

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

KANSERLİ KOLON HÜCRE DİZİSİNDE
SERANİB-2 MADDESİNİN APOPTOZ OLUŞUMUNA VE
HÜCRE YAŞAMINA OLASI ETKİLERİ

Dr. Mustafa BAŞPINAR

Genel Cerrahi Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2015

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**KANSERLİ KOLON HÜCRE DİZİSİNDE
SERANİB-2 MADDESİNİN APOPTOZ OLUŞUMUNA VE
HÜCRE YAŞAMINA OLASI ETKİLERİ**

Dr. Mustafa BAŞPINAR

**Genel Cerrahi Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŐMANI
Prof Dr Mustafa Serdar ERKASAP**

**ESKİŞEHİR
2015**

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T. C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Mustafa BAŞPINAR'a ait " insan kolon kanser hücre dizisinde (Caco2) seranib-2 maddesinin apoptozis üzerine etkisi " Adlı çalışma jürimiz tarafından Genel Cerrahi Anabilim Dalında Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:

Jüri Başkanı Prof .Dr.Mustafa Serdar ERKASAP
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Üye Prof .Dr. Ercüment PAŞAOĞLU
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Üye Doç.Dr. Sezgin YILMAZ
Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun..... Tarih ve..... Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr. Enver İHTİYAR
Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, tezimin hazırlanmasında büyük emeği olan sayın hocam Prof. Dr. Mustafa Serdar ERKASAP' a ve Genel Cerrahideki eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren değerli hocalarıma, ayrıca tezimin hazırlanmasında katkıları olan Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Nilüfer ERKASAP'a yardımları için teşekkür ederim.

ÖZET

Başpınar , M. ‘Kanserli Kolon Hücre Dizisinde Seranib-2 Maddesinin Apoptoz Oluşumuna Ve Hücre Yaşamına Olası Etkileri’ini araştırılması , Eskişehir Osman Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi Eskişehir 2015. Bu çalışma insan kolon kanser hücre dizisinde (Caco2) seranib-2 maddesinin apoptozis üzerine etkisini araştırmıştır. Bizim çalışmamızda, seranib-2 nin Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol ile karşılaştırıldığında 1 µM’den itibaren azalmaya başladığı ve 50 µM konsantrasyonda 24 ve 48 saatte sırasıyla % 47 ve % 52 oranında azalttığı görülmüştür. RT-PCR sonuçlarına göre, gruplar arasında TNF-alfa mRNA düzeylerinde herhangi bir fark gözlenmezken 24 saatte TNF-alfaR1 mRNA düzeyleri, her iki konsantrasyonda da kontrole göre azalmış, 48 saatte ise bir fark oluşmamıştır. ASAH mRNA düzeyleri ise 48 saat sonrası 50 µM’lık tedavi grubunda tüm gruplara göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Böylece çalışmamız, seranib-2’nin zaman ve doz bağımlı güçlü anti-kanser etkisinin olduğunu ortaya koymaktadır. TNF-alfa mRNA ekspresyonunun değişmemesi ancak TNF-alfaR1 mRNA düzeylerinin kontrole göre azalmış olması ise seranib-2’nin farklı yollardan etki edebileceğini göstermiştir. ASAH mRNA düzeyinin tedavi gruplarında yüksek çıkması kullanılan seranib-2 dozunun ASAH ekspresyonunu düşürmede etkin olmadığını veya hücre ölümünün seramidaz inhibisyonundan farklı bir yoldan seramidaz enzim ürünleri olan sfingozin ve sfingozin-1-fosfat inhibisyonuyla olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kolon Kanseri , Apoptoz , Seranib-2

ABSTRACT

Baspinar , M. Colon Cancer Cell Line Article Ceranib-2 of apoptosis formation and to investigate the possible effects of cell life, Eskişehir Osman Gazi University Faculty of Medicine, General Surgery Department of Medicine Thesis Eskişehir 2015.In this study, human colon cancer cell lines (Caco-2) investigated the effect on apoptosis of ceranib-2 agent. In our study, ceranib-2 of Caco-2 cells compared to control its impact on the viability started to decrease from 1 mM and 50 µM concentrations of 24 and 48 hours in 47%, respectively, and has been shown to reduce by 52%. According to the RT-PCR results between groups of TNF-alpha mRNA is no difference in level was observed in 24 hours TNF-alfa1 mRNA level decreased compared to the control in both concentrations, no occurrence of a difference is 48 hours. ASAHI mRNA levels were significantly higher in the treatment group than the other groups at 50 mM after 48 hours. Thus, our data ceranib-2 reveals that the time and dose-dependent potent anti-cancer effect. The change of TNF-alpha mRNA expression compared to control but have decreased mRNA levels of TNF-R1 showed the different pathways may affect the seranib-2. ASAHI suggests that the mRNA level of which being higher than used ceranib-2 dose is not effective in reducing the expression ASAHI or cell different pathways the ceramidase enzyme products from ceramidase inhibition of death in the treatment group sphingosine and sphingosine-1-phosphate may be by inhibition.

Key Words: Colon Cancer , Apoptosis , Ceranib-2

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. Karsinogenez	2
2.2 Kolon embriyolojisi ve anatomisi	18
2.3 Kolon kanseri	20
2.4 Kolorektal Karsinogenezde Moleküler Genetik Değişikler	22
2.5 Kolon kanserinde patolojik bulgular	33
2.6.Tedavi	42
2.7 Apoptoz	49
3.GEREÇ VE YÖNTEM	64
3.1 Hücre Kültürünün Yapılaması	64
3.2 Kültür İçin Yapılan Hazırlıklar	64
3.3 Hücrelerin Ekimi Ve Yaşatılması	64
3.4 Hücre Sayısının Belirlenmesi	65
4.BULGULAR	70
4.1 Seranib-2'nin Hücre Canlılığına Etkisi	70
4.2 Seranib-2'nin TNF-alfa Gen Expresyonu Üzerine Etkisi	71
4.3 Seranib-2'nin TNF-alfa Reseptör-1 Gen Expresyonu Üzerine Etkisi	72
4.4 Seranib-2'nin ASAH Gen Expresyonu Üzerine Etkisi	73
5. TARTIŞMA	74
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	84
KAYNAKLAR	

SİMGELER VE KISALTMALAR

APAF-I	apoptotik proteaz aktive etme faktörünü
ACF	Aberrant crypt foci
AJCC	American joint committee of cancer
APC	Adenomatous polyposis coli
RTK	reseptör tirozin kinaz
VEGF	vasküler endodermal growth faktör
EphA, EphB	efrin reseptörleri A ve B
JAK	Janus Family Kinases
FAK	fokal adezyon kinazı
GOF	Gain of function
MAP kinaz	Mitogen-activated protein kinases
ERK	Extracellular signal regulated kinase
JNK	c-Jun NH ₂ - terminal kinase
MAPKKK	MAP kinaz kinaz kinaz
SOS	Son of sevenless
Grb2	growth-factor-receptor-bound protein 2
PI-3K	fosfoinozid-3 kinaz
PIP3	Fosfotidilinozitol trifosfat
PDK	PIP3 bağımlı kinazlar
PKB	protein kinaz B
STAT	Signal transducer and activator of transcription
IFN	interferon
PDGF	trombosit kökenli büyüme faktörü
EGF	epidermal büyüme faktörü
TGF alfa, beta	transforme edici büyüme faktörleri alfa ve beta
İL-2	interlökin 2
İGF-1 ve 2	insülin benzeri büyüme faktörü
GFR	büyüme faktörü reseptörlere
FAP	Familial adenomatous polyposis

HNPCC	Hereditary non-polyposis colorectal cancer
LOH	Loss of heterozygosity
MCR	Mutation cluster region
DCC	Deleted in colorectal carcinogenesis
TGF-B	Transforming growth factor beta
MMR	Miss match repair genes
MSI	Microsatellite instability
REP	Replication error pathway
CEA	Carcinoembryogenic antigen
IHC	immunohistokimyasal boyama
DHPLC	Denaturing high performance liquid chromatography
PARP	poli ADP riboz polimeraz
D-MAPP	1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> -D-erythro-2-(<i>N</i> -myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol
NOE	oleoylethanolamine
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
DMSO	dimetilsülfoksit
HBSS	Hank's balanced salt solution
XTT	Cell Proliferation Kit, Biological Industries

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1 MAPK ailesi ve sinyal iletimi. ATF: 'activating transcription factor ERK extracellular signal regulated kinase , GTP : guanosine triphosphate , JNK: c-Jun N –terminal kinase , MAPK: mitogen- activated protein kinase , MEK mitogen extracellular signal regulated kinase, MEKK: MAPK/ERK kinase kinase , MKK: MAPK kinase, MKKK: MAPK kinase kinase RTK receptore tyrosine kinase	6
2.2 Protein kinaz B /Akt yolunun işlevleri	9
2.3 Fosfoinozotid 3K(PI-3K), mTOR ve protein sentezi	10
2.4 MAPK ve protein kinaz B yollarının apoptozis mekanizmalarına etkileri	11
2.5 Sitokin aracılı JAK / STAT aktivasyonu	12
2.6 Karsinogenezin oluşumu. İçli F , Akbulut H.Onkolojiye Giriş . In. İliçin G, B,beroğlu K, Süleymanlar G ve ark ; eds . İç hastalıkları . Güneş kitapevi; 2005:2007-2014'den alınmıştır.	17
2.7 Kierszenbaum A. Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş. Ankara 2006:438-441'dan alınmıştır	19
2.8 DNA onarım mutasyonları	24
2.9 Kolorektal kanserin kolonda yerleşim yerine göre dağılımı.	33
2.10 Kolon kanserinde histopatolojik görünüm	34
2.11 (A) Hepatik flksurada yerleşimli kolon Tumoru ne bağlı sağ kolonda hava-sıvı seviyesi, (B) tumorun endoskopide ve (C) BT de görünümü	38
2.12 Kolon kanserinde Asler Coller /Dukes (üst) ve TNM (alt) Sınıflamalarının şematik görünümü	40
2.13 Ca un apoptozis üzerine etkisi	50
2.14 Bcl-2 nin apoptozisi bloke ettiği nokta	52
2.15 DNA hasarına p53 cevabı ve apoptozis	53
2.16 Sitokin aracılığı ile meydana gelen apoptozis	55
2.17 Mitokondride sitokrom-c aracılığı ile APAF-1 aktivasyonu ve apoptozis	56
2.18 Seramid ve metabolitleri	60

2.19 Seramidin de novo sentezi , metabolitleri ve metabolik etkileri	61
4.20 Kontrol, DMSO ve farklı konsantrasyonlardaki maddenin Caco-2 hücrelerine 24 ve 48 saat uygulanması sonucunda % olarak yaşayabilen hücre oranları.	70
4.21 Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki maddenin Caco-2 hücrelerine 24 ve 48 saat uygulanması sonucunda ölçülüp hesaplanan rölatif TNF- α gen ekspresyon düzeyleri.	71
4.22 Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki maddenin Caco-2 hücrelerine 24 ve 48 saat uygulanması sonucunda ölçülüp hesaplanan rölatif TNF- α R1 gen ekspresyon düzeyleri.	72
4.23 Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki maddenin Caco-2 hücrelerine 24 ve 48 saat uygulanması sonucunda ölçülüp hesaplanan rölatif ASAH gen ekspresyon düzeyleri.	72

TABLULAR

	Sayfa
2.1 Protein kinazlarda görülen onkojenik değişimlerin kanser türleri ile ilişkisi	5
2.2 Sporadik ve genetik kolorektal kanserlerin özellikleri	31
2.3 Kolorektal kanserde evreleme	40
2.4 Kolon kanserinde tedavi algoritmi	44
2.5 AJCC (American joint committee of cancer- Amerikan kanser cemiyeti) kalın barsak kanseri gelişimi bakımından ortalama riske sahip insanlarda tarama testlerinin yapılmasına 50 yaşında başlanmasını tavsiye etmektedir. Bu amaçla önerilen izleme yöntemlerinden kişiye uygun olan biri seçilebilir	47
3.6 RT PCR için miks içeriği.	67
3.7 Kontrol, DMSO ve farklı konsantrasyonlardaki maddenin Caco-2 hücrelerine 24 ve 48 saatliğine uygulanması sonucunda % olarak yaşayabilen hücre oranları.	69

1. GİRİŞ

Yaşamımızı sürdürebilmemiz için hücrelerimizin sürekli yenilenmesi gerekir. Yaşam süresini dolduran hücreler vücuttan atılırlarken yerlerine yenileri gelir. Bu denge genlerin kontrolü altındadır. Bazı genler hücrelerin bölünüp çoğalmasını sağlarken, bazıları da aşırı hücre üremesini önlerler(1). Bazen hücreler, çevresel faktörlerin çok basamaklı bir süreç içinde, hücre DNA'sında ve kromozomların fonksiyonel birimleri olan genlerde oluşturduğu değişiklikler neticesinde kontrolsüz olarak bölünmeye başlarlar ve normalde olmayan bir oluşum meydana getirirler. Bu oluşum komşu dokulara ve uzak organlara yayılabilir. Bu anormal hücrelerin kontrolsüz büyüme ve yayılma özelliğine sahip olması ile gelişen büyük bir grup hastalığa kanser adı verilir. Kanser hastalığının ortaya çıkabilmesi için yalnızca kontrolsüz çoğalma yeterli değildir. Hücrenin invazyon (diğer sağlıklı dokuları istila etme) ve metastaz (dolaşıma geçerek sağlıklı başka dokulara yayılma) gibi diğer malign özellikleri de kazanması gerekmektedir.(2,3)

Amerikan popülasyonunda yaşam boyu kanser gelişme olasılığı erkeklerde yaklaşık 2'de 1 iken bu oran kadınlarda 3'te 1'dir. Yine malign tümörler sonucu ölümler kalp hastalıkları sonucu ölümlerin ardından ikinci sırada yer almaktadır. Kolorektal kanser, görülme sıklığı bakımından tüm kanserler arasında meme, prostat ve akciğer kanserlerinden sonra 4.sırada yer almakta ve erkek ve kadınlarda görülen kanserlerin yaklaşık %1015 ini oluşturmaktadır. Dünyada her yıl yaklaşık 1 milyon yeni vaka teşhis edilmekte ve kolorektal kansere bağlı 500.000 ölüm bildirilmektedir. Dünya sağlık örgütü kayıtlarına göre her yıl teşhis konulan yeni vaka sayısı 800.000 civarındadır. (4). Apoptosis ya da programlı hücre ölümü çok hücreli canlılarda gelişimin normal komponenti olarak bilinen hücresel bir olaydır. Bazı kanser türlerinde kimyasal ya da radyasyon terapisine verilen cevap tümörlü hücrelerdeki apoptosisin indüksiyonu ile paraleldir. Malignant hücrelerde apoptosisin mekanizmaları ve tümör üzerine etkileri araştırılmakla beraber, fizyolojik ölüm yollarının modülasyonu kanser türleri için yeni tedavi stratejisi olabilir.(5,6) Apoptozisde rol oynayan pek çok madde ve bunların mekanizmaları kanser tedavisinde çalışılmıştır. Bunlardan biri de sfingomiyelinin hidrolizi sonucu oluşan biyoaktif bir lipit olan seramid' dir. Seramid bazı hücre kültür modellerinde, hücre döngüsünün durdurulmasında, farklılaşmada

ve apoptosis de önemli rol oynar. Hücreler mitojen faktörlere maruz bırakıldığında intraselüler seramid miktarının azaldığı bildirilmiştir. İntraselüler seramidaz enziminin miktarı azaldığında ise seramid miktarında artış görülmektedir. Seramid miktarının artması da apoptozis ile sonuçlanmaktadır. Dolayısıyla son günlerde seramidaz enzimini inhibe eden antikanser ilaçların geliştirilmesi önem kazanmıştır. Seramidaz aktivitesini inhibe eden birkaç bileşik geliştirilmiştir ancak bunların farmakolojik özellikleri kanser tedavisi için yeterli değildir. Ancak son yıllarda keşfedilen seranib2 maddesi seramidaz enzimini inhibe eden küçük bir moleküldür ve antiproliferatif ve proapoptotik etkilere sahiptir. Çeşitli kanserli hücre dizileri üzerinde yapılan çalışmalarda seramidaz enziminin protein ve mRNA seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir. Seramidaz enziminin bilinen en önemli fonksiyonu seramidi hidroliz etmektir. Ayrıca seramidler çeşitli sinyal yollarıyla ilgili gen ekspresyonlarının düzenlenmesine de katılır. Hücrelerdeki seramid birikimi çeşitli ekstraselüler uyarılar (TNFalfa) ile indüklenebilir. Kolon kanser hücreleri üzerine seranib2 maddesinin herhangi bir etkisinin olup olmadığına yönelik şu ana kadar bilimsel bir veriye ulaşamadığından ve çeşitli kanserler üzerindeki antiproliferatif ve proapoptotik etkisinin gözlenmesinden dolayı bu maddenin kolon kanser hücresi üzerine bir etkisinin olup olmadığını bilimsel yöntemlerle araştırmayı amaçladık. Çalışmamızda insan kolon kanser hücre dizisi (Caco2) kullanılmıştır. Hücre canlılığına etkisi 2, 3bis(2metoksi4nitro5sülfopenil)5-[(fenilamino)karbonil]2Htetrazolium hidrosit (XTT) yöntemi ile TNF α , TNF α reseptörü, ve asit seramidaz gen ekspresyonlarına da Real TimePCR (RTPCR) Tekniği ile bakılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Karsinogenez

Karsinogenezin temelinde, hücrenin yaşaması, büyümenin kontrolü ve diferansiasyon gibi biyolojik olayları etkileyen mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesi yer almaktadır. Kanserin gelişimi sürecinde tümör hücreleri birçok fenotipik özellikler kazanır. Bu değişimler, tümör hücrelerinin hızlı ve sınırsız çoğalmalarına ve çevre dokuya yayılmalarına neden olur. Ayrıca, bu hücreler özgün mikroçevreden bağımsız olarak yaşamını devam ettirme ve metastaz yapma özelliğine sahiptir. Protoonkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin seri mutasyonları farklı mekanizmalar aracılığıyla malign fenotipin oluşumuna katkıda bulunur .(7)

Sinyal iletimi yollarını ve sinyal proteinlerini hedef alan onkojenik mutasyonlar sık olarak rastlanmaktadır. (8)Sinyal iletiminde meydana gelen değişimler hücrenin çoğalma ve/veya yaşama işlevlerinin kontrolünü ortadan kaldırır. Böylelikle, onkojenik sinyal iletimi tümör gelişimi ile invazyon/metastaz sürecinde etkin rol oynamaktadır.

a) Protein Kinazlar Ve Sinyal İletimi

İnsan Genom Projesi'nin verilerine göre, insan genomundaki yaklaşık 32.000 genin %20'si sinyal iletiminde görev alan proteinleri kodlamaktadır (9). Bu proteinler arasında hücre membranında yerleşen reseptörler, G-proteinler ve sinyal ileten enzimler yer almaktadır. Protein kinazlar, sinyal iletimi sırasında protein fosforilasyonunu/aktivasyonunu sağlarlar. Protein kinazlar membran yerleşimli olanlar ve sitoplazmik tirozin kinazlar olarak iki ana gruba ayrılır. Bu proteinler, katalitik özelliklerine göre (fosforilasyona uğrayan aminoasit türü) tirozin ve serin/treonin kinazlar olarak da sınıflandırılır.(10,11)

Membranda yerleşim gösteren proteinlere reseptör tirozin kinazlar (RTK) denilmektedir. RTK süperailisinde 58 transmembran protein bulunmaktadır. Bu reseptörler arasında insülin reseptörü, büyüme faktörleri (EGF, VEGF, PDGF, FGF, NGF) reseptörleri ve efrin reseptörleri (EphA, EphB) yer almaktadır (11). RTK'lar, sitoplazmik kısımlarında aktivasyondan sorumlu bir bölge (tirozin kinaz bölgesi) içerirler. İstirahat halindeki hücrelerde, RTK'nın inaktif ve aktif konformasyonları denge halindedir. Bu reseptörler büyüme faktörleri ile bağlandıktan sonra aktif hale

geçerler ve sitoplazmadaki hedef proteinleri ile etkileşerek sinyal iletimini gerçekleştirirler. RTK aktivasyonu, reseptörün kendi kendini fosforile etmesiyle başlar. İkinci aşamada ise, bu fosforlanan bölgelere çeşitli adaptör proteinler bağlanırlar ve uyarının hücre içine iletimini sağlarlar. Adaptör proteinlerin ortak yapısal özelliği SH2 (Src-homology-2) bölgeleri içermeleridir. Bu proteinler, SH2 böl geleri aracılığıyla reseptöre bağlanarak, RTK ile sitoplazmadaki efektör proteinleri arasında köprü görevi yapmaktadır. RTK aktivasyonunun sonlandırılmasından fosfataz grubu proteinler sorumludur. Buna göre, fizyolojik koşullarda sinyal iletimi tersinir özellik taşır ve RTK aracılı iletim kontrol altında tutulur. Karsinogenez sürecinde ise, sürekli ve kontrolsüz RTK aktivitesi söz konusudur(9). Sitoplazmik protein kinazlar arasında Src, Abl, fokal adezyon kinazı (FAK) ve “Janus Family Kinases (JAK)” proteinleri yer almaktadır. İstirahat halindeki hücrelerde bu proteinler sitoplazmada inaktif halde bulunurlar. Büyüme faktörleri veya sitokinler ile hücrenin uyarılmasından sonra aktif hale gelen bu proteinler, sitoplazmadaki veya nükleustaki hedeflerine yönelirler. Sitoplazmik tirozin kinazların sürekli aktivasyonu ve onkojenik sinyal iletimi, transformasyon, tümör büyümesi, motilite ve invazyon artışı ile anjiyogenez gibi malign fenotipe özgü hücresel olayları hızlandırır.(12,13)

Protein kinazlar dört mekanizma aracılığıyla onkojenik transformasyona yol açabilir (9):

1. Protoonkogenin retroviral transdüksiyonu,
2. Genomik rearanjmanlar,
3. “Gain of function (GOF)” mutasyonlar,
4. Protein kinazın aşırı sentezlenmesi.

Bu değişimlerin tümörler ile ilişkisi Tablo 1’de görülmektedir.

Tablo 2.1 : protein kinazlarda görülen onkojenik değişimlerin kanser türleri ile ilişkisi

Protein kinaz (proto-onkogen)	Onkojenik değişim	Kanser türü (en sık görülen türler)
EGFR/erb1 (<i>c-erbB</i>)	Amplifikasyon	Meme kanseri, glioblastoma multiforme, over kanseri
ErbB2/HER2/Neu	Delesyon	Küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu (NSCC)
	Amplifikasyon	Meme, over, mide, NSCC Kolon karsinomu
PDGF- β	Tel-PDGF- β [t(5;12) translokasyon]	Kronik miyeloid lösemi
EphB4	Ekspresyon artışı	Infiltratif duktal karsinom
Kit/SCFR (<i>c-kit</i>)	"Gain of function" mutasyon delesyon	Akut miyeloid lösemi Küçük hücreli akciğer karsinomu (SCLC) Gastrointestinal sistem tümörleri
Fit1/VEGFR1	Ekspresyon artışı	Tümör anjiyogenezisi
Src (<i>c-src</i>)	c-terminal ucunda kısalma ekspresyon artışı/kinaz aktivitesi artışı	Kolon karsinomu Meme kanseri, pankreas kanseri, nöroblastoma
Fak	Ekspresyon artışı kinaz aktivitesi değişikliği	Malignansilerde, adezyon, invazyon ve metastazın modülasyonu
Jak	Ekspresyon artışı	Lösemiler
Abl (<i>c-abl</i>)	Füzyon [t(9;22) translokasyonu] p210 ^{Bcr-Abl} , p190 ^{Bcr-Abl}	p210 ^{Bcr-Abl} : Kronik miyeloid lösemi p190 ^{Bcr-Abl} : Ph (+) akut lenfositik lösemi

Retroviral transdüksiyon diğer canlılarda (örneğin;rodentler) karşılaşılan transformasyon yoludur. Genomik rearanjmanlar arasında Philadelphia (Ph) kromozomu önemli bir yer tutar. Bu kromozom t(9;22) (*bcrabl*) translokasyonu sonucunda oluşur. Sentezlenen p210^{Bcr-Abl} onkojenik füzyon proteini ise sürekli kinaz aktivitesine sahiptir. Bu aktivite hücre çoğalması, apoptozis adezyon ile ilgili kontrolsüz sinyal iletimlerine neden olmaktadır(14) . İmatinib mesilat (STI 571 = Gleevec),kronik miyelositer lösemide bu proteinin kinaz aktivitesini inhibe etmektedir.(15-17)

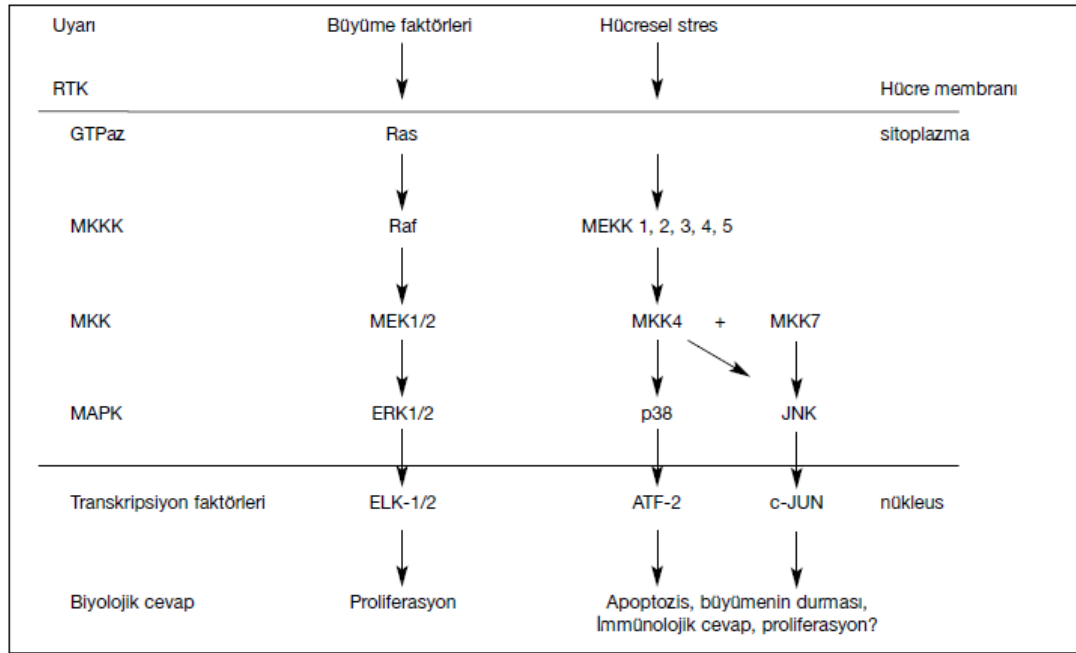
Protein kinazların devamlı aktivasyonuna yol açan GOF mutasyonlara Src tirozin kinaz ve c-kit örnek verilebilir. Src tirozin kinaz proteininin c-ucunda meydana gelen kısalma, proteinin inaktif hale dönmesini önler ve onkojenik potansiyel kazandırır(13) . c-kit protoonkogeninde ise, nokta mutasyonu sonrası sürekli kinaz aktivasyonu söz konusudur. İmatinib mesilat, gastrointestinal stromal tümörlerde de c-kit kinaz aktivitesini baskılamaktadır.(14)

Tümör hücrelerinde, protein kinaz sentezinin artması da onkojenik transformasyonda etkili olmaktadır. Örneğin; Erb-B reseptör ailesinde yer alan proteinlerin (örneğin; EGFR, HER2) sentezinin artması akciğer kanseri patogenezi doğrudan etkilemektedir(18) . Meme karsinomalarında da HER2/neu sentezi artmaktadır.Son yıllarda ivme kazanan hedeflenmiş tedavi yaklaşımlarında,tümör hücresi büyüme faktörleri reseptörlerini bloke eden monoklonal antikolar (örneğin, Herceptin)veya doğrudan tirozin kinaz aktivitesini inhibe eden ilaçlar (örneğin, Gleevec) ile klinik çalışmalar yürütülmektedir.(19)

b) MAP Kinaz Sinyal İletim Yolu:

MAP kinazlar, “Mitogen-activated protein kinases” süper ailesinde yer alırlar (Şekil 1)(20) . Ökaryotik hücrelerin tümünde mevcut olan bu proteinler hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarılmasında çok önem taşımaktadır. Bu sinyal iletimi kaskadları, embriyogenezis, yaşama, çoğalma, diferansiasyon ve apoptozis işlevlerinin düzenlenmesinde rol alır. MAP kinazlar üç ana gruba ayrılır(21) .

1. p38 MAP kinaz ailesi,
2. “Extracellular signal regulated kinase (ERK)” ailesi,
3. “c-Jun NH2- terminal kinase (JNK)” ailesi.



Şekil 2.1 : MAPK ailesi ve sinyal iletimi. ATF: 'activating transcription factor , ERK extracellular signal regulated kinase , GTP : guanosine triphosphate , JNK: c-Jun N –terminal kinase , MAPK: mitogen-activated protein kinase , MEK

MAP kinaz yolu reseptör aracılı uyarının hücre içine iletiminden sorumlu bir kinaz kaskadı olarak çalışır. Kaskad sistemi hem sinyalin amplifikasyonu hem de düzenleyici etkileşimler (sinyalin süresi, şiddeti ve kinetiği) açısından önem taşır. Sinyalin iletimi G-protein aktivasyonu (Ras aktivasyonu) ile başlar ve MAPKKK'nın (MAP kinaz kinaz kinaz) aktivasyonundan sonra sırasıyla MAPKK (MAP kinaz kinaz) ve MAPK (MAP kinaz) aktive olur. MAPK ise sitoplazmik substratlarını (hücre iskeleti elemanları, diğer protein kinazlar) ve/veya nükleusta transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon yoluyla aktive eder ve hücrenin biyolojik cevabı oluşur (22).

c) Ras/Raf/MEK/ERK Sinyal İletim Yolu Ve Kanser:

Hormonlar, büyüme faktörleri, diferansiyasyon faktörleri ve tümör promoter maddeler bu sinyal yolunu kullanırlar. Bu iletim yolu Ras aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla Raf (= MAPKKK), MEK (= MAPKK) ve Erk (= MAPK) proteinleri ile kinaz kaskadı ilerler. Ras ve Raf protoonkogendir. Ras proteinlerinin aktif hale gelmesi için translasyon sonrası modifikasyondan (farnesilasyon) sonra membrana yerleşmesi gerekir. İstirahat halindeki hücrelerde Ras proteinleri inaktif (Ras-GDP) halde bulunurlar. Hücrenin uyarılması ile GDP'nin yerine GTP bağlanarak aktif

konformasyona dönüşüm (Ras-GTP) tetiklenir. Ras aktivasyonu tersinir bir süreçtir. Bu aktivasyonda rol oynayan moleküller, SOS (son of sevenless) ve Grb2 (growth-factor-receptor-bound protein 2) adaptör proteinleridir. Bu sinyal yolunun efektör molekülleri, SOS üzerinde negatif düzenleyici etki ile Ras aktivasyonunu sonlandırmaktadır. Aktive olan Ras proteinleri Raf kinazlara yüksek afinite ile bağlanırlar ve Raf kinazların hücre membranına yerleşimini ve aktivasyonunu sağlarlar.(22,23)

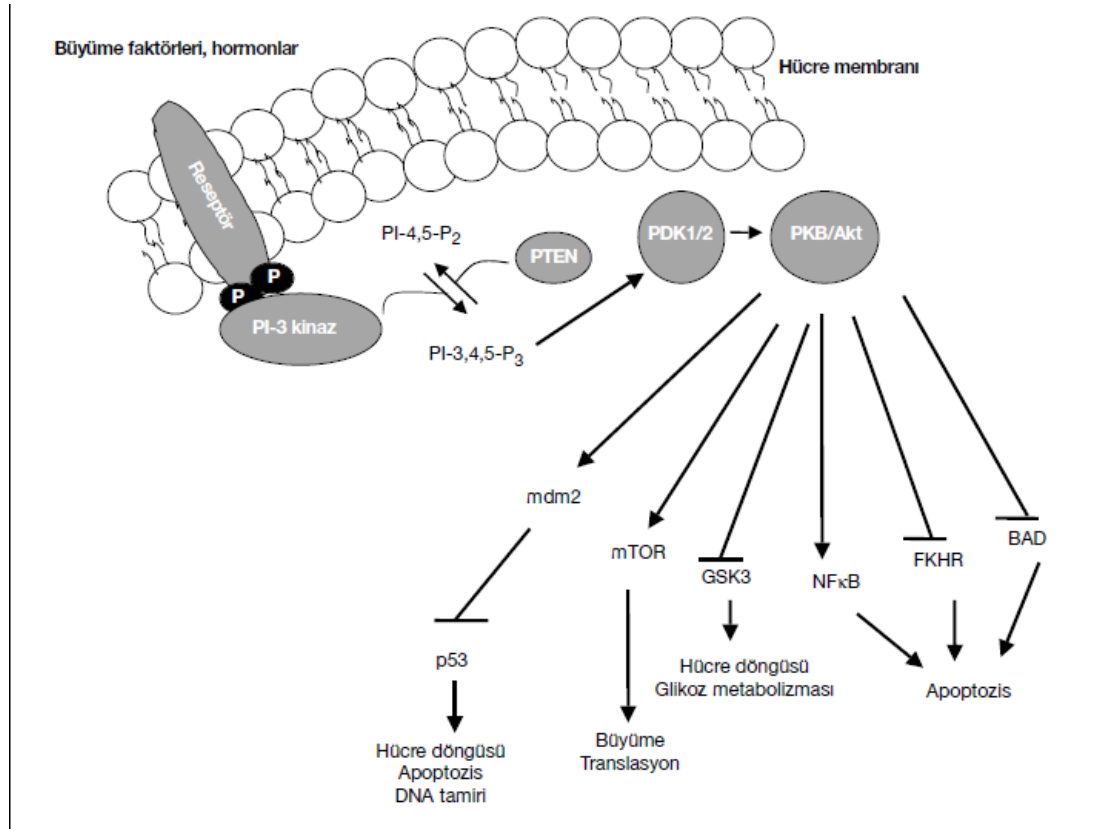
İnsan tümörlerinin %30'unda Ras/Raf/MEK/ ERK yolunun aşırı aktivasyonu söz konusudur(22). Bu oran tümörlerdeki Ras mutasyonu sıklığı ile uyumludur. Mutant Ras proteinleri, aktif RAS-GTP formunda kalırlar; bu nedenle, hücrenin kontrolsüz uyarılmasından sorumlu tutulmaktadır.

Ras iletim yolu ile tetiklenen transformasyon sürecinde sinerjik etkileşim de önem taşır. Normal koşullarda, EGF ve PDGF gibi büyüme faktörlerinin fosfoinozid-3 kinaz (PI-3K) yolunu uyarmalarında Ras'ın etkinliği minimal düzeydedir. Buna karşılık onkojenik Ras, PI-3K yolunun güçlü bir aktivatörüdür. Onkojenik Ras bu yolu aktive ederek apoptozisi baskılar(2,25) . İnsan kanserlerinin önemli bir bölümü epitel hücrelerinden köken alır. Dolayısıyla, bu hücrelerde apoptozisin baskılanması karsinogenez sürecinde kritik etkenlerden birini oluşturur. Ayrıca, onkojenik Ras uyarısı, transforme hücrelerde normal hücrelerden farklı genlerin ekspresyonunu da uyarabilir.(7)

d) PI-3 kinaz/protein Kinaz B Sinyal İletim Yolu Ve Kanser:

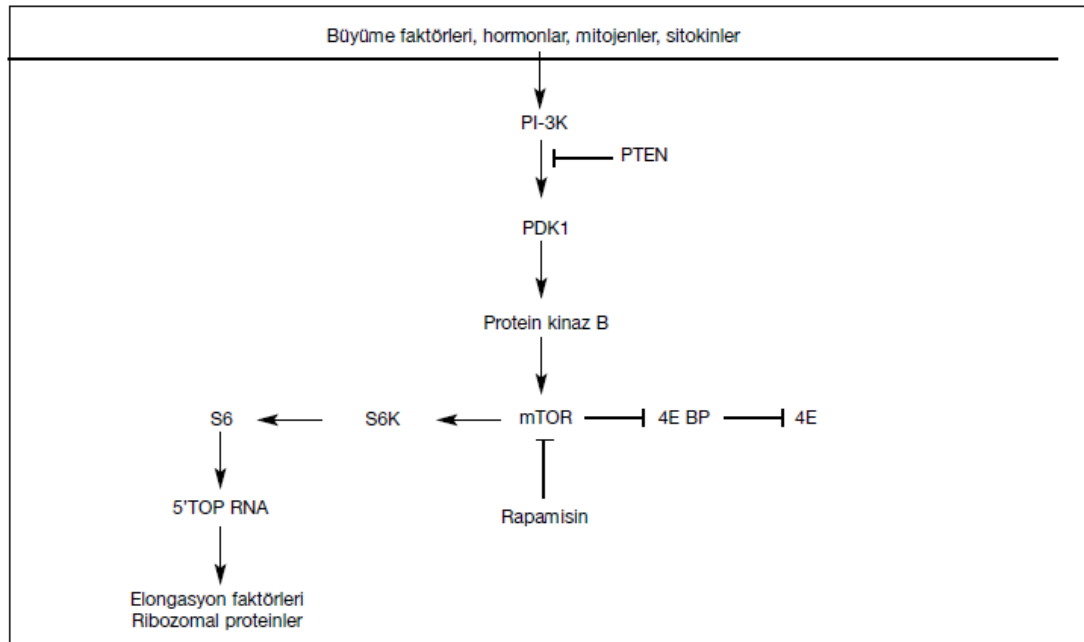
Fosfoinozid-3 kinaz (PI-3K) ailesi, büyüme ve yaşama sinyallerinin iletiminden sorumlu proteinlerdir(26). Reseptörün uyarılmasından sonra PI-3K, hücre membranında inozitol fosfolipidlerin fosforilasyonunu katalizler. Fosfotidilinozitol trifosfat (PIP3), bu yolla oluşan bir lipid mediatördür. PIP3, PIP3 bağımlı kinazlar (PDK) ve protein kinaz B (PKB)'nin aktivasyonundan sorumludur (9). Protein kinaz B, *Akt1* ve *Akt2* genleri tarafından kodlanan bir proteindir. Bu genler, viral *v-akt* onkogeninin insanda bulunan homologlarıdır(27). Sitokinler ve büyüme faktörleri PI-3K ve PKB yolunu aktive ederek hücreler için yaşama sinyalleri oluştururlar. Tümör baskılayıcı proteinlerden PTEN ise, PIP3 oluşumunu inhibe ederek negatif düzenleyici rol oynar(28,29). Protein kinaz B uyarısı hücre

içinde çeşitli proteinlerin aktivitelerini etkilemektedir. Bunlardan biri, “mammalian target of rapamycin (mTOR)” proteinidir. Kinaz aktivitesine sahip olan bu proteinin rapamisin tarafından inhibe olduğu gösterilmiştir. mTOR’un önemli fonksiyonları şunlardır (30):



Şekil 2.2 : protein kinaz B /Akt yolunun işlevleri

1. S6 kinaz (S6K) aktivasyonu ile S6 ribozomal proteinini aktive ederek, 5'TOP mRNA'ların translasyonunu uyarır.
2. Ökaryotik inisiasyon faktörü 4E ile bağlanan proteini (4E-BP) inaktive ederek, 4E'nin serbest hale gelmesini sağlar. Aktif hale gelen 4E ribozomal proteinlerin translasyonunu uyarır. 5'TOP mRNA'lar, hücredeki RNA miktarının %20'sini oluşturur ve translasyon işlevinde etkilidirler. 4E proteini de, bu mesajların translasyonunda etkilidir. Sentezlenen proteinlerin, büyüme faktörleri, onkoproteinler veya hücre döngüsünün düzenleyici proteinleri olması mTOR'un önemini ortaya koymaktadır(29,33).



Sekil 2.3 Fosfoinozid 3K(PI-3K), mTOR ve protein sentezi

Karsinogenezde etkili olan PI-3K sinyal yolu değişimleri şöyle sıralanmaktadır:

1. PI-3K'nın sentezi artabilir.
2. PTEN tümör baskılayıcı proteini mutasyon ile fonksiyon kaybına uğrayabilir.
3. PKB sentezi kanser hücrelerinde (meme, over, mide, pankreas, prostat) artabilir.
4. PTEN'in işlev kaybı veya PKB'nin aşırı sentezlenmesi sürekli mTOR aktivasyonuna yol açmaktadır.
5. 4E proteininin sentezi de artabilir.

Bu noktalar göz önüne alındığında, karsinogenezde mTOR'un etkileri şu şekilde özetlenebilir:

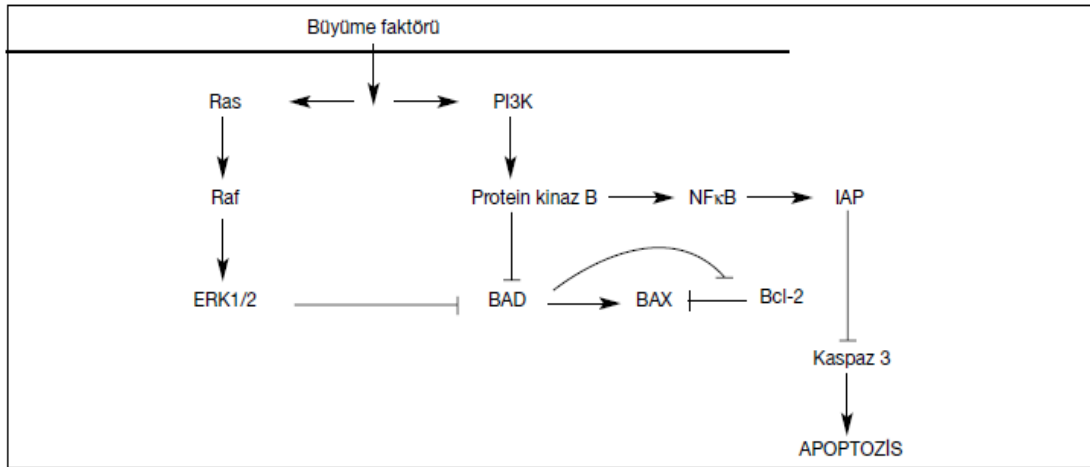
- a. PI-3K sinyal yolu aracılı karsinogenezde mTOR'un temel bir rolü vardır.
- b. S6K'nın aktivasyonu ve 4E-BP'nin inaktivasyonu tümör gelişimi ile ilişkilidir.

Protein kinaz B aktivasyonunun hücre döngüsü üzerindeki etkileri de karsinogenez sürecinde önem taşır. p21 proteini hücre döngüsünün erken G1 fazında siklin D ve siklin bağımlı kinaz 4/6 (cdk4/6) kompleksi üzerinde pozitif uyarıcı etki yapmaktadır. Protein kinaz B, p21'in stabil formunun oluşumunu tetikler ve hücre

döngüsünün ilerlemesine uyarıcı yönde etki eder. Buna ek olarak, p21'in degradasyonunu uyarıcı proteini de inhibe etmektedir(26).

Hücre döngüsünün inhibitör proteinlerinden p27'nin siklin-siklin bağımlı kinaz kompleksine bağlanması için, sitoplazmadan hücre çekirdeğine yer değiştirmesi gerekir. Onkojenik uyarı halinde (PTEN mutasyonu, HER2 veya EGFR aktivasyonu) bu protein fosforilasyona uğrar. Bunun sonucunda, p27 sitoplazmaya geri döner ve hücre döngüsündeki inhibitör etkisi ortadan kalkar.(34) Bu çalışmalar, sürekli ve/veya kontrolsüz protein kinaz B uyarısı ile tümör hücrelerinin çoğalması arasındaki doğrudan ilişkiyi göstermektedir.(35-37)

Protein kinaz B uyarısının doğrudan etkili olduğu hücresel işlevlerden biri de apoptozistir (Şekil 4)(26). PKB, proapoptotik BAD proteini ile kaspaz 9 üzerinde inhibitör etki gösterirken, NFκB uyarısı ile de antiapoptotik cevabı desteklemektedir(26).

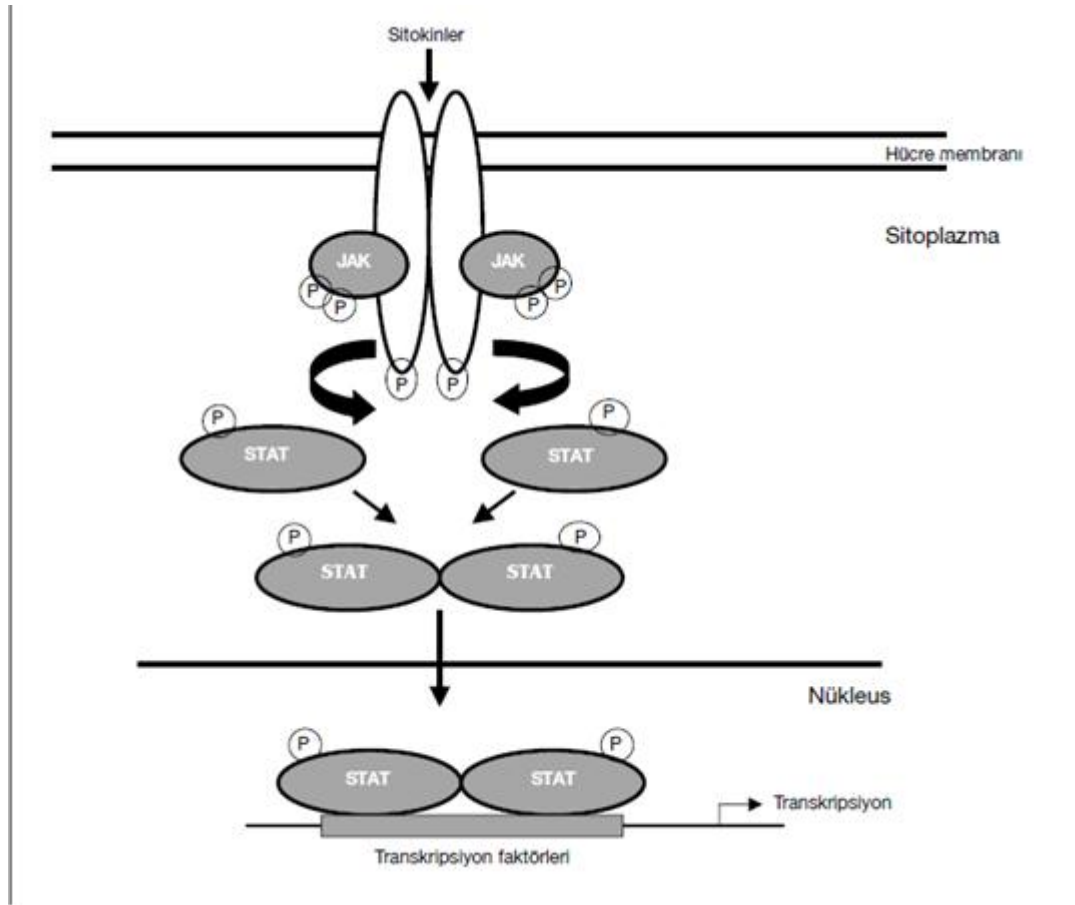


Şekil 2.4 MAPK ve protein kinaz B yollarının apoptozis

e) Nonreseptör Tirozin Kinazlar İle Sinyal İletim Yolu Ve Kanser:

Kanser gelişimi sürecinde Src tirozin kinazın ekspresyonu ve/veya aktivitesi artmaktadır(12,13). Hücrelerde inaktif halde bulunan endojen Src uyarılarla aktif hale geçince, hem kinaz aktivitesi hem de SH domainleri üzerindeki kısıtlayıcı etkenler ortadan kalkar. Aktive olan protein, periferik alandaki adezyon bölgelerine hareket eder. Src'nin katalitik aktivitesi ile tetiklenen sinyal iletimi mekanizması hücre büyümesi, adezyon ve migrasyon gibi fizyolojik işlevleri yürütmektedir. Buna

göre, kanser hücrelerinde Src aktivasyonunun kontrolünün ortadan kalkması tümör büyümesini hızlandırabilir ve hücrelerdeki invazyon potansiyelini uyarabilir.



Şekil 2.5 : sitokin aracılı JAK / STAT aktivasyonu

f) STAT Proteinleri İle Sinyal İletim Yolu Ve Kanser:

“Signal transducer and activator of transcription (STAT)” proteinleri 1990’lı yılların başında interferon (IFN) aracılı olarak gen transkripsiyonunun düzenlenmesi ile birlikte tanımlandı. Günümüzde, çeşitli sitokinlerin farklı STAT proteinlerini aktive ettikleri bilinmektedir. Memeli hücrelerinde yedi STAT proteini tanımlanmıştır.

Bunlar; STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT6 olarak adlandırılmaktadır(38).

Sitokin aracılı STAT aktivasyonunun aşamaları şu şekilde sıralanmaktadır

(38) :

Sitokin, hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanır (α alt birim). Daha sonra $\alpha\alpha$ ya da $\alpha\beta$ oligomerizasyonu gerçekleşir. Bu oligomerizasyon, reseptör ile ilişkili olan JAK proteinlerini çapraz fosforilasyon ile aktive eder. Aktive JAK proteinleri reseptörü de fosforile ederler. Bu bölgeler sitoplazmadaki inaktif STAT proteinlerinin reseptör ile etkileşmesine olanak sağlar. STAT proteinlerin daha sonra homodimer ya da heterodimer oluşturmak üzere reseptörden ayrılarak hücre çekirdeğine gelirler ve DNA üzerinde özgül cevap elemanı dizileri ile etkileşerek hedef genlerin transkripsiyonunu uyarırlar.

STAT proteinlerinin yapısında yer alan bölgelerin işlevleri şunlardır(39) :

1. Oligomerizasyon bölgesi: Diğer proteinler ile etkileşir, STAT tetrameri oluşumunu sağlar.
2. DNA bağlanma bölgesi: DNA'ya özgün bağlanmadan sorumludur; ligand uyarısına özgül sinyal oluşumunu sağlar.
3. SH2 bölgesi: STAT-reseptör, STAT-JAK ve STATSTAT etkileşimlerinden sorumlu bölgedir.
4. C-terminal ucu: Transkripsiyonel aktivitenin özgünlüğü ve kontrolünden sorumludur.
5. Tirozin aminoasiti: N-ucundan yaklaşık 700 aminoasit uzaklıktadır. Tirozin fosforilasyonu, bütün STAT proteinlerinin DNA'ya bağlanma aktivitelerini düzenler.

STAT3 ve STAT5 aktivitelerinin kontrolsüz işleyişi malign transformasyonda rol oynamaktadır. STAT proteinleri iki mekanizma aracılığıyla karsinogeneze etkili olur. Bunlardan biri STAT'ın sürekli aktivasyonudur. Diğer değişim ise proteinin c-ucunun mutasyona uğramasıdır. Devamlı olarak aktif olan STAT proteini antiapoptotik yolları uyararak malign süreçte etkili olabilir. IL-6 ile devamlı STAT3 aktivasyonu uyarılan multipl miyeloma hücrelerinde antiapoptotik proteinlerden Bcl-xL ve Mcl-1'in arttığı gösterilmiştir(40).

STAT aracılı sinyal iletimi ile uyarılan hedef genlerin (örneğin; c-myc, siklin D1 ve Bcl-xL) hücre döngüsünün kontrolünü sağlayarak ve/veya apoptozisi önleyerek karsinogenez sürecinde etkili oldukları öne sürülmektedir. Ayrıca, STAT

aracılı sinyal iletiminin malign sürecin gelişiminde MAP kinaz yolunun aktivasyonu ile etkileşebileceği düşünülmektedir. Devamlı aktif STAT3 proteini ile hastalısız sağkalım süresi arasındaki ters ilişki anlamlı bulunmuştur(41). Ancak STAT aktivasyonu kötü prognozun nedeni olabileceği gibi, bu sürecin kendisi de STAT aktivasyonunu tetikleyebilir. Lösemik blastlarda sitokin sentezi ve otokrin/parakrin yolla JAK/STAT yolunun uyarılması, akut miyeloid lösemide devamlı STAT aktivasyonu nedeni olabilecek mekanizmalar arasında sayılmaktadır. STAT3 aktivitesi vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) düzeyinin artışına yol açarak, tümör anjiyogenezisinde de rol oynamaktadır(42). Bcr-Abl kimerik proteini hematopoietik hücrelerde büyüme faktöründen bağımsız olarak çoğalma ve transformasyonu indükler. Bu onkoprotein JAK/STAT yolunun sürekli aktif olmasına yol açar. İmatinib mesilat ile tetiklenen apoptozis STAT5 aktivitesinin inhibisyonu ve Bcl-xL ekspresyonunun azalması ile korelasyon göstermiştir(43). Buna göre, Bcr-Abl ile ilişkili apoptozis direncinde STAT5 aktivitesinin rolü vardır.

g) Adenovirüs Proteinlerinin Sinyal İletim Yollarında Etkileri Ve

Kanser:

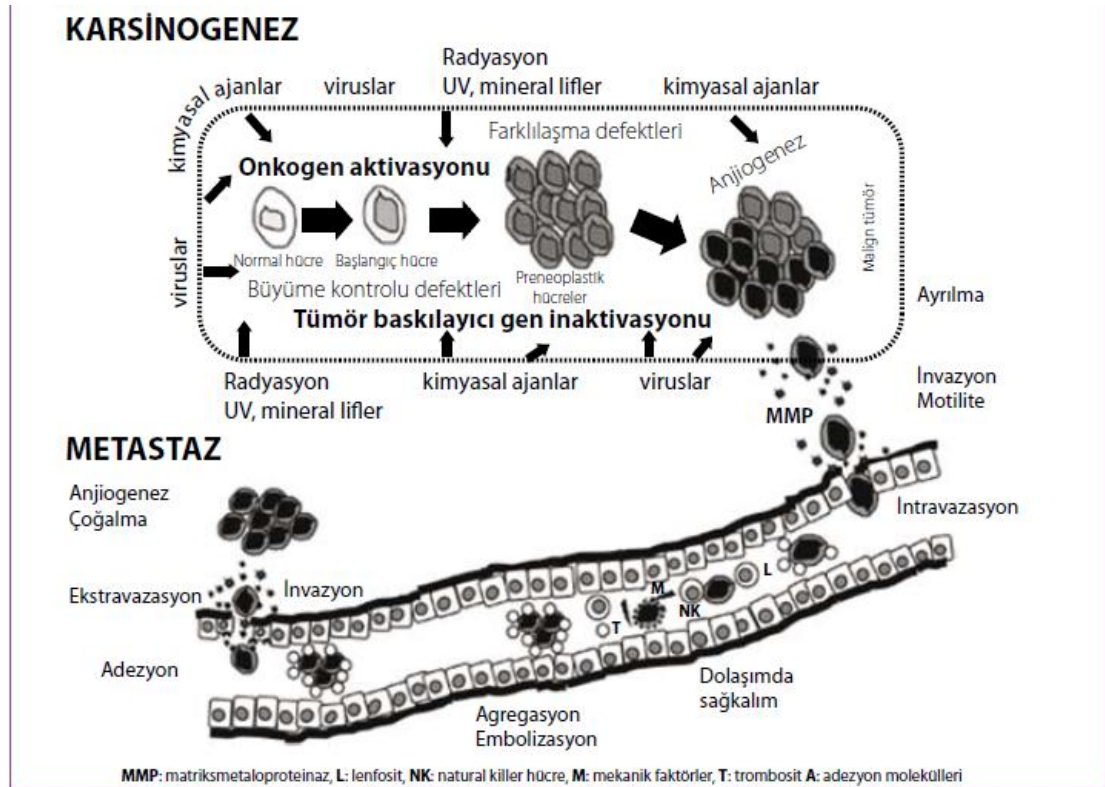
Adenovirüslerin replikasyon döngüleri sırasında adenoviral erken genler E1A viral proteinlerini sentezler. Bu proteinler infekte hücrenin G1 fazından S fazına geçişini indükler. S fazında viral genom da replike olur(44). Diğer taraftan, infekte hücreler viral enfeksiyona cevap olarak p53'ü aktive ederler. Böylece hücrede G1 fazında duraklama ve/veya apoptozis uyarılır ve viral çoğalma engellenir. Adenovirüsler ise bu kez sentezledikleri E1B proteinleri ile p53 tarafından yönlendirilen etkilerden kendilerini korurlar ve çoğalmaya devam ederler. p53 blokajı yapamayan adenovirüsler ise normal hücrelerde replike olamazlar. Adenoviral tedavi de bu özellikten yola çıkarak tümör hücrelerini öldürmeyi hedefler; bunun için, E1B sentezi yapamayan mutant adenovirüsler geliştirilmiştir (ONYX-015)]. Tümör hücrelerinde p53 mutasyonu sıklığı %60 civarındadır. Dolayısıyla, bu mutant virüsler seçici olarak p53 mutasyonu olan tümör hücrelerinde çoğalarak tümör lizisine yol açarlar(45,46).

h) Onkogenler:

DNA molekülündeki pürin ve pirimidin bazları ve şeker molekülleri ile reaksiyona giren veya kromozomların yapısında bulunan proteinlerle çarpaz bağlar oluşturan karsinojen ajanlar, DNA molekülündeki baz delesyonları, zincir kırıkları, inversiyon gibi yapısal değişikliklere yol açar. Mutasyon dediğimiz bu değişiklikler sonucunda DNA'nın replikasyonu, genlerin transkripsiyonu ve translokasyonu veya aktivasyonunda değişiklikler olur. Yapı ve fonksiyonundaki değişiklikler sonucu ekspresyonlarındaki düzenlemenin bozulmasıyla kanser oluşumunu kolaylaştıran bu genlere onkogen adı verilir. Onkogenler genellikle mutasyon ya da başka nedenlerle yeni bir işlev veya aktivite kazanarak otozomal dominant etki gösterirler. Normal hücrede çoğalmanın kontrolü için gerekli olan ve hasara uğradıkları veya ortadan kalktıkları zaman hücrenin denetimsiz çoğalmasına neden olan ve otozomal resesiflik gösteren genlere de tümör süpressör genler denir. Onkogenlerin aktivasyonu ve tümör süpresör gen inaktivasyonları, hücrenin kontrolsüz çoğalması, kontak inhibisyonun kaybolması, invazyon ve metastaz yeteneği kazanması gibi malign özellikler kazanmasına yol açar(2, 49, 50). Hücre büyümesi, farklılaşması ve çoğalmasında rolü olan proto-onkogenlerde meydana gelen mutasyonlar tümör gelişimine, tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar ise hücre siklusunun inhibisyonunu engelleyerek anormal hücre büyümesine neden olur.

Tümör hücrelerinin çoğalması Sürekli bölünen hücrelerde mitozdan sonra siklus G1 -S-G1 (interfaz) ve M (mitoz) şeklinde tekrarlanır. Bu süreçte hücre uyarımı ve büyüme meydana gelmekte veya bölünme sinyali almadıkları sürece istirahat fazı G1 de durmaktadırlar. G1, S, G2 fazları (interfaz) hücre siklusunun %90'ını kapsar ve 16-24 saat sürer. Mitoz bölünme ise 1-2 saat sürmektedir. G fazında hücreler kendi çevrelerini kontrol eder, sinyalleri alır ve büyümeyi indükler. Bu fazda DNA sentezi (replikasyonu) için hazırlık yapılır. RNA ve protein sentezi olur. S fazında DNA sentezlendikten sonra, G2 fazında hücre büyümeye devam eder, aynı zamanda RNA sentezi, protein sentezi gerçekleşir ve hücre mitozu hazırlar. Mitoz; profaz, metafaz, anafaz ve telofazdan oluşmaktadır. Hücre siklusunda bir faz tamamlanmadan sonraki faza geçilirse genetik materyal tam ve doğru kopyalanmadığı için hücrede hasar meydana gelebilir. Hücre siklusunda G-S geçişinde, G-M geçişinde ve metafaz-anafaz geçişinde kontrol noktaları vardır. Bu

kontrol noktalarında hücrenin siklusa devam edip etmeyeceği kararı verilir(3,48).Tümörün büyüme hızını ifade etmede kullanılan “doubling time (ikilenme zamanı)” tümör hücre sayısının iki katına çıkmasıdır. Özellikle solid tümörlerin hücreleri başlangıçta geometrik artışla çoğalırken zaman ilerledikçe büyüme hızı yavaşlar ve bazı durumlarda da ölen ve çoğalan hücrelerin birbirine eşit olduğu bir plato çizerler, bu büyüme paterni Gombertz eğrisi olarak adlandırılır(47,51). Hücre proliferasyonu için gerekli olan sinyal iletim sistemi en başta büyüme faktörü adını verdiğimiz bir dizi polipeptidden oluşur. Bunlardan başlıcaları PDGF (trombosit kökenli büyüme faktörü) EGF (epidermal büyüme faktörü) CSF (koloni stimulan faktörler) TGF alfa, beta (transforme edici büyüme faktörleri alfa ve beta) İL-2 (interlökin 2) İGF-1 ve 2 dir (insülin benzeri büyüme faktörü). Hem proto-onkogen hem de nonprotoonkogen kaynaklı büyüme faktörleri, hedef hücrelerdeki spesifik büyüme faktörü reseptörlere (GFR) bağlanırlar. Böylece, bu reseptörler üzerindeki tirozin kinaz enzimler aktifleşir. GFR’ler ve bazı hormon reseptörleri hücre membranında bulunan ve bir kısmı membran içinde bir kısmı membran dışında/içinde olan proto-onkogen proteinlerdir. Proteinin hücre yüzeyindeki parçasında spesifik ekstrasellüler büyüme faktörleri için özel bağlanma bölgeleri bulunur. GFR’ler kendilerine özgü büyüme faktörleri ile aktive edildiklerinde, bu reseptörlerin sitoplazmik bölgeleri aktif tirozin kinaz haline gelir. Aktifleşen tirozin kinazlar ekstrasellüler sinyali bazı mekanizmalarla sitoplazmik proteinlere ve nükleusa aktarırlar. Sinyal iletiminin son safhasında hücre çekirdeğindeki DNA dan RNA yapımı ve DNA nın replikasyonu uyarılır ve hücre çoğalması aktive olur Bu sistemde rol alan genlerin herhangi birinde ortaya çıkabilecek aşırı aktivasyon kontrolsüz çoğalma ile sonuçlanabilecektir(1).



Şekil 2.6 : karsinogenezin oluşumu. İçli F , Akbulut H. Onkolojiye Giriş . In. İliçin G, B, Beroğlu K, Süleymanlar G ve ark ; eds . İç hastalıkları . Güneş kitapevi; 2005:2007-2014'den alınmıştır.

Hücre siklusunda birçok denetim noktası tanımlanmıştır. Bu denetim noktaları, hücre döngüsünün bir sonraki evreye geçmeden önceki evrelerin bir çeşit kontrolü olarak da düşünülebilir. Bu noktalar hücre siklusunun ilerlemesini durdurabildiği gibi, gerekli olan durumlarda apoptozisi (programlı hücre ölümü) de aktive edebilir. Anormal DNA'lı hücreler ya tamiri olanaksız DNA hasarı oluşmuş ya da yanlış, eksik veya gereksiz olarak fazla transkrip olmuş DNA'dan dolayı oluşur. Böylece, DNA'sını sadece doğru bir şekilde ve tam olarak replike etmiş hücrelerin mitozise girmesi sağlanır(3). Apoptozis yaşlanmış ve yararsız hale gelen normal hücrelerin ortamdaki yok edilmelerini (eliminasyonlarını) sağlar. Tümör baskılayıcı genler, özellikle hücre siklusunu denetim noktalarında rol alanlar ve DNA tamir genleri, siklus esnasında ortaya çıkabilecek genetik hasarları ortadan kaldırarak veya hasara uğrayan hücrelerin apoptozisine neden olarak kanserli hücrelerin ortaya çıkmasını önlemeye çalışırlar.

2.2 Kolon Embriyolojisi Ve Anatomisi

a) Embriyoloji:

Embriyolojik gastrointestinal kanalın gelişimi gebeliğin dördüncü haftasına kadar sürer. İkel barsak endodremden türeyerek üç segmente ayrılır. Ön barsak, orta barsak ve arka barsak. Kolon rektum ve anüsü orta barsak ve arka barsak birlikte oluşturur.

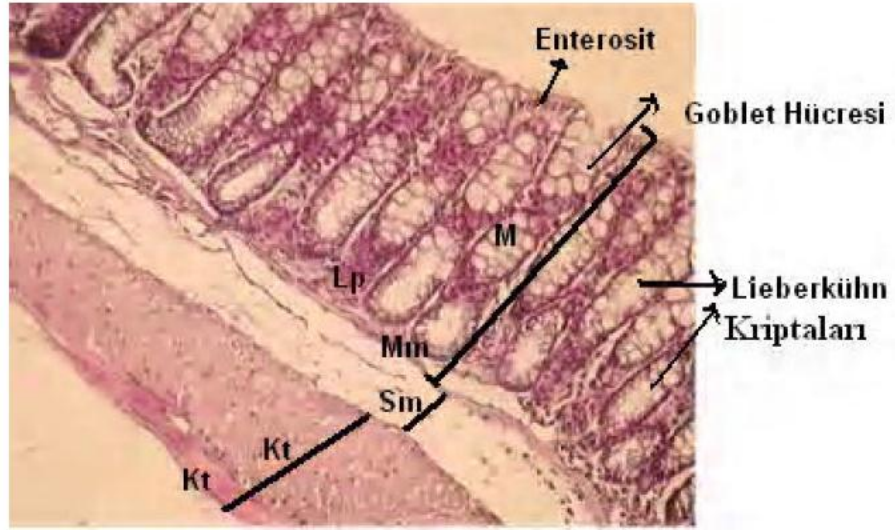
Orta barsak; ince barsak, çıkan kolon ve proksimal transvers kolona dönüşür ve kan akımını süperior mezenterik arterden alır. Gebeliğin altıncı haftasında orta barsak karın boşluğunun dışına fıtklaşır ve daha sonra saat yönünün aksine süperior mezenterik arterin etrafında 270 derece rotasyon yaparak gebeliğin onuncu haftasında karın içindeki son halini alır.

Arka barsak; distal transvers kolon, inen kolon, rektum ile proksimal anüsü oluşturur, bunların tümü kan akımını inferior mezenter arterden alır. Gebeliğin altıncı haftasında arka barsağın en distal ucu yani kloaka, ürorektal septum ile ürogenital sinüs ve rektum olarak ikiye ayrılır.

Distal anal kanal ektodermden türer ve kan akımını internal pudental arterden alır. Dentate çizgi endodermal arka barsağı, ektodermal distal anal kanaldan ayırır. (93)

b) Anatomi:

Kalın barsak ilioçekal valvden anüse kadar uzanır. Anatomik ve fonksiyonel olarak kolon, rektum ve anal kanaldan oluşur. Kolon ve rektumun duvarı beş ayrı katmandan oluşur: mukoza, submukoza, iç sirküler kas, dış longitudinal kas ve seroza. (93)



Şekil 2.7: Kierszenbaum A. Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş. Ankara 2006: 438-441'dan alınmıştır.

İntraperitoneal klon ve proksimal rektum 1/3 rektum seroza ile örtülüdür; orta ve alt rektumda seroza yoktur.

Kolon terminal ileum ve çekum bileşkesinden başlar 90-150 cm'de rektuma ulaşır. Rektosigmoid bileşke, yaklaşık sakral promontorium hizasında olup keyfi olarak üç tenya kolinin birleşerek rektumun dış longitudinal kasının başlangıç yeri olarak kabul edilir.

Çekum kolonun en geniş bölümüdür (normalde 7,5-8,5 cm) aynı zamanda müsküler tabakası en ince olan bölümüdür. Be nedenle çekum perforasyona en çok duyarlı ve tıkanıklığa en az duyarlı bölümdür. Çıkan kolon genellikle retroperitona fiksedir. Hepatik fleksura transvers kolona geçişi belirler. İntraperitoneal transvers kolon göreceli olarak mobildir ancak gastrokolik ligaman ve mezenteri ile tutulmuştur. Omentum majus transvers kolonun anterior süperior kenarına yapışıktır. Splenik fleksura transvers kolondan inen kolona geçişi işaret eder. Splenik fleksura ve dalak arasındaki bağlar kısa ve kalın olabilir. Bu durum kolektomi sırasında yaralanmalara sebep olabilir. İnen kolon retroperitona kısmen fiksedir. Sigmoid kolon kolonun in dar kısmı olup en mobil kısımdır. Sigmoid kolon genellikle sol alt kadrana yerleşik olmasına rağmen mobil olması nedeni ile sağ alt kadrana kadar

uzanabilir. Bu durum klinik açıdan sigmoid kolonu tutan hastalıklarda sol alta beklenen bulguların sağ alt kadranda olmasını açıklar. (93)

i) Kolonun Kan Akımı:

Kolonun kan akımı çok değişkenlik gösterebilir. Genelde süperior mezenterik arter dallanarak. Terminal ileum ve proksimal çıkan kolonu kanlandıran ileokolik arteri, çıkan kolonu kanlandıran sağ kolik arteri ve transvers kolonu besleyen kolika media arterini verir. İnférieur mezenterik arter dallanarak, inen kolonu besleyen sol kolik arteri, sigmoid kolonu besleyen birkaç dalı olabilen sigmoidal arteri ve rektumun süperionu besleyen süperior rektal arteri verir. (93)

ii) Kolonun Lenfatik Drenajı:

Kolonun lenfatik drenjı muskularis mukoza içindeki lenfatik ağdan kaynaklanır. Lenfatik damarlar ve lenf düğümleri reyonel arterleri takip eder. Lenf düğümleri barsak duvarında(epikolik) , büyük mezenter arter etrafında (intermediate) ve süperior ve inferior arterlerin kaynaklandığı yerlerde (ana) bulunur. (93)

2.3 Kolon Kanseri

a) İnsidans:

Kolorektal kanserler gastrointestinal traktusta en sık rastlanan kanserlerdir. ABD ‘ de yılda 145.000 üzerinde yeni olgu tanısı konmaktadır ve her yıl 55.000 üzerinde hasta bu hastalıktan ölmektedir. Bu durum, kolorektal kanserleri ABD ‘de ikinci en sık öldürücü kanser sırasına koymaktadır. İnsidans kadın ve erkeklerde birbirine eşit olup bu durum yaklaşık 20 yıldır değişmemiştir. Yaygın uygulanan tarama programları ile bu öldürücü hastalığın sıklığı azalmış olmalıdır. Erken saptanması, tıbbi ve cerrahi tedavideki gelişmeler son zamanlarda kolorektal hastalık mortalitesinde görülen azalmadan sorumlu tutulmaktadır. (94)

b) Epidemiyoloji (Risk Faktörleri)

Kolorektal kanserlerin gelişimdeki risk faktörlerinin belirlenmesi, uygun seçilmiş kitlelerin tarama ve kontrol programlarını oluşturmada çok önemlidir.

i)Yaş

Yaşlanma kolorektal kanser için baskın bir risk faktörüdür. 50 yaşından sonra sıklık sabit air şekilde artış gösterir. Kolorektal kanser riski bakımından ortalama riske sahip semptomsuz Amerikalılarda tarama testlerinin yaşında başlamasının ardındaki düşünce budur. Ancak her yaştaki fertlerde kolorektal kanser gelişebilir. Bu nedenle barsak alışkanlıklarında önemli değişiklik olanlar, rektal kanaması olanlar, melena, açıklanamayan anemisi olanlar ile kilo kaybı bulunan hastaların tam bir değerlendirilmesi gerekir.

ii) Kalıtsal Risk Faktörleri:

Kolorektal kanserlerin yaklaşık yüzde sekseni sporadiktir. Yüze yirmisi ise ailesinde bilinen kolorektal kanser hikâyesi olanlarda gelişir. Bu ailesel bozuklukların saptanmasındaki gelişmeler erken tedaviye ilgiyi artırmıştır. En sık rastlanan APC geni ile mismatch (yanlış birleşme) onarım genindeki defektleri araştıran testler bugün kullanılmaktadır.

iii) Çevresel Ve Diğer Faktörler :

Kolorektal kanserler hayvansal yağların fazla, lifli gıdaların az tüketildiği toplumlarda daha yüksek diyet faktörünün karsonıgenezde önemli rol aldığını vasaymaktadır. Doymuş ve poliunsatüre yağlardan zengin gıda ile beslenenlerde kolorektal kanser riski artarken, oleik asitten (zeytinyağı, balık yağı) zengin gıdalarla beslenenlerde risk artmamaktadır. Alkol tüketimi ile kolorektal kanser gelişimi arasındada bir ilişki olduğu varsyılmaktadır. Kalsiyum, selenyum, A, C, E vitaminleri, keroteoidler ve bitkisel fenoller muhtemelen kolorektal kanser gelişimi riskini azaltmaktadır. Obezite, hareketsiz yaşam tarzı, kolorektal kanserlerde içinde bulunduğu birçok kansere bağlı morbiditeyi ciddi oranda artırmaktadır.

iv) İltihabi Barsak Hastalıkları:

Uzun süre iltihabi barsak hastalığı koliti olanlarda kolorektal kanser gelişme riski yüksektir. Kronik enflamasyonla mukoza malign değişime yatkınlık oluştuğu varsayılmaktadır. Genel olarak risk, kolitin süresi ve yaygınlığı ile paralellik gösterir. Ülseratif panitte kanser riski 10 yılda yaklaşık % 2, 20 yıl sonra % 8, 30 yıl sonra % 18 kadardır. Crohn panitinde de benzer risk mevcuttur. Bu nedenle pankolitite 8 yıl

sonra sol taraflı kolitte ise 12-15 yıl sonra yıllık tarama koloskopi ve çok sayıda biyopsi yapılmalıdır. Ancak şunuda belirtmek gerekir ki yoğun takipler sağkalımı belirgin olarak artırmamıştır, dolayısı ile bazıları bu yaklaşımın etkinliğinden kuşkuludur.

v) Diğer Risk Faktörleri:

Sigara özellikle 35 yıl üzerinde kullanılmışsa kolon adenomu gelişimi ile paralellik gösterir. Üreterosigmoidoskopi yapılmış hastalarda adenom ve kasinom gelişimi bakımından yüksek riskli hastalardır. Dolaşımdaki human growth hormon ve insuline benzer growth faktör-1 düzeylerinin yüksek olduğu akromegalide de risk yüksektir. Pelvik ışınlanma rektal kanser gelişme riskini artırabilir ancak bunun radasyonun direkt hasarına mı bağlı olduğu ypkasa başka bir pelvik tümör hikâyesi olan hastada rektal invazyon mu geliştiği açık değildir. (94)

2.4.Kolorektal Karsinogenezde Moleküler Genetik Değişiklikler

Kolorektal kanser normal dokuda buyumeyi kontrol eden molekuler mekanizmaların bozulmasına yol açan bir seri genetik değişikliklerin birikimi sonucunda oluşmaktadır. Karsinogenezde ilk değişiklikler hucre buyumesi ve programlanmış hucre olumu (apoptozis) arasındaki normal dengeyi etkileyen ve histopatolojik incelemelerle tesbit edilemeyen oldukça hassas olaylardır. Epitel hucresinin neoplazik surece girmesi için gerekli olan genetik değişimler temelde birbirinden farklı olan iki mekanizma ile açıklanmıştır.

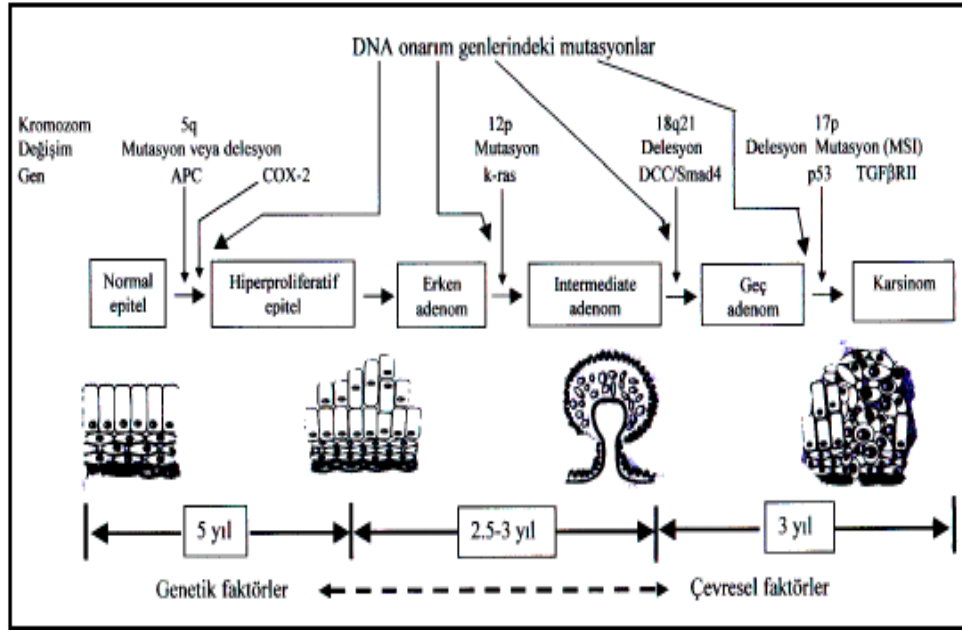
Bunlardan biri allelik kayıplar ve anoploidi ile karakterize olan kromozomal kararsızlıklar (genomic instability), diğeri de bazı karmaşık DNA mutasyonları ve diploidi nin artması ile kendisini gösteren değişikliklerdir (Microsatellite instability-MSI). Genomik kararsızlık yeterince mutasyona uğramış bir hucresinin kanser hucresine donusumune müsait bir durum oluşturarak adenom ve karsinomların oluşumunda önemli rol oynar. 1990 da Fearon ve Vogelstein'in kolorektal kanser tumorogenezinde rol oynayan molekuler düzeydeki olayları açıklamak amacıyla oluşturdukları model daha sonraki araştırmalara ışık tutmuştur.

Fearon ve Vogelstein in oluşturdukları modele göre;(56,57)

- 1- Kolorektal tumorler onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu ve tumor supresor genlerin mutasyonel inaktivasyonu sonucunda olusurlar.
- 2- Malin tumor olusumu icin en az 4 veya 5 genin mutasyonu gerekmektedir. Daha az miktardaki değisiklikler ancak benign tumor olusumu icin yeterli olmaktadır.
- 3- Genetik değisikliklerin birbirini takib eden bir sıra icinde olustuğu kabul edilmekteyse de tumorun biyolojik ozelliklerinin belirlenmesinde bu genetik değisikliklerin birikimi onların olus sırasından daha önemlidir.
- 4- Mutant tumor supresor gen heterozigot bir ortamda bulunduğunda bile fenotipik etkisini gosterme gayreti icindedir. Bu model daha sonra yapılan araştırmalara ışık tutmakla birlikte ozellikle ailevi kolon polipozisi (Familial adenomatous polyposis-FAP) ve polipozisle birlikte olmayan herediter kolon kanseri (Hereditary non-polyposis colorectal cancer - HNPCC) gibi kolorektal kansere genetik yatkınlık olusturan iki hastalığın genetik ozelliklerinin aydınlatılmasından sonra bu konudaki bilgiler artarak değisime uğramıştır.

Kolorektal kanser gelismine sebep olan genetik değisiklikler üç temel gurupta incelenebilir;

- 1- Tumor supresor gen aktivitesinin azalması veya kaybolması.
- 2- Protoonkogenlerde olusan değisiklikler.
- 3- DNA onarımı (mismatch repair) ile ilgili genlerdeki değisiklikler



Şekil 2.8: DNA onarım mutasyonları

a) Tumor Supresor Genlerdeki Değişimler:

Tumor supresor genler ancak her iki allel gende mutasyon veya kayıp olduğunda aktivitelerini kaybetmekte ve hücrenin programlanmış ölümü (apoptoz) engellenmektedir. Bir tümör supresor gen olan APC geninin (Adenomatous polyposis coli) inaktivasyonu ile başlayan bu yol kolorektal kanserlerin yaklaşık %70 ila 80 nin patogenezinde rol oynamaktadır ve heterozigozite kaybı olarak adlandırılır (Loss of heterozygosity-LOH). APC geni fonksiyonunun kaybı displazik aberran kript odağı olarak tanımlanan ilk adenomatoz değişikliklerin oluşumuna yol açar. Aberran kript odakları (Aberrant crypt foci - ACF) mikroskopik lezyonlardır ve makroskopik olarak görülmesi mümkün değildir. Daha sonra bir dizi başka genetik değişikliklerin de eklenmesiyle değişik derecede displazi gösterebilen orta ve geç dönemdeki adenom ve sonuçta karsinom oluşur.

b) APC Geni Mutasyonu:

Familiyal adenomatoz polipozisli (FAP) hastalarda 5.kromozomdaki delesyon bu kromozomun uzun kolundaki APC geninin tanımlanmasına yol açmıştır (5q21). APC geninin kodladığı protein 2843 aa içermektedir ve kolon epitel hücrelerinin bazolateral membranında yerleşim gösterir. Bu proteinin sentezi kript proksimaline

doğru goc eden hucrelerde daha belirgindir. APC geni mutasyonunun kolorektal karsinogenezin erken donemlerinde oluştuğu dusunulmaktadır. Kolorektal kanserin oncu lezyonu olarak kabul edilen aberran kript odaklarıyla karakterize mikroskopik adenomlarda APC geni mutasyonu gosterilmistir. Bu gendeki allelik delesyonlara FAP dışındaki kolon adenomlarının %20-50 sinde, kolon karsinomlarının da %60-80 ninde rastlanmaktadır. APC geni mutasyonu buyuk oranda (%98) APC proteininin kısalması sonucunda olusmaktadır ki bu bulgu FAP li ailelerin genetik olarak arastırılmasında kullanılabilir testlerin gelismesine yol acmıştır. FAP li bireylerde APC genindeki somatik mutasyonun cok buyuk bir kısmı (> %90) genellikle genin 1/3 lik orta kısmında bulunan ve mutasyon yoğunlasma bolgesi olarak adlandırılan bir bolgede olmaktadır (Mutation cluster region- MCR). Mutasyonun oluştuğu bolge hastalığın fenotipini etkileyen bir faktordur. MCR bolgesinde olusan mutasyonlar kolonda asırı polip olusumu ile birlikte (> 5000 polip). MCR dışındaki bolgelerde olusan mutasyonlarda ise daha hafif formla seyreden ve atenue FAP olarak adlandırılan (Atenuated FAP) bir fenotip olusmaktadır. Klasik FAP den farklı olarak kolondaki adenom sayısı 20 ila 100 civarında değisen, adenom ve kanser gelisimi klasik FAP den yaklasık 10 yıl daha gec olan ve adenomların daha cok proksimal kolonda yerlesim gosterdiği atenue FAP de APC gen mutasyonu genin 5' veya 2' terminallerinde olusmaktadır.

APC genindeki mutasyonlar hucre buyume ve coğalmasını duzenleyen mekanizmalarda değisikliklere yol acararak FAP gelismine yol acar. APC geni normalde β -catenin'in fosforilasyon yoluyla yıkımına sebep olarak hucre icinde birikimine engel olur. β -catenin hucre dışından gelen uyarıların nukleusa iletilmesine aracılık eden bir proteindir. APC geni fonksiyonunun kaybı β -catenin'in asırı miktarlarda birikimine ve bazı nukleus proteinlerinin sentezinin artmasına yol acar ve bunun sonucu da hucre coğalmasının artısı ve apoptozun azalmasıdır. Tumor dokusundaki B-cathenin sentezinin normal kolon mukozasına gore uc kez daha fazla olduğu gosterilmistir. APC genindeki anormallikler aynı zamanda bir adezyon molekulu olan E-cadherin de olusan değisiklikler nedeniyle hucreler arasındaki normal adezyonların bozulmasına sebep olur. Selluler adezyonda rol oynayan bir transmembran proteini olan E-cadherinin sitoplazmik kısmı β -catenine bağlanmakta ve bu kompleks de alfa-catenin ve aktin e bağlanarak hucreler arasındaki adezyonun

olusumunda rol oynamaktadır. Bu bulgular APC geninin hucre adezyonunda da rol oynadığını dusundurmektedir.(52-55)

c) p53 Geni Mutasyonu:

p53 geni bir tumor supresor gen olup 17. kromozomun kısa kolunda lokalize olmuştur (17p) ve bir hucre fosfoproteini olan p53 proteininin sentezinden sorumludur. Bu protein hucre çoğalması ve farklılaşmasının duzenlenmesinde rol oynayan bir proteindir. p53 geni normalde hucre siklusunda G1-S fazları arasında gecen surede hucrenin olusabilecek DNA hasarlanmalarına karsi korunmasını sağlamaktadır. p53 un kaybı aynı zamanda hasarlanmış hucrelerin apoptozundaki gecikme ile birlikte dir. P53 geninin inaktivasyonu adenomun karsinoma donusumune aracılık etmektedir. Bu olay kolorektal karsinogenezin nisbeten geç dönemlerinde ortaya cikan onemli bir basamaktır. Kolon kanserinde kromozom 17p nin delesyona uğrayan kısmı p53 geni iceren kısımdır ve sıklıkla p53 geninin bir alleli delesyona uğramışken diğ er allelde nokta mutasyonu bulunmaktadır. Kolon kanserinde uzak metastaz varlığı ile 17. ve 18. kromozomlardaki (17p ve 18q) allelik kayıp ve delesyonlar arasında anlamlı bir birliktelik olduğu gorulmuştur. p53 geninin bulunduğ u kromozom 17p nin delesyonuna kolorektal kanserlerin %75 inde rastlandığı halde adenom varlığında oldukça nadir olarak gorulur. p53 geninin edinsel somatik mutasyonu mide ve meme kanseri gibi değisik kanserlerde de sık gorulen bir genetik mutasyondur.(53,54)

d) DCC Geni Mutasyonu:

DCC geni (Deleted in colorectal carcinogenesis) bir supresor gendir ve 18. kromozomun uzun kolunda lokalize olmuştur (18q21). Bu genin delesyonu kolorektal kanserlerin %70 inde ve ileri derecede displazi gosteren adenomların da yaklasık yarısında saptanırken hafif displazi gosteren adenomlarda gorulmemektedir. DCC geni normal kolon mukozasında da yapılmakta olan ve hucre adezyon molekullerine benzer bir yapı gosteren bir proteinin sentezini duzenlemekte (E-cadhedrin?), adezyon molekulune benzer bu protein sentezlenemediğ inde hucreler arası etkilesimin neoplazik transformasyonla sonuçlanacak yonde değistiğ i dusunulmektedir. DCC varlığı 2 ve 3. evredeki kolorektal kanserlerde kotu prognozun oldukca kuvvetli bir belirleyicisidir.

Aynı kromozomun değişik bir bölgesinde yerleşim gösteren ve diğer bir tumor supresor gen olan DPC4/Smad4 un de kolorektal kanser vakalarının ucunda birinde delesyona uğradığı gösterilmiştir. DPC4 uyarı iletimini TGF-B (Transforming growth factor beta) reseptörleri aracılığı ile sağlayan SMAD gen ailesi içinde yer alır. TGF-B epitel hücrelerinde büyümeyle onleyici etki göstermektedir ve kolon adenokarsinom hücreleri genellikle TGF-B'nin hücre üzerindeki bu etkisine direnc göstermektedir. APC geni kaybı ile FAP modeli oluşturulan farelerde DPC4 un deneysel olarak inaktivasyonu adenomatoz poliplerin kansere dönüşümüne yol açmaktadır. (53,54)

e) Protoonkogenlerin Aktivasyonu

Protoonkogenler hücrede uyarı iletiminde ve hücre büyümesinin kontrolünde rol oynayan genlerdir. Bu genlerin uygunsuz aktivasyonları hücre yüzeyinden nükleusa gelecek mesajların anormal iletimine, anormal hücre proliferasyonuna ve sonuçta tumor oluşumuna yol açar. Ras geni bugüne kadar üzerinde en çok durulmuş olan onkogendir. İnsanda hücre içi uyarı iletimini düzenleyen bir nükleotidi (guanin) bağlayan proteini kodlayan 3 ras geni mevcuttur (K-ras, N-ras ve H-ras). K-ras geni 12.kromozomun kısa kolunda yerleşmiştir. Kolorektal kanserlerin yaklaşık %65 inde bir ras geninde (genellikle K-ras) nokta mutasyonu saptanmaktadır. Ras mutasyonlarının çoğu adenom gelişiminin orta dönemlerinde oluşmaktadır. Ras geni mutasyonu kolon kanserleri ve 1cm den büyük adenomlarının yaklaşık yarısından fazlasında görülürken 1 cm den küçük adenomların ancak %10 nunda ras geni mutasyonuna rastlanmaktadır. Ras protoonkogeninin tek başına aktivasyonu kanser oluşumu için yeterli görünmemekle birlikte küçük adenomun büyük adenoma dönüşümü sürecinde rol oynayabileceği düşünülmektedir.(54,55)

f) DNA Onarım Genlerindeki Değişiklikler (Mismatch Repair Gens)

İnsan genomu 23 çift kromozomda bulunan yaklaşık 100.000 gendeki 3 milyara yakın nükleotidden oluşmuştur. Her bir kromozom çifti kalıtım yoluyla anne ve babadan geçer ve kromozom üzerinde her genin allel olarak adlandırılan bir benzeri bulunur. Kromozomlardaki nükleotid sıfresi (dizilimi) hücre bölünmesi sırasında kopyalanma ve yeniden eşleşme suretiyle yeni oluşan hücrelere aktarılır.

Her 10 milyar nukleotid çiftinin kopyalanması sırasında bir hata oluşması normal olarak kabul edilebilir bir mutasyon oranıdır. Daha fazla miktarlardaki kopyalanma hatalarının düzeltilmesini sağlayan onarım genleri mevcuttur (Miss match repair genes – MMR). Genomik kararsızlık (genomic instability), yeterince mutasyona uğramış bir hücrenin kanser hücresine dönüşümüne müsait bir durum oluşturur ve kolon karsinogenezinde rol oynayan önemli bir mekanizmadır. Kolon kanserinde kromozom kararsızlıkları, kromozom translokasyonları ve mikrosatellit kararsızlığı (Microsatellite instability -MSI) gibi değişik genomik kararsızlık türleri sık olarak görülür. Özellikle HNPCC (Hereditör nonpoliposis kolorektal kanser) vakalarında MSI mekanizmasının keşfinden sonra genomik kararsızlığın kolon kanseri patogeneziindeki önemi daha belirgin hale gelmiştir. Mikrosatellitler genom boyunca dağınık olarak yerleşmiş ve yüksek polimorfizm gösteren nukleotid bölgeleridir. HNPCC li hastaların tumorlerinde bu nukleotid bölgesinin uzunluğunun normal dokudakine göre oldukça değişken bir özellik gösterdiği anlaşılmıştır. MSI nin varlığı DNA sentezi sırasında hata oluşma olasılığını artırmaktadır (mismatch-yanlış eşleşme). MSI nin hassas genlerde giderek artan sayıda mutasyonun oluşumuna yol açması sonuçta malign fenotipin ortaya çıkmasına yol açar. Kopyalanma sırasında DNA yapısının değişmeden sürdürülmesinde rol oynayan MMR genlerindeki değişiklikler sporadik kolorektal karsinomların %15 ila 20 sinde görülürken özellikle HNPCC li hastaların karakteristik bir bulgusudur (>%85) (Replication error pathway-REP). MMR genlerindeki mutasyonlar ve bu sistemin inaktivasyonu genomik kararsızlığa ve replikasyon hatalarının artmasına sebep olur. REP yoluyla oluşan kolorektal tumorlerin karakteristik özellikleri şu şekilde sıralanabilir;(54-56)

- 1- 1-Sıklıkla dışı doğru (exophytic) büyüme gösterirler
- 2- 2-Genellikle sağ kolon ve cekumdan kaynaklanırlar
- 3- 3-Histolojik olarak sıklıkla lenfositik cevap ile birlikte olan kötü diferansiyel karsinom özelliği
- 4- 4-gösterirler
- 5- 4-Serum CEA (Carcinoembryonic antigen) seviyeleri daha düşük seyrederek.

6- 5-p53 geni mutasyonuna daha az rastlanır

7- 6-Daha iyi bir prognoza sahiptirler

g) Anormal Hücre Proliferasyonunun Kolon Karsinogenezindeki Rolü

Aktif olarak çoğalan hücreler karsinojenik uyarılara ve genetik değişimlere daha duyarlıdır. Normal kolonda DNA sentezi ve hücre bölünmesi kriplerin alt ve orta kısımlarında daha belirgindir ve kriplerin üst bölümlerine doğru gidildikçe hücreler farklılaşmalarını tamamlamış ve artık bölünmeyen olgun hücreler haline donusurlar. Bu çoğalma ve olgunlaşma sürecindeki bozukluklar kolon neoplazmalarının oluşumunda rol oynayan önemli basamaklardan biridir. Kolon kanserli ve FAP li hastalarda ve bunların yakın akrabalarında kolon mukozasındaki proliferatif aktivitenin ve farklılaşmanın arttığı, kolon

kanseri gelişme riski düşük olan toplumlarda ise proliferatif aktivitenin daha düşük olduğu gösterilmiştir. Değişik kimyasal karsinojenlerle tedavi edilen ve kolon mukozası sekonder safra asitleri gibi kanser gelişimine yol açtığı bilinen maddelere maruz bırakılan deney hayvanlarında mukozadaki proliferatif aktivitenin arttığı gösterilmiştir. Kolorektal kanser riskinin artmış olduğu ulseratif kolitte kolon epitel hücrelerinin yenilenmesi sırasında DNA sentezinin baskılanmasında bir yetersizlik olduğu bilinmektedir. FAP li ailelerin fertlerinde ve kimyasal uyarıcılarla kolon karsinogenezi oluşturulan farelerde kolon mukozasında hızlı hücre çoğalımının bir işareti olan ornithine decarboxylase (OD) enziminin arttığı gösterilmiştir. Bu enzimin yapımı yaşlanma ile artmakta ve kolonda adenom bulunan yaşlı hastalarda daha yüksek seviyelere ulaşmaktadır.(57,58)

h) Polipozisle Birlikte Olmayan Hereditör Kolorektal Kanser Sendromu

(Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer - HNPCC) (Lynch sendromu)

HNPCC otozomal dominant geçiş gösteren bir kalıtsal kolorektal kanser sendromudur ve tüm kolorektal kanserlerin yaklaşık olarak %5 ini (%1-8) oluşturur. Familial adenomatoz polipozis (FAP) ve diğer poliposis sendromlarının aksine bu sendromda kolonda polipozis bulunmaz. Kolorektal kanser oluşumu sporadik kolon kanseri vakalarından yaklaşık yirmi yıl daha erkendir. HNPCC de kanserin kaynaklandığı prekanseröz polip yassı adenom karakteri gösterebilir (flat adenoma).

HNPCC de gorulen kolon kanserleri sporadik kolon kanserlerine gore daha proksimalde yerlesim gosterirler (%35 e karsılık %72) ve senkronik ve/veya metakronik kanser gorulme olasılığı da daha fazladır (%5 e karsılık %20).Metakronik kolon kanseri olan HNPCC li hastalarda ilk operasyondan sonra ikinci malinitenin gelismesine kadar gecen ortalama sure 5 yıldır (1-13 yıl). HNPCC de hayatta kalım suresi sporadik distal kolon ve rektum kanserlerine gore daha uzundur (5 yıllık hayatta kalım oranı %53 a karsılık %35). HNPCC li bireyler over, mide, ince barsak, bobrek pelvisi ve ureter kanseri gibi diğer kanserlerin gelisimi yonunden de yuksek bir risk altındadır.

HNPCC li hastaların birinci derece akrabalarında kolon kanseri sıklılığının 7 kat, meme kanseri sıklılığının da 5 kat artmış olduğu gosterilmistir.(53,54) HNPCC genelde iki ana guruba ayrılarak incelenmektedir. Tip A HNPCC veya tip-1 Lynch sendromu olarak adlandırılan tipinde sadece kolon ve rektumda kanser olusmaktadır.

Kolorektal kanser yanında kadın genital sistemi, deri, mide, pankreas, ince barsak ve lösemi gibi diğer organ kanserlerinin de hastalığa eslik ettiği tip tip B HNPCC veya tip-2 Lynch sendromu olarak adlandırılmaktadır. Lynch 2 sendromundaki kolon kanserleri genelde musinoz karakterde ve kotu diferansiye karsinom ozelliği gosterirler ve lezyon çevresinde Chron hastalığındakine benzer lenfoid reaksiyon bulunur. Bazı yayınlarda Lynch-1 ve Lynch-2 sendromları dışında Muir-Torre sendromu (Lynch sendromu ve selim ve/veya habis olabilen deri lezyonlarının bir arada bulunması) ve Glioblastomla birlikte olan Turcot sendromunun değisik bir sekli de HNPCC in 3. ve 4. formu olarak bildirilmektedir. HNPCC patogenezinde sorumlu olan genetik defekt mikrosatellit kararsızlığı (Microsatellite instability-MSI) ve DNA onarım genlerindeki değisikliklerdir. (DNA mismatch repair genes-MMR). Mikrosatellitler genom boyunca dağılım gösteren nukleotidlerin yuksek polimorfizm gosteren bolgeleridir. HNPCC li hastaların tümörlerinde bu nukleotid bolgesinin uzunluğunun normal dokudakine gore oldukca değisken bir ozellik gosterdiği anlasılmıstır. MSI nin varlığı DNA sentezi sırasında hata olasılığını artırmaktadır (missmatch- yanlıs eslesme). MSI, hassas genlerde giderek artan sayıda mutasyonun olusumuna ve sonucta malign fenotipin ortaya cikmasına sebep olur. MSI, HNPCC de oldukca sık rastlanan bir bulgu olmakla birlikte benzer değisimler sporadik kolorektal kanserlerinin de %15 kadarında gorulebilmektedir. MSI saptanan

tumoru olan hastalar daha iyi bir prognoza sahiptir ve bu tumorler kemoterapiye daha iyi yanıt vermektedir. 1997 yılında Hollanda da yapılan bir uluslararası konsorsiyumda HNPCC de tanı ve yüksek risk kriterleri tanımlanmış ve Amsterdam kriterleri olarak adlandırılmıştır. Bethesda kriterleri ise genetik testlerin uygulanacağı yüksek risk grubundaki hastaların belirlenmesi amacıyla geliştirilmiştir.(54-57)

Tablo 2.2 : Sporadik ve genetik kolorektal kanserlerin özellikleri

	Sporadik kolon kanseri	Klasik FAP	Atenü FAP	APC I1307K	HPCC
Gen		APC	APC	APC	APC
Kolon kanserleri arasında görülme sıklığı	>%95	%1	?	?	%3-5
Adenom sayısı	1-5	>100	<100 (en az 20)	3-10	3-10
Polip lokalizasyonu	Sol kolon	Distal	Proksimal	Distal	Proksimal
Polip görülme yaşı (ort.)	>50	16	44	?	?
Kanser görülme yaşı (ort.)	>60	30	<50	?	45
Tarama testi	Kolonoskopi	Sigmoidoskopi	Kolonoskopi	Kolonoskopi	Kolonoskopi

HNPCC vakalarında MSI nin keşfedilmesinden sonra genomik kararsızlığın kolon kanseri patogeneziindeki önemi daha belirgin hale gelmiştir. Kopyalanma sırasında DNA yapısının değişmeden sürdürülmesinde rol oynayan genlerdeki değişiklikler (MMR) HNPCC li hastaların karakteristik bir bulgusudur. MMR genlerindeki mutasyonlar ve bu sistemin inaktivasyonu genomik kararsızlığa ve replikasyon hatalarının artmasına sebep olur.

Bu güne kadar hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH2, hMSH3 ve hMSH6 olmak üzere 6 MMR geni tanımlanmıştır. Bunlar içinde hMSH2 ve hMLH1 deki mutasyonlar MSI nin rol oynadığı kolon tumorlerinde en sık görülen mutasyonlardır. MLH1 ve MSH2 mutasyonları HNPCC vakalarının %90'ında görülürken sporadik kolorektal kanserlerin ancak %10-15 inde görülmektedir. Kolorektal kanserin geç yaşta ortaya çıkması ve kadın hastalarda endometrial kanserin sık görülmesi MSH6 mutasyonu ile birlikte olan HNPCC in karakteristik özellikleridir. MSH2 ve MLH1 mutasyonu bulunan bireylerde hayatları süresince kolorektal kanser oluşma riski %70-90 arasında değişmektedir.

HNPCC in molekuler genetiği konusundaki araştırmalar halen surmekle birlikte bu hastaların genetik olarak taranması ve tumor DNA sında yapılan analizlerle yuksek risk gurubundaki bireylerin ortaya cıkarılmasına yönelik cesitli genetik testleri iceren ticari kitler halen kullanılmaktadır. Genetik testler daha yoğun takip ve tedavi programlarına dahil edilecek yuksek riskli hastaların saptanmasına yardımcı olmaktadır. MSI saptanmasına yönelik testler, immunhistokimyasal boyama (IHC) ve DHPLC (Denaturing high performance liquid chromatography) gibi MLH1 ve MSH2 mutasyonlarının saptanmasına yönelik teknikler HNPCC li bireylerin taranmasında kullanılan yontemlerdir. Bu tekniklerin MLH1 ve MSH2 mutasyonlarının saptanmasındaki duyarlılığı %90 nın uzerinde olup ozgullukleri de %100 e yakındır.(55,56)

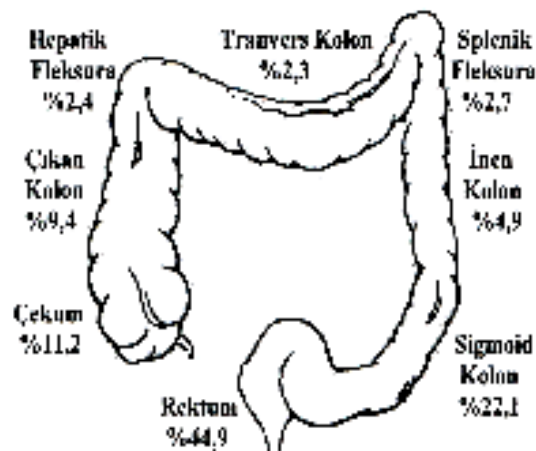
Yuksek risk gurubundaki HNPCC li bireylerin 25 yasından itibaren baslamak uzere her 2 yılda bir kolonoskopi ve mide, meme ve genitouriner sistem kanserlerine yönelik diğer tarama yontemleri (Gastroskopi, ultrasonografi, endometrial biyopsi ve CA-125 olcumu vb.) ile izlenmesi ve 30 yas sonrasında ise kolonoskopinin her yıl tekrarlanması gerekir. Ailede 25 yas oncesinde kolorektal kanser tanısı almıs birey varlığında tarama testlerinin bu bireyde kanserin gorulduğu yasin 5 yıl oncesinden baslatılması tavsiye edilmektedir. Menapoz sonrası donemdeki kadınlarda profilaktik histerektomi ve ooferektomi tavsiye edilebilir. Genc kadın hastalarda hayatlarının daha sonraki donemlerinde histerektomi ve ooferektomi gerekebileceği hatırlatılarak eğer istiyorlarsa erkenden cocuk sahibi olmaları tavsiye edilmelidir. HNPCC li bir hastada kolorektal kanser teshisinden sonra uygulanacak cerrahi tedavi subtotal kolektomidir. Cocuk sahibi olmus yuksek risk altındaki kadın hastalarda ise kolektomiye ilave olarak profilaktik histerektomi ve bilateral salpingooferektomi yapılabilir. Kolektomi sonrasında hastaların belirli aralıklarla takip edilmesi gerekir. Ameliyat oncesinde kolonoskopi yapılmıs bir hasta kolektomiden 1 yıl sonra ve bir patoloji saptanmadığı taktirde takibeden her 3 yılda bir fleksibl rektosigmoidoskopi yapılarak ve yılda bir kez dışkıda gizli kan aranarak izlenmelidir.(56-59)

2.5. Kolon Kanserinde Patolojik Bulgular

a) Makroskopik Görünüm

Kolorektal kanserler makroskopik olarak polipoid, ulseratif, infiltratif veya anuler (skiro) yapıda olabilirler. Çekum ve sağ kolon kanserleri daha çok polipoid formdadır ve sağ kolon geniş olduğundan semptom vermeden büyük hacimlere ulaşabilir. Sol kolon ve rektumdaki kanserler barsak duvarını cepecevre sararak (anuler form) barsak lümenini daraltma eğilimi gösterir. Bu görünüm radyolojik olarak ‘napkin ring’ (pecete halkası görünümü) olarak adlandırılır. Bu nedenle sol kolon tumorlerinde dıskılama alışkanlığındaki değişiklikler daha belirgin olabilir. Her iki formda da tumorde derin ulser oluşabilir. Bu özellikle büyük hacimdeki tumorlerde tumor dokusunun yeterince beslenememesi ve nekroze olması nedeniyle görülen bir durumdur. Kolon kanserleri nadiren yüzeyden fazla kabarık olmayan ve intramural yayılım gösteren formda (flat adenom veya tumor) olabilir. Bu tür daha çok inflamatuvar barsak hastalığı zemininden kaynaklanan kanserlerde ve HNPCC lerde görülür.

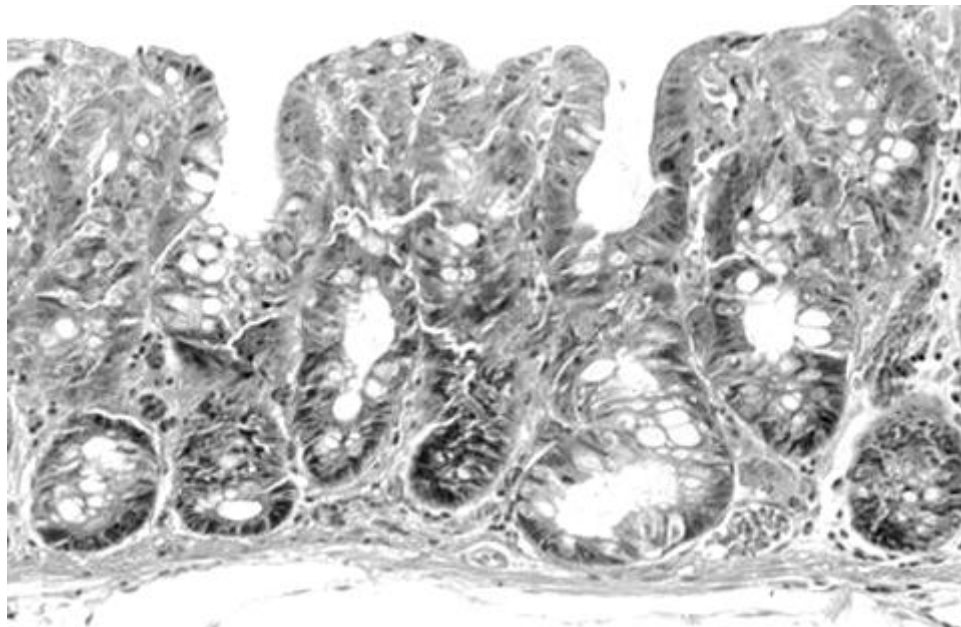
Kolorektal kanserlerin sadece %25 i rijit sigmoidoskopiyle görülebilecek seviyede olup %60 ında fleksibl sigmoidoskopiyle erişilebilecek seviyededir. Kolon tumorlerinin yaklaşık 1/3 i rektumda yerleşirken kalan 2/3 lik bölümü kolonun diğer kısımlarında ve özellikle sol kolonda yerleşim gösterir (Rektum %20-30, Sigmoid %25, inen kolon %5-10, transvers kolon %10-15, çıkan kolon-çekum %25) .



Şekil 2.9: Kolorektal kanserin kolonda yerleşim yerine göre dağılımı.

b) Mikroskopik Bulgular:

Kolon ve rektum karsinomları mukozadaki glanduler yapılardan kaynaklanan ve değişik derecelerde farklılaşma gösteren adenokarsinomlardır (>%95). Adenokarsinom dışı tumorler kolon tumorlerinin %5 inden daha az bir kısmını oluşturlar. Kolon adenokarsinomları çoğunlukla iyi veya orta derecede diferansiye ve değişik derecede musin salgılayan tumorlerdir. iyi diferansiye tumorlerde gland yapısı belirginken kotu diferansiye kanserlerde gland formasyonu daha az belirgindir ve nukleer oryantasyon kaybolmuştur. Musinoz veya kolloid kanserlerde tumor hucreleri musin golleri icinde bulunur. Signet-ring hucreli karsinomda hucre icinde bol miktarda bulunan musin vakuelleri nedeniyle hücre cekirdeği hucrenin bir tarafına itilmiş haldedir . Andiferansiye kanserlerde (kolloid ve signet-ring cell karsinomlar) gland yapısı ortadan kalkmıştır ve bu tumorler iyi diferansiye karsinomlara göre çok daha kotu bir prognoza sahiptir. Kotu diferansiye genellikle 45 yas altındaki bireylerde ve HNPCC olgularında gorulur. Bu tur morfolojik sınıflamalara rağmen gercekte bir çok karsinomda heterojen bir yapı olduğu gorulur. Hitopatolojik incelemede dikkat edilmesi gereken ve prognoz uzerinde etkisi olan diğer ozellikler venoz, lenfatik veya noral invazyon olup olmadığıdır.



Şekil 2.10: Kolon kanserinde histopatolojik görünüm

c) Kolon Kanserinde Klinik Bulgular:

Kolorektal kanserler yavaş büyüyen neoplazmlar olup özellikle cecum ve sağ kolondaki tumorlerin semptomatik hale gelmesi uzun süre almaktadır. Genellikle bu bölgedeki kanserlerin ilk bulgusu demir eksikliği anemisi şeklinde kendisini gösteren gizli kanamadır. Çabuk yorulma, halsizlik, çarpıntı, baş dönmesi ve anjina pectoris gibi anemiye bağlı belirtiler görülebilir. Hastalığın başlangıcında şikayetler belirsiz ve aralıklı olduğundan hasta ve hekim üzerinde durmayabilir ve kuratif tedavi için kıymetli olan erken dönem geçebilir. Hastaların bir kısmına demir eksikliği anemisinin nedeni araştırılırken tanı koyulur. Bazı hastalarda Htc ve Hb seviyelerinde belirgin düşme olmadan erken dönemde sadece serum ferritin düzeyinde azalma saptanabilir. Dışkıda gizli kan pozitif bulunur. Sağ kolon geniş olduğundan ve bu bölgedeki dışkı sıvı kıvamda olduğundan tıkanma ve buna ait bulgular çok seyrekdir. Cecum tumorleri ileocecal valf ve çevresini tuttuğunda karında gaz, siskinlik ve subileus / ileus bulguları (bulantı ve kusma) ortaya çıkabilir. Sol kolonda barsak lumeni daha dar, dışkı daha kıvamlı ve bu bölgedeki tumorler daha çok anuler formda olduğundan dışkılama alışkanlığında değişiklikler (kabızlık, karında siskinlik hissi vb.) ve subileus atakları sol kolon tumorlerinde daha çok görülür. Karın ağrısı ve rektal kanama da sol kolon tumorlerinde daha sık rastlanabilen bulgulardır. Ağrı yemek sonrasında ve mushil kullanıldığında şiddetlenebilir. Rektal kanama sigmoid kolon ve rektum tumorlerinde daha sık görülen bir bulgudur. Kanama genellikle az miktarda ve dışkı ile karışık veya dışkıya sürünmüş haldedir. Rektum kanserinde tenezmus, sık dışkılama ihtiyacı, dışkı capında azalma bulunabilir. Kolon kanserinin ileri evresinde halsizlik, kilo kaybı, istahsızlık ve ateş yanında peritona yayılım sonucunda malign asit ortaya çıkabilir. Karaciğer metastazları nedeniyle sağ üst kadranda ağrısı ve sarılık, akciğer metastazları nedeniyle de oksürük ve dispne bulunabilir.(58)

d) Tanı Ve Evreleme:

Dijital rektal muayene ile (parmakla yapılan muayene, rektal tuse) kalın barsağın anüse yakın 10cm lik son kısmında oluşan tumorler tesbit edilebilir. Kolon kanserlerinin sadece %10 luk bir kısmı parmakla ulaşılabilen bu bölgede yerleştiklerinden vakaların ancak küçük orandaki bir kısmı bu yöntemle anlaşılabilir

ve bu hastaların bir kısmında doktora başvurmalarını gerektirecek kanama veya dışkı kalınlığında incelme gibi baska belirtiler de bulunur. Bu yontem bir ic hastalıkları uzmanı veya cerrah tarafından muayene edilen 40 yas ve uzerindeki her hastaya uygulanmalıdır.

Kolon kanserinde seckin teshis yontemi endoskopi olmakla birlikte radyolojik yontemler de tanı ve evrelemede yardımcı olarak kullanılırlar. Fleksibl sigmoidoskopi kalın barsağın 60 cm lik son kısmının endoskoplara incelenmesi islemidir. Her 1000 sigmoidoskopide yaklasık olarak 7 kalınbarsak kanseri ve 60 uzerinde de buyuk polip (>2cm) saptanmaktadır.

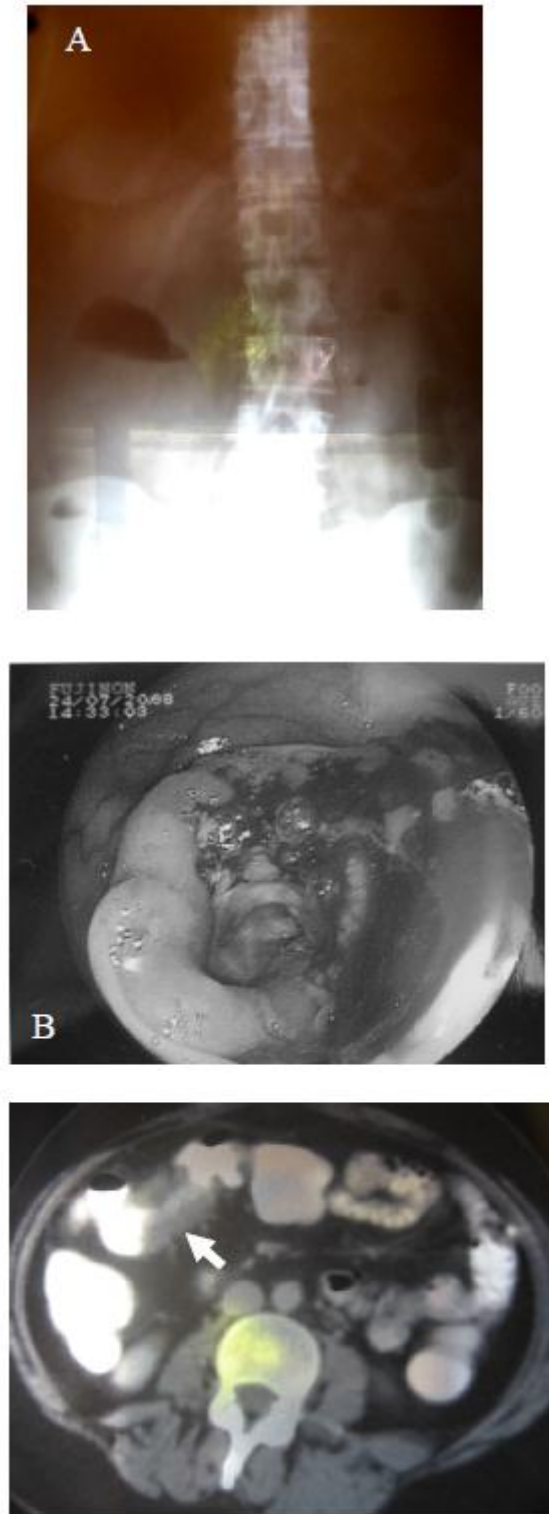
Sigmoidoskopide herhangi bir olusum saptananlarda tum kolonun incelenmesi gerekir. Sigmoidoskopide genellikle sadece bosaltıcı lavmanla barsak temizliği yapılması yeterli olmaktadır ve kolonoskopide olduğu gibi rahatsız edici bir islem olan ağız yoluyla müşhil kullanılması gerekmez. Kolonoskopiye gore daha ucuz bir yontemdir ve duzenli aralıklarla uygulandığında kalınbarsak kanserinden olumleri %60-80 oranında azalttığı gosterilmistir. Sigmoidoskopinin kalın barsağın daha ust kısımlarındaki kanserlerin gosterilmesinde yetersiz olmasından dolayı duzenli olarak dışkıda gizli kan aranmasıyla birlikte uygulandığında bir izleme yontemi olarak tavsiye edilmektedir.

Kolonoskopi kalınbarsak kanseri taramalarında ve teshiste kullanılabilecek en etkin yontemdir. Kolonoskopi tum kalın barsakların ve ince barsağın son 15-20 cm lik kısmının incelenmesine ve gerektiğinde ornek alınmasına veya gorulen poliplerin çıkarılmasına (polipektomi) imkân sağlar. Kalınbarsak kanseri taramasında kolonoskopi ile tum kalın barsağın 55-65 yas civarında bir kez incelenmesi ve (polipten kanser olusumu icin gecen surenin uzunluğu goz onunde bulundurularak) 8-10 yılda bir tekrarlanması onerilmektedir. Kolonoskopi ve gerektiğinde polipektomi yapılmasıyla kalınbarsak kanseri gorulme sıklığının %75 ila %90'a varan bir oranda azaltılabileceği gosterilmistir. Nisbeten pahalı olması, 1 gun kadar surebilen bir barsak temizliğini gerektirmesi, islem sırasında ağrı kesici ve uyutucu ilacların kullanılması baslıca dezavantajlarıdır. Kolonoskopide 5mm den kucuk poliplerin %20'si, 5-10mm capındaki %15'i ve 10mm den buyuk poliplerin de %10 kadarı gozden kacabilir ki tecrubesiz ellerde bu oranlar daha da yuksektir. Bu

nedenle kolonoskopinin mutlaka bu iste uzmanlaşmış ve gastroenterolog olan hekimler tarafından yapılması gerekir. Ülkemizde bu yöntemin gastroenterologlar tarafından yapılmasını zorunlu kılan bir yasal düzenleme olmadığından kolonoskopi hemen her sağlık kuruluşunda bu konuda uzmanlaşmamış ve yeterli tecrübesi olmayan hekimlerce yapılabilmekte ve bu durum sıklıkla hastalığın gözden kaçması veya yanlış teşhis konulması gibi istenmeyen sonuçlara yol açabilmektedir.

Ozel bir teknikle çekilen kalın barsak grafisi'nin (Çift kontrastlı kolon grafisi) kalınbarsak kanseri ve poliplerinin saptanmasındaki duyarlılığı ortalama %85 civarındadır ki bu kalınbarsak kanserlerinin %15 kadarının bu yöntemde gözden kaçabileceği anlamına gelmektedir. Yine bu yöntemde 1cm ve bazen daha büyük poliplerin yarıya yakını gözden kaçabilmektedir. Dolayısıyla bu yöntem ancak iyi bir merkezde ve tecrübeli radyologlar tarafından titizlikle yapıldığında kolonoskopiye alternatif bir yöntem olarak kullanılabilir.

Bilgisayarlı tomografi aracılığı ile yapılan kalınbarsak görüntülemesi (BT kolonoskopi veya virtual colonoscopy) hastalar tarafından iyi tahammül edilen, işlem sırasında ağrı kesici veya uyutucu ilaç kullanılmasını gerektirmeyen, 10-15 dakikada tamamlanabilen bir yöntemdir. Bu yöntemde de kolonoskopide olduğu gibi işlem öncesinde ağız yoluyla barsak temizleyici ilaçların kullanılması ve işlem sırasında barsak içine hava verilmesi gerekir. Bu yöntemin kolon kanseri teşhisindeki duyarlılığının %85 civarında olduğu bildirilmekteyse de doğru sonuç alınması için uzmanlaşmış tecrübeli elemanlar tarafından yapılması gerekir. Küçük polip ve tümörler bu yöntemde de gözden kaçabilirler. BT, MR ve PET (Pozitron emisyon tomografisi) kolon kanserinin teşhisinde ilk başvurulacak teşhis yöntemleri olmayıp hastalığın evrenmesinde ve yakın ve uzak metastaz varlığının gösterilmesinde kullanılırlar.



Şekil 2.11: (A) Hepatik fleksurada yerleşimli kolon Tumorune bağlı sağ kolonda hava-sıvı seviyesi, (B) tumorun endoskopide ve (C) BT de görünümü.

e) Tumor Yayılımı Ve Evreleme (Staging)

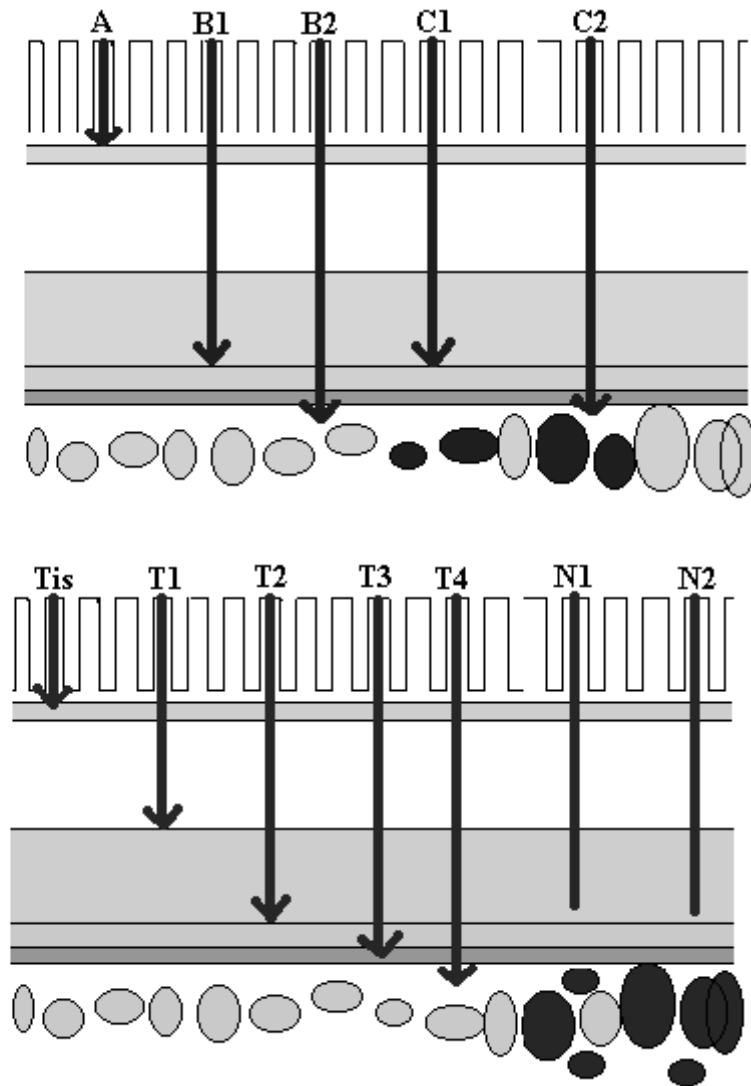
Kolon kanserleri genellikle intramukozal epitelyal lezyonlar olarak baslarlar (intramukozal karsinom) ve tumorun gelismesi ile submukozaya ulasarak invaziv kanser haline gelirler. Bu asamadan sonra lokal yayılım yanında lenfatik ve hematojen yayılım da ortaya cikabilir. Lokal yayılımda tumorun barsak katları boyunca yayılarak serozaya doğru ilerlemesi sozkonusudur. Serozaya ulasan tumor komsu organları tutabilir. Komsu organ yayılımı, serozası olmadığından ozellikle rektum karsinomlarında daha cok gorulur. Lokal yayılım perinoral ve vaskuler invazyon sayesinde primer odağın 8-10cm uzağına kadar ilerleyebilir.

Kolon kanseri perikolik, intermediate ve ana lenf duğumleri aracılığıyla lenfatik yayılım gosterir. Kotu difaransiye tumorlerde lenfatik yayılım daha sık gorulur. Hematojen yayılım en sık portal ven aracılığı ile karaciğede gorulur. Karaciğerdeki metastatik tumorlerin %80 e yakınında primer odak bir kolorektal tumordur. Karaciğer ve akciğer metastazı olmadan diğer organlara hematojen yayılım nadir olarak gorulur. Proksimal rektum kanseleri superior hemoroidal venler aracılığıyla karaciğere hematojen metastaz yaparken distal rektum kanserlerinde portokaval anastomozlar ve inferior vena kava aracılığı ile akciğerlere ve diğer organlara erken hematojen yayılım gorulebilir. Kolon kanserinde bir diğer yayılım yolu da implantasyondur. Bu yolla barsak icinde ve periton bosluğunda metastazlar meydana gelebilir. Cerrahi girisim sırasında da batın icine veya karın duvarına metastaz olusabilir. Kolon kanserinde yayılım prognoz acısından son derece onemli olduğundan değişik evreleme yontemleri kullanılmaktadır. Bunlar icinde Dukes tarafından olusturulan evreleme sistemi ve TNM sistemi (T:Tumor invazyonu, N:Lenf nodu tutulumu, M:Metastaz) en sık kullanılan sistemlerdir. TNM sistemi asğıdaki sekilde değerlendirilir .

Tis: insitu karsinom	N0: Lenf nodu tutulumu yok
T1: Submukoza invazyonu	N1: 1-3 lenf nodu tutulumu
T2: Muskularis propriaya invazyon	N2: >4 lenf nodu tutulumu
T3: Seroza invazyonu	M0: Uzak metastaz yok
T4: Komsu organ invazyonu	M1: Uzak metastaz var

Tablo 2.3: Kolorektal kanserde evreleme

Evre	TNM	Dukes sınıflaması	Tümör invazyon derecesi	5 yıl hayatta kalım
0	T0, N0, M0		Gözle görülür tümör yok	
I	T1, N0, M0	A	Tümör mürskularis mukoza ve submukozaaya sınırlı	% 97
I	T2, N0, M0			% 90
II	T3, N0, M0	B1	Tümör mürskularis propriaya sınırlı	% 78
II	T4, N0, M0	B2		% 63
III	T1-4, N1, M0	C1	Serozaya ulaşmış, komşu organ tutulumu olabilir	% 56-65
III	T1-4, N2, M0	C2		% 26-37
IV	T1-4, N1-2, M1	D	Uzak metastaz var	%1



şekil 2.12: Kolon kanserinde Asler Coller /Dukes (ust) ve TNM (alt)

Sınıflamalarının sematik görünümü(52,53,59)

2.6 Tedavi:

a) Cerrahi Tedavi:

Kolon kanserinde primer tedavi yontemi cerrahidir. Tarama ve tanı yontemleri sayesinde kolon kanserlerinin yarıdan fazlasına (%65) kuratif cerrahi girisim uygulanabilmektedir. Lokal yayılım nedeniyle hastaların %10 unda tumor çıkarılamamakta ve vakaların %20 sinde de teshis sırasında uzak metastaz saptanmaktadır. Hastaların kucuk bir bolumunde ileri derecede yaslı ve hasta olduklarından dolayı cerrahi tedavi uygulanamaz. Kolon kanserli her olgu gastroenterolog, radyolog, onkolog ve bu konuda tecrubeli cerrahın katılımıyla olusturulacak bir multidispliner yaklaşımla ayrı olarak değerlendirilmelidir. Cerrahi tedaviye karar verilmesinde hastalığın doğru sekilde evrenmesi onemli rol oynar. Bu amacla ultrasonografi, CT, MRI ve PET evrelemede sıklıkla basvurulan görüntuleme yontemleridir.

Yapılacak rezeksiyonun sınırları tumorun evresi, yeri ve tumorun bulunduğu kolon segmentinin vaskuler ve lenfatik drenajına gore belirlenir. (52).

Tumorun alt ve ust sınırlarından en az 5cm uzunluğunda bir barsak segmentinde tumorle birlikte çıkarılması gerekir. Kolonun vaskuler yapısı nedeniyle segmentel rezeksiyon her zaman mumkun olmayabilir. Barsakta obstruksiyona yol acmıs tumorlerde rezeksiyon sonrası mortalite yuksektir. Bu vakalarda cerrahi tedavi oncesinde kolonoskopi ile yerlestirilecek bir stent kolonda yeterli bir dekompresyon sağlayarak mortaliteyi azaltabilir. Rektum tumorlerinde lokal nuks sık gorulur (%25). Total mezorektal eksizyonla nuks oranı %10 a kadar azalabilmektedir. Ust ve orta rektum tumorlerinde low anterior rezeksiyon uygulanır. Anal kanala 2cm den daha yakın ve genis rektum tumorlerinde ve pelvik yayılım varlığında kolostomi ile birlikte abdominopreineal rezeksiyon yapılır.

Kolorektal kanser olgularının cerrahi tedavisi sırasında hastaların %10-25 inde karaciğer metastazı bulunur. Görüntuleme yontemleri ile karaciğerdeki metastazı rezeksiyona uygun olduğu anlasılan vakalarda metastazektomi uygulanır. Karaciğerdeki metastaz sayısı 4 den fazla olmayan ve karaciğerin sadece bir lobunda metastaz bulunan vakalar metastazektomi icin uygun vakalardır. Hastaların %70-80 inde rezeksiyondan sonraki 2. yilda karaciğerdeki yeni metastazlar ortaya çıkar.

Karaciğerde yeni metastazlar ortaya çıkan vakalarda ikinci kez metastezektomi yapılabilir. Daha önceden karaciğer parenkim hastalığı olan hastalar hepatic rezerv yetersiz olabileceği için hepatic rezeksiyon için uygun değildir. Kalın barsak kanserinde teshis ve uygun tedavi sonrasında 5 yıl yasama oranı hastalığın evresine bağlı olarak ortalama %50 civarındadır. Teshis anında uzak metastazı olmayan ve kuratif amaçla cerrahi tedavi uygulanan hastalarda bu oran %80 e kadar yükselmektedir. Bu oran sindirim sisteminden kaynaklanan diğer tümörlere göre belirgin ölçüde daha yüksektir. (52,59)

b) Kolorektal Kanserde Kemoterapi Ve Radyoterapi

Kolon kanserinde kemoterapi, neoadjuvan kemoterapi, adjuvan kemoterapi ve ileri evre hastalık için yapılan kemoterapi olmak üzere üç grupta incelenebilir. Neoadjuvan kemoterapi özellikle rektum tümörlerinde ve genellikle radyoterapi ile kombine edilerek uygulanan ve cerrahi tedavi öncesinde tümör hacmini küçültmeye yönelik bir tedavidir. Daha sıklıkla uygulanan adjuvan kemoterapi ise kuratif amaçla cerrahi tedavi uygulanan ve özellikle lenf nodu tutulumu bulunan hastalarda vücuttaki mikrometastazların erdike edilmesi amacıyla yapılır. Bu amaçla kullanılan kemoterapötik ajanlar 5-fluorouracil (5-FU) ve levamisole kombinasyonu olup yapılan adjuvan kemoterapinin Dukes C (Evre III) evresindeki hastalarda kanser rekürrensini %40, mortaliteyi de %33 oranında azaltabildiği gösterilmiştir. Dukes B (Evre II) evresindeki hastalarda tümör kötü diferansiye olmadıkça, lokal lenfatik, vasküler ve perinöral invazyon ve komşu dokulara invazyon bulunmadıkça adjuvan kemoterapi önerilmez.(57-59)

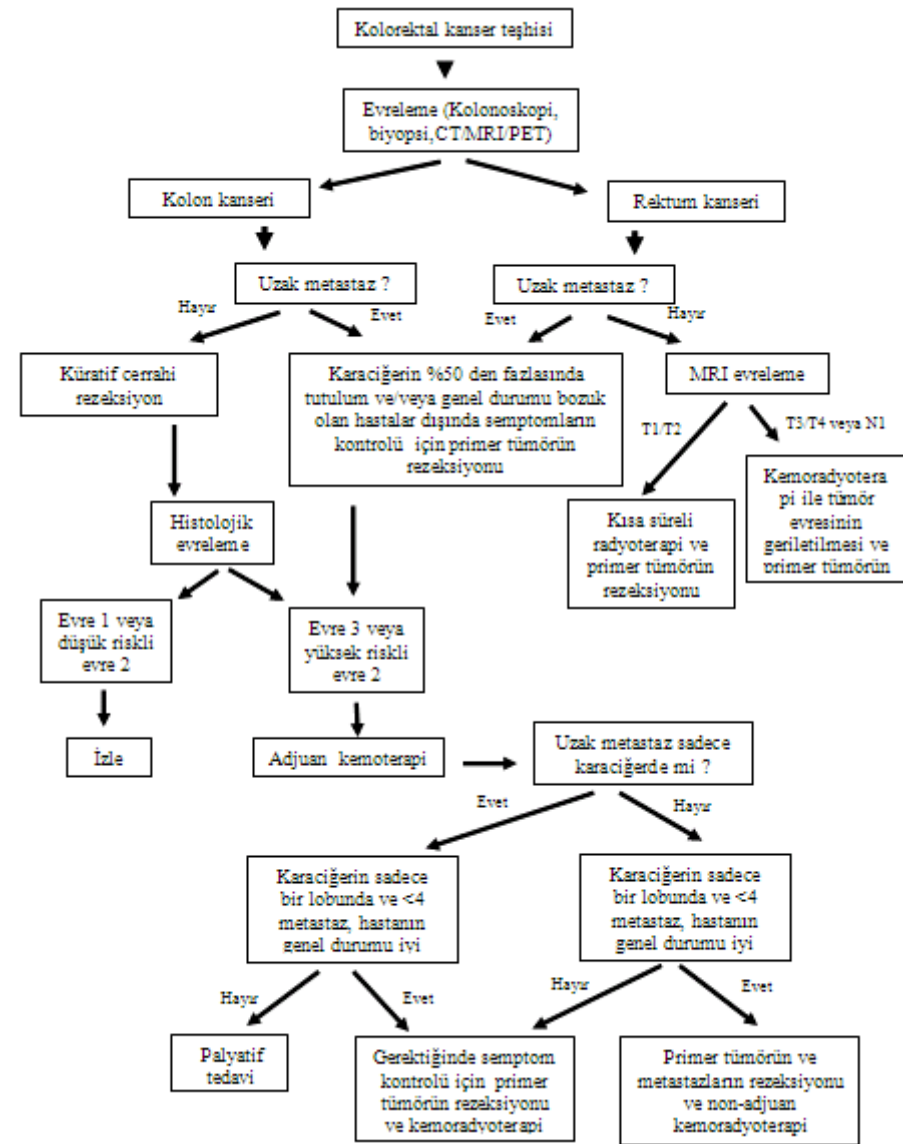
Uzak metastazları bulunan ileri evredeki kolon kanseri vakalarında (advanced colorectal cancer) hayatta kalım süresini uzatabilmek amacıyla değişik kemoterapötik ajanlar kullanılır. Bu amaçla 5-FU ve 5-FU + Leucovorin (tetrahydrofolate) ve bir üçüncü jenerasyon platin bileşiği olan oxaplatin kombinasyonları kullanılabilir gibi, son yıllarda kullanıma giren topoizomera inhibitörleri (irinotecan, camptotecin) umut verici görünmektedir. Diyare, notropeni, alopesi gibi yan etkileri nedeniyle hastaların bir kısmında kullanımları güç olmakla birlikte özellikle 5-FU ile combine tedavide iyi sonuçlar alınmaktadır. İleri evredeki kolorektal kanser tedavisinde kullanılmaya başlanan yeni bir ilaç grubu da vasküler

endothelial growth factor (VEGF) ve epidermal growth factor (EGRF) reseptorlerine karşı geliştirilmiş olan monoklonal antikordur [Bevacizumab (Avastin) ve cetuximab]. Bu ilaçlarla yapılan tedavilerin uzun süreli etkilerinin anlaşılmasına yönelik çalışmalar devam etmektedir. Hipertansiyon, kanama, tromboz oluşumu ve proteinuri başlıca yan etkileridir.

Metastektomi yapılamayan karaciğer metastazları radyofrekans enerji uygulaması veya hepatik arter kateterizasyonu aracılığı ile yapılan kemoterapi ile küçültülebilirler ancak bu tedavilerin hayatta kalım süresini anlamlı olarak artırmadığı gösterilmiştir.

Kolon kanserinde radyoterapi özellikle rektum tumorlerinin tedavisinde tercih edilir. Rektum tumorlerinde adjuvan kemoterapi ve postoperatif radyoterapinin kombine edilmesi evre II ve III tumorlerde kansere bağlı olumu %35 oranında azaltabilmektedir.

Tablo 2.4: Kolon kanserinde tedavi algoritmi(58)



c) Kolon Kanseri Tedavisi Sonrasında Takip:

Kolon polipi olan vakaların belirli aralıklarla kolonoskopi yapılarak takip edilmeleri gerekir. Yapılan çalışmalarda polipektomi uygulanan hastaların %30-40'ında 3 yıl içinde yeni polip oluşabildiği gösterilmiştir. Kolonda çok sayıda (>3) ve 1cm den büyük polipi olanlarda, viloz yapıda ve ileri derecede displazik polipi olanlarda bu olasılık daha yüksektir. Bu nedenle polipektomiden 3 yıl sonra

kolonoskopinin tekrarlanması, polip görülmediği takdirde kolonoskopinin 5 yıl aralarla tekrar edilerek izlemenin sürdürülmesi tavsiye edilir.

Kolorektal kanser nedeniyle rezeksiyon uygulanmış olan hastaların da metakronik kanser olasılığı nedeniyle (%8) belirli aralıklarla kolonoskopi yapılarak izlenmesi gerekir. Cerrahi tedavi öncesinde obstruksiyon nedeniyle tam kolonoskopi yapılamamış olan vakalarda ameliyattan sonraki 6 ay içinde mutlaka kolonoskopi yapılmalıdır. Cerrahi tedavi öncesinde kolonoskopi yapılmış olan hastalarda rezeksiyondan sonraki 1. ve 3. yıllarda kolonoskopi tekrarlanır. Herhangi bir soruna rastlanmayan hastaların daha sonra 3-5 yıl aralarla kolonoskopi yapılarak izlenmesi yeterlidir. İzleme sırasında serum tumor marker düzeyleri (CEA ve CA19-9) ilk 2 yılda 3 ay, daha sonra ise 6 ay ara ile olculmeli ve yükselme saptanan vakalarda kolonoskopi ve/veya gerektiğinde laparotomi (second look) yapılmalıdır. Endoskopi ve marker ölçümü dışında uzak metastaz olusunun kontrolüne yönelik ultrasonografi ve BT gibi görüntüleme yöntemlerinin 6 ayda bir tekrarlanması tavsiye edilir.

Secilmiş vakalarda bu incelemelerin sıklığı azaltılabilir (2 yılda bir kez gibi). Kolon kanserinde cerrahi tedavi sonrasında anastomoz hattında nuks daha çok rektum tumorlerinde görülürse genelde nadirdir (%3). Proksimal kolon kanserlerinde nukslerin çoğu barsak dışı bölgelerde görüldüğünden kolonoskopi ile anlaşılması mümkün değildir. Nuks genellikle ilk 2. yılda ortaya çıkar. Karaciğer (%33), akciğerler (%20) ve lokal nuks (%20) hastalığın en sık olarak tekrar ortaya çıkabildiği bölgelerdir. Karaciğer metastazları ortaya çıkan vakaların ancak . inde metastazektomi yapılabilmektedir. Bu hastalarda 5 yıllık survi %25 civarındadır. (58,59)

d) Kolon Kanserinden Korunmada Tarama Yöntemleri

Son 20 yıldan beri teşhis ve tedavide kullanılan yöntemlerin geliştirilmesi ve tarama programlarının uygulanmaya başlanması kalınbarsak kanserinin erken evrede teşhis edilmesini ve bu hastalığa bağlı olum oranlarının azalmasını sağlamıştır. Kolon kanserlerinin %80 den fazlasının kolon poliplerinden geliştiği bilindiğinden tarama testleriyle kolonda polip veya erken evrede kanser saptanan hastaların uygun tedavi ile normal omurlerini sürdürmeleri mümkün olduğundan kolon kanseri artık

onlenebilir kanserler arasında sayılmaktadır. Kalınbarsak kanseri olan hastaların küçük bir kısmında (%5-6) seyrek görülen familial kolon kanseri varlığı söz konusudur ki bu gruptaki hastaların hayatlarının erken dönemlerinden itibaren kalınbarsak kanseri gelişimi yönünden özel bir dikkatle izlenmeleri gerekir (Hereditör adenomatoz polipozis, hereditör nonpolipozis kolorektal kanser vb.). Kolon kanseri gelişme riskinin yüksek olduğu bilinen diğer bir hastalık grubu olan inflamatuvar barsak hastalıklarına sahip olan hastaların (ulseratif kolit ve Crohn hastalığı) belirli aralıklarla endoskopi ve biyopsi ile takip edilmesi tavsiye edilir. Özellikle hastalığı 20 yıldan beri var ulseratif kolit olgularında kanser gelişme riski artmakta (%10) , 30 yıldan sonra bu hastaların yaklaşık %20 sinde kalınbarsak kanseri oluşmaktadır.

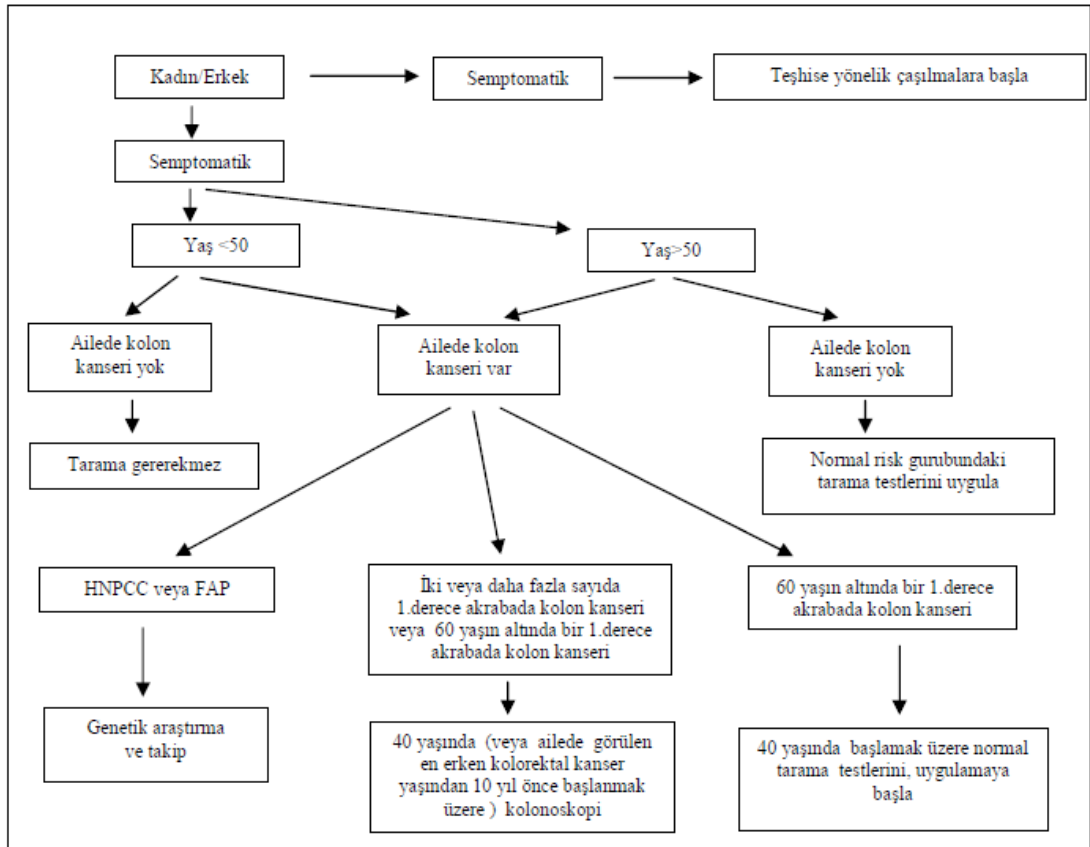
Bu nedenle 8 yılı aşkın süreden beri hastalığı olan ulseratif kolitli vakalarının yılda bir kez kolonoskopi yapılarak takip edilmeleri gerekir. Daha önce kalınbarsak polipi veya kanseri saptanmış olan hastalar, rahim veya yumurtalık kanseri nedeniyle tedavi görmüş olan kadın hastalar kalınbarsak kanseri gelişimi bakımından artmış bir riske sahiptirler.

Kolorektal kanser taramasında tavsiye edilen yaklaşım tabloda görülmektedir.(58)

Kalınbarsak kanseri tarama testlerinin yapılmasına hangi yaşta başlanması veya sonlandırılması konusunda kesin bir görüş birliği olmamakla birlikte bu kanserin görülmesi bakımından özel bir risk grubunda olmayan insanlarda 45 yaşından sonra yılda en az bir kez dışkıda gizli kan aranması, 50 yaşından sonra da endoskopik veya radyolojik inceleme yöntemlerinden biriyle periyodik olarak takip edilmeleri uygun bir yaklaşımdır. Kalınbarsak kanseri çoğunlukla ileri yaş grubunda görülen bir hastalık olduğundan ortalama riske sahip insanlarda endoskopik ve radyolojik yöntemlerin uygulanmasına genellikle 50 yaşından itibaren başlanması tavsiye edilir. Birinci derece akrabasında 60 yaş öncesinde kalınbarsak kanseri tespit edilmiş olanlarda tarama testlerinin, akrabasında kanser tespit edilen yaş seviyesinden en az 10 yıl öncesinden yapılmaya başlanması gerekir. Kalın barsak kanseri oluşma riski yüksek olan hastalıklara (ailevi polipozis sendromları, HNPCC vb.) sahip ailelere

mensup kisilerde tarama testlerine hayatın daha erken doneminde, tercihan 30 yasinda, baslanmalıdır.(58)

Tablo 2.5: AJCC (American joint committee of cancer- Amerikan kanser cemiyeti) kalın barsak kanseri gelisimi bakımından ortalama riske sahip insanlarda tarama testlerinin yapılmasına 50 yasında baslanmasını tavsiye etmektedir. Bu amacla onerilen izleme yontemlerinden kisiye uygun olan biri secilebilir (58).



Tarama testlerinin hangi sıklıkta yapılacağı uygulanan teste göre değisir. Yılda iki kez dışkıda gizli kan aranması yılda bir kez bakılmasına göre kalınbarsak kanserinden ölüm riskini belirgin olcude daha fazla azaltmaktadır. Kolonoskopinin 10 yıllık ara ile yapılması tavsiye edilir. Kolonoskopi yapılamayan vakalarda çift kontrastlı kolon grafisi veya sanal kolonoskopi (CT kolografi, virtual colonoscopy) kullanılabilir. Düzenli olarak 10 yılda bir kolonoskopi yapılmasıyla kolon kansere bağlı olumlerin %75 ila %90 oranında önlenebileceği anlaşılmıştır. Bir kez kolonoskopi yapıldıktan sonra yılda bir veya iki kez dışkıda gizli kan aranmasını ve 5

yılda bir fleksibl sigmoidoskopi yapılmasını tavsiye eden merkezler de bulunmaktadır.

Dışkıda gizli kan aranması (DGK) barsakta bulunan tumordan kaynaklanan gözle görülemeyecek miktardaki kanamanın ve dolayısıyla tumorun tesbit edilmesi amacıyla uygulanır. DGK aranması amacıyla değişik testler kullanılmakla birlikte bu testlerin kalın barsaktan kaynaklanan kanamaların saptanmasındaki duyarlılıkları birbirine yakındır. Daha önceleri kullanılan testlerde (Guaiac, Benzidin vb.) testten bir hafta önce diyet uygulanması gerekirken günümüzde kullanılan insan hemoglobinine duyarlı daha spesifik ve hassas immunhistokimyasal yöntemlerde test öncesinde diyet uygulanmasına gerek yoktur ve yanlış pozitiflik olasılığı çok düşüktür. Bu yöntemlerle dışkıda 0.5-1ml ye kadar olan kanamalar fark edilebilmektedir. DGK pozitif bulunan vakaların % 5-15'inde kolon kanseri, %20-40'ında da 2cm den büyük polip saptanmaktadır. 1cm den küçük kolon polipleri genellikle kanamadıkları için bu captaki poliplerin saptanmasında testin duyarlılığı düşüktür. DGK testinin üst üste 3 kez yapılan dışkılamadan alınan alınan uc örnekte bakılarak tekrarlanması tavsiye edilmelidir.

Yılda bir veya iki kez DGK bakılması ve pozitif bulunan vakalarda kolonoskopi yapılmasının kalınbarsak kanserinden ölümleri sırasıyla %20 ve %35 oranında azalttığı gösterilmiştir. Peryodik olarak yılda iki kez DGK aranması ve 5 yılda bir fleksibl sigmoidoskopi yapılmasıyla bu oran %60 a kadar yükseltilmektedir.

Tarama testlerinin ne zaman sonlandırılması gerektiği konusu tartışmalı olmakla birlikte 80 yas üzerindeki, özellikle yaşam beklentisini azaltan ilave hastalıkları olan kişilerde tarama testlerinin sonlandırılması uygun bir yaklaşım gibi görünmektedir.(58,59)

2.7. Apoptoz:

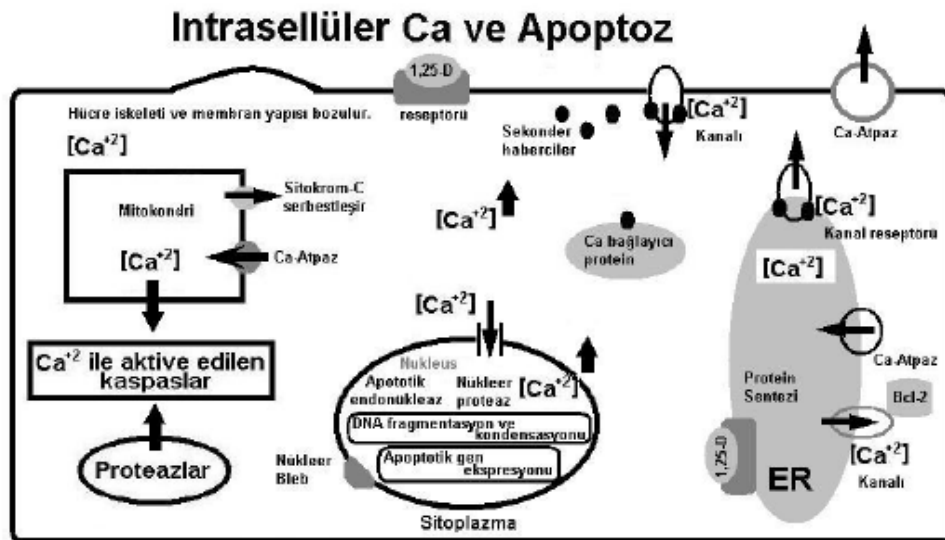
Apoptoz terimi ilk olarak 1972 de J.F.K.Kerr tarafından(60) nekrozdan (61) farklı olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şekli için tanımlanmıştır ve fizyolojik hücre ölümünü ifade eder. Eski bir yunan terimi olan apoptoz, kelime anlamı olarak yaprakların ağaçtan, petallerin çiçekten doğal olarak düşmesi anlamına gelmektedir. Bugün de bu terimin kullanımı uygundur ve fizyolojik nedenlerden kaynaklanan

hücre ölümünü anlatır. Teorik olarak apoptoz, çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı olarak tanımlanabilir. Böylece hormonal olarak aktif çeşitli maddeler, iyonize radyasyon ve kemoterapiyi içeren travmatik ajanlar vasıtasıyla gerçekleşen hücre sel lezyonların ya da genetik faktörlerle aktive edilen hücre sel intihar programının apoptoza neden olduğu söylenebilir.(61)Fizyolojik bir işlem olarak apoptoz, normal gelişim sırasında ve olgun organizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribi esnasında spesifik hücrelerin kaybindan sorumludur. Apoptotik hücre sayısı kişinin ya da organizmanın sağlıklı ya da hasta oluşunu belirlediğinden, apoptozun fonksiyonel mekanizmaları hücrede denge unsurudur.(62) Bu da demektir ki; apoptoz oranının azalması ile hücre sayısı artar aksine eğer apoptoz oranı artarsa hücre sayısı azalır ve istenmeyen doku tahribatı meydana gelir. Günümüzde insanı da içeren memeliler grubunda üretkenliğin dengelenmesinde apoptozun önemli rol oynadığına dair sağlam kanıtlar vardır.(63) Ayrıca birçok hastalığın genetiğinde de bu değişimler söz konusudur.(64) Apoptoz tek hücreli organizmalarda hücre ölümünün tek yoludur .(65) Çok hücreli organizmalarda ise genetik oluşumlu hücre hasarının bloke edilmesi ya da hücrenin tamamen yok edilmesi apoptoz vasıtasıyla gerçekleşir. Böylece hasarın yayılması ve tümör oluşumu gibi zararlı olasılıklar engellenmiş olur .(66) Apoptoz olayının oluşmasından daha önce hücre sel replikasyon işlemi durur (DNA onarımı) eğer bu esnada DNA tamiri gerçekleşemezse apoptoz ile sonuçlanan olaylar serisi başlar. Bu sırada apoptozun başlayıp başlamaması hasarın boyutuna, hücrenin tipine ve hücrenin üretkenlik potansiyeli olan tümör geliştirme riskine bağlıdır. Apoptoz sadece intra-uterin gelişme esnasındaki organogenez ve sinaptogenez olaylarında değil, aynı zamanda farklılaşmış dokuların olgunlaşmasında da esastır. Çünkü apoptoz vücudun bütünündeki hücre sayısının sabit tutulmasını ve immün sistem faaliyetlerinin gerçekleşmesini sağlar (66). Bu son olaya örnek olarak, immün bir reaksiyonun sonucu dikkate alınacak olursa; bu noktada aktive edilmiş lenfositlerin direkt apoptoz vasıtasıyla kendi antijenlerini elimine ettikleri görülür .(67)

a) Apoptozun Aşamaları

Yapılan in-vitro çalışmalar apoptozun ani gerçekleşen hızlı bir olay olduğunu gösterir. Apoptotik uyarıdan sonra hücre hızla ortamından uzaklaşır; yuvarlaklaşırken içeriği bir araya toplanır ve sitoplazması büzülür. Bu büzülme kabarma gelişimi esnasında şiddetle gelişen aktivitelere yansır. Olayın dinamiği sitoplazmanın kaynamasına benzetilebilir. Protoplazmanın zardan uzaklaşmasından, apoptotik cisimin oluşumuna kadar bütün apoptotik olaylar zinciri birkaç dakika sürer. Bununla birlikte apoptotik hücrelerin fagositozu için daha uzun bir zaman gerekir. Hatta bu işlem 12-18 saat sürebilir.(73,74)

Apoptozun gerçekleşmesi sırasında oluşan DNA çözülmesi, apoptozun mekanizma ve seviyeleriyle ilgili çalışmalarda önemlidir.(75-77) Bu olaydan apoptozu belirleme yöntemlerinde de bahsedeceğiz. DNA çözülmesi olayı kromatin yığılmasına dayalı apoptoz sırasında çarpıcı bir şekilde ortaya çıkar.(76) Apoptoz işlemi aktive edildikten 1 saat ya da daha uzun bir süre sonra DNA da tek iplikte bir çentikle başlayan çok karakteristik ve geri dönüşsüz bir parçalanma görülür. Böylece bu çözülmenin apoptozda bir anahtar olduğu düşünülür. DNA yarıklanması, DNA yı parçalayan enzim olan endonükleaz aktivitesini artırdığından önemli role sahiptir .(63) Bu enzim aktivasyonu muhtemelen Ca/Mg oranının 1 ya da daha fazla oluşuna bağlı olabilir. (63,76,78)



Şekil 2.13 : Ca un apoptozis üzerine etkisi

Ama yinede DNA çözülmesi apoptoz için şart değildir. Sağlıklı bir hücrede basit hücresel ve moleküler bir olay herhangi bir anda apoptoza neden olabilir. Bu durum hücrelerin zaten sahip oldukları intihar programını gerçekleştirip gerçekleştirmeyeceklerini belirleyen inhibitör bir molekül taşımaları gerektiğini gösterir.

b) Apoptozun Genetiği

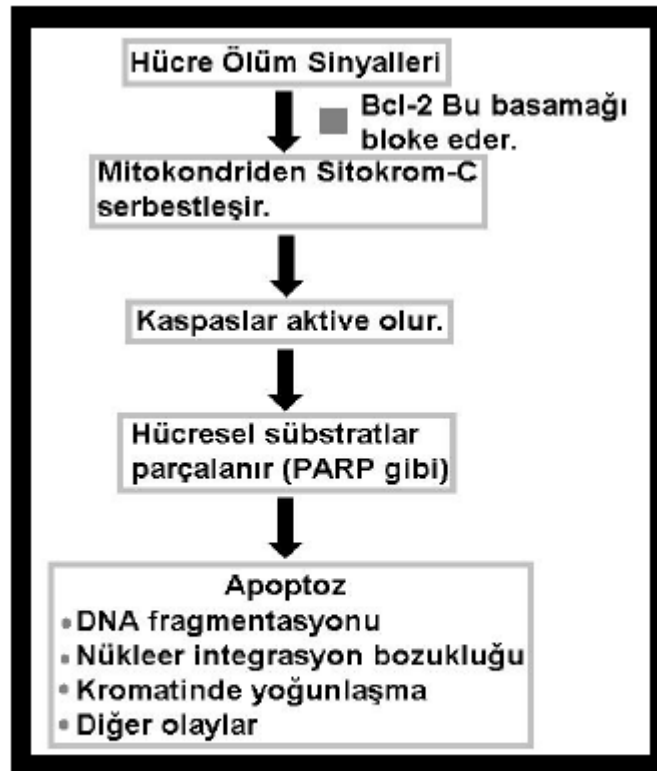
Son yıllarda apoptozun genetiği çok ilgi çekmiştir. Apoptoz olayını gerçekleşmesi esnasında gözlenen genetik olaylar hem en toksik ilaçların hücre ölümünü bu yolla gerçekleştirdiği açık olduğundan, hem de bu işlemde tümör supresör genleri ile onkoproteinlerin birlikte iş görmesi açısından önemlidir. Her hücresel işlemde olduğu gibi apoptozun genetiğinde de belli aşamalar görülür:

- 1-** Ölüme karar verme
- 2-** Hücre ölümünü gerçekleştirme
- 3-** Parçalanma
- 4-** Fagositoz

i) Bcl-2 Ve P53:

Bcl-2: Bcl-2 ailesi antiapoptotik ve proapoptotik üyelerden oluşan ve apoptoz düzenlemede en önemli role sahip olan onkoprotein grubudur. Bcl-2 ve Bcl-XL apoptozu engelleme fonksiyonunu ya kaspasların öncü formlarını durdurarak ya da kaspas akışını direkt olarak aktive eden sitoplazmadaki apoptoz uyarıcı faktör (AIF) ve sitokrom-C gibi apoptogenik faktörlerin mitokondriden serbestleşmesini engelleyerek gerçekleştirir .(99)

Bax ya da Bak gibi proapoptotik üyeler heterodimerizasyon yoluyla kaspas serbestleşmesini uyarır ve mitokondri zarının geçiş porlarının açıklığını değiştirerek sitokrom-C'yi serbestleştirir. Dolayısıyla kaspas aktivasyonuna yol açar.(99,100) Bir hücrenin apoptoz eğilimli oluşu heterodimer ya da homodimer formundaki Bcl-2 ailesi genlerinin etkisine bağlıdır. Bcl-2 salgılanması sonucu Bcl-2 homodimerleri şekillenir. Böylece apoptoz inhibe edilir . Oysa aşırı Bax apoptozu aktive eder.(101)

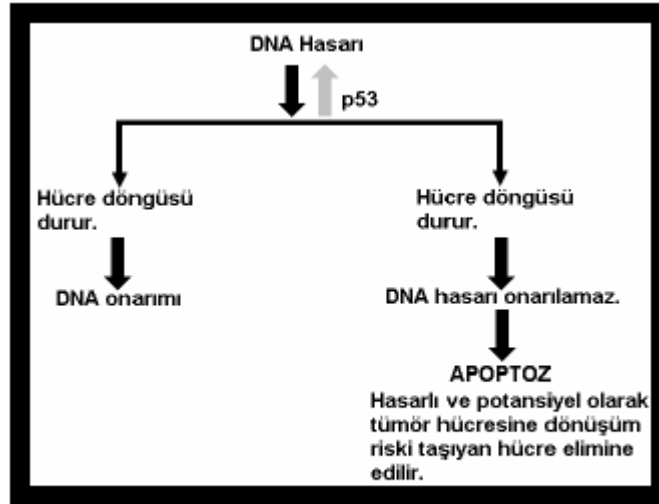


Şekil 2.14 : Bcl-2 nin apoptozisi bloke ettiği nokta

ii)P53:

p53 apoptozu uyarıcı bir proteindir. Birçok anti-tümör ilaç, hedef olarak hücre DNA'sını seçer ve p53 seviyesini artırır. Bu aktivasyon ya hasarın tamirine ya da apoptozu yol açar.(102)

Bu aktivasyon aynı zamanda kromozom-17'nin kısa kolundaki bir genin (17p53) üretimi ile ilgilidir . (103)Bu genin mutasyonu p53 salgılanmasına büyük ölçüde katkıda bulunur. Bu katkı hasarı onarabilir veya apoptozu uyarabilir. Bu ihtimallerin ikisi de Bax, p53, p21 ve farklı birkaç gene bağlıdır .(104) Sadece p53 geninin mutasyonundan kaynaklanan birkaç tür tümör belirlendiğinden ve bu mutasyon tüm tümör türlerinde de gerçekleşen en yaygın mutasyon olduğundan önemlidir .(103) p53, genomun içeriğini sürdürerek görev yapar. Hücrenin belli noktalarında malign tip p53 bulunması, DNA tamir mekanizmasının doğru hasarı tamir etmesinde kontrolör olarak rol oynar .(105)



Şekil 2.15: DNA hasarına p53 cevabı ve apoptozis

Mutant p53 geni taşıyan hücreler, artık genom içeriğini garanti edemez. Çünkü onlar artık hücre döngüsünün durma sinyallerini alamazlar. Sonuç olarak hücre genomu stabil değildir ve bütün hücreler potansiyel olarak tümör oluşturabilir .(104) Ek olarak p53 ile aynı işlevi gören p63 ve p73 genleri de tespit edilmiştir .(106)

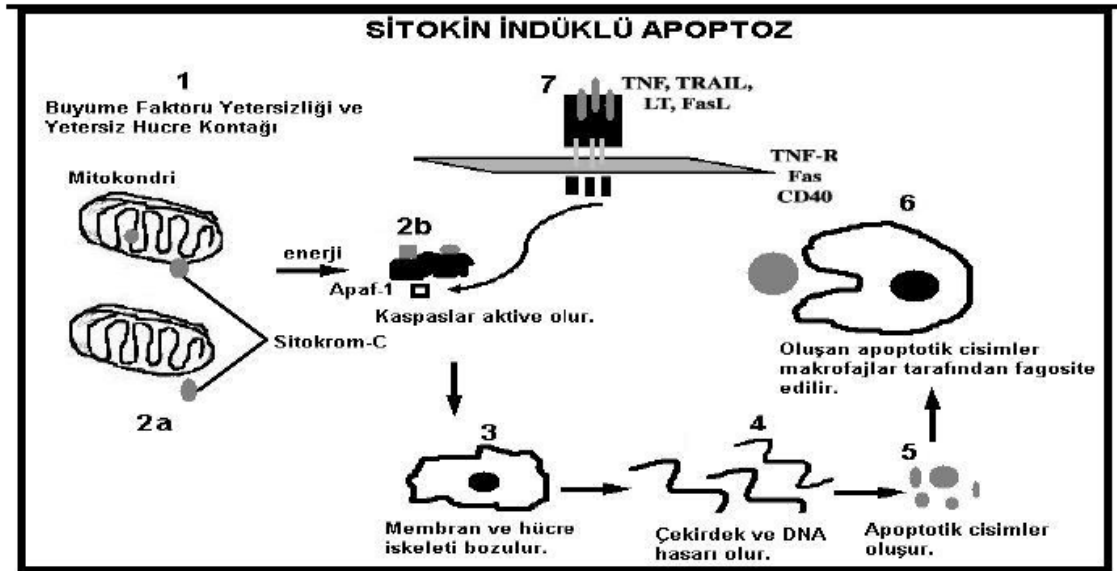
Bcl-2 hücrede aşırı miktardaysa ve p53 de mutasyona uğrarsa apoptoz gerçekleşemez.(107)

c) Apoptozda Rol Oynayan Diğer Genetik Mekanizmalar

Ces-1 ve Ces-2 gibi spesifik genler hücrede apoptozu uyarırlar. Ced-3 ,Ced-11 ve Ced-9genleri ise hücrede ölüm defektleri oluşturur. Apoptozda temel olay sistein proteazların aktivasyonudur .(104) Kaspaslar proteolitik olarak aktif enzimleri parçalayan ve normalde hücrede inaktif olan proenzimler olarak sentezlenirler.(105) Ced-3 geni ise özel aspartik asit sistein proteazı kodlar .(102,103) Yani Ced-3'e bağlı proteolitik akış apoptozda önemli role sahiptir. Ced-3'ün substratlarından biri de apoptoz boyunca parçalanan poli ADP riboz polimerazdır (PARP)(70). Bu enzim DNA tamirinde rol oynar ve bu enzimin proteolitik yıkımı DNA onarımını engeller.(103) PARP aynı zamanda Ca/Mg'ye bağlı ve DNA'yı apoptoz boyunca parçalayan endonükleazları inhibe eder(104). Ced-3 tarafından parçalanan PARP apoptozu ortaya çıkaran iki anahtar fonksiyonu inhibe eder (104). Bu genler plazma membranındaki karbonhidrat kaybı ve membran fosfolipid simetrisindeki azalmayla aktive olur. Bu yolların ikisi de hücreyi apoptozla dolayısıyla da fagositoza götürme yeteneğindedir.(105) Bcl-2'ye paralel fonksiyonlu bir diğer protein de C-myc'dir ve bu proteinin hücrede aşırı miktarda artışıyla apoptoz bloke edilebilir. (106)Ayrıca memeli hücrelerinde döngünün düzenlenmesinde Cdc-2'nin rolü de bulunmuştur .(107) Benzer şekilde Siklin-A (S/G2 siklin), Siklin-B (M siklin), Siklin-E ve Siklin-D'nin çeşitli fazların düzenlenmesindeki rolü de araştırılmaktadır (107, 108).

Aynı zamanda PCNA'nın (proliferasyon hücre çekirdeği antijeni) katalitik DNA polimeraz alt ünitelerinin sentezindeki rolü de açıktır .(107) Apoptotik bir hücrede Cdc-2, PCNA, Siklin-A, C-myc ve p53 hep artar. Hücre iskelet proteinleri olan aktin, vimentin ve tubulin ise hep azalır. Yapılan birçok araştırmadan edinilen sonuçlara dayanarak Siklin-A, PCNA, Cdc-2, P53, Cmyc'nin yüksek seviyeleri sürekli olursa ve bu durum hücrenin G1/S fazında durması olayı ile birleşirse hücrenin apoptotik döngüye girdiği söylenebilir. Bu proteinlerin yüksek seviyelerinin sürekli hale gelmesi bir protein ailesi ya da özel bir proteinin kendine özgü alanının maskelenmesinin bir sonucu olarak gerçekleşir. Bu suretle bahsi geçen proteinlerin yarı ömrünün artması bu proteinlerin hücrenin farklı bölümlerinde yeniden

dağılmasından kaynaklanabilir. Bu proteinlerden PCNA ve Cdc- 2 çekirdekte diğerleri ise sitoplazmada bulunur. Ayrıca hücrede apoptotik işaretleri kontrol edebilen ve membranda yerleşmiş ölüm reseptörleri vardır (104). Bu reseptör ailesi aynı zamanda tümör nekroz faktörleri (TNF) olarak da bilinir ve bu ailenin 6 farklı reseptör içeren 24 üyesi vardır (TNF-R, FAS, DR3, DR4, DR5, DR6). Ölüm alanı olarak bilinen, hücre membranda yerleşmiş 80 aminoasitlik sisteinden zengin bir zincir bulunmaktadır ve bu bölgenin apoptoz aktivasyonunda büyük önemi vardır.



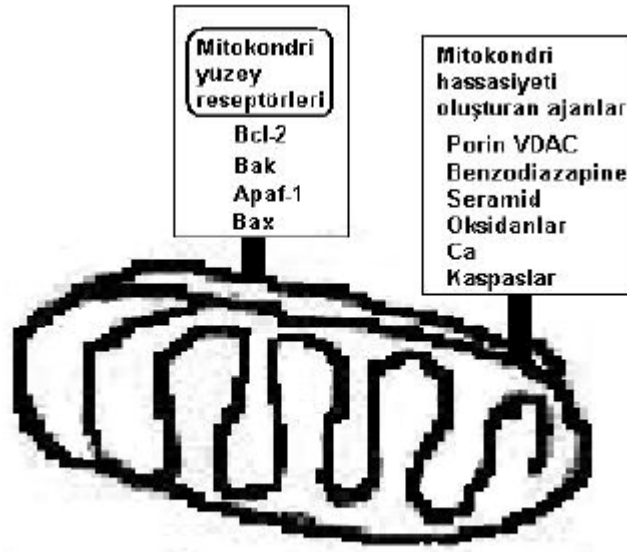
Şekil 2.16: sitokin aracılığı ile meydana gelen apoptozis

i)Kaspaslar:

Daha önce de belirtildiği gibi kaspaslar, sitoplazmada normalde inaktif proenzimler olarak bulunur. Fakat proteolitik parçalanmadan sonra aktif hale geçerler ve böylece kaspas aktivasyon zinciri başlar. Başlangıçta, kaspaslar mitokondride membran hasarı oluşturur ve bu olayların sonucunda; zar değişimleri, hücre iskeleti ve çekirdek değişimine yol açan hasarlar ortaya çıkar. (68,100) Ayrıca sitokrom-C'nin prokaspas zimogenlerini aktive etmesi de ilginçtir. Bununla birlikte insan hücrelerinde apoptozun nasıl inhibe edildiğine dair kesin bir kanıt yoktur.

ii)Mitokondri:

Bazı kaspaslar mitokondride inhibe edilir. Bcl- 2 ve Bax mitokondri dış zar geçirgenliğini ayarlar. Apoptotik uyarıda mitokondriyal bir protein olan sitokrom-C, apoptotik proteaz aktive etme faktörünü (APAF-I) aktive eder ve kaspasların aktive edildiği yer olan sitoplazmaya salar (101)



Şekil 2.17: mitokondride sitokrom-c aracılığı ile APAF-1 aktivasyonu ve apoptozis

iii) Kolon Kanseri Ve Apoptozis İlişkisi

Çoğu kanser türünde olduğu gibi kolon kanserinin gelişiminde de apoptozis önemli rol oynamaktadır. Kontrolsüz hücre poliferasyonunun yanında azalmış apoptozis de kolon kanseri gelişimine katkı sağlamaktadır. Apoptozisin azalması pek çok faktörle ilişkili olabilmektedir.

Kolon kanseri gelişimi de bu faktörlerle ilişkili olduğu bilinen çok basamaklı bir süreçtir. (109) Protoonkogenlerde değişiklikler, tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonlarındaki kayıplar, kolon kanseri gelişimine yol açan değişiklikler olarak kabul edilmektedir. Örneğin, bir tümör baskılayıcı gen olan P53 geninde meydana gelen mutasyonların çeşitli kanser türlerine sebep olabildiği gibi kolon kanserine de sebep olabileceği düşünülmektedir. P53 geni bir transkripsiyon aktivatörüdür. Mutasyona uğradığı ya da bulunmadığı zaman hücre apoptosise gidemez ve ömrü uzar. (110)P53 apoptozis mekanizmasında Bcl 2 ve Bax proteinleri arasındaki oranı

ayarlar. Tümör hücreleri anti-apoptotik proteinlerin aşırı yapımıyla ya da proapoptotik proteinlerin yapımlarının, azalmasıyla apoptosise dirençli bir nitelik kazanırlar .(111)

Kolorektal kanserlerde p53 mutasyonunun belirlenmesi hastalığın prognozu açısından önemlidir. p53 mutasyonu taşıyan kolorektal kanser hastaları mutasyon taşımayanlara göre daha kötü bir hastalık seyrine ve kısa hayatta kalma oranına sahiptirler .(112)

Tümör dokusunda apoptotik hücre sayısının yaşayabilir hücelere oranı belirlenebilmektedir ve bu oran, apoptozisin şiddetini belirtmektedir. Bu, tümörün tipini ve evresini belirlemede, tedaviye vereceği yanıtı önceden tahmin etmede ve prognozu saptamada yardımcı olabilmektedir (113)

Apoptosis mekanizmasının daha iyi anlaşılmasının, kolon kanserinin tedavisinde büyük ölçüde yarar sağlayacağı açık bir gerçektir.

iv) Apoptozis Ve Kanser Tedavisi

Günümüzde kullanılan antikanser ajanların çoğu tümör hücrelerini seçici olarak öldürmek üzere tasarlanmıştır. Yakın zamana kadar ilaç etkisi üzerine yapılan birçok araştırma ilacın hücre içi hedefi, ilaç-hedef etkileşimi ile oluşan hücresel hasarın niteliği veya ilacın hedefle etkileşimini engelleyen direnç mekanizmaları üzerine odaklanmıştır. Şimdi ise antikanser ajanların apoptozisi artırdığı ve apoptotik süreçteki bir bozulmanın tedavinin duyarlılığını azaltabileceği iyi bir biçimde bilinmektedir (114). Farklı primer hedeflere sahip ajanlar benzer mekanizmalarla apoptozisi artırabilirken apoptotik süreçteki mutasyonlar çoklu ilaç direnci oluşturabilirler.

Hücre yaşaması ve bölünme prosesi apoptozisin inhibisyonunu gerektirir ve bu süreçte büyüme faktörleri ve çeşitli sitokinler aracılığıyla aktif kaspazlar inhibe edilerek aktivasyonları engellenir. Hücre büyümesi, proliferasyonu ve apoptozisi gibi önemli hücresel proseslerin regülasyonu fosfoinozid 3 kinaz (PI3K)/ protein kinaz B (PKB veya Akt) gibi sinyal yollarıyla düzenlenmektedir. PI3K yolağının aktivasyonu Akt aktivasyonuna neden olur ve proapoptotik genlerden Bad inhibe olur (115). Bu seri aktivasyon sonucunda kaspaz 9'un inhibe olmasıyla ve

apoptotik proses de inhibe olur. Benzer şekilde protein kinaz-c de Bad inhibisyonuna neden olmaktadır (116). Eğer bu hayatta kalma yolaklarının herhangi birisi çok fazla aktive olursa sonuçta apoptoza karşı bir direnç gelişir. Bu durum malignitelerin önemli bir özelliğidir (117).

Antikanser ajanlar tümör hücrelerinde olduğu kadar normal hücrelerde de apoptozisi artırmaktadır. Tümörlerdeki apoptozisi tespit eden birçok patolojik apoptotik hücre ölümünün normal dokularda da arttığını belirlemişler ve bu sürecin kemoterapi ile ilişkili ‘toksikiteye’ katkıda bulunabileceğini bildirmişlerdir (118). Tüm bu bilgiler ele alındığında apoptotik sinyal yolaklarının aktive edilmesiyle birlikte büyüme faktör sinyal yolaklarının da inhibisyonu ile sadece hedef hücrede etki gösteren yeni kanser tedavileri güçlü bir strateji olarak görünmektedir.

a) Seramid

Sfingolipitler ökaryotik hücrelerin plazma membranında bulunan önemli moleküllerdir ve amide bağlı yağ asiti zinciri ile amino alkol sfingozin iskeletinden oluşurlar. Sfingozine bağlı olan çeşitli gruplar onların tipini ve çeşidini belirler. Sfingolipitler önemli sinyalizasyon yolaklarını düzenledikleri için sfingolipit metabolizmasının değişmesi patolojik koşullara ve kanserin ilerlemesine neden olabilir (119). Önceki yapılan çalışmalarda onkogenezisde, kanser ilerlemesinde ve ilaç-radyasyon dirençliliğinde sfingolipitlerin rolünün olduğu gösterilmiştir (120).

Bir sfingolipit olan seramid, apoptozis, hücre yaşlanması, hücre farklılaşmasının da dahil olduğu çeşitli hücresel süreçleri düzenleyen güçlü bir sinyal molekülüdür. Membran seramidleri, membrandaki lipit sıralanmasını değiştirerek ve por oluşumunu etkileyerek membran yapısına katkıda bulunur. Seramidler hücre membranının permeabilitesini de değiştirebilirler. Yapılan çalışmalar seramidlerin büyük moleküllerin geçişini sağlayan porları oluşturabildiğini göstermektedir. Bu çalışmalar apoptozis sırasında mitokondriyal membranlarda sitokrom c'nin salınımı gibi süreçlerde seramidin rol alabileceğini göstermektedir.

Seramid, sfingomiyelinaz enzimi tarafından sfingomiyelinin hidroliziyle, kompleks sfingolipitlerin yıkılmasıyla ya da sfingozin gibi bazı moleküllerin dönüşümü sonucu üretilebilir. Seramid üretimi apoptozisi artırır ve hücre

döngüsünün durdurulmasını sağlar. Ancak seramid, glukosilasyonla inaktif hale getirilebilir ya da sfingozin-1-fosfat gibi büyümeyi artırıcı moleküller tarafından metabolize edilebilir.

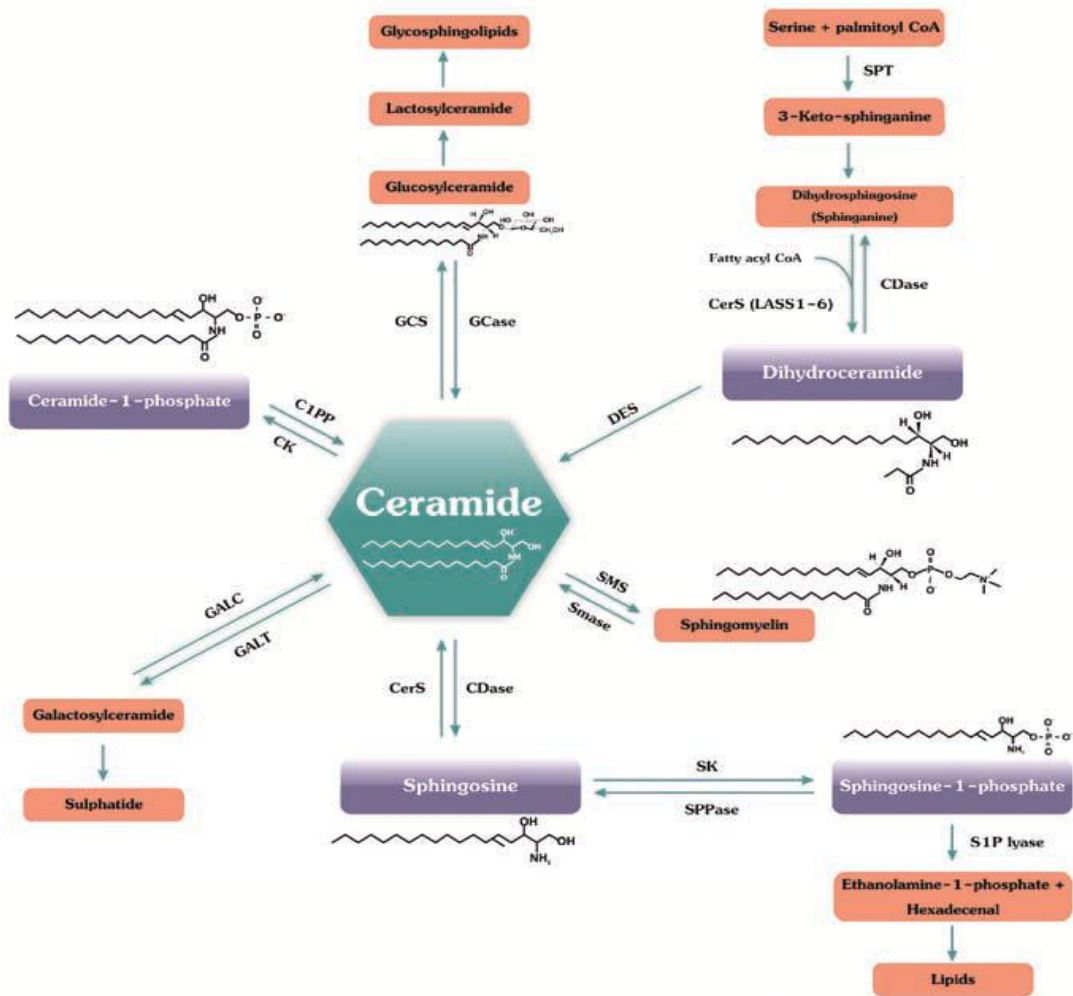
Seramid metabolizmasına dahil olan çeşitli metabolik enzimlerin hücre membranındaki lokasyonları seramid tarafından aracılık edilen sinyalizasyon yollarının aktive edildiğini göstermektedir. Örneğin, mitokondriyal membranlarda seramidin üretimi ile kemoterapötik ilaçlara cevap olarak apoptozisin aktive edildiği gösterilmiştir. Tnf-alfa, Fas ligand, iyonize radyasyon, oksidatif stres ve kematerapötikler gibi uyarıların seramid üretimini artırdığı bilinmektedir (121, 122, 123). TNF tarafından başlatılan seramid aracılı sinyalizasyon yolağı bu sürece nötral sfingomiyelinaz ya da asidik sfingomiyelinazın dahil olmasına bağlı olarak inflamatuvar bir cevapla ya da apoptozisin indüksiyonuyla sonuçlanabilir.

Sfingolipit metabolik yolağında seramid, büyümeyi artırıcı ya da inflamatuvar sinyallere cevap olarak sfingomiyelinin hidrolizi sonucu üretilir ve seramidin birikimi normal hücrelere zarar vermeksizin tümör hücrelerinin apoptozisine neden olur. Ayrıca seramid, sfingozin üretmek amacıyla seramidaz enziminin aktivasyonu ile hidroliz edilebilir. Bu yüzden seramid/sfingozin-1-fosfat arasındaki denge hücrenin kaderini belirler (124,125). Hücreler mitojenlere maruz bırakıldığında seramid miktarı azalırken sfingozin-1-fosfatın intraselüler seviyelerinde bir artış gözlenmektedir. Bu koşullar hücre yaşamını ve proliferasyonu destekler. Aksine, seramidaz'ın ya da sfingozin kinaz aktivitesinin yokluğunda apoptozis gerçekleşir. Ayrıca, seramidazlar tarafından seramidlerin yıkımı sonucu tümör hücrelerinin apoptozisten kaçtıkları gösterilmiştir. Seramidazların aktivitesinin inhibe edilmesi seramid birikimine yol açacağı için seramidazlar antikanser ilaç gelişimi için önemli hedeflerdir (kaynak 126,127).

Seramidle ilişkili olan başka bir molekül de sfingozin-1-fosfattır. Seramidazlar tarafından seramidin deasetillenmesi sonucu sfingozin oluşur. Seramid gibi sfingozin de pro-apoptotik bir moleküldür. Ancak, sfingozin hızlı bir şekilde proliferatif özelliklere sahip bir molekül olan sfingozin-1-fosfata dönüştürülür. Sfingozin-1-fosfat büyüme reseptörlerine cevap olarak sfingozin kinaz tarafından üretilir. sfingozin kinaz'ın bir ürünü olan sfingozin-1-fosfat antiapoptotik ve tümör

geliştirici olduğu ve proliferasyon, hücre büyümesi, hücre göçü, angiogenesis ve vaskulogenezis de rol aldığı bilinmektedir.

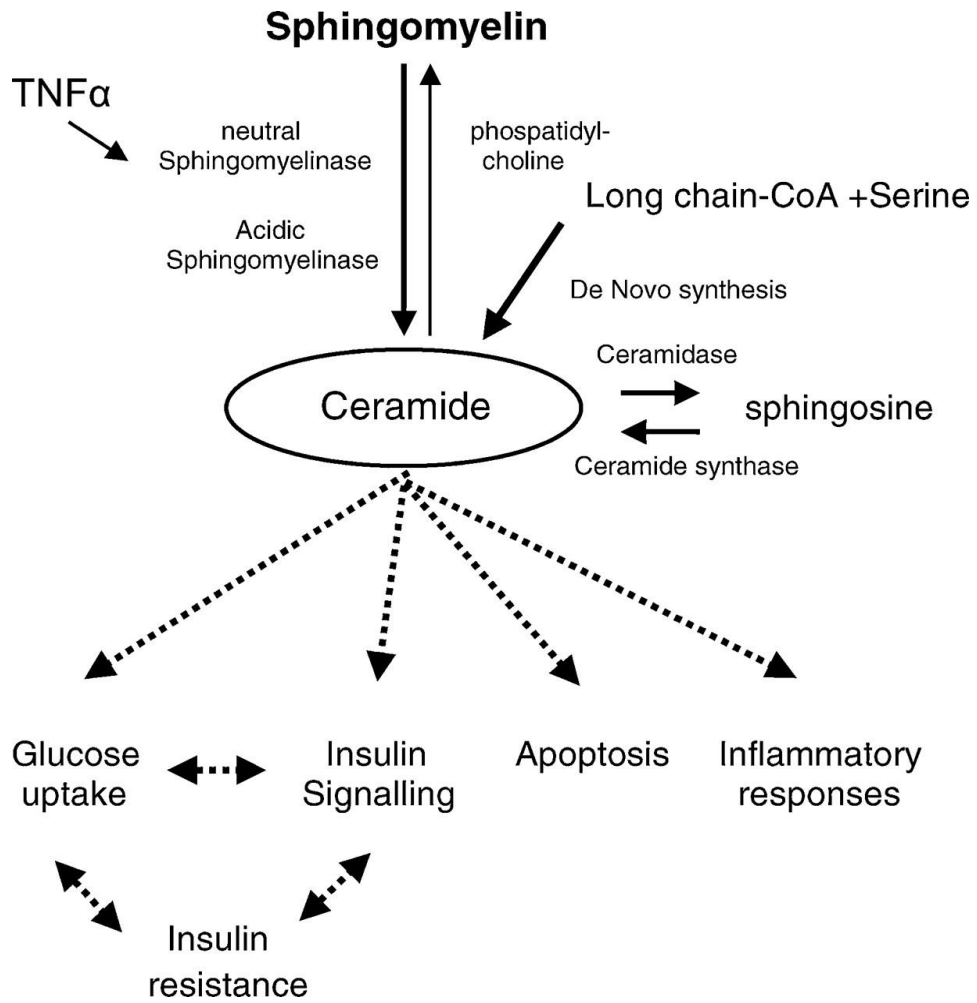
Seramidler Bcl-2 gibi onkogenleri negatif olarak düzenlerken tümör süpressör genleri aktive ettiği için hücresel transformasyonu önlemede önemli bir role sahiptir. Güvenli ve etkili mekanizmalar geliştirilirse seramid, anti-neoplastik bir ajan olarak önemli olabilir. Seramid metabolizmasının da dahil olduğu çoklu ilaç dirençliliği üzerine yapılan çalışmalar kimyasal dirençlilikte seramid rolünün daha fazla araştırılması gerektiğini göstermektedir. Bu hedefleri başarabilmek için seramid stres sinyalizasyon kaskatlarını nasıl aktive ettiğini ve büyüme yollarını nasıl baskıladığının mekanizmalarının anlaşılması gerekmektedir (128).



Şekil 2.18: seramid ve metabolitleri

b) Seramidaz

Nötral ve asit seramidaz aktivitesinin tümörlü hücrelerde normal hücrelerle kıyaslandığında artmış olduğu bulunmuştur. Seramidazlar, prostat, baş, boyun ve melanoma'yı içeren birkaç kanser türünde aşırı derecede ekspresyon göstermektedir (129,130). Ayrıca seramidazların aşırı ekspresyonunu tümör hücrelerini tümör nekrozis faktör ve radyasyona karşı dirençli hale getirmiştir (131,132). Tüm bu bulgular seramidazların yeni antikanser ilaçların gelişimi için önemli hedefler olduğunu desteklemektedir.



Şekil 2.19: seramidin de novo sentezi , metabolitleri ve metabolik etkileri

c) Seramidaz İnhibitörleri

Seramidazların inhibisyonu kanser hücrelerinde apoptozisi ve seramid birikimini artırmak için bir alternatif yoldur. Farklı seramidaz inhibitörleri antikanser

ilaçlar olarak geliştirilmiştir. Bunlar ya tek başına ya da diğer ilaçlarla birlikte kullanılmaktadır. *1S,2R-D-erythro-2-(N-myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol* (**Derythro-MAPP**) olarak adlandırılan bir seramidaz inhibitörünün büyümeyi baskıladığı ve HL-60 insan lösemi hücrelerinde hücre döngüsünü durdurduğu gösterilmiştir (133). Diğer yandan D-MAPP insan melanoma hücrelerinde endojen seramid seviyelerini artırarak apoptozisi artırmaktadır (134). Diğer bir çalışmaya göre D-MAPP, imipramin ve DL-PDMP ile birlikte kullanıldığında Jurkat hücrelerinde iyonize radyasyonun apoptotik etkisini artırmıştır (135). Asit seramidazı inhibe etmek kanser tedavisi için bir başka önemli stratejidir. Çünkü asit seramidaz da birkaç kanser türünün oluşumunu tetikler ve radyoterapi ve kemoterapiye karşı direnç oluşumuna neden olur (136,137). Bir asit seramidaz inhibitörü olan *1R,2R-derythro-2-N-myristoylamino-1-nitrophenyl-propan-1,2-diol* (**B13**), SW-403 insan metastatik kolorektal kanser hücrelerinde normal hücrelere herhangi bir etki göstermeden seramid seviyelerini artırarak apoptozisi indüklemiştir. Ayrıca B13, metastatik kolorektal kanserli fındık farelerinde tümör büyümesini baskılamıştır (138). Asit seramidaz inhibisyonu kanser hücrelerinde antiproliferatif etki gösteren N-oleoylethanolamine (**NOE**) tarafından da gerçekleştirilmiştir (139). Spinedi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada NOE'nin artan konsantrasyonlarına maruz bırakılan CHP100 nöroepitelioma hücrelerinde asit seramidazın inhibisyonu sonucu apoptozisin gerçekleştiği gösterilmiştir (140). Bütün bu maddeler asit seramidaz inhibisyonunda önemli olmasına rağmen farmakolojik açıdan bir takım yan etkilere sahiptirler. Ayrıca bu hidrofobik bileşikler albumine bağlandıklarından dolayı biyoaktiviteleri düşüktür. Bu yüzden asit seramidaz inhibisyonu için küçük, ilaç benzeri antikanser ilaçlar geliştirilmiştir. Bu maddelerden birisi de seranib-2'dir. Seranib-2 ile tedavi edilen SKOV3 insan ovaryum adenokarsinom hücrelerinde seramidaz enziminin aktivitesinin düştüğü bulunmuştur (141).

3.GEREÇ VE YÖTEM

Bu çalışmaya 25 Haziran 2013 tarih ve 17 sayılı Etik Kurul kararı ile başlanmıştır.

3.1 Hücre Kültürünün Yapılması

Hücre kültürü fizyolojik ve patolojik olayların araştırılması, sinyal mekanizmalarının açıklanması, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, hücre çoğalması ve hücre ölüm olaylarının aydınlatılabilmesi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Çoğu hücre kültürleri için %95 O₂ ve %5 CO₂ ile temel olarak hiperoksit nemli bir ortamdır. Hücreler bu in vitro ortama uyum sağladığı sürece gelişir ve çoğalırlar. Çalışmamızda insan kolon kanser hücre dizisi (Caco-2) kullanılmıştır.

3.2 Kültür İçin Yapılan Hazırlıklar

Toz halinde steril şişelerde bulunan Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640, Sigma) bir litrelik steril ve deiyonize su içine eklenerek çözüldü. Bu besi ortamı, önceden steril edilmiş şişelere 0,22 mikrolitrelik filtrelerden enjektör yardımı ile geçirilerek sterilize edildi ve buzdolabında +4 °C'de saklandı. Fetal dana serumu (Fetal calf serum = FCS, Sigma) ve penisilin + streptomisin (Sigma) 3 ml'lik hacimlere bölünerek buzdolabında -20 °C'de saklandı. Seranib-2 maddesi dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma) içerisinde çözüldü ve üzerine DMEM medium ilave edilerek stok çözelti hazırlandı. Her deneyden önce taze olarak hazırlanan bu stok çözeltiden deneyde kullanılacak ilaç dozları yine DMEM medium ile dilüe edilerek hazırlandı. Dilüe edilerek hazırlanan dozlarda DMSO oranı %1'den daha az olacak şekilde belirlendi.

3.3 Hücrelerin Ekimi Ve Yaşatılması

Canlı olarak kültür flaskı içerisinde getirilen hücreler mediumu değiştirilerek bir gece inkübatörde bekletildi. Daha sonra RPMI-1640, %10 FCS ve %1 penisilin + streptomisin karışımını içeren santrifüj tüpü içinde 1000 devir /dakika ve 4 °C'de 5 dakika döndürüldü. Üstteki medium atılarak dipteki hücreler, içerisinde besiyeri bulunan flaslara ekilerek 37 °C, %5 CO₂ ve %100 nem içeren inkübatöre kondu. İnkübatörde bulunan flasklar, ilk iki gün yerinden oynatılmamak koşuluyla, kuluçka süresince inverted mikroskop (Olympus) ile kontrol edilerek hücrelerin çoğalmaları

gözlemlendi. Eskiye besiyerleri pipet yardımıyla boşaltılarak, içerisinde 0.1 mL penisilin + streptomisin, 1mL FCS ve 8.9 mL RPMI-1640 bulunan besiyeriyle 2-3 günde bir yenilendi. Hücreler flask tabanını %85-90 oranında kapladıktan sonra deneye alındı.

3.4 Hücre Sayısını Belirleme Yöntemleri

Hücre sayısını belirlemek için tripan mavisi ile boyama yöntemi ve XTT yöntemi uygulandı.(91)

a) Tripan Mavisiyle Boyama

Tripan mavisiyle boyama yönteminde ölü hücreler tripan mavisi ile boyanırken, canlı hücreler hücre zarları sağlam olduğu için boya ile boyanmamaktadır. Hücreler flask tabanını %85-90 oranında kapladıktan sonra hücrelerin besiyeri pipet yardımıyla çekildi ve atıldı. Daha sonra flasklar Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen Hank's balanced salt solution (HBSS, Sigma) ile yıkanarak flaskta kalan proteinler uzaklaştırıldı. Flasklarda kalan hücreler 5 dakika %0,25 tripsin (Sigma) ile yıkanarak tabandan uzaklaştırıldı ve $+4^{\circ}C$ 'de 1200 devir/dk da 5 dakika döndürüldü. İşlem sonrasında üstte alan sıvı kısım atıldı ve sayım kabı içerisine 0,2 mL altta kalan iyice karıştırılan hücre çözeltisinden, 0,3 mL HBSS ve en son 0,5 mL tripan mavisi (Sigma) koyarak 1 mL'ye tamamlandı. Beş dakika beklendikten sonra sayım kabı içinden alınan 10 μ L örnek CEDEX XS (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science) marka hücre sayım aletinde sayılarak 1 mL'de bulunan canlı hücre sayısı belirlendi.

b) XTT

Hücreler flask tabanını %85-90 oranında kapladıktan sonra flask tabanında kalan hücreler tripan mavisiyle boyama yöntemi ile sayılarak 1 ml'de bulunan canlı hücre sayısı belirlendi ve her bir kuyucuğa 1×10^4 hücre gelecek şekilde 96 kuyucuklu kaplara ekim yapıldı. Caco-2 hücreleri 24 ve 48 saat ayrı ayrı 0. 1, 1, 5, 10, 25 ve 50 μ M seranib-2 dozları ile muamele edildikten sonra 2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-suülfofenil)-5-[(fenilamino)karbonil]-2H-tetrazolium hidrokisit (XTT) yöntemi uygulandı.

Seranib-2'nin hücreler üzerindeki sitotoksitesisi Scuderio P.A. tarafından tanımlanan XTT (Cell Proliferation Kit, Biological Industries) spektrofotometrik yöntemi ile belirlendi (91). Her 200 µl besiyeri için 100 µl XTT çözeltisi eklenerek 37 °C'de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından 450 nm'de oluşan suda çözünebilir formazan boya absorbansı okuması Trinity Biotech Captia Reader cihazında yapıldı. (Trinity Biotech PLC, Bray CO. Wicklow, IRELAND). Canlı hücrelerin mitokondrisinde oluşan ve XTT ürünü olan suda çözünebilir formazan yaşayan hücre sayısı ile korelasyon gösterdiğinden, ekstrakt verilen kuyucuklarda okunan optik yoğunluk kontrole göre yaşayan hücrelerin yüzdesine çevrildi. Bu işlem için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\frac{\text{Her bir kuyucuktaki ilaç verilen hücre absorbansı} \times 100}{\text{Kontrol hücrelerinin ortalama absorbansı}}$$

Kontrol hücrelerinin ortalama absorbansı

XTT yöntemiyle elde edilen sonuçlarla çizilen grafikten Caco-2 hücreleri için IC50 değeri hesaplandı ve ekstraktın apoptozis üzerine olan etkilerini belirleyebilmek için IC50'ye çok yakın 2 konsantrasyon belirlendi.

c) Real Time-PCR (RT-PCR) Tekniği ile TNF- α , TNF- α R1, Asit Seramidaz Veya β -aktin Tayini

Deney süresi sona erdiğinde hücreler kuyucuklardan toplandı ve santrifüj işlemi ile pellet haline getirildi. Hemen sonrasında RNA izolasyonu işlemine geçildi.

i) RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu için High Pure RNA Isolation Kit' (Roche, Almanya) ve cDNA sentezi için cDNA Sentez Kiti (Roche, Almanya) kullanılmıştır.

1. Doku örneği metal boncukların olduğu eppendorfa aktarılır. 30 frekansta 4 dk homojenize edilir.
2. Boncuklar alınır ve örnek başka bir eppendorfa aktarılarak üzerine 200 µl kloroform eklenir. Vortekslenir.
3. 12000 g'de ve +2 - +8 °C 'de 15 dk santrifüj edilir.
4. 3 faz oluşacak. Üst faz: RNA
Orta faz: DNA
Alt faz: Protein

5. Üstteki RNA fazı alınır.
6. RNA'ların üzerine 500 µl izopropanol eklenir ve alt üst yapılır.
İzopropanol presipitasyon için kullanılır.
7. RNA presipitasyonu için oda sıcaklığında 15 dk inkübe edilir.
8. 12000 g'de ve +2 - +8 °C 'de 10 dk santrifüj edilir.
9. Süpernatant atılır, pelet kalır.
10. %75'lik ethanolden 1 ml eklenir. RNA peleti ethanol içinde vortekslenerek yıkanır.
11. 7500 g'de ve +2 - +8 °C 'de 5 dk santrifüj edilir.
12. Süpernatant atılır.
13. RNA peletinden ethanolü uzaklaştırmak için kurumaya bırakılır.
14. RNA peletinin üzerine RNAaz free water eklenir.
15. RNA peleti birkaç kez pipetajla çözülür.
16. 55 °C'de 15 dak inkübe edilir.
17. Ependorf tüpü içerisinde elde edilen RNA -80 °C'de saklandı.

ii) RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

RNA'nın miktarı ve saflığını belirlemek amacıyla 1,5 µl RNA (Thermo Scientific, Nanodrop 1000, USA) 260 nm dalga boyunda optik dansite ölçülerek hesaplandı.

iii) cDNA Sentezi

1. Total RNA (500 ng) + ddH₂O= 9.4 µl olacak şekilde karıştırılır.
2. Üzerine 1 µl random primer, 1 µl oligo-dt eklenir.

Total: 11.4 µl

3. 65 °C'de 10 dak inkübe edilir.

Komponent hazırlanır:

Buffer 5x : 4 µl
Reverse transkriptaz : 1,1 µl
Protector RNAase inhibitör : 0,5 µl

Deoxinükleotit mix : 2 μ l
 DTT : 1 μ l

Total: 8.6 μ l

4. 11,4'lük total üzerine 8,6 μ l komponentten dağıtılır ve vortekslenir.
5. 29 °C'de 10 dak
 48 °C'de 60 dak
 85 °C'de 5 dak } cDNA sentezi için PCR şartları
6. Çıkan örnekler +2 - +8 °C'de 1-2 saat; -15 ila -25 °C'de daha uzun süre saklanabilir.

iv) RT- PCR

Tnf-alfa, Tnf-alfa reseptör 1 ve asit seramidaz (hedef genler) ve β -aktin (referans gen) mRNA düzeyleri, Dual Label (Taqman prob) kullanılarak Roche Nano Lightcycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) ile ölçüldü. RT-PCR için tablo 3,3'deki karışım hazırlanıp reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 3.6: RT PCR için miks içeriği.

Karışım	Miktar (μ l)
Reconstituted primer /probe miks (TNF- α , TNF- α R1,asit seramidaz veya β -aktin)	1
2X qPCR Mastermiks	10
PCR-Grade water	4
Cdna	5
Toplam	20

Toplam 20 μ l RT-PCR reaksiyonu aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:

95° C'de	10 dk	}	50 döngü
95° C'de	20 sn		
55° C'de	30 sn		

72° C'de 20 sn

Çalışmanın sonuçları LightCycler® Nano Software ile analiz edildi.

v) Primer Dizilerinin Hazırlanması

Tnf-alfa, Tnf-alfa reseptör 1 ve asit seramidaz (hedef genler) ve β -aktin (referans gen) primer dizileri Roche, Almanya tarafından dizayn edildi.

vi) Deney Grupları

Seranib-2 maddesinin hücre çoğalması üzerindeki etkisinin XTT yöntemi ile belirlenmesi için aşağıda belirtilen gruplar oluşturuldu. Belirtilen madde konsantrasyonları Caco-2 hücrelerine 24 ve 48 saat ayrı ayrı uygulandı. 24 saat için her grup 3 örnek ve 48 saat için de her grup 3 örnek olacak şekilde oluşturuldu ve 3'er kez tekrar edilerek toplamda her grup için 9 tekrar gerçekleştirildi.

- | | |
|---------|---|
| 1. grup | : Kontrol grubu, sadece besiyeri uygulandı. |
| 2. grup | : 0.1 μ g/ml seranib-2, 24 ve 48 saat (n=9) |
| 3. grup | : 1 μ g/ml seranib-2, 24 ve 48 saat (n=9) |
| 4. grup | : 5 μ g/ml seranib-2, 24 ve 48 saat (n=9) |
| 5. grup | : 10 μ g/ml seranib-2, 24 ve 48 saat (n=9) |
| 6. grup | : 25 μ g/ml seranib-2, 24 ve 48 saat (n=9) |
| 7. grup | : 50 μ g/ml seranib-2, 24 ve 48 saat (n=9) |

vii) İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS (Statistics Program for Social and Science) programı ile gerçekleştirildi. Çalışmada yapılan bütün ölçümler üç kez tekrar edildi ve sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda one-way ANOVA varyans analizi uygulandı. $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

4.BULGULAR

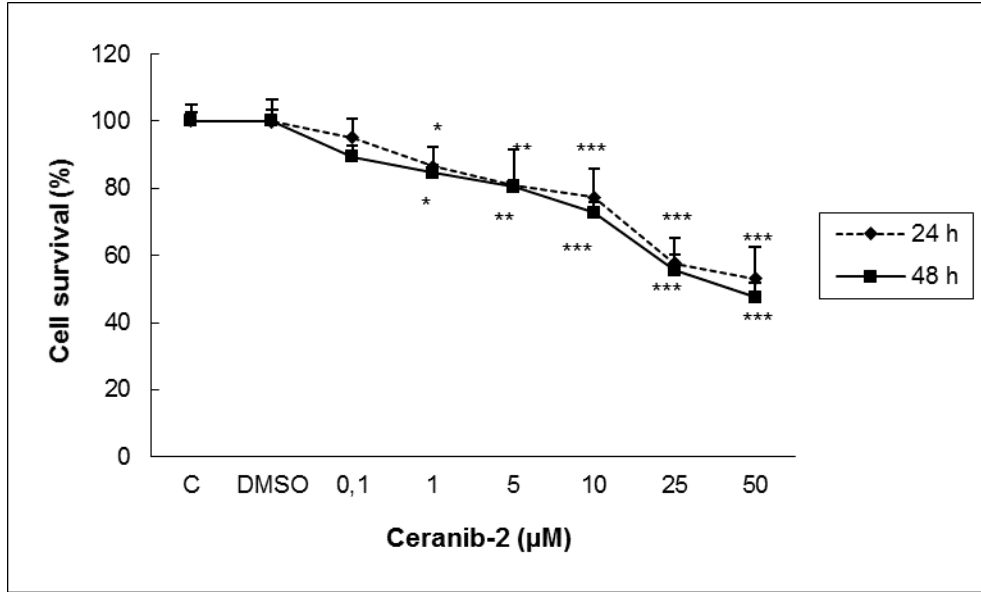
4.1 Seranib-2'nin Hücre Canlılığına Etkisi

Maddenin hücre canlılığı üzerine olan etkisi XTT yöntemiyle belirlendi. Çözücü olarak kullanılan en yüksek %1 oranında bulunan DMSO hücre yaşam oranında herhangi bir değişime neden olmadı. Seranib-2 nin, Caco-2 hücre canlılığını üzerine etkisini kontrol ile karşılaştırdığımızda 1 μM 'dan itibaren azalmaya başladığını ve 50 μM konsantrasyonda 24 ve 48 saatte sırasıyla %47 ve %52 oranında azalttığını görülmüştür ($p<0.001$). Bu sonuçlara göre 24 ve 48 saat için IC50 değeri 50 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulundu.

Tablo 4.7: Kontrol, DMSO ve farklı konsantrasyonlardaki maddenin Caco-2 hücrelerine 24 ve 48 saatliğine uygulanması sonucunda % olarak yaşayabilen hücre oranları. Kontrol grubuna göre *: $p<0.05$ - **: $p<0.01$ -***: $p<0.05$

Gruplar	Yaşayabilen hücre oranı (% \pm SD)	
	24 saat	48 saat
Kontrol	100 \pm 5,1	100 \pm 2,85
DMSO	99,9 \pm 6,7	100 \pm 3,37
0,1 $\mu\text{g/ml}$	95,2 \pm 5,4	89,4 \pm 3,32
1 $\mu\text{g/ml}$	86.5 \pm 5,9*	84,7 \pm 2,18*
5 $\mu\text{g/ml}$	80,8 \pm 10,6**	80,4 \pm 2,05**
10 $\mu\text{g/ml}$	77,4 \pm 8,6***	72,7 \pm 3,23***
25 $\mu\text{g/ml}$	57,7 \pm 7,6***	55,6 \pm 4,77***
50 $\mu\text{g/ml}$	53 \pm 9,7***	47,5 \pm 4,4***

24 ve 48 Saat XTT Ölçüm Sonuçları

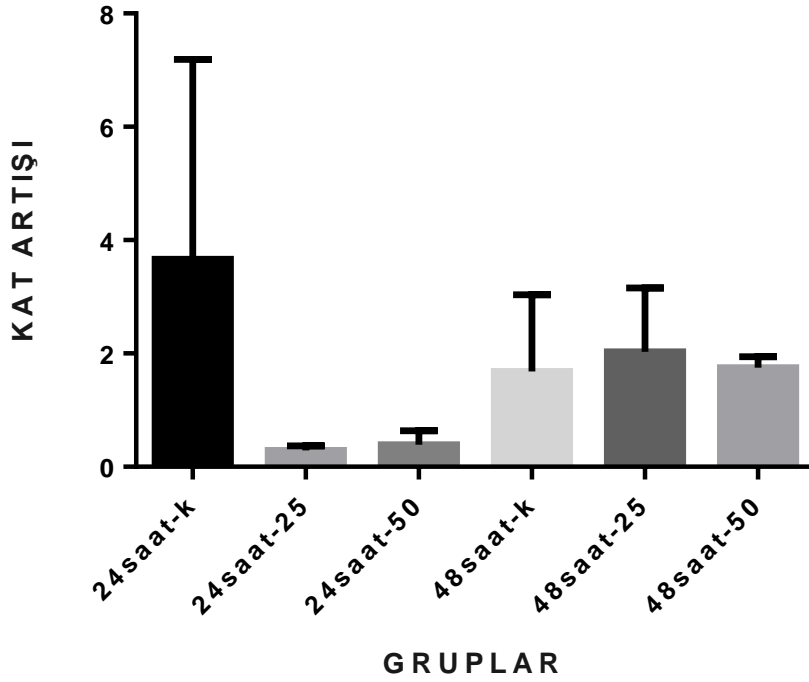


Şekil 4.20: Kontrol, DMSO ve farklı konsantrasyonlardaki maddenin Caco-2 hücrelerine 24 ve 48 saat uygulanması sonucunda % olarak yaşayabilen hücre oranları. Kontrol grubuna göre *: $p < 0.05$ - **: $p < 0.01$ -***: $p < 0.005$

4.2 Seranib-2'nin TNF- α Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Caco-2 hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle 25 ve 50 $\mu\text{g/ml}$ ceranib-2 uygulaması sonucunda ölçülen TNF- α gen ekspresyonu sonuçları kontrol grubu "1" kabul edilip oranlanarak rölatif değerleri hesaplandı.

CACO hücreleri TNF-alfa ifadenmesi

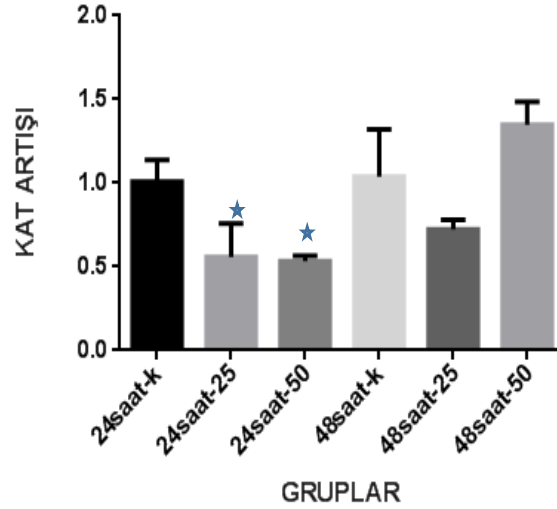


Şekil 4.21: Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki maddenin Caco-2 hücrelerine 24 ve 48 saat uygulanması sonucunda ölçülüp hesaplanan rölatif TNF- α gen ekspresyon düzeyleri.

4.3 Seranib-2'nin TNF- α Reseptör-1 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Caco-2 hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle 25 ve 50 $\mu\text{g/ml}$ ceranib-2 uygulaması sonucunda ölçülen TNF- α R1 gen ekspresyonu sonuçları kontrol grubu "1" kabul edilip oranlanarak rölatif değerleri hesaplandı.

CACO hücreleri TNF-alfa Reseptör mRNA ifadenmesi

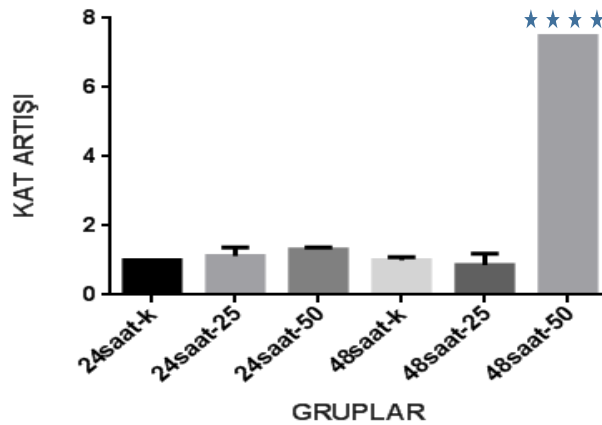


Şekil 4.22: Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki maddenin Caco-2 hücrelerine 24 ve 48 saat uygulanması sonucunda ölçülüp hesaplanan rölatif TNF- α R1 gen ekspresyon düzeyleri. Kontrol grubuna göre *: $p < 0.05$.

4.4 Ceranib-2'nin ASAH Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Caco-2 hücrelerine 24 ve 48 saat süreyle 25 ve 50 μ g/ml ceranib-2 uygulaması sonucunda ölçülen ASAH gen ekspresyonu sonuçları kontrol grubu "1" kabul edilip oranlanarak rölatif değerleri hesaplandı.

CACO hücreleri ASAH mRNA ifadenmesi



Şekil 4.23: Kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlardaki maddenin Caco-2 hücrelerine 24 ve 48 saat uygulanması sonucunda ölçülüp hesaplanan rölatif ASAH gen ekspresyon düzeyleri. Kontrol grubuna göre ****: $p < 0.0001$.

5. TARTIŞMA

Kolorektal kanserler gastrointestinal traktusta en sık rastlanan kanserlerdir. ABD ‘ de yılda 145.000 üzerinde yeni olgu tanısı konmaktadır ve her yıl 55.000 üzerinde hasta bu hastalıktan ölmektedir. Bu durum, kolorektal kanserleri ABD ‘de ikinci en sık öldürücü kanser sırasına koymaktadır. İnsidans kadın ve erkeklerde birbirine eşit olup bu durum yaklaşık 20 yıldır değişmemiştir. Yaygın uygulanan tarama programları ile bu öldürücü hastalığın sıklığı azalmış olmalıdır. Erken saptanması, tıbbi ve cerrahi tedavideki gelişmeler son zamanlarda kolorektal hastalık mortalitesinde görülen azalmadan sorumlu tutulmaktadır. (93)

Yaşamımızı sürdürebilmemiz için hücrelerimizin sürekli yenilenmesi gerekir. Yaşam süresini dolduran hücreler vücuttan atılırlarken yerlerine yenileri gelir. Bu denge genlerin kontrolü altındadır. Bazı genler hücrelerin bölünüp çoğalmasını sağlarken, bazıları da aşırı hücre üremesini önlerler(1).

Bazen hücreler, çevresel faktörlerin çok basamaklı bir süreç içinde, hücre DNA’sında ve kromozomların fonksiyonel birimleri olan genlerde oluşturduğudeğişiklikler neticesinde kontrolsüz olarak bölünmeye başlarlar ve normalde olmayan bir oluşum meydana getirirler. Bu oluşum komşu dokulara ve uzak organlara yayılabilir. Bu anormal hücrelerin kontrolsüz büyüme ve yayılma özelliğine sahip olması ile gelişen büyük bir grup hastalığa kanser adı verilir. Kanser hastalığının ortaya çıkabilmesi için yalnızca kontrolsüz çoğalma yeterli değildir. Hücrenin invazyon (diğer sağlıklı dokuları istila etme) ve metastaz (dolaşıma geçerek sağlıklı başka dokulara yayılma) gibi diğer malign özellikleri de kazanması gerekmektedir.(2,3)

Karsinogenezin temelinde, hücrenin yaşaması, büyümenin kontrolü ve diferansiasyongibi biyolojik olayları etkileyen mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesi yer almaktadır. Kanser gelişimi sürecinde tümör hücreleri birçok fenotipik özellikler kazanır. Bu değişimler, tümör hücrelerinin hızlı ve sınırsız çoğalmalarına ve çevre dokuya yayılmalarına neden olur. Ayrıca, bu hücreler özgün mikroçevreden bağımsız olarak yaşamını devam ettirme ve metastaz yapma özelliğine sahiptir. Protoonkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin seri mutasyonları farklı mekanizmalar aracılığıyla malign fenotip oluşumuna katkıda bulunur .(7)

Kolorektal kanser normal dokuda buyumeyi kontrol eden molekuler mekanizmaların bozulmasına yol acan bir seri genetik değisiklerin birikimi sonucunda olusmaktadır. Karsinogenezde ilk değisiklikler hucre buyumesi ve programlanmış hucre olumu (apoptozis) arasındaki normal dengeyi etkileyen ve histopatolojik incelemelerle tesbit edilemeyen oldukça hassas olaylardır. Epitel hucrelerinin neoplazik surece girmesi için gerekli olan genetik değisimler temelde birbirinden farklı olan iki mekanizma ile açıklanmıştır. Bunlardan biri allelik kayıplar ve anoploidi ile karakterize olan kromozomal kararsızlıklar (genomic instability), diğeri de bazı karmaşık DNA mutasyonları ve diploidi nin artması ile kendisini gosteren değisikliklerdir (Microsatellite instability-MSI). Genomik kararsızlık yeterince mutasyona uğramış bir hucrenin kanser hucrelerine donusumune müsait bir durum oluşturarak adenom ve karsinomların olusumunda önemli rol oynar.

Kolorektal kanser gelişimine sebep olan genetik değisiklikler uc temel grupta incelenebilir;

- 1- Tumor supresor gen aktivitesinin azalması veya kaybolması.
- 2- Protoonkogenlerde olusan değisiklikler.
- 3- DNA onarımı (mismatch repair) ile ilgili genlerdeki değisiklikler

Protein kinazlar, sinyal iletimi sırasında protein fosforilasyonunu/aktivasyonunu sağlarlar. Protein kinazlar membran yerleşimli olanlar ve sitoplazmik tirozin kinazlar olarak iki ana gruba ayrılır. Bu proteinler, katalitik özelliklerine göre (fosforilasyona uğrayan aminoasit türü) tirozin ve serin/treonin kinazlar olarak da sınıflandırılır.(10,11) Membranda yerleşim gösteren proteinlere reseptör tirozin kinazlar (RTK) denilmektedir.

Karsinogenez sürecinde ise, sürekli ve kontrolsüz RTK aktivitesi söz konusudur(9).Sitoplazmik protein kinazlar arasında Src, Abl, fokal adezyon kinazı (FAK) ve “Janus Family Kinases (JAK)” proteinleri yer almaktadır. İstirahat halindeki hücrelerde bu proteinler sitoplazmada inaktif halde bulunurlar. Büyüme faktörleri veya sitokinler ile hücrenin uyarılmasından sonra aktif hale gelen bu proteinler, sitoplazmadaki veya nükleustaki hedeflerine yönelirler. Sitoplazmik

tirozin kinazların sürekli aktivasyonu ve onkojenik sinyal iletimi, transformasyon, tümör büyümesi, motilite ve invazyon artışı ile anjiyogenez gibi malign fenotipe özgü hücrel olayları hızlandırır.(12,13) MAP kinazlar, “Mitogen-activated protein kinases” süper ailesinde yer alırlar(20) . Ökaryotik hücrelerin tümünde mevcut olan bu proteinler hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarılmasında çok önem taşımaktadır. Bu sinyal iletimi kaskadları, embriyogenezis, yaşama, çoğalma, diferansiasyon ve apoptozis işlevlerinin düzenlenmesinde rol alır.

Hormonlar, büyüme faktörleri, diferansiasyon faktörleri ve tümör promoter maddeler bu sinyal yolunu kullanırlar. Bu iletim yolu Ras aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla Raf (= MAPKKK), MEK (= MAPKK) ve Erk (= MAPK) proteinleri ile kinaz kaskadı ilerler. Ras ve Raf protoonkogendir.

EGF ve PDGF gibi büyüme faktörlerinin fosfoinozid-3 kinaz (PI-3K) yolunu uyarılmasında Ras’ın etkinliği minimal düzeydedir. Buna karşılık onkojenik Ras, PI-3K yolunun güçlü bir aktivatörüdür. Onkojenik Ras bu yolu aktive ederek apoptozisi baskılar(2,25) .Fosfoinozid-3 kinaz (PI-3K) ailesi, büyüme ve yaşama sinyallerinin iletiminden sorumlu proteinlerdir(26). Reseptörün uyarılmasından sonra PI-3K, hücre membranında inozitol fosfolipidlerin fosforilasyonunu katalizler. Fosfotidilinozitol trifosfat (PIP3), bu yolla oluşan bir lipid mediatördür. PIP3, PIP3 bağımlı kinazlar (PDK) ve protein kinaz B (PKB)’nin aktivasyonundan sorumludur (9).

Protein kinaz B uyarısının doğrudan etkili olduğu hücrel işlevlerden biri de apoptozistir (26). PKB, proapoptotik BAD proteini ile kaspaz 9 üzerinde inhibitör etki gösterirken, NF κ B uyarısı ile de antiapoptotik cevabı desteklemektedir(26). “Signal transducer and activator of transcription (STAT)” proteinleri 1990’lı yılların başında interferon (IFN) aracılı olarak gen transkripsiyonunun düzenlenmesi ile birlikte tanımlandı. Günümüzde, çeşitli sitokinlerin farklı STAT proteinlerini aktive ettikleri bilinmektedir. Memeli hücrelerinde yedi STAT proteini tanımlanmıştır.

Bunlar; STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT6 olarak adlandırılmaktadır(38). STAT3 ve STAT5 aktivitelerinin kontrolsüz işleyişi malign transformasyonda rol oynamaktadır. STAT proteinleri iki mekanizma aracılığıyla karsinogenezde etkili olur. Bunlardan biri STAT’ın sürekli

aktivasyonudur. Diğer değişim ise proteinin c-ucunun mutasyona uğramasıdır. Devamlı olarak aktif olan STAT proteini antiapoptotik yolları uyararak malign süreçte etkili olabilir. IL-6 ile devamlı STAT3 aktivasyonu uyarılan multipl miyeloma hücrelerinde antiapoptotik proteinlerden Bcl-xL ve Mcl-1'in arttığı gösterilmiştir(40).

Onkogenlerin aktivasyonu ve tümör süpresör gen inaktivasyonları, hücrenin kontrolsüz çoğalması, kontak inhibisyonun kaybolması, invazyon ve metastaz yeteneği kazanması gibi malign özellikler kazanmasına yol açar(2,49,50). Hücre büyümesi, farklılaşması ve çoğalmasında rolü olan proto-onkogenlerde meydana gelen mutasyonlar tümör gelişimine, tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar ise hücre siklusunun inhibisyonunu engelleyerek anormal hücre büyümesine neden olur.

Apoptoz terimi ilk olarak 1972 de J.F.K.Kerr tarafından(60) nekrozdan (61) farklı olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şekli için tanımlanmıştır ve fizyolojik hücre ölümünü ifade eder. Eski bir yunan terimi olan apoptoz, kelime anlamı olarak yaprakların ağaçtan, petallerin çiçekten doğal olarak düşmesi anlamına gelmektedir. Bugün de bu terimin kullanımı uygundur ve fizyolojik nedenlerden kaynaklanan hücre ölümünü anlatır. Teorik olarak apoptoz, çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı olarak tanımlanabilir. Böylece hormonal olarak aktif çeşitli maddeler, iyonize radyasyon ve kemoterapiyi içeren travmatik ajanlar vasıtasıyla gerçekleşen hücre ölümünün ya da genetik faktörlerle aktive edilen hücre ölümünün intihar programının apoptoza neden olduğu söylenebilir.(61).

Apoptozis ekstrasellüler ve intrasellüler mekanizmalar tarafından başlatılabilir. Proapoptotik proteazlar ve mitokondrial mekanizmalar spesifik endonülez aktivasyonuna ve DNA fragmentasyonuna neden olur. Seramid proapoptotik mekanizmaları tetikleyen bir lipid mediatörüdür. Kolon hücrelerinde kanserli hücrelere göre daha yüksek düzeydedir. Seramid analogları veya seramidaz inhibitörleri kullanılarak hücre ölümünü düzenlenebilir ve özellikle kanser hücrelerinde apoptotik yollar aktive edilebilir. Hücrelerde seramid birikimi bir çok

ekstrasellüler uyarılarla indüklenir. (TNF α , radyasyon , FAS ligand , IFN α , kemoterapi vs)

Çoğu kanser türünde olduğu gibi kolon kanserinin gelişiminde de apoptosis önemli rol oynamaktadır. Kontrolsüz hücre proliferasyonunun yanında azalmış apoptosis de kolon kanseri gelişimine katkı sağlamaktadır. Apoptosisin azalması pek çok faktörle ilişkili olabilmektedir. Kolon kanseri gelişimi de bu faktörlerle ilişkili olduğu bilinen çok basamaklı bir süreçtir .(109)

Tümör dokusunda apoptotik hücre sayısının yaşayabilir hücrelere oranı belirlenebilmektedir ve bu oran, apoptozisin şiddetini belirtmektedir. Bu, tümörün tipini ve evresini belirlemede, tedaviye vereceği yanıtı önceden tahmin etmede ve prognozu saptamada yardımcı olabilmektedir. Apoptosis mekanizmasının daha iyi anlaşılmasının, kolon kanserinin tedavisinde büyük ölçüde yarar sağlayacağı açık bir gerçektir.(113)

Apoptozisi regüle eden sistemler içerisinde hücrelerel sfingolipidler önemli bir rol oynamaktadır. Sfingolipidler membran ve hücre içi lipidler olarak hücre sağkalım üzerinde çeşitli yolları düzenlemektedirler. Bir çok hücrelerel süreç içerisinde etkin rol oynarlar. Örneğin; büyüme, adhezyon, migrasyon, otofaji, nekroz ve apoptozis. Sfingolipid mekanizması kompleks bir sistem üzerinden etki eder. Sistem içerisindeki bazı molekül seramid bir çok enzim ile etkileşerek glikosfingolipidlere ve sfingozin 1 fosfata dönüşür. (160-162)

Sfingozin 1 fosfat seramid aracılı apoptozisi antagonize eden biyoaktif bir moleküldür. Bunu ERK y1 aktive ederek ve seramid bağımlı JNK aktivasyonunu baskılayarak gerçekleştirir. Büyüme faktörleri (PDGF, EGF, VEGF, TGF β , IGF 1) , sitokinler (TNF α , IL ler) ve hormonlar sfingozin 1 fosfat aktivasyonunu stimüle ederler.

Bir çok literatür sfingozin kinaz 1 / sfingozin 1 fosfat sinyalizasyonunun ilaç direnç gelişiminde önemli bir yere sahip olduğunu vurgular. Çünkü bu sinyal kanser hücrelerini kemoterapinin indüklediği apoptozisten korur. Örneğin prostat adenokarsinomlarda sfingozin 1 kinaz ilaca bağılı apoptozisi regüle eder ve kemoterapi sensörü olarak kullanılır (163).

Bir lipid kinaz olan sfingokinaz, insanlarda, farelerde, mayalarda ve bitkilerde bulunan seramid / sfingozin 1 fosfat dengesinde regülatör olarak rol alır. Sfingokinaz 1 ' deki artış sfingozin 1 fosfat akümülyasyonuna sebebiyet verir. Buda apoptotik mekanizmaları artırır. Özellikle akciğer kanseri, mide kanseri, over kanseri ve böbrek kanserinde miktarı artmıştır.(168)

Sfingokinaz 1, bir çok çalışmada kanser hücrelerinde over exprese olduğu gösterilmiştir. Çalışmalarda sfingokinaz 1 oranının kanserli olmayan hücrelere göre 2 ila 8 kat daha fazla oranda olduğu gösterilmiştir. Sfingokinaz oranındaki bu farkın kanser metastazı azalmış sağ kalım ve kötü prognozla alakalı olabileceği düşünülmüştür. (165,166)

Hatta bazı yayınlarda bazı kanserlerin prognozunu belirlemede yeni tümör markeri olarak sfingokinaz 1'i önermişlerdir.(167)

Otuz dört çalışmanın derlendiği bir metaanalizde sfingokinaz 1, mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. On yedi çalışmada sfingokinaz 1, mRNA düzeyleri, on iki çalışmada sfingokinaz 1 protein düzeylerine bakılmıştır. Bütün çalışmalarda sfingokinaz 1, mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinin kanserli hücrelerde artış eğiliminde olduğu gösterilmiştir. (168)

Mitokondri, seramidin indüklediği apoptozisde MOMP (mitokondrial dış membran permeabilitesi) 'ni değiştirerek merkezi rol oynar. MOMP ' da Bcl-2 proteini tarafından regüle edilir. Reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) üretimi ile sonuçlanır. Stokrom-c ' nin stozole salınımı ile apoptotik süreç başlatılır. (169,170)

Mitokondriye bağlı hücreyel değişikliklerin yanı sıra seramidin apoptozis üzerindeki etkisini düzenleyen hücreyel hedefler vardır. Bunlardan birisi MAPKs (mitogen activated protein kinaz) . MAPKs de seramid metabolizmasındaki enzimleri düzenleyerek seramid metabolizmasını Bcl-2 grubu proteinlerle birlikte regüle eder.(171-173)

İntrasellüler sfingozin 1 fosfat düzeyleri sfingozinin sfingokinaz tarafından fosforillenmesi ile ve daha az oranda da sfingozin fosta 1 fosfataz tarafından degregasyonuyla endoplazmik retikulumda dönüşümlü olarak ya da sfingozin 1 fosforilaz tarafından dönüşümsüz olarak oluşturulur. Sfingokinaz ' ın iki adet

izoformu mevcuttur. Bunlar sfingokinaz 1 ve sfingokinaz 2 ' dir. Bunların katalitik özellikleri, hücre içi lokalizasyonları ve fonksiyonları farklıdır. Sfingokinaz 1, antiapoptotik faktör, sitozolde yer alır. Sfingokinaz 2, uyarı sonrası hücre membranı üzerine etkili proapoptotik faktör, uyarı sonrası sitozol ve nükleus üzerine etkili proapoptotik etkiyi ise mitokondri üzerinden sağlayan diğer izoformdur. Sfingokinaz 2 fazla miktarda üretilirse palmitatın seramide dönüşümünü artırır, sfingokinaz 1 ise tam tersi çalışır.(171, 174, 175)

Apoptozisde seramid, sfingozin sfingozin 1 fosfat ve bunların Bcl-2 proteinleri tarafında regülasyonu önemlidir.

Bcl-2 / Bcl-xL sfingozin kinazları aktive ederek sfingozin fosfat akümülyasyonuna neden olarak apoptozisin azalmasına neden olur. Aynı zamanda CersS (seramid sentetaz) ve sfingomiyelinazı baskılayarak seramidi ve apoptozisi baskılar. Bax / Bak seramid sentetaz aktivitesini artırarak seramidi ve apoptozisi artırır.

Mitokondri dış membranında seramid kanallarının oluşması için Bcl-2 proteinlerine ihtiyaç olmamasına rağmen bu kanalların oluşumu Bcl-2 tarafından sıkı bir şekilde regüle edilmektedir.(176).

Proapoptotik Bax geni mevcut olan seramid kanallarını genişletir. Seramid proapoptotik mekanizmayı üç majör yolla aktive eder.

1) İndirekt olarak kaspazları aktive ederek, sistein proteazlar kaspaz 3 ü aktive ederler, buda endonüklezların aktive olmasına ve DNA fragmantasyonuna yol açar.(146)

2) Protein kinaz yollarını aktive eder. SAPK/JNK aktivasyonu c-jun fosforilasyonuna sebep olur buda kaspaz 3 e bağlı mekanizmaları uyararak apoptozisi aktive eder.(148, 149)

3) TNF reseptör 1 ve FAS reseptörlerinin hücre membranında sayısını artırarak antitümör T lenfositlerinin ve diğer Fas ligand ve TNF ye bağlı yolların aktif hale gelmesini sağlar.(142)

Son çalışmalarda seramidin kanser patogeneğinde ve konvansiyonel tedavilerin başarısız olmasında önemli bir yere sahip olduğu saptanmıştır. Örneğin

radoterapiye direncin hücre içi seramid üretiminin önemli derecede azalmış olmasına bağlı olduğu ortaya konmuştur. Tümör hücrelerinde azalmış seramid düzeyi nedeni ile seramid düzeyini regüle eden ajanlar bu hücrelerde daha etkilidir(145-147).

Kemoterapi kanser tedavisinde temel yaklaşımlardan birisidir. Hedefe yönelik tedavi kemoterapinin etkinliğini artırmaktadır. İlaç direnci kemoterapinin etkinliğini azalttığından dolayı ciddi bir problem olarak ortaya çıkmaktadır. İlaç direnci intrensek veya kazanılmış olabilir. İntrensek direnç kemoterapi uygulanmasından önce tümör hücrelerinin büyük bir kısmı tarafından direnç düzenleyen faktörlerin salınmasını ifade eder. Kazanılmış ilaç direnci ise tedavi esnasında gelişir. Başlangıçta ilaca duyarlı olan tümör hücreleri yeni gelişen mutasyonlar sonrasında veya adaptif mekanizmalarla direnç kazanır. Bu adaptif direnç mekanizmaları tümör relapsı ve tedaviye dirençli olguları açıklamaktadır.,(158,159)

İlaç direncine yönelik birçok mekanizma ortaya konmuştur. Bunlardan bazıları ilaç efflux, ilaç metabolizmasındaki değişiklikler, ilaç reseptör mutasyonları, kanser kök hücrelerinin bulunması, apoptozisi düzenleyen sinyallerin inaktive edilmesidir. Özellikle apoptozis dirençli fenotipler tedavide ciddi sorun oluşturmaktadır. Çünkü kemoteropatik ajanlar farklı mekanizmalarla etki gösterebilirler dahi final yolak apoptozis etki göstermektedir. Şayet apoptozis direnci ortadan kaldırılırsa kemoterapinin etkinliği artacaktır.(160,161)

Birçok kemoteropatik direncini düzenleyen moleküler yolaklar seramid yolakları ile yakından ilişkilidir. Birçok kemoteropatik ajan; daunorubicine cannabiodes ve etoposide ve diğer sitrese sebebiyet veren agonistler (Fas ligand) endojen seramid düzeyinde sentezi artırarak etki gösterirler. Ayrıca meme kanserinde TNF a, hepatomada etanol endojen seramid miktarını sfingomiyelin hidrolizi yaparak artırır. Melanomada glikoseramid katabolize olarak seramide dönüşür ve hücre içi seramid artışı ile apoptozis meydana gelir. Başka bir yolda glikoseramid sentetaz aşırı ekspresyonu glikoseramid biyosentezini aktive eder. Multi ilaç rezistansının nedeni budur.

Spinedi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, CHP-100 nöroepitelyal hücreleri 18 saat NOE konsantrasyonuna maruz bırakılmış, sonuç olarak seramidlerin

glukozillenmesini engellediği ortaya konmuş. Hücre içi seramid miktarı artmıştır. Artan seramid miktarına bağlı olarak hücrelerde apoptozis artışı görülmüştür.(160)

Raisova ve arkadaşlarının insan keratinosit ve melanositleri üzerinde yaptığı çalışmada D-e-MAPP ve D-NMAPPD enzimlerinin asit seramidaz aktivitesinin baskılandığı gözlemlenmiştir. Seramid seviyesinin artmasında apoptozisi artırmış hücre proliferasyonunu baskılamıştır. Bu bulgular seramidaz inhibitörlerinin antiproliferatif ve sitotoksik ilaçların yeni bir tedavi grubu olacağını ortaya koymuştur.(134)

Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, proapoptotik molekül olan seramid ile antiapoptotik spingolipid olan sfingozin 1 fosfat kanser patolojisinde ve kanser tedavisine karşı gelişen dirençte önemli rol oynamaktadır. Normal sfingolipid dengesi oluşturmaya yönelik ilaçların, seramid düzeyini artıran ve sfingozin 1 fosfat düzeyini düşüren, kanser tedavisinde kullanımını gündeme getirmiştir. Seramidi metabolize ederek seviyesini düşüren asit seramidazların kanserli hücrelerde kemoterapi direncine neden olduğu görülmüş ve seramidaz inhibitörlerinin kemoterapötik ilaçların etkinliğini artırdığı ortaya konmuştur.(137)

Lépine ve arkadaşları doksorubucine tedavisinin otofajik aktiviteyi ciddi derecede azalttığını, hücrelerin apoptozis duyarlılığını artırdığını göstermiştir. Bu çalışmada doksorubucine seramid sentezini artırarak AKT yi (protein kinaz B) baskılamakta bu da koruyucu otofajiyi apoptozise kaydırmaktadır(144).

Vejselova ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; gelişen tümör hücrelerinde seramidazların seramidi hızlıca ortamdaki kaldırarak mediatör görevi yaptığı bazı kanser hücrelerinde tespit edilmiştir. Fibrosarkom (131) prostat kanseri (151) malign melanom (152) hepatoma (153) serviks kanseri (154)

Ayrıca asit seramidazın aşırı ekspresyonu kanser hücrelerinin kemoterapötik ilaçlara olan direnci artırdığı ortaya konmuştur. Mevcut seramidaz inhibitör ilaçlar uzun zincir alkali yapıda olan zayıf farmakolojik özelliklere ve biyoaviliteye sahip ilaçlar olduğundan kemoterapötik amaçla kullanımı sınırlıdır.(176). Bu nedenle küçük ilaç benzeri molekül olan seranib 2 kanser tedavisinde teropatik amaçlı kullanım için üretilmiştir. Seranib 2 nin antitümör etkisini net olarak ortaya koyan bir çalışma henüz yoktur. Seramidaz enzimini inhibe ederek hücre içi seramidin artmasına ve apoptozisin artmasına sebep olduğu hipotezi

mevcuttur. Bir çok insan tümör hücresinde seramid düzeyi normal hücreye göre malignensi derecesi ile doğru orantılı olarak azalmıştır. Bu konu ile ilgili hipotezlerden kanser hücrelerinde bir çok tümör süpresör sinyalin seramid üretimini stimüle ettiği ve bununda apopitozisi artırdığı ortaya konmuştur. Son çalışmalar intrsellüler seramid düzeyini kontrol eden yolakların antineoplastik tedavide potansiyel yeni hedefler olabileceğini ortaya koymuştur.(156)

Bu yolaklardan en önemlisi seramidaz yolağıdır. Seramidaz seramid hidrolizini kontrol ederek hücre zarının sfingolipid yapısını regüle eder. Memeli hücrelerinde sfingozin 1 fosfat enzimi sfingomiyelinden seramid oluşumunu sağlar. Seramidin hidrolize olması ile seramid 1 fosfat sfingozin oluşmaktadır. (157)

Asid seramidazlar proapopitotik bir lipid olan seramidi hidrolize ederek seramidin tümör hücrelerinde sağ kalım, büyüme ve ölümünü regüle eder. Seranib 2 nin etkili bir asit seramidaz inhibitörü olduğu ve asid seramidaz inhibisyonunda kanser hücrelerinin antiproliferasyonunda kilit rol oynadığı son çalışmalarda ortaya konmuştur. Diğer standart antitümör ajanlarla birlikte uygulandığında asid seramidaz inhibitörlerinin sinerjistik etki ortaya koyduğu görülmüştür.(155)

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bizim çalışmamızda, seranib-2 nin Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkisi kontrol ile karşılaştırıldığında 1 μM 'dan itibaren azalmaya başladığı ve 50 μM konsantrasyonda 24 ve 48 saatte sırasıyla % 47 ve % 52 oranında azalttığı görülmüştür. RT-PCR sonuçlarına göre, gruplar arasında TNF-alfa mRNA düzeylerinde herhangi bir fark gözlenmezken 24 saatte TNF-alfaR1 mRNA düzeyleri, her iki konsantrasyonda da kontrole göre azalmış, 48 saatte ise bir fark oluşmamıştır. ASAH mRNA düzeyleri ise 48 saat sonrası 50 μM 'lık tedavi grubunda tüm gruplara göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Böylece çalışmamız, seranib-2'nin zaman ve doz bağımlı güçlü anti-kanser etkisinin olduğunu ortaya koymaktadır. TNF-alfa mRNA ekspresyonunun değişmemesi ancak TNF-alfaR1 mRNA düzeylerinin kontrole göre azalmış olması ise seranib-2'nin farklı yollardan etki edebileceğini göstermiştir. ASAH mRNA düzeyinin tedavi gruplarında yüksek çıkması kullanılan seranib-2 dozunun ASAH ekspresyonunu düşürmede etkin olmadığını veya hücre ölümünün seramidaz inhibisyonundan farklı bir yoldan seramidaz enzim ürünleri olan sfingozin ve sfingozin-1-fosfat inhibisyonu ile olabileceğini düşündürmektedir.

Seranib-2 maddesinin etki mekanizmasının net olarak ortaya konması, farklı yollar üzerinden etkisinin görülmesi gelecek çalışmalar için araştırma konusu olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, eds Basic Pathology. 5th W.B. Saunders Company 1992.
2. Ringer DP, Schnipper LE. Principles of Cancer Biology. İn: Lenhard RE, Osteen RT, Gansler T; eds. Clinical Oncology Atlanta: American Cancer Society; 2001:21-35.
3. İçli F, Akbulut H. Onkolojiye Giriş. İn: İliçin G, Biberöğlu K, Süleymanlar G ve ark.; eds. İç Hastalıkları. Güneş Kitapevi; 2005:2007- 2014.
4. Bresnair RS. Malignant and premalignant lesions of the colon. In Current Diagnosis and Treatment in Gastroenterology. Eds: Friedman SL, McQuaid KR, Grendell JH. McGraw Hill, New York, 2003, pp:407-435.
5. Burlacu, A., 2003, Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins, J. Cell. Mol. Med., 7(3):249-257
6. Dobrucalı A. Kolorektal kanserde sınıflama ve etyopatogenez. Kolon, rektum ve anorektal bölge hastalıkları, Tasarım yayıncılık, İstanbul, 1. Baskı, 2003, s:395-412.
7. McCormick F. Signalling networks that cause cancer. Trends Cell Biol 1999; 12:53-6.
8. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100:57-70.
9. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signaling. Nature 2001; 411:355-64.
10. Pawson T, Raina M, Nash P. Interaction domains: From simple binding events to complex cellular behavior. FEBS Letters 2002; 513:2-10.
11. Pawson T. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. Eur J Cancer 2002; 38(Suppl 5):3-10.
12. Jones RJ, Brunton VG, Frame MC. Adhesion-linked kinase in cancer; emphasis on Src, focal adhesion kinase and PI 3- kinase. Eur J Cancer 2000; 36: 1595-606.

13. Frame MC. Src in cancer: Deregulation and consequences for cell behavior. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1602:114-30.
14. Savage DG, Antman KH. Imatinib mesylate- A new oral targeted therapy. *N Engl J Med* 2002; 346: 683-93.
15. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001; 344:1031-7.
16. Goldman JM, Melo JV. Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001; 344:1084-6.
17. Peggs K, Mackinnon S. Imatinib mesylate-The new gold standard for treatment of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348:1048-50.
18. Hirsch FR, Scagliotti GV, Langer CJ, et al. Epidermal growth factor family of receptors in preneoplasia and lung cancer: Perspectives for targeted therapies. *Lung Cancer* 2003; 41:29-42.
19. Kim JA. Targeted therapies for the treatment of cancer. *Am J Surg* 2003; 186:264-8.
20. Liem AA, Chamberlain MP, Wolf CR, Thompson AM. The role of signal transduction in cancer treatment and drug resistance. *EJSO* 2002; 28:679-84.
21. Plataniias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* 2003; 101: 4667-79.
22. Kolch W. Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000; 351:289-305.
23. Lee JT, McCubrey JA. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia* 2002; 16:486-507.
24. Karp JE, Lancet JE, Kaukmann SH, et al. Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed

- acute leukemias: A phase1 clinical- laboratory correlative trial. *Blood* 2001; 97: 3361-9.
25. Blalock WL, Navolanic PM, Steelman LS, et al. Requirement for the PI3K/Akt pathway in MEK1-mediated growth and prevention of apoptosis: Identification of an Achilles heelin leukemia. *Leukemia* 2003; 17:1058-67.
 26. Chang F, Lee JT, Navolanic PM, et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: A target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2003; 17: 590-603.
 27. Staal SP. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: Amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 5034-7.
 28. Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3 kinase/AKT pathway. *Proc Natl AcadSci USA* 1999; 96:4240-5.
 29. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling* 2002;14: 381-95.
 30. Vogt PK. PI 3-kinase, mTOR, protein synthesis and cancer. *Trends Mol Med* 2001; 7:482-4.
 31. Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000; 103:253-62.
 32. Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, et al. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J* 1997; 16:3693-704.
 33. Sekulic A, Hudson CC, Homme JL, et al. A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res* 2000; 60:3504-13.
 34. Blain S, Massagué J. Breast cancer banishes p27 from nucleus. *Nat Med* 2002; 8:1076-8.

35. Viglietto G, Motti ML, Bruni P, et al. Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med* 2002; 8:1136-44.
36. Shin I, Yakes M, Rojo F, et al. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27Kip1 at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 2002; 8:1145-52.
37. Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, et al. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 2002; 8:1153-60.
32. Bowman T, Garcia R, Turkson J, et al. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000; 19:2474-88.
38. Benekli M, Baer MR, Baumann H, Wetzler M. Signal Transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood* 2003; 101:2940-54.
39. Puthier D, Thabard W, Rapp M, et al. Interferon alpha extends the survival of human myeloma cells through an upregulation of the Mcl-1 antiapoptotic molecule. *Br J Haematol* 2001; 112:358-63.
40. Benekli M, Xia Z, Donohue KA, et al. Constitutive activity of signal transducer and activator of transcription 3 protein in acute myeloid leukemia blasts is associated with short disease-free survival. *Blood* 2002; 99:252-7.
41. Niu G, Wright KL, Huang M, et al. Constitutive STAT3 activity upregulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 2002; 21:2000-8.
42. Horita M, Andreu EJ, Benito A, et al. Blockage of the Bcr- Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-XL. *J Exp Med* 2000; 191:977-84.
43. Biederer C, Ries S, Brandts CH, McCormick F. Replicationselective viruses for cancer therapy. *J Mol Med* 2002; 80:163-75.
44. McCormick F. Interactions between adenovirus proteins and the p53 pathway: The development of ONYX-015. *Semin Cancer Biol* 2000; 10:453-9.

45. McCormick F. ONYX-015 selectivity and the p14ARF pathway. *Oncogene* 2000; 19:6670-2.
46. Ries S, Korn WM. ONYX-015: Mechanism of action and clinical potential of a replication-selective adenovirus. *Br J Cancer* 2002; 86:5-11.
47. Dinçol K. Kemoterapide Temel Prensipler. İn: Topuz E, Aydiner A, Karadeniz AN;eds. *Klinik Onkoloji. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları*;2000:34-47.
48. Reed SI. Cell Cycle. İn: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA;eds. *Cancer*. 8 th Ed. Philadelphia:Lippicott-Williams&Wilkins;2008:79- 92
49. Dalay N.Kanser Biyolojisi. Topuz E, Aydiner A, Karadeniz AN;eds. *Klinik Onkoloji. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları*; 2000:48-53.
50. Tripathy D. Neoplasia. İn:McPhee SJ,Lingappa VR,Ganong WF et al.;eds. *Pathophysiology of Disease*.2nd ed.Connecticut: Appleton&Lange;1997:78-97.
51. Dy GK, Adjei AA. Principles of Chemotherapy. İn:Chang AE,Ganz PA,Hayes DF et al.;eds. *Oncology*. Springer Science Business Media; 2006:14- 40.
52. Bresailer RS.Malignant and premalignant lesions of the colon. In *Current Diagnosis and Treatment in Gastroenterology*. Eds:Friedman SL, McQuaid KR,Grendell JH.McGraw Hill, New York,2003,pp:407-435.
53. Luk G. Malignant tumors of the colon.In: *Clinical practice of gastroenterology*, Ed:Brandt LJ, Current Medicine Inc,Philadelphia,1999,., Volume 2,pp:762-772,
54. Winawer SJ,Enker WE,Levin B. Colorectal cancer. In:*Management of Gastrointestinal Disease*. Eds: Winawer SJ,Almy T.Gower Medical Publishing,New York,1992. pp: 27.1-40

55. Bresalier RS. Malignant neoplasms of the large intestine. In: *Gastrointestinal and liver disease*. Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH (Eds.) 2261WB Saunders, Philadelphia, 2006. 7th ed. 2759-2810.
56. Boland CR. Malignant tumors of the colon. In: *Textbook of Gastroenterology*. Eds: Yamada T, Alpers DH, Owyang C. Lippincott, Philadelphia, 1995. pp: 1967-2026
57. Dobrucalı A. Kolorektal kanserde sınıflama ve etyopatogenez. *Kolon, rektum ve anorektal bölge hastalıkları*, Tasarım yayıncılık, İstanbul, 1. Baskı, 2003, s: 395-412.
58. Bond JH. Colorectal cancer; screening and surveillance. In: *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. Eds: Weinstein WM, Hawkey CJ, Bosch J. Elsevier, Spain, 2005, pp: 407-414.
59. Midgley A, Merie A, Kerr DJ, Mortensen N. Colorectal cancer: a multidisciplinary approach. In: *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. Eds: Weinstein WM, Hawkey CJ, Bosch J. Elsevier, Spain, 2005, pp: 421-430
60. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4): 239-57.
61. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis distinct modes death with fundamentally different significance. *Pathol Annu.* 1982; 17: 229-259.
62. Thompson EB. Apoptosis and steroid hormones. *Mol Endocrinol.* 1994; 8: 665-73.
63. Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Review* 1993; 14: 133-150.
64. Ballian N, Hu M, Liu SH, Brunnicardi FC. Proliferation, hyperplasia, neogenesis, and neoplasia in the islets of Langerhans. *Pancreas.* 2007 Oct; 35(3): 199-206.

65. Lumachi F, Basso S. Apoptosis: life through planned cellular death regulating mechanisms, control systems, and relations with thyroid diseases. *Thyroid* 2002; 12(1):27-34.
66. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998; 281: 1317-1321.
67. Toubi E, Shoenfeld Y. Protective autoimmunity in cancer. *Oncol Rep.* 2007; 17(1): 245 -51.
68. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis definition, mechanism and relevance to disease. *Am J Med.* 1999; 107: 489-506.
69. Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993; 341: 1251-1254.70. Thompson CB. Apotosis in the pathogenesis of autoimmune disease. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995; 267: 1456-1462.
70. Mountz JD, Zheu T, Su X, Wu J, Cheng J. The role of programmed cell death as an emerging new concept for pathogenesis of autoimmune disease. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996; 8: 2-14.
71. Marshall JC, Malam Z, Jia S. Modulating neutrophil apoptosis. *Novartis Found Symp.*2007; 280: 53-72.
72. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997; 88: 347-54.
73. Walker NI, Harnon BW, Gobe GC, Kerr JF. Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol.* 1988; 13: 18-54.
74. Wyllie AH. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980; 68: 251-306.
75. Steller H. Mechanism and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267: 1445-1449.
76. Tilly JL. Ovarian follicular artresia as an apoptotic process,aparadigm for programmed cell death in endocrine tissues. *Mol.Cell Endocrinol.* 1992; 84: 19-23.

77. Ruaslathi E, Reed JC. Anchorage dependence integrins and apoptosis. *Cell* 1994; 77: 477-8.
78. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced tymphocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 284: 555-6.
79. <http://www.medix.marshall.edu>.
80. http://en.wikibooks.org/wiki/Human_Physiology/Development:_birth_through_death
81. Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*. 1973; 7: 253-66.
82. Schweichel JU. Elektron microscopic studies on the degradation of the apical ridge during the development of limbs in rat embryos. *Z Anat Entwicklungsgesch* 1972; 136: 192-203.
83. O'Connor TM, Wytttenbach CR. Cell death in the embryonic chick spinal cord. *J Cell Biol*.1974; 60: 448-459.
84. Pilar G, Landmesser L. Ultrastructural differences during embryonic cell death in normal and peripherally deprived ciliary ganglia. *J Cell Biol*. 1976; 68: 339-356.
85. Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol*. 1990; 181: 195-213.
86. Erickson GF. Defining apoptosis: players and systems. *J Soc Gynecol Investig* 1997;4(5): 219-28.
87. <http://www.academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/lysoso.htm>
88. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol*. 2007; 78: 217-45.
89. Hornung JP, Koppel H, Clarke PG. Endocytosis and autophagy in dying neurons: an ultrastructural study in chick embryos. *J Comp Neurol*. 1989; 283(3): 425-37.

90. Salzgeber B, Weber R. The regression of the mesonephros in the chick embryo. A study of acid phosphatase and cathepsin activity. Biochemical, histochemical, and electron microscopic observations. *J Embryol Exp Morphol.* 1966; 15(3): 397-419.
91. Peluso JJ, England-Charlesworth C, Bolender DL, Steger RW. Ultrastructural alterations associated with the initiation of follicular atresia. *Cell Tissue Res.* 1980; 211(1): 105-15.
92. Schwartz's principles of surgery 1096,1097 shf 8. baskı
93. Schwartz's principles of surgery 1126,1127 shf 8. baskı
94. Clarke PG. Identical populations of phagocytes and dying neurons revealed by intravascularly injected horseradish peroxidase, and by endogenous glutaraldehyde-resistant acid phosphatase, in the brains of chick embryos. *Histochem J.* 1984; 16(9): 955-69.
95. <http://www.brh.co.jp>
96. <http://www.uam.es/departamentos/medicina/patologia/150-40x.JPG>
97. Beaulaton J, Lockshin RA. The relation of programmed cell death to development and reproduction: comparative studies and an attempt at classification. *Int Rev Cytol.* 1982;79: 215-35.
98. Wyllie AH, Beattie GJ, Hargreaves AD. Chromatin changes in apoptosis. *Histochem J* 1981; 13(4): 681-92.
99. Pontremoli S, Melloni E, Salamino F, Sparatore B, Michetti M, Horecker BL. Cytosolic Ca²⁺-dependent neutral proteinases from rabbit liver: activation of the proenzymes by Ca²⁺ and substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Jan; 81(1): 53-6.
100. Bowen ID, Morgan SM, Mullarkey K. Cell death in the salivary glands of metamorphosing *Calliphora vomitoria*. *Cell Biol Int.* 1993; 17(1): 13-33.
101. Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family of proteins in apoptosis, apoptosomes or mitochondria? *Genes Cell* 1998; 3: 697-707.

102. Taneja N, Tjalkens R, Philbert MA, Rehemtulla A. Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in a cell free system. *Oncogene*. 2001; 20(2): 167-77.
103. Miyoshito T, Krojewski S, Krowjewski M, et al. Tumor suppressor P53 is regulator of Bcl- 2 and Bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994; 9: 1799-1805.
104. Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 1994; 78(4): 539-42.
105. Beroud C, Soussi T. P53 gene mutation soft wore and database. *Nucleic Cad. Res.* 1998;26: 200-204.
106. Joza N, Susin SA, Dongez E, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001; 41: 549-594.
107. Lane D. P53 guardian of genome. *Nature* 1992; 358: 15-16.
108. Kaellin WG. The emering p53 gene family. *J Nati Cancer Inst* 1999; 91: 594-598.
109. .Durhan E., Kolon kanser tanılı olgularda PCR RFLP metodu ile p53 gen mutasyonlarının saptanması. (Yüksek Lisans Tezi) Afyon Kocatepe Üniversitesi;2006
110. Pehlivan S., Kolorektal tümörlerde telomeraz aktivitesi ve apoptozis ile ilişkisi. (Tez) Fırat Üniversitesi,2008
111. Solakoğlu Z. Apoptoz varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni. *Klinik Gelişim Dergisi*,2009;22(3): 20–25.
112. Akpınar G., Kolon kanserinde apoliprotein e (apo e) gen poliferizminin araştırılması.(Doktora Tezi), Kocaeli Üniversitesi;2006
113. .Oktem S., Özhan M.H., Özol D.Apoptozisin Önemi, *Toraks Dergisi*, 2001; 2(1):91-95
114. Schmitt, C.A. at Lowe, S.W., 1999, Apoptosis and therapy, *J Pathol*, 187, 127-137 p.

115. Paez, J. at Sellers, W.R., 2003, PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling, *Cancer Treat Res*, 115, 145-167 p.
116. Kim, R., Emi, M. at Tanabe, K., 2006, Role of mitochondria as the gardens of cell death, *Cancer Chemother Pharmacol*, 57, 545–553 p.
117. Ulukaya, E., Acilan, C. at Yilmaz, Y., 2011, Apoptosis: why and how does it occur in biology, *Cell Biochem Funct*, 29, 6, 468-480 p.
118. Searle, J., Lawson, T.A., Abbott, P.J., Harmon, B. at Kerr, J.F., 1975, An electron-microscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells, *J. Pathol*, 116, 129-138 p.
119. Zheng, W.; Kollmeyer, J.; Symolon, H.; Momin, A.; Munter, E.; Wang, E.; Kelly, S.; Allegood, J.C.; Liu, Y.; Peng, Q.; Ramaraju, H.; Sullards, M.C.; Cabot, M.; Merrill, A.H., 2006, Ceramides and other bioactive sphingolipid backbone in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling autophagy. *Biochim. Biophys-Acta*, 1758(12), 1864-1884.
120. Furuya, H.; Shimizu, Y.; Kawamori, T., 2011, Sphingolipids in cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, 30(3-4), 567-576.
121. Kolesnick, R.N.; Haimovitz-Friedman, A.; Fuks, Z., 1994, The sphingomyelin signal transduction pathway mediates apoptosis for tumor necrosis factor, Fas, and ionizing radiation. *Biochem. Cell. Biol.*, 72(11-12), 471–474.
122. Goldkorn, T.; Balaban, N.; Shannon, M.; Chea, V.; Matsukuma, K.; Gilchrist, D.; Wang, H.; Chan, C., 1998, H₂O₂ acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J. Cell Sci.*, 111(Pt 21), 3209–3220.
123. Bose, R.; Verheij, M.; Haimovitz-Friedman, A.; Scotto, K.; Fuks, Z.; Kolesnick, R., 1995, Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell*, 82(3), 405–414.

124. Olivera A, Spiegel S., 2001, Sphingosine kinase: a mediator of vital cellular functions. *Prostaglandins*; 64:123–34.
125. Spiegel S, Milstien S., 2002, Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J Biol Chem*;277:25851–4.
126. Bielawska A, Linardic CM, Hannun YA., 1992, Ceramide-mediated biology. Determination of structural and stereospecific requirements through the use of N-acyl-phenylaminoalcohol analogs. *J Biol Chem* ;267:18493–7.
127. Selzner M, Bielawska A, Morse MA, Rudiger HA, Sindram D, Hannun YA, et al., 2001, Induction of apoptotic cell death and prevention of tumor growth by ceramide analogues in metastatic human colon cancer. *Cancer Res*;61:1233–40.
128. Ruvolo, P.P., 2003, Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites, *pharmacological research*, 47, 383-392 p.
129. Norris JS, Bielawska A, Day T, El-Zawahri A, ElOjeimy S, Hannun Y, et al., 2006, Combined therapeutic use of AdGFPFasL and small molecule inhibitors of ceramide metabolism in prostate and head and neck cancers: a status report. *Cancer Gene Ther*;13:1045–51.
130. Musumarra G, Barresi V, Condorelli DF, Scire S., 2003. A bioinformatic approach to the identification of candidate genes for the development of new cancer diagnostics. *Biol Chem* ;384:321–7.
131. Strelow A, Bernardo K, Adam-Klages S, Linke T, Sandhoff K, Kronke M, et al., 2000, Overexpression of acid ceramidase protects from tumor necrosis factor-induced cell death. *J Exp Med*;192:601–12.
132. Mahdy AE, Cheng JC, Li J, Elojeimy S, Meacham WD, Turner LS, et al., 2009, Acid ceramidase upregulation in prostate cancer cells confers resistance to radiation: AC inhibition, a potential radiosensitizer. *Mol Ther*;17:430–8.
133. Bielawska, A.; Greenberg, M.S.; Perry, D.; Jayadev, S.; Shayman, J.A.; McKay, C.; Hannun, Y.A., 1996, (1S,2R)-D-erythro-2-(N-Myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol as an inhibitor of ceramidase. *J. Biol. Chem.*, 271, 12646–12654.

134. Raisova, M.; Goltz, G.; Bektas, M.; Bielawska, A.; Riebeling, C.; Hossini, A.M.; Eberle, J.; Hannun, Y.A.; Orfanos, C.E.; Geilen, C.C., 2002, Bcl-2 overexpression prevents apoptosis induced by ceramidase inhibitors in malignant melanoma and HaCaT keratinocytes. *FEBS Lett.*, 516(1–3), 47–52.
135. Rodriguez-Lafrasse, C.; Alphonse, G.; Aloy, M.T.; Ardail, D.; Gérard, J.P.; Louisot, P.; Rousson, R., 2002, Increasing endogenous ceramide using inhibitors of sphingolipid metabolism maximizes ionizing radiation-induced mitochondrial injury and apoptotic cell killing. *Int. J. Cancer.*, 101, 589–598.
136. Saad, A.F.; Meacham, W.D.; Bai, A.; Anelli, V.; Elojeimy, S.; Mahdy, A.E.; Turner, L.S.; Cheng, J.; Bielawska, A.; Bielawski, J.; Keane, T.E.; Obeid, L.M.; Hannun, Y.A.; Norris, J.S.; Liu, X., 2002, The functional effects of acid ceramidase overexpression in prostate cancer progression and resistance to chemotherapy. *Cancer Biol. Ther.*, 6(9) , 1455–1460.
137. Liu, X.; Elojeimy, S.; Turner, L.S.; Mahdy, A.E.; Zeidan, Y.H.; Bielawska, A.; Bielawski, J.; Dong, J.Y.; El-Zawahry, A.M.; Guo, G.W.; Hannun, Y.A.; Holman, D.H.; Rubinchik, S.; Szulc, Z.; Keane, T.E.; Tavassoli, M.; Norris, J.S., 2008, Acid ceramidase inhibition: a novel target for cancer therapy, *Front. Bioscience*, 13(6), 2293–2298.
138. Selzner, M.; Bielawska, A.; Morse, M.A.; Rüdiger, H.A.; Sindram, D.; Hannun, Y.A.; Clavien, P.A., 2001, Induction of apoptotic cell death and prevention of tumor growth by ceramide analogues in metastatic human colon cancer. *Cancer Res.*, 61(3), 1233–1240.
139. Cuvillier, O.; Levade, T., 2003, Enzymes of sphingosine metabolism as potential pharmacological targets for therapeutic intervention in cancer. *Pharm. Res.*, 47(5), 439–445.
140. Spinedi, A.; Di Bartolomeo, S.; Piacentini, 1999, M. N-Oleoyl ethanolamine inhibits glucosylation of natural ceramides in CHP-100 neuroepithelioma cells: possible implications for apoptosis. *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, 255(2), 456–459.

141. Draper M.J., Xia Z., Smith R.A., Zhuang Y., Wang W., Smith C.D., 2011, Discovery and Evaluation of Inhibitors of Human Ceramidase, *Mol Cancer Ther*, 10, 2052-2061.
142. Herr, I., Wilhelm, D., Böhler, T., Angel, P., and Debatin, K. M. Activation of CD95 (APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis. *EMBO J.*, 16: 6200–6208, 1997.
143. Hannun, Y. Functions of ceramide in coordination cellular response to stress. *Science (Washington DC)*, 274: 1855–1859, 1996.
144. Perry, D., and Hannun, Y. The role of ceramide in cell signaling. *Biochem. Biophys. Acta*, 1436: 233–243, 1998
145. Santana, P., Pena, L., and Haimovitz-Friedman, A. Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell*, 86: 189–199, 1996.
146. Haimovitz-Friedmann, A., Kolesnick, R. N., and Fuks, Z. Ceramide signaling in apoptosis. *Br. Med. Bull.*, 53: 539–553, 1997.
147. Chmura, S. J., Nodzenski, E., Beckett, M. A., Kufe, D. W., Quintans, J., and Weichselbaum, R. R. Loss of ceramide production confers resistance to radiation-induced apoptosis. *Cancer Res.*, 57: 1270–1275, 1997.
148. Basu, S., and Kolesnick, R. Stress signals for apoptosis: ceramide and c-Jun kinase. *Oncogene*, 17: 3277–3285, 1998
149. Bossy-Wetzell, E., Bakiri, L., and Yaniv, M. Induction of apoptosis by the transcription of c-Jun. *EMBO J.*, 16: 1695–1709, 1997.
150. 150.Strelow A, Bernardo K, Adam S, Klages A (2000). Overexpression of acid ceramidase protects from tumor necrosis factor induced cell death. *J Exp Med* 192: 601–611.
151. 151.Seelan RS, Quian C, Yokomiza A, Bostwick G, Smith DI, Liu W (2000). Human acid ceramidase is overexpressed but not mutated in prostate cancer. *Gene Chromosome Canc* 29:137– 146

152. Proksch D, Klein JJ, Arenz C (2011). Potent inhibition of acid ceramidase by novel B-13 analogues. *Journal of Lipids* 2011: 971618
153. Osawa Y, Uchinami H, Bielawski I, Schwabe F, Hannun YA, Brenner DA (2005). Roles of C ceramide and sphingosine 1 phosphate I regulating hepatocyte apoptosis in response to tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 280: 27879–27887.
154. Xu R, Sun W, Jin J, Obeid LM, Mao C (2010). Role of alkaline ceramidases in the generation of sphingosine and its phosphate in erythrocytes. *FASEB J* 24: 2507–2515.
155. Draper JM, Xia Z, Smith RA, Zhuang Y, Wang W, Smith CD (2011). Discovery and evaluation of inhibitors of human ceramidase. *Mol Cancer Ther* 10: 2052–2061.
156. Canals D, Perry DM, Jenkins RW, Hannun YA (2011). Drug targeting of sphingolipid metabolism: sphingomyelinases and ceramidases. *Br J Pharmacol* 163: 694–712
157. Koch J, Gartner S, Li CM, Quintern LE, Bernardo K, Levran O, Schnabel D, Desnick RJ, Schuchman EH, Sandhoff K (1996). Molecular cloning and characterization of a full-length complementary DNA encoding human acid ceramidase. Identification of the first molecular lesion causing Farber disease. *J Biol Chem* 271: 33110–33115.
158. Debatin, K.M.; Krammer, P.H. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* 2004, 23, 2950–2966.
159. Lowe, S.W.; Cepero, E.; Evan, G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* **2004**, 432, 307–315.
160. Maurer, B.J.; Metelitsa, L.S.; Seeger, R.C.; Cabot, M.C.; Reynolds, C.P. Increase of ceramide and induction of mixed apoptosis/necrosis by N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide in neuroblastoma cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999, 91, 1138–1146.

161. Cuvillier, O.; Pirianov, G.; Kleuser, B.; Vanek, P.G.; Coso, O.A.; Gutkind, S.; Spiegel, S. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 1996, 381, 800–803.
162. Hakomori, S.I. Glycosynaptic microdomains controlling tumor cell phenotype through alteration of cell growth, adhesion, and motility. *FEBS Lett.* 2010, 584, 1901–1906.
163. Pchejetski, D.; Golzio, M.; Bonhoure, E.; Calvet, C.; Doumerc, N.; Garcia, V.; Mazerolles, C.; Rischmann, P.; Teissie, J.; Malavaud, B.; et al. Sphingosine kinase-1 as a chemotherapy sensor in prostate adenocarcinoma cell and mouse models. *Cancer Res.* 2005, 65, 11667–11675.
164. Lepine, S.; Allegood, J.C.; Edmonds, Y.; Milstien, S.; Spiegel, S. Autophagy induced by deficiency of sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase 1 is switched to apoptosis by calpain-mediated autophagy-related gene 5 (Atg5) cleavage. *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 44380–44390
165. Van Brocklyn JR, Jackson CA, Pearl DK, Kotur MS, Snyder PJ, et al. (2005) Sphingosine kinase-1 expression correlates with poor survival of patients with glioblastoma multiforme: roles of sphingosine kinase isoforms in growth of glioblastoma cell lines. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 64: 695–705.
166. Li J, Guan HY, Gong LY, Song LB, Zhang N, et al. (2008) Clinical significance of sphingosine kinase-1 expression in human astrocytomas progression and overall patient survival. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14: 6996–7003.
167. Pyne S, Edwards J, Ohotski J, Pyne NJ (2012) Sphingosine 1-phosphate receptors and sphingosine kinase 1: novel biomarkers for clinical prognosis in breast, prostate, and hematological cancers. *Frontiers in oncology* 2: 168.
168. 168.Sphingosine Kinase 1 and Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. Yun Zhang¹, Yan Wang², Zhi Wan¹, Shiping Liu¹, Yu Cao¹, Zhi Zeng^{1*}¹ Department of Emergency, West China Hospital, West China

School of Medicine, Sichuan University, Chengdu, China, 2 Department of Epidemiology, School of Public Health, Jilin Medical College, Jilin, China

169. Siskind, L.J. Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2005**, 37, 143–153.
170. Colombini, M. Ceramide channels and their role in mitochondria-mediated apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, 1797, 1239–1244.
171. Bartke, N.; Hannun, Y.A. Bioactive sphingolipids: Metabolism and function. *J. Lipid Res.* **2009**, 50, S91–S96.
172. Yu, J.; Novgorodov, S.A.; Chudakova, D.; Zhu, H.; Bielawska, A.; Bielawski, J.; Obeid, L.M.; Kindy, M.S.; Gudz, T.I. JNK3 signaling pathway activates ceramide synthase leading to mitochondrial dysfunction. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 25940–25949.
173. Gault, C.R.; Eblen, S.T.; Neumann, C.A.; Hannun, Y.A.; Obeid, L.M. Oncogenic K-Ras regulates bioactive sphingolipids in a sphingosine kinase 1-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 31794–31803.
174. Maceyka, M.; Sankala, H.; Hait, N.C.; le Stunff, H.; Liu, H.; Toman, R.; Collier, C.; Zhang, M.; Satin, L.S.; Merrill, A.H., Jr.; et al. SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 37118–37129
175. Hait, N.C.; Oskeritzian, C.A.; Paugh, S.W.; Milstien, S.; Spiegel, S. Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, 1758, 2016–2026.
176. Siskind L.J.; Feinstein L.; Yu T.; Davis J.S.; Jones D.; Choi J.; Zuckerman J.E.; Tan W.; Hill R.B.; Hardwick J.M.; et al. Anti-apoptotic Bcl-2 family proteins disassemble ceramide channels. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 6622–6630

