Amonyum persülfat % 10'luk

Amonyum persülfat (0,1 g), 1 mL distile su içinde çözüldü. Çözelti kullanılacağı zaman her seferinde taze olarak hazırlandı

-Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) % 10'luk

SDS (5 g), 50 mL saf su içerisinde yavaş yavaş karıştırılarak çözüldü.

-Yükleme Tamponu (Sample Buffer)

0.29 M Tris-baz (pH 6,8) içerisinde, % 8.3 SDS, %25 gliserol, % 7.75 DTT, %0.01 Bromfenol mavisi olacak şekilde yükleme tamponu hazırlandı.

-Elektrot Tamponu (Yürütme Tamponu)

Tris-baz (3 g) ve 14,4 g glisin az miktarda saf su içerisinde çözüldü ve konsantre HCl kullanılarak pH'sı 8.5'e ayarlandı. 1 g SDS az miktarda saf su içerisinde çözülerek Tris-glisin çözeltisine ilave edildi ve total hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan tampon 4°C'de saklandı. Tampon 2–3 kez kullanımdan sonra yeniden hazırlandı.

3.4.2. Western Blot Analizi

- Elektroforez işlemi bitince jel elektroforez camları arasından çıkartıldı. Jelin yükleme kısmı düzgün bir şekilde kesilerek uzaklaştırıldı ve transfer işlemi için hazırlandı.

-Santa Crus marka PVDF membran önce beş dakika saf metanol içinde bekletilerek doyuruldu. Sonrasında sandwich aparat, fiber spanç, filtre kâğıtları ve PVDF membranlar transfer tamponu içerisinde 30 dakika ıslatıldı.

- Sandwichler, içerisinde sırasıyla fiber spanç, filtre kâğıdı, membran, jel, filtre kâğıdı ve tekrar fiber spanç olacak şekilde hazırlanarak tekrar kapatıldı. Bu işlem yapılırken jel ile PVDF membran arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi.

- Daha sonra sandwich ve buz aküsü, blotlama tankına yerleştirildi ve tank içerisine sandwichlerin üst seviyesine kadar soğuk transfer tamponu ilave edildi. Elektroforez sonrasında proteinler elektroforetik olarak PVDF membranlara transfer edildi.

- Protein transferi 4°C'de bir saat boyunca 300 mA sabit akım uygulanarak gerçekleştirildi.

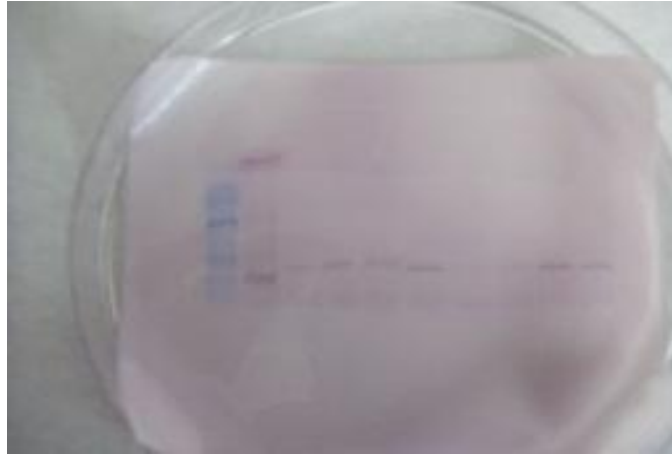
- Proteinlerin transfer aşamasından sonra sandwich kasetleri blotlama tankından çıkartıldı. Önceden boyanmış protein standardının PVDF membrana geçmesi transfer aşamasının başarılı olduğunu göstermiştir.

- Membranlar soğuk 1xTBS (Tris Tamponu) çözeltisi ile 10'ar dakikalık aralıklarla, çözelti her defasında değiştirilerek üç defa yıkandı.

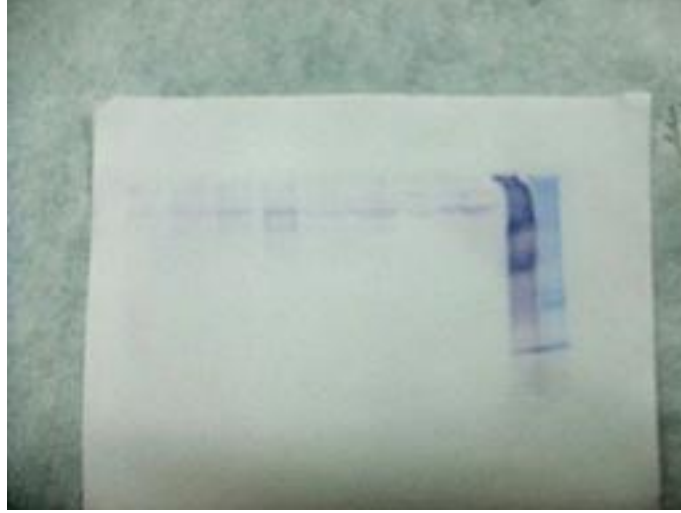
- Yıkama işleminden sonra membranlar, spesifik olmayan bölgelerin bloklanması amacıyla bir saat boyunca %2'lik BSA içerisinde bekletildi.

- Bloklama işlemi oda sıcaklığında ve çalkalayıcı kullanılarak gerçekleştirildi.

- Bloklama işleminden sonra %2'lik BSA döküldü ve membranlar çalkalayıcı kullanılarak 30 dk boyunca soğuk 1xTBS çözeltisi ile yıkandı, her yıkamadan sonra çözelti dökülerek yenilendi.
- Membranlar daha sonra 80 µL Delta Biolabs marka polyclonal anti-Bcl-2 antikoru (1:125 seyreltme) ve Delta Biolabs marka polyclonal anti-Bax antikoru ile (1:125 seyreltme) %2'lik BSA içerisinde 4 °C'de gece boyunca çalkalayıcıda bekletildi.
- Süre sonunda petri kaplarındaki BSA çözeltisi döküldü ve membranlar soğuk 1xTBS ile oda sıcaklığında çalkalayıcı kullanılarak 30 dakika süre ile yıkandı
- Membranlar daha sonra 10 mL %2'lik BSA solüsyonu (1:250 seyreltme) ile seyreltilmiş alkalen fosfataz işaretli ikinci bir antikor (40 µL anti rabbit antikoru) ile oda sıcaklığında bir saat sabit hızda çalkalandı.
- Membranlar, soğuk 1xTBS ile durulandıktan sonra BCIP/NBT ile boyama işlemine tabi tutuldu.
- Boyama, BCIP/NBT reaksiyon, solüsyonuna 30 g/L TCA (trikloroasetik asit) eklenerek bloke edildi (Resim 4).
- Daha sonra membran deiyonize suyla yıkanarak oda sıcaklığında ışıktan korunarak kurutuldu (Resim 5).



Resim 4. Petri kabı içerisinde bantların boyanarak görünür hale getirilmesi.



Resim 5. Membran üzerinde pozitif kontrol, ön boyama yapılmış moleküler ağırlık standardı ve numunelere ait bantlar.

-Membranların bilgisayar ortamına aktarılmasında yüksek çözünürlüğe sahip VILBER LOURMA marka tarayıcı kullanılmıştır. Image-J software (Image-J 1.33u, NIH) programı kullanılarak bantların sayısal değerlere çevrilmesi gerçekleştirildi.

Western Blotting Analizi İçin Kullanılan Çözeltiler

- Transfer Tamponu

Tris-baz 24,5 g, 112 g glisin ve 2 L metanol, 10 litreye saf suda çözünerek hazırlandı.

- 10 x TBS (Tris Tuz Tamponu) Çözeltisi (pH:7,6)

Tris-baz'dan 24,2g ve NaCl'den 80g alınarak saf suda çözüldükten sonra pH 7.6'ya ayarlanmış ve saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

- 1xTBS

10xTBS çözeltisinden % 10'luk hazırlanmıştır. Çözelti için 50 mL 10xTBS çözeltisine 50 µL (%0.1 olacak şekilde) Tween 20 ilave edildi ve total hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı. Çözelti kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklandı.

-Bloklama için %2'lik BSA

2 g BSA tartılarak 100 mL'lik balon jöjeye aktarıldı. Son hacim 100 mL 'ye tamamlandı.

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi amacıyla SPSS (for Windows Release 11.5 Standart Versiyon Copyright © Spss Inc.) hazır paket programı kullanıldı.

1. Bax, Bcl-2 proteinlerinin Western blot değerlerin istatistiksel analizi için Mann Whitney U testi kullanıldı. Bax sonuçlar ort \pm SD, Bcl-2 sonuçları, ortanca (min-max) olarak verildi ve $p < 0.05$ saptanan değerler anlamlı olarak kabul edildi.
2. Tunel verilerinin istatistiksel analizinde Mann Whitney U testi kullanıldı. Sonuçlar ort \pm SD olarak verildi ve $p < 0.05$ saptanan değerler anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. TÜMÖR DOKULARININ HACİMLERİ

Fibrosarkom oluşan ve daha sonra curcumin tedavisi verilen gruptaki sıçanlarda fibrosarkom saptandığında ölçülen ve 10 gün süreyle curcumin tedavisinin tamamlanmasından sonra ölçülen tümör boyutları ile hesaplanan tümör hacimleri Tablo III'te görülmektedir. İstatistiksel olarak tedavi öncesi ve tedavi sonrası tümör hacimleri arasında fark olmadığı saptandı ($p=0,754$).

Tablo III. Tümör boyutu değerleri [tümörün büyük çapı (cm), küçük çapı (cm), hesaplanan hacmi (cm^3)].

	Sıçan 1	Sıçan 2	Sıçan 3	Sıçan 4	Sıçan 5
Tedavi öncesi	6,5-4,5 (65,81)	4-3,5 (24,5)	3-2,5 (9,34)	2,5-1,5 (2,81)	2,5-2 (5)
Tedavi sonrası	5,5-5 (68,75)	3,3-3 (14,85)	4,5-3 (20,25)	3-2,5 (9,38)	2-1,5 (2,25)

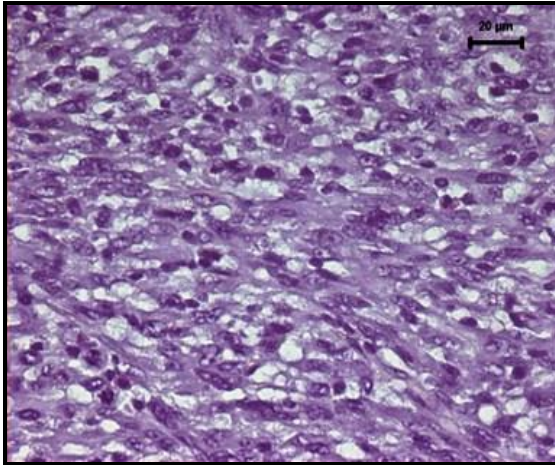
4.2. DOKULARIN PATOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

Çıkarılan tümör dokuları makroskopik olarak beyaz zayıf demarke multinodüler tümör şeklinde görüldü. Tümörün lokal olarak invaziv şekilde büyüdüğü düşük düzeyde metastaze olduğu tespit edildi. Genellikle düzensiz, değişik büyüklükte nodüler şekilli, iyi sınırlanmamış ve kapsülsüz görünümde idiler. Kesit

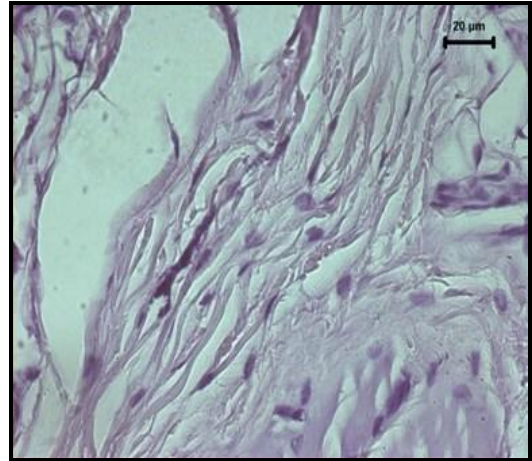
yüzü lobüllü, homojen gri beyaz renkli olup sıçanların birkaçında sarımsı renkte nekroz sahalarının olduğu tespit edildi (Resim 6).



Resim 6. Çıkarılan tümöral doku.



Resim 7



Resim 8

Resim 7. Fibrosarkom dokusunun mikroskop altında görüntülenmesi.

Resim 8. Normal deri altı bağ dokusunun mikroskop altında görüntülenmesi.

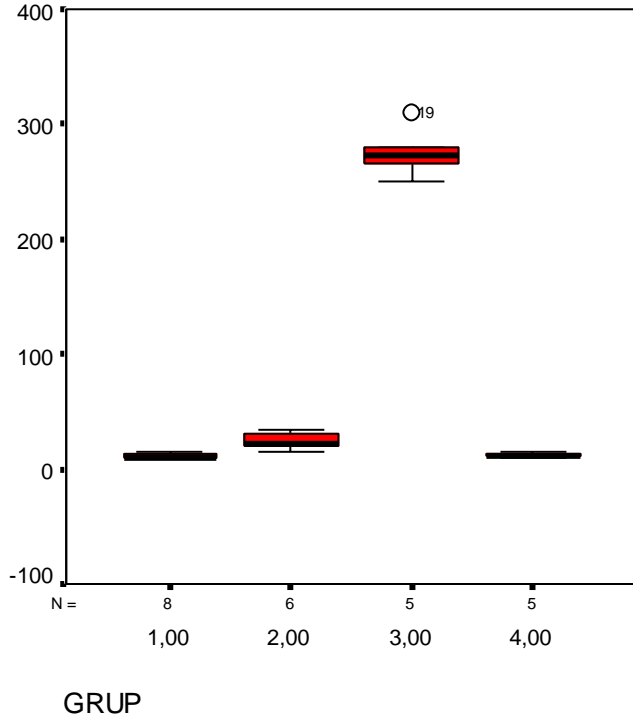
Doku kesitlerinin patolojik incelenmesinde, fibrosarkom grubunda uzun demetler halinde, içi hücrelerden oluşan tümör gözlemlendi. Tümörde geniş nekroz, sık ve atipik mitoz saptandı. Malign mezenkimal tümörlerin özelliklerinden olan balık sırtı görünümü mevcuttu. Tümöral dokunun yer yer kasa invaze olduğu gözlemlendi (Kontrol grubuna ait deri altı bağ dokusu resim 8'de ve fibrosarkom grubuna ait kanser dokusu resim 7'de görülmektedir).

4.3. DOKU KESİTLERİNDE APOPTOTİK HÜCRELERİN TUNEL YÖNTEMİ İLE GÖSTERİLMESİ:

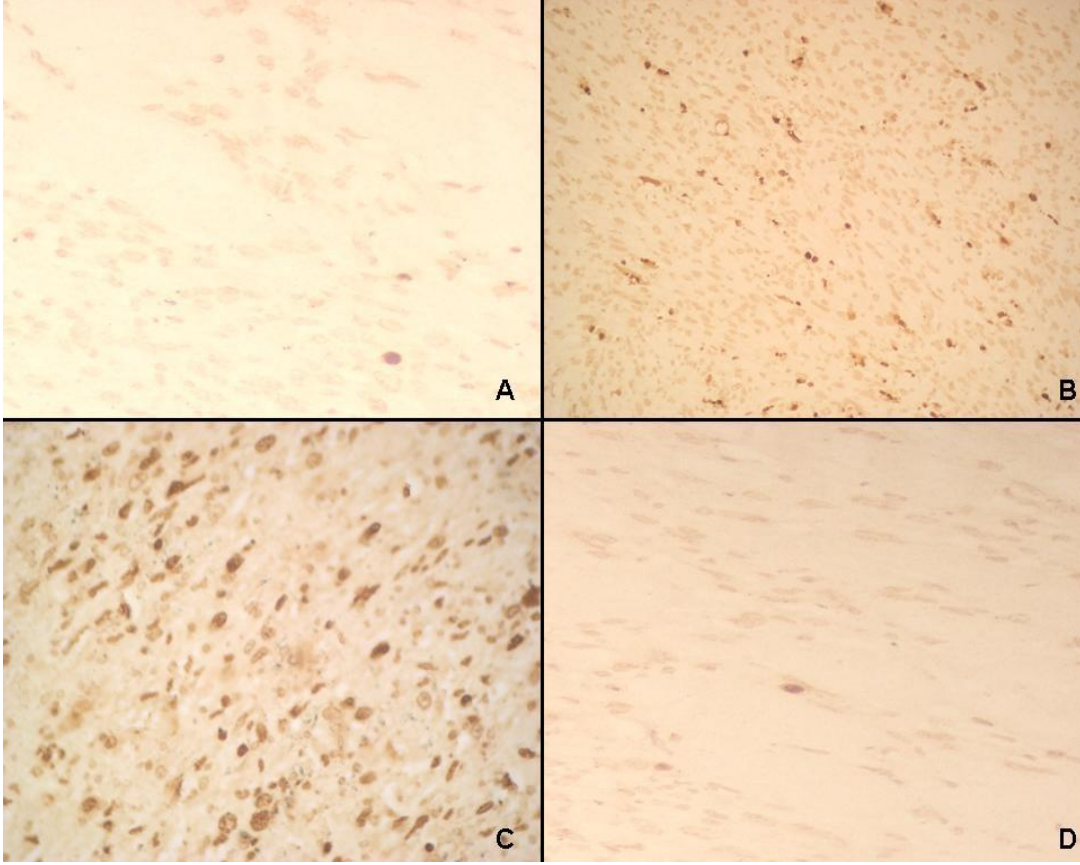
Doku kesitlerinde hücre sayımı tunel yönteminde hem hematoksilin eozinli (resim 9), hem de immünfloresanlı preparatlarda (resim.10) yapıldı. Tunel yöntemi ile yapılan hücre sayımında apoptotik hücre sayısı kontrol grubunda 11,625 ($\pm 2,2$), B grubunda 24,166 ($\pm 7,36$), C grubunda 275,4 ($\pm 22,27$), D grubunda 12,2 ($\pm 1,92$) olarak saptandı. Tüm grupların apoptotik hücre sayıları Tablo IV.'te ve şekil 29.'da görülmektedir. Gruplar arasında istatistiksel karşılaştırma yapıldığında, A grubu ile B grubu arasında, B grubu ile C grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (sırası ile $p=0.003$, $p=0.006$). A grubu ile D grubu arasında ise anlamlı fark saptanmadı ($p=0.448$).

Tablo IV. Tunel yöntemi ile saptanan apoptotik hücre sayıları.

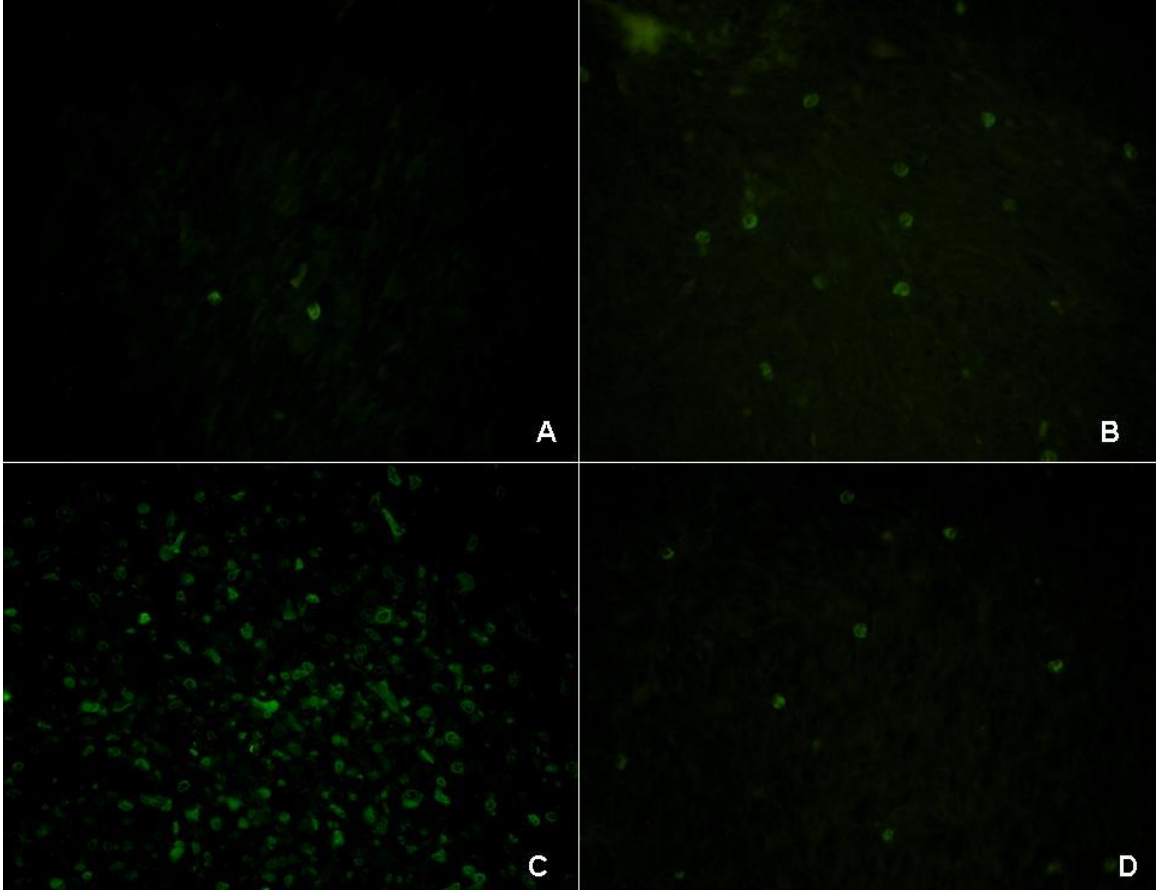
Gruplar	Sıçan 1	Sıçan 2	Sıçan 3	Sıçan 4	Sıçan 5	Sıçan 6	Sıçan 7	Sıçan 8
Kontrol grubu	10	15	12	10	11	10	15	10
Fibrosarkom grubu	15	20	25	35	30	20		
Tedavi edilen fibrosarkom grubu	250	272	265	280	310			
Curcumin grubu	12	10	11	15	13			



Şekil 31. Doku kesitlerinde Tunel yöntemi ile yapılan, gruplara göre apoptotik hücre sayıları [(1, (grup A): kontrol grubu, 2, (grup B): fibrosarkom grubu, 3, (grup C): tedavi edilen fibrosarkom grubu, 4, (grup D): curcumin grubu].



Resim 9. Apoptotik hücrelerin hematoksilen-eozin boyalı doku kesitlerinde Olympus BX50 marka mikroskofta görüntülenmesi [(A:Kontrol grubu, B:Fibrosarkom grubu, C:Tedavi edilen fibrosarkom grubu, D:Curcumin grubu), (A:X100, B:X40, C:X200, D:X100 büyütme ile)].



Resim 10. Apoptotik hücrelerin İmmü Floresan boyalı doku kesitlerinde X100 büyütme ile Olympus BX50 marka mikroskopta görüntülenmesi (A:Kontrol grubu, B:Fibrosarkom grubu, C:Tedavi edilen fibrosarkom grubu, D:Curcumin grubu).

Tablo V. Tünel yöntemi ile saptanan apoptotik hücre sayıları ve standart sapmaları

Gruplar	Ortalama±Standart sapma
Kontrol grubu	11,62 ± 2,19
Fibrosarkom grubu	24,16 ± 7,35 ^{a,b}
Tedavi edilen fibrosarkom grubu	275,4 ± 22,26 ^a
Curcumin grubu	12,2 ± 1,923 ^b

a: kontrol grubu ile karşılaştırıldığında p<0.05

b: tedavi grubu ile karşılaştırıldığında p<0.05

4.4. DOKUDA Bcl-2 ve Bax PROTEİNLERİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

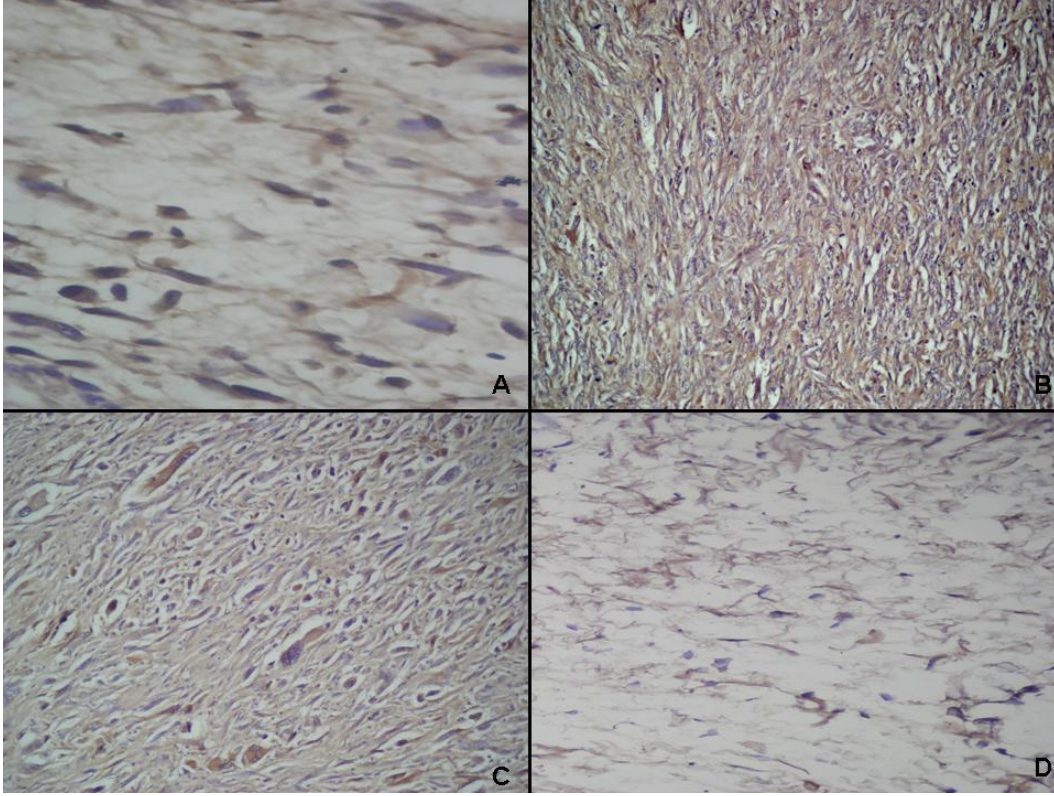
4.4.1. Dokuda Bax proteininin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi.

Fibrosarkom ve tedavi edilen fibrosarkom gruplarına ait doku kesitlerinde, hücre stoplazmalarının yer yer orta (++) yer yer zayıf (+) boyandığı gözlemlendi. İki grup arasında belirgin fark olmadığı görüldü.

Kontrol ve Curcumin gruplarına ait doku kesitlerinde ise hücre stoplazmalarının çok az da olsa zayıf (+1) olarak boyandığı gözlemlendi(Tablo VI ve Resim 11)

Tablo VI. Doku kesitlerinde immünohistokimyasal olarak bax proteininin boyanma yoğunluğu

Gruplar	Sıçan 1	Sıçan 2	Sıçan 3	Sıçan 4	Sıçan 5	Sıçan 6	Sıçan 7	Sıçan 8
Kontrol grubu	+	+	+	+	+	+	+	+
Fibrosarkom grubu	+	++	++	+	+	+		
Tedavi edilen fibrosarkom grubu	++	+	+	++	+			
Curcumin grubu	+	+	+	+	+			



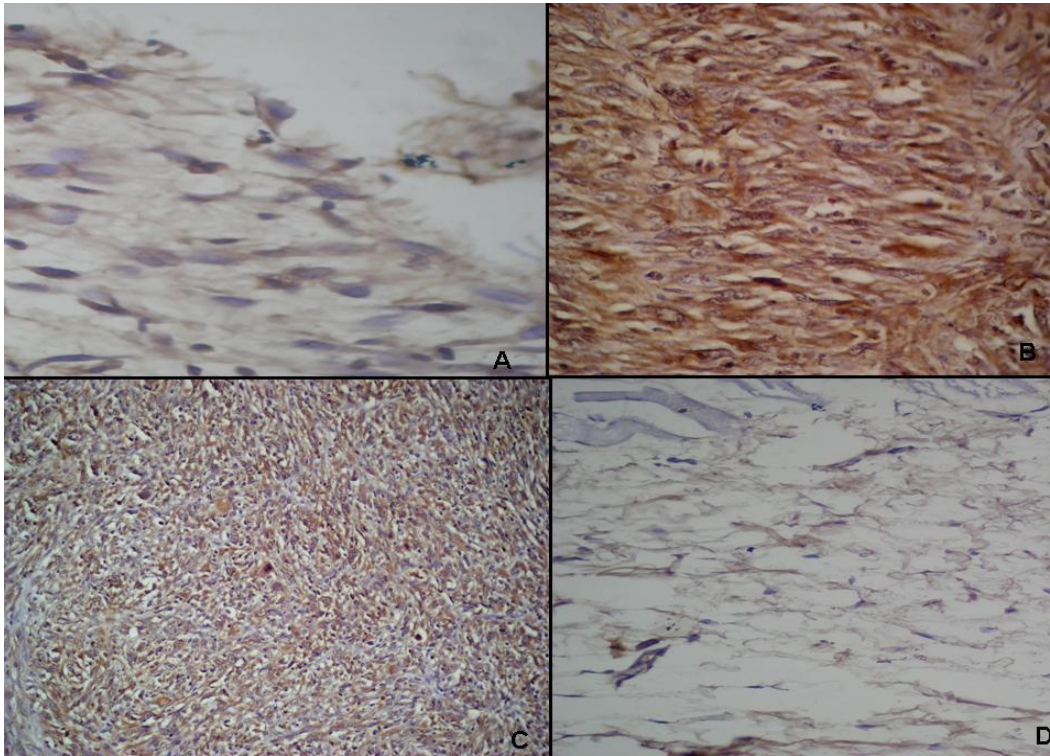
Resim 11. İmmünohistokimya yöntemi ile Bax proteinlerinin hücre sitoplazmalarında X40 büyütme ile tespit edilmesi [(A:Kontrol grubu, B:Fibrosarkom grubu, C:Tedavi edilen fibrosarkom grubu, D:Curcumin grubu), (A:X200, B:X100, C:X100, D:X100 büyütme ile)].

4.4.2. Dokuda Bcl-2 proteininin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi.

B grubuna ait doku kesitlerinde, hücre sitoplazmalarının yer yer diffüz güçlü (+3), yer yer fokal orta derecede boyandığı görüldü. C grubuna ait doku kesitlerinde, hücre sitoplazmalarının fokal orta (+2), A ve D gruplarına ait doku kesitlerinde ise hücre sitoplazmalarının çok az da olsa zayıf (+1) boyandığı gözlemlendi (Tablo VII, Resim 12).

Tablo VII. Doku kesitinde immünohistokimyasal olarak Bcl-2 proteininin boyanma yoğunluğu.

Gruplar	Sıçan 1	Sıçan 2	Sıçan 3	Sıçan 4	Sıçan 5	Sıçan 6	Sıçan 7	Sıçan 8
Kontrol grubu	+	+	+	+	+	+	+	+
Fibrosarkom grubu	+++	+++	+++	+++	++	++		
Tedavi edilen fibrosarkom grubu	++	++	++	++	++			
Curcumin grubu	+	+	+	+	+			



Resim 12. İmmünohistokimya yöntemi ile Bcl-2 proteinlerinin hücre sitoplazmalarında X40 büyütme ile tespit edilmesi [(A:Kontrol grubu, B:Fibrosarkom grubu, C:Tedavi edilen fibrosarkom grubu, D:Curcumin grubu) (A:X200, B:X100, C:X100, D:X100 büyütme ile)].

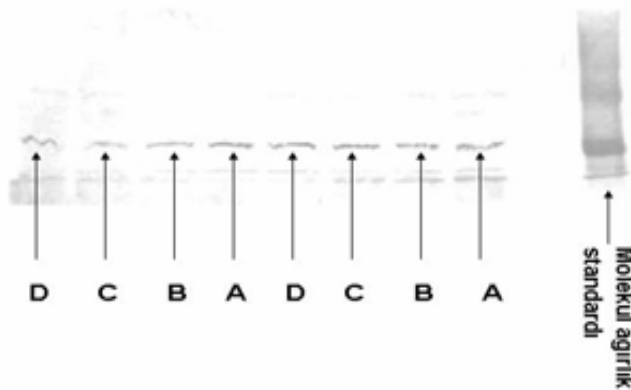
4.5 DOKUDA Bcl-2 ve Bax PROTEİNLERİNİN WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

4.5.1. Dokuda Bax Proteininin Western Blot Yöntemi İle değerlendirilmesi

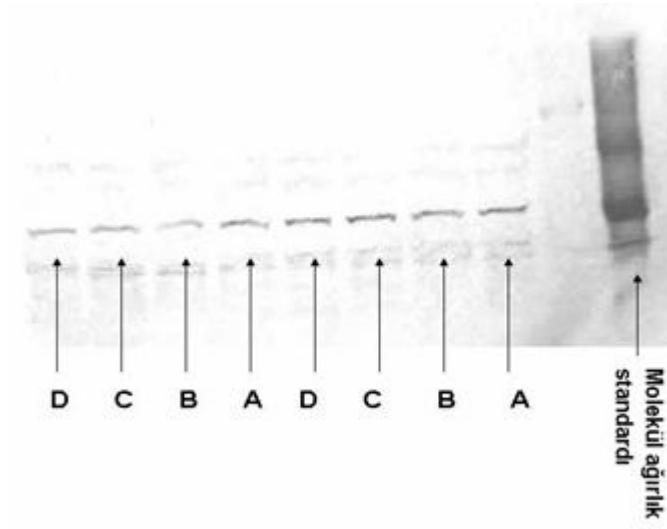
Membranlar daha önce anlatıldığı şekilde (sayfa 76) boyandıktan sonra jel görüntüleme sistemi ile bilgisayar ortamına aktarıldı. Membranlarda gözlenen bantlar (Resim 13, 14, 15), Image-J 1.33u, NIH programı kullanılarak boyanma yoğunlukları ve genişlikleri gözönüne alınarak sayısal değerlere çevrildi. Dokuda Bax proteininin western blot yöntemi ve Image-J programı ile saptanan sayısal değerleri Tablo VIII'de görülmektedir. Grupların ortalama değerleri SPSS 11,5 programında hesaplandı. Bax proteininin A grubuna ait değeri 2898,12 ($\pm 663,91$), B grubuna ait değeri 2117,47 ($\pm 687,63$), C grubuna ait değeri 2275,82 ($\pm 685,15$), D grubuna ait değeri 2282,19 ($\pm 733,69$) olarak hesaplandı.

Gruplar arasında istatistiksel karşılaştırma yapıldığında, B grubunda Bax proteini A grubuna göre istatistiksel olarak anlam olmamakla birlikte azalmış olarak bulundu. A grubu ile D grubu arasında değişiklik yoktu ve istatistiksel olarak fark saptanmadı. Aynı şekilde C grubu ile B grubu arasında da değişiklik gözlenmedi ve istatistiksel olarak fark saptanmadı.

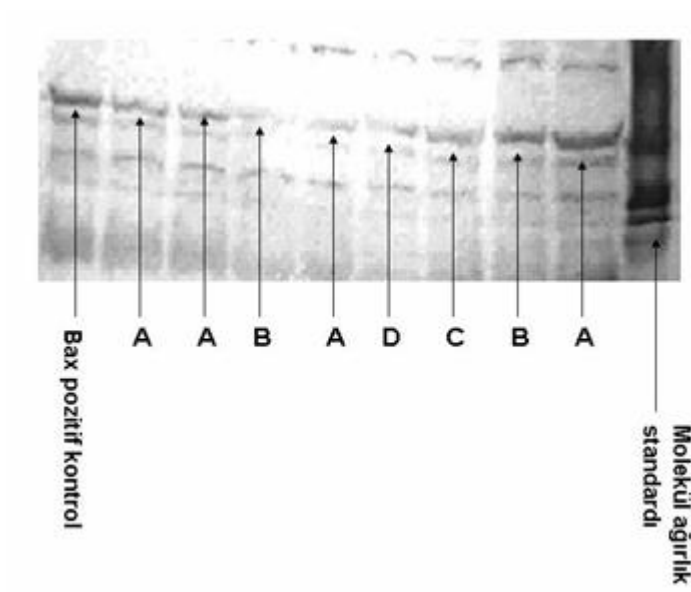
- A ve B grupları karşılaştırıldığında $p=0,062$
- B ve C grupları karşılaştırıldığında $p=0,602$
- A ve D grupları karşılaştırıldığında $p=0,223$
- A ve C grupları karşılaştırıldığında $p=0,223$



Resim 13. Membranda Bax proteinlerinin bant şeklinde görünümü (A:Kontrol grubu, B:Fibrosarkom grubu, C:Tedavi edilen fibrosarkom grubu, D:Curcumin grubu), (1.Jel).



Resim 14. Membranda Bax proteinlerinin bant şeklinde görünümü (2.jel).



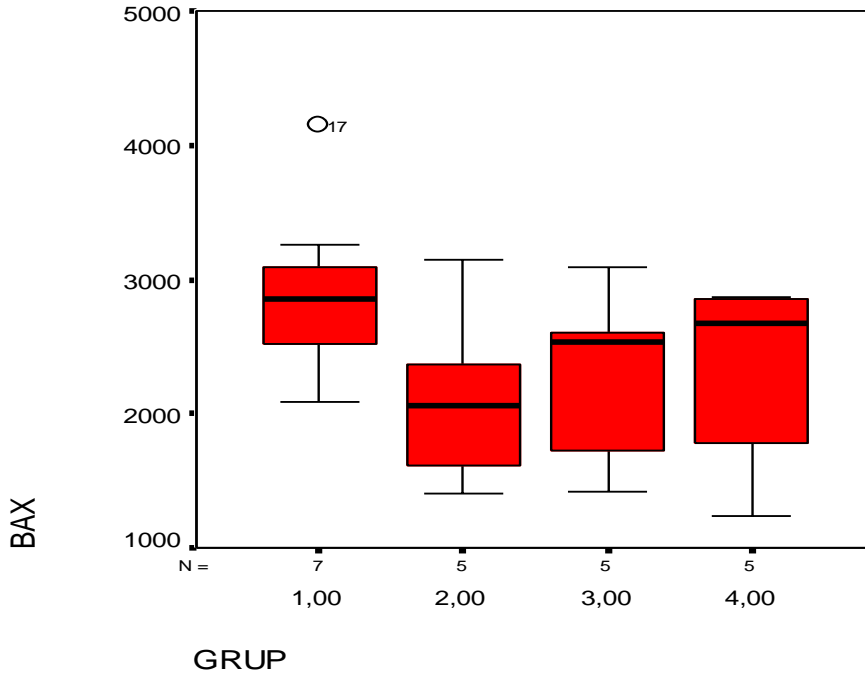
Resim 15. Membranda Bax proteinlerinin bant şeklinde görünümü (3. jel).

Tablo VIII. . Western Blot yöntemi ile saptanan Bax proteininin Image-J 1.33u, NIH programı ile hesaplanan değerleri

	Sıçan 1	Sıçan 2	Sıçan 3	Sıçan 4	Sıçan 5	Sıçan 6	Sıçan 7
Kontrol grubu	2556,28	2475,58	2854,96	2085,11	4146,13	2911,88	3256,95
Fibrosarkom grubu	2060,75	1609,34	2366,48	1404,18	3146,62		
Tedavi edilen fibrosarkom grubu	2600,75	1415,94	3092,06	1730,87	2539,52		
Curcumin grubu	2869,04	2671,03	2850,16	1778,41	1242,36		

Tablo IX. Western Blot yöntemi ile saptanan Bax değerlerine ait ortalama ve standart sapmalar.

	Ortalama \pm Standart sapma
Kontrol grubu	2898,12 \pm 663,91
Fibrosarkom grubu	2117,47 \pm 687,63
Tedavi edilen fibrosarkom grubu	2275,82 \pm 685,15
Curcumin grubu	2282,19 \pm 733,69



Şekil 32. Western Blot yöntemi ile saptanan Bax proteininin Image-J 1.33u, NIH programı ile hesaplanan değerleri [1, (grup A): kontrol grubu, 2, (grup B): fibrosarkom grubu, 3, (grup C): tedavi edilen fibrosarkom grubu, 4, (grup D) : curcumin grubu].

4.5.2. Dokuda Bcl-2 Proteininin Western Blot Yöntemi İle değerlendirilmesi

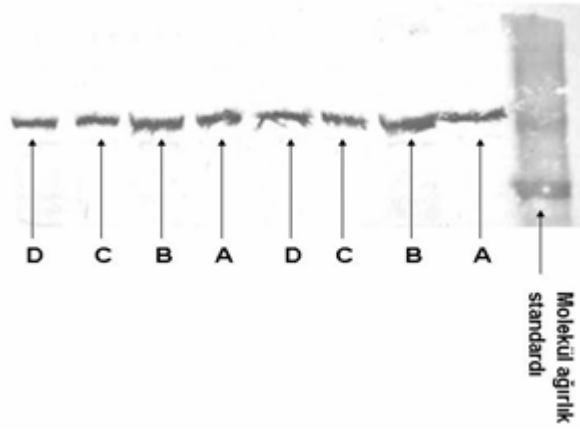
Membranlar daha önce anlatıldığı şekilde (sayfa 76) boyandıktan sonra jel görüntüleme sistemi ile bilgisayar ortamına aktarıldı. Membranlarda gözlenen bantlar (Resim 16,17,18), Image-J 1.33u, NIH programı kullanılarak boyanma yoğunlukları ve genişlikleri göz önüne alınarak sayısal değerlere çevrildi. Dokuda Bcl-2 proteininin western blot yöntemi ve Image-J programı ile saptanan sayısal değerleri Tablo X'da görülmektedir. Grupların ortalama değerleri SPSS 11.5 programında hesaplandı. Bcl-2 proteininin A grubuna ait değeri 729,09 (136,44 - 6356,79), B grubuna ait değeri 2183,42(1375,44 - 8298,05), C grubuna ait değeri 971,14 (401,97- 4563,55), D grubuna ait değeri 1604,92 (629,14 - 5998,98) olarak bulundu.

Gruplar arasında istatistiksel karşılaştırma yapıldığında, A grubu ile B grubu arasında istatistiksel olarak fark saptandı. A grubu ile D grubu arasında değişiklik gözlenmedi ve istatistiksel olarak fark saptanmadı. C grubunda Bcl-2, B grubuna göre istatistiksel olarak anlamsız olmakla birlikte, önemli ölçüde azalmış olarak bulundu.

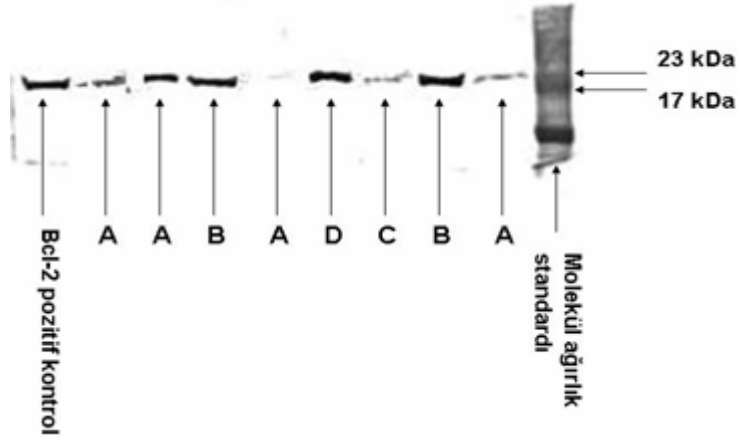
- A ve B grupları karşılaştırıldığında $p=0,039$
- B ve C grupları karşılaştırıldığında $p=0,068$
- A ve D grupları karşılaştırıldığında $p=0,242$
- A ve C grupları karşılaştırıldığında $p=0,884$



Resim 16. Membranda Bcl-2 proteinlerinin bant şeklinde görünümü.(jel 1) (A:Kontrol grubu, B:Fibrosarkom grubu, C:Tedavi edilen fibrosarkom grubu, D:Curcumin grubu)



Resim 17. Membranda Bcl-2 proteinlerinin bant şeklinde görünümü (jel2).



Resim 18. Membranda Bcl-2 proteinlerinin bant şeklinde görünümü (jel 3).

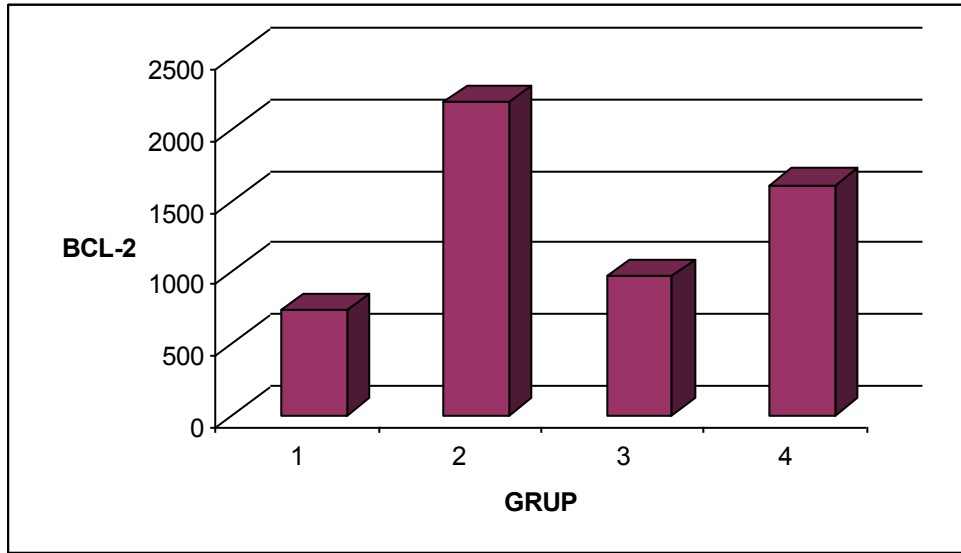
Tablo X. Western Blot yöntemi ile saptanan Bcl-2 proteininin Image-J 1.33u, NIH programı ile hesaplanan değerleri.

Gruplar	Sıçan 1	Sıçan 2	Sıçan 3	Sıçan 4	Sıçan 5	Sıçan 6	Sıçan 7	Sıçan 8
Kontrol grubu	703,39	368,14	6356,79	5574,98	458,85	136,44	754,80	1052,56
Fibrosarkom grubu	1656,70	2688,58	8298,05	6863,86	1678,26	1375,44		
Tedavi edilen fibrosarkom grubu	1482,09	971,14	442,79	4563,55	401,97			
Curcumin grubu	1403,46	629,14	5998,98	4452,60	1604,92			

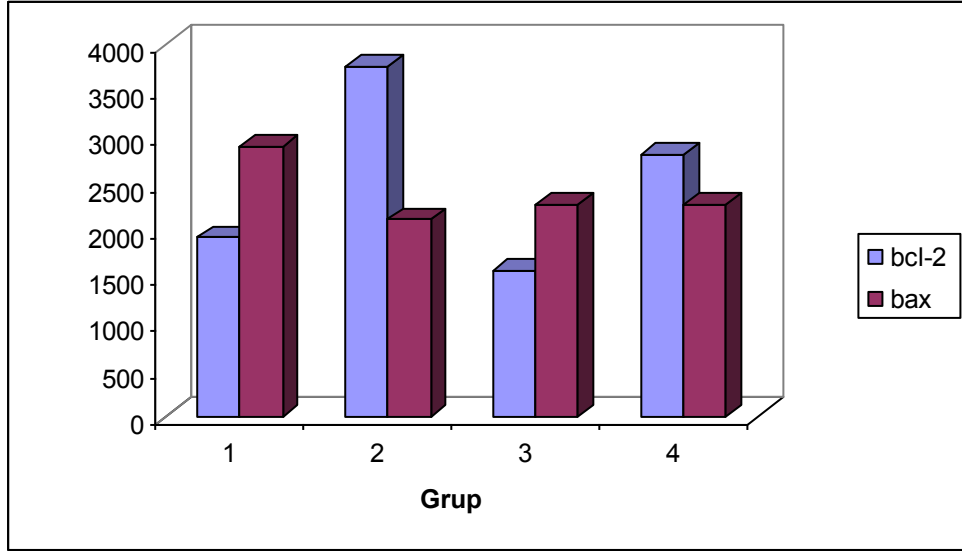
Tablo XI. Western Blot yöntemi ile saptanan Bcl-2 değerlerine ait ortalama ve standart hatalar.

	Ortanca (min-max)
Kontrol grubu	729,09 (136,44 - 6356,79)
Fibrosarkom grubu	2183,42 (1375,44 - 8298,05) ^a
Tedavi edilen fibrosarkom grubu	972,14 (401,97- 4563,55)
Curcumin grubu	1604,92 (629,14 - 5998,98)

a: kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$



Şekil 33. Western Blot yöntemi ile saptanan Bcl-2 proteininin Image-J 1.33u, NIH programı ile hesaplanan değerleri [1.(grup A): kontrol grubu, 2, (grup B): fibrosarkom grubu, 3, (grup C), tedavi edilen fibrosarkom grubu, 4, (grup D) ,curcumin grubu].



Şekil 34. Gruplara göre Bcl ve Bax değerlerinin bir arada karşılaştırılması [1.(grup A): kontrol grubu, 2, (grup B): fibrosarkom grubu, 3, (grup C), tedavi edilen fibrosarkom grubu, 4, (grup D) ,curcumin grubu].

5. TARTIŞMA

Fibrosarkom embriyonik mezodermden köken alan, vücudun herhangi bir bölgesinde ağrısız kitle şeklinde kendini gösteren bir yumuşak doku sarkomudur. Tedavide temel yaklaşım geniş lokal eksizyon ve radyoterapi (RT)'dir. Bazı histolojik alt tiplerde kemoterapi (KT) de tedaviye eklenmektedir. Tedaviye rağmen sağ kalım yüksek riskli hastalarda ancak %50 olarak bildirilmiştir (103).

Son yıllarda kanser sıklığının her geçen gün artması nedeniyle kanser oluş mekanizmalarını açığa çıkarmak ve alternatif tedavi yöntemleri geliştirmek için yoğun biçimde bilimsel araştırmalar yapılmaktadır. Halen kanser tedavisinde, kabul görmüş kemoterapi ve radyoterapi tedavi modelleri kullanılmaktadır. Kullanılan ilaçlara, ve radyoterapiye bazı kanser türlerinin dirençli olması ve bu tedavi yöntemlerinin normal hücrelerde de önemli hasarlara (hepatotoksik, nefrotoksik, kardiyotoksik vb.) yol açması nedeniyle kanser tedavisinde alternatif tedavi seçeneklerinin aranması zorunlu hale gelmiştir.

Kanser gelişimi mitoz kontrolü bozulmuş bir fenotipin üretilmesi ile başlamaktadır. Bundan sonraki aşamalarda büyüme faktörleri,büyüme faktör

reseptörleri, p53 gibi tümör baskılayıcı genler, DNA onarım genleri, Myc, myb gibi çekirdekte bulunan kopyalama faktörleri süreci yönlendiren faktörler olarak karşımıza çıkmaktadırlar (16,19,20,25). Bu faktörler ve ayrıca bunlara ek olarak apoptozda rol oynayan pek çok faktör (kaspazlar, bcl ailesi proteinleri, NF-κB, gibi) birlikte kanser gelişiminin gerileme veya ilerleme yönünde davranışını belirlerler. Apoptozu inhibe eden faktörler neoplastik büyümelere sebep olurken, apoptozu arttıran faktörler de neoplastik büyümeyi durdurmaktadırlar.

Apoptozun hücrenin kendi kendisini yok ettiği intrensek bir mekanizma, başka bir deyişle programlı hücre ölümü olarak açıklanabilir. Bir dokunun büyümesi sadece hücre çoğalmasına değil aynı zamanda fizyolojik olarak gerçekleşen apoptoz olarak adlandırılan programlanmış hücre ölümüne de bağlıdır. Apoptoz giden hücre çevredeki hücrelere zarar vermeden kendi ölümünü gerçekleştirir (44). Apoptoz embriyonal ve fetal dönemde, özellikle sinir sisteminin ve bağışıklık sisteminin normal gelişiminde, erişkinlerde özellikle menstruasyonda gözlenen endometriyal hücre yıkımı gibi fizyolojik durumlarda görülebilen bir süreçtir. Apoptozda ana amaç, yaşlanan veya aşırı üretilen hücreleri eleyerek organizmanın dengesini korumak ve yaşamın sağlıklı olarak devamlılığını sağlamaktır (7,44).

Apoptozda görev alan faktörlerden biri de Bcl ailesi proteinleridir. Bu aileye ait olan Bax proteini apoptotik etki gösterirken, Bcl-2 proteini antiapoptotik etkilidir. Bax proteini sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesini indükleyerek hücreleri ölüme sürüklemektedir. Yapılan çalışmalarda Bax geninden yoksunluğun apoptozda azalma, onkogeneze hızlanma ve çeşitli kanserlerin oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir(87,88). Bcl-2 proteini bcl ailesinin proapoptotik etkili üyelerine bağlanarak onların etkilerini engeller. Bcl-2 ekspresyonunda artışın prostat kanseri, ve gastrik neoplazmlar gibi kanserlerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (170,171).

Kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmakta olan kemoterapi ve radyoterapinin temel mekanizması kanserli hücreleri apoptoz gütürerek kanserli dokuyu küçültmek, ortadan kaldırılabilirdir. Ancak radyoterapi ve kemoterapi esnasında kanserli hücreler apoptoz ile temizlenirken, normal hücreler de apoptoz gidererek zara görebilmekte ve bu da insan sağlığını olumsuz etkileyen bir yan etki olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, bazı kanser hücreleri kemoterapi ve radyoterapiye dirençli olabilmektedir. Bu noktadan hareket ederek, son yıllarda, özellikle kanserli

hücrelerde apoptozu uyaran, fakat normal hücelere zarar vermeyen doğal maddeler araştırılmaya başlanmıştır. Bu doğal maddelerden biri de curcumindir. Günlük beslenme sırasında alınan curcuminin başlangıç aşamasındaki kansere karşı kullanılabileceği bildirilmiştir (11).

Cucuminin fibrosarkom üzerine apoptotik etkisi şimdiye kadar neredeyse hiç araştırılmamıştır. Bu konuda yapılan ilk çalışmada Ruby ve ark fibrosarkom hücreleri üzerine, daha sonra Mitra ve ark ise farelerde curcuminin NF-κB üzerinden apoptotik etki yaptığını bildirdiler (14,165). Sıçanlarda deneysel fibrosarkom oluşturulmasıyla curcuminin oral verilerek apoptoz üzerine etkilerini Bax, Bcl-2 proteinleri üzerinden araştıran çalışma bulunmamaktadır.

Biz çalışmamızda sıçanlara 3-MC uygulayarak oluşturduğumuz fibrosarkom modelinde curcuminin apoptotik etkisini inceledik. Curcumin, apoptotik etkisi halen araştırılmakta olan bir moleküldür. Curcuminin apoptotik etkisinde deneklerin yaşı, uygulama süresi, uygulama miktarı ve uygulama yolu sonucu etkileyen faktörler olarak ortaya çıkmaktadır. Curcuminin apoptotik etkisinin oluşmasındaki mekanizmalar konusunda da farklı çalışmalarda farklı görüşler ileri sürülmektedir. Ayrıca, curcuminin Bcl-2 ve Bax proteinlerinin ekspresyonları üzerine etki şekline ilişkin de farklı sonuçlar bildirilmektedir.

Curcumin birçok araştırmacı tarafından apoptotik etkili bir molekül olarak bildirilmekte ve genel kanı olarak apoptotik etkiye sahip olduğu kabul edilmekle birlikte (12,128,132), bazı araştırmacılar tarafından tam tersine, antiapoptotik etkili olduğu (172) veya apoptoz üzerine etkisi olmadığı da bildirilmiştir (139). Biz çalışmamızda öncelikle curcuminin fibrosarkom dokusunda apoptotik etki yaratıp yaratmadığını göstermeyi amaçladık. Bunun için de, Tunel yöntemini kullanarak sıçanların dokularında hücre sayısını saptadık. Kontrol grubuna göre fibrosarkom grubunda apoptotik hücrelerin arttığını ve istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu bulduk (p=0,003). Bu bulgu, fibrosarkom oluşumu durumunda hem hücre mitozunun hızlanarak hücre sayısının artmış olması, ama diğer taraftan da bu durumun bir sonucu olarak apoptoz giden hücrelerin sağlıklı duruma göre artış göstermesine bağlıdır. Biz çalışmamızda Lowe ve ark, Aggarwal S ve ark ve de Ju-Hyung ve ark nın sonuçları ile uyumlu olarak, fibrosarkom grubuna göre tedavi grubunda apoptotik hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı (p=0,006) şekilde arttığını saptadık.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bu bulgu, curcuminin fibrosarkom dokusu üzerine apoptotik etkili olduğunu göstermektedir.

Tümör dokularının tedavi öncesi ve sonrasındaki hacimleri hesaplandığında değişiklik olmadığını (istatistiksel olarak $p=0,754$) saptadık. Apoptotik hücre sayısında kontrol ve fibrosarkom grupları arasında fark olmasına karşın tümör hacimlerinin değişmemiş olması, uyguladığımız curcumin tedavi süresi ve/veya dozunun apoptoz oluşturmak için yeterli fakat muhtemelen tümör küçülmesini sağlayabilecek kadar fazla olmadığını düşündürmektedir.

Curcuminin Bax ekspresyonu üzerine etkisini araştıran çalışmalarda çelişkili sonuçlar bildirilmiştir. Bhattacharyya S ve ark, curcumini tümör ile arttırılmış T hücre apoptozunda tedavi amaçlı kullanarak etkilerini incelediler ve ilginç olarak, curcuminin T hücrelerinde Bax seviyesinde azalmaya neden olduğunu gösterdiler (173). Bildirilen bu etkinin tersine, Pal S. ve ark Ehrlich ascites tümör hücreleri ile yaptıkları çalışmada curcuminin, Bax'ın pozitif düzenlenmesini sağlayarak hücrenin apoptoza gitmesine neden olduğunu saptadılar (130). Bu sonuçlardan farklı olarak bazı araştırmacılar ise curcuminin Bax ekspresyonu üzerine herhangi bir şekilde etki etmediğini bildirdiler. Sharmila Shankar ve ark Bax geninin curcuminin apoptotik etkisini gösterebilmesi için gerekli olup olmadığını açık olmadığını bildirmektedir (174). Aynı şekilde Satyendra Mishra ve ark hücre kültürü çalışmalarında curcuminin bazı derivelerinin apoptozu arttırdığını ancak Bax ekspresyonu üzerinde etkisi olmadığını gösterdiler(175). PAN Rui ve ark farelerde Alzheimer modeli oluşturarak curcuminin tedavi edici etkisi üzerinde çalıştılar. Hipokampusları incelenen farelerde Bax seviyelerinin değişmediğini gösterdiler (176). Jiang MC ve ark insan hepatoma kanser hücre dizilerinde curcumin tedavisinin sonucunda Bax proteinlerinin seviyelerinin değişmediğini saptadılar (89). Bu araştırmacıların (174-176) sonuçları ile uyumlu olarak biz de çalışmamızda Western blot ve immunohistokimya yöntemlerini kullanarak Bax protein ekspresyonunun tedavi uyguladığımız grupta fibrosarkom grubuna göre, değişiklik göstermediğini ($p=0,223$) saptadık. Bax ekspresyonunun artmasının apoptozu tetiklediği bilinmektedir. Curcumin tedavisi alan grupta Bax ekspresyonu belirgin ve anlamlı bir artış göstermemiştir. Çalışmamızdaki bu bulgumuz, curcuminin apoptotik etkisinin ortaya çıkmasında Bax protein ekspresyonunun etkin bir mekanizma olmadığını göstermektedir.

Curcuminin Bcl-2 proteinin ekspresyonu üzerine etkisine ilişkin çalışmalarda da çelişkili sonuçlar bildirilmiştir. Rana Anjum ve ark AK-5 tümör hücrelerinde (177), Zai-xin Li ve ark. Burkitt's lymphoma Raji hücrelerinde (178), Jiang MC ve arkadaşları insan hepatoma kanser hücre dizilerinde (89). Cao ve ark .human hepatoma G2 hücrelerinde curcuminin Bcl-2 protein düzeyini değiştirmediğini buldular (178). İlginç bir sonuç olarak, Bhattacharyya S ve ark curcumini tümör ile arttırılmış T hücre apoptozunda tedavi amaçlı kullanarak etkilerini incelediler. Curcuminin T hücrelerinde Bax seviyesinde azalmaya neden olduğunu, Bcl-2'nin ise arttığını gösterdiler. Curcuminin bu özelliği ile T hücre yaşam süresini uzatarak kanser tedavisinde kullanılabileceğini belirttiler (173). Bu araştırıcıların bulgularından farklı olarak pek çok araştırmacı, curcumin tedavisinin Bcl-2 ekspresyonunu azalttığını bildirmişlerdir. Anto JR. ve ark insan miyeloid hücrelerinde (131), Aggarwal S, ve ark. MDA 686LN hücre dizilerinde (128), Christine Syng-ai ve arkadaşları MCF-7, MDAMB, ve HepG2 kanser hücre dizilerinde (179), Shi M ve ark insan over kanseri hücrelerinde Bcl-2 protein ekspresyonunu azalttığını gösterdiler (180). Kuo Liang-Min ve ark. çalışmalarında curcuminin HL-60 lösemi hücrelerinde curcuminin apoptoza yol açtığını, curcuminin apoptotik etkisinin doza ve süreye bağlı olduğunu, Bcl-2 protein ekspresyonunun curcumin tarafından azaltıldığını, ancak daha da artan curcumin dozlarında hücrelerde nekroz ortaya çıktığını bildirdiler (181). Liu B ve ark multipil myelom hücre dizilerinde curcumin uygulanması sonrası Bcl-2 mRNA seviyesinin azaldığını saptadılar (182,183). Bizim çalışmamızda western blot yöntemi ile bulduğumuz Bcl-2 protein düzeyleri değerlendirildiğinde, tedavi grubunda fibrosarkom grubuna göre istatistiksel olarak anlamı olmamakla beraber belirgin bir azalma olduğu görüldü ($p=0,062$). Kontrol ve fibrosarkom grupları arasında ise anlamlı bir farklılık saptadık ($p=0,039$). İmmünohistokimyasal yöntem ile elde ettiğimiz sonuçlarımız Western blot yöntemi ile elde ettiğimiz sonuçlarımızı destekledi. Bizim sonuçlarımız Anto JR ve ark, Aggarwal S ve ark, Christine Syng-ai ve ark, Liu B ve ark, Kuo ML ve ark' nın sonuçları ile uyumludur. Çalışmamızdaki bu bulgular, fibrosarkom dokusunda curcuminin apoptotik etkisinin ortaya çıkmasında rol oynayan mekanizmalardan birinin de Bcl-2 protein ekspresyonunun azalması olabileceğini göstermektedir.

Bazı çalışmalarda curcuminin Bcl-2 protein ekspresyonunun azaltmak ve bax protein ekspresyonunu arttırmaktan başka mekanizmalar ile de apoptoz yaptığı bildirilmiştir. NF- κ B' ve Cox-2 gen ekspresyonunu negatif düzenlenimi (131), kaspaz 9 düzeyinin artması (184), Bcl-xL ekspresyonunun azalması, p53 ve Bak ekspresyonlarının artması (185), cyclinD1, IL-6, (Cox-2), MMP-9 yapımının azaltılıp kaspazların aktivasyonu (128), sitokrom-c'nin mitokondriden salınıp kaspaz-3'ün aktive olması (130), kaspaz 8 aktivasyonu (131), kaspaz 3'ün aktivasyonu ve sitokrom-c'nin salınımı, tümör hücrelerinde ROS üretiminin artırılması (186), JAK ve STAT fosforilasyonunun azaltılması (133), NF- κ B sinyal yolu ile aktive edilen IKK ve Akt yolağının suprese edilmesi (134), kaspaz 3'ün etkinliğini artması ve glutatyon seviyesinin düşmesi (187) gibi çok sayıda farklı mekanizmalar ileri sürülmüştür. Biz çalışmamızda curcuminin olası apoptotik etki mekanizmaları olarak Bcl-2 ve Bax proteinlerinin ekspresyonlarını inceledik. Bax protein ekspresyonunun curcumin ile tedavi edilen fibrosarkom grubunda, değişmediğini, Bcl-2 protein ekspresyonunun ise fibrosarkom grubunda tedavi edilen fibrosarkom grubuna göre istatistiksel olarak anlamsız olmakla birlikte önemli ölçüde azaldığını saptadık. Bulgularımız, curcuminin fibrosarkom dokusu üzerine apoptotik etkisinin ortaya çıkmasında Bcl-2 ekspresyonunun muhtemelen rol oynayan bir mekanizma olduğunu ancak, bu araştırmacıların çalışmalarında bildirdikleri başka mekanizmaların da Bcl-2 protein ekspresyonunun arttırılmasına ek olarak birlikte çalışıyor olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda Tunel yöntemi kullanılarak yapılan apoptotik hücre sayısı tedavi edilen fibrosarkom grubunda fibrosarkom grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır ($p=0.006$). Western blot yöntemi kullanarak saptanan bcl-2 ekspresyonu tedavi verilen fibrosarkom grubunda tedavi edilmeyen fibrosarkom grubuna oranla belirgin şekilde azalmakla birlikte istatistiksel olarak anlam bulunamadı. Bu sonuçlar göstermektedir ki, curcumin fibrosarkom dokusu üzerine güçlü şekilde apoptotik etki yapmıştır. Ancak Bcl-2 proteini ekspresyonundaki değişiklik apoptotik hücre sayısındaki kadar güçlü değildir. Bu sonuç, curcuminin apoptotik etkisinin ortaya çıkmasında muhtemelen ek başka mekanizmaların da (kaspazlar, NF- κ B, p53, c-Myc, COX-2, JAK ve STAT) Bcl-2 protein ekspresyonu ile birlikte rol oynamasına bağlı olabilir.

Daha önce yapılan bir çalışmada curcuminin oral olarak kullanımda etkinliğini daha çok gastrointestinal sistemde gösterdiği saptansa da (129), başka çalışmalarda oral kullanımın güvenli ve etkili olduğu bildirildi. Limtrakul P ve ark farelerin yemlerine koyarak 115mg/kg/gün dozunda 3 ay süre ile ağızdan curcumin uygulayarak herhangi bir toksik etkiye ulaşmadıklarını ve kanserli hücrelerde apoptosis oluştuğunu bildirdiler (11). Biz de çalışmamızda curcumini noninvaziv bir uygulama şekli olarak ağızdan vermeyi tercih ettik. Bu araştırmacıların bulguları ile uyumlu olarak çalışmamızda kontrol grubu ile sadece curcumin uyguladığımız grup arasında apoptotik hücre sayısının değişmediğini saptadık ($p=0.448$). Bax ve Bcl-2 protein ekspresyonları da bu iki grup arasında farklı değildi (sırasıyla $p=0,602$ $p=0,242$). Bu sonuç göstermektedir ki, bizim uyguladığımız doz ve sürede ağızdan alınan curcumin kanserli hücrelerde istediğimiz apoptotik etkiyi oluştururken, normal doku üzerine herhangi bir apoptotik/antiapoptotik etki yapmamıştır. Bu da curcumin tedavisinin güvenli olabileceğini göstermektedir.

Youngjoo Kwon ve arkadaşları yaptıkları çalışmada curcuminin kolon kanserli farklı yaş gruplarındaki sıçanlarda etkisini araştırdılar. Orta yaş grubundaki sıçanlarda curcuminin apoptotik etki göstermediği, diğer yaş gruplarında ise apoptotik etki gösterdiği sonucuna vardılar (184). Bizim çalışmamızdaki sıçanlar da orta yaşlıdır. Ancak biz Youngjoo Kwon ve ark çalışmasındaki sonuçlara zıt olarak curcuminin orta yaş sıçanlarda güçlü apoptotik etki gösterdiğini saptadık.

Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, oluşturduğumuz deneysel fibrosarkom modelinde curcuminin normal hücrelere zarar vermeden kanser hücreleri üzerine apoptotik etkili olduğu görülmüştür. Yapılan bir çok çalışmada bu etkisinin Bax ve Bcl-2 proteinleri üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir. Biz tedavi grubumuzda, apoptotik etki ile uyumlu olarak Bax proteini ekspresyonunun değişmediğini, Bcl-2 proteinini ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte belirgin şekilde azaldığını gösterdik. Bu bulgular bize curcumin tedavisinin fibrosarkom hücreleri üzerinde gösterdiği güçlü apoptotik etkide Bcl-2 proteinlerinin de rolü olmakla birlikte muhtemelen apoptotik yolaktaki diğer proteinlerin (p53, c-Myc, NF- κ B, kaspazlar gibi) de katkısıyla bu etkinin oluşmuş olabileceğini ve/veya bizim uyguladığımız doz ve sürede curcuminin Bcl-2 protein düzeyini azaltmada yeterli olmamış olabileceğini düşündürmektedir. Bundan sonraki çalışmalarda curcuminin

daha yüksek dozlarını kullanarak Bcl-2 düzeyindeki etkinin ve ayrıca NF-κB kaspaz, fas ligand gibi diğer apoptoza aracılık eden moleküllerin de nasıl değiştiği araştırılmalıdır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada sıçanlara 3 MC verilerek oluşturulan fibrosarkom modelinde gavaj yoluyla verilen curcuminin apoptotik etkisi ve bu etkinin Bcl-2 ve Bax proteinleri üzerinden olup olmadığı araştırıldı.

Çalışmamızda curcuminin fibrosarkom dokusu üzerine güçlü apoptotik etki yaptığı gösterildi. Bax protein ekspresyonunun curcumin tedavisi ile değişmediği, Bcl-2 protein ekspresyonunun curcumin tedavisi ile belirgin şekilde azaldığı saptandı. Bulgularımıza göre, curcumin, fibrosarkom dokusu üzerinde güçlü apoptotik etki oluşturan bir doğal moleküldür ve apoptotik etkisinin ortaya çıkmasında Bcl-2 proteini rol oynamaktadır. Bizim çalışmamızda, curcumin normal doku üzerine herhangi bir apoptotik/antiapoptotik etki oluşturmaz. Dolayısıyla bulgularımız curcumin kullanımının güvenli olabileceğini gösterdi.

Çalışmamızdaki curcuminin bu olumlu etkilerine karşın, curcuminin fibrosarkom tedavisinde apoptotik etkisinden yararlanmak üzere kullanılabileceğini söylemek için henüz çok erkendir.

Literatürde, fibrosarkomda curcuminin apoptotik etkisini araştıran sadece iki çalışma bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda curcumin sıçan başına yalnızca 200 mg dozunda ve on gün süreyle uygulandı. Bulgularımız yalnızca bu doz ve bu süreye ait bulgulardır. Bundan sonraki aşamada curcuminin farklı dozlarda ve farklı sürelerde kullanımı ile yapılacak ileri çalışmalarda curcuminin normal dokuda nekroz yapmadan apoptoz oluşturduğu ideal doz aralıkları saptanabilir.

Kanser tedavisinde halen yaygın olarak kullanılmakta olan kemoterapi ve radyoterapi yöntemleri apoptozu uyararak etki göstermektedirler. Bu yöntemlerin hem tedavi etkinliğinin kısıtlılığı ve hem de normal hücrelerde de apoptoz oluşturmak gibi zararlı yan etkileri nedeniyle ideal tedavi yöntemleri olduklarını söylemek mümkün değildir. Curcumin gibi apoptotik etkili bir molekülün radyoterapi veya kemoterapiye ek olarak kullanımı apoptotik etkinin güçlenmesini ve kemoterapi veya

radyoterapi dozunun azaltılabılmesini sağlayarak tedavide bir alternatif sunabilir. Bu açıdan, curcuminin radyoterapiye ve kemoterapiye eklenerek fibrosarkom üzerine apoptotik etkinin incelenmesi ileri aşamalarda bir diğer araştırma alanı olarak önerilebilir.

7. ÖZET

DENEYSEL FİBROSARKOM MODELİNDE CURCUMİN'İN APOPTOZ ÜZERİNE ETKİSİ

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, 09100-Aydın

Fibrosarkom, görülme sıklığı %2-3 olan ve sağ kalım oranı %50 olarak bildirilen bir yumuşak doku sarkomudur. Tedavide kullanılan lokal ekzisyon, radyoterapi ve kemoterapi yöntemleri her zaman başarılı olamayabilmektedir. Apoptoz programlanmış hücre ölümüdür. Bcl-2 ve bax, apoptoza aracılık eden bcl ailesine ait proteinlerdir. Bax proteini apoptotik, Bcl-2 proteini antiapoptotik etkiye sahiptir. Kanser tedavisinde kanserli hücrelerin apoptoza götürülerek temizlenmesi temel tedavi stratejisini oluşturmaktadır. Curcumin son yıllarda apoptotik etkisi ve bu etki nedeniyle kanserde tedavi amaçlı kullanımı çok araştırılan doğal bir moleküldür. Bu çalışmanın amacı; curcuminin fibrosarkom üzerine apoptotik etkisini ve Bcl-2, Bax proteinlerinin ekspresyonlarının nasıl etkilendiğini incelemektir.

Çalışmaya 24 adet Wistar Albino erkek sıçan alındı. Sıçanlar kontrol (n=8), fibrosarkom (n=6), fibrosarkom+curcumin tedavi (n=5), sadece curcumin grubu (n=5) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Fibrosarkom ve fibrosarkom+curcumin tedavi gruplarına 3-metilkolantren (3-MC) uygulayarak fibrosarkom modeli oluşturuldu. Daha sonra fibrosarkom+curcumin tedavi grubuna ve sadece curcumin grubuna gavaj yoluyla 10 gün sıçan başına 200 mg curcumin verildi. Apoptozun saptanması için doku kesitlerinde tunel yöntemi kullanılarak apoptotik hücre sayımı yapıldı. Bcl-2 ve bax proteinlerinin ekspresyonları Western blot ve immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak gösterildi.

Apoptotik hücreler fibrosarkom+curcumin grubunda fibrosarkom grubuna göre anlamlı olarak artmış bulundu ($p=0.006$). Sadece curcumin uygulanan grup ve kontrol grubu arasında değişiklik olmadığı görüldü. ($p=0.448$). Fibrosarkomda curcumin tedavisinin Bcl-2 protein ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte belirgin şekilde azalttığı saptandı ($p=0.068$). Bax ekspresyonu ise tedavi ile değişiklik göstermedi ($p=0.223$).

Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, curcuminin fibrosarkom dokusu üzerine güçlü şekilde apoptotik etki yaptığını ve bu etkide bcl-2 ekspresyonunun rolü

olduğunu, ancak Bcl-2 ekspresyonundaki azalmanın apoptotik hücre sayısındaki artış kadar güçlü olmaması nedeniyle, muhtemelen curcuminin apoptotik etkisinde farklı mekanizmaların da rol oynuyor olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, curcumin normal dokuda apoptotik/antiapoptotik etki veya nekroz oluşturmamıştır. Curcuminin, fibrosarkomda tedavi amaçlı kullanımına yönelik farklı dozlar ve sürelerde ve ayrıca radyoterapi ve kemoterapi ile de kombine kullanıldığı ileri çalışmalar yapılması gereklidir.

Anahtar Sözcükler:

Apoptoz, fibrosarkom, Bcl-2, Bax, Curcumin.

8. SUMMARY

THE EFFECT OF CURCUMIN ON APOPTOSIS IN EXPERIMENTAL FIBROSARCOMA MODEL

Adnan Menderes University, Medical Faculty, Biochemistry AD, 09100-Aydın

Fibrosarcoma is a soft tissue sarcoma. It is reported that the density of visibility is %2-3 and the rate of remain alive is %50. The methods of local removal, radiotherapy and chemotherapy which are used in treatment can't be successful everytime. Apoptosis is a cell death which is programmed. Bcl-2 and Bax are proteins which belong to Bcl family and they mediate apoptosis. Bax protein has apoptotic effect and Bcl-2 protein has antiapoptotic effect. In cancer treatment, the clearance of taking cancerous cell to apoptosis composes the strategy of basic treatment. The fact that curcumin has apoptotic effect and its usage for the purpose of cancer treatment because of this effect is a natural molecule which has been searched in recent years. The aim of this study is investigation of apoptotic effect of curcumin on fibrosarcoma and whether expression of Bcl-2 and Bax proteins changed.

24 Wistar Albino male rats were taken in this study. Rats were divided into four groups: Control group (n=8), fibrosarcoma group (n=6), Fibrosarcoma + curcumin treatment group (n=5) and only curcumin group (n=5). Fibrosarcoma model was formed by applying 3-Methylcholantren (3-MC) to fibrosarcoma and fibrosarcoma + curcumin treatment groups. Then fibrosarcoma + curcumin treatment group and only curcumin group were given 200 mg curcumin for each rat via gavage for ten days. To fix apoptosis, apoptotic cell counting was done by being used TUNEL method in tissue sections. Expression of Bcl-2 and Bax proteins were fixed by being used Western Blot and immunohistochemical methods.

It was found that in comparison with fibrosarcoma group, apoptotic cell increased significantly in fibrosarcoma + curcumin group ($p=0.006$). It was seen that there was no difference between the group which was only applied for curcumin and control group ($p=0,448$). It was also seen that curcumin treatment reduced Bcl-2 protein expression importantly in fibrosarcoma ($p=0,068$). But it was not significant statistically. Bax expression not changed in fibrosarcoma + curcumin treatment group, comparison to fibrosarcoma group ($p=0,223$)

Results which we gained in our study show that curcumin has strong apoptotic effect on fibrosarcoma tissue, Bcl-2 expression plays part in this effect, but different mechanisms have an influence on apoptotic effect of curcumin because of decrease in Bcl-2 expression isn't as powerful as increase in apoptotic cell number. Besides, curcumin doesn't form apoptotic/antiapoptotic effect or necrosis in normal tissue. It is necessary that further studies must be done in different doses and periods with radiotherapy and chemotherapy and curcumin must be used in fibrosarcoma for the purpose of treatment in these further studies.

Keywords:

Apoptosis, fibrosarcoma, Bcl-2, Bax, curcumin.

9. KAYNAKLAR

1. Cummings MC, Winterford CM, Walker NI, Apoptosis Histology For Pathologists. 2.th ed. chapter 1: 3-21. Philadelphia, 1997.
2. Duke RC, Ojcius DM, Young JD. Cell suicide in health and disease. Scientific American. 1996 December; 48-55.
- 3 Parone PA, James D, Martinou JC. Mitochondria: regulating the inevitable. Biochimie. 2002; 84: 105-111
4. Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. Genome Biology. 2001; 2(7): 3009.1-3009.10
5. Sa G, Das T. Anti cancer effect of curcumin: Cycle of life and death. Cell Division 2008; 3:14
6. Pari L, Tewas D, Eckel J. Role of curcumin in health and disease Archives of Physiology and Biochemistry, April 2008; 114(2): 127–149
7. Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B. Moleküler Biyoloji , Nobel yayınevi 2007; sayfa 423-443.
8. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. Blood 1992; 80(4): 879-86.
9. Fukuda N, Saitoh M, Kobayashi N, Miyazono K. Execution of BMP-4-induced apoptosis by p53-dependent ER dysfunction in myeloma and B-cell hybridoma cells Oncogene 2006; 25: 3509–3517.
10. Perego P, Giarola M, Righetti SC, Supino R, Caserini C, Delia D, Pierotti MA, Miyashita T, Reed JC, Zunino F. Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems Cancer Res. 1996; 56(3): 556-62.
11. Limtrakul P, Lipigorngoson S, Namwong O, Apisariyakul A, Dunn FW Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice Cancer Lett. 1997; 116(2): 197-203.
12. Lowe SW, Lin WA. Apoptosis in cancer. Carcinogenesis. 2000; Mar;21(3):485-95
13. Singh AK, Sidhu GS, Deepa T, Maheshwari RK Curcumin inhibits the proliferation and cell cycle progression of human umbilical vein endothelial cell. Cancer Lett. 1996; 107(1): 109-15.

14. Anto RJ, Maliekal TT, Karunagaran D. L-929 cells harboring ectopically expressed RelA resist curcumin-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2000; 275(21): 15601-4.
15. López-Lázaro M. Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. *Mol Nutr Food Res.* 2008; 52(1): 103-27.
16. Kumar V, Cotran R, Robbins S. *Temel Patoloji (Çeviri)*. Çev. ed. Çevikbaş U. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2000; 133-74.
17. Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, Schnekenburger M, Morceau F, Henry E, Dicato M, Diederich M. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin *Cancer Lett.* 2005;223 (2):181-90.
18. Huether S, Mc Cance K. *Understanding Pathophysiology*, 3rd ed. USA, Mosby, 2004: 244-72.
19. Onat T, Emerk K, Sözmen EY. *İnsan Biyokimyası*. Palme yayıncılık 2006.....
20. Vahakangas KH, Bennett WP, Castren K. P53 and K-ras mutations in lung cancers from former and never- smoking women. *Cancer Res* 2001; 1: 4350-6.
21. Gressani KM, Rollins LA, Kabler SL, Cline JM, Miller MS. Induction of mutations in Ki ras and INK4a in liver tumors of mice exposed in utero to 3 methylcholantren. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1045-52.
22. Horio Y, Chen A, Rice P, Roth J, Malkinson AM, Schrupp DS. Ki ras and p53 mutations are early and late events, respectively, urethane induced pulmonary carcinogenesis in A/J mice. *Mol Carcinog.* 1996; 17: 217-23.
23. Miller MS, Gressani KM, Kabler SL, Townsend AJ, Malkinson AM, O'Sullivan MG. Differential sensitivity to lung tumorigenesis following transplacental exposure of mice to polycyclic hydrocarbons, heterocyclic amines and lung tumor promoters. *Exp Lung Res* 2000; 26: 709-30.
24. Miller MS, Leone-Kabler S., Rollins LA. Molecular pathogenesis of transplacentally induced mouse lung tumors. *Exp Lung Res* 1998; 24: 557-77
25. Slavson D, Cooper BJ. *Mechanisms of Disease*, 3rd ed, USA, Mosby, 2002: 298-309
26. Andrews Lab Research

27. Sugimura T. Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis* 2000; 21: 387-95.
28. Yenerman M ed. Genel patoloji İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi,1994; 1362-77.
29. Mumford JL, Helmes CT, Lee XM, Seidenberg J, Nesnow S. Mouse skin tumorigenicity studies of indoor coal and wood combustion emissions from homes of residents in Xuan Wei, China with high lung cancer mortality. *Carcinogenesis* 1990; 11: 397-403.
30. Gressani KM, Leone-Kabler S, O'Sullivan MG, Case LD, Malkinson AM, Miller MS. Strain-dependent lung tumor formation in mice transplacentally exposed to 3-methylcholanthrene and post-natally exposed to butylated hydroxytoluene *Carcinogenesis*. 1999; 20(11): 2159-65.
31. Wessner LL, Fan M, Schaeffer DO, McEntee MF, Miller MS. Mouse lung tumors exhibit specific Ki-ras mutations following transplacental exposure to 3-methylcholanthrene. *Carcinogenesis*. 1996; 17(7): 1519-26.
32. Kayaalp O ed. Tibbi Farmakoloji Ankara, Güneş kitabevi. 1994; 303-85.
33. Balmain A, Harris CC. *Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. Carcinogenesis* 2000; 21: 371-77.
34. Williams GM, Iatropoulos MJ, Jeffrey AM Thresholds for the effects of 2-acetylaminofluorene in rat liver 1: *Toxicol Pathol*. 2004; 32.
35. Petersen BL, Engel AM, Juul-Madsen H, Mouritsen S, Svane I, Werdelin O Tumors developing in nude mice express unusually large amounts of MHC class I antigens. *APMIS*. 1991; 99(12): 1111-9.
36. Sezgin İ ed. Klinik Genetik. Sivas, Cumhuriyet Üniversitesi yayınları 1998; 217-48.
37. Rihn BH, Bottin MC, Coulais C, Rouget R, Monhoven N, Baranowski W, Etorh A, Keith G Genotoxicity of 3-methylcholanthrene in liver of transgenic big Blue mice *Environ Mol Mutagen*. 2000; 36(4): 266-73.
38. Rabergh CM, Vriolijk NH, Lipsky MM, Chen TT. Differential expression of two CYP1A genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 165: 195-205.
39. Leone-Kabler S, Wessner LL, McEntee MF, D'Agostino RB Jr, Miller MS. Ki-ras mutations are an early event and correlate with tumor stage in transplacentally-induced murine lung tumors. *Carcinogenesis*. 1997 Jun; 18(6): 1163-8.

40. Huggins C, Grand LC. Sarcoma Induced Remotely in Rats Fed Methylcholanthrene. *Cancer Research*, 1963; 23.
41. Fish DC, Demarais JT, Djurickovic DB, Huebner RJ Prevention of 3-methylcholanthrene-induced fibrosarcomas in rats pre-inoculated with endogenous rat retrovirus *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981; 78(4): 2526-7.
42. Devens BH, Lundak RL, Byus CV. Induction of murine fibrosarcomas by low dose treatment with 3-methylcholanthrene followed by promotion with 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Cancer Lett*. 1984; 21(3): 317-24.
43. Patiroğlu T, Sahin G, Kontaş O, Uzüm K, Saraymen R. Protective effect of magnesium supplementation on experimental 3-methyl cholanthrene-induced fibrosarcoma and changes in tissue magnesium distribution during carcinogenesis in rats. *Biol Trace Elem Res*. 1997; 56(2): 179-85.
- 44 Apoptoz ders notları, Erişim: http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptoz_ders_notu. (Erişim tarihi 5.5.2008).
45. Gültekin N, Karaoğlu K, Küçükateş E. Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. *Türk Kardiyoloji Derneği Arş*. 2008; 36: 120-130.
46. Öztürk F. Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2002; 9(2): 143-148.
- 47 Turgut B, Demir T, Celiker Ü. Oftalmolojide Apoptoz. *Fırat Tıp Dergisi* 2006; 11(1): 6-11.
48. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozin önemi *Toraks Dergisi* 2001; (1): 91-95.
49. Nakai M, Qin Z. H, Chen J. F, Wang Y, Chase T. N. Kainic Acid-Induced Apoptosis İn Rat Striatum Is Associated With Nuclear Factor-Kb Activation. *J. Neurochem*, Vol. 74, No. 2, 2000.
50. Hubpages.com/hub/cell_biology (Erişim tarihi 15.4.2009).
51. Humphreys RC, Halpern W. Trail receptors: targets for cancer therapy. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2008; 615: 127–58.
- Jesenberger V, Jentsch S. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Feb; 3(2): 112-21.
- 52 Simon H.-U, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction *Apoptosis* 2000; 5: 415–418.

53. Pelengaris S, Khan M, Evan G. c-MYC: more than just a matter of life and death *Nat Rev Cancer*. 2002 Oct; 2(10): 764-76.
54. Kanamori H, Krieg S, Mao C, Di Pippo VA, Wang S, Zajchowski DA, Shapiro DJ. Proteinase, Inhibitor 9, an Inhibitor of Granzyme B-mediated Apoptosis is a Primary Estrogen-inducible gene in Human Liver Cells. *J. Biol. Chem*. 2000; 275: 5867-5873.
55. Yılmaz N, Pençe S, Kaspazlar Derleme İbni Sina Tıp Dergisi 7. sayı 2002 Sayfa 127-145.
56. Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 420-430.
57. Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*.1986; 47(6): 921-8.
58. Shishodia S, Aggarwal BB. Nuclear Factor- κ B: a friend or a foe in cancer? *Biochemical Pharmacology* 2004; 68: 1071-1080.
59. Kühnel F, Zender L, Paul Y, Tietze MK, Trautwein C, Manns M, Kubicka S. NFkappaB mediates apoptosis through transcriptional activation of Fas (CD95) in adenoviral hepatitis *J Biol Chem*. 2000 3; 275(9): 6421-7.
60. Beg AA, Sha WC, Bronston RT, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kB. *Nature* 1995; 376(6536):167-170.
- 61 Shishir Shishodia, Bharat B. Aggarwal. Nuclear factor-kB: a friend or a foe in cancer?. *Biochemical Pharmacology* 68 (2004) 1071–1080
62. Sivula A, Talvensaaari-Mattila A, Lundin J, Joensuu H, Haglung C, Ristimaki A, Turpeenniemi-Hujanen T. Association of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2005; 89: 215-220.
63. Ranger GS, Salhab M, Mokbel K. The role of cyclooxygenase-2 in breast cancer: review. *Breast Cancer Res Treat*. 2007.
64. Tiguert R, Lessard A, So A, Fradet Y. Prognostic markers in muscle invasive bladder cancer. *World J Urol*. 2002; 20: 190-195 (49).
65. Singh-Ranger G, Mokbel K. The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in breast cancer and implications of COX-2 inhibition. *Eur J Surg Oncol*. 2002; 28: 729-737.

66. Singh-Ranger G, Salhab M, Mokbel K. The role of cyclooxygenase-2 in breast cancer: review. *Breast Cancer Res Treat* 2007.
67. www.2.unil.ch/cepo_research/project.html (Erişim tarihi 15.4.2009).
68. Gwyn TW, Cristopher AS .Molecular regulation of apoptosis. Genetic controls on cell death. *Cell*. 1993; Vol. 74,777-79, September 10.
69. Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans*. 2001 Nov; 29(Pt 6): 684-8.
70. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis the p53 network *J Cell Sci*. 2003 Oct 15;116(Pt 20): 4077-85.
71. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research* 1994 ; 54 :4855-4878.
72. www.weizmann.ac.il/.../apoptotic_pathways.html(Erişim tarihi 15.4.2009).
73. Stanley J. Korsmeyer. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: Regulators of cell death. *Blood*, 1992; Vol 80, no.4: 879-86.
74. www.dwalab.ca/research/apoptosis/index.html(Erişim tarihi 15.4.2009).
75. Sattler M, Liang H, Nettesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, Yoon HS, Shuker SB, Chang BS, Minn AJ, Thompson CB, Fesik SW. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*. 1997 Feb 14; 275(5302): 983-6.
76. Öztürk M. Programlı Diyabet ve Apoptoz Hücre ölümü sempozyumu kitabı <http://www.ctf.edu.tr/ctftbiyo/apoptosis>(Erişim tarihi 15.4.2009).
- 77.Ogata Y, Takahashi M. Bcl-x_L as an Antiapoptotic Molecule for Cardiomyocytes *Drug News Perspect*. 2003 Sep; 16(7): 446-52.
78. Tsujimoto Y, Finger L R, Yunis J. Cloning of the chromosome brake point of neoplastic B cells with thet (14,18) chromosome translocation.*Science* 1989; 226:1097-9.
79. Pezzella F, Tse AG, Cordell JL, Pulford KA, Gatter KC, Mason DY Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation

Am J Pathol. 1990 Aug; 137(2): 225-32.

80. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*. 1998 Dec 24;17(25): 3247-59.

81. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis *Oncogene*. 2003 Nov 24; 22(53): 8590-607.

82. Fakler M, Loeder S, Vogler M, Schneider K, Jeremias I, Debatin KM, Fulda S. Small molecule XIAP inhibitors cooperate with TRAIL to induce apoptosis in childhood acute leukemia cells and overcome Bcl-2-mediated resistance. *Blood*. 2009 Feb 19;113(8):1710.

83. www.celldeath 2006(Erişim tarihi 15.4.2009).

84. Perego P, Giarola M, Righetti SC, Supino R, Caserini C, Delia D, Pierotti MA, Miyashita T, Reed JC, Zunino F. Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems. *Cancer Res*. 1996 Feb 1; 56(3): 556-62.

85. Knudson CM, Johnson GM, Lin Y, Korsmeyer SJ Bax Accelerates Tumorigenesis in p53-deficient Mice. *Cancer Research*. 61, 659–665, January 15, 2001.

86. Yin CY, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Van Dyke T. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature*, 1997; .385: 637–640.

87. Miyashita T, Reed JC. Tumor Suppressor p53 Is a Direct Transcriptional Activator of the Human bax Gene. *Cell*, Vol. 1995; 80; 293-299.

88. Han J, Sabbatini P, Perez D, Rao L, Modha D, White E. The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *GenesDev*. 1996; 10:461–477.

89. Shibata M, Liu M, Knudson MC, Shibata E, Yoshidome K, Bandey T, Korsmeyer SJ, Green JE. Haploid loss of bax leads to accelerated mammary tumor development in C3(1)/SV40-TAg transgenic mice: reduction in protective apoptotic response at the preneoplastic stage. *The EMBO Journal*, 1999; Vol.18 No.10: 2692–2701.

90. Yamamoto H, Itoh F, Fukushima H., Adachi Y, Itoh H, Hinoda Y, Imai K. Frequent Bax frameshift mutations in gastric cancer with high but not low microsatellite instability. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 1999; 18: 103–106

92. Gil J, Yamamoto H, Zapata JM, Reed JC, Perucho M Impairment of the proapoptotic activity of Bax by missense mutations found in gastrointestinal cancers. *Cancer Res.* 1999 May 1;59(9):2034-7.
93. Krajewski S, Blomqvist C, Franssila K, Krajewska M, Wasenius VM, Niskanen E, Nordling S, Reed JC Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma *Cancer Res.* 1995 Oct 1;55(19):4471-8
94. Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Wang HG, Irie S, Fong L, Reed JC. Immunohistochemical analysis of in vivo pattern of Bcl-X expression. *Cancer Res.* 1994 Nov 1;54(21):5501-7
95. Tai YT, Lee S, Niloff E, Weisman C, Strobel T, Cannistra SA. BAX protein expression and clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 1998 Aug;16(8): 2577-8.
96. Knudson CM, Johnson GM, Lin Y, Korsmeyer SJ Bax Accelerates Tumorigenesis in p53-deficient Mice. *Cancer Research.* 61, 659–665, January 15, 2001.
97. Jin C, Reed JC Yeast and apoptosis *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 ;3(6):453-9.
98. ZHANG JIAN HUA, MING XU DNA fragmentation in apoptosis *Cell Research* (2000),10, 205-211
99. Suen DF, Norris KL, Youle RJ, Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev.* 22(12), 1577–90, 2008
100. Kültürsay H, Kayıkçıoğlu M. Apoptoz ve kardiyovasküler hastalıklar *Anadolu Kardiyoloji Dergisi* 2002; 4: 323-329
101. Solomon LA, Ali S, Banerjee S, Munkarah AR, Morris RT, Sarkar FH Sensitization of ovarian cancer cells to cisplatin by genistein: the role of NF-kappaB *J Ovarian Res.* 2008 Nov 24;1(1):9
102. Ji L, Zhang G, Uematsu S, Akahori Y, Hirabayashi Y Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death by natural ceramide, *FEBS Letters*, 358: 211-214. 1995
103. Champion RT, Burton JL, Ebling FJG. *Textbook of dermatology fifth edition*, volume 3, Oxford Blackwell Scientific publications, 2080-2081.
104. AKSU G, AĞIR H Yumuşak doku sarkomlarının tedavisinde radyoterapinin rolü 2007, Cilt 22, Sayı 2, 095-103

105. Fiore M, Miceli R, Mussi C, Lo Vullo S, Mariani L, Lozza L, Collini P, Olmi P, Casali PG, Gronchi A. Dermatofibrosarcoma protuberans treated at a single institution: a surgical disease with a high cure rate *J Clin Oncol*. 2005 Oct 20;23(30):7669-75
106. McArthur G. Dermatofibrosarcoma protuberans: recent clinical progress. *Ann Surg Oncol*. 2007 Oct;14(10):2876-86. Epub 2007 Jul 24.
115. Alok C Bharti, Bharat B Aggarwal. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochemical Pharmacology* 64; 883-888.2002
107. Aggarwal BB, Shishodia S: *Biochem Pharmacol*, 71(10):1397-421. 2006
108. Human Blog Curcumin and omega-3 Compound May Fight Pancreatic Cancer Jan 26 2009
109. Pandya U, Saini MK, Jin GF, Awasthi S, Godley BF, Awasthi YC. Dietary curcumin prevents ocular toxicity of naphthalene in rats. *Toxicol Lett* 2000; 115(3): 195-204.
110. Limtrakul P, Lipigorngoson S, Namwong O, Apisariyakul A, Dunn FW. Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice. *Cancer Lett* 1997;116(2):197-203.
111. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol*. 2007;595:1-75
112. Anto JR, Mukhopadhyay A., Dennig K., Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl. *Carcinogenesis*. 2002; 23: 143-150).
113. Pandya U, Saini MK, Jin GF, Awasthi S, Godley BF, Awasthi YC. Dietary curcumin prevents ocular toxicity of naphthalene in rats. *Toxicol Lett* 2000; 115(3): 195-204
114. Jaruga E, Salvioli S, Dobrucki J, Chrul S, Bandorowicz-Pikuła J, Sikora E, Franceschi C, Cossarizza A, Bartosz G. Apoptosis-like, reversible changes in plasma membrane asymmetry and permeability, and transient modifications in mitochondrial membrane potential induced by curcumin in rat thymocytes *FEBS Lett*. 1998 Aug 21;433(3): 287-93

- 115 Ireson, C. R., Jones, D. J., Orr, S., Coughtrie, M. W. Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine, *Cancer Epidemiol. Biomarkers* 2002, 11, 105–111.
116. López-Lázaro M. Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: Considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. *Mol. Nutr. Food Res*, 52, 103 –127,2008.
117. Sharma RA., Euden SA., Platton SL, Cooke DN., Phase I clinical trial of oral curcumin: Biomarkers of systemic activity and compliance, *Clin. Cancer Res.* 10, 6847–6854. 2004.
118. Cheng, A. L., Hsu, C. H., Lin, J. K., Hsu, M. M., et al., Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions, *Anticancer Res.* 2001, 21, 2895 –2900
119. Thiyagarajan M, Sharma SS. Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats. *Life Sci* 2004;74(8):969-85.
120. Bala K, Tripathy BC, Sharma D. Neuroprotective and anti-ageing effects of curcumin in aged rat brain regions. *Biogerontology* 2006;7:81-9.
121. Tripathy, Deepak Sharma. Neuroprotective and anti-ageing effects of curcumin in aged rat brain regions. *Biogerontology* 7:81-9.
122. Anto RJ, Kuttan G, Babu D and et al. Anti-tumour and free radical scavenging activity of synthetic curcuminoids. *Int J Pharma* 1996; 131: 1-7.
123. Piper JT, Singhal SS, Salameh MS, Torman RT, Awasthi YC, Awasthi S. Mechanisms of anticarcinogenic properties of curcumin: the effect of curcumin on glutathione linked detoxification enzymes in rat liver. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998 Apr;30(4): 445-56
124. Cao J., Jia L., Zhou Hui-Min, Liu Y, Zhong Lai-Fu . Mitochondrial and Nuclear DNA Damage Induced by Curcumin in Human Hepatoma G2 Cells. *Toxicological Sciences* 91(2), 476–483 (2006)
125. McNally SJ, Harrison EM, Ross JA, Garden OJ,. Curcumin induces heme oxygenase 1 through generation of reactive oxygen species, p38 activation and phosphatase inhibition. *International Journal Of Molecular Medicine* 19: 165-172,

2007

126. Arnab Banerjee, A. Kunwar, B. Mishra, K.I. Priyadarshini. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin. Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. *Chemico-Biological Interactions* 174 (2008) 134–139.

127. Khar A, Mubarek A, Parthasarathi BW and et al. Antitumour activity of curcumin is mediated through the induction of apoptosis AK-5 tumour cells. *FEBS Letters* 1999;445:165-8

128. Aggarwal S, Takada Y, Singh S, Myers JN, Aggarwal BB. Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappa B signaling. *Int J Cancer*. 2004;111:679-692

129. Choudhuri T., Pal S., Aggarwal ML., Das T., Sa G. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction *FEBS Lett*. 2002; 512: 334-340.

130. Pal S, Choudhuri T, Chattopadhyay S, Bhattacharya A., Datta GK., Das T., Sa G. Mechanism of curcumin induced apoptosis of Ehrlich's Ascites Carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 228 : 658-665.

131. Anto JR, Mukhopadhyay A., Dennig K., Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl. *Carcinogenesis*. 2002; 23: 143-150).

132. Ju-Hyung Woo, Young-Ho Kim, Yun-Jung Choi, Dae-Gon Kim, Kyung-Seop Lee, Jae Hoon Bae, Do Sik Min, Jong-Soo Chang, Yong-Jin Jeong, Young Han Lee, Jong-Wook Park, Taeg Kyu Kwon. Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-XL and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt. *Carcinogenesis* vol.24 no.7 pp.1199-1208, 2003

133. Villegas I, Sánchez-Fidalgo S, Alarcón de la Lastra C New mechanisms and therapeutic of curcumin for colorectal cancer *Mol. Nutr. Food Res*. 2008, 52, 1040 – 1061

134. Pari L, Tewas D., Eckel J. Role of curcumin in health and disease *Arch Physiol Biochem*. 2008 Apr;114(2):127-49.

135. Duvoix A., Blasius R., Delhalle S., Schnekenburger M., Morceau F., Henry E.,

Dicato M., Diederich M., Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin
Cancer Letters 8 June 2005 (Vol. 223, Issue 2, Pages 181-190)

136. Gautam SC, Xu YX, Pindolia KR, Janakiraman N, Chapman RA Nonselective inhibition of proliferation of transformed and nontransformed cells by the anticancer agent curcumin (diferuloylmethane). *Biochem Pharmacol.* 1998 Apr 15;55(8):1333-7.

137. Bhaumik S., Anjum R., Rangaraj N., Pardhasaradhi BV., Khar A. Curcumin mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves the production of reactive oxygen intermediates. *FEBS Lett.* 1999; 456(2): 311-4 (7).

138. Kuo ML, Huang TS, Lin JK. Curcumin an antioxidant and anti-tumour promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996; 95:95-100.).

139. Jaruga E, Bielak-Zmijewska A, Sikora E, Skierski J, Radziszewska E, Piwocka K, Bartosz G . Glutathione- independent mechanism of apoptosis inhibition by curcumin in rat thymocytes. *Biochem Pharmacol.* 1998; 56:961-965.).

140. Yi-Rong Chen, Guisheng Zhou, Tse-Hua Tan c-Jun N-terminal kinase mediates apoptotic signaling induced by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide. *Mol. Pharmacol.* 56:1271–1279; 1999 .),

141. Piwocka K, Jaruga E, Skierski J, Gradzka I, Effect Of Glutathione Depletion On Caspase-3 Independent Apoptosis Pathway Induced By Curcumin In Jurkat Cells *free Radical Biology & Medicine*, vol. 31, no. 5, pp. 670–678, 2001.

142. Sa G., Das T., Anti cancer effect of curcumin: Cycle of life and death, *Cell Division* 2008, 3:14).

143. Moon DO, Kim MO, Lee HJ, Choi YH, Park YM, Heo MS, Kim GY Curcumin attenuates ovalbumin-induced airway inflammation by regulating nitric oxide *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Oct 17;375(2):275-9.

144. Sreejayan MN, Rao MN. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J Pharm Pharmacol.* 1997;49:105-117

145. Thangapazham RL, Sharma A, Maheshwari RK Rajesh L. Thangapazham, Anuj Sharma, and Radha K. Maheshwari Multiple Molecular Targets in Cancer Chemoprevention by Curcumin *AAPS J.* 2006 Jul 7;8(3):
TheAAPS Journal 2006; 8 (3) Article 52).

146. López-Lázaro M. Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: Considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. *Mol Nutr Food Res*. 2008 Jun;52 Suppl 1:S103-27
147. Grandjean-Laquerriere A, Gangloff SC, Le Naour R, Trentesaux C, Hornebeck W, Guenounou M. Relative contribution of NF-kappaB and AP-1 in the modulation by curcumin and pyrrolidine dithiocarbamate of the UVB-induced cytokine expression by keratinocytes. *Cytokine*. 2002;18:168-177.
148. Thangapazham RL, Sharma A, Maheshwari RK. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin *AAPS J*. 2006 Jul 7;8(3)
149. Clària J, Romano M. Pharmacological intervention of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. Impact on inflammation and cancer *Curr Pharm Des*. 2005;11(26):3431-47
150. Du B, Jiang L, Xia Q, Zhong L. Synergistic inhibitory effects of curcumin and 5-fluorouracil on the growth of the human colon cancer cell line HT-29. *Chemotherapy*. 2006;52(1):23-8. *Chemotherapy*. 2006;52:23-28.
151. Atsumi T, Murakami Y, Shibuya K, Tonosaki K, Fujisawa S. Induction of cytotoxicity and apoptosis and inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression, by curcumin and its analog, alpha-diisoeugenol. *Anticancer Res*. 2005;25:4029-4036.
152. Lopez-Lazaro M, Willmore E, Jobson A, Gilroy KL, Curtis H, Padget K, Austin CA. Curcumin induces high levels of topoisomerase I- and II-DNA complexes in K562 leukemia cells. *J Nat Prod* 70: 1884-1888, 2007.
153. Singh AK, Sidhu GS, Deepa T, Maheshwari RK Curcumin inhibits the proliferation and cell cycle progression of human umbilical vein endothelial cell. *Cancer Lett*. 1996 Oct 1;107(1):109-15
154. Mehta K, Pantazis P, McQueen T, Aggarwal BB. Antiproliferative effect of curcumin (diferuloylmethane) against human breast tumor cell lines *Anticancer Drugs*. 1997 Jun;8(5):470-81.
155. Bahorun T, Neergheen V S., Cancer chemoprevention alternative strategies *IJMU*, Vol 2, No 2, Jul-Dec 2007
156. Lopez-Lazaro M Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: Considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and

- chemotherapeutic agent . Mol. Nutr. Food Res. 2008, 52, S103 –S127
157. Shishodia S, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Role of curcumin in cancer therapy Curr Probl Cancer. 2007 Jul-Aug;31(4):243-305
158. Mohan R, Sivak J, Ashton P, Russo LA, Pham BQ, Kasahara N, Raizman MB, Fini ME. Curcuminoids inhibit the angiogenic response stimulated by fibroblast growth factor-2, including expression of matrix metalloproteinase gelatinase B. J Biol Chem. 2000 Apr 7;275(14):10405-12.
159. Shim JS, Kim JH, Cho HY, Yum YN, Kim SH, Park HJ, Shim BS, Choi SH, Kwon HJ. Irreversible inhibition of CD13/aminopeptidase N by the antiangiogenic agent curcumin Chem Biol. 2003 Aug;10(8):695-704
160. Dorai T, Cao YC, Dorai B, Buttyan R, Katz AE. Therapeutic potential of curcumin in human prostate cancer. III. Curcumin inhibits proliferation, induces apoptosis, and inhibits angiogenesis of LNCaP prostate cancer cells in vivo Prostate. 2001 Jun 1;47(4):293-303
161.). Ramírez-Tortosa MC, Mesa MD, Aguilera MC, Quiles JL, Baró L, Ramirez-Tortosa CL, Martinez-Victoria E, Oral administration of a Turmeric extract inhibits LDL oxidation and has hypocholesterolemic effects in rabbits with experimental atherosclerosis. Atherosclerosis. 1999 Dec;147(2):371-8.
162. Shah BH, Nawaz Z, Pertani SA, Roomi A, Mahmood H, Saeed SA, Gilani AH. Inhibitory effect of curcumin, a food spice from turmeric, on platelet-activating factor- and arachidonic acid-mediated platelet aggregation through inhibition of thromboxane formation and Ca²⁺ signaling Biochem Pharmacol. 1999 Oct 1;58(7):1167
163. Aggarwal BB, Harikumar KB Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. Int J Biochem Cell Biol. 2009 Jan;41(1):40-59
164. Sajithlal GB, Chithra P, Chandrakasan G. Effect of curcumin on the advanced glycation and cross-linking of collagen in diabetic rats. Biochem Phanna 1998; 56:1607-1614
165. Kumar M. A, Krishna M In Vivo Modulation of Signaling Factors Involved in Cell

Survival Journal of Radiation Research, Vol. 45, 491- 495 (2004) .

166. Sawick B, Kasacka L, Chyczewski L, Sobolewski K. Preliminary evaluation of mast cells in rats with an experimental fibrosarcoma induced by 3-methylcholanthrene. *Folia Histochem Cytobiol.* 2001;39 Suppl 2:96-7

167. Numasaki, M., M. Watanabe, T. Suzuki, H. Takahashi, A. Nakamura, F. McAllister, T. Hishinuma, J. Goto, M. T. Lotze, J. K. Kolls, and H. Sasaki. 2005. IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J. Immunol.* 175: 6177–6189)

168. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., and Randall R.J.: Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193:265-275.)

169. Laemmli, 1970. Cleavage of structural proteins during the assemble, of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227:680

170. Marin MC, Fernandez A, Bick RJ, Brisbay S, Buja LM, Snuggs M, McConkey DJ, von Eschenbach AC, Keating MJ, McDonnell TJ. Apoptosis suppression by bcl-2 is correlated with the regulation of nuclear and cytosolic Ca²⁺. *Oncogene.* 1996 Jun 6;12(11):2259-66

171. Kazuhiro Kyokane,, Masafumi Ito2 Yoshiaki Sato, Kenji Ina, Takafumi Ando And Kazuo Kusugami *Journal Of Pathology*, Vol. 184: 382–389 (1998). Expression Of Bcl-2 And P53 Correlates With The Morphology Of Gastric Neoplasia

172. Chen, Y. R.; Zhou, G.; Tan, T. H. c-Jun N-terminal kinase mediates apoptotic signaling induced by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide. *Mol. Pharmacol.* 56:1271–1279; 1999)

173. 194 Bhattacharyya S, Mandal D, Saha B, Sen GS, Das T, Sa G Curcumin prevents tumor-induced T cell apoptosis through Stat-5a-mediated Bcl-2 induction. *J Biol Chem.* 2007 Jun 1;282(22):15954-64).

174. Sharmila Shankar and Rakesh K.Srivastava. Bax and Bak genes are essential for maximum apoptotic response by curcumin, a polyphenolic compound and cancer chemopreventive agent derived from turmeric, *Curcuma longa Carcinogenesis* vol.28 no.6 pp.1277–1286, 2007).

175. Satyendra Mishra, Neha Kapoor, A. Mubarak Alic, B. V. V. Pardhasaradhi, A. Leela Kumari, Ashok Khar, Krishna Misraa. Differential apoptotic and redox

regulatory activities of curcumin and its derivatives Free Radical Biology & Medicine 38 (2005) 1353– 1360.)

176. PAN Rui, QIU Sheng, LU Da-xiang and DONG Jun. Curcumin improves learning and memory ability and its neuroprotective mechanism in mice Chin Med J 2008;121(9):832-839 832).

177. Rana Anjum, Ashok Khar. Diferential regulation of apoptosis in AK-5 tumor cells by the proto-oncogene Bcl-2: presence of Bcl-2 dependent and independent pathways FEBS Letters 499 (2001) 166-170.

178. Curcumin induces apoptosis through mitochondrial hyperpolarization and mtDNA damage in human hepatoma G2 cells. Jun Cao , Yong Liu , Li Jia , Hui-Min Zhou , Ying Kong , Guang Yang , Li-Ping Jiang Qiu-Juan Li Lai-Fu Zhong. Free Radical Biology & Medicine 43 (2007) 968–975.)

179. Christine Syng-ai, A. Leela Kumari, and Ashok Khar Effect of curcumin on normal and tumor cells: Role of glutathione and bcl-2 Molecular Cancer Therapeutics 1105).

180. Shi M, Cai Q, Yao L, Mao Y, Ming Y, Ouyang G. Antiproliferation and apoptosis induced by curcumin in human ovarian cancer cells. Cell Biol Int. 2006 Mar;30(3):221-6.).

181. Kuo ML, Huang TS, Lin JK. Curcumin an antioxidant and anti-tumour promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. Biochim Biophys Acta 1996 Nov 15;1317(2):95-100 199

182. Liu B, Bai QX, Chen XQ, Gao GX, Gu HT Effect of curcumin on expression of survivin, Bcl-2 and Bax in human multiple myeloma cell line

183 Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2007 Aug;15(4):762-6).

184. Youngjoo Kwon, Bernadene A. Magnuson Age-related differential responses to curcumin-induced apoptosis during the initiation of colon cancer in rats Food and Chemical Toxicology 47 (2009) 377–385).

185. Shankar S, Srivastava RK Involvement of Bcl-2 family members, phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT and mitochondrial p53 in curcumin (diferulolylmethane)-induced apoptosis in prostate cancer. Int J Oncol. 2007 Apr;30(4):905-18

186. Ju-Hyung Woo, Young-Ho Kim, Yun-Jung Choi, Dae-Gon Kim, Kyung-Seop Lee, Jae Hoon Bae, Do Sik Min, Jong-Soo Chang, Yong-Jin Jeong, Young Han Lee, Jong-Wook Park and Taeg Kyu Kwon. Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-XL and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt. *Carcinogenesis* vol.24 no.7 pp.1199±1208, 2003).

187. Asser I. Ghoneim. Effects of curcumin on ethanol-induced hepatocyte necrosis and apoptosis: implication of lipid peroxidation and cytochrome c *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2009) 379:47–60).