



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**KOLOREKTAL TÜMÖRLERDE  
MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-9,  
NİTRİK OKSİT VE MALONDİALDEHİD  
KONSANTRASYONLARI ÜZERİNE  
MELATONİNİN  
ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. TÜLAY KAVAK

DANIŞMAN

Doç. Dr. L. Didem KOZACI

**AYDIN-2008**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**KOLOREKTAL TÜMÖRLERDE  
MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-9,  
NİTRİK OKSİT VE MALONDİALDEHİD  
KONSANTRASYONLARI ÜZERİNE  
MELATONİNİN  
ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. TÜLAY KAVAK

DANIŞMAN

Doç. Dr. L. Didem KOZACI

**AYDIN-2008**

Bu araştırma ADÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından TPF-07001  
sayı ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Bu araştırmanın planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında, beni destekleyen bilgi ve deneyimlerini aktaran tez danışmanım sayın Doç.Dr. L. Didem Kozacı'ya saygı ve şükranlarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim sırasında ilgi ve desteklerini gördüğüm, bilimsel konularda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Anabilim Dalımız Başkanı Sayın Prof.Dr. Çiğdem YENİSEY'e, Doç.Dr. Mustafa ALTINIŞIK, Sayın Doç.Dr. Aslıhan KARUL ve Sayın Yrd.Doç.Dr. Mukadder SERTER'e teşekkür ederim.

Hastaların seçimi ve kolonoskopi ile biyopsi materyallerinin alınması konusunda yardımlarını esirgemeyen Gastroenteroloji bilim dalı öğretim üyeleri Sayın Doç. Dr. Vahit YÜKSELEN ve Uzm. Dr. Adil COŞKUN'a, teşekkür ederim

HPLC ile analizlerin yapılması sırasında her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç.Dr. Cengiz GÖKBULUT'a, dokuların immünohistolojik incelemelerinde büyük destek veren patoloji anabilim dalı öğretim üyelerinden Sayın Doç.Dr. Nil ÇULHACI'ya, çalışmamın hücre kültürü aşamasında her türlü desteği veren ve bunaltıcı sorularımı içtenlikle cevaplayan, üniversitemiz Merkez Araştırma laboratuvarının tüm imkanlarını sunan Sayın Doç.Dr. Serhan SAKARYA'ya çok teşekkür ediyorum.

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum ve kendilerinden çok şey öğrendiğim tüm asistan arkadaşlarıma ve laboratuvardaki çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tezimin proje aşamasında maddi desteği sağlayan Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na teşekkür ederim.

Ayrıca canımın içi biricik kızım ve sevgili eşim; her zaman yanımda olmanız dileğiyle.....

Dr. Tülay KAVAK

## İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. KOLOREKTAL KANSER	4
2.1.1. Epidemiyoloji	4
2.1.2. İnsidans	4
2.1.3. Mortalite	5
2.1.4. Risk Faktörleri	5
2.1.4.1. Yaş	6
2.1.4.2. Aile Öyküsü	6
2.1.4.3. Adenomatöz Polipler-Kanser	7
2.1.4.4. İnflamatuvar Barsak Hastalığı (İBD)	7
2.1.4.5. Diğer Durumlar	7
2.1.5. Koruyucu Faktörler	7
2.1.5.1. Diyet	7
2.1.5.2. Folik Asit	8
2.1.5.3. Kalsiyum	8
2.1.5.4. Fiziksel Aktivite	8
2.1.5.5. Aspirin ve NSAİ İlaçlar	8
2.1.5.6. Hormon Replasman Tedavisi	9
2.1.5.7. HMG- CoA Redüktaz İnhibitörleri (statinler)	9
2.1.6. Kolorektal Kanserde Histopatoloji	9
2.1.6.1. Makroskopik Özellikler	9
2.1.6.2. Mikroskopik Özellikler	9
2.1.6.2.1 Adenokarsinom	10
2.1.6.2.2 Musinöz Adenokarsinom	10
2.1.6.2.3. Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom (linitis plastica)	10
2.1.6.2.4. Skuamöz diferansiasyon gösteren karsinom	10
2.1.6.2.5. Andiferansiye Karsinom	10
2.1.6.2.6. Küçük Hücreli Karsinom	11

2.1.6.2.7. Seyrek görülen kolorektal karsinomlar	11
2.1.6.2.8. Erken kolon karsinomu ( <i>Small Early Flat Carcinoma</i> )	11
2.1.7. Yerleşim	11
2.1.8. Evreleme	11
2.1.9. Tanı	12
2.1.10. Prognostik Parametreler	13
2.2. KANSER VE EKSTRASELLÜLER MATRİKS	14
2.3. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR	15
2.3.1. Genel Özellikleri	15
2.3.2. Sınıflandırma	16
2.3.3. Matriks Metalloproteinazların Yapısı	17
2.3.4. Matriks Metalloproteinaz Aktivitesinin Düzenlenmesi	19
2.3.5. Kanser Progresyonunda Proteinazların Rolü	22
2.4. KOLOREKTAL KANSER VE OKSİDATİF STRES	26
2.5. SERBEST RADİKALLER	27
2.5.1. Serbest Radikallerin Hasar Mekanizması	28
2.6. MALONDİALDEHİD (MDA)	30
2.6.1. MDA'nın Yapısı	31
2.6.2. MDA Metabolizması	32
2.7. NİTRİK OKSİT (NO <sup>•</sup> )	33
2.7.1. NO <sup>•</sup> Metabolizması	33
2.7.2. NO <sup>•</sup> Yapısı ve Özellikleri	34
2.7.3. Nitrik Oksit ve Kanser	37
2.8. ANTİOKSİDAN SİSTEMLER	37
2.9. MELATONİN	38
2.9.1. Gastrointestinal Melatonin	39
2.9.2. Melatonin ve Kanser	39
2.9.3. Melatonin Metabolizması	40
2.9.4. Melatoninin Biyolojik Etkileri	42
2.9.5. Melatoninin Antioksidan Etkisi	42
2.9.6. Oksidatif Stres ve Melatonin	46
2.9.7. Melatoninin Etki Yerleri	47
2.9.8. İnsanda Melatonin Üretimi	48
2.10. APOPTOZİS	48
2.10.1. Apoptozis ve Tarihçesi	50

2.10.2. Apoptotik Hücre Ölümünün Aşamaları	50
2.10.3. Apoptozda Biyokimyasal Değişiklikler	50
2.10.4. Morfolojik Değişiklikler	51
3. GEREÇ VE YÖNTEM	54
3.1. HASTALARIN BELİRLENMESİ VE BİYOPSİ MATERYALLERİNİN ALINMASI	54
3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI	54
3.3. APOPTOTİK/ NORMAL HÜCRE TAYİNİ	56
3.4. DOKUDA VE HÜCRE KÜLTÜR ORTAMLARINDA PROTEİN TAYİNİ	58
3.5. DOKUDA VE HÜCRE KÜLTÜR ORTAMLARINDA NİTRİK OKSİT ÖLÇÜMÜ	58
3.6. DOKUDA VE HÜCRE KÜLTÜR ORTAMLARINDA MDA ÖLÇÜMÜ	60
3.8. DOKULARIN MMP-9 YÖNÜNDEN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELENMESİ	62
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	64
BULGULAR	65
4.1. APOPTOTİK HÜCRELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ	66
4.2. CACO-2 HÜCRELERİNDE MELATONİNİN MDA YAPIMI ÜZERİNE ETKİSİ	66
4.3. CACO-2 HÜCRELERİNDE MELATONİNİN NO YAPIMI ÜZERİNE ETKİSİ	67
4.4. CACO-2 HÜCRELERİNDE MELATONİNİN MMP-9 YAPIMI ÜZERİNE ETKİSİ	68
4.5. BİYOKİMYASAL PARAMETRELER ARASINDAKİ KORELASYONLAR	69
4.6. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME SONUÇLARI	70
5. TARTIŞMA	74
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	80
ÖZET	82
SUMMARY	84
KAYNAKLAR	86

## TABLO DİZİNİ

<b>Tablo I</b>	Tümörlerde Duke's evrelendirmesi	11
<b>Tablo II</b>	Tümörlerin TNM klinik sınıflama kriterleri	12
<b>Tablo III</b>	MMP'lerin sınıflandırılması	17
<b>Tablo IV</b>	Deney ve kontrol gruplarında uygulanan melatonin dozları	56
<b>Tablo V</b>	Deney ve kontrol gruplarında Normal/apoptotik hücre sayıları	66

## ŞEKİL DİZİNİ

<b>Şekil 1</b>	Kolorektal kanserlerin kolonda görülme oranları	5
<b>Şekil 2</b>	Tümör gelişim ve yayılım aşamaları	15
<b>Şekil 3</b>	MMP enzimlerinin moleküler yapısı	18
<b>Şekil 4</b>	MMP enzim aktivitesinin düzenlenmesi	20
<b>Şekil 5</b>	MMP'ler için hücre yüzeyi ile ilişkili aktivasyon kaskadı	21
<b>Şekil 6</b>	Tümör ve metastaz gelişiminde MMP'lerin rolü	23
<b>Şekil 7</b>	Oksidatif Stres	26
<b>Şekil 8</b>	MDA'nın kimyasal yapısı	31
<b>Şekil 9</b>	<i>İn vivo</i> MDA katabolizmasının potansiyel yolları	32
<b>Şekil 10</b>	L-argininden nitrik oksit (NO) sentezi	34
<b>Şekil 11</b>	Melatoninin yapısı	38
<b>Şekil 12</b>	Triptofandan melatoninin oluşum aşamaları	41
<b>Şekil 13</b>	Pineal bezde melatonin sentezinin kontrolü	42
<b>Şekil 14</b>	Melatoninin sistemik etkileri	43
<b>Şekil 15</b>	Apoptozis ve nekrozisin hücre sel görünümü	49
<b>Şekil 16</b>	Apoptotik cisimciklerin oluşumu	52
<b>Şekil 17</b>	NO standart grafiği	60
<b>Şekil 18</b>	10µM konsantrasyonundaki MDA standardının kromotogramı	62
<b>Şekil 19</b>	1mM melatonin uygulanmış hücre kültür ortamı örneğinin MDA analizinin kromotogramı	62
<b>Şekil 20</b>	Aktif MMP-9 standart grafiği	64



<b>Şekil 24</b>	Melatonin uygulanan CaCo-2 hücrelerinin ikinci ve üçüncü günlerdeki MDA düzeyleri arasındaki ilişki	70
<b>Şekil 25</b>	Melatonin uygulanan CaCo-2 hücrelerinde birinci gün sonunda NO düzeyleri ile ikinci gün sonundaki MDA düzeyleri arasındaki ilişki	71
<b>Şekil 26</b>	Melatonin uygulanan CaCo-2 hücrelerinde birinci gün sonunda NO düzeyleri ile üçüncü gün sonundaki MDA düzeyleri arasındaki ilişki	72

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AFMK</b>	N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinüramin
<b>APMA</b>	4-aminofenilmerkürük asetat
<b>BCA</b>	Bicinchoninic asit
<b>BHT</b>	Butillenmiş hidroksi toluen
<b>BM</b>	Bazal membran
<b>BSA</b>	Sığırs serum albumin
<b>CaCO-2</b>	İnsan kolon adenokarsinoma hücre dizisi
<b>CAT</b>	Katalaz
<b>CEA</b>	Karsinoembriyonik antijen
<b>cGMP</b>	Siklik guanosin monofosfat
<b>COX-2</b>	Siklooksijenaz-2
<b>DMEM</b>	Dulbecco'nun modifiye esansiyel hücre kültürü besi ortam
<b>EGF</b>	Epidermal büyüme faktörü
<b>EK</b>	Enterokromofin hücreler
<b>ELISA</b>	Enzim- linked immünosorbent assay
<b>eNOS</b>	Endotelyal nitrik oksit sentaz
<b>ESM</b>	Ekstrasellüler matriks
<b>FAP</b>	Familyal adenomatöz polipozis
<b>GSH-Px</b>	Glutasyon peroksidaz
<b>HNPCC</b>	Hereditör nonpolipozis kolorektal kanser
<b>HPLC</b>	Yüksek performans likit kromatografisi
<b>HT-29</b>	İnsan kolon adenokarsinoma hücre dizisi
<b>IL-1</b>	İnterlökin 1
<b>iNOS</b>	Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
<b>KRK</b>	Kolorektal kanser
<b>MDA</b>	Malondialdehid
<b>Mel</b>	Melatonin
<b>MMP</b>	Matriks metalloproteinaz
<b>MMP-9</b>	Matriks metalloproteinaz-9
<b>MT-1 MMP</b>	Membrana bağlı Tip 1 Matriks Metalloproteinaz
<b>MT-MMP</b>	Membrana bağlı tip Matriks metalloproteinaz
<b>NED</b>	N-Naftiletilen diamin
<b>nNOS</b>	Nöronal nitrik oksit sentaz
<b>NO·</b>	Nitrik oksit
<b>NOS</b>	Nitrik oksit sentaz
<b>NSAII</b>	Nonsteroid antiinflatuar ilaçlar
<b>PARS</b>	Poli-ADP-riboz sentaz

<b>PARS</b>	Poli-ADP-riboz sentaz
<b>PBS</b>	Fosfat buffer saline
<b>PDGF</b>	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
<b>PGE-2</b>	Prostoglandin E-2
<b>SDS</b>	Sodyum dodesil sülfat
<b>SOD</b>	Süperoksit dismutaz
<b>SOR</b>	Serbest oksijen radikali
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforme edici büyüme faktörü $\beta$
<b>TIMP</b>	Metalloproteinaz doku inhibitörü
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tümör nekroz faktör $\alpha$
<b>uPA</b>	Ürokinaz tip plazminojen aktivatörü

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1</b>	Apoptozu değerlendirmek için boyanmış hücreler	57
<b>Resim 2</b>	Normal hücrelerin mikroskopik görünümü	67
<b>Resim 3</b>	Apoptotik hücre	67
<b>Resim 4</b>	Kolorektal kanserli hastalarda tümör dokusunda MMP-9 ekspresyonunun immünohistokimyasal incelenmesi	73

## 11. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal kanser (KRK) günümüzde gelişmiş ülkelerde en sık rastlanan kanser tipleri arasında olup beş yıllık sağ kalım süresi %45 olarak bildirilmiştir (1). Kolorektal kanserlerde prognozu esas olarak belirleyen faktörler lokal invazyon ve metastatik tümör yayılımıdır. İnvazyon ve metastaz için tümör hücrelerinin sürdürmesi gereken üç aşama sırasıyla; 1) vasküler endotel ve ekstrasellüler matrikse tutunma, 2) lokal proteoliz ve 3) hareketlilik kazanma olarak sıralanabilir. Bunlardan son ikisinde çeşitli proteolitik enzimler rol oynamaktadır. Bu enzimler normal organizmada da mevcut olup malignitelerde yüksek plazma seviyelerinin artmış metastaz yeteneği ile birlikteliği gösterilmiştir (1).

İnvazyon için bazal membranın ve çevredeki interstisyel stromanın parçalanması gereklidir. İnvazyonu önleyen en önemli bariyer kollajendir. İnterstisyum ve stromada daha çok tip I ve tip III kollajen bulunurken, bazal membranda tip IV ve V kollajen bulunmaktadır.

Kollajen esas olarak matriks metalloproteinazlar (MMP) tarafından parçalanır. MMP'lar sentezlendikleri hücreden salındıktan sonra aktive olurlar. Enzimlerin aktivitesinin regülasyonunda serin proteazlar, diğer aktif MMP'lar ve enzimlerin endojen inhibitörleri, MMP'ların doku inhibitörleri (TIMP) başlıca rolü oynar (2). MMP'lar metastaz oluşumundaki rolleri nedeniyle prognoz tayininde ve yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesinde önemli role sahiptir. Örneğin meme ve akciğer kanserinde artmış MMP-2 (jelatinaz A) ekspresyonu artmış metastaz potansiyeli ile ilişkili bulunmuştur. Kolorektal kanserlerde ise özellikle MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin ekspresyonunda ve aktivitesinde bir artış gösterilmiş olup bu artış ile tümör evrelemesi arasında pozitif bir korelasyon bildirilmiştir (1, 3, 4, 24).

Yukarıda da belirtildiği gibi karsinogenez çok basamaklı bir olaydır. Tablonun tüm evrelerinde çeşitli serbest radikallerin karsinogenezi arttırıcı etkileri vardır (5).

Nitrik oksit (NO<sup>•</sup>) oldukça reaktif bir serbest radikaldir. Yarı ömrü sadece bir kaç saniyedir ve kolayca süperoksit gibi serbest radikallerle birleşir. Biyolojik sistemlerde hızla nitrit ve nitrate parçalanır. Nitrik oksit MMP'ların sentez ve salınımının regülasyonunda da önemlidir. Yakın zamanlı çalışmalarda MMP-2 ve

MMP-9 yapımı ve sekresyonunda NO<sup>-</sup> nun olası rolüne dikkat çekilmiştir (7). Düz kas hücrelerinde endotelial NOS (eNOS) artışının MMP-2 ve MMP-9 aktivitesini azaltırken TIMP-2 yapımını arttırdığı yönünde de yayınlar vardır. NO/cGMP yolağının MMP ekspresyonu ve aktivitesi üzerine etkisi olduğu bildirilmiş fakat henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (8).

Nitrik oksit çok kısa yarı ömrü ve reaktivitesi nedeniyle lokal bir haberci olarak etki eder, sinyal iletimi, apoptozis gibi birçok biyolojik olayda rol oynar. Apoptozis gibi koruyucu mekanizmaların bozulduğu karsinogeneziste NO<sup>-</sup> kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadır (6). Mutant p53 geni taşıyan HT-29 kolon kanseri hücrelerinde NO<sup>-</sup> sentaz ekspresyonu hücre proliferasyonunu artırırken *wild-type* p53 taşıyan hücrelerde NO<sup>-</sup> sentaz aktivitesi ve hücre büyümesi ve tümör oluşumu arasında ters bir orantı izlenmiştir (6).

Lipid peroksidasyonu bir tür oksidatif doku hasarı olup poliansatüre yağ asitlerini etkiler. Tablo, hidrojen peroksit ve superoksit radikallerine maruz kalan hücrelerin membranlarında hasarlanma, hücre organellerinin kaybı ve sitozolik aldehid ve peroksit ürünlerinin oluşumu ile kendini gösterir. Malonildialdehid (MDA) oluşumu lipid peroksidasyonunun iyi bir göstergesidir. MDA serbest radikallerle membran yağ asitlerinin girdiği reaksiyonlarda başlıca son ürün olarak izlenir. Kolorektal kanserlerde malign dokuda normal dokuya göre MDA düzeylerinde % 111'lere varan artışlar bildirilmiştir (9).

Antioksidanlar organizmada oksijenin varlığında oluşan serbest oksijen radikallerini etkisiz hale getirirler. Magnezyum, selenyum, vitamin E, C ve A gibi eksojen olarak besinlerle aldığımız antioksidanların yanı sıra organizmada antioksidan olarak etki gösteren birçok madde sentezlenir. Organizmada endojen olarak üretilen en önemli antioksidan maddelerden biri melatonindir. Melatoninin antioksidan etkisinin vitamin E'den daha fazla olduğu yönünde yayınlar mevcuttur (10). Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) triptofan metabolizmasının ileri bir ürünü olarak başta epifiz bezi olmak üzere çeşitli dokularda serotoninden sentezlenir (11). Lipofilik bir hormon olan melatonin vücutta yaygın olarak bulunur. İskemi-reperfüzyon, inflamasyon gibi serbest radikallerin ve bunlara eşlik eden reaktiflerin rol oynadığı çeşitli patolojik tablolarda melatoninin yararlı, antioksidatif etkileri

gösterilmiştir (11). Melatoninin ayrıca nitrik oksit sinyal iletimi üzerine olası etkileri, NO<sup>-</sup> ve NOO<sup>-</sup> yapımını azalttığı bildirilmiştir (12,13).

İntestinal sistem epifiz dışında önemli bir melatonin sentez yeridir (11). Melatonin intestinal sistemde enterokromafin hücrelerce üretilir ve lokal konsantrasyonları sistemik konsantrasyonlarından yüksektir. Şimdiye kadar, melatonin etkilerini göstermesinde rol oynayan iki melatonin reseptörü (MT1 ve MT2) tanımlanmıştır. Bu reseptör tipleri intestinal sistemin farklı kısımlarında farklı oranlarda eksprese edilmektedirler (11, 14). Melatonin önemli immünmodülatör ve onkostatik etkileri prostat ve meme kanserlerinde gösterilmiştir (11, 15). Nöronlarda ve immün hücrelerde melatonin apoptozisi önlerken birçok diğer kanser hücresi tipinde apoptotik etkilere sahiptir (16, 6). Kuvvetli bir antioksidan olarak melatoninin kolon mukozası hasarlanmasında önemli koruyucu bir rolü olduğu yönünde yayınlar mevcuttur. Fare ve sıçan kolit modellerinde melatoninin mukoza hasarına yol açan birçok parametrenin oluşumunu azalttığı veya durdurduğu bildirilmiştir (12). Melatoninin kolon kanseri üzerindeki etkileri ise henüz tam bir açıklık kazanmamıştır (18, 20).

Bu çalışmada CaCo-2 kolon adenokarsinom hücreleri kullanılarak *in vitro* şartlarda melatoninin antioksidan ve anti-kanserojen etkilerinin moleküler yollarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla melatonin uygulanmış/uygulanmamış CaCo-2 hücre kültürü ortamında lipid peroksidasyonu markeri olarak MDA, nitrik oksit metabolizmasını izlemek üzere NO<sup>-</sup> düzeyleri, kolon tümörünün metastazında önemli enzimlerden MMP-9'un aktivitesi incelenmiştir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. KOLOREKTAL KANSER**

Kolorektal kanserler (KRK) dünyanın değişik toplumlarında farklı sıklıkta görülen onkolojik bir sorundur. Sanayileşmiş ülkelerde görülme sıklığı gelişmekte olan ülkelere oranla daha fazladır.

#### **2.1.1. Epidemiyoloji**

İstatistiksel bilgilerin güvenilir olduğu ABD'de kolorektal kanserler; erkeklerde prostat ve akciğer, kadınlarda meme ve akciğer kanserlerinden sonra üçüncü sıklıkta görülen kanserlerdir (23). Kolorektal kanserlerden ölüm bütün kanserlerden ölümlerin % 10'unu oluşturmaktadır (23).

#### **2.1.2. İnsidans**

Sporadik kolorektal kanser gelişiminde yaş majör bir risk faktörüdür. KRK sıklığı 20-39 yaşlar arasında son derecede düşüktür. 40-50 yaş arasında önemli oranlarda artmaya başlar. Kolorektal kanserlerde tanı yaşı ortalama 62'dir. Ancak, kolorektal kanserler için risk 50-75 yaş arasında değişir. Yaş ilerledikçe risk oranı yükselir. Çocukluk yaşlarında seyrek görülür. Bunların çoğu predispozan faktörler ve polipozis sendromu gibi pozitif aile anamnezi gösterirler (25).

Primer kolorektal kanserlerin %95'ini adenokarsinomlar oluşturur. Kolon kanserlerinin yaklaşık %30 u rektumda % 25'i sigmoidde %5-10'u inen kolonda %10-15'i transvers kolonda, çıkan kolon-çekumda da %25'i yerleşir. Yapılan bir çalışmada KRK yaklaşık %45'inin rektumda %22'sinin de sigmoid kolonda görüldüğü bildirilmiştir ( Şekil 1) ( 24).

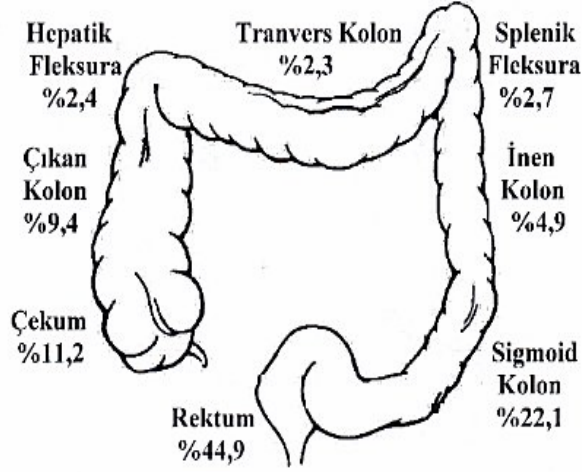
Kolorektal kanser görülme oranları dünyanın değişik coğrafi bölgelerinde farklılık göstermektedir. Kuzey Amerika ve Avrupa'daki birçok ülkede KRK görülme sıklığı Afrika ve Asya'daki gelişmekte olan ve/veya az gelişmiş bölgelerden on kat daha fazladır (23).

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1999 yılındaki kolon kanseri insidansı; erkeklerde %3.48, rektum kanseri insidansı %2.81'dir. Kadınlarda



ise insidans; kolon kanserinde %4.22, rektum kanserinde ise %3.84 olarak açıklanmıştır.

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalındaki son 15 yıllık seride de görüldüğü gibi kanser kalın bağırsağın anüse (makat) yakın olan son kısımlarında yani inen kolon, sigmoid, rektosigmoid ve rektum bölümlerinde daha fazla oluşmaktadır.



**Şekil 1** Kolorektal kanserlerin kolonda görülme oranları (24)

Bu coğrafi farklılıkların; genetik yatkınlık yanında, diyetSEL ve çevresel faktörlerin etkisiyle oluştuğu kabul edilmektedir.

### 2.1.3. Mortalite

ABD en yüksek kolon kanseri insidans oranlarına sahip olduğu halde, en düşük mortalite hızına sahip ülkelerden biridir. Tedavi edilen bütün KRK'lerin beş yıllık yaşam oranları ABD'de % 61, Çin'de % 32 ve Avrupa'da % 30 olarak bildirilmiştir (23).

### 2.1.4. Risk Faktörleri

Kolon kanseri gelişiminde genetik ve çevresel faktörler etkilidir. Bunlardan; genetik yatkınlık en belirgin risk faktörü olmakla beraber kolorektal kanserlerin büyük çoğunluğu sporadik kanserlerdir.

Toplumun diyet ve yaşam değişikliği ile KRK insidansının % 66-75 oranında azaltılabileceği belirtilmiştir. Benzer şekilde diyet değişikliği ve fiziksel

aktiviteyi arttırmanın insidans oranlarındaki azalmada rolü olabileceği ileri sürülmüştür. Diyetel faktörler dışında aspirin ve nonsteroid antiinflamatuvar (NSAII) ilaç kullanımının rolü ve kanser taramaları ile adenomatöz poliplerin çıkarılmış olmalarının da kanser insidansında düşüğe neden olabileceği belirtilmiştir (23).

Kolorektal karsinom patogenezinde kırmızı et ve yağ oranından zengin yüksek kalorili beslenmenin, antioksidan, antimutajen, antineoplastik vitamin ve eser elementlerden yoksun, lifsel komponenti olmayan beslenme alışkanlığının tümör oluşumunda önemli rolü vardır. Ülkeler arasındaki kolorektal kanser sıklıkları arasındaki değişkenlik beslenme, yaşam tarzı ve çevresel faktörlerin farklılığını yansıtmaktadır. Endojen ve ekzojen karsinojenik etkenler, hatalı beslenmeye bağlı koruyucu maddelerin eksikliği kolon mukoza epitel hücrelerinin rejenerasyon kapasitesinin ve mukus kalitesinin kaybına neden olmaktadır. Tüm bu faktörler barsak epiteli ile direkt temasta olan intralüminal mikrofloranın ve içeriğın değişmesine, epitel hücre membranlarında yağ asit oranlarının yükselmesine, lipid peroksidasyon radikallerinin artmasına neden olur. Ayrıca, sitokinler, interlökinler, prostaglandinler ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- $\alpha$ ), NO gibi iltihabi medyatörler mukoza epitel destrüksiyonunun kalıcı hale gelmesine neden olur. Sonuçta, genetik ve somatik mutasyonlarla karsinogenezis başlar (25).

#### 2.1.4.1. Yaş

Kolorektal kanserler ileri yaş hastalığı olup kişinin 50 yaş ve üzerinde olması orta derecede bir risk faktörüdür.

#### 2.1.4.2. Aile Öyküsü

Sporadik Kanserler: Herediter sendromların yanısıra sporadik kanserler içinde genetik bir yatkınlığın söz konusu olduğu anlaşılmıştır. Epidemiyolojik çalışmalarda hastalığa sahip bireylerin birinci derece yakınlarında KRK gelişme riski genel topluma göre iki- üç kat daha fazladır.

Familyal adenomatöz polipozis (FAP) ve herediter nonpolipozis kolorektal kanser (HNPCC) en sık ailesel kolon kanseri sendromlarıdır. Bütün KRK'lerin % 5'ten azını oluştururlar (23).

#### *2.1.4.3. Adenomatöz Polipler-Kanser*

Kolorektal kanserlerin büyük bir kısmı adenomatöz poliplerin doğal seyri sonucu gelişmektedir. Adenomlar tanım olarak displazik epitele sahiptir ve bu benign neoplazmlar malign dejenerasyon potansiyeline sahiptirler. Klinik çalışmalarda adenomatöz poliplerin karsinomaların öncülü olduğu kanıtlanmıştır. Adenomların kolonda dağılımı karsinom dağılımı ile paraleldir. Endoskopik veya cerrahi olarak çıkarılan birçok polipte kanser odağı saptanmaktadır. Kanser riskinin polipteki displazi derecesi ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca polipektomi yapılan hasta grubunda KRK'den ölüm oranlarının azaldığı gösterilmiştir.

#### *2.1.4.4. İnflamatuvar Barsak Hastalığı (İBD)*

Kronik ülseratif kolit veya Crohn hastalığı olanlarda kolon kanser riskinin hastalık süresi ile orantılı olarak arttığı bilinmektedir. Bu grupta ortalama % 3-8 olan kanserleşme oranı, hastalığın başlamasından 10 yıl sonra % 10'a, 25 yıl sonra % 30'lara kadar yükselmektedir. Crohn hastalığı olan kişilerde kolon kanseri genel toplumdan daha erken yaşta görülür. İBD'de karsinomanın başlangıç lezyonu displazidir. Kanser riski yüksek dereceli displazide en fazladır ve daha çok görülebilen plaklar veya kitlelerde gelişir (23).

#### *2.1.4.5. Diğer Durumlar*

Diabetes Mellitus, kolesistektomi, alkol, sigara içimi, üreterokolik anastomozlar ve pelvik radyasyon KRK oluşumunda diğer risk faktörleri olarak sıralanabilir.

### **2.1.5. Koruyucu Faktörler**

Kolorektal kanserler için belirlenen risk faktörleri yanında bazı koruyucu faktörler de tanımlanmıştır. Bunlar; meyve ve sebzeden zengin diyet, düzenli fiziksel aktivite, düzenli aspirin veya NSAII kullanımı ile postmenopozal kadınlarda hormon replasman tedavisidir.

#### *2.1.5.1. Diyet*

Birçok epidemiyolojik çalışma; sebze ve meyveden zengin diyet ile beslenmenin kolorektal kanserden korunmayla ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu koruyucu etki;

sebze ve meyvelerdeki fiber (lif içeriği), antioksidan vitaminler, folik asit, selenyum gibi mineraller, diğer mikronutrientler veya fitokimyasallara veya henüz tam bilmediğimiz elementlere bağlı olabilir. Kolorektal kanserden korunmada diyetsel lifin (fiber) potansiyel rolü olduğu gösterilmiştir. Bununla beraber hangi miktarda diyetsel fiberin KRK gelişiminden koruduğu açık olmadığı gibi bir grup çalışmada uyumsuz sonuçlar rapor edilmiştir. Düşük diyetsel fiber alan toplumlarda gıdadaki total fiber alımını iki katına çıkarmakla KRK riskinin % 40 oranında düşürebileceği ileri sürülmüştür (23).

#### *2.1.5.2. Folik Asit*

Hayvan ve insan çalışmalarında elde edilen bilgiler folik asidin kolon doku kültüründe kanser patogeneziyi inhibe ettiğini göstermiştir. 400 µg/gün folik asit içeren multivitamin kullanan kadınlarda KRK gelişme riski önemli oranda azaldığı bildirilmiştir (23).

#### *2.1.5.3. Kalsiyum*

Bir diğer muhtemel koruyucu faktör, artmış diyetsel kalsiyum alımı veya diyete kalsiyum ilavesidir. Kalsiyumun koruyucu etkisinin bireysel vit D reseptör genotipine bağlı olduğunu telkin eden çalışmalar vardır (23).

#### *2.1.5.4 Fiziksel Aktivite*

İç sırasında veya istirahat zamanında yapılan düzenli fiziksel aktivitenin kolon kanseri korunmasıyla ilişkili olduğuna ait gözlemler mevcuttur (23). Fakat fiziksel aktivitenin koruyucu etkisini nasıl yaptığı bilinmemektedir.

#### *2.1.5.5. Aspirin ve NSAİ İlaçlar*

Kolon kanseri gelişiminde aspirin ve diğer NSAİ ilaçların koruyucu etkisini gösteren önemli veriler mevcuttur (23). İleri sürülen hipotezde; bu grup ajanlar ile siklooksijenaz-2 inhibisyonu olmakta, apoptozis artmakta ve tümör hücresi büyümesi azalmaktadır.

#### 2.1.5.6. Hormon Replasman Tedavisi

Bazı alışmalar postmenopozal kadınlarda hormon kullanımının KRK riskini azaltabileceğini telkin etmektedir.

#### 2.1.5.7. HMG- CoA Redüktaz İnhibitörleri (statinler)

Koroner arter hastalığı için pravastatin ve simvastatin kullanımı ile yapılan klinik çalışmalarda kolon kanseri insidansında azalma gözlenmiştir. Bu ajanların apoptozisi uyardığı ve kolon kanser hücre proliferasyonunu inhibe ettiği (23) ve sulindak ilavesi ile bu etkilerin daha da arttığı gösterilmiştir.

### 2.1.6. Kolorektal Kanserde Histopatoloji

#### 2.1.6.1. Makroskopik Özellikler

Büyük boyuttaki tümörlerde üç tür makroskopik özellik vardır:

- Lümene doğru kitlesel büyüme: Çekum ve çıkan kolonda daha fazla görülür. Tümörün intralüminal bölümü intramural bölümünden daha fazladır.
- İnfiltratif- ülser: Transvers, inen kolon ve rektumda daha fazla görülür.
- Anüler- konstrüktif: Rektum ve sol kolonda daha fazladır.

#### 2.1.6.2 Mikroskopik Özellikler

Dünya Sağlık Örgütünün kolorektal karsinom sınıflaması aşağıdaki gibidir:

- Adenokarsinom
- Müsinöz adenokarsinom
- Taşlı yüzük hücreli karsinom
- Adenoskuamöz karsinom
- Skuamöz hücreli karsinom
- Andiferansiye karsinom
- Küçük hücreli karsinom

#### 2.1.6.2.1 Adenokarsinom

Tümör dokusunda tübül oluşumunun derecesi ve hücrel dizilime göre derecelendirme yapılır. Hastaların % 15-20'si grade I ya da iyi diferansiyedir. Yüzde 60-70 grade II ya da orta diferansiye, % 15-20'si grade III ya da az diferansiyedir.

#### 2.1.6.2.2 Musinöz Adenokarsinom

Taşlı yüzük hücreli karsinomlar da bu gruba eklendiğinde, kolorektal karsinomlar içinde görülme sıklığı % 10'dur. Musinöz karsinom tanısı için musinöz komponentin tümörün % 50'sinden fazla olması gerekir. Musinöz karsinomlar; genç erişkin ve çocuklarda, villöz adenom zemininde, ülseratif kolitli ve radyoterapi alan hastalarda daha fazla görülür. Bu tümörler musinöz olmayan kolorektal karsinoma göre daha ileri evrededirler. Musinöz karsinomlar içinde taşlı yüzük hücreli türü daha agresiftir ve prognozu daha kötüdür (24).

#### 2.1.6.2.3. Taşlı Yüzük Hücreli Karsinom (*linitis plastica*)

Nadir olan bu tip genellikle genç hastalarda görülür. Tümör hücrelerinin %50'den fazlasında belirgin intrasitoplazmik müsün varlığı ile karakterizedir.

#### 2.1.6.2.4 Skuamöz diferansiyasyon gösteren karsinom

Kolorektal karsinomlarda skuamöz diferansiyasyon görülebilir. Bunların büyük çoğunluğu çekumda yerleşir. Pekçok vakada skuamöz komponent glandüler komponent ile birlikte (adenoskuamöz karsinom). Saf skuamöz hücreli karsinom kolonda oldukça nadirdir. Klinik bulgular klasik adenokarsinoma benzer. Prognozu nispeten daha kötüdür.

#### 2.1.6.2.5 Andiferansiye Karsinom

Tümörü oluşturan hücreler glandüler ve diğer daha az görülen diferansiye tümör hücrelerine benzemez. Kolorektal tümörlerin % 1'ini oluşturur.

#### 2.1.6.2.6 Küçük Hücreli Karsinom

Histopatolojik olarak akciğerin küçük hücreli karsinomu ile aynı özellikleri taşıyan bu tümör kolorektal karsinomların % 1'inden azını oluşturur. Olguların % 30'u adenoma kökenlidir.

#### 2.1.6.2.7 Seyrek görülen kolorektal karsinomlar

Karsinosarkom, koryokarsinom alanları içeren adenokarsinom, clear hücreli adenokarsinom ve hepatoid adenokarsinomdur.

#### 2.1.6.2.8 Erken kolon karsinomu (Small Early Flat Carcinoma)

Daha çok Japon patologlar tarafından kabul edilen ve tanımlanan bu lezyon Batı'da az oranda görülmektedir. Karsinom derinliği mukoza ve submukoza ile sınırlıdır.

Japonya ve Batıda farklı sıklıkta görülmesinin nedeni patologlar arasındaki displazi- karsinom tanı kriterlerinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır (24).

#### 2.1.7. Yerleşim

Kolorektal kanserlerin çoğu sigmoid kolon ve rektumda yerleşir. Ancak proksimal kolon kanserleri giderek artmaktadır.

#### 2.1.8. Evreleme

Evrelemede amaç; hastalığın yayılım derecesini saptamak bu şekilde tedavinin planlanması ve prognoz açısından tahminde bulunabilmektir. Bu amaçla en sık kullanılan sistemler TNM ve Duke's sistemleridir (Tablo I ve II).

**Tablo I** Tümörlerde Duke's Evrelendirmesi

Evre	Yayılım
Evre A	Sadece mukozada
Evre B	Tüm duvar (+), lenf ganglionu (-)
Evre C	Tüm duvar (+), lenf ganglionu (+)
Evre D	Uzak metastaz (+)

**Tablo II** Tümörlerin TNM Klinik Sınıflama Kriterleri

## Primer tümör (T)

Tx	Primer tümör değerlendirilmiyor
T0	Primer tümör yok
Tis	Karsinoma in situ
T1	Tümör submukozaya yayılmış
T2	Tümör muskularis propriyaya yayılmış
T3	Tümör subserozaya veya peritonla kaplı olmayan perikolik veya perirektal dokulara geçmiş
T4	Tümör visseral peritonu geçmiş ve komşuluk yolu ile diğer organları tutmuş

## Rejyonel lenf nodülleri (N)

Nx	Rejyonel lenf nodülleri değerlendirilemiyor
N0	Rejyonel lenf nodüllerine yayılım yok
N1	1-3 perirektal veya perikolik lenf nodülünde metastaz var
N2	4 veya daha fazla pararektal veya perikolik lenf nodülünde metastaz var
N3	Vasküler yapılar boyunca herhangi bir lenf nodülünde metastaz var

## Uzak metastaz (M)

Mx	Uzak metastaz varlığı değerlendirilemiyor
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

**2.1.9. Tanı**

Hikaye, fizik muayene ve tanısal testlerle tanıya gidilir. Özellikle aile hikayesi, kanama, dışkılama alışkanlığındaki değişiklikler ve kilo kaybı sorgulanmalıdır.

Kolon tümörleri yavaş büyürler ve bu nedenle karakteristik semptomlar genellikle çok geç dönemde görülür. Kolorektal kanserde erken tanı çok önemlidir. Uzun yaşam süresi sağlamanın anahtarı erken tanıdır. Genel olarak, klinik bulgu ve belirtiler ortaya çıktığında hastalık ileri evrededir. Bu nedenle, bulgular ortaya çıkmadan, kısaca asemptomatik hastada kanser tanınabilmelidir. Bunun için de



toplumu bilgilendirmek ve tarama programları uygulamak gereklidir. Tarama; güvenilirliği olan, basit, doğru ve ucuz testlerle yapılmalı ve geniş insan kitleleri üzerine dayanmalıdır. Tarama sonucu küçük ve erken evre tümörü saptama olasılığı fazladır. Tarama özellikle, kanser riski olan hastalarda daha anlamlı ve yararlıdır (25).

Kolorektal kanserlerde semptom ve bulgular tümörün lokalizasyonu, makroskopik yapısı, tümörün yayılım derecesi ve kanama, perforasyon ve tıkanma gibi komplikasyonların oluşumuna göre değişir.

Sağ kolon kanserlerinde karın ağrısı, dispeptik yakınmalar, halsizlik ve karın sağ alt kısmında palpabl kitle en sık görülen yakınmalardır. Nedeni açıklanamayan anemi ve hızlı kilo kaybı varlığında sağ kolon tümörü mutlaka akla gelmelidir. Gözle görülür kanama nadiren görülür. Rektum kanserlerinde ana semptom rektal kanamadır. Sık görülen diğer bulgular kabızlık, karın ağrısı ve boşalamama hissidir. Komplikasyonlar bazen hastalığın ilk bulgularını oluşturur.

#### **2.1.10. Prognostik Parametreler**

Barsak duvarına invazyon derinliği ve lenf düğümü sayısı temel prognostik faktörlerdir. Bunlar dışında az diferansiye tümörler, endokrin hücre varlığı, Crohn benzeri reaksiyon, tümör tomurcuklanması da kötü prognozu gösterir.

Kolorektal kanserlerin teşhisinde henüz hiçbir belirteç tek başına prognostik öneme sahip değildir.

Diferansiyasyon belirteçleri: Karsinoembriyjenik antijen (CEA), CA19-9, epidermal büyüme faktörü (EGF), gastrin reseptörleri, E-kaderin, integrin, tip IV kollajen (24).

Moleküler belirteçler: c-myc, K-ras, CD 44, NM 23, p53 kullanılmaktadır.

Farklı proteinaz sistemlerinden proteinaz ve inhibitör profillerini tanımlamak kolorektal kanser ilerlemesini belirlemek için önemlidir (24). Matriks metalloproteinazlar metastaz oluşumundaki rolleri nedeniyle prognoz tayininde ve yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesinde önemli role sahiptir.

Kolorektal kanserlerde özellikle MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin ekspresyonunda ve aktivitesinde bir artış gösterilmiş olup bu artış ile tümör evrelemesi arasında pozitif bir korelasyon bildirilmiştir (1, 3, 4, 25).

## 2.2. KANSER VE EKSTRASELLÜLER MATRİKS

Ekstrasellüler matriks (ESM), hücrelerarası boşluklarda özel bir ortam oluşturan doku bütünlüğü ve homeostazından sorumlu dinamik, interaktif bir yapıdır. ESM, protein ve proteoglikanları içeren, organizmalara sadece yapısal destek sağlamakla kalmayıp aynı zamanda hücre proliferasyonu, farklılaşması ve migrasyonu ile yapışma, doku morfogenezisi gibi pek çok biyolojik aktivitede önemli rollere sahiptir (27).

Matriksi oluşturan başlıca iki temel ekstrasellüler protein vardır. Bunlar; kollajen ve proteoglikanlardır. ESM yapısında en fazla bulunan proteinlerden biri kollajendir. Total vücut proteinlerinin %30, total vücut ağırlığının ise %6 kadarını oluşturan kollajen, insan vücudunda en yaygın olarak bulunan proteindir. Yüksek oranda glisin (%33) içeren kollajenin yapısında, prolin (%10) ile aminoasit türevleri olan hidroksprolin (%10) ve hidroksilizin (%1) bulunmaktadır. Kollajen grubunda yer alan proteinlerin yapısındaki her üç amino asitten biri glisin, her beş amino asitten biri prolin veya hidroksprolin gibi amino asit olup ve molekül üçlü heliks veya süper heliks yapı gösterir.

İnvazyon için bazal membranın ve çevredeki interstisyel stromanın parçalanması gereklidir. İnvazyonu önleyen en önemli bariyer kollajendir. İnterstisyum ve stromada daha çok tip I ve tip III kollajen bulunurken, bazal membranda tip IV ve V kollajen bulunmaktadır.

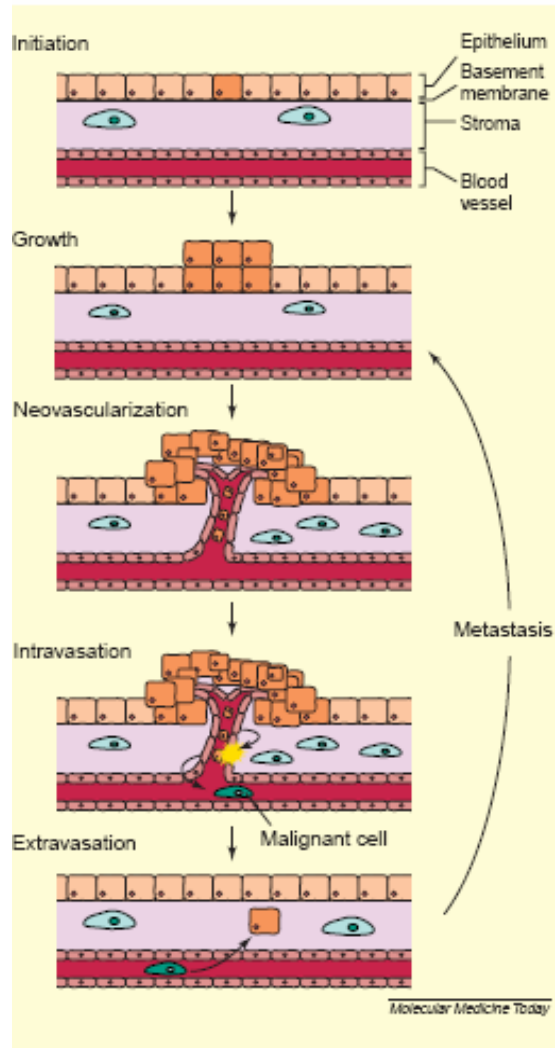
Tümör invazyonu ve metastazın mekanizması ile ilgili yapılan yeni çalışmalarda, bazal membran (BM) ve ESM bozulmasının asıl basamak olduğu gösterilmiştir. MMP'ların burada çok önemli rol oynadığı ortaya konmuştur (18,116) (Şekil 2). Kanserde ESM, tümör dokusunun büyümesi ve tümör hücrelerinin yayılımını önlemek için primer bir bariyer olarak görev yapar. Malign tümörler bu bariyeri aşmak için metalloproteinazları kullanırlar (27).

Matriks metalloproteinazlar; ESM yıkımını hem direkt olarak hem de tümör invazyonuna karışan diğer biyolojik sistemlerle etkileşerek, hücre adezyon molekülleri, sitoskeletal proteinler ve büyüme faktörleri aracılığıyla gerçekleştirirler (1).

## 2.3. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR

### 2.3.1. Genel Özellikleri

Matriks metalloproteinazlar (MMP); ekstrasellüler matriks (ESM) ile bazal membran komponentlerini parçalama yeteneğine sahip olan ve aktif bölgesinde çinko içeren homolog bir enzim ailesidir (22, 27,113). Bu enzimler doku yeniden yapılanması, morfogenezis, yara iyileşmesi ve normal gelişimsel süreç gibi fizyolojik durumlarda rol oynadıkları gibi tümör hücresi invazyonu, angiogenezis ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de yer alırlar (27,113).



**Şekil 2.** Tümör gelişim ve yayılım aşamaları (116)

Ekstrasellüler matriksin ve bazal membranın parçalanması; nonneoplastik dokunun yeniden oluşum sürecinde olduğu gibi kanser invazyonunda da önemli rol oynar. MMP'lar santral sinir sistemi, baş-boyun, mide, pankreas, kolon, böbrek, deri ve prostatın malign tümörlerinin invazyonunda belirgin bir rol oynar (27).

### **2.3.2. Sınıflandırma**

Matriks metalloproteinaz ailesinin önceden tanımlanmış üyesine birçok yeni metalloproteinazın eklenmesi ile bugün 20'den fazla enzim bildirilmiştir (1, 2, 15, 22, 30).

Matriks metalloproteinazlar, lökositler, keratinositler, fibroblastlar, makrofajlar, kondrositler, düz kas hücreleri gibi epitelyal ve mezenkimal kökenli hücreler tarafından sentezlenirler. Pek çok MMP embriyogenez aşamasında yaygın olarak eksprese edilir. Yetişkinlerde ise plasentada, endometriyumda, meme bezlerinin involüsyonu esnasında ve inflamasyonda hızla eksprese edilirler. Doku gelişimi ve farklılaşmasında, yeniden şekillenmede, ovulasyon, hücre göçü, anjiogenez ile tam mekanizmaları bilinmese de birçok hastalığın patolojisinde MMP'ler önemli rol oynamaktadır. Kanser dışında, artrit, inflamasyon, multipl skleroz, kronik yaralar, kronik akciğer hasarı, bronşiyal astım, pulmoner tansiyon MMP'lerin rol aldığı başlıca hastalıklardır.

MMP'lar beş gruba ayrılabilir (28, 29)

- Kollajenazlar : MMP- 1, MMP- 8, MMP- 13
- Jelatinazlar : MMP- 2, MMP- 9
- Stromelizinler : MMP- 3, MMP- 10, MMP- 11
- Membran tip MMP'lar : MT-MMP
- Diğer MMP'lar

Matriks metalloproteinazlar genellikle pro/"latent" formda salınır. Enzim düzeylerinin kontrolü ekspresyon düzeyinin kontrolü ile sağlanır. Proteolitik aktivite için ekstrasellüler olarak aktivasyon gereklidir (29).

**Tablo III.** MMP'ların sınıflandırılması (27)

Grup	MMP	MA Latent (kDa)	MA Aktif (kDa)	Etki ettiği substrat
<i>Kollajenazlar</i>				
İnterstisyel kollajenaz	MMP-1	55	43	Kollajen tip I, II, III, VII, X (Fibriler)
Nötrofil kollajenaz	MMP-8	75	58	Kollajen tip I, II, III
Kollajenaz 3	MMP-13	65	55	Kollajen tip I, II, III, IV, gelatin
<i>Gelatinazlar</i>				
Gelatinaz A	MMP-2	72	66	Gelatin, kollajen IV, V, VII, X, elastin, fibronektin
Gelatinaz B	MMP-9	92	84	Gelatin, kollajen tip IV, V, I, III, fibronektin, elastin
<i>Stromelysinler</i>				
Stromelysin 1	MMP-3	57	46	Kollajen tip III, IV, V, IX, proteoglikanlar, fibronektin, laminin
Stromelysin 2	MMP-10	57	46	Gelatin, tip III, IV, V kollajen, fibronektin
Stromelysin 3	MMP-11	51	44	$\alpha$ 1 proteinaz inhibitörleridir.
<i>MT-MMPs</i>				
MT1-MMP	MMP-14	64	54	Pro MMP-2, pro MMP-13, kollajenler, fibronektin
MT2-MMP	MMP-15	72	61	MT1-MMP ile benzerdir.
MT3-MMP	MMP-16	66	55	Pro MMP-2
MT4-MMP	MMP-17	?	54	Pro MMP-2
MT5-MMP	MMP-24	63	62	Pro MMP-2
<i>Diğerleri</i>				
Matrilysin	MMP-7	28	19	Gelatin, fibronektin, elastin, kollajen tip IV
Metaloelastaz	MMP-12	54	45	Elastin, fibronektin, kazein.

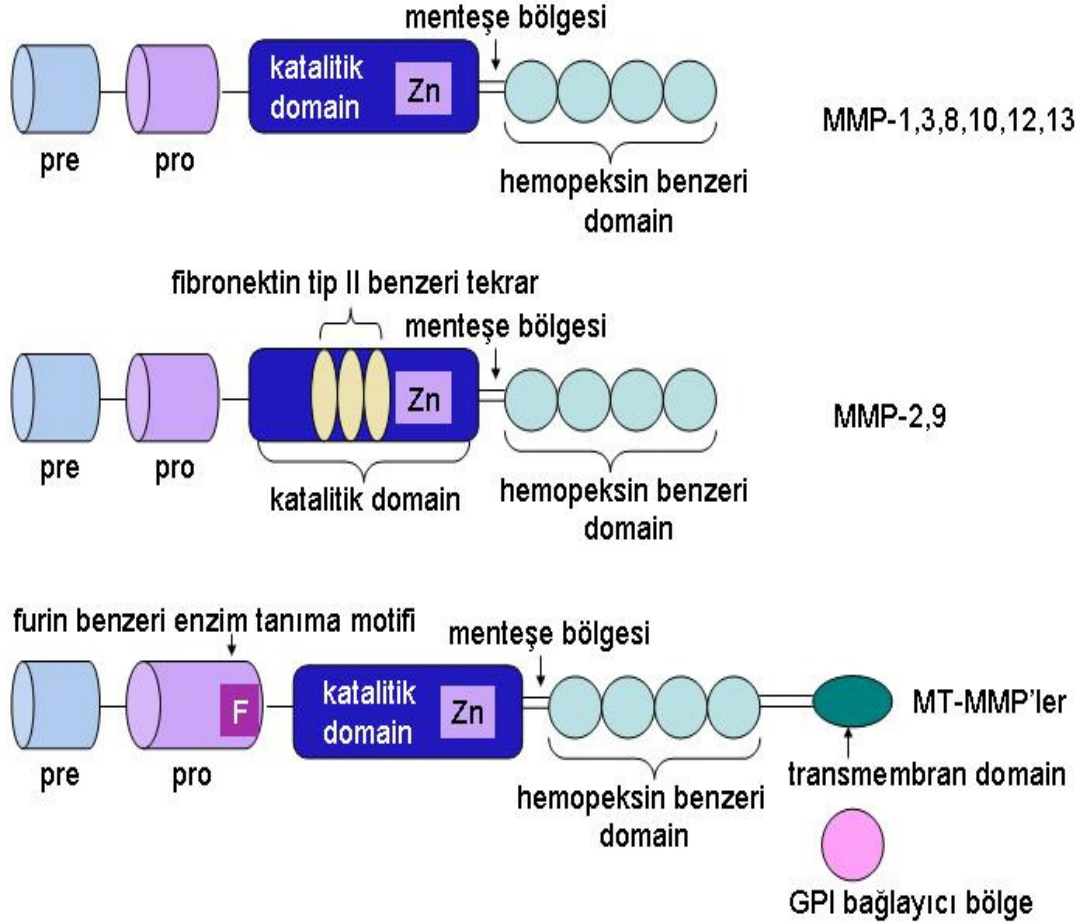
### 2.3.3. Matriks Metalloproteinazların Yapısı

Matriks metalloproteinazların primer yapısı incelendiğinde bu proteinlerin birkaç farklı bölge içerdiği görülmüştür (27).

1-“*Pre-domain*” bölgesi: İlk bölge; molekülü sekresyon için hedefleyen, ancak daha sonra uzaklaştırılan ve latent enzimde bulunmayan sinyal peptid dizesidir. 80-90 aminoasit içeren aminoterminal propeptiddir.

2- “*Pro-domain*” bölgesi: Yüksek derecede korunmuş PRCGVDPV dizesi içerir. Enzim aktive olduğunda çıkarılır. “*Pro-domain*” yapısında bulunan sistein rezidülerinin enzimin latent formunun korunmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Bu bölgenin çıkarılması, inaktif proenzimin aktif forma dönüşmesini sağlar.

3-Katalitik bölge: Histidin rezidüleri içeren, bakteriyel metalloproteinazlardan termolizine analog olan ve fonksiyonel stabilitenin korunması için gerekli olan çinko iyonunu içeren bölgedir. Yaklaşık 170 aminoasit içerir.



**Şekil 3.** MMP enzimlerinin moleküler yapısı (30)

4-Prolinden zengin bölge (menteşe bölgesi): Katalitik bölge ve son bölge arasında yer alır.

5-Hemopeksin benzeri bölge: Son kısımda hem bağlayan moleküllere dizin benzerliği nedeniyle, hemopeksin olarak adlandırılan bölge yer alır. Bu bölge N ve C terminal kısımlarını bağlayan disülfid bağı içerir ve katalitik bölgeye 5-10 aminoasitlik prolinden zengin bir bölge ile bağlanır. Matrilizin (MMP7) dışında tüm metalloproteinazlarda bulunur. Bu bölgenin fonksiyonu bilinmemekle birlikte substrat spesifitesini sağlama ya da plazminojen aktivatör ürokinaz sistemine analog olma özelliği ile, hücre yüzey reseptör alanını tanıma fonksiyonu gösterdiği ileri

sürülmüştür. Substrata bağlanma ve TIMP ile etkileşime girmedi fonksiyonel rolü vardır (27).

Bu genel yapının dışında; Jelatinaz A ve B; katalitik bölgelerinde fibronektinin kollajen bağlayan bölgesi ile ilişkili olan, sisteinden zengin jelatin bağlayan bir ekstra domain içerirler. Membran tipi metalloproteinazlar (MT-MMP) bir transmembran domain, stromelisin 3 ise furin benzeri bir kısım içerirler (Şekil 3)(27, 30).

Jelatinaz B ve MT- MMPnin tümü; tip V kollajenin  $\alpha$  zincirine benzer bir kısım içerirler.

#### **2.3.4. Matriks Metalloproteinaz Aktivitesinin Düzenlenmesi**

Latent zimojenler; MT-MMP'ler aracılığıyla, diğer proteazların etkisiyle veya önceden aktive olmuş MMP'lerin diğerlerini aktive etmesiyle aktiflenebilirler.

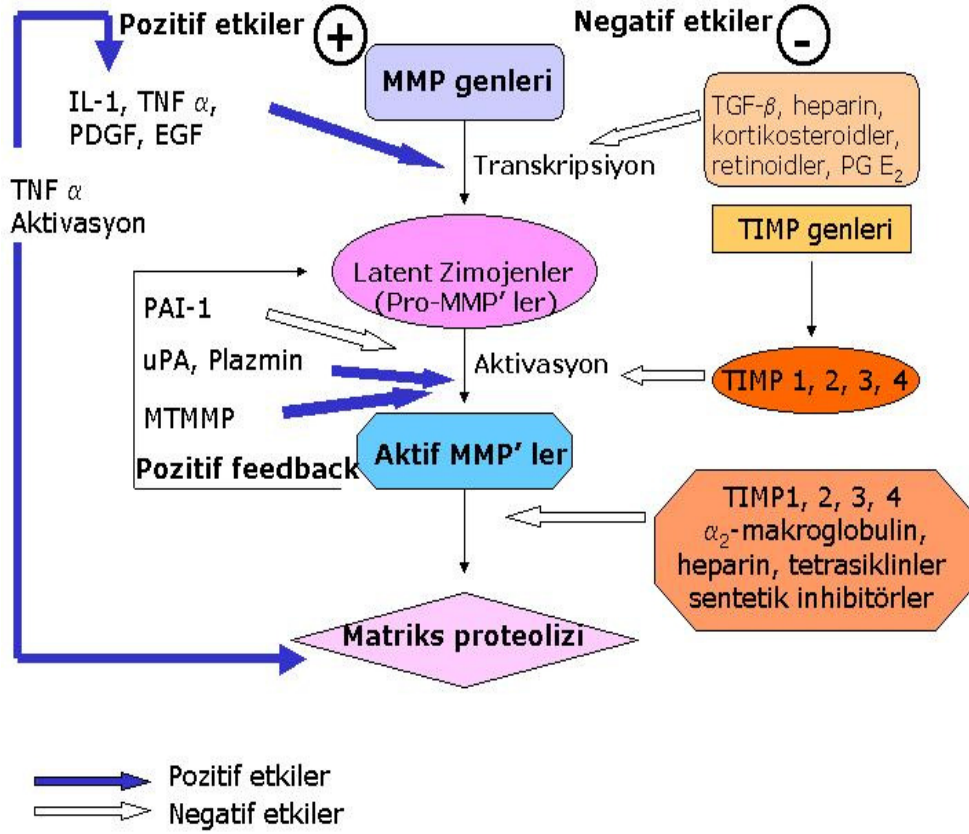
Matriks metalloproteinazların proteolitik aktiviteleri üç basamakta düzenlenir. Bunlar transkripsiyon, pro-enzimin aktivasyonu ve enzim aktivitesinin inhibisyonudur (Şekil 4)(30).

##### *2.3.4.1. Transkripsiyonel Düzenleme*

Matriks metalloproteinaz gen ekspresyonu tümör nekrozis faktör  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interlökin-1 (IL-1) gibi inflamatuvar sitokinlerle, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi birçok büyüme faktörü ve hormonlar ile stimüle edilir (Şekil 4). Transforme edici (dönüştürücü) büyüme faktörü-b (TGF-b), heparin, kortikosteroidler, retinoidler, prostaglandin E2 (PGE2) ve diğer eikozanoidler ise MMP gen transkripsiyonunu inhibe ederler (28, 30, 31).

##### *2.3.4.2. Proenzimin Aktivasyonu Aşamasında Düzenleme*

Matriks metalloproteinazlar sentezlendikten sonra inaktif proenzim (zimojen) olarak saliverilirler. "Pro-domain" yapısında bulunan sistein rezidülerinin enzimin latent formunun korunmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Bu bölgenin çıkarılması, inaktif proenzimin aktif forma dönüşmesini sağlar.



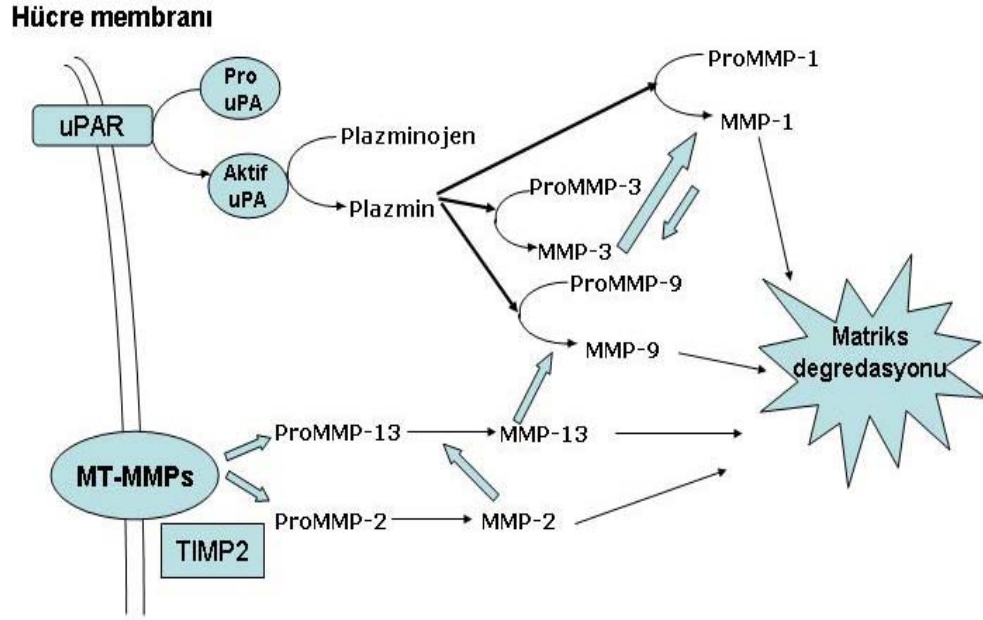
**Şekil 4.** MMP enzim aktivitesinin düzenlenmesi (30)

Matriks metalloproteinazların temel fizyolojik aktivatörü plazmindir. Çeşitli hücrelerde (endotel hücresi, monosit-makrofaj, düz kas hücresi) eksprese edilen ürokinaz-tip plazminojen aktivatörü (uPA)'nın aktif formunun plazminojeni plazmine dönüştürdüğü ve oluşan plazminin pro-MMP'leri aktive ettiği kabul edilmektedir (Şekil 5)(30).

Ürokinaz-tip plazminojen aktivatörü aracılığı ile oluşan aktivasyon kaskadı ile pıhtılaşma kaskadı arasında benzerlikler vardır. Ürokinaz PA aracılı aktivasyon kaskadında bir MMP'nin aktivasyonu, diğer bir MMP'nin aktivasyonuna yol açar, aktiflenen enzim bir diğer MMP'yi aktive edecek şekilde bir döngü oluşturur (Şekil 5)(30). Bu şekilde plazmin pro- formdaki MMP-1, MMP-3 ve MMP-9'u aktif formuna dönüştürür. Daha sonra MMP-3 pro-MMP-1'i MMP-1'e dönüştürür, MMP-1 de pro-MMP-9'u aktif formuna dönüştürebilir. MT-MMP'ler de diğer MMP'lerin özellikle MMP-2'nin aktivatörüdürler. Oluşturdukları proteolitik aktivasyon plazminojen/plazmin aktivatör sistemine benzer şekilde hücre yüzeyinde gerçekleşir (30).



Matriks metalloproteinaz-2 ve MMP-9 aktive olmuş doku makrofajları tarafından üretilen (özellikle aterosklerotik plak içindeki köpük hücre makrofajları) serbest radikal etkisiyle ESM içinde kendiliğinden aktive olabilir (30).



**Şekil 5.** MMP'lar için hücre yüzeyi ile ilişkili aktivasyon kaskadı (30)

#### 2.3.4.3. Matriks Metalloproteinaz Enzim Aktivitesinin İnhibisyonu

Matriks metalloproteinaz aktivitesinin kontrolünde spesifik doku inhibitörleri olan TIMP'ler anahtar rol oynarlar (27, 31, 32). Doku spesifik MMP'ler selektif gen ekspresyonu ve büyüme faktörleri, sitokinler, onkojenler, tümör promoterleri yoluyla aktive olabilirler (28).

İnsanlarda TIMP; 1, 2, 3 ve 4 olmak üzere tanımlanmış dört gruba ayrılır (30). TIMP'ler de MMP'ler gibi vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, kan hücreleri, bağ dokusu hücreleri ve makrofajlar tarafından sentez edilirler (30). TIMP'ler arasında matriksteki lokalizasyonları ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi yönünden farklar vardır. Değişik MMP türlerine göre de özgüllük gösterirler. Örneğin; Jelatinaz A (MMP-2) tercihen TIMP- 2 ile Jelatinaz B (MMP-9) ise TIMP-1 ile inhibe edilirler (30).

TIMP'ler bağ dokusu metabolizmasının düzenlenmesinde temel olan proteinlerdir. Pek çok dokuda ve vücut sıvılarında bulunurlar. MMP'lere irreversibl

ve non-kovalent biçimde bağlanarak latent enzim formunun aktivasyonunu ve katalitik aktivitenin sürdürülmesini de inhibe ederler. Böylece TIMP'ler MMP enzim aktivitesini ve MMP/TIMP dengesini sıkı kontrol altında tutarlar.

Bundan başka, genel proteinaz inhibitörü olarak bilinen ve yüksek molekül ağırlığı nedeni ile dokulara girmesi zor olan  $\alpha$ 2-makroglobulin), heparin, tetrasiklinler ve ve sentetik inhibitörler de aktif MMP inhibitörleri arasında yer alırlar (Şekil 4) (15, 29, 30,32, 33).

Ayrıca tetrasiklin analogları, non-selektif MMP inhibitörleri olarak kabul edilebilir. MMP molekülünün Zn içeren aktif bölgesine bağlanarak enzimde yapısal değişikliğe yol açarlar ve enzimin aktivitesini kaybetmesine neden olurlar (30).

Son yıllarda peptid ve non-peptid yapıda sentetik MMP inhibitörleri de üretilmiştir (109). Bu inhibitörler en çok kanser tedavisinde olmak üzere kardiyovasküler hastalıklar, artrit, psöriyazis, peridontal hastalık ve makula dejenerasyonu gibi farklı hastalıkların tedavisinde denenmektedir.

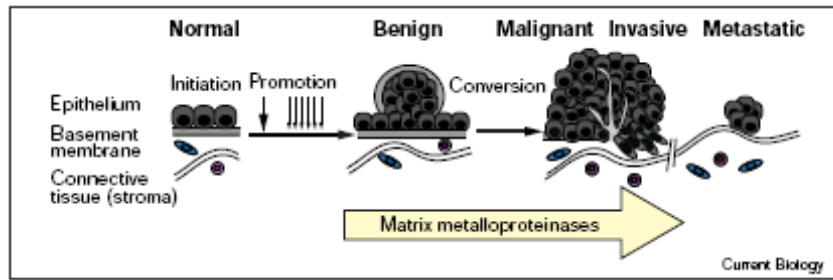
### **2.3.5. Kanser Progresyonunda Proteinazların Rolü**

Malign hücreler, invazyon ve metastaz yapma özelliğine sahiptirler. Kolorektal kanser hastalarında ölümün major nedeni tümör invazyonu ve metastazdır (3). Yaklaşık 25 yıldan daha uzun bir zamandır kanser yayılmasında proteazların rolü bilinmektedir. Sistein ve aspartat proteazları, proteinleri asit pH'da parçalarken, intrasellüler proteolitik aktiviteden de sorumludurlar. Kanser invazyonunda ekstrasellüler matriksin ve bazal membranın parçalanması önemli rol oynar. Bu parçalanma çeşitli ekstrasellüler proteolitik enzimler sayesinde olur. Bu enzimler matriksi parçalayan proteazlar olarak bilinirler.

Bu grupta serin proteaz ailesi (tPA sistemi) ile birlikte matriks metalloproteinaz ailesi yer alır. Serin proteazları ve metalloproteinazlar nötral pH'da aktivite gösterirler (10). Tümör ile infiltre olmuş stromal hücrelerde matriksi degrade eden proteaz sisteminin komponentleri saptanmıştır. Bu da kanser invazyon sürecinde stromal hücrelerin aktif rol oynadığını gösterir. Bu enzimlerin aktivitesi, proenzim aktivatörleri (uPA, MT-MMP), spesifik inhibitörler (PAI, TIMP) ve hücre yüzey reseptörleri (uPAR) ile düzenlenir. Matriks parçalanması, ekstrasellüler

matriks komponentlerinin üretimi, proteinaz üretimi ve proteinaz inhibitörlerinin üretimi arasındaki dengeye bağlıdır (27).

MMP'ler başlıca proteazlar olarak kolorektal kanserde yoğun olarak çalışılmıştır ve metastatik sürecin invaziv safhası için gerekli olduğuna inanılmaktadır. Tümör hücre migrasyonuna ana engel olarak tüm dokuların majör yapısal proteinleri kollajenler gösterildiğinden beri kollajenolitik enzimlerin kanser yayılımını kolaylaştırmadaki esas rolü oynadığı varsayılmaktadır (Şekil 6) (2,115).



**Şekil 6.** Tümör ve metastaz gelişiminde MMP'lerin rolü (115)

Tümör dokusunda, proteinaz düzeyleri normal kolorektal dokudakinden daha fazladır. ESM'deki proteolitik hasarın nedeni olarak yüksek proteinaz seviyeleri gösterilmiştir. Bu durum tümörlerin invazyon ve metastaz potansiyelini de etkiler (22,36). Proteinazların oluşturduğu ESM hasarı primer olarak, spesifik proteinaz inhibitörlerince normal ve patolojik dokunun her ikisinde de düzenlenir. Ne var ki kanserde bu proteinazlar normal olarak düzenlenemezler (36).

Aktif proteinazlar ve inhibitörleri arasındaki denge, metastatik kaskadın her bir evresinde ortaya çıkacak ESM yıkımı/ remodeling olup olmadığını belirlemede önemlidir (36).

Matriks metalloproteinazların artrit, yara iyileşmesinde, aortik anevrizmalar, konjestif kalp yetmezliği gibi birçok patolojik durumda rol oynadığı ileri sürülmektedir (36,37). Kronik obstrüktif akciğer hasarı (KOAH), akut akciğer hasarı, bronşiyal astım, pulmoner hipertansiyon gibi selim akciğer hastalıkları ile akciğer kanserinin MMP-9 ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (40).

Jelatinazlar kollajenleri, jelatinleri, fibronektini ve elastini parçalayabilirler. Bu enzimler katalitik bölgeye ilişmiş 3 kez tekrar eden fibronektin benzeri bölgeler içerirler. Jelatinaz B (MMP-9) kolorektal kanserler başta olmak üzere akciğer,

mesane, mide ve derinin yassı hücreli karsinomlarında makrofajlarında saptanmıştır. MMP-2 ve MMP-9 bazal membranın majör komponenti olan kollajen IV'ün yapısını bozarlar (22). MMP-2 ve MMP-9 malign dokularda en fazla belirlenen, tümör saldırganlığı ve metastatik potansiyelle ilişkili olduğu saptanan MMP'lardır (38-39).

Diğer bir MMP, interstisyel kollajenaz (MMP-1) meme, beyin, mide, baş boyun kanserlerinde saptanmıştır. Kolorektal kanserlerde *insitu* hibridizasyon (İSH) tekniği ile eozinofil ve fibroblastlarda artmış MMP-1 düzeyi gösterilmiştir. Kolorektal kanser hücrelerinde MMP-1'in Duke's evrelendirmesinden bağımsız olarak kötü prognozla birlikte olduğu gösterilmiştir (2). Bazal hücre karsinomlarında stromal hücrelerde MMP-1 düzeyinin artışı, immünohistokimyasal (İHK) yöntemlerle gösterilmiştir. Mide kanserinde tümör stromasının makrofaj ve fibroblast benzeri hücrelerinde lokalize olmuştur (27).

Stromelizin-1 (MMP-3) ve stromelizin-2 (MMP-10) bazal hücreli kanserde, baş boyun yassı hücreli karsinomlarında, prostat, mide, kolon ve pankreas karsinomlarında saptanmıştır. Yine, stromelizin-3 (MMP-11) baş boyun, mide, kolorektum, karaciğer, akciğer, böbrek, deri ve pankreas kanserlerinde stromada artmış olarak bulunurken neoplastik epitelde lokalizasyonu saptanmamıştır. İnvaziv meme kanserinde *in situ* meme kanserinden daha fazla olması ve kolorektal kanserde gözlenirken benign kolon adenomunda gözlenmemesi, MMP-11'in giderek artan miktarlarının tümörün invaziv olma potansiyeli ile doğru orantılı olduğunu düşündürmektedir. Ne varki, tüm matriks MMP'ları tümör gelişiminin destekçisi değildir. Gerçekte MMP-12 ekspresyonunda artış, tümör büyümesinin inhibisyonunda rol oynar. Tümör dokusunda MMP-12'nin aşırı ekspresyonu, kolorektal kanserli hastalarda sağ kalım artışıyla ve tümör neovaskülarizasyonunda azalışla anlamlı derecede pozitif ilişkili bulunmuştur (2).

Pro MMP-9'un aktivasyonunda MMP-13'ün rolü vardır. MMP-13'ün tümörlerde normal dokulara göre arttığı bildirilmiştir (2).

Matrilizin (PUMP-1, MMP-7) düzeyleri mide, meme, prostat, ve kolorektal kanserde artış göstermektedir. Kolorektal kanserlerde de tümörün geç evrelerinde matrilizin düzeyleri yükselir. Atipik malign tümörlerden olan ve metastaz yapmayan bazal hücreli karsinomlarda ise matrilizin düzeylerinde artış izlenmemiştir. Bu da matrilizin düzeylerinin tümör progresyonunda önemli bir rolü olduğunun kanıtıdır.

Membran tipi MMP'ler (MT-MMP) jelatinaz aktivasyonunda rol alırlar. Jelatinaz aktivasyonu, tümör hücrelerinin göçü için önemlidir. MT-MMP'lerin mRNA ve proteini mide kanserinde neoplastik bölgede kolon, meme, baş boyun kanserinde ise stromada saptanmıştır (27).

Son derece potent olan bu endopeptidazların regülasyonunda çeşitli sitokinler, büyüme hormonları, perisellüler ortam, hücre matriks ilişkisi ve ekstrasellüler matriks rol oynar. Bu enzimlerin ekstrasellüler aktivasyonlarının kontrolünde endojen inhibitörlerle olan inaktivasyon da oldukça önemlidir. Spesifik doku inhibitörleri olan TIMP'ler, metalloproteinazların aktif ve/veya inaktif formlarına sıkı bir şekilde, 1:1 oranında sitokiyometrik olarak bağlanırlar (3, 22, 78, 80, 15).

Metalloproteinazların spesifik doku inhibitörleri (TIMP) *in vivo* koşullarda bu enzimlerin aktivitesinin regülasyonunda önemli rol oynarlar, tümör invazyon ve metastazını reversibl olarak inhibe ederler.

Dokudaki ve ekstrasellüler sıvıdaki TIMP konsantrasyonları genellikle MMP konsantrasyonlarından fazladır. Böylece doğal inhibitörler fokal perisellüler bölgede enzimin proteolitik etkisini sınırlar (81). TIMP'lerin transkripsiyonu MMP'lere benzer şekilde sitokinler (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6) ve büyüme faktörlerince (TGF $\beta$ ) düzenlenir (81). MMP'lar ve TIMP'ler arasındaki oran çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde değişmekte olup aradaki dengedeki değişiklikler farklı tabloların patogeneğinde önemli roller oynayabilmektedir (27).

Kolorektal kanserlerde hem TIMP1 protein hem de mRNA'sı stromada fibroblastlarda izlenmiştir. Hastalığın ilerlemesi ile düzeylerinin arttığı bildirilmiştir. TIMP-1 karsinomlarda benign adenomlardan, adenomlarda da normal mukozada olduğundan daha fazla oranda saptanmıştır. Artan miktarların tümörün invaziv olma özelliği ile doğru orantılı olduğu söylenebilir (17). TIMP-1 MMP-9'un primer inhibitörüdür. MMP-9/ TIMP-1 oranındaki bir dengesizliğin adenomların karsinomlara ilerlemesinde potansiyel bir sebep olabileceği düşünülmektedir (81).

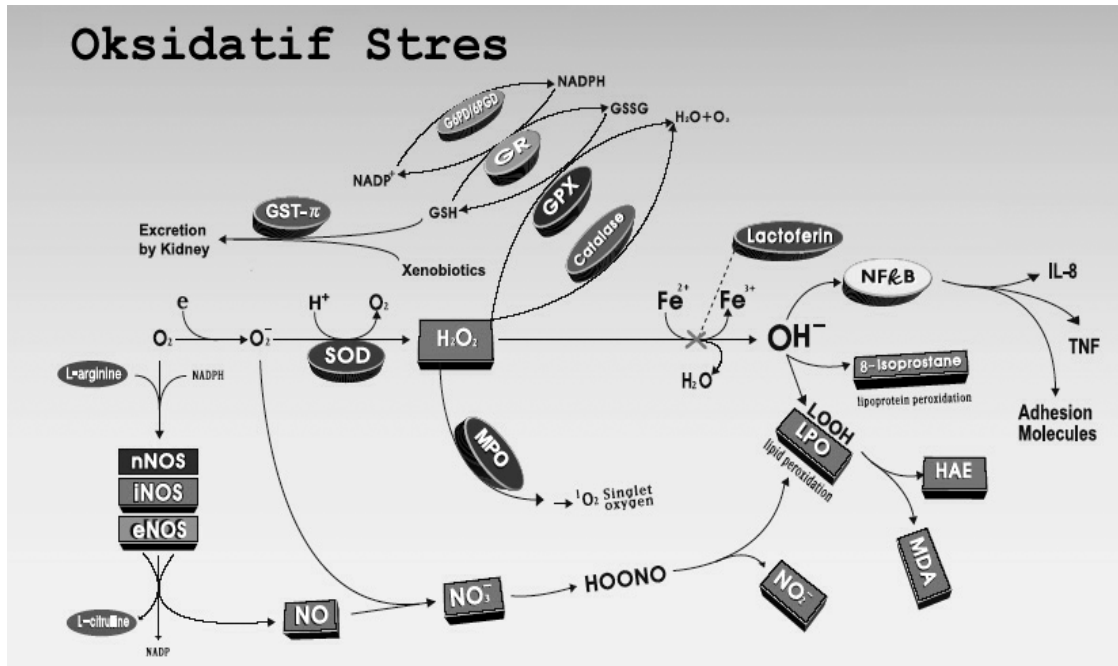
TIMP-2 ekspresyon düzeyinin tümör invazyon derinliği, lenf nodu metastazı ve tümör Duke's sınıflaması ile tedricen arttığı bildirilmiştir (3).

Matriks metalloproteinaz-2 ve TIMP-2 arasındaki denge ise ESM bütünlüğü ve homeostazının korunması için mutlak gereklidir. Kolorektal kanserin invazyon ve metastazında MMP/TIMP arasındaki dengenin bozulmasının önemi

vurgulanmıştır. TIMP-2'nin MMP-2 aktivasyonunda inhibitör etkisi ve MMP-2 aktivasyonu için majör kofaktör olarak kolorektal kanserde çifte rol oynadığı düşünülmektedir. TIMP-2 ekspresyonunun artması kolorektal kanserlerin geç evrelerinde kötü prognoz göstergesidir (3).

## 2.4. KOLOREKTAL KANSER VE OKSİDATİF STRES

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme, bu dengenin bozulmasına neden olur. Serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizlik "Oksidatif stres" olarak adlandırılır ve sonuçta doku hasarına yol açar (Şekil 7) (42).



Şekil 7. Oksidatif Stres (42)

Oksidatif stres geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz hücre hasarına yol açar. Oksidatif stres; akut ya da kronik olabilir. Örneğin iskemi-reperfüzyonda, kısa süreli bir oksidatif stres varken, kronik inflamasyonda uzun süreli bir oksidatif stres vardır. Bu tür uzun süreli oksidatif stres kanser gelişiminde rol oynar (41).

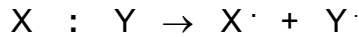
Oksidatif streste doku veya hücrede oluşan serbest oksijen radikalleri (SOR)'nin konsantrasyonu antioksidan kapasiteyi aşmıştır.

## 2.4. SERBEST RADİKALLER

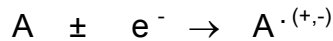
Serbest radikal üreten birçok bileşiğin, *in vivo* olarak tümörleri ilerlettikleri gösterilmiştir. Peroksit ve hidroperoksitler de aynı etkiyi gösterirler. Serbest radikaller kanserin başlangıç, gelişme ve ilerleme safhalarında etkili olmakla beraber bu etki ilerleme safhasında daha belirgin, diğer safhalarda ise nisbeten azdır. Serbest radikal etkisi sonucu DNA ve kromozomlarda kırılma ve onkogenlerde aktivasyon meydana gelir (10).

Serbest radikaller için birçok tanım yapılmasına rağmen otoritelerin üzerinde birleştiği tanım; bir serbest radikalın moleküler ya da atomik yörüngesinde bulunan ve genelde çok reaktif olan eşleşmemiş elektron bulunduran bir kimyasal ürün olduğu şeklindedir. Atomlardaki elektronlar yörünge olarak bilinen boşluklarda hareket ederler. Her yörüngede birbirine zıt yönde hareket eden en fazla iki elektron bulunur. Bir serbest radikal çeşitli yollarla ortaya çıkabilir:

1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar. Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır.



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.



Serbest radikaller; pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşurlar. Her ne kadar serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da, serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır.

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve yapılarının bozulmalarına neden olurlar. Biyolojik sistemlerdeki süperoksit anyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ) hidroksil radikali ( $OH\cdot$ ), nitrik oksit ( $NO\cdot$ ), peroksil radikali ( $ROO\cdot$ ), ve radikal olmayan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi serbest

oksijen türleri oksidatif stresin en önemli nedenlerini oluştururlar. Serbest radikal zincir reaksiyonları genellikle, moleküllerden H'nın uzaklaştırılmasıyla başlar. Lipid peroksidasyonu (doymamış yağ asitlerinin hücre membranlarında ve lipoproteinlerdeki oksidasyonu) serbest radikal zincir reaksiyonu için iyi bir örnektir. Bu reaksiyonun özellikle aterosklerozun gelişiminde çok önemli olduğu araştırmacıların savları arasında bulunmaktadır. Mitokondriyal elektron transport zincirinde oksijenin tamamlanmamış redüksiyonu, sigara içimi, radyasyon gibi çeşitli faktörler oksidatif strese neden olabilirler (42).

Tümör gelişimi ile serbest radikaller arasında bir ilişki olup serbest oksijen radikallerinin karsinogenezin farklı basamaklarında önemli rol oynadığı anlaşılmıştır. Bu maddeler özellikle organizmada antioksidan sistem bozulmuş ise lipid peroksidasyonunu başlatarak membran ileti sistemine hasar verebilirler. Yine genlerin büyüme ve diferansiasyonunu değiştirerek mutagenез ve karsinogenezde etkin olabilirler. Tüm bu olaylar hidroksiradikallerin pürin ve pirimidin bazlarına etkisiyle nükleer seviyede ve/veya lipid peroksidasyonu ile de hücre membranı düzeyinde gerçekleşmektedir (49).

### **2.5.1. Serbest Radikallerin Hasar Mekanizması**

Serbest radikaller bütün hücrel makromoleküllerle reaksiyona girebilirler. Hücrel hasar oluşumunda özellikle üç tip reaksiyon önemlidir:

#### *1. Proteinlerin oksidatif modifikasyonu*

Serbest oksijen radikalleri, aminoasit yan zincirleri oksidasyonuna neden olarak protein-protein bağlarının oluşmasına yol açarlar. Ayrıca protein yapısında, ana zinciri okside ederek proteinlerin parçalanmasına neden olurlar. Böylece hücrede fonksiyonel önemi olan enzimlerde bozulmalar ortaya çıkar.

#### *2. DNA hasarı*

Serbest oksijen radikalleri, nükleer ve mitokondriyal DNA'da timin ile reaksiyona girerek tek zincir kırılmaları oluşturur. Sonuçta hücrelerin enerji kaybetmeleriyle nekrotik tipte hücre ölümü olur.

#### *3. Lipid Peroksidasyonu*

Serbest radikallerin aracılık ettiği hücrel hasarda lipid peroksidasyonu önemli bir mekanizmadır.

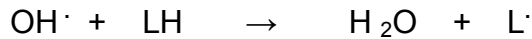


Serbest oksijen radikalleri, plazma ve organel membranlarında lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Hidroksil radikali membran lipidleri ile çift bağ yapar, böylece lipid-radikal etkileşimi ile zincirleme reaksiyon sonucu pek çok lipid peroksidasyon ürünü (malondialdehid (MDA), dien konjugatları gibi) oluşur. Eritrosit membranlarının, lipozomal membranların (özellikle hücre ve mitokondri) okside olması ile bu yapıların fiziksel ve kimyasal özellikleri değişir. Membranın iyon geçirgenliği bozulur. Eritrositlerde hemoliz olur. Böylece yaygın membran, organel ve hücre hasarı ortaya çıkar (49).

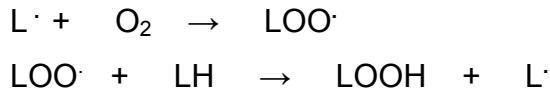
Lipid peroksidasyonu sırasında karbon bağlarının kopması ile aldehid yapısında yıkım ürünleri ortaya çıkmaktadır. Bu sitotoksik metabolitler MDA gibi alkaneller ve 4-hidroksinonenal gibi hidroksialkanellerdir (49). MDA lipid peroksidasyonunun son ürünüdür. Hücre membranında lipid peroksidasyonu, membran lipid içeriği ve dağılımındaki değişikliklerin göstergesidir. Böylelikle hücre membranında oluşan direk hasarla reaktif karbon ürünleri oluştukları yerden daha uzak alanlara yayılarak bu bölgelerde doku hasarına sebep olabilirler (48).

Lipid peroksidasyonunda zincirleme reaksiyonun başlatılması için tetikleyici bir faktör gereklidir. Sözü edilen bu faktörün OH<sup>·</sup> radikali olduğu kabul edilmektedir. Lipid peroksidasyonu, poliansatüre yağ asitlerinin zincirleme bir radikal reaksiyonudur ve üç aşamadan oluşur. Bunlar:

*Başlatma (initiation) safhası:* OH<sup>·</sup> radikali, bir yağ asidinin (LH) metilen molekülünden bir hidrojen atomu (H) kopararak bir lipid radikali (L<sup>·</sup>) oluşturur. Bu reaksiyon hem membran lipidleri hem de besinsel yağlar için geçerlidir.

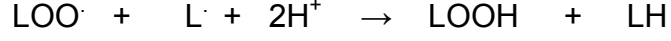


*İlerleme ve yıkım (propagation, degradation) safhası:* Zincirleme reaksiyona uğrayan lipid radikale O<sub>2</sub> ilavesi ile devam eder ve lipid peroksil radikali (LOO<sup>·</sup>) ile lipid peroksit oluşur. Tek elektron üzerinden yeniden yapılanma lipidin parçalanması ile sonuçlanır.



Lipid peroksidasyon ürünlerinden biri de MDA'dır. Malondialdehid plazmada çözünür olduğundan idrarda da saptanabilir. Açığa çıkan diğer ürünler ise, 4-hidroksinonenal ve 4- hidroksi-2,3-transnonenaldır.

*Sonlanma (termination) safhası:* Zincir reaksiyonu antioksidanlar tarafından sonlandırılabilir.



Yaşlanma, koroner kalp hastalıkları ve kanser başta olmak üzere birçok hastalıkta lipid peroksidasyonunun önemli rol oynadığı bilinmektedir. Birçok çalışmada tümörlerde lipid peroksidasyonunun arttığı bildirilmiştir. Lipid hidroperoksitler doğrudan DNA zincirini kırabilir ve lipid peroksil ve alkoksil radikalleri DNA'da oksidasyona sebep olabilir. Okzoaldehidler; DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece, kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar. Lipid peroksidasyonunun ikinci bir ürünü olan MDA doku reaksiyon zincir hızının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (50).

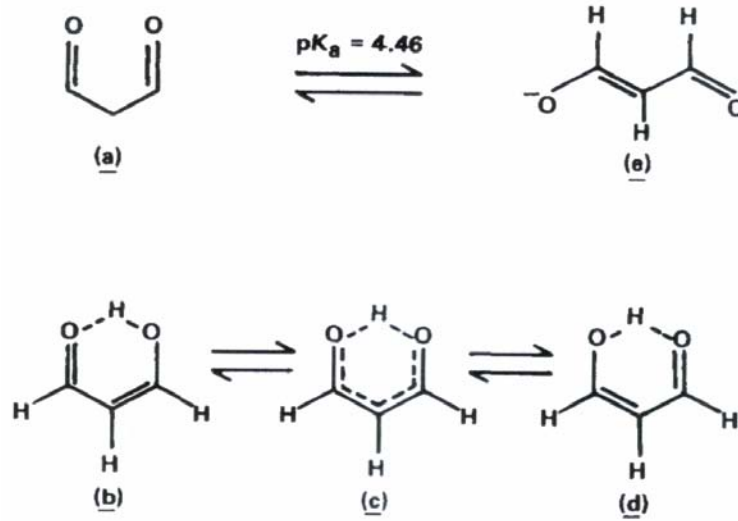
## **2.6. MALONDİALDEHİD**

Oksidatif hasarın *in vivo* göstergesi olarak en çok kullanılan belirteç serbest radikallerin doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girmesiyle oluşan lipid peroksidasyonunun yıkım ürünlerinden olan MDA'dır. Malondialdehidin hücre membranlarının geçirgenliğini artırdığı, membranların iyon alışverişine etki ederek hücre içi iyon dengesini bozduğu, enzim aktivitelerinin bozulmasına, DNA'nın yapısında kırılmalara ve baz değişimlerine neden olduğu gösterilmiştir (52).

Malondialdehid; membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Bu da membranda deformasyon yapar, iyon transportu, enzim aktivitesi gibi membran fonksiyonları etkilenir.

### **2.6.1. Malondialdehid'in Yapısı**

Malondialdehid uçucu, düşük molekül ağırlıklı ( $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$ ; formül ağırlığı: 72.07), kısa zincirli, 1,3-dikarbonil bileşiği ve orta derecede zayıf bir asit'tir (pKa: 4.46) (Şekil 8).



**Şekil 8.** MDA'nın kimyasal yapısı

Serbest formda veya çeşitli doku komponentleriyle kompleks yapmış olarak bulunabilen MDA, poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı sonucu son ürün olarak oluşabilir. Memelilerde bu yağ asitleri en çok araşidonik asit ve dokosaheksanoik asittir. Oleik asit ve linoleik asidin oksidasyonundan çok az MDA oluşur. Bazı dokularda MDA enzimatik reaksiyonlar sonucu da oluşabilir.  $\text{PGH}_2$ ,  $\text{PGH}_3$  ve  $\text{PGG}_2$ 'den tromboksan sentetaz kataliziyle 1:1:1 oranında MDA, tromboksan  $\text{A}_2$  ve 17 karbonlu bir bileşik oluşur. Bununla birlikte esas kaynağı, doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonudur. MDA çoklu doymamış yağ asitlerinin yapısında molekül içi yeniden düzenlenme esnasında oluşan endoperoksidlerin yıkımının geç evreleri sırasında oluşur. Bu yeniden düzenlenme yağ asitlerinin alifatik zinciri üzerinde oluşan serbest radikalleri stabilize etmek için gereklidir. Bu durumda, linoleik asit gibi iki çift bağ içeren yağ asitleri peroksidasyon esnasında MDA oluşturabilmesine rağmen, üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitleri, biyolojik örneklerde, MDA'nın esas kaynağıdır.

Malondialdehid, sulu çözeltilerde  $\text{P}^{\text{H}}$ 'a bağlı olarak çeşitli formlarda bulunabilir. MDA'nın sulandırılmış asit veya nötral çözeltileri (<25mM)  $+4^\circ\text{C}$ 'de 20 gün saklanabilir. Yüksek konsantrasyonlarda özellikle oda ısısında veya uzun süre bekletildiğinde MDA çözeltilerinde aldol tipi kondensasyon oluşur.

## 2.6.2. Malondialdehid'in Metabolizması

Doku lipid peroksidasyonu esnasında oluşan MDA, hücresel düzeyde metabolize edilir. Örneğin, karaciğer aldehid dehidrojenaz tarafından ya da bir mitokondrial yolla enzimatik olarak yıkılır ve/veya vücuttan atılır.

Ekzojenik olarak uygulanan MDA hızlıca ve uniform olarak bütün esas majör organlar boyunca dağılır. Doku MDA'sındaki herhangi bir azalma esas olarak  $\text{CO}_2$  ve daha az ölçüde asetil ve malonil-koenzim A (daha sonra anabolik yollara girerler) oluşacak şekilde aldehid dehidrojenaz tarafından MDA kökenli asetaldehidin oksidasyonunu yansıtır. MDA kökenli malonat yoluyla alternatif bir metabolizmanın sınırlı aktivitesini gösteren kanıtlar da vardır. Birkaç farklı aldehid dehidrojenaz MDA'yı indirgeyebilir. MDA dozajından sonra, asit-labil MDA metabolitleri, çok az serbest MDA ile birlikte idrarla atılır. MDA'nın majör idrar metabolitlerinin, N-asetil- $\epsilon$ -(2-propen) lizin gibi, amino grupları yoluyla MDA ile reaksiyon yapmış protein, fosfolipid ve nükleik asitlerin yıkımından ortaya çıktığı görülmektedir.



Şekil 9. *In vivo* MDA katabolizmasının potansiyel yolları

Ana katabolik yol ara maddeler olarak malonik semialdehid ve asetaldehid ve ürün olarak CO<sub>2</sub>'i (Şekil 9) içerir. MDA'nın malonik semialdehitten CO<sub>2</sub> veya CoA ara maddelerine dönüşümünde anahtar enzim/ metabolik yollar: (a) aldehid dehidrojenaz; (b) dekarboksilaz; (c) asetil-CoA sentaz; (d) asetil-CoA karboksilaz; (e) trikarboksilik asid siklusu.

## 2.7. NİTRİK OKSİT (NO<sup>•</sup>)

Nitrik oksit, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, düz kasların gevşemesi, vazodilatasyon ve nörotransmisyonu içeren çeşitli fizyolojik süreçlerde görev alan önemli bir pro-oksidatif ve antioksidatif sinyal molekülü olmakla birlikte aynı zamanda çok reaktif bir radikaldir. Nitrik oksit molekülü bir atom azot ile oksijenin eşleşmemiş elektron vererek birleşmesinden oluşması nedeniyle radikal tanımına uymaktadır.

1980'lerde Furchgott ve Zawadski izole arter preparatlarında, asetilkolinle oluşturdukları gevşemenin, endotele bağımlı olduğunu göstermişlerdir. Çünkü asetilkolinle oluşan bu gevşeme, arteryel endotel uzaklaştırıldığında veya harap edildiğinde görülmemiştir (54). 1987'de Ignarro ve arkadaşları ile Palmer ve arkadaşları (55) ayrı ayrı yaptıkları çalışmalarda, EDRF'yi damar endotelinden izole etmişler ve bu yapının dominant kısmının NO<sup>•</sup> olduğunu tespit etmişlerdir.

İnflamasyon gelişmesinde; nitrojenin reaktif metabolitlerinin artmış üretiminin patofizyolojik bir rolü vardır. İnsan inflamatuvar barsak hastalığı ve intestinal inflamasyon oluşturulmuş hayvan modellerinde NO<sup>•</sup> düzeyleri artmıştır (8).

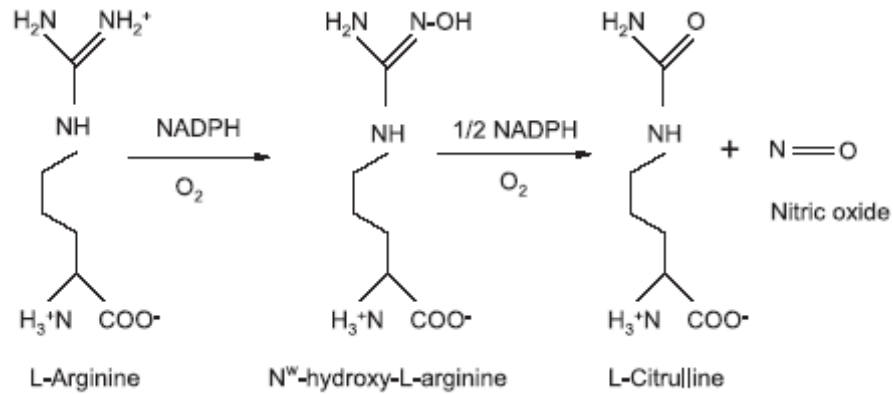
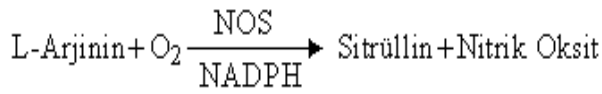
Nitrik oksit MMP'ların sentez ve salınımının regülasyonunda da önemlidir. Yakın zamanlı çalışmalarda MMP-2 ve MMP-9 yapımı ve sekresyonunda NO<sup>•</sup>'nun olası rolüne dikkat çekilmiştir (7).

### 2.7.1. Nitrik Oksit Metabolizması

Nitrik oksit, L-argininden sitrülün oluşumu sırasında, L-argininin guanidin nitrojen grubunun hidrosilasyonu ile oluşan ara üründür (Şekil 10). Bu reaksiyon bir dizi nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından katalize edilir. Nitrik oksit, argininden NOS enzimi aracılığıyla sentezlenir. NOS'in genetik olarak farklı üç izoformu tespit edilmiştir. Bunlar; düşük miktarda üretilerek vasküler tonüsü ayarlayan bir konstitutif

endotelial izoform (eNOS), yine düşük miktar üretilen sinaptik şekillenme ve nörotransmisyonu düzenleyen bir konstitutif nöronal izoform (nNOS) ve yüksek miktarda üretilerek, immün/inflamatuar olaylarda rol alan ve hücre aracılı immün cevapta etkili bir komponent olan uyarılabilir form (iNOS)'dur. nNOS ve eNOS izoenzimleri NO<sup>•</sup> üretimi için Ca kalmodulin kompleksine bağımlıdır, buna karşın iNOS bundan bağımsızdır (53).

Bu reaksiyon için ortamda oksijen ve bazı diğer ko-faktörlerin nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN), tetrahidrobiopterin ve kalmodulin bulunması gerekir (62).



### Şekil 10. L-argininden nitrik oksit (NO<sup>•</sup>) sentezi

Nitrik oksit, L-argininin L-sitrüline dönüşümü sırasında sentezleniyor. Bu reaksiyon esnasında 1,5 molekül NADPH, elektron vericisi olarak kullanılıyor. Hidroksi-arginin ara ürün olarak oluşmuştur (26).

### 2.7.2. Nitrik Oksit Yapısı ve Özellikleri

Renksiz ve son derece toksik bir gaz olan NO<sup>•</sup> serbest radikal yapısında olmasından dolayı yarı ömrü çok kısadır. Düşük konsantrasyonlarda toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevlerin gerçekleşmesinde rol oynar.

Havadaki NO<sup>•</sup> oksijenle oksitlenerek çok kısa sürede NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrit) ve NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrat) oluşturur. NO<sup>•</sup>'in açık formülünde görülen eşlenmemiş elektronu, azot ve

oksijen atomları üzerinde yer değiştirerek rezonans stabilitesi sağlar, reseptörden bağımsız olarak membranlardan kolayca diffüze olabilir (56-57). Tüm bu özellikleri NO'e haberci molekül özelliği kazandırmaktadır (56). Ayrıca su ve oksijen varlığında, 3-20 sn gibi çok kısa yarı ömrü vardır, kolayca oksitlenir. Böyle bir ortamda NO· bir dizi nitrojen oksitlerine (NOx) dönüşebilir.

Nitrik oksit ve tekrar NO'e dönüşebilen nitrojen oksitleri (NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> vb) güçlü nitroze edici ajanlardır ve primer ile sekonder aminleri nitrozleyerek, nitrozaminleri oluştururlar. Nitrozaminler; potansiyel karsinojeniktirler. Çünkü bu bileşikler DNA'da, nitrozilasyon, deaminasyon yapabilir ve alkil nükleofillerin oluşumuna neden olabilirler.

Yapısal NOS tarafından yapılan nitrik oksit, hücreler arası ve hücre içi haberleşmede rol oynar. Yapısal NOS enzimleri, ortamdaki kalsiyum konsantrasyonlarının artışından etkilenirken iNOS etkilenmez. Yapısal NOS çeşitli organ sistemleri için bazal seviyelerde gereklidir. Tiol grupları ile reaksiyona girerek gerektiği zamanlarda kullanılmak üzere depolanır. Nitrik oksit, pankreasın asiner hücrelerinde guanozin 3.5 siklik monofosfat (cGMP) sentezini düzenler. Guanozin 3.5-siklik monofosfat, böbrekler ile beyinde atrial natriüretik faktör, yapımı düz kasların gevşemesi, retinada fototransdüksiyon ve enterotoksinlerle ilişkili olarak ince barsaklarda sıvı salınımını etkiler. Arterlerde venlerden daha fazla NO· üretilir. Nitrik oksit demir sülfür içeren ve trikarboksilik asit siklusunun enzimi olan cis-akonitaz ile gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenazın tiyol (SH) gruplarına bağlanır. Normal fizyolojik koşullarda NO konsantrasyonları 100-500 nM düzeylerinde iken endotoksin, α-interferon, IL-1, TNF-α gibi ajanlarla iNOS'un tetiklenmesi sonucunda düzeyleri yaklaşık on kat artar. Hastalık ve sonuçlarına bağlı olarak NO· zararlı veya yararlı etkiler gösterebilir (117).

Nitrik oksit bir kez sentezlendikten sonra hızla hedef dokulara yayılır ve hücre içinde guanilat siklaz enzimini aktive ederek düz kas kasılmasını sağlayan "siklik guanozin monofosfat" (cGMP) miktarını artırır (62). Oluşan bu biyokimyasal olaylar düz kas kasılması, vasküler tonüs ve kan akımlarının düzenlenmesinde önemli rol oynar. Nitrik oksit aynı zamanda trombositler içindeki çözülebilir guanilat siklaz aktivitesini de artırarak trombosit adhezyon ve agregasyonunu azaltır. Ayrıca mikroorganizmaların mitokondrial proteine bağlı demir bileşikleriyle reaksiyona girip

DNA sentezini bozarak ölmelerine yol açar ve savunma sisteminde rol oynar. Nitrik oksit, kardiyovasküler sistem, sinir sistemi ve immünolojik sistemde bir çok fizyolojik ve patolojik mekanizmaların düzenlenmesinde çok önemli intra ve intersellüler sinyal taşıyan bir moleküldür (62).

Nitrik oksit damar düz kaslarını gevşetir, trombosit agregasyonunu inhibe eder, kan basıncını düşürür, anjiyogenezi stimüle eder, nöronal sinyal iletimini sağlar. iNOS vasıtasıyla mikroorganizma tahrip edici NO<sup>•</sup> sentezlemek için makrofajları aktive eder (63). Nitrik oksit diğer bir yandan da, inflamatuvar bozukluklarda sitotoksik bir ajan olarak hareket edebilir.

### **2.7.3. Nitrik Oksit ve Kanser**

Nitrik oksit; vazodilatasyon, nörotransmisyon, anjiyogenez, apoptoz ve tümör progresyonu gibi birçok olayda rol oynayan bir mediyatördür. Yakın zamanda yapılan çalışmalar NO<sup>•</sup>'in en az iki mekanizma ile tümör gelişimi ile ilgili olabileceğini göstermiştir. Bunlardan birincisi, anjiogenezin stimülasyonu, diğeri ise DNA üzerinde serbest radikallerin direk aktivasyonu ile artmış mutagenesidir (68). Ek olarak, tümör hücrelerinden NO<sup>•</sup> salınımı, NO<sup>•</sup>'in antiproliferatif etkisi aracılığı ile tümör ile uyarılan immünsupresyonda rol oynayabilir (69). Birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışmada NO<sup>•</sup>'in anjiyogenezi hızlandırdığı gösterilmiştir. Anjiyogenezin tümörün büyüme ve yayılımındaki en önemli faktörlerden olduğu bilinmektedir. NO<sup>•</sup>'in endotelial hücre büyümesini indüklediği ve tümör kan akımını düzenlediği gösterilmiştir.

Karsinogenezde bozulan apoptozisin tümör gelişiminde önemli bir faktör haline gelmesine yol açar. İnflamatuvar süreçte meydana gelen olaylar kolorektal tümörler gibi kanserlerin gelişmesinde önemli risk faktörlerini oluştururlar. Kolorektal kanser gelişmesinde inflamatuvar süreç bir risk faktörüdür. Aktive olmuş immün sistem hücrelerinde NO<sup>•</sup> üretiminin artmış bulunması NO<sup>•</sup> ve kanser gelişimi arasında bir bağ olduğunu düşündürmektedir. İnsan kolon adenomlarında gözlenen NOS izoformlarındaki artış, kolon kanseri gelişimi sürecine önemli katkılarda bulunur (64).

Nitrojenin reaktif metabolitlerinin üretimindeki artış, inflamasyon gelişiminde önemli bir patofizyolojik role sahiptir. Hayvan modellerindeki intestinal inflamasyon ve insan inflamatuvar barsak hastalığı NO<sup>•</sup> üretimi ve iNOS'un



ekspresyonunda artışla karakterizedir. iNOS, kolon epitelyal hücrelerinden proinflamatuvar stimulusa cevap olarak eksprese olur. İnflamatuvar odak içinde NO<sup>•</sup>, superoksit anyonuyla reaksiyona girebilir, sonuçta peroksinitrit üretimi sayesinde oksidatif doku hasarı meydana gelir ki kolon inflamasyonunda NO<sup>•</sup>'in yıkıcı etkilerinin aracılık ettiğine inanılmaktadır (68).

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda kanserde NO<sup>•</sup> ve iNOS'un aktivitesi çalışılmıştır. Bulunan sonuçlarda genellikle NO<sup>•</sup> ve iNOS'un arttığı gösterilmiştir. Fakat kolorektal kanserli hastalarda bulunan sonuçlar halen tartışmalıdır. Birçok çalışmada normal mukoza ile karşılaştırıldığında tümör dokusunda NO düzeyleri yüksek bulunmuşken, tersi sonuçlar da gösterilmiştir.

Nitrik oksitin protümör özellikleri kadar antitümör özelliklerinin de olduğu bilinmektedir. Düşük konsantrasyonlarda tümör büyümesini stimüle eder ve birçok hücre tipini apoptozdan korur. Yüksek konsantrasyonlarda ise hücre büyümesini inhibe eder ve apoptozu indükler. NO<sup>•</sup>'in sürekli indüksiyonu, kronik inflamasyonda mutajenik etkiye neden olabilir. NO<sup>•</sup> aracılı DNA hasarı veya DNA tamirinin engellenmesi potansiyel olarak kanserojeniktir. NO<sup>•</sup> tümör büyümesi ve metastazı stimüle edebilir. Bunu tümörün migrasyon, invazyon ve anjiyogenik kabiliyetini artırarak yapar. NO<sup>•</sup>'in tümör süpresör P53 onkoproteinini inaktive ederek karsinogenezi hızlandırabileceğini gösteren çalışmalar bildirilmiştir.

Nitrik oksit ayrıca siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimini uyararak tümör progresyonunu hızlandırabilir. Hem NO hem de prostoglandinlerin konsantrasyonları inflamasyon ve tümör progresyonu ile yakından ilişkili bulunmuştur. Kolorektal kanserlerin tedavisinde COX-2 ve iNOS'u inhibe edecek kemoterapötik ajanların tedavide kullanılabileceği düşünülmektedir.

## **2.8. ANTİOKSİDAN SİSTEMLER**

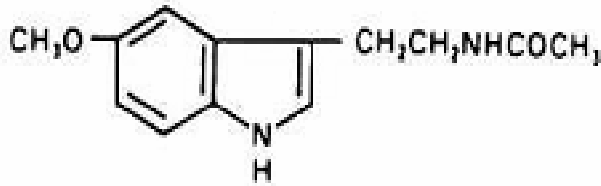
Serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar "antioksidan savunma sistemleri" olarak bilinirler.

Organizma serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak amacı ile vücutta SOR ve reaktif nitrojen türlerini enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların aktivasyonu ile dengeleyip uzaklaştırabilir. İyi bir antioksidan serbest

radikalleri belirli bir şekilde ortadan kaldırır, redoks metallerini tutar, antioksidan ağı içerisinde diğer antioksidanları tetikler, gen ekspresyonunda pozitif etkiye sahiptir, organizmada kolayca emilir ve membran ve/veya sulu ortamlarda fonksiyoneldir. Superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) önemli enzimatik antioksidanlardır. Non-enzimatik antioksidanlar arasında vitaminler (vitamin E, vitamin C, karotenoidler), tiyol antioksidanlar (glutatyon, tiyoredoksin, lipoik asit), doğal flavonoidler, melatonin ve diğer bazı moleküller bulunur. Bir antioksidan diğer antioksidanları tetikleyebilir. Bu işlem “antioksidan ağı” olarak adlandırılır.

## 2.9. MELATONİN

Melatonin (MEL), karanlıkta pineal bezden salgılanan, uyku, üreme, sirkadiyen ritim ve immünite gibi pek çok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayan bir hormondur (Şekil 11).



**MELATONİN**  
(5-Metoksi-N-Asetiltryptamin)

**Şekil 11.** Melatoninin yapısı (77)

Pineal bez melatonin yapımından sorumlu tek organ değildir. Diffüz nöroendokrin sistem içinde kabul edilen APUD (amine precursor uptake and decarboxilation) hücrelerinde melatonin sentez edildiği gösterilmiştir. Bu hücreler, retina, lakrimal bezler, beyin diğer bölgeleri ile bronş, karaciğer, böbrek, adrenal bezler, gastrointestinal sistem, timus, plasenta, over, testis ve endometriumda yer alır. Ayrıca mast hücresi, lökosit ve naturel killer hücrelerinde melatonin sentezlenmektedir.

Melatoninin varlığı 1958 yılında dermatolog Lerner tarafından belirlenmiştir. Gastrointestinal traktta melatonin varlığını ilk kez Raikhlin ve Kvetnoy

bildirmişlerdir. (71). Daha sonra sindirim sistemi mukozasındaki enterokromafin hücrelerde (EK) immünohistolojik olarak tespit edilmiştir (72,73).

### **2.9.1. Gastrointestinal Melatonin**

Melatonin kanda ve diğer vücut sıvılarında günboyu minimal yoğunluktadır. Çeşitli çalışmalarda gastrointestinal dokulardaki melatonin konsantrasyonunun kandaki konsantrasyonlardan, 10-100 kez daha yüksek olduğu saptanmıştır (74). Gastrointestinal melatoninin sentez ve sekresyon mekanizması henüz tam olarak açıklanamamıştır. Gastrointestinal melatonininde sirkadiyen ritm gözlenmez. Parantral veya oral melatonin ya da prekürsörü olan triptofan uygulanması GİS'de melatonin birikimine neden olur. Özellikle gece salınan gastrointestinal melatoninin çok küçük bir kısmının pineal orjinli olabileceği de düşünülmüştür (74).

Buna ek olarak GİS'in enterokromofin hücrelerinin (EK) veya pinealositlerdeki melatonin üretiminin yanında, luminal sıvılarda da melatonin tespit edilmiştir. Luminal melatoninin yiyeceklerden gelebileceği düşünülmüştür. Tavuklarda melatonin zengin besin uygulanması plazma melatonin düzeyinin yükselmesine neden olmuştur. Bununla beraber yiyeceklerle luminal konsantrasyonlar arasındaki korelasyon ve gastrointestinal mukozanın farklı segmentlerindeki melatonin değerleri luminal melatoninin ancak mukozal orjinli olmasıyla mümkündür (74).

Sistemik veya peroral melatonin uygulamaları sonucunda özellikle mide ve kolonda birikim gözlenmektedir (74).

Kolit tedavisi veya önlenmesinde melatonin antioksidatif etki yaparak immün sistemi uyararak etki eder. Melatoninin immün sistemi uyarıcı etkisi çok iyi bilinmektedir. Bununla beraber melatoninin GİS'deki immün yanıt üzerine artırıcı etkisi direkt olarak aydınlatılamamıştır. İndirek olarak ratlarda melatonin uygulanmasının GİS'in majör immün dokusu olan payers plaklarının büyüklük ve sayısını önemli derecede artırması indirek kanıt olarak gösterilmiştir (74).

### **2.9.2. Melatonin ve Kanser**

Melatonin güçlü immünmodülatör ve onkostatik etki gösterir (75). *In vitro* melatonin insan kolorektal kanser hücrelerinin (CaCo-2) proliferasyonunu inhibe eder. *In vitro*

yüksek dozda melatonin kolon adenokarsinomunda hücre büyümesini inhibe eder. Melatoninin düşük dozlarda onkostatik etkisi gösterilememiş ise de doza bağlı olarak DNA sentezini azalttığı sonucuna ulaşılmıştır (76). Üstelik in vivo şartlarda, hem düşük ve hem de yüksek dozlarda melatonin, murine kolonik kanserinin apoptotik hücre sayısını arttırdığı gösterilmiştir.

### **2.9.3. Melatonin Metabolizması**

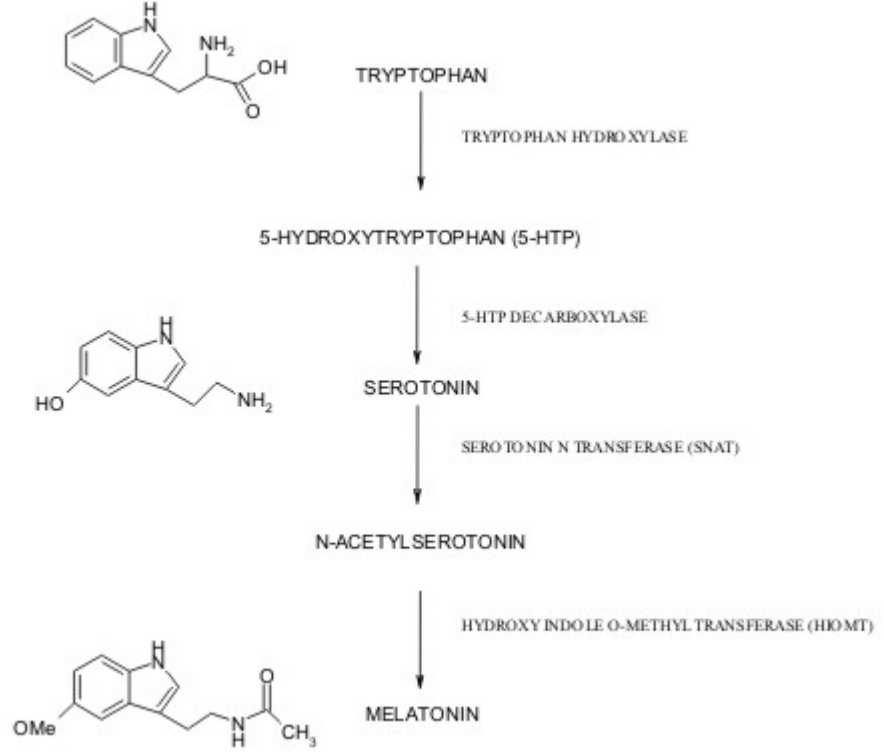
Melatonin sentezi sirkadien ritm gösterir. Aydınlıkta hiperpolarize olan retinal hücreler, karanlıkla beraber depolarize olarak, bezde MEL sentezini başlatırlar. Gün batımıyla fotoreseptör hücrelerden salgılanan norepinefrin, hem triptofanın dolaşımdan beze girişini arttırmakta ve hem de b1 reseptörleri aracılığıyla membrandaki adenil siklazı aktive ederek, intraselüler cAMP seviyelerini yükseltmektedir (77).

Dolaşımdaki triptofanın aktif transportla pinealosit içine alınmasıyla başlayan MEL sentezi, dört ardışık enzimatik reaksiyon sonucunda tamamlanır: İlk aşamada hidrosilasyon reaksiyonuyla oluşan 5-OH triptofan, dekarboksilasyonla serotonine dönüşmekte ve daha sonra sırasıyla N-asetilasyon ve O-metilasyon reaksiyonlarıyla, serotoninden MEL (5-metoksi-N-asetiltriptamin) oluşmaktadır (Şekil 12). MEL sentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan N-asetiltransferaz (NAT) aktivitesi, cAMP etkisiyle yükselmekte ve böylece sentezlenen ve salgılanan MEL miktarı artmaktadır (Şekil 13) (77).

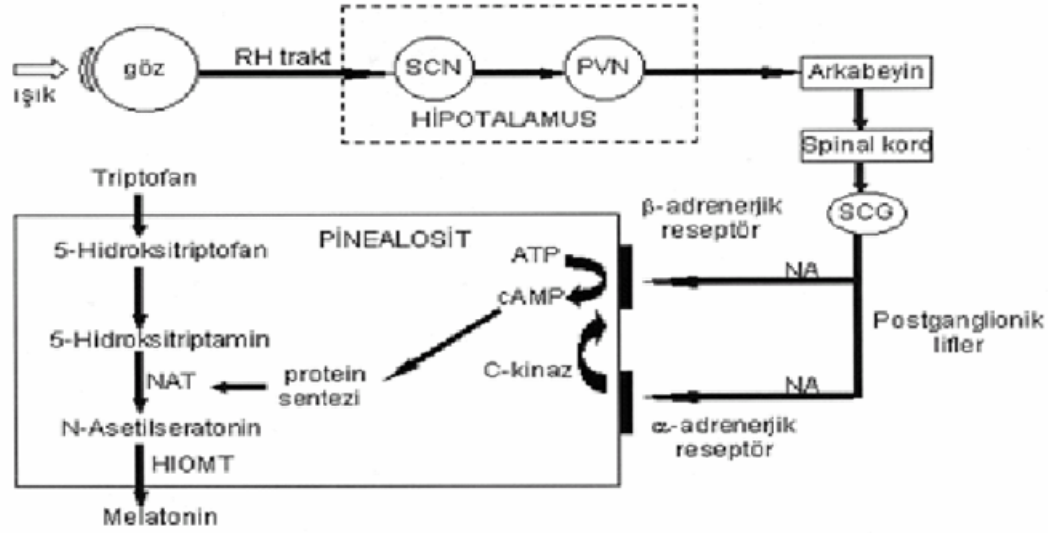
Sentezini takiben, pineal bezden doğrudan dolaşıma verilen MEL, lipofilik özelliğine rağmen, membran reseptörleri aracılığıyla hedef hücrelerine ulaşır. Otoradyografik çalışmalarla, beynin çeşitli bölgelerinde, bağırsak, ovaryumlar, kan damarları ve karaciğerde, MEL reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir. MEL reseptörlerinin sensitivitesi ve ekspresyonu, günlük ışık ritmi ile ilişkilidir. Lipofilik özelliği nedeniyle, hücrenin tüm fraksiyonlarına kolaylıkla girebilen MEL için sitozolik ve nükleer bağlanma yerleri de tanımlanmıştır.

Melatoninin inaktivasyonu, başlıca karaciğerde gerçekleşir. İndol halkasının altıncı konumundan hidrosile olan MEL, daha sonra sülfat veya glukuronik asitle konjuge edilerek idrarla atılır. MEL'in idrardaki başlıca metaboliti

olan 6-sülfatoksi melatonin düzeyleri, MEL'in plazma düzeyleri kadar, sentez ve yıkımı için de iyi bir göstergedir.



**Şekil 12.** Triptofandan melatoninin oluşum aşamaları



Pineal gland'da melatonin sentezinin kontrolü. SCN; Suprakiazmatik nükleus, RH; retinohipotalamik, PVN, Paraventriküler nükleus, SCG; Superior servikal ganglion, NA; Norepinefrin, NAT; 5-Hidroksitriptamin-N-asetiltransferaz, HIOMT; Hidroksiindol-O-metiltransferaz.

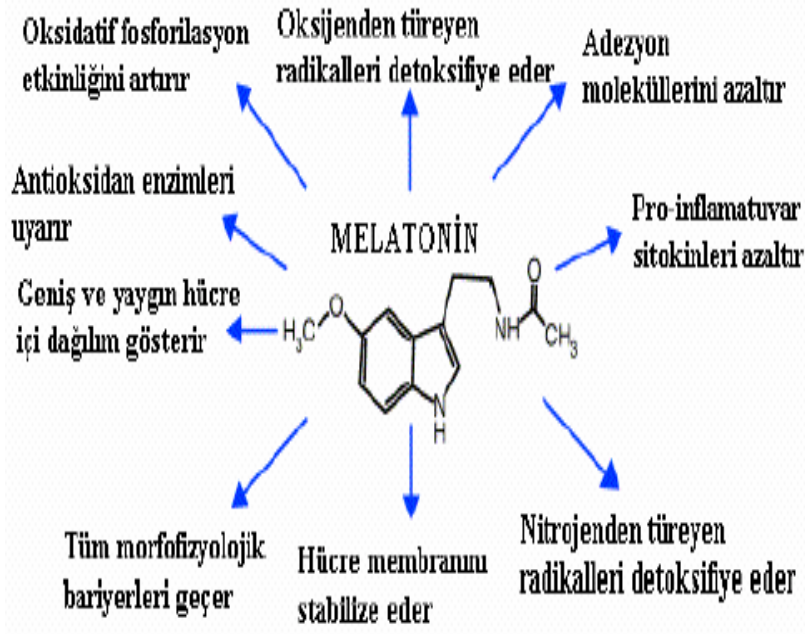
### Şekil 13. Pineal bezde melatonin sentezinin kontrolü

#### 2.9.4. Melatoninin Biyolojik Etkileri

Melatoninin uyku, sirkadien ritim, duygu durumu, termoregülasyon, immünite, cinsel olgunlaşma ve üreme gibi bir çok biyolojik olayla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla antiproliferatif ve antioksidan etkilere de sahip olduğu gösterilen MEL'in, kanser ve yaşlanmanın önlenmesinde de etkili olabileceği öne sürülmektedir (Şekil 14).

#### 2.9.5. Melatoninin Antioksidan Etkisi

Antioksidanlar içerisinde, MEL'in en güçlü radikal tutucu olduğu öne sürüldüğünden, MEL'e olan ilgi giderek artmakta ve antioksidan özelliği gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Melatoninin bir antioksidan olduğu, literatürde ilk kez 1991 yılında lanas ve ark tarafından öne sürülmüş ve daha sonra yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla desteklenmiştir.



**Şekil 14.** Melatoninin sistemik etkileri (77)

Bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, MEL'in antioksidan özelliği üç ana başlık altında toplanabilir :

**1. Direkt antioksidan etki:** MEL'in  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{HOCl}$ ,  $\text{NO}^\cdot$ ,  $\text{ONOO}^\cdot$  gibi oksidatif strese yol açabilen serbest radikalleri detoksifiye ettiği ve böylece onların biyomoleküller üzerindeki zararlı etkilerini önleyebildiği bildirilmektedir

Melatoninin antioksidan özelliği, yapısında bulunan pirol halkasından kaynaklanmaktadır. Fizyolojik şartlarda pek çok indol MEL'e benzer şekilde yıkılsa da,  $\text{O}_2$  varlığında, MEL'in pirol halkasının indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) ile enzimatik ya da hemin ile nonenzimatik olarak yıkımı, yüksek reaktiviteye sahip, N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinüramin (AFMK) oluşumuyla sonuçlanmaktadır. MEL'in  $\text{H}_2\text{O}_2$  varlığında da AFMK oluşturduğu ve bu metabolitin radikal tutucu aktivite gösterdiği belirlenmiştir .

N1-asetil-N2-formil-5-metoksikinüramin oluşumuna yol açan diğer bir mekanizma ise, yüksek bir affinite ile  $\text{OH}^\cdot$  radikalini bağlayabilen MEL'in, indolil katyon radikalini oluşturması ve bu radikalın de,  $\text{O}_2$ 'i yakalayarak AFMK'e dönüşmesidir. AFMK, daha sonra arilamin formamidaz (AFA)'ın katalizlediği

reaksiyonla N1-asetil-5- metoksikinüramin (AMK)'e çevrilmektedir. Diğer taraftan indolil radikal, OH<sup>·</sup> varlığında siklik 3-hidroksimelatonin oluşturmakta ve bu metabolitin idrar düzeyleri, radikal üretiminin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Çeşitli antioksidanların gücünü belirlemek amacıyla yapılan karşılaştırmalı çalışmalar, MEL'in en güçlü antioksidanlardan biri olduğunu göstermektedir.

Askorbat, alfa-tokoferol ve GSH gibi zincir reaksiyonlarını kırabilen diğer antioksidanlardan farklı olarak, MEL yayılmakta olan lipid peroksidasyonunu peroksil radikalini yakalayarak sonlandırmaktadır. MEL'in bu antioksidanlardan daha güçlü olduğu, GSH'dan beş kat ve mannitolden 14 kat daha güçlü bir şekilde OH<sup>·</sup> radikalini yakaladığı *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir. 5-OH-triptofan, 5-OH-triptamin ve serotonin ile kıyaslandığında, MEL'in, NO<sup>·</sup> oluşumunu azaltan en güçlü indol olduğu saptanmıştır. *In vitro* şartlarda MEL'in doza bağımlı bir şekilde, ONOO<sup>·</sup>'in yol açtığı oksidasyonu önlediği ve ayrıca kendisi nitrasyona uğrayarak ONOO<sup>·</sup>'i detoksifiye ettiği; *in vivo* inflamasyon modelinde de nitrotirozin oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir.

**2. Antioksidan enzim aracılı etki:** Farmakolojik ve muhtemelen fizyolojik düzeylerdeki MEL'in, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSSG-Rd), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve  $\gamma$ -glutamilsistein sentetaz gibi bazı antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarını ya da aktivitelerini artırdığı ve bu yolla oksidatif stresi baskıladığı bildirilmektedir. Ratlara, akut/ kronik uygulanan MEL'in beyin dokusu Mn-SOD ve CuZn-SOD sentezini artırdığı ve bu yolla oksidatif hasara karşı beyin dokusunu koruduğu; ayrıca anne rata verilen MEL'in plasentadan geçebildiği ve fetus beyinde SOD aktivitesini artırdığı gösterilmiştir. Gündüze göre, gece öldürülen ratlarda beyin GSHPx aktivitesinin daha yüksek bulunması, MEL'in fizyolojik antioksidan etkisine bağlanmaktadır (77).

Hayvan modeli çalışmalarında, farmakolojik dozda uygulanan MEL ile akciğer, barsak, böbrek, karaciğer, beyin, kalp, pineal bez ve eritrosit GSHPx aktiviteleri, %22-138 oranında artmaktadır. Ratlarda karaciğer, böbrek ve beyin dokusu GSHPx aktivitesinin, MEL uygulandıktan üç saat sonra arttığı gözlenmiştir. Nöral GSH-Px aktivitesinin, MEL'e benzer şekilde, gündüz düşük; gece yüksek olduğu bulunmuştur. Pinealektomi yapılan ratların karaciğer, akciğer ve beyin GSH-



Px aktivitelerinde anlamlı düşüşler saptanmıştır. GSH havuzunu koruyan GSSG-Rd aktivitesinin sürekli karanlığa maruz bırakılan kuşların beyinde daha yüksek olduğu ve ekzojen MEL ile de deney hayvanlarında aktivitenin yükseldiği bildirilmiştir. MEL uygulanan ratların, karaciğer GSSG-Rd aktivitesinin yaklaşık iki kat arttığı belirlenmiştir. MEL tarafından  $\gamma$ -glutamilsistein sentetazın uyarılmasıyla, insan endotel hücrelerinde total GSH içeriğinin yükseldiği öne sürülmektedir (77).

3. *Prooksidan enzim aracılı etki:* MEL'in bazı prooksidan enzimleri inhibe ederek, serbest radikal oluşumunu azalttığı ve bu yolla da antioksidan sistemi desteklediği öne sürülmektedir. *In vitro* ve *in vivo* şartlarda, NO $\cdot$  ve daha ileri aşamada ONOO $\cdot$  oluşumuna neden olan nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesinin, fizyolojik MEL konsantrasyonlarında inhibe edildiği bildirilmektedir. MEL'in bu antioksidan etkilerini destekleyecek şekilde; oksidatif doku hasarına yol açan kainik asit, L-sistein, sisplatin, adriyamisin, alloksan, streptozotosin, sentetik seks steroidleri ve siklosporin A gibi toksinlerle indüklenen oksidatif stresin MEL ile önlenildiği, *in vivo* çalışmalarla da gösterilmiştir.

Melatonin hem suda ve hem de lipid fazda çözünebildiğinden, organizmada çok geniş alanda antioksidan etki gösterebilmektedir. Kolaylıkla kan-beyin bariyerini ve plasentayı geçebilen MEL için, bilinen hiçbir morfofizyolojik bariyerin olmaması, MEL'in tüm intraselüler komponentlere rahatlıkla ulaşabilmesini sağlamaktadır. Böylece MEL, hücre zarını, organelleri ve çekirdeği etkin bir şekilde serbest radikal hasarından koruyabilmektedir. Hücre membranı ile temas ettiğinde, fosfolipid tabakanın dış yüzeyine tutunan MEL, radikallerle membrandan önce temasa geçerek onları detoksifiye eder ve membranı korur. MEL varlığında, mitokondriyal solunum zincirinden kaynaklanan O $_2$ , H $_2$ O $_2$  ve OH $\cdot$  gibi radikallerin üretimi de azalmaktadır. Çekirdeğe kadar ulaşabilme özelliği, DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında, MEL'e bir üstünlük sağlamaktadır. Daha da önemlisi, diğer antioksidanların aksine, çok yüksek dozlarda (300 mg/gün) ve beş yıl gibi uzun süre kullanımda bile, MEL'in toksik bir etki göstermemesidir.

Melatoninin antioksidan etkileri genel olarak incelendiğinde, adezyon moleküllerinin ve proinflamatuvar sitokinlerin sentezini azaltmasını da içeren oldukça geniş spektruma sahip bir antioksidan olduğu görülebilir (77).

### 2.9.6. Oksidatif Stres ve Melatonin

Hem *in vitro*, hem de *in vivo* çalışmalarda, melatoninin güçlü bir serbest radikal süpürücü ajan olduğu gösterilmiştir (78,79). Oldukça toksik olan hidroksil radikalleri başta olmak üzere, diğer serbest oksijen radikallerinin neden olduğu oksidatif hasardan makromolekülleri özellikle de DNA'yı koruyabilir. DNA hasarı oluşturan radikaller hücrede nükleer bir enzim olan poli-ADP-riboz sentazı (PARS) aktive ederler. Bu enzim, DNA tek zincirinin kırılması ile aktive olur ve hücrelerde şiddetli enerji tüketimine yol açarak sonuçta nekrotik tipte hücre ölümüne neden olur. Melatoninin PARS aktivitesini inhibe ederek; şok, inflamasyon ve iskemi/reperfüzyonda (I/R) organ hasarını önleyebileceği bildirilmektedir (80).

Melatonin serbest radikal yakalayıcı etkisi bakımından, bilinen tüm antioksidanlardan (mannitol, glutasyon ve vitamin E gibi) daha güçlüdür. Antioksidanların büyük çoğunluğunun aksine, melatonin hem suda, hem de yağda çözünebildiğinden hücrenin tüm komponentlerine etki eder. Melatonin direk olarak güçlü bir radikal (hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali, peroksil radikali, singlet oksijen ve peroksinitrit anyonu) süpürücü etki gösterir. İndirekt olarak ise, spesifik melatonin reseptörleri aracılığı ile antioksidan enzim seviyelerini artırarak ya da pro-oksidatif enzimleri inhibe ederek (SOD, GSHPx, GSSGRd, glikoz-6-fosfat dehidrogenaz stimülasyonu ve NOS inhibisyonu) doku koruyucu etki gösterir (26, 78, 79).

Süperoksit radikale en önemli etkisi süperoksitin dismutasyonunda en büyük rol oynayan SOD'un mRNA'sını artırmasıdır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hücrelerde CAT ve GSHPx, ile toksik olmayan ürünlere dönüştürülür. GSHPx, GSSGRd ve aktivitesi melatonin ile uyarılmaktadır. Melatonin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in hücre içi konsantrasyonunu azaltır. GSSGRd aktivitesinde ko-faktör olan NADPH, G-6-PD ile oluşturulur. Melatonin G-6-PD aktivitesini de uyarır. Melatonin, indol nükleusun yan zincirindeki metoksi ve asetil grupları OH<sup>-</sup> radikalinin giderilmesinde rol oynar. Melatonin bir elektron vererek hidroksili nötralize eder ve toksik olmayan indolil katyon radikale (melatonil) dönüşür. Bu nitrojen merkezli melatonil radikalinin de süperoksit anyon radikali ile etkileşip 5-acetyl-N-formyl-5-methoxykynuramine (5-MAFK) oluştururken bu radikali

de süpürdüğü bildirilmektedir. Melatonin singlet oksijeni direkt olarak nötralize edebilmektedir (79).

Nitrik oksit, O<sub>2</sub> varlığında peroksinitrite dönüşerek toksik etkilere aracılık eder. ONOO<sup>-</sup>, peroksinitröz asit ve hidroksil radikaline dönüşebilmektedir. NO<sup>•</sup> inhibisyonunun ONOO<sup>-</sup> oluşumunu engelleyeceği ve kardiyak performansı artırabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle, NO<sup>•</sup> sentezini gerçekleştiren NOS'un (özellikle iNOS) pro-oksidatif bir enzim olabileceği düşünülmektedir. Melatoninin iNOS aktivitesini inhibe edebileceği bildirilmiştir (78,79).

Melatoninin daha önce gösterilmiş bir diğer etkisi ise zarları stabilize edici özelliğidir. Bu konuda daha önce yapılan çalışmalarda melatoninin sepsiste artan oksidatif hasarda eritrosit zarında koruyucu etkileri gösterilmiş ve *in vivo* ortamda melatoninin farmakolojik dozlarının eritrosit zarını lipid peroksidasyonundan ve oksidatif hasardan koruduğu ve antioksidan savunma sistemindeki enzimlerin aktivitelerini artırdığı bulunmuştur (81,82). Melatoninin hücre zarlarını stabilize edici özelliğinin yanı sıra mitokondrial zarları da stabilize edici özelliklerinin olduğu gösterilmiştir. Lipofilik özellikte olması nedeniyle özellikle de mitokondrial iç zarı stabilize ederek elektron transport zincirinin fonksiyonunu gerektiği gibi yapabilmesine yardımcı olmaktadır. Ayrıca *in vitro* ortamda da melatoninin eritrositlerin zarında sodyum nitroprussid uygulamasına bağlı olarak artan nitrik oksit (NO) düzeylerinin oksidan etkisini önleyici yönde etkilerinin olduğu bulunmuştur. Ancak melatoninin fizyolojik düzeylerindeki (pikogram) değişiklikler eritrosit membranında lipidlerin peroksidasyonu açısından önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Aynı zamanda *in vivo* ve *in vitro* deneylerde, birçok hastalığın patojenezinde ve fizyolojik doku perfüzyonunda oldukça önemli olan eritrositlerin deformabilite özelliklerindeki bozuklukların da melatonin uygulaması ile antioksidan etkisine bağlı olarak düzeltildiği öne sürülmüştür (81,82).

### **2.9.7. Melatoninin Etki Yerleri**

*In vitro* fizyolojik dozlarda melatonin, cAMP üretimini zamana ve doza bağlı bir şekilde inhibe eder. Melatonin reseptörleri; Mel-1a, Mel-1b ve Mel-1c olmak üzere üç tiptir. Mel-1a reseptör geni insan kromozomunda 4q35.1 lokalizasyonunda kodlanmıştır. Ekspresyonu suprakiazmatik nukleus ve pars tuberaliste sınırlıdır. Sirkadien ve reproduktif etkilerinin bu reseptör aracılığı ile gerçekleştiği düşünülür.

Mel-1b reseptör geni insan kromozomunda 11q21-22 bölgesinde kodlanmıştır. Beyin ve retinada eksprese olur ve her iki bölgede de dopaminerjik fonksiyonlar ile ilişkili olduğu düşünülür. Mel-1c geni ise insanda saptanmamıştır.

### **2.9.8. İnsanda Melatonin Üretimi**

Normal insanlarda melatonin gece salgılanır. Yetişkinlerde ortalama plazma melatonin seviyesi 60-70 pg/ml ve başlıca metaboliti olan 6-HMS'nin maksimum plazma konsantrasyonu 80- 100 pg/ml arasındadır. Normal insan melatonin ritminin en karakteristik özelliği normal bireylerde günlük ve haftalık olarak tekrarlanabilir olmasıdır. Birey içerisinde değişmezliğe rağmen bireyler arasında ritmin amplitüdü açısından çok büyük bir değişkenlik vardır.

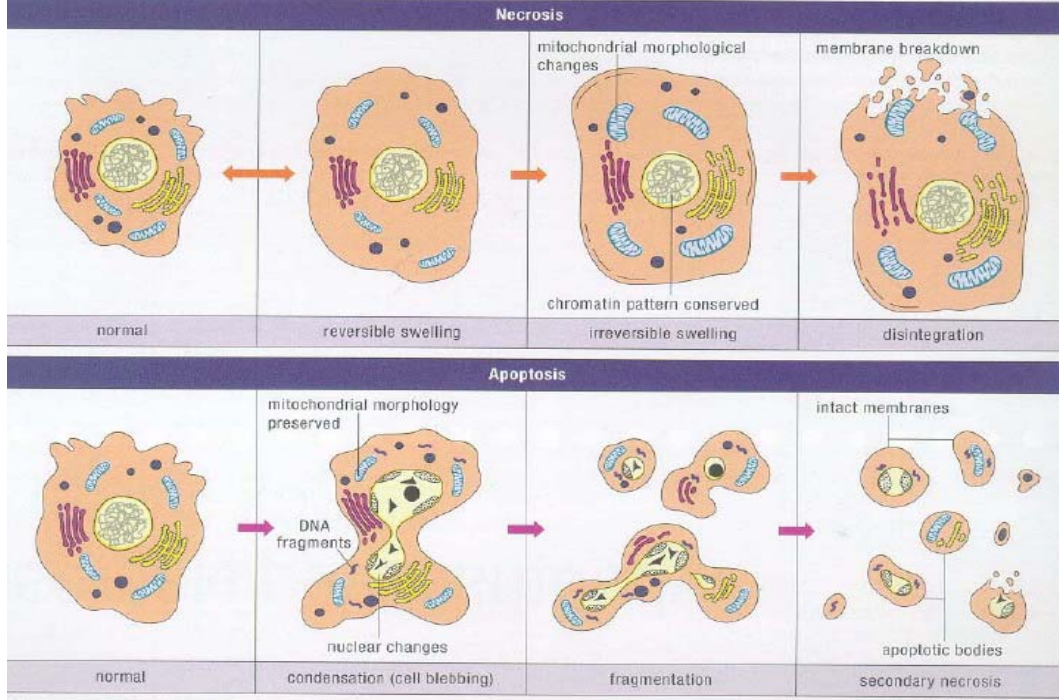
### **2.10. APOPTOZİS**

Apoptozis (programlanmış hücre ölümü), hücre intiharı olarak da bilinir ve fizyolojik bir olaydır. Apoptoz, organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin, zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (83).

Yaşamakta olan hücreler iki farklı mekanizma ile ölürler. Bu mekanizmalar nekroz ve apoptozdur (Şekil 15). Nekroz; hipoksi, aşırı ısı değişiklikleri, toksinler gibi hücre dışından gelen çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda gelişen travmatik hücre ölümüdür. Apoptoz ise yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Nekroz patolojik bir olaydır. Apoptoz ise fizyolojik veya patolojik uyarılarla oluşabilir (84).

Apoptozis, hücrenin yaşam çemberi boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar. Barsak epitel hücrelerinin devamlı yenilenmesi, menstruasyon esnasında uterusun iç yüzündeki hücrelerin öldürülerek uzaklaştırılması apoptozise örnektir. Apoptozis, organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev alır. Örneğin virüsle enfekte hücreler bu yolla ortadan kaldırılır. Hasarlı DNA da apoptozis yolu ile ortadan kaldırılır. Hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden

olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptozis yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır (85).



**Şekil 15.** Apoptozis ve nekrozisin hüresel görünümü (86)

Ökaryotik organizmalardaki hücreler doğarlar, belirli bir süre yaşarlar ve sonra ölürlür. Yaşam süresi hücre tipine göre değişmektedir. Zamanı gelince hücreler daha önceden programlanmış bir şekilde ölürlür. Örneğin; barsak hücreleri üç beş günlük bir yaşam süresini takiben ölürken derinin epidermal hücreleri 20–25 günlük bir süre sonunda ölmektedir. Kalp kası hücreleri veya nöronlar ise ömür boyu yaşarlar. Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü olarak da adlandırılır (86). Apoptozla hücre ölümü; enerji kullanılarak hüresel yaralanma ve inflamasyon olmaksızın, çok daha ustaca gerçekleştirilir. Programlı hücre ölümünün, bütün çok hücreli organizmalarda, gelişmede ve homeostazın sürdürülmesinde vazgeçilmez bir rolü vardır (87).

### 2.10.1. Apoptozis ve Tarihçesi

Apoptozis birçok gen ile ilişkili aktif bir sistem olup, Yunancada apo (= ayrı) ve ptozis (= düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş bir kelimedir. Apoptozis, hücrelerde normal gelişim sırasında meydana gelen ölüm olarak 1842 yılında Vogt tarafından tanımlanmıştır. Programlanmış hücre ölümü terim olarak ilk kez 1965 yılında kullanılmıştır. Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır (93).

Apoptozis tümörlerde sık görülen bir olay olup hücre ölümüne yol açan aktif olarak düzenlenmiş bir hücre sel süreçtir. Apoptozise direnç göstermek, hücre kaybını azaltarak tümöre bir avantaj sağlar.

### **2.10.2. Apoptotik Hücre Ölümünün Aşamaları**

Apoptoz hücre içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden bir olaylar zinciri olarak seyrederek. Sonuçta hücrenin fagositozu ile sona erer. Bu aşamalar;

- I) Apoptozun başlatılması,
- II) Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu,
- III) Hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması,
- IV) Fagositoz, olarak özetlenebilir.

### **2.10.3. Apoptozda Biyokimyasal Değişiklikler**

Hücrelerde apoptoza yol açan bir tek mekanizma olmamakla birlikte pek çok hücre tipinde erken apoptozda sitoplazmada iyonize kalsiyumun arttığı izlenmiştir. Apoptozda en önemli biyokimyasal olay endojen endonükleaz enziminin aktivasyonu ile DNA'nın kırılmasıdır. Bu enzim Ca ve Mg bağımlı olduğundan aktivasyonu için hücre içi kalsiyumun artması gerekmektedir. Enzim DNA'yı 200 baz çiftlik parçalara ayırarak kırılmalar oluşturur ve jel elektroforezinde merdiven paterninin oluşmasına yol açar. Buna karşılık nekrozda çok sayıda endonükleaz enzimi aktive olduğundan DNA düzensiz parçalanarak merdiven paterni oluşmaz (86).

Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserin'in erken evrede membranın dış

yüzüne doğru transloke olmasıdır “fosfatidilserin translokasyonu”. Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar (86).

Apoptozis çok sayıda ve çeşitte mediatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (c-myc), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitokondri) bulunmaktadır. Bazı mediatörler hücre tipine özgüdür, bazıları da apoptotik stimulusun çeşidine göre farklılık gösterebilirler.

#### **2.10.4. Morfolojik Değişiklikler**

Hücreler özelleşmiş yüzeysel yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler. Su kaybederek küçülürler, büzüşürler. Stoplazmanın yoğunlaştığı, organellerin birbirlerine yakınlaştığı izlenir. Membranlar bütünlüklerini korurlar. Organeller genel olarak sağlamdır. Morfolojik olarak en önemli değişiklikler nükleusta izlenir. Kromatin çekirdek membranına yakın kısımlarda yoğunlaşarak değişik şekil ve büyüklükte çöker. Elektron mikroskopik incelemede kromatinin yoğun granüler yarımay, hilal veya yüzük şeklinde çekirdek membranının iç yüzünde yerleştiği gözlenir. Çekirdek de hücre gibi büzüşür ve bazen membranla sarılı olarak birkaç parçaya ayrılabilir (90).

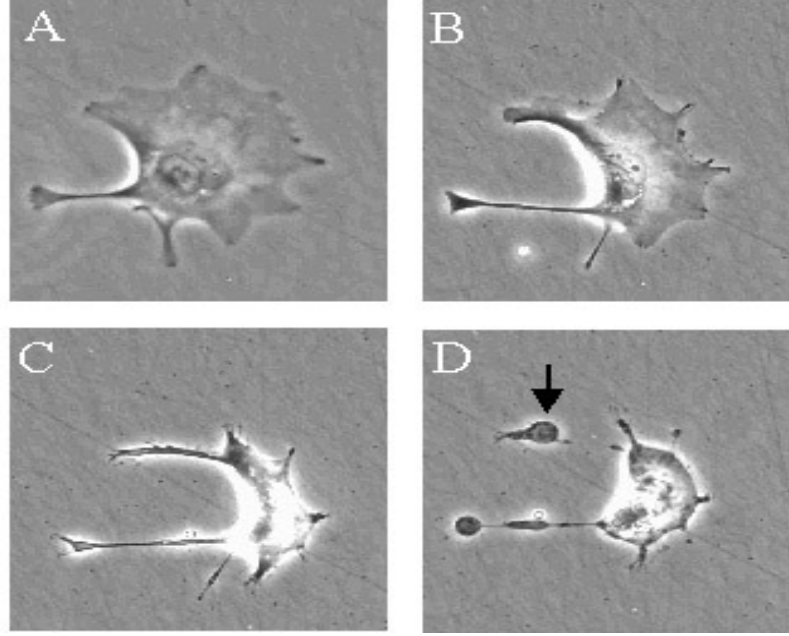
Apoptoz hematoksilen eozinle (H&E) boyanmış kesitlerde ışık mikroskopik seviyede izlenebilir. Hücreler koyu eozinofilik sitoplazmalı, bir veya birkaç parçalı piknotik çekirdekli olarak görünür. Çekirdek, kromatinin çekirdek membranının iç yüzüne yerleşmesi nedeniyle hilal veya yarımay şeklinde izlenebilir. Apoptotik süreç ilerledikçe hücrelerde sitoplazmik çıkıntılar oluşur. Hücre daha sonra membranla çevrili küçük parçalara ayrılır. İçlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller ve bazılarında çekirdek parçaları da mevcut olan apoptotik cisimler meydana gelir (Şekil 16) (91).

Apoptotik hücreler komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir.

Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler;

- Morfolojik görüntüleme yöntemleri
- İmmunohistokimyasal yöntemler
- Biyokimyasal yöntemler

- İmmunolojik yöntemler
- Moleküler biyoloji yöntemleri (86)



**Şekil 16.** Apoptotik cisimciklerin oluşumu (92)

Malign hastalıklar klasik olarak kontrolsüz bir aşırı hücre proliferasyonunun olduğu hastalıklardır. Aşırı proliferasyonun yanında azalmış apoptotik hücre ölüm hızının da malignite gelişimine katkıda bulunduğu görülmüştür (71).

Apoptozisle ilgili çalışmalar hızla artmasına karşın apoptozisi saptamak ve değerlendirmek pek kolay olmamaktadır. Özellikle tek bir hücrede apoptozis olayı saatler içerisinde geliştiğinden apoptotik süreçteki hücreyi morfolojik olarak tanımak ve kantifiye etmek zordur. Genellikle çalışmaların güvenilirliğini artırmak amacıyla farklı yöntemlerin birkaçının birlikte kullanılması önerilmektedir. Apoptotik hücredeki morfolojik değişiklikleri saptamak için ışık mikroskobu, elektron mikroskobu, flowsitometri kullanılmaktadır. Yine çeşitli sitoplazmik değişikliklerin saptanması (örneğin kaspaz aktivitesinin, hücreye kalsiyum akışının veya mitokondri disfonksiyonunun ölçülmesi), membran değişikliklerinin belirlenmesi (örneğin membran geçirgenliğinin değişmesi), apoptoz sürecinde veya regülasyonunda görevli çeşitli proteinlerin kanda veya dokuda düzeyinin ölçülmesi (örn: Bcl2/Bax oranı), DNA parçalanmasının çeşitli özel immünohistokimyasal boylarla saptanması bu



yöntemler arasında sayılabilir. Bütün bu yöntemler içinde en sık rastlanan yöntemler, DNA'daki değişikliklere dayalı olan DNA agaroz jel elektroforezi ve TUNEL (terminal deoxytransferase mediated bio-dUTP nick end labeling) boyası ile formalinde fikse edilmiş materyalde yapılan mikroskopik incelemedir. Son dönemde kullanılan önemli ve güvenilir bir başka metod ise Annexin-V boyası uygulaması ve ELISA' dır (94).

Kanser, AIDS, otoimmün ve nörodejeneratif hastalıklar gibi önemli hastalıklarda apoptotik mekanizmada bozukluklar tespit edilmesi, apoptozla ilgili yapılan araştırmaları hızla artırmıştır. Araştırmalar bu hastalıkların oluşmasının engellenebilmesi ve apoptozun tedavide kullanılabilmesi alanlarında yoğunlaşmaktadır. Apoptozu kontrol eden mekanizmaların daha iyi anlaşılması tıbbın pek çok dalında yeni tedavi çabalarına kapı açabilecektir.

Literatürde, kolorektal adenokarsinom grubunda apoptoz ve proliferasyonu karşılaştıran sınırlı sayıda çalışma mevcut olup, bu çalışmalar daha çok Fas ligand (FasL), kaspaz, Bcl-2, p53, Ki-67 ile ilgilidir.

### **3. GEREÇ VE YÖNTEMLER**

Etik kurul ön onayı alındı. Hastalardan biyopsi ile alınacak doku materyalleri için etik kurul ön onayı alındı. bilgilendirildi. Çalışma kapsamına alınacak her bireye, “Gönüllüler İçin Bilgilendirilmiş Onam Metni” okunarak bilgilendirildi ve kendilerine “Bilgilendirilmiş Onam Formu” imzalatıldı. Çalışmaya katılmayı kabul edenler çalışma kapsamına alındı.

#### **3.1. HASTALARIN BELİRLENMESİ VE BİYOPSİ MATERYALLERİNİN ALINMASI**

Gastroenteroloji polikliniğine başvuran ve kolorektal kanser olabileceği düşünülen hastalara kolonoskopi yapılarak biyopsi materyalleri alındı. Alınan materyalin bir kısmı formole konularak rutin patolojik inceleme için patoloji laboratuvarına gönderildi. Bir kısmı da eppendorf tüplerin içerisine konularak hızla donduruldu. Çalışma zamanına kadar - 80°C’de saklandı.

Patolojik inceleme sonucunda kolorektal adenokanser tanısı alan toplam 14 hasta çalışmaya dahil edildi. Hastalardan 12’si erkek ve yaş ortalamaları ( $60.6 \pm 2.65$ ), ikisi kadın ve yaş ortalamaları ( $67 \pm 2.5$ ) olarak belirlendi. Hastalar yeni tanı almış olup cerrahi girişim yapılmadığından evrelendirme yapılamadı.

Örnek toplama aşaması tamamlandığında dokular tartılarak gram doku ağırlıkları belirlendi. Dokular %0,1 triton X100 (PBS ile hazırlandı) ile 1/50 ve 1/100 oranlarında dilüsyon yapılarak ultra.homojenizatörde (Bandelin Sonoplus) buz üzerinde homojenize edildi. Çalışılincaya kadar - 80°C’de saklandı.

#### **3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI**

Bu çalışmada CaCo-2 hücre dizisi kullanıldı. CaCo-2 hücre dizisi insan kolon adenokarsinoma hücre dizisidir. Hücreler ATCC (Amerikan Tissue Culture Collection)’den sağlandı.

Dulbecco’nun modifiye esansiyel hücre kültürü besiyeri, (DMEM, Gibco BRL. Burlington) içersine 2mM L–glutamin, %7.5 Na bikarbonat, 0.1mM non esansiyel aminoasit, 1mM Na pirüvat, %20 bovin serum albumin (BSA), %1 penisilin, streptomisin içerecek şekilde hazırlandı. CaCo-2 hücreleri bu ortam içerisinde üretildiler. Hücreler yaklaşık %70-80 sıklığına ulaştıklarında pasajları yapılarak çoğaltıldı.

İkinci pasajda dondurularak nitrojen tankında saklanmış olan hücreler 37°C'lik su banyosunda hızla çözüldü ve steril kabine alındı (Heraeus). Hücreler, 37°C'ye getirilmiş olan üç mL DMEM içerisine yavaşça pipetlendi. 25 cm<sup>2</sup> lik hücre kültürü kabına (flaska) alındı. Hücreler, güneşirı ortamları boşaltılıp beş-altı mL PBS (fosfat buffer saline) ile üç kez yıkandıktan sonra taze ortam eklenmek suretiyle çoğaltıldı. Canlılık, çoğalma durumu ve enfeksiyona maruz kalıp kalmadıklarını gözlemek amacıyla hücreler hergün kültür mikroskopunda incelendi.

Hücreler yeterli sıklığına eriştiklerinde kültür kabındaki besi ortamı dökülerek 1mL tripsine (37°C) tabi tutuldu. Yaklaşık dört beş dakika 37°C CO<sub>2</sub> inkübatöründe (Thermo) bekletildi. Hücrelerin kültür kabından kopmaları sağlandıktan sonra tripsini nötralize etmek amacıyla tripsinin beş katı miktarda besi ortamı eklendi. Hücreler kültür mikroskopunda incelenerek yüzeyden ayrıldıkları gözlemlendikten sonra steril bir tüpe alındı. 1990 RPM'de on dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üstteki besi ortamı dökülerek hücrelerin üzerine taze ortam eklendi. 50 cm<sup>2</sup> lik kültür kabına alındı. Daha sonra güneşirı besi ortamları dökülüp PBS ile (37°C) yıkandıktan sonra taze ortam eklenmek suretiyle hücreler çoğaltıldı. Hücreler yaklaşık %80 sıklığına ulaştığında pasaj işlemi tekrarlandı. Gruplar oluşturuluncaya kadar toplam beş pasaj yapıldı.

CaCo-2 hücreleri, 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına 500'er µL ve apoptozu değerlendirmek için 18 tane petri kabına üçer mL besi ortamı ile ekildi. Gün aşırı PBS ile üç kez yıkanarak ortamları değiştirildi. Hücreler yaklaşık %80-90 sıklığına ulaştıklarında gruplar oluşturularak melatonin uygulaması yapıldı. Etanol/PBS ile 10mM konsantrasyonunda melatonin stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözelti 2µM'lık filtreden geçirilerek 1mM, 0.01mM, 0.1µM, 1nM, 0.01nM konsantrasyonlarında melatonin içeren besi ortamları hazırlandı. Melatonin uygulanmayan hücreler kontrol grubu olarak tanımlandı (Tablo IV). 24 kuyucuklu hücre kültür kapları ve petri kaplarına yukarıda belirtilen miktarlarda ekim yapılarak inkübasyona bırakıldı.

24 saat sonunda besi ortamları 1,5 mL'lik plastik eppendorf tüplere alındı. Kuyucuklara 200 µL 50mM trisma base + %1NP40 (PH 7,4) eklendi. On dakika karıştırıcıda tutuldu. On dakika sonunda hücreler pipet yardımıyla iyice plaktan

kazınarak eppendorflara alındı. Tüm inceleme ve ölçümler beşinci pasajda her grup için dokuz ayrı hücre kültüründe gerçekleştirildi.

**Tablo IV.** Deney ve kontrol gruplarında uygulanan melatonin dozları

	Grup adı	Melatonin dozu
Deney Grupları	A (n=9)	1 mM
	B (n=9)	0,01 mM
	C (n=9)	0,1 µM
	D (n=9)	1 nM
	E (n=9)	0,01nM
Kontrol Grubu	F (n=9)	(-)

### 3.3. APOPTOTİK/ NORMAL HÜCRE TAYİNİ

Petri kaplarına ekilerek deney ve kontrol grupları oluşturulmuş ve inkübasyona bırakılmış olan hücrelerin besi ortamları MDA, NO<sup>-</sup> ve aktif MMP-9 ölçümleri için; birinci, ikinci ve üçüncü gün sonunda hücrelere zarar verilmeden 1,5 mL'lik plastik eppendorf tüplere alındı. Petri kaplarında kalan hücrelerde aşağıda anlatılan yöntemle apoptoz oranı değerlendirildi (95).

Gerekli boyalar:

*Fiksatif solüsyon*

2mg/ mL malaşit yeşili (metanolde)

*Lökostat solüsyonu 1*

-% 0.1 eozin Y

-% 0.1 formaldehid

-% 0.4 sodyum fosfat dibazik (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

-%0,5 potasyum fosfat monobazik ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

*Lökostat solüsyonu 2*

-% 0.04 metilen mavisi,

-%0.04 azur A, % 0.4 sodyum fosfat dibazik ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ),

-% 0.5 potasyum fosfat monobazik ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

*İşlemler:*

- Hücre içeren tüm petripler PBS ile iki kez yıkandı.
  - On saniye fiksatif solüsyonda inkübe edildi.
  - Boya dökülerek kurutma kağıdı üzerine ters çevrilip boyanın tamamen boşalması sağlandı.
  - On saniye lökostat solüsyonu 1'de inkübe edildi.
  - Boya dökülerek kurutma kağıdına ters çevrilerek boya tamamen boşaltıldı.
- Lökostat solüsyonu 2'de on saniye bekletilerek boya döküldü.
- PBS ile iki kez yıkanarak havada kurutuldu. (Resim 1)
  - Işık mikroskobu ile apoptotik ve normal hücreler sayıldı (Toplam 200 hücre).



**Resim 1.** Apoptozu değerlendirmek için boyanmış hücreler

### 3.4. DOKU VE HÜCRE KÜLTÜR ORTAMLARINDA PROTEİN TAYİNİ

Doku örnekleri ve hücre kültür süpernatantlarında protein tayini Lowry metodu ile yapıldı. Bu yöntemin temeli alkali ortamda  $\text{Cu}^{+2}$  ile protein arasında bir kompleks oluşması ve folin reaktifinin indirgenmesi sonucu oluşan renk şiddetinin 750 nm'de kolorimetrik olarak değerlendirilmesine dayanmaktadır.

#### *Reaktifler*

-20 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 0.5g Na-K-tartarat ( $\text{C}_4 \text{H}_4 \text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 0.1 N NaOH içinde çözülerek hacim 1L'ye tamamlandı.

-100 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  100 mL suda hazırlandı.

-Alkali bakır çalışma çözeltisi:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.1 M NaOH, 0.7 M Na-K-tartarat (1/9) oranında karıştırılarak hazırlandı.

-Seyreltik folin: Folin, 1/2 su ile seyreltildi.

-Alkali bakır çalışma çözeltisi:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.1M NaOH, 0.7M Na-K-tartarat (1/9) oranında karıştırılarak hazırlandı.

#### *Analiz Aşamaları*

- Homojenize edilmiş doku örnekleri 4000 RPM'de yedi dakika santrifüj edildi.
- Standart olarak sığır serum albumin (BSA) kullanıldı. 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000mg/dl olmak üzere yedi farklı konsantrasyonda standart hazırlandı.
- Örnek ve standartlardan 5µl alındı.
- Üzerine 250 µl alkali bakır çalışma çözeltisi eklendi. Oda ısısında 15 dakika inkübasyondan sonra
- 25 µl seyreltik folin çözeltisi eklenerek 45 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 750 nmde mikropalak okuyucuda (Thermo Labsystems) okunarak konsantrasyonları standart grafikten yararlanılarak hesaplandı.

### 3.5. DOKUDA VE HÜCRE KÜLTÜR ORTAMLARINDA NİTRİK OKSİT ÖLÇÜMÜ

Nitrik oksit tayini; kadmiyumun nitratı nitrite indirgenmesi esasına dayanmaktadır.

#### *Reaktifler*

-%30  $\text{ZnSO}_4$  çözeltisi

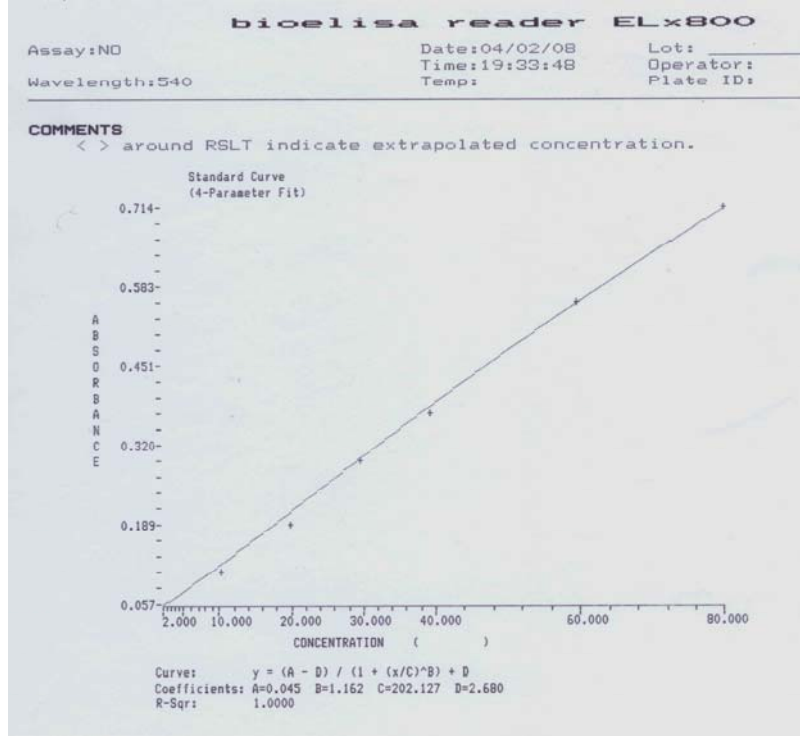
-5 mM  $\text{CuSO}_4$  çözeltisi

-Glisin-NaOH tamponu ( $\text{P}^{\text{H}}=9,7$ )

- 3M HCl içinde sülfonilamid çözeltisi
- N-Naftiletillen diamin çözeltisi (NED)

#### *Analiz Aşamaları*

- Homojenize edilmiş doku örnekleri 4000 RPM'de yedi dakika santrifüj edildi.
- 100 mM sodyum nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) hazırlanarak stok standart çözeltisi oluşturuldu. Bu stok çözeltiden  $500\mu\text{M}$ 'lık ikinci stok çözeltisi hazırlandı. İkinci stok çözeltiden 2, 10, 20, 30, 40, 60, 80  $\mu\text{M}$ 'lık standartlar hazırlandı.
- Doku ve hücre kültür ortamı süpernatantları %30  $\text{ZnSO}_4$  çözeltisi ile deproteinize edildi ( 100 $\mu\text{l}$  örnek+ 20 $\mu\text{l}$   $\text{ZnSO}_4$  ile) ve 10000 RPM'de on dakika santrifüj edildi.
- 100  $\mu\text{l}$  süpernatant çekilerek üzerine 20  $\mu\text{l}$  glisin- NaOH tamponu eklendi.
- Kadmiyum granüllerinin aktivasyonu gerçekleştirildi. Granüller üç kez bidistile su ile çalkalandı. Bir-iki dakika  $\text{CuSO}_4$  çözeltisi içinde bekletildi. Daha sonra glisin NaOH tamponu ile üç kez yıkandı.
- Her bir numune içerisine aktiflenmiş kadmiyum granülleri ilave edildi. Vortekslenerek 20 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 10000 RPM'de on dakika santrifüj edildi.
- 50  $\mu\text{l}$  süpernatant alındı. 1/1 oranında karıştırılarak hazırlanmış olan NED sülfonilamid çözeltisinden 50  $\mu\text{l}$  eklendi.
- 540 nm'de mikroplak okuyucuda (Bio-TEK Instruments EL 800) absorbanları ölçüldü. Standart grafikten (Şekil 17) yararlanılarak örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.



**Şekil 17.** NO standart grafiği

Sonuçlar, protein düzeylerine oranlanarak  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein olarak ifade edildi.

### 3.6. DOKUDA VE HÜCRE KÜLTÜR ORTAMLARINDA MDA ÖLÇÜMÜ

Günümüzde MDA düzeyinin belirlenmesinde kullanılan spektrofotometrik yöntemler tiyobarbitürik asidin MDA ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan pembe renkli bileşiğin ölçümüne dayanmaktadır. Bu yöntemde tiyobarbitürik asit MDA dışında bazı glikoproteinler, aminoasitler ve benzeri bileşiklerle de aynı reaksiyona girmekte ve yanlış yüksek ölçümlere neden olmaktadır.

Yapılan çalışmalarda MDA ölçümlerinde florometrik HPLC yönteminin spektrofotometrik yöntemden doğruluk ve hassasiyet yönünden daha üstün olması nedeniyle son yıllarda MDA ölçümlerinde HPLC yönteminin kullanımı giderek artmaktadır. Bu yöntemde MDA'nın kromotografik ayrımının ve florometrik ölçümünün yapılması daha doğru sonuç elde edilmesini sağlamaktadır (97).

#### *Reaktifler*

- 1,1,3,3 tetraetoksi propan (MDA standardı)
- 2,8 mmol/L butillenmiş hidroksi toluen (etanolda) (BHT)
- %8,1 SDS (sodyum dodesil sülfat)



-8g/L tiyobarbitürük asit (TBA)+ asetik asit karışımı (TBA, 200mL/L asetik asit ile 1/1 dilüe) 2M NaOH ile P<sup>H</sup> 3,5'a ayarlandı.

-Butanol:piridin (15:1)

-0,01M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ultra saf su ile hazırlandı.

-0,01M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ultra saf su ile hazırlandı.

-1,1,3,3 tetraethoksi propane ile 10mM /L stok standart hazırlandı (distile su ile).

Daha sonra bu standarttan 50, 40, 20,10, 5, 3, 1.5, 0.75, 0.375, 0.188, 00687 µM/L konsantrasyonlarda standartlar oluşturuldu.

### *Analiz Aşamaları*

-Akış hızı 0,8ml/dk.

-Kolon ısısı 40 °C

-Dedektör dalga boyu florosan dedektör

-Ex 515, Em 553

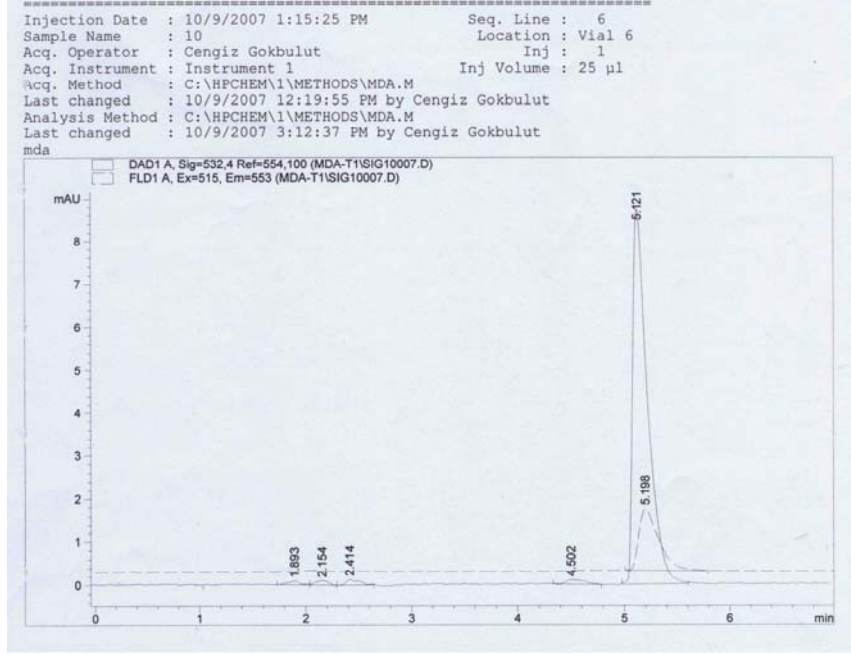
-Dad dedektör 532nm

-Enjeksiyon miktarı 25 µl

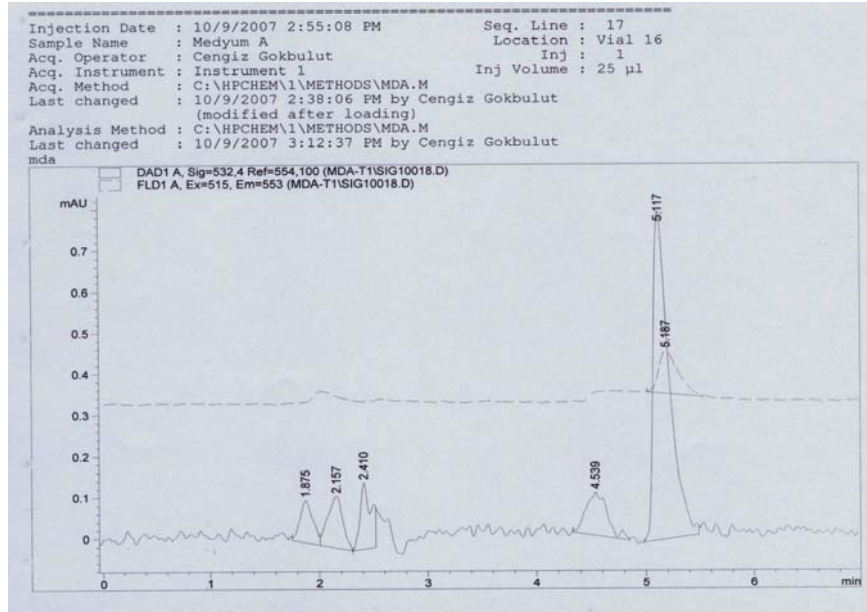
-Kolon: P henomenex C18 nemesis olacak şekilde HPLC sistem hazırlandı.

- Mobil faz: Tampon 80 µl, metanol 10 µl, asetonitril 10 µl
- 50µl std, numune üzerine 20µl 2.8mM BHT + 40 µl %8.1 SDS + 600 µl 8g/L TBA asetik asit karışımı eklendi.
- 95°C de 1 saat inkübe edildi. Buz üzerinde soğutuldu.
- Soğuduktan sonra 200µl saf su + 1000 µl butanol : piridin karışımı eklendi.
- 1 dakika vortekslendi.
- İki-üç dakika inkübasyondan sonra ayrılmış olan renkli üst faz 1,5 mL'lik plastik eppendorf tüplere alındı.
- 10000 RPM'de beş dakika santrifüj edildi.

Yukarıda anlatıldığı şekilde önce standartlar çalışıldı (Agilent 1100 Serisi, Waldron, Almanya). Sistemin ve standartların düzgün olduğu görüldükten sonra numunelerin çalışılmasına geçildi. Her altı örnekte bir standart çalışılmak suretiyle numuneler çalışıldı (Şekil 18 ve 19). Örneklerdeki MDA konsantrasyonları kendisine en yakın standardın alanı ile doğru orantı kurularak hesaplandı. Sonuçlar protein düzeylerine oranlanarak mg protein başına nmol olarak ifade edildi.



Şekil 18. 10µM konsantrasyonundaki MDA standardının kromotogramı



Şekil 19. 1mM melatonin uygulanmış hücre kültür ortamı örneğinin MDA analizinin kromotogramı

### 3.7. MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-9 AKTİVİTE DENEYİ

Farklı melatonin konsantrasyonları ile inkübe edilen CaCo-2 hücrelerinin ortamları toplandı. Hücre kültür süpernatantları 5 dakika 10000 g'de +4°C'de santrifüj edildi.

% 0,1 triton X100 ile homojenize edilmiş olan doku örnekleri 15 dakika 10000 g'de +4°C'de santrifüj edildi. Hücre kültür ortamlarında ve homojenize doku örneklerinde aktif MMP-9 düzeyleri ELISA metodu ile (Sensolyte Plus, Anaspec) hazır kit kullanılarak ölçüldü.

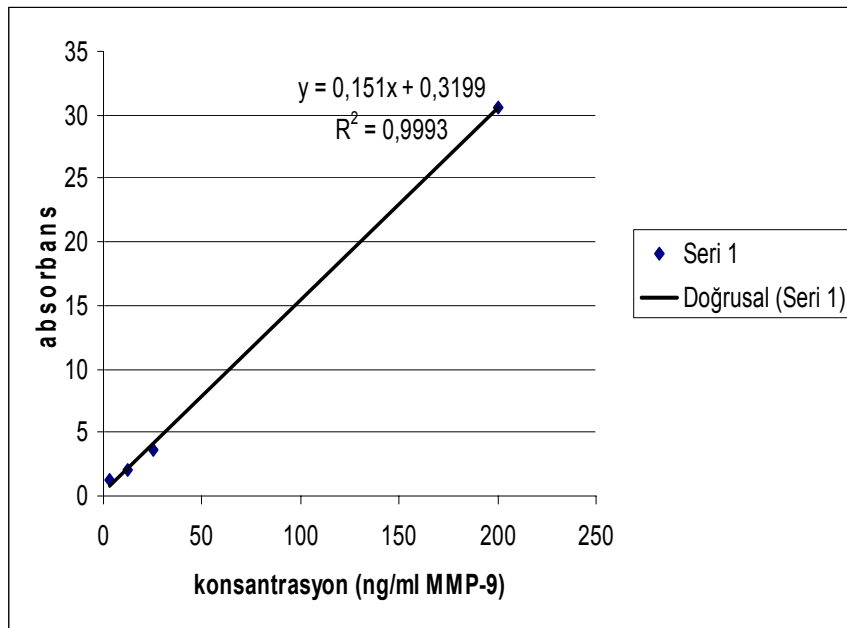
#### *Kit içeriği*

- Monoklonal anti insan MMP-9 antikoruna ile kaplanmış 96 kuyucuklu plak.
- Yıkama tamponu 10x konsantre deiyonize su ile 9 kez sulandırıldı.
- MMP-9 standardı (10 µg/ml rekombinant insan pro MMP-9), 10 µl standardına 490 µl dilüsyon tamponu eklenerek 200 ng/ml'lik standart hazırlandı. Bu standarttan seri dilüsyon yapılarak 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 ng/ml'lik 6 tane standart hazırlandı. Tüm bu işlemler buz üzerinde yapıldı.
- MMP dilüsyon tamponu
- Assay tamponu
- APMA (4-aminofenilmerkürük asetat) (100mM ). Assay tamponu ile 1mM olacak şekilde dilüsyon yapıldı.
- MMP-9 substratı (5-FAM/QXL 520 FRET peptid) deney tamponu ile 1/200 dilüsyon yapıldı.

#### *Analiz Aşamaları*

- Tüm kit içeriği oda ısısına getirildi. Prospektüsde yazıldığı şekilde reaktiflerin dilüsyonları yapıldı
- Monoklonal anti insan MMP-9 antikoruna ile kaplanmış olan kuyucuklara 100 µl örnek, standart ve blank (MMP-9 dilüsyon tamponu) eklendi.
- 100-200 RPM'de oda ısısında bir saat inkübe edildi.
- 200 µl yıkama tamponu ile tüm kuyucuklar dört kez yıkandı.
- MMP-9 standardı zimojen yapıda olduğundan, standartların bulunduğu kuyucuklara 100 µl, 1mM APMA eklenip 37 °C'de iki saat inkübe edilerek aktif hale getirildi.

- Tüm kuyucuklar 200 µl yıkama tamponu ile dört kez yıkandı.
- Tüm kuyucuklara 100 µl MMP-9 substrat eklendi.
- Plak kapatılarak karanlıkta 16 saat inkübasyondan sonra, mikropalak ELISA okuyucuda (Thermo labsystems multiskan spectrum marka) 490/520 nm'de (eksitasyon/emisyon) floresans absorbanları okundu.
- Standart grafiğe (Şekil 20) göre aktif MMP-9 düzeyleri bulundu.
- Sonuçlar hücre kültür ortamındaki protein düzeylerine oranlanarak ng/mg protein olarak değerlendirildi.



**Şekil 20.** Aktif MMP-9 standart grafiği

### 3.8. DOKULARIN MMP-9 YÖNÜNDEN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELENMESİ

Her olgunun H&E boyalı preparatları arşivden çıkarıldı.

İmmün-histokimyasal boyama için parafin bloklardan hazırlanan kesitler poly-L-lysin (MikroSlides Snowcoat X-tra, Surgipath, Richmond, IL, USA) kaplı lamlara alındı. Alınan kesitler deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemi sonrası endojen peroksidaz aktivitesinin bloke edilmesi için % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de 15 dakika bekletildi. Antikorum nonspesifik bağlanmasını önlemek için protein blokajı uygulandı. Ardından primer antikor olan MMP-9 (NovoCastr, UK, NCL-MMP-9-439, 1/40) ile bir saat inkübe edildi. Primer antikora bağlanan sekonder antikor ile 15 dakika ve

streptavidin-biyotin-peroksidaz enzim kompleksi ile 15 dakika inkübasyon işlemleri gerçekleştirildi. Her bir aşamanın bitiminde kesitler PBS ile yıkandı. Renklendirici olarak 3,3'-diaminobenzidin (DAB) ile inkübe edilen kesitlere hemotoksilen ile zemin boyaması yapılarak lamelle kapatıldı.

Hemotoksilen eozin ile boyalı ve immünohistokimyasal boyama uygulanan örneklerin hepsi ışık mikroskobu ile (Olympus BX50) ile incelendi. MMP-9'un epitelium hücrelerinde, inflamatuvar hücrelerde sitoplazmik boyanması değerlendirildi. Boyanma yoğunluklarına göre hafif boyananlara +1, orta derecede boyananlara +2, güçlü boyananlara +3 puan verildi.

### **3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

Araştırmadan elde edilen veriler, SPSS 15.0 istatistik programında değerlendirilmiştir. İstatistiksel incelemede 0.05'in altındaki p değerleri % 95 güven aralığı ile anlamlı olarak kabul edilmiştir. MDA, NO, MMP-9 ölçümlerine ait tüm veriler ortalama  $\pm$  standart error mean (SEM) olarak ifade edilmiştir. Ortalamaların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi uygulandı. Değişkenler arasındaki korelasyonların karşılaştırılmasında "Spearman's nonparametrik testi" kullanıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. APOPTOTİK HÜCRELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Apoptotik hücrelerin değerlendirilmesi için hazırlanan boya ile boyanarak havada kurutulmuş olan hücreler ışık mikroskopunda incelendi (Resim 2 ve 3). Her seferinde 200 hücre sayılarak normal ve apoptotik hücre ayrımı yapıldı. Hücre sayıları tablo V’de gösterilmiştir.

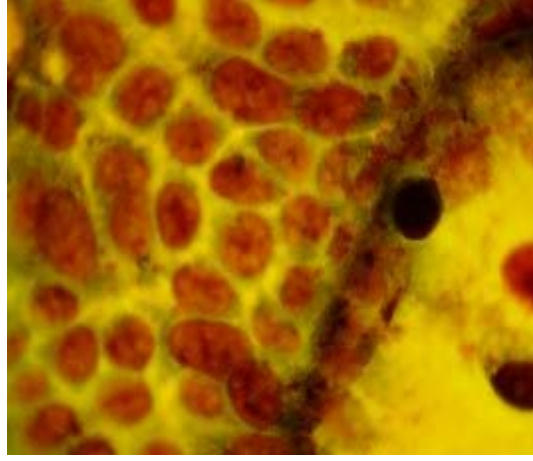
0,1µM melatonin uygulanan örnekte hiç apoptotik hücre saptanmadı. Diğer gruplarda saptanan apoptotik hücre sayıları çeşitli idi ve uygulanan melatonin dozu ile ilişkili görünmüyordu.

**Tablo V.** Deney ve kontrol gruplarında Normal/apoptotik hücre sayıları (N=normal hücre, A= apoptotik hücre, Sayılan toplam hücre sayısı=200)

			GÜNLER					
			1		2		3	
Deney Grupları	Grup	Melatonin dozu	N	A	N	A	N	A
	A	1 mM	194	6	199	1	198	2
	B	0,01 mM	192	8	200	0	196	4
	C	0,1 µM	200	0	200	0	200	0
	D	1 nM	198	2	197	3	197	3
	E	0,01 nM	199	1	195	5	198	2
Kontrol Grubu	F	(-)	199	1	199	1	197	3



Resim 2



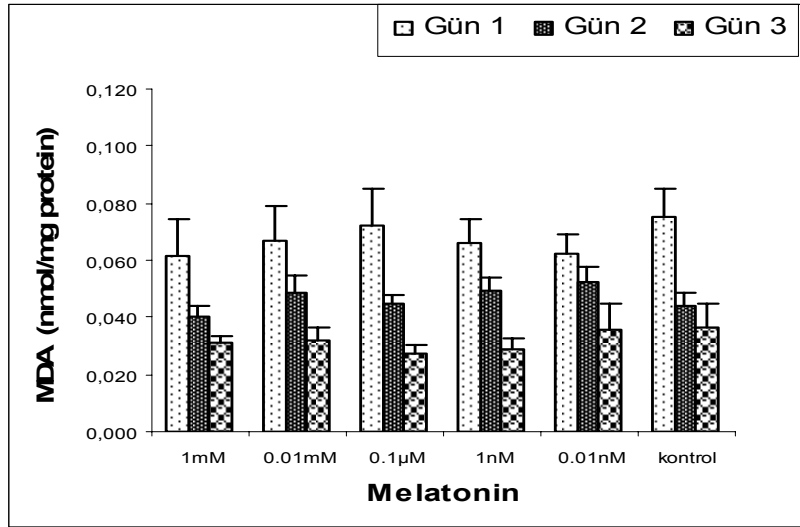
Resim 3

**Resim 2.** Normal hücrelerin mikroskopik görünümü (X100)

**Resim 3.** Apoptotik hücre (Koyu renk boyanmış) (X100)

#### 4.2. CACO-2 HÜCRELERİNDE MELATONİNİN MDA YAPIMI ÜZERİNE ETKİSİ

Melatonin uygulanan gruplarda ve kontrol grubunda MDA konsantrasyonlarının günlere göre dağılım grafiği şekil 21'dedir.



**Şekil 21.** Melatonin uygulanan gruplarda ve kontrol gruplarında MDA konsantrasyonlarının günlere göre dağılım grafiği

Birinci günde en yüksek MDA konsantrasyonu 0,1µM melatonin uygulanan grupta ölçülmüştür; en düşük MDA konsantrasyonu ise 1mM ve 0,01nM melatonin uygulanan grupta ölçülmüştür.

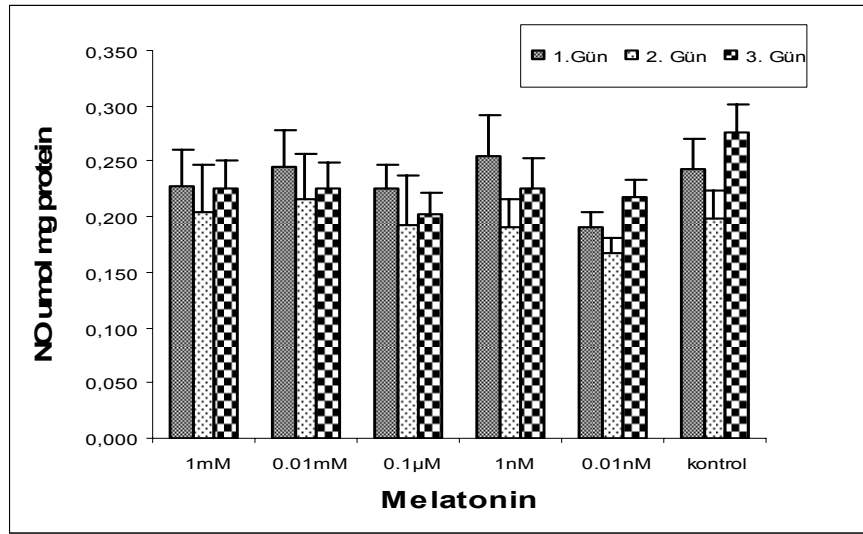
İkinci günde en yüksek MDA konsantrasyonu 0,01nM melatonin uygulanan grupta ölçülmüştür; en düşük MDA konsantrasyonu ise 1mM melatonin uygulanan grupta ölçülmüştür.

Üçüncü günde en yüksek MDA konsantrasyonu 0,01nM melatonin uygulanan grupta ölçülmüştür; en düşük MDA konsantrasyonu ise 0,1 µM melatonin uygulanan grupta ölçülmüştür.

Çalışmamızda; melatoninin bir ve üç günlük uygulamasının MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre bir azalma gösterdiğini izledik. Fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi.

#### 4.3. CACO-2 HÜCRELERİNDE MELATONİNİN NO<sup>-</sup> YAPIMI ÜZERİNE ETKİSİ

Melatonin uygulama grupları ve kontrol gruplarının günlere göre ortalama NO<sup>-</sup> düzeyleri şekil 22’de gösterilmiştir.



**Şekil 22.** Melatonin uygulanan gruplarda ve kontrol gruplarında NO konsantrasyonlarının günlere göre dağılım grafiği

Birinci günde en yüksek NO<sup>-</sup> konsantrasyonu 1nM melatonin uygulanan grupta ölçülmüştür; en düşük NO<sup>-</sup> konsantrasyonu ise 0,01nM melatonin uygulanan grupta ölçülmüştür.



İkinci günde en yüksek NO<sup>•</sup> konsantrasyonu 0,01mM melatonin uygulanan grupta, en düşük NO<sup>•</sup> konsantrasyonu ise 0,01nM melatonin uygulanan grupta ölçülmüştür.

Üçüncü günde en yüksek NO<sup>•</sup> konsantrasyonu 0,01mM ve 1nM melatonin uygulanan grupta, en düşük NO<sup>•</sup> konsantrasyonu ise 0,1µM melatonin uygulanan grupta ölçülmüştür.

Melatonin uygulamasının bir ve ikinci günlerinde NO<sup>•</sup> düzeyleri arasında anlamlı bir fark görülmemesine rağmen üçüncü günün sonunda 1mM melatonin uygulanan grupta NO<sup>•</sup> yapımı kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalmıştır ( $p < 0.05$ ). Üçüncü gün sonunda 0,1µM ve 0.01nM melatonin uygulanan gruplarda da NO<sup>•</sup> yapımının anlamlı şekilde ( $p < 0.05$ ) azaldığı izlenmiştir.

#### **4.4. CACO-2 HÜCRELERİNDE MELATONİNİN MMP-9 YAPIMI ÜZERİNE ETKİSİ**

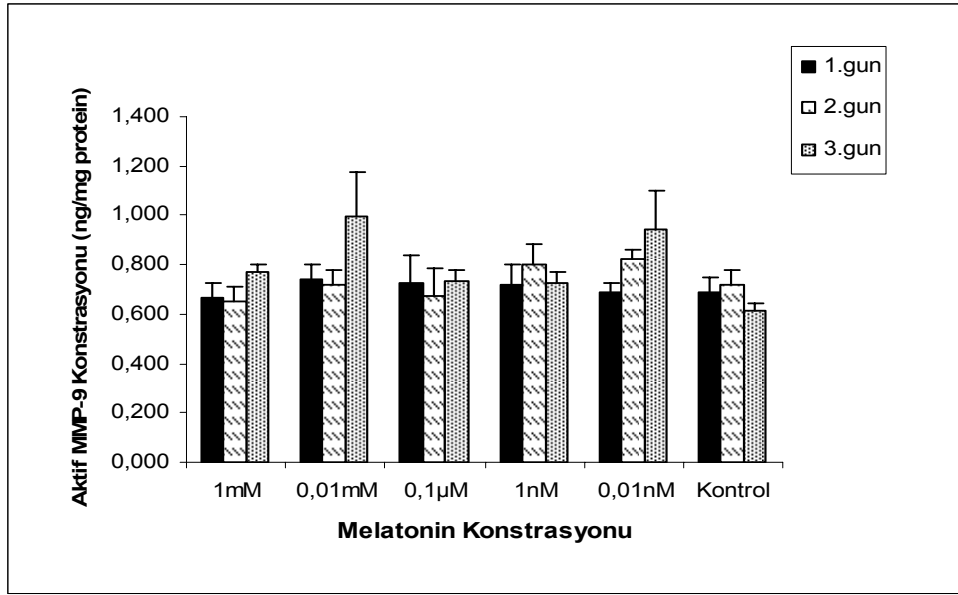
Melatonin uygulama grupları ve kontrol gruplarının günlere göre ortalama aktif MMP-9 düzeyleri Şekil 23'de gösterilmiştir.

Birinci günde en yüksek aktif MMP-9 konsantrasyonları 0,01mM melatonin uygulanan grupta; en düşük MMP-9 konsantrasyonları ise 1mM melatonin uygulanan grupta görülmüştür.

İkinci günde en yüksek aktif MMP-9 konsantrasyonları 1nM melatonin uygulanan grupta; en düşük MMP-9 konsantrasyonları ise 1mM melatonin uygulanan grupta görülmüştür.

Üçüncü günde en yüksek aktif MMP-9 konsantrasyonları 0,01mM melatonin uygulanan grupta; en düşük MMP-9 konsantrasyonları ise 1nM melatonin uygulanan grupta görülmüştür.

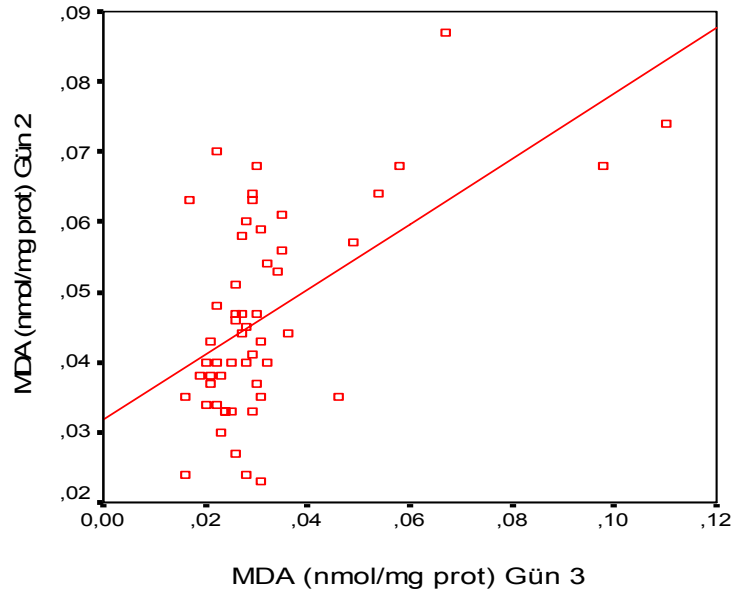
Melatonin uygulama grupları ile kontrol grupları arasında aktif MMP-9 düzeylerinde birinci ve ikinci günler arasında anlamlı bir fark yokken üçüncü günün sonunda 1mM, 0,01mM ve 0,01nM melatonin uygulama grupları ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 23.** Melatonin uygulanan gruplarda ve kontrol gruplarında aktif MMP-9'un günlere göre dağılım grafiği

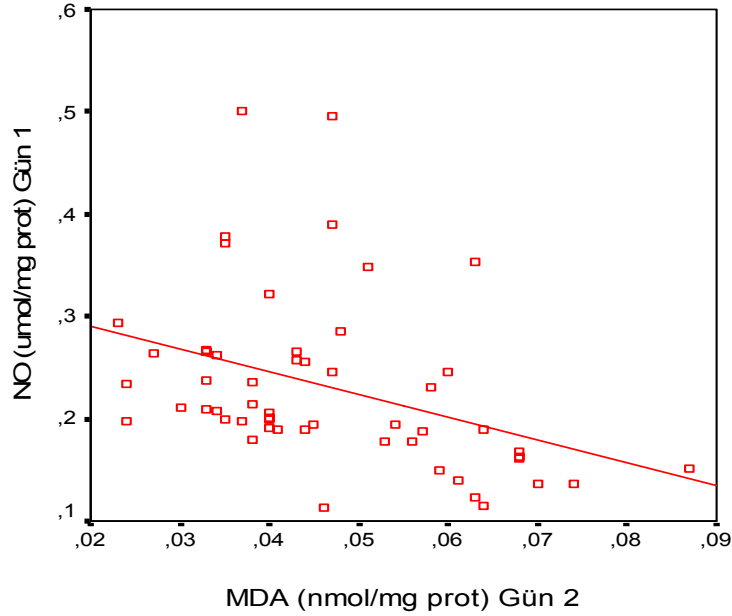
#### 4.5. BİYOKİMYASAL PARAMETRELER ARASINDAKİ KORELASYONLAR

Spearman'ın nonparametrik korelasyon analizinde melatonin uygulanan gruplarda doz dikkate alınmadan ikinci ve üçüncü günlerde ölçülen MDA düzeyleri arasında pozitif yönde güçlü bir korelasyon bulunmuştur ( $p= 0.000$   $r = 0.469$ ) (Şekil 24).



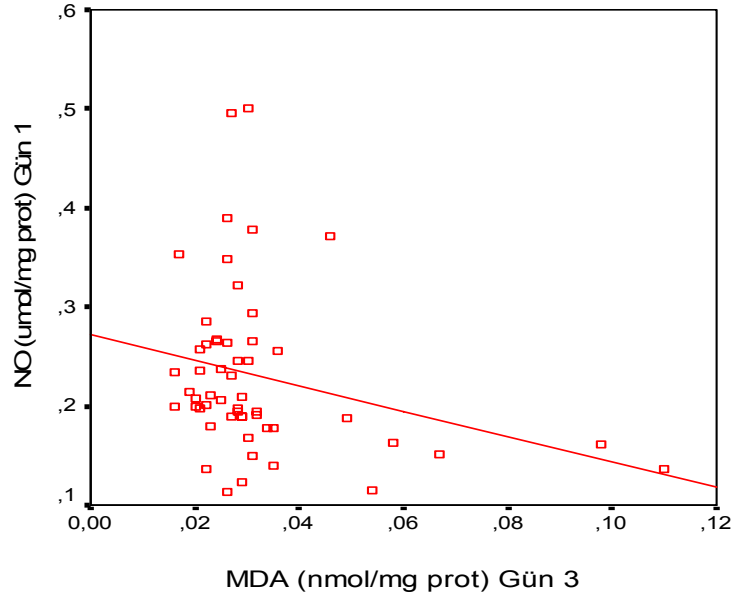
**Şekil 24.** Melatonin uygulanan CaCo-2 hücrelerinin ikinci ve üçüncü günlerdeki MDA düzeyleri arasındaki ilişki

Melatonin uygulamasının doz dikkate alınmadan ölçülen birinci gün sonu NO<sup>•</sup> düzeyleri ile ikinci gün sonu MDA düzeyleri arasında negatif yönde güçlü bir korelasyon izlendi ( $p = 0.000$ ;  $r = -0.525$ ) (Şekil 25).



**Şekil 25.** Melatonin uygulanan CaCo-2 hücrelerinde birinci gün sonunda NO düzeyleri ile ikinci gün sonundaki MDA düzeyleri arasındaki ilişki

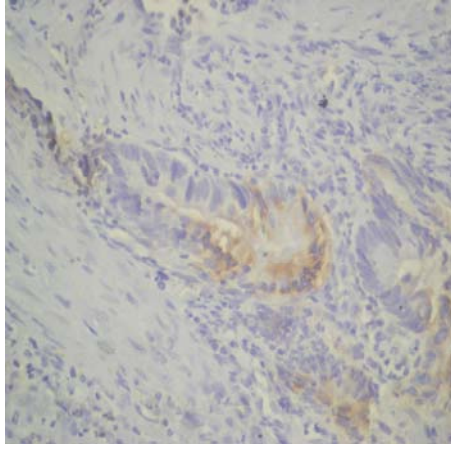
Melatonin uygulamasının doz dikkate alınmadan ölçülen birinci gün sonu NO<sup>•</sup> düzeyleri ile üçüncü gün sonu MDA düzeyleri arasında negatif yönde korelasyon izlendi ( $p = 0.014$ ;  $r = -0.333$ ) (Şekil 26).



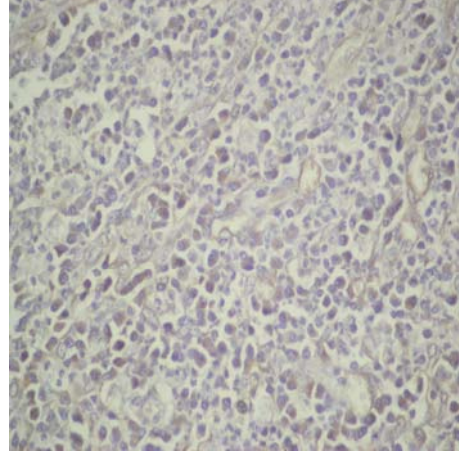
**Şekil 26.** Melatonin uygulanan CaCo-2 hücrelerinde birinci gün sonunda NO düzeyleri ile üçüncü gün sonundaki MDA düzeyleri arasındaki ilişki

#### **4.6. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME SONUÇLARI**

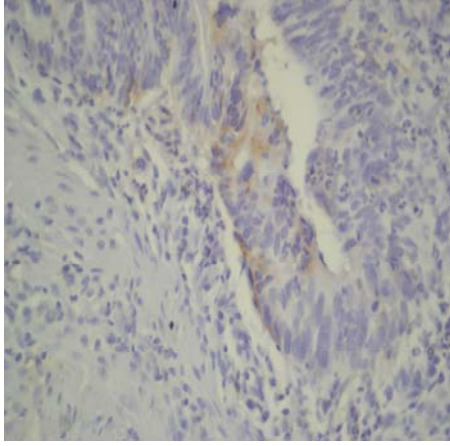
Doku örneklerinin immünohistokimyasal incelemesi sonucunda (Resim 4) stroma hücrelerinde %27,5 olguda boyanma (MMP-9 ekspresyonu ) gözlenmedi. Olguların %45'inde hafif derecede (+1), %27,5'unda ise orta derecede (+2) ekspresyon gözlemlendi. Örneklerin epitel hücreleri incelendiğinde %45'inde MMP-9 ekspresyonu gözlenmezken, % 45'inde hafif ve %10'unun da orta derecede ekspresyon gözlemlendi.



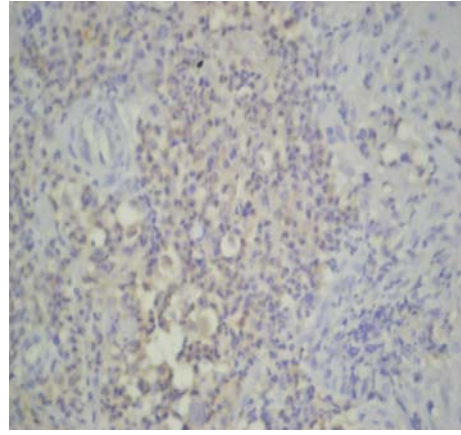
A



B



C



D

**Resim 4.** Kolorektal kanserli hastalarda tümör dokusunda MMP-9 ekspresyonunun immünohistokimyasal incelenmesi ( A-C-D: X200 B: x400)

## 5. TARTIŞMA

Kolorektal kanserler dünyanın değişik toplumlarında farklı sıklıkta görülen onkolojik bir sorundur. Primer kolorektal kanserlerin %95'ini adenokarsinomlar oluşturur. Kolon kanserlerinin yaklaşık % 60'ı distal kolonda izlenirken ~%30'u rektum da, %20'si sigmoid kolonda yerleşir. Kolon kanseri gelişiminde genetik ve çevresel faktörler etkilidir.

Kolorektal kanserlerin başlangıç ve ilerleme aşamalarında reaktif oksijen radikallerinin rolü ileri sürülmüştür. Karsinogenezde DNA hasarı, hücre membranı, mitokondri hasarları önemli olup serbest oksijen radikallerinin tümör ilerlemesini ve başlayan hücre çoğalmasını artırırken antioksidan enzimlerin tümör başlamasını ve ilerlemesini inhibe edebileceği ihtimalinin yüksek olduğu bildirilmiştir (76). Gastrointestinal mukoza; aerobik metabolizma esnasında fazlaca SOR oluşmasının bir sonucu olarak uzamış oksidatif stresin hedefidir. Ayrıca intestinal sistem devamlı olarak oksidan besinlere maruz kalmaktadır (111).

Melatoninin klinik açıdan etkili bir antioksidan ve dolayısıyla antikanserojen olduğuna inanılmaktadır. Çeşitli klinik durumlarda melatoninin tümör büyümesini inhibe ettiği ve kanser kemoterapisinde yan etkileri önlediği rapor edilmiştir. Bu çalışmada güçlü bir antioksidan olan melatoninin kolon adenokanser hücre kültürlerinde NO<sup>•</sup>, MDA ve MMP-9 üzerine etkileri araştırılarak melatoninin olası koruyucu etkilerinin moleküler yolu açıklanmaya çalışılmıştır.

Melatoninin; hücreleri, dokuları ve organları serbest radikal oluşturan ajan ve olaylar (potasyum siyanid, L-sistein, aşırı egzersiz, karbon tetraklorid, iskemi-reperfüzyon, protein ve iyonize radyasyon gibi) sonucu gelişen oksidatif zedelenmeye karşı çeşitli serbest radikalleri ve serbest oksijen radikallerini (OH<sup>•</sup>, peroksinitrit, NO<sup>•</sup>, vb.) detoksifiye ederek koruduğu gösterilmiştir. Melatoninin en potent endojen hidroksil radikal temizleyicilerinden biri olduğu ve glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve SOD gibi antioksidan enzimleri stimüle ettiği, nitrik oksid sentetaz gibi oksidatif enzimlerin sentezinde ise inhibitör etki yaptığı belirlenmiştir.

İnsan kolon dokusunda melatonin reseptörlerinin varlığı bilinmektedir. Kolon dokusunda üç tip melatonin reseptörü vardır: MT-1, MT-2, MT-3. Tümör hücre kültürlerinde MT-2'nin antiproliferatif rol oynadığı gösterilmiştir.

Tümör proliferasyonunda melatoninin rolünü inceleyen çalışmalar mevcuttur. Fakat kolorektal kanserlerde *in vitro* deneylerle melatoninin rolünü inceleyen az sayıda çalışmaya rastlanmıştır (16,113). Farriol ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada düşük ( $10^{-7}M-10^{-10}M$ ) ve yüksek dozlarda ( $1,2$  ve  $3 \times 10^{-3}M$ ) melatoninin CT-26 sıçan hücrelerinde DNA sentezi üzerine olan etkilerini 5- bromo-2-deoksiüridin düzeylerine bakarak incelemişler, yüksek doz melatonin konsantrasyonları ile DNA sentezi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş bulmuşlardır (76). Çalışmamızda melatoninin; apoptoz üzerine hiçbir doz ve uygulama süresinde anlamlı bir etki yapmadığını gözlemledik. Ancak melatoninin apoptoz üzerine etkisi ile ilgili kesin yargıya varabilmek için apoptoz deneylerinin başka metodlarla da desteklenmesi gerekmektedir.

Nitrik oksit, pro-inflamatuar veya antiinflamatuar etkileriyle akut ve kronik inflamasyonda önemli bir role sahiptir. Barsak inflamasyonunda NO'nun etkileri üzerine çalışmalar 1990'ların başından itibaren artış göstermiştir. Bu araştırmaların bazılarında NO inhibisyonu dokularda fonksiyon bozukluğu ve hasara neden olurken, bir kısmında da yararlı etkiler göstermiştir. Nitrik oksit oldukça reaktif bir moleküldür ve doğrudan ya da peroksinitrit oluşumu yoluyla oksidan etki gösterir. Bu oksidan özelliği nedeniyle bakterisid ve tümör hücrelerine karşı sitotoksiktir, savunma sisteminin bir parçası olarak görev yapar. Nitrik oksidin birçok zararlı etkisi süperoksit anyonu ile reaksiyonu sonucu oluşan peroksinitrite bağlı olarak ortaya çıkar (65). Biyolojik sistemlerde üretilen yüksek konsantrasyonlardaki NO'nun zararlı etkileri üç mekanizma ile gerçekleşir. Bunlardan ilki, NO'nun oksijene benzer şekilde hücre içine girerek, paylaşılmamış elektronu bulunan bir molekül olduğu için hücre içinde proteinlerin yapısında bulunan demir gibi geçiş metallerine bağlanması ve ortama serbest demir salınmasına neden olmasıdır. İkincisi, otooksidasyon ile N-nitroso bileşiklerini oluşturarak DNA'ya zarar veren  $N_2O_3$  oluşturmasıdır. Son olarak da nitrik oksit, oksijen radikalleri ile reaksiyona girerek DNA, proteinler ve hücre membran lipidlerini okside eden peroksinitrit üretmesidir. Nitrik oksit fizyolojik ve patofizyolojik olaylarda hücre sel toksisiteyi gösteren bir biyoregülatör moleküldür (117).

Aktive olmuş immün sistem hücrelerinde NO üretiminin artmış bulunması NO ve kanser gelişimi arasında bir bağ olduğunu düşündürmektedir. İnsan kolon

adenomlarında gözlenen NOS izoformlarındaki artış, kolon kanseri gelişimi sürecine önemli katkılarda bulunmaktadır (64). Yakın zamanda yapılan çalışmalar NO<sup>•</sup>'in en az iki mekanizma ile tümör gelişimi ile ilgili olabileceğini göstermiştir. Bunlardan birincisi, anjiogenezisin stimülasyonu, diğeri ise DNA üzerinde serbest radikallerin direk aktivasyonu ile artmış mutagenesistir (68).

Navarro ve arkadaşları HT-29 kolon adenokanser hücrelerinde melatoninin NO<sup>•</sup> yapımı üzerine etkilerini inceledikleri bir çalışmada melatoninin doza bağlı bir şekilde NO<sup>•</sup> düzeylerinde düşüşe sebep olduğunu göstermişlerdir. Maksimum etki 4mM melatonin dozunda olmak üzere 1mM doz melatonininde de NO<sup>•</sup> düzeylerinde anlamlı azalma göstermişlerdir (118). Benzer şekilde Papazisis ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, 72 ve 96 saat sonunda melatoninin sitotoksik etkilerini incelemişler ve 0.1 mM'in üzerindeki melatonin dozlarının HT-29 hücreleri için sitotoksik olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada 0.1mM'dan daha düşük dozlarda melatoninin, hücre büyümesi ve DNA sentezi üzerinde herhangi bir etki yapmadığını gösterilmiştir. Sitotoksik etkiler özellikle 1mM ve üzeri dozlarda dramatik şekilde artmıştır (120). Biz çalışmamızda 1mM'nin üzerindeki melatonin dozlarının toksik etki yapacağını düşünerek maksimum melatonin dozumuzu 1mM olarak belirledik. Melatonin dozlarını 1/100 oranlarında düşürerek farklı dozlarda melatonine yanıtın nasıl olacağını izlemeyi amaçladık.

Çalışmamızda melatonin uygulamasının bir ve ikinci günlerinde NO<sup>•</sup> düzeyleri arasında anlamlı bir fark görülmemesine rağmen üçüncü günün sonunda 1mM melatonin uygulanan grupta NO<sup>•</sup> yapımı kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalmıştır ( $p < 0.05$ ). Bu sonuç Navarro ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma ile uyumludur. Bu sonuca ek olarak yine üçüncü gün sonunda 0,1 $\mu$ M ve 0.01nM melatonin uygulanan gruplarda da NO<sup>•</sup> yapımının anlamlı şekilde ( $p < 0.05$ ) azaldığı izlenmiştir. Bu sonuçlar melatoninin NO<sup>•</sup> oluşumunu doza ve zamana bağımlı olarak etkilediği düşündürmektedir. NO<sup>•</sup>'in tümör hücrelerine karşı sitotoksik etkisi göz önüne alındığında, melatonin tedavisinin NO<sup>•</sup> düzeylerinde azalmaya neden olması ile melatoninin oksidatif hasara karşı koruyucu etkisini NO<sup>•</sup> üzerinden göstermesi mümkündür.

Serbest radikal aracılı doku hasarının göstergesi olarak daha çok oksidatif hasar sonucu oluşan ürünlerin ölçülmesi yoluna gidilmektedir. Bu amaçla lipid



peroksidasyonunun yıkım ürünlerinden biri olan MDA, oksidatif hasarın *in vivo* göstergesi olarak en sık ölçülen parametredir. Kolon kanserli hastaların serum MDA düzeyinin yüksek bulunması, serbest oksijen radikalleri ile oluşan lipid peroksidasyonunun sonuçlarından biridir. Bu sonuç kolon kanserinde oluşan doku hasarında serbest oksijen radikallerinin ve oksidatif stresin rol aldığını düşündürmektedir. Serum MDA düzeyi ölçümünün kolon kanseri hastalığının tanısında klinikte faydalı olabileceğini düşündürmektedir (100). Bazı araştırmacılar kanserli hastalarda plazmada ve kanserli dokularda artan lipid peroksit düzeylerini bildirmişlerdir. (102, 103, 105).

Serbest oksijen radikallerinin düzenlenmesi biyokimyasal reaksiyonlardaki değişikliklerin normal bir sonucudur (5). Membran fosfolipidlerini içeren hücre komponentlerinin oksidatif hasara karşı çok önemli bir koruma sunduğu dikkate alınmalıdır. Serbest oksijen radikali üretimi hücrel membran dejenerasyonu ve DNA hasarının bir sonucu olarak artmış lipid peroksidasyonunu içerecek hastalığın klinik ilerleyişinde artmaktadır. Kanser hastalarında anormal olarak çoğalan hücrelerde artan lipid peroksidasyonunun serum lipid peroksitlerinde artışa yol açtığı gösterilmiştir. Kanserde lipid peroksidasyonundaki artış Szatrowski ve Nathan tarafından gözlemlendiği gibi, zayıf antioksidan sisteme bağlı olabilir (98). Kanser hastalarında MDA artışı biyolojik membranların yapısındaki poliansature yağ asidi ürünlerinin bulunmamasına bağlı olabilir. Skrzydlewska ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada kolorektal kanser hastalarında plazma ve doku MDA konsantrasyonlarının arttığını göstermişlerdir (5). Erata ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada kolorektal kanserli hastaların normal dokuları ile malign dokuları arasındaki MDA düzeylerini karşılaştırmışlar ve malign dokuda MDA düzeylerinin %111 daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (112).

Kolon kanseri ile oksidatif stres ilişkisini gösteren birçok çalışma mevcuttur. Bayraktar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kolon kanserli hastalarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum MDA düzeylerinde anlamlı bir artış görülmektedir (114). Otamiri ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kolorektal kanser hastalarında normal doku ile karşılaştırıldığında MDA düzeylerinde anlamlı bir yükselme bulmuşlardır (105). Mei ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada kolitli ratlardan aldıkları inflamasyonlu kolonu lipopolisakkaritle uyararak *in vivo* ve *in vitro*

melatoninin MDA ve NO<sup>·</sup> üzerine etkilerini incelemişlerdir. *In vitro* deneylerde lipopolisakkaritle uyarılan hücrelerde 1mM dozda melatonin uygulamasının NO<sup>·</sup> düzeyinde anlamlı bir düşüşe sebep olduğunu, 10 µM ve 100 µM dozlarda ise NO<sup>·</sup> düzeylerinde bir azalma olduğunu fakat bu azalmanın anlamlı olmadığını göstermişlerdir. 10 µM, 100 µM ve 1mM dozların her üçünde de melatoninin MDA düzeylerinde ise anlamlı bir azalmaya sebep olduğunu göstermişlerdir (13). Biz, çalışmamızda melatoninin dozdan bağımsız olarak bir ve üç günlük uygulanmasının MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre bir azalma gösterdiğini izledik. Fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. Mei ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, kolon kanseri hücrelerinin lipopolisakkaritle uyarılmasının, MDA düzeyindeki değişiklikleri yansıtması açısından önemlidir. Bizim, çalışmamızda MDA düzeylerinde anlamlı bir değişiklik izlenmemesi hücreleri herhangi bir oksidatif ajanla uyarmamış olmamız sebebiyle olabilir.

Yerer ve arkadaşları yaptıkları çalışmada plazma melatonin seviyelerindeki değişikliklerin eritrosit MDA düzeylerinde değişikliklere sebep olduğunu fakat bu değişikliklerin istatistiksel bir anlamlılık taşımadığını göstermişlerdir (119). Biz de çalışmamızda; kullandığımız melatoninle doku MDA düzeylerinde anlamlı bir fark bulamadık. Bu sonuç melatoninin antioksidan etkinliğinin lipid peroksidasyonu üzerine etkisi olmadığını düşündürmektedir.

Kanserde ESM, tümör dokusunun büyümesi ve tümör hücresinin yayılımını önlemek için primer bir bariyer olarak görev yapar. Tümör invazyonu ve metastazın mekanizması ile ilgili yapılan yeni çalışmalarda, bazal membran (BM) ve ESM bozulmasının asıl basamak olduğu gösterilmiştir. Malign tümörler bu bariyeri aşmak için metalloproteinazları kullanırlar (18, 27,116). Matriks metalloproteinazlar ekstrasellüler matriks yıkımını hem direkt olarak hem de tümör invazyonuna karışan diğer biyolojik sistemlerle etkileşerek, hücre adezyon molekülleri, sitoskeletal proteinler ve büyüme faktörleri aracılığıyla gerçekleştirirler (1). Matriks metalloproteinazlar, ekstrasellüler matriks ile bazal membran komponentlerini parçalama yeteneğine sahip olan bir enzim ailesidir (22, 27). Bu enzimler doku yeniden yapılanması, morfogenezis, yara iyileşmesi ve normal gelişimsel süreç gibi fizyolojik durumlarda rol oynadıkları gibi tümör hücresi invazyonu, anjiogenezis ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de yer alırlar (27).

Literatür incelendiğinde kolorektal kanserde MMP-9 düzeylerini inceleyen çok sayıda çalışmaya rastlanmıştır (1, 3, 4, 22, 29, 36, 106, 107, 108, 109, 110). Parsons ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, kolon adenomlarında normal mukozaya göre karşılaştırıldığında pro MMP-9 düzeyinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar ılımlı (moderate) displastik poliplerle şiddetli displastik polipler, karşılaştırıldığında MMP-9'da artmaya doğru bir eğilim olduğunu bildirmişler ve MMP-9'daki bu artışın tümörün invazyon ve metastaz yapma potansiyelinde önemli bir role sahip olabileceğini göstermişlerdir (106).

Kolonik ve rektal tümörler arasında MMP-9 ekspresyonunda farklılıklar mevcuttur. Roeb ve arkadaşları normal dokuyla karşılaştırdıklarında kolon kanserinde MMP-9 ekspresyonu beş kat artmış fakat rektal kanserli hastaların normal dokuları ile kanser dokusu arasında MMP-9 ekspresyonunda bir fark bulamamışlardır (107). Kolorektal kanserde MMP-9 seviyelerindeki artış direk tümör progresyonuyla ilgili olmaktan ziyade tümör dokusundaki ve etraf dokuda görülen tipik inflamasyonla izah edilmiştir. Bununla birlikte görünürdeki inflamasyonun derecesi, tümördeki MMP-9 ekspresyonunun seviyesi ile iyi bir korelasyon göstermemektedir (108).

Baker ve Leaper'ın çalışmalarında cerrahi rezeksiyondan sonra 77 hastanın normal ve tümöral mukoza içeren doku örneklerinde latent MMP-9; tümör örneklerinin %99'unda normal dokuların da %91'inde tespit edilmiştir. Aktif MMP-9 kolorektal tümörlerde %86, normal dokuda ise %16 oranında gösterilmiş total MMP-9 düzeyleri kolorektal tümörlerde normal dokuya göre anlamlı derecede yüksek bulunmuş. Endojen aktif MMP-9 tümör dokularının %100'ünde normal kolorektal dokuların ise %71'inde gösterilmiştir. Yine, tümörün patolojik evresi ile MMP-9 ekspresyon derecesi arasında bir uyum olduğu görülmüştür. Tümör diferansiyasyonu, derinliği, lenfatik ve vasküler invazyonla gelatinaz düzeylerinde farklılıklar gözlenmiştir. Bu farklılıklar anlamlı bulunmamıştır. Fakat aktivite deneyleri ile ölçülen, total MMP-9 ve endojen MMP-9 düzeyleri tümör dokularında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Tümör dokularında aktif ve latent MMP-9 lizis bandlarının her ikisi de Duke's stage ile korelasyon göstermekte fakat diferansiyasyon, tümör derinliği veya invazyonu ile korelasyon göstermemektedir (29).

Waas ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada karaciğer metastazı olan kolorektal kanserli hastaların metastatik tümör dokusunda, normal karaciğer

dokusuna göre daha yüksek miktarda MMP-9 aktivitesi saptamışlardır. Klinikopatolojik değişiklikler ile MMP-9'un aktif ve latent formları arasında korelasyon olduğunu göstermişlerdir (22). Tutton ve arkadaşları ise kolorektal kanserli hastalarda MMP-9 düzeylerini küratif cerrahi öncesi ve sonrası (6-12 ay sonra) dönemlerde incelemişler ve kanser dokularında MMP-9 düzeylerini normal dokuya göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır (109). Cerrahi sonrası dönemde MMP-9 düzeylerinde cerrahi öncesi döneme göre anlamlı derecede düşme tespit etmişlerdir Baker ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kolorektal kanserli hastaların dokularında latent ve aktif MMP-9 düzeylerini karşılaştırmışlar ve tümör dokularındaki aktif MMP-9 düzeylerinin normal dokudan anlamlı derecede yüksek olduğunu bulmuşlardır (36).

Ganguly ve arkadaşları indometazin ile indüklenmiş gastrik ülser hastalarında MMP-9'un aktivitesi üzerine melatoninin etkisini incelemişler ve melatoninin doza bağımlı olarak MMP-9 aktivitesini inhibe ettiğini göstermişlerdir. MMP-9 aktivitesinin azalması ile birlikte melatoninin ülserasyonu engellediğini bildirmişlerdir (110). Bizim çalışmamızda, melatonin uygulama grupları ve kontrol grupları karşılaştırıldığında aktif MMP-9 düzeyleri arasında bir ve iki günlük melatonin uygulaması sonunda anlamlı bir fark bulamadık. Üç günlük melatonin uygulaması ise 1mM, 0,01mM ve 0,01nM dozlarda MMP-9 düzeyleri kontrol gruplarına göre daha yüksek izlendi ( $p < 0,05$ ). Literatürde kolon kanseri hücrelerinde melatonin uygulaması ile aktif MMP-9 düzeylerini karşılaştıran *in vitro* bir başka çalışmaya rastlamadık. Bu yüzden çalışmamızdaki sonuçlarla literatür karşılaştırma imkanı bulamadık.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada CaCo-2 kolon adenokarsinom hücreleri kullanılarak *in vitro* şartlarda melatoninin antioksidan ve anti-kanserojen etkilerinin moleküler yolları araştırıldı.

Çalışmamızda melatonin uygulamasının doza ve zamana bağlı olarak MMP-9 düzeylerinde kontrol gruplarına göre artışa neden olduğu, yine doza ve zamana bağlı olarak NO<sup>-</sup> düzeylerinde azalmaya neden olduğu gösterildi.

Çoğu malign tümörde stromal fibroblastlar MMP-9'un primer kaynağıdır. Birçok tümörde görülen inflamatuvar hücre infiltrasyonu da MMP üretimine neden olur.

Tümör hücreleri ise fibroblastlar tarafından MMP üretimini artıran faktörleri üretir. Bu çalışmada direkt olarak melatoninin adenokanser CaCo-2 hücreleri üzerine etkisini incelendi. Çalışmanın daha ileri dönemlerinde CaCo-2 hücreleri ve fibroblastlar ve/veya inflamatuvar hücreler ortama eklenerek melatoninin ko-kültür ortamında etkilerinin incelenmesinin daha faydalı olacağı kanısındayız. Ayrıca yine aynı ortamda MMP'ların aktivitesinin kontrolünde önemli etkisi olan proteinaz inhibitörlerinin de incelenmesi kolorektal tümör gelişimi ve metastaz patogeneziine daha ayrıntılı ışık tutacaktır.

Bozuk apoptotik mekanizma kanser gelişiminin özelliklerinden biridir. Kanser hücrelerinde apoptozisi arttırmak, kanser tedavisindeki hedeflerden biridir. Bu çalışmada melatoninin, uygulanan hiçbir dozunda hücrelerin apoptozu üzerine anlamlı bir etkisi izlenmemiştir. Daha kesin bir yargı ancak apoptozun başka metodlarla da incelenmesi ile mümkün olacaktır.

Melatoninin olası "dual" etkisi nedeniyle kanser tedavisi ve kanserden korunma amacıyla kullanılması için şimdilik dikkatli olunması gereklidir.

## ÖZET

### KOLOREKTAL TÜRÖRLERDE MATRİKS METALLOPROTEİNAZ-9, NİTRİK OKSİT VE MALONDİALDEHİD KONSANTRASYONLARI ÜZERİNE MELATONİNİN ETKİSİ

**Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, 09100-Aydın**

Kolorektal kanser (KRK), günümüzde en sık rastlanan kanser tipleri arasındadır. KRK'de prognozu belirleyen faktörler, lokal invazyon ve metastatik tümör yayılımdır. İnvazyonu önleyen en önemli bariyer olan kollajen başlıca matriks metalloproteinazlarca (MMP) parçalanır. MMP'lar metastaz oluşumundaki rolleri nedeniyle prognoz tayininde ve yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesinde önemli role sahiptirler. Bilinen en kuvvetli endojen antioksidan olan melatoninin tümör büyümesini inhibe ettiği ve kanser kemoterapisinde yan etkileri önlediği bildirilmiştir.

Bu çalışmada melatoninin CaCo-2 adenokanser hücrelerinde NO, MDA ve MMP-9 yapımına etkileri araştırıldı. Melatonin CaCo-2 hücre kültürlerine farklı dozlarda ( $10^{-11}$ M- $10^{-3}$ M) ve farklı sürelerle (24-48-72 saat) uygulandı. Kontrol grubuna melatonin uygulanmamıştır. Besiyerinde MDA düzeyi HPLC yöntemiyle, NO düzeyi griess reaksiyonuna dayanan yöntemle ve MMP-9 düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçüldü. Apoptoz tayini lökostat boyaması yapılarak değerlendirildi. Ayrıca kolorektal kanser tanısı alan 15 hastanın kolonoskopik biyopsi materyallerinde MMP-9 düzeyleri, immünohistokimyasal olarak değerlendirildi.

Melatoninin CaCo-2 hücrelerinde apoptoz üzerine etkisi izlenmedi. Melatonin (1mM) uygulamasında üçüncü günün sonunda NO düzeylerinde kontrol grubuna göre azalma izlendi ( $p < 0.05$ ). Melatonin uygulaması MDA düzeylerinde değişikliğe yol açmadı. Üç günlük melatonin uygulaması sonucu 1mM, 0,01mM ve 0,01nM dozlarda aktif MMP-9 düzeylerinde kontrol grubuna göre artış gözlemlendi ( $p < 0,05$ ).

Kolorektal kanserlerde MMP-9 düzeyleri tümör gelişiminde ve metastaz oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Melatonin uygulamasının NO düzeyleri üzerine etkileri melatoninin antitümöral etkiye sahip olabileceğini düşündürürken MMP-9 düzeyleri üzerine etkisi şaşırtıcıdır. Melatoninin adenokanser hücreleri üzerine dual

etkili olması olası olup KRK'deki etki mekanizmalarına yönelik daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar Sözcükler:**

Kolorektal kanser, malondialdehid, melatonin, matriks metalloproteinaz-9, nitrik oksit

## SUMMARY

### EFFECTS OF MELATONIN ON MATRIKS METALLOPROTEINASE-9, NITRIC OXIDE AND MALONDIALDEHYDE CONCENTRATIONS IN COLORECTAL CANCERS

**Adnan Menderes University, Faculty of Medicine, Dept. of Biochemistry, 09100-Aydın**

Colorectal cancers (CRC) are among the most common cancer types in today's world. In CRC, local and the metastatic invasions are the factors determining the prognosis of the disease. The most important barrier against invasion is collagen which is degraded mainly by matrix metalloproteinases (MMPs). MMPs play important roles in determining prognosis and new targets of therapy due to their important roles in metastasis. Melatonin, the most potent endogen antioxidant known, has been reported to inhibit tumour progression and to prevent the side effects caused by chemotherapy.

In this study, effects of melatonin on NO, MDA and MMP-9 production by CaCo-2 adenocancer cells were investigated. Different doses of melatonin ( $10^{-11}$ M- $10^{-3}$ M) were applied to CaCo-2 cells for various durations (24-48-72 hours). Control group did not receive any melatonin treatment. Culture medium was analysed for MDA by HPLC method, while NO levels were measured by Griess reaction. MMP-9 levels were measured using ELISA method. Presence of apoptosis was investigated by leukostat staining. Furthermore, biopsy materials from 15 patients with colorectal tumour diagnosis were evaluated for MMP-9 production by immunostaining.

Melatonin did not have any apoptotic effect on CaCo-2 cells. Melatonin treatment at a dose of 1mM caused a decrease in NO levels on the third day of treatment compared to the controls ( $p < 0.05$ ). There was no change in MDA levels by melatonin treatment. At day three, melatonin treatment at doses of 1mM, 0,01mM and 0,01nM caused an increase in MMP-9 levels compared to the control group ( $p < 0,05$ ).

Matrix metalloproteinase-9 levels play an important role in tumour development and metastasis in colorectal cancers. While inhibitory effects of



melatonin on NO production suggest a role for the antioxidant an antitumoral effect, it was surprising to see the effects of it on MMP-9 production. Further studies are needed to investigate the possible dual effects of melatonin on colorectal cancers.

**Keywords:**

Colorectal cancer, malondialdehyde, melatonin, matrix metalloproteinase-9, nitric oxide

## YEDİNCİ BÖLÜM

### KAYNAKLAR

1. Curran S, Dundas S. R, Buxton J, Leeman M. F, Ramsay R, and Murray G. I. Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. *Clinical Cancer Research* 2004; Vol: 10 8229–8234.
2. Zucker S. and Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 2004; 23: 101–117.
3. Hi B, Li P, Zhao S, Liu Z, Yu Y.-M, Han M, Wen J-K. Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in colorectal carcinoma invasion and metastasis. *China World J Gastroenterol* 2005; 11(20): 3046-3050.
4. Ishida H, Murata N, Tada M, Okada N, Hashimoto D, Kubota S, Shirakawa K and Wakasugi K. Determining the levels of matrix metalloproteinase-9 in portal and peripheral blood is useful for predicting liver metastasis of colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2003; 33(4): 186–191.
5. Skrzydlewska E, Sulkowski S, M. Koda, B. Zalewski, L. K-Koda, M. Sulkowska. Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer *World Journal of Gastroenterology* 2005; 11(3): 403-406.
6. Wenzel U, Nicke A and H. Daniel. Melatonin potentiates .avone-induced apoptosis in human colon cancer cells by increasing the level of glycolytic end products. *Int. J. Cancer* 2005; 116: 236–242.
7. Pfeilschifter J, Eberhardt W, Huwiler A. Nitric oxide and mechanisms of redox signalling: matrix and matrix-metabolizing enzymes as prime nitric oxide targets. *Eur. J. Pharmacol* 2001; 429: 279–286.
8. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A and Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2003; 253: 269–285.
9. Erata GO, Kanbağlı O, Durlanık O, Bulut T, Toker G and Uysal M. Induced oxidative stress and decreased expression of inducible heat shock protein 70 (ihsp

- 70) in patients with colorectal adenocarcinomas. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35(2): 74–78.
- 10.** Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 1994; 15: 271-276.
- 11.** Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2006; 60: 97-108
- 12.** Gilad E, Cuzzocrea S, Zingarelli B. Melatonin is scavenger of peroxynitrite. *Life Sci* 1997; 60(PL): 169-174.
- 13.** Mei Q, Xu J-M, Xiang L, Hu Y-M, Hu X-P, Xu Z-W. Change of nitric oxide in experimental colitis and its inhibition by melatonin in vivo and in vitro. *Postgrad Med J* 2005; 81: 667–672.
- 14.** Bubenik GA. *Digestive Diseases and Sciences* 2002; 47(10): 2336-2348.
- 15.** Sanchez-Barcelo EJ, Cos S, Fernandez R, Mediavilla MD. Melatonin and mammary cancer: a short review. 2003; 10: 153-159.
- 16.** Sainz RM, Mayo JC, Rodriguez C, Tan DX, Lopez-Burillo S, Reiter RJ. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 1407–26.
- 17.** Yu Q, Miller SC, Osmond DG. Melatonin inhibits apoptosis during early B-cell development in mouse bone marrow. *J Pineal Res* 2000; 29: 86 –93.
- 18.** Anisimov VN, Popovich IG, Shtylik AV, Zabezhinski MA, Ben-Huh H, Gurevich P, Berman V, Tendler Y, Zusman I. Melatonin and colon carcinogenesis. III. Effect of melatonin on proliferative activity and apoptosis in colon mucosa and colon tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2000; 52: 71– 6.
- 19.** Winczyk K, Pawlikowski M, Lawnicka H, Kunert-Radek J, Spadoni G, Tarzia G, Karasek M. Effects of melatonin and melatonin receptors ligand N-[(4-methoxy-1H-indol-2-yl)methyl]propanamide on murine Colon 38 cancer growth in vitro and in vivo. *Neuro Endocrinol Lett* 2002; 23: 50–4.
- 20.** Chuang JI, Chang TY, Liu HS. Glutathione depletion-induced apoptosis of Ha-ras-transformed NIH3T3 cells can be prevented by melatonin. *Oncogene* 2003; 22: 1349 –57.

- 21.** Dziegiel P, Podhorska-Okolow M, Surowiak P, Ciesielska U, Rabczynski J, Zabel M. Influence of exogenous melatonin on doxorubicinevoked effects in myocardium and in transplantable Morris hepatoma in rats. *In Vivo* 2003; 17: 325– 8.
- 22.** Waas ET, Wobbes T, Lomme RML, DeGroot J, Ruers T, Hendriks T. Matrix metalloproteinase 2 and 9 activity in patients with colorectal cancer liver metastasis *British Journal of Surgery* 2003; 90: 1556–1564.
- 23.** Gönen Ö. Kolorektal kanser epidemiyolojisi. Türkiye klinikleri cerrahi kolorektal kanser özel sayısı-1. 2004; Cilt 9: 11-14.
- 24.** Küpeliöglu A. Kolorektal kanserde histopatoloji. Türkiye klinikleri cerrahi kolorektal kanser özel sayısı-1 2004; Cilt 9: 25-27.
- 25.** Dolar M. E. Kolorektal Tümörler. <http://gastro.uludag.edu.tr/> 05.01.2008.
- 26.** Oz E. and Yılhan M. N. Effects of melatonin in reducing the toxic effects of doxorubicin *Molecular and Cellular Biochemistry* 2006; 286: 11–15.
- 27.** Apakkan Aksun S, Özmen D, Bayındır O. Metalloproteinazlar, inhibitörleri ve ilişkili fizyolojik ve patolojik durumlar. *T Klin Tıp Bilimleri* 2001; 21: 332-342.
- 28.** Kukacka J, Průsa R, Kotaska K, Pelouch V. Matrix metalloproteinases and their function in myocardium. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005;149(2): 225-36.
- 29.** E. A. Baker and D. J. Leaper measuring gelatinase activity in colorectal cancer. *EJSO* 2002; 28: 24-24.
- 30.** Reel B. Matriks metalloproteinaz enzimleri ve ateroskleroz. Türkiye Klinikleri. *J Med Sci* 2006; 26: 527-537.
- 31.** Nagase H, Suzuki K, Itoh Y, Kan C-C, Gehring MR, Huang W, Brew K. Involvement of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPS) during matrix metalloproteinase activation. *Intracellular Protein Catabolism* 1996; 23-31.
- 32.** Tanaka H, Miyazaki N, Oashi K, Tanaka S, Ocmichi M, Abe S. Sputum matrix metalloproteinase-9: tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio in acute asthma. *J.Allergy Clin Immunol* 2000; vol: 105 no: 5.
- 33.** Thorgeirsson UP, Lindsay CK, Cottam DW, Gomez DE. Tumor invasion, proteolysis and angiogenesis. *Journal of Neuro-Oncology.* 1994; 18: 89-103.
- 34.** Murphy G. The regulation of connective tissue metalloproteinases by natural inhibitors. *Progress in İnflammation Research and Therapy* 1991.

- 35.** Evans JD, Ghaneh P, Kawesha A, Neoptolemos JP. Role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. 1997; 58: 520-8.
- 36.** Baker E.A, Leaper D.J. The plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in colorectal cancer: relationship to tumour pathology European Journal of Cancer 2003; 39: 981–988.
- 37.** Tchetverikov I, Lohmander L S, Verzijl N, Huizinga T W J, TeKoppele J M, Hanemaaijer R and DeGroot J. MMP protein and activity levels in synovial fluid from patients with joint injury, inflammatory arthritis, and osteoarthritis. Ann Rheum Dis 2005; 64: 694-698.
- 38.** Laack E, Kohler A, Kugler C, Dierlamm T, Knuffmann C, Vohwinkel G. Pretreatment serum levels of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in non-small-cell lung cancer. Ann Oncol 2002;13(10):1550-7.
- 39.** Yang SF, Hsieh YS, Lin CL, Hsu NY, Chiou HL, Chou FP. Increased plasma levels of urokinase plasminogen activator and matrix metalloproteinase-9 in nonsmall cell lung cancer patients. Clin Chim Acta 2005; 354(1-2): 91-9.
- 40.** Susskind H, Hymowitz MH, Lau YH, Atkins HL, Hurewitz AN, Valentine ES. Increased plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in lung and breast cancer are altered during chest radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2003; 56(4): 1161-9.
- 41.** Dreher D, Junod A.F. Role of oxygen free radicals in cancer development. Eur.J.Cancer 1996; 32A (1): 30-8.
- 42.** Altan N, Sepici Dinçel ,A, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres.Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem] 2006; 31 (2): 51–56.
- 43.** Knight JA. Disease related to oxygen-derived free radicals. Ann .Clin.Lab.Sci 1995; 25(2): 111-21.
- 44.** Tez M, Göçmen E, M Koç, Akgül H. Kolektoral kanserde oksidatif stres (Erken Sonuçlar) Selçuk Tıp Derg 2005; Cilt: 21 Sayı: 3.
- 45.** Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endotelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 1620-4.

- 46.** Patel RK, McAndrew J, Sellak H, White CR; Jo H, Freeman BA, Darley-Usmar. Biological aspects of reactive nitrogen series. *Biochym Biophys Acta* 1999;1411: 385-400.
- 47.** Alagöz G, Durukan P, Yıldız M, Bayar M, İlhan N, Çevik Y, Seçkin D. Akut Zehirlenme Hastalarında serum malondialdehid, paraoksonaz ve karaciğer fonksiyon testleri arasındaki ilişkinin araştırılması. *Fırat Tıp Dergisi* 2007; 12(3): 184-189.
- 48.** İşlekel H, İşlekel S, Güner G. Biochemical mechanism and tissue Injury of cerebral ischemia and reperfüsyon. *Tissue Injury. Nörol Bil. D.* 2000; 17: 2.
- 49.** Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1995, S:1-40.
- 50.** Yılmaz S, Temizer S O. Meme Kanseri Hastalarında Lipid Peroksidasyonu ve Bazı Enzim Aktiviteleri Arasındaki İlişki. *Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem]* 2003; 28 (4): 252-256.
- 51.** Tsuzuki T, Tokuyama Y, Igarashi M, Miyazawa T. Tumor growth suppression by alpha-eleostearic acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, via lipid peroxidation. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1417-25.
- 52.** Aktaş M, Değirmenci U, Yıldırım H, Ercan Kul S, Tamer L, Atik U. Malondialdehit ölçümünde HPLC ve spektrofotometrik yöntemlerin karşılaştırılması. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2004; 4: 365-370.
- 53.** Çekmen M, Turgut M, Türköz Y. Denizmen A, Gözükara E. M. Nitrik Oksit (NO) ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'in Fizyolojik ve Patolojik Özellikleri. *T Klin Pediatri* 2001; 10.
- 54.** Furchott RF, Zawadski JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (Lond)*. 1980; 288: 373-6.
- 55.** Palmer, -R.M.J, Ferrige A.G, Moncada S Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factors. *Nature* 1988; 327: 524-6.
- 56.** Lowenstein C.J, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: A Physiologic Messenger. *Ann Intern. Med* 1994; 120: 227-37.
- 57.** Yallampalli DVM, Smith MB, Sharon MS. Steroid hormones modulate the production of NO and cGMP in the rat uterus. *Endocrinology* 1994; 134(4): 1971-4.
- 58.** Grisham MB. Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 169: 70-15.

- 59.** Marletta MA. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide and N-Nitrosatingagents. *Chem Res Toxicol* 1987; 249-57.
- 60.** Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 2004; 343: 1199-1206.
- 61.** Marletta, M. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 1994; 78: 927-930.
- 62.** Türköz Y, Özerol E. Nitrik oksit'in etkileri ve patolojik rolleri. *Journal of Turgut Özal Medikal Center* 1997; 4.
- 63.** Halliwell B. Free radicals and antioxidant: a personal view. *Nutr Rev* 1994; 52: 253-265.
- 64.** Wenzel U, Kuntz S, De Sousa UJ, Daniel H. Nitric oxide suppresses apoptosis in human colon cancer cells by scavenging mitochondrial superoxide anions. *Int J Cancer* 2003; 106(5): 666-75.
- 65.** Özkan M, Yüksekol İ. Nitrik oksit ve akciğerler. *Toraks Dergisi*, 2003; 4(1): 88-94.
- 66.** Martin K.L, Turko E. and Murad F. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 203-236.
- 67.** Murad, F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci Rep* 1999; 19: 133-154.
- 68.** Wamvakas S, Schmidt H. Just say NO to cancer? *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 406-407.
- 69.** Lejeune P, Lagadec P, Onier N, Pinard D, Ohshima H, Jeannin J-F. Nitric oxide involvement in tumor induced immunosuppression. *J Immunol* 1994; 152: 5077-83.
- 70.** Ueda K, Kobayashi S, Morita J, Komano T. Sitespecific DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Biochim Biophys Acta* 1985; 824: 341-348.
- 71.** Raikhlin NT, Kvetnoy IM: Lightening effect of the extract of human appendix mucosa on frog skin melanophores. *Bull Exp Biol Med* 1974; 8: 114-116.
- 72.** Raikhlin NT, Kvetnoy IM: Melatonin and enterochromaffine cells. *Acta Histochem.* 1976; 55:19-25.
- 73.** Raikhlin NT, Kvetnoy IM, Tolkachev VN: Melatonin may be synthesized in enterochromaffine cells. *Nature* 1975; 255: 344-345.

- 74.** Bubenik G. A. MD. Gastrointestinal melatonin localization, function, and clinical relevance digestive diseases and sciences 2002; Vol: 47 No. 10.
- 75.** Maestroni GJ. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert Opin Investig Drugs*. 2001; 10(3): 467-76.
- 76.** M. Farriol, Y. Venereo, X. Orta, J. M Castellanos and T. Segovia-Silvestre.-In vitro effects of melatonin on cell proliferation in a colon adenocarcinoma line J. *Appl. Toxicol* 2000; 20: 21–24.
- 77.** Yazıcı C, Köse K. Melatonin: karanlığın antioksidan gücü. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (E.Ü. Journal of Health Sciences)* 2004;13(2): 56-65.
- 78.** Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: A novel protective agent against oxidative injury of the ischemic-reperfused heart. *Cardiovascular Research* 2003; 58: 10-9.
- 79.** Reiter RJ. Cytoprotective properties of melatonin: Presumed association with oxidative damage and aging. *Nutrition* 1998; 14: 691-6.
- 80.** Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2001; 426: 1-10.
- 81.** Aydoğan S, Yerer MB, Yapıslar H. In vitro effects of melatonin on the filtrability of erythrocytes in SNP-induced oxidative stress. *Clin Hemorheol Microcirc* 2004; 30: 317-22.
- 82.** Fosslie E. Mitochondrial medicine molecular pathology of defective oxidative phosphorylation. *Ann Clin Lab Sci* 2001; 31: 25-67.
- 83.** Öztürk F. Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2002; 9(2): 143-148.
- 84.** Thompson CB. Apoptosis. In: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven Publishers. 1999.
- 85.** Erdoğan BB. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-faslı bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi* 2003; 4: 165-174.
- 86.** Ulukaya E. Apoptozis ders notları, Erişim: [http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis\\_ders\\_notu](http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu). (2003).
- 87.** Tomatır AG. Apoptoz; programlı hücre ölümü. *T. Klin. J. Med. Sci.* 2003; 23: 499-508.
- 88.** Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi* 2001; 2 (1): 91-95.



- 89.** Zhang J, Xu M. Apoptotic DNA fragmentation and tissue homeostasis. Trends in Cell Biology 2002; 12 (2): 84-89.
- 90.** Öztürk F. Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2002; 9(2): 143-148.
- 91.** Turgut B, Demir T, Celiker Ü. Oftalmolojide Apoptoz. Fırat Tıp Dergisi 2006; 11(1): 6-11.
- 92.** Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi Toraks Dergisi2 2001; (1): 91-95.
- 93.** Kerr JFR, Willie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 26: 239-257.
- 94.** Kültürsay H, Kayıkçıoğlu M. Apoptozis ve kardiyovasküler hastalıklar Anadolu Kardiyoloji Dergisi 2002; 4: 323-329.
- 95.** Spector David L, Goldman Robert D, Leinwand Leslie. Cells laboratory manuel A Volüme 1: 15.3, 15.4
- 96.** Lowry O, Rosenbraugh N, Farr L, Randall R. Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 182: 265.
- 97.** Volpi N, Tarugi P. Improvement in the high performance liquid chromatography malondialdehyde level determination in normal human plasma. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1998; 713(2): 433-7.
- 98.** Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by human tumor cells. Cancer Research 1991; 51: 794-8.
- 99.** Dülger H, Alıcı S, Şekeroğlu M. R, Noyan T, Yalçınkaya A. Kanserli hastalarda kemoterapinin lipid peroksidasyonu üzerine etkisi. Van Tıp Dergisi 2002; Cilt: 9 Sayı: 2.
- 100.** Eriksson LC, Andersson GN. Membrane biochemistry and chemical hepatocarcinogenesis. Crit Rev Biochem Mol Biol 1992; 27: 1-55.
- 101.** Masotti L, Casali E, Gesmundo N, Sartor G, Galeotti T, Borrello S, Piretti MV, Pagliuca G. Lipid peroxidation in cancer cells: chemical and physical studies. Ann N Y Acad Sci 1988; 551: 47-57.
- 102.** Gerber M, Segala C. Aging and cancer: plasma antioxidants and lipid peroxidation in young and aged breast cancer patients. Free radicals and aging. Birkhauser, Basel. 1992. p.235-46.

- 103.** Sadani GR, Nadkarni GD. Role of tissue antioxidant defence in thyroid cancers. *Cancer Lett* 1996; 109: 231-5.
- 104.** Levy RD, Oosthuizen MM, Degiannis E, Lambrechts H. Elevated reversible and irreversible lipid peroxidation in human oesophageal cancer. *Anticancer Res* 1998; 18:1325-28.
- 105.** Otamiri T, Sjudahl R. Increased lipid peroxidation in malignant tissues of patients with colorectal cancer. *Cancer* 1989; 64: 422-5.
- 106.** Parsons SL, Watson SA, Collins HM, Griffin NR, Clarke PA, Steele RJ. Gelatinase (MMP-2 and -9) expression in gastrointestinal malignancy. *Br J Cancer* 1998; 78(11): 1495-502.
- 107.** Roeb E, Dietrich CG, Winograd R, Arndt M, Breuer B, Fass J, Schumpelick V, Matern S. Activity and cellular origin of gelatinases in patients with colon and rectal carcinoma differential activity of matrix metalloproteinase-9. *Cancer* 2001 Nov 15; 92(10): 2680-91.
- 108.** Nielsen BS, Timshel S, Kjeldsen L, Sehested M, Pyke C, Borregaard N, Dano K92 kDa type IV collagenase (MMP-9) is expressed in neutrophils and macrophages but not in malignant epithelial cells in human colon cancer. *Int J Cancer*. 1996 Jan 3; 65(1): 57-62.
- 109.** Tutton M. G, George M. L, Eccles S. A, Burton S, Swift R. I, Abulafi A. M. Use of plasma MMP2 and MMP 9 levels as a surrogate for tumour expression in colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer*2003; 107: 541-550.
- 110.** Ganguly K, Maity P, Reiterand R, Swarnakar J S. Effect of melatonin on secreted and induced matrix metalloproteinase-9 and -2 activity during prevention of indomethacin-induced gastric ulcer. *J. Pineal Res.*2005; 39: 307–315.
- 111.** Zödl B, Sargazi M, Zeiner M, Roberts NB, Steffan I, Marktl W, Ekmekcioglu C. Toxicological effects of iron on intestinal cells. *Cell Biochem Funct* 2004; 22(3): 143-7.
- 112.** Özdemirler Erata G, Kanbağlı O, Durlanik O, Bulut T, Toker G, Uysal M. Induced oxidative stress and decreased expression of inducible heat shock protein 70 (ihsp 70) in patients with colorectal adenocarcinomas. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35(2): 74-78.

- 113.** M. F Leeman, S. Curran and G. I Murray New insights into the roles of matrix metalloproteinases in colorectal cancer development and progression J Pathol 2003; 201: 528–534
- 114.** Bayraktar M, Harputluoglu M, Bayraktar M. Kolon kanserli hastaların serum C-reaktif protein ve malondialdehit düzeylerinin incelenmesi. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2007; 27: 13-15.
- 115.** Matrisian L.M. Cancer biology: Extracellular proteinases in malignancy. Current Biology Vol 9: No 20.
- 116.** McCawley L. J. and Matrisian L M. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. Molecular Medicine Today 2000; VOL: 6.
- 117.** Kuyumcu A, Polat D. A, Özmen M, T Besler. Travma ve enfeksiyonda nitrik oksidin rolü. Ulus Travma Derg 2004; 10(3):149-159.
- 118.** Navarro A G, González Puga C, Escames G, López L C, López A, López-Cantarero M, Camacho E, Espinosa A, Gallo M A, Castroviejo D Cellular mechanisms involved in the melatonin inhibition of HT-29 human colon cancer cell proliferation in culture. Journal of Pineal Research 2007; 43 (2): 195–205.
- 119.** Yerer M.B, Aydoğan S. Sirkadiyen ritme bağlı olarak melatonin seviyesindeki değişikliklerin eritrositlerde lipid peroksidasyonu üzerine etkisi. Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences) 2006; 15(3): 153-160.
- 120.** Papazisis K T, Kouretas D, Geromichalos G, Sivridis E, Sekreli K. T, Dimitriadis K A, and Kortsaris A H. Effects of melatonin on proliferation of cancer cell lines J Pineal Res 1998; 25: 211-218.
- 121.** Curan S, Murray G. I. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. Journal of pathology 1999; 189: 300-308.