

**T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL KOLOREKTAL KANSER MODELİNDE
SİKLOOKSİJENAZ-2 İNHİBİTÖRLERİNİN ETKİNLİĞİ VE
ANJİYOGENEZİSİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Hilal GÜNGÖR**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Nevin İLHAN**

**ELAZIĞ
2014**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez uzmanlık tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Nevin İLHAN

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden “Uzmanlık Tezi” olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nevin İLHAN

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

.....	_____
.....	_____
.....	_____
.....	_____
.....	_____

*Değerli hocam Prof. Dr. Nevin İlhan'a,
Canım annem ve babama,
Sevgili eşim ve biricik yavrularıma*

TEŞEKKÜR

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda; uzmanlık eğitimim süresince; bilgi, beceri, pratik ve teorik birikimlerini bana aktararak mesleki anlamda yetişmemi sağlayan, tez çalışmalarım ve eğitimimin tamamı boyunca hoca olmanın ötesinde bana olan güvenini, desteğini, sevgi ve pozitif yaklaşımını her zaman yanımda hissettiğim değerli danışman hocam ve bölüm başkanımız Prof. Dr. Nevin İLHAN'a, sonsuz saygı, sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Eğitimim süresince yardım ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim Anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Necip İLHAN'a, Prof. Dr. Ferit GÜRSU'ya, Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ'a, Prof. Dr. İhsan HALİFEOĞLU'na, Doç. Dr. Süleyman AYDIN'a, Doç. Dr. Dilara KAMAN'a teşekkür ve saygılarımı sunarım. Tez çalışmalarım süresince değerli vakitlerini ayırarak bana büyük destek sağlayan Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hatice ERÖKSÜZ ve yine aynı anabilim dalında görevli Prof. Dr. Yesari ERÖKSÜZ hocamla Araş. Gör. Burak KARABULUT'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yine çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. İbrahim. H. ÖZERCAN'a ve Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU'na, asistan arkadaşlarıma ve Biyokimya Anabilim Dalı, Merkez laboratuvarında görevli tüm personele teşekkür ederim.

Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Biriminde (FÜDAM) tezimin deneysel çalışmalarını gerçekleştirmemde bana yardımcı olan personele ve Veteriner Hekim Zafer ŞAHİN'e, bu tez çalışmasını TF. 12.33 no'lu proje ile destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projelendirme (FÜBAP) birimine teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi uzmanlık eğitimim boyunca da sevgi, ilgi, sabır ve desteklerini hem benden hem de çocuklarımdan esirgemeyen canım annem ve babama, bu yola çıkarken ve devamında en büyük destekçim sevgili eşim Cum.Sav. Mahmut GÜNGÖR'e ve sahip oldukları en önemli şey olan anneleriyle geçirdikleri vakitlerinden çaldığım biricik yavrularım Buğra Kerem ve Zeynep Deniz'e

Teşekkür etmekten büyük mutluluk duyarım.

Dr. Hilal GÜNGÖR

ÖZET

Kolorektal kanser (KRK) dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin önemli bir sebebidir. KRK'lerin erken tanısı ve tedavisi yaşam sürelerinin iyileştirilmesi açısından önemlidir. Bu çalışmada, deneysel KRK modeli oluşturulan Sprague Dawley cinsi sıçanlarda COX-2 inhibitörlerinin tümör gelişim insidansları ve anjiyogenezis üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Araştırmada sıçanlar 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna 12 hafta boyunca haftada bir, 1 mM EDTA-salin s.c, DMSO ise deney süresince (25 hafta) her gün oral uygulandı. DMH grubuna 1 mM EDTA-salin içinde 25 mg/kg DMH 12 hafta boyunca haftada bir s.c, DMSO 25 hafta her gün oral uygulandı. DMH'le eş zamanlı olarak 8 mg/kg Diklofenak'ın ve 6 mg/kg Selekoksisib'in DMSO içinde günlük oral olarak deney süresince uygulandığı gruplar tedavi grupları olarak belirlendi. Uygulamalar sonunda sıçanlar dekapite edilerek alınan kolorektal doku örneklerinde histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler yapılırken, kan örneklerinde anjiyogenezis parametreleri çalışıldı.

Histopatolojik değerlendirmelerde kontrollerde patolojik değişim izlenmezken, DMH grubunda %62,5 adenokarsinom, %31,25 displazi, %6,25 oranında inflamasyon saptandı. Tedavi gruplarında ise adenokarsinom oranlarında belirgin azalma izlendi. Kontrollerle karşılaştırıldığında DMH grubunda; VEGF, ICAM-1, MMP-2, MMP-9 düzeylerinde, MMP-2/TIMP-2 oranında anlamlı artış saptandı. Tedavi gruplarında ise DMH grubuyla karşılaştırıldığında bu parametrelerin tamamında ve MCP-1 düzeylerinde anlamlı düşüş, TIMP-2 düzeylerinde ise Selekoksisib grubunda anlamlı artış saptandı. İmmünohistokimyasal değerlendirmede, kontrollerle karşılaştırıldığında DMH grubunda MMP-2, MMP-9, Nfκ-B'nin boyanma şiddeti, yaygınlıklarında artış, tedavi gruplarında ise DMH grubuyla karşılaştırıldığında azalma olduğu izlendi. Selekoksisib grubundaki azalma daha belirgindi.

Sonuç olarak, NSAİİ'lerden özellikle COX-2 inhibitörlerinin, KRK oluşum oranlarını azalttığı ve hastalık progresyonunu yavaşlattığı immünohistokimyasal, histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirme sonuçları ile teyit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal kanser, anjiyogenezis, COX-2 inhibitörleri, NSAİİ

ABSTRACT

THE EFFECTIVENESS OF CYCLOOXYGENASE-2 INHIBITORS AND EVALUATION OF ANGIOGENESIS IN THE MODEL OF EXPERIMENTAL COLORECTAL CANCER.

Colorectal cancer (CRC) is an important cause of cancer-related deaths worldwide. Early diagnosis and treatment of CRCs are of importance for improving survival. In the present study, it was aimed to investigate effects of COX-2 inhibitors on tumor development incidence and angiogenesis in Sprague Dawley rats in which an experimental model of CRC was created.

Rats were divided into 4 groups. Control group received 1 mM EDTA saline (SC, weekly) for 12 weeks and DMSO (PO, daily) throughout experiment (25 weeks). DMH group received 25 mg/kg DMH in 1 mM EDTA-saline (SC, weekly) for 12 weeks and DMSO (PO, daily) for 25 weeks. The groups received 8 mg/kg diclofenac and 6 mg/kg celecoxib in DMSO (PO, daily) simultaneously with DMH throughout experiment were identified as treatment groups. The rats were sacrificed by decapitation at the end of experiment. Histopathological and immuno histochemical evaluations were performed in colorectal tissue samples, whereas angiogenesis parameters were studied in blood samples.

In histopathological evaluations, no pathological change was observed in control rats, while adenocarcinoma (62,5%), dysplasia (31,25%) and inflammation (6,25%) were detected in DMH group. In treatment groups, a marked decrease was observed in adenocarcinoma rate. When compared to controls, a significant increase was detected in VEGF, ICAM-1, MMP-2, and MMP-9 levels and MMP-2/TIMP-2 ratio in DMH group. When compared to DMH group, a significant decrease was detected in MCP-1 level and in all above-mentioned parameters, while a significant increase in TIMP-2 levels in celecoxib group. In immunohistochemical studies, there was an increase in intensity and extent of staining of MMP-2, MMP-9 and NFκ-B in DMH group when compared to controls, while a decrease in treatment groups when compared to DMH group. The decrease in celecoxib group was more prominent.

In conclusion, it was confirmed by immunohistochemical, histopathological and biochemical evaluation results that NSAID drugs, particularly COX-2 inhibitors, decrease rate of disease and slow down progression of existing disease in CRCs.

Keywords: Colorectal cancer, angiogenesis, COX-2 inhibitors, NSAID drugs

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
KISALTMALAR LİSTESİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1.Genel Bilgiler	3
1.1.1.Kolorektal Karsinom	3
1.1.1.1. Kolorektal Karsinomların Epidemiyolojisi	3
1.1.1.2. Kolorektal Karsinomların Etiyolojisi	4
1.1.1.2.1. Genetik Faktörler	4
1.1.1.2.2. Çevresel Faktörler ve Diyet	5
1.1.1.2.3. İnflamatuvar Barsak Hastalıkları	6
1.1.1.2.4. Adenomlar	6
1.1.1.3. Kolonun Anatomisi ve Embriyolojisi	6
1.1.1.3.1. Çekum	6
1.1.1.3.2. Çıkan Kolon	7
1.1.1.3.3. Transvers Kolon	7
1.1.1.3.4. İnen Kolon	7
1.1.1.3.5. Sigmoid Kolon	7
1.1.1.3.6. Rektum Anatomisi	8
1.1.1.3.7. Ratlarda Kolon Anatomisi	8
1.1.1.4. Kolonun Histolojisi	9
1.1.1.5. Kolorektal Kanserlerde Histopatoloji	10
1.1.1.6. Kolorektal Karsinogenez	10
1.1.1.7. Kolorektal Karsinom Gelişim Evreleri	12

1.1.1.8. Kolorektal Karsinomda Lokalizasyon	13
1.1.2. NSAİİ'lar ve COX Enzim Yolağı	13
1.1.2.1. NSAİİ'lar'ın Genel Özellikleri	13
1.1.2.2. COX Enzimi	16
1.1.2.3. COX-2 İnhibitörleri	18
1.1.2.3.1. Selekoksib	20
1.1.2.3.2. Diklofenak	22
1.1.2.4. COX-2'nin Moleküler Düzenlenmesi ve Karsinogenez	22
1.1.3. Anjiyogenezis ve İlgili Parametreler	28
1.1.3.1. Anjiyogenezis	28
1.1.3.2. VEGF	30
1.1.3.3. Matriks Metalloproteinazlar (MMP)	31
1.1.3.3.1. Jelatinazlar; MMP-2 ve MMP-9	35
1.1.3.4. Metalloproteinaz Doku İnhibitörleri (TIMP)	36
1.1.3.5. Hücre Adezyon Molekülleri	37
1.1.3.6. Kemokinler	39
1.1.3.7. Nükleer Faktör Kappa B (NF-κB)	40
1.1.4. Kimyasal Karsinojenlerle Deneysel Kanseri Modeli Oluşturma	42
1.1.4.1. Deneysel Kolon Kanseri Modeli	42
1.1.4.2. 1,2 Dimetilhidrazin (DMH) ve Etki Mekanizması	43
2. GEREÇ VE YÖNTEM	45
2.1. Gereç	45
2.1.1. Deney Hayvanları ve Deney Grupları	45
2.1.2. DMH İle Deneysel Kanseri Modeline İlişkin Protokolün Oluşturulması	46
2.1.3. Kullanılan Kimyasalların Hazırlanışı	47
2.1.4. Deney Grupları	47
2.1.5. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması	48
2.2. Yöntem	49
2.2.1. Enzim İmmün Ölçümler	49
2.2.1.1. Plazma VEGF Düzeylerinin Ölçümü	50
2.2.1.2. Plazma ICAM-1 Düzeylerinin Ölçümü	50
2.2.1.3. Plazma MMP-2 Düzeylerinin Ölçümü	50

2.2.1.4. Plazma MMP-9 Düzeylerinin Ölçümü	50
2.2.1.5. Plazma TIMP-2 Düzeylerinin Ölçümü	51
2.2.1.6. Plazma MCP-1 Düzeylerinin Ölçümü	51
2.2.2. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Analizler	51
2.2.2.1. Histopatolojik İncelemelerin yapılışı	51
2.2.2.2. Histopatolojik Sınıflandırma kriterleri	52
2.2.2.3. İmmünohistokimyasal Yöntemin İlkesi	53
2.2.2.4. İmmünohistokimyasal İncelemelerin Yapılışı	53
2.2.3. İstatistiksel Analizler	53
3. BULGULAR	55
3.1. Gruplara Ait Vücut Ağırlığı Değerleri	55
3.2. Gruplara Ait Makroskobik Değerlendirmeler	55
3.3. Biyokimyasal Değerlendirmeler	65
3.3.1. Plazma VEGF Düzeyleri	65
3.3.2. Plazma ICAM-1 Düzeyleri	65
3.3.3. Plazma MMP-2 Düzeyleri	66
3.3.4. Plazma MMP-9 Düzeyleri	67
3.3.5. Plazma TIMP-2 Düzeyleri	68
3.3.6. Plazma MMP-2/ TIMP-2 Oranları	68
3.3.7. Plazma MCP-1 Düzeyleri	69
3.4. Tüm Gruplarda Kolorektal Dokunun Histopatolojik Değerlendirmesi	70
3.5. Tüm Gruplarda Kolorektal Dokunun İmmünohistokimyasal Değerlendirmesi	80
3.5.1. MMP-2 İmmünreaktivitesinin Değerlendirilmesi	80
3.5.2. MMP-9 İmmünreaktivitesinin Değerlendirilmesi	81
3.5.3. Nfκ-B İmmünreaktivitesinin Değerlendirilmesi	82
4. TARTIŞMA	84
5. KAYNAKLAR	105
6. ÖZGEÇMİŞ	137

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. İnsanlarda metalloproteinaz ailesinin üyeleri	32
Tablo 2. Standart rat yemi	45
Tablo 3. Gruplara ait plazma MMP-2, MMP-9, TIMP-2 düzeyleri ve MMP-2/TIMP-2 Oranları	69
Tablo 4. Gruplara ait plazma VEGF, ICAM-1, MCP-1 düzeyleri	70

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Rat Kolon Anatomisi	9
Şekil 2.	WNT/Beta-Katenin Sinyal Yolağı	11
Şekil 3.	Kolon kanseri gelişiminin moleküler modeli	13
Şekil 4.	Prostanoid sentez yolağı ve spesifik reseptörleri:	16
Şekil 5.	COX enzimleri ve Eikosanoidlerin sentezi. Fizyolojik ve patofizyolojik etkileri	17
Şekil 6.	COX inhibisyonunun seçicilik spektrumu. Klasik NSAİİ'ların ve COX-2 inhibitörlerinin, COX-1 ve COX-2 üzerine göreceli etkileri	19
Şekil 7.	Selekoksib'in kimyasal yapısı	21
Şekil 8.	Diklofenak'ın kimyasal yapısı	22
Şekil 10.	COX-2 ve APC yolağı	25
Şekil 11.	PG sentez yolağı ve PGE ₂ 'nin kanser gelişimi üzerine etkileri	27
Şekil 12.	Anjiogenezis oluşum sürecinin şematik şekli	29
Şekil 13.	Tümoral anjiyogenezis ve etkili parametreler	30
Şekil 14.	Matriks metalloproteinaz domain yapısı	33
Şekil 15.	Kanser oluşum sürecinde MMP'lerin rolleri	34
Şekil 16.	Jelatinazların genel yapısı	35
Şekil 17.	NF-κB Aktivasyon yolağı	41
Şekil 18.	Kontrol Grubunda genel görünüm	56
Şekil 19.	DMH Grubunda tüy dökülmesi, tüylerde renk değişikliği	56
Şekil 20.	DMH Grubunda sırt bölgesinde tüy dökülmesi	57
Şekil 21.	DMH Grubunda rektal kanama	57
Şekil 22.	Orta hat laparotomi ile abdominal kavitenin açılması	58
Şekil 23.	DMH Grubunda kolonla çevre dokular arasında adezyonlar	58
Şekil 24.	DMH Grubunda kolonda invajinasyon	59
Şekil 25.	DMH Grubunda kolonda invajinasyon ve megakolonla birlikte genel görünümde bozulma	59
Şekil 26.	Kolon lümeninde geçişi tamamen engelleyen tıkanıklık ve tıkanıklığın üst kısmında lümen içeriğinin birikimi.	60
Şekil 27.	Kolorektal dokunun bütünlüğü bozulmadan çıkarılmış hali	60

Şekil 28.	Lümen içeriği temizlenmiş kolorektal dokuda tümoral oluşuma ait makroskopik görünüm	61
Şekil 29.	Longitudinal olarak açılmış kolonun distal parçası	61
Şekil 30.	DMH Grubunda çekumda lokalize kolon lümeninde geçişe izin vermeyerek tıkanıklığa neden olan tümoral oluşum.	62
Şekil 31.	Çekumda lokalize tümörün kesitsel görüntüsü	62
Şekil 32.	DMH Grubunda karaciğerde lokalize ve karaciğerin bir lobunu tamamen destrüksiyona uğratmış tümoral oluşum.	63
Şekil 33.	DMH Grubunda karaciğerde bir lobda lokalize küçük tümöral oluşumlar.	63
Şekil 34.	DMH Grubunda karaciğerde nekrotik bir alan.	64
Şekil 35.	DMH Grubunda böbrek yüzeyinde tümoral oluşum.	64
Şekil 36.	Gruplara ait plazma VEGFdüzeyleri	65
Şekil 37.	Gruplara ait plazma ICAM-1düzeyleri	66
Şekil 38.	Gruplara ait plazma MMP-2 düzeyleri	67
Şekil 39.	Gruplara ait plazma MMP-9 düzeyleri	67
Şekil 40.	Gruplara ait plazma TIMP-2 düzeyleri	68
Şekil 41.	Gruplara ait plazma MMP-2/TIMP-2 oranları	699
Şekil 42.	Gruplara ait plazma MCP-1düzeyleri	70
Şekil 44.	Kontrol Grubunda kolonda normal histopatolojik görünüm.	72
Şekil 45.	Kontrol Grubunda kolonda normal histopatolojik görünüm.	72
Şekil 46.	DMH Grubunda kolonda invaziv karsinoma ait histopatolojik görünüm.	73
Şekil 47.	DMH Grubunda kolonda invaziv müsinöz adeno karsinoma ait histopatolojik görünüm.	73
Şekil 48.	DMH Grubunda kolonda invaziv karsinom. Normal dokudan kansere geçişe ait histopatolojik görünüm.	74
Şekil 49.	DMH Grubunda kolonda invaziv karsinom. Atipik hücrelere ait histopatolojik görünüm.	74
Şekil 50.	DMH Grubunda kolonda invaziv karsinom. Kas dokusuna invazyona ait histopatolojik görünüm.	75

Şekil 51.	DMH+Diklofenak Grubunda kolonda normal histopatolojik görünüm.	75
Şekil 52.	DMH+Diklofenak Grubunda kolonda inflamasyon,inflamatuvar hücre infiltrasyonuna ait histopatolojik görünüm.	76
Şekil 53.	DMH+Diklofenak Grubunda kolonda displastik değişiklikler ve lenfoid hiperplaziye ait histopatolojik görünüm.	76
Şekil 54.	DMH+Diklofenak Grubunda kolonda displastik değişikliklere ait histopatolojik görünüm.	77
Şekil 55.	DMH+Diklofenak Grubunda kolonda invaziv karsinoma ait histopatolojik görünüm.	77
Şekil 56.	DMH+Selekoksib Grubunda kolonda normal histopatolojik görünüm.	78
Şekil 57.	DMH+Selekoksib Grubunda kolonda inflamasyon,polimorfonüveli(PMN) lökosit infiltrasyonuna ait histopatolojik görünüm..	78
Şekil 58.	DMH+Selekoksib Grubunda kolon epitelinde displastik değişikliklerle birlikte bozulmaya başlamış bez yapısı, lenf nodu hiperplazisi ve submukozal ödeme ait histopatolojik görünüm.	79
Şekil 59.	DMH+Selekoksib grubunda sadece bir hayvanda tespit edilen invaziv karsinoma ait histopatolojik görünüm	79
Şekil 60.	DMH+Selekoksib Grubunda sadece bir hayvanda tespit edilen invaziv karsinomda peritümoral alandaki yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonlarına ait histopatolojik görünüm.	80
Şekil 61.	MMP-2'nin gruplara ait immünohistokimyasal boyanma özellikleri.	81
Şekil 62.	MMP-9'un gruplara ait immünohistokimyasal boyanma özellikleri.	82
Şekil 63.	Nfκ-B'nin gruplara ait immünohistokimyasal boyanma özellikleri.	83

KISALTMALAR LİSTESİ

AA	: Araşidonik Asit
AAPC	: Ailesel Adenomatöz Polipozis Koli
Ab	: Antikor
Ag	: Antijen
AOM	: Azoksimetan
APC	: Adenomatöz Polipozis Koli
Arg	: Arjinin
Bcl-2	: B Hücreli Lenfoma-2
C	: Sistein
CC-kemokinler	: Beta-kemokinler
CCL-2	: CC Kemokin Ligand-2
COX	: Siklooksijenaz
CTLA4 mAb	: Sitotoksik T lenfosit antijen 4m antikoru
CXC	: Alfa-kemokinler
CXCL	: Kemokin Ligandları
DMH	: Dimetilhidrazin
DMSO	: Dimetilsülfoksit
E2F	: Transkripsiyon uzama faktörü-2
ED50	: Medyan etkin doz
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetikasit
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
EIA	: Enzim İmmün Ölçüm
ELISA	: Enzim Bağlı İmmunosorbant Ölçüm
EMIT	: Enzim-Multipl İmmunoassay Teknik
ERK	: Ekstraselüler Regüle Eden Kinaz
ESM	: Ekstraselülmatriks
FAP	: Familyal Adenomatöz Polipozis
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Birimi
GSK-3β	: Glikojen Sentaz Kinaz- 3β
HE	: Hematoksilen-Eozin

HIF-1	: Hipoksiyle İndüklenen Transkripsiyon Faktör-1
HNPCC	: Kalıtsal Nonpolipozis Kolon Sendromları
HPH	: Hemopoetik Progenitör Hücre
IC50	: Bir ilacın, hedef etkisinin yarısını göstermesi için gerekli olan konsantrasyonu
ICAM-1	: Hücreler Arası Adezyon Molekül-1
IFN- γ	: İnterferon-gama
Ig	: İmmünglobülin
IL	: İnterlökin
Ile	: İzolosin
IκB	: İnhibitör kappa B
IκK	: İnhibitör kappa B Kinaz
i.m	: İntramüsküler
İHK	: İmmünohistokimya
JNK	: C-Jun NH2-Terminal Kinaz
K-ras	: Rat Anjiyo Sarkom
KRK	: Kolorektal Kanser
LEF-1	: Lenfoid Geliştiren Faktör-1
LFA-1	: Lenfosit Fonksiyon İlişkili Antijen-1
LOH	: Heterozigozite Kaybı
Mac-1	: Makrofaj Antijen-1
MAPK	: Mitojen-Aktive Eden Protein Kinaz
MAPKP-1	: Mitojenle Aktive Protein Kinaz Fosfataz-1
MCP-1	: Monosit Kemoatraktan Protein-1
MEK	: MAPK/ERK Kinaz
MEKK	: MAPK Kinaz Kinaz
MKK	: MAPK Kinaz
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MNNG	: N-metil-N-nitro-N-nitrozoguanidin
MNU	: N-metil- N-nitrozüre

mRNA	: Mesajcı Ribonükleik asit
MT-MMP	: Membran tipi MMP
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NF-κB	: Nükleer Faktör kappa B
NO	: Nitrik Oksit
NSAİİ	: Nonsteroid Antiinflatuvar İlaç
PAR-1	: Proteinaz Aktive Reseptör
PARP	: Poli(ADP riboz) Polimeraz
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PDK	: 3-Fosfoinositide-Bağlı Kinaz
PG	: Prostaglandin
PGHS	: Prostaglandin Endoperoksit Sentaz
PGI₂	: Prostatiklin
PGP	: Prolinglisin-Prolin
Phe	: Fenilalanin
PI3-K	: Fosfatidilinozitol 3-kinaz
Pig	: Plazminojen
PKB	: Protein kinaz B
PKCβ2	: Protein Kinaz C beta 2
PMNL	: Polimorfonükleer Lökositlerin
PPAR δ	: Peroksizom Proliferatör Aktive Edici Reseptör
Rb	: Retinoblastom geni
s.c	: Subkutan
sICAM-1	: Solubl Hücreler Arası Adezyon Molekül-1
SRC	: Protein Kinaz Aktivitesi Gösteren Gen
TCF-4	: T-Hücre sel Faktör 4
TERT	: Telomerik Reverse Transkriptaz
TGF-β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü- β
TIMP	: MMP'ların Spesifik Doku İnhibitörleri
TKR	: Tirozin Kinaz Tipi Reseptör
TNFα	: Tümör Nekrozis Faktör-alfa
TX	: Tromboksan

USFDA : Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
Val : Valin
VCAM-1 : Vasküler Hücresel Adezyon Molekülü-1
VEGF : Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
VEGF-R : Vasküler Endotel Büyüme Faktörü Reseptörü
WHO : Dünya Sağlık Örgütü
Wnt : Wingless ve Int-1 Genleri

1. GİRİŞ

Kolorektal karsinom; gelişmiş ülkelerde önemli oranda morbidite ve mortaliteye sebep olan bir kanser türüdür. Görülme sıklığı açısından değerlendirildiğinde Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre kolorektal kanser (KRK) her iki cinsiyette de en sık görülen üçüncü kanser türü olmuştur (1). Yine WHO verilerine göre her yıl yaklaşık 945 bin kişi KRK nedeniyle hastalanmakta ve yaklaşık 500 bin kişi KRK nedeniyle hayatını kaybetmektedir (2).

Kolonun malign (kötü huylu) tümörleri mikroskopik olarak değerlendirildiğinde; adenokarsinom, melanom ve sarkom olarak 3 grup altında sınıflandırılır. Mevcut bir adenomun malign tümoral dönüşümü en az 5 yıl, ama çoğunlukla 10-15 yıllık bir süreçte gerçekleşir (3). Solid tümörlerin tamamında olduğu gibi kolorektal tümörlerin gelişim ve metastaz aşamalarında da anjiyogenezis kritik bir öneme sahiptir. Hipoksi ve beraberinde tam olarak tanımlanamamış bir takım uyarılar, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi anjiyogeneziste etkili faktörlerin salınmasına aracılık eder. Ekstraselülmatriks (ESM) ve onu çevreleyen hücrelerle, endotel hücreleri ve tümör hücrelerinden salınan bu büyüme faktörleri, sitokinlerle beraber kendilerine ait reseptörlerin endotel hücrelerini uyarmaları sonucunda anjiyogenezi başlatırlar (4).

Tümör büyümesi için anjiyogenezis zorunludur. Anjiyogenezis, ESM'in tekrar şekillenmesini gerektiren bir aşamadır (5). Tümör hücrelerinin oluşum ve gelişim aşamaları, tümör hücresinin tümöre komşu diğer hücrelerle (fibroblast, inflamatuvar hücreler vb) olan etkileşimine bağlıdır. Bu aşamada özellikle tümör hücrelerinin stromal hücrelerle arasındaki ilişki tümör invazyonu ve metastazı açısından oldukça önemlidir. Tümöral hücrelerden kemotaktik faktörlerin salınımı, inflamatuvar hücrelerin tümör bölgesine göçüyle bu bölgede makrofaj, monosit gibi inflamatuvar hücrelerden salınan büyüme faktörleri ve sitokinlerin artışına yol açmaktadır. Sitokinlerdeki bu artışla birlikte stromal hücrelerden ESM'i yıkan proteaz salınımı uyarılır (6,7).

Monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1)'i de içeren kemokinler ve bunlara ait reseptörler de anjiyogenezisle birlikte tümör büyümesi ve kök hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde önemli role sahiptirler. Bu rol, anjiyogenezis ve

tümör büyümesini modüle ederken, kök hücre proliferasyonunu inhibe etme yönündedir (8).

Kanser gelişim sürecinde kalıcı bir inflamasyon gelişimiyle birlikte büyüme faktörleri ve sitokinlerin artışıyla uyarılan artmış matriksmetalloproteinaz (MMP) ekspresyonun da olduğu gösterilmiştir. Bu aşamada tümör hücresinin temel amacı, yerleştiği dokunun olanaklarını kullanarak kendi metabolizmasını daha ekonomik hale getirmektir (9). MMP'lar ESM ile bazal membran bileşenlerini parçalama özelliğine sahip olan ve aktif bölgesinde çinko içeren bir enzim ailesidir. MMP'lar yeniden yapılanma, morfogenezis, uterus involüsyonu, kemik resorpsiyonu, yara iyileşmesi ve normal gelişimsel süreç gibi fizyolojik durumların yanı sıra tümör hücresi invazyonu, anjiyogenezis ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de önemli rol oynarlar (10). MMP'ların spesifik doku inhibitörleri (TIMP)'lar in vivo şartlarda bu enzimlerin aktivitesinin regülasyonunda önemli rol oynarlar. MMP'lar ve TIMP'ların arasındaki oran çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde değişmekte ve bu durum farklı patolojik durumların patogenezinde önemli bir rol oynayabilmektedir (10-12).

MMP'lerin anjiyogenik etkilerinin yanı sıra endostatin oluşumuna katkıda bulunarak gösterdikleri anti-anjiyogenik etkileri, anjiyogenezin regülasyonu sürecinde proteinler arası etkileşimin karmaşıklığı açısından önemlidir (13).

Transkripsiyonel bir faktör olan Nükleer faktör kappa B (NF- κ B) de MMP'lara benzer şekilde invazyonla ilişkili faktörlerin transkripsiyonel olarak düzenlenmesi yoluyla gerçekleşen tümör gelişim sürecinde büyük öneme sahiptir (14). Bunun yanı sıra, NF- κ B sinyal yolağı ile apoptozisin baskılanması sonucu kanser hücrelerinin gelişimine izin verildiği gösterilmiştir (15).

Hücre adezyon molekülleri, hücre-hücre etkileşimlerinde ve hücre ile hücre dışı matriks bileşenleri arasındaki etkileşimlerde önemli rol oynamaktadır. Kanser hücrelerinin adezyon özelliklerindeki değişimler, bu hücrelerin malign potansiyel kazanmalarını önemli ölçüde etkilemektedir (16).

Adezyon molekülleri başlıca, immünglobülin (Ig) superfamilyası, selektinler, integrinler ve kaderinler olmak üzere dört ana sınıfa ayrılırlar. Ig superfamilyasının birer üyesi olan intersellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve vasküler hücresel adezyon molekülü-1 (VCAM-1), tümöral yapıya infiltre olarak hücresel ve humoral immün cevap yoluyla tümörün sitolizine katkıda bulunmaktadır (17).

Tümör hücreleri uzun bir süre sessiz kaldıktan sonra karsinojenik etkiyle malign potansiyel kazanırlar ve kontrolsüz çoğalmaya başlarlar. Daha sonrasında anjiyogenezin devreye girmesiyle tümör ilerleyişi hızlı bir döneme girer. Bu göz önünde bulundurulduğunda damarlanma başlamadan ya da henüz minimal düzeyde iken bu yönde uygulanacak etkin tedavi yöntemleri ile başarılı sonuçlar alınabilecektir.

Tedavide antiinflamatuvar etkinliğinden yararlanan siklooksijenaz inhibitörleri de etkin tedavi ajanı olarak literatürlerde yerlerini almışlardır. Siklooksijenaz (COX) enziminin farklı genler tarafından kodlanan COX-1 ve COX-2 olmak üzere başlıca iki izoformu vardır (18, 19).

COX-2'nin birçok karsinom tipinde ekspresyonu artmıştır. COX-2'nin neoplastik büyümeyi indükleyerek, anjiyogenez ve tümör invazivliğinde rol oynadığı, yanı sıra apoptoza direnci arttırdığı bilinmektedir (20, 21).

Birçok çalışmada KRK'larda COX-2 overekspresyonu gösterilmiştir. Son zamanlardaki çalışmalardan elde edilen sonuçlar COX-2 ekspresyonunun kolon karsinom patogenezi üzerine belirgin etkisi olduğunu göstermektedir (18, 22).

Bu çalışmanın temel amaçlarından biri; ratlarda 1,2 dimetilhidrazinle (DMH) indüklenmiş kolorektal tümörlerde özellikle anjiyogenez sürecindeki etkinlikleri bilinen VEGF, MMP-2, MMP-9, ICAM-1, MCP-1, doğal bir metalloproteinaz inhibitörü olan TIMP-2 ile transkripsiyonel bir faktör olan NF- κ B düzeylerinin değerlendirilmesi ve yukarıda bahsedilen mekanizmalar göz önünde bulundurulduğunda COX-2 inhibitörleri gibi moleküler hedefe yönelik ajanların uygulanmasının bu tümörler üzerine etkinliğinin araştırılmasıdır.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Kolorektal Karsinom

1.1.1.1. Kolorektal Karsinomların Epidemiyolojisi

WHO verilerine göre KRK her iki cinsiyette de en sık görülen üçüncü kanser türü olmuştur (1). Kansere bağlı en sık ölüm nedenleri arasında ise erkeklerde ikinci ve kadınlarda ise üçüncü sırayı almaktadır (23). Her yıl bir milyona yakın kişi KRK'e yakalanmakta ve yaklaşık beş yüz bin kişi KRK'e bağlı olarak ölmektedir (24). T.C Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı'nın yaptığı istatistiklere göre ise kolorektal kanser, akciğer kanseri, meme kanseri ve mide kanserini takiben

4. sırada yer almaktadır. Her iki cinsiyet için de yaşamları boyunca KRK gelişme riski % 13,2 civarındadır (25). Yaşla beraber her iki cinsiyette de görülme sıklığı artmaktadır ve özellikle 75 yaş üzerinde hem kadın hem de erkeklerde en sık görülen kanser türü olmuştur (26). Yaşa bağlı insidans ve mortalite oranları ise sırasıyla kadınlarda 100.000'de 37,5 ve 14,1 iken, erkeklerde daha yüksek olup sırasıyla 100.000'de 52,2 ve 20,5 olarak saptanmıştır (27).

1.1.1.2. Kolorektal Karsinomların Etiyolojisi

KRK'ler hem sporadik (~%95) hem de kalıtsal (~%5) olarak ortaya çıkabilir. Etiyolojilerinde çevresel ve genetik faktörlere ek olarak prekanseröz hastalıklar da rol oynamaktadır (28).

1.1.1.2.1. Genetik Faktörler

KRK'lerin ortaya çıkışında genetik değişikliklere ait özellikler önemli rol oynar. Kolorektal kanserler, malign dönüşümde genetik ve hücresel olaylar zinciri açısından oldukça detaylı araştırılmış bir kanser tipidir. Sporadik olarak gelişen KRK vakalarında adenomatöz poliplerin ortaya çıkışı ve devamında tümör dokusunun gelişiminden, iki vuruş modeli (two-hit hipotezi) sorumlu tutulmuştur. Adenomlarda, adenomatöz polipozis koli (APC) geninin her iki kopyasında da kayıp olması, APC mutasyonu ile birlikte hücre siklusunun kontrolden çıkması ve tümoral dönüşümle epitel hücrelerinin kaybı ile sonuçlanır. Sporadik tümörlerde ise tümörü çevreleyen normal dokuda benzer kaybın izlenmemesi bu görüşü desteklemektedir (29). Adenomların çok büyük bir kısmında APC gen mutasyonu tespit edilmiştir (30). Bunu takiben ortaya çıkan çeşitli değişiklikler tümör oluşum aşamalarının gerçekleşmesine yol açarlar ve çevresel faktörler de KRK'lerin ortaya çıkışını hızlandırabilir. Bu kanserlerde kalıtım şekli mendeliyan değildir (29).

Başlıca kalıtsal kolorektal kanser tipleri;

- a) Familial Adenomatöz Polipozisler (FAP)
- b) Kalıtsal Nonpolipozis Kolon Sendromları (HNPCC)= Lynch Sendromu
- c) Hamartamatöz Polipozis Sendromları

a) Familial Adenomatöz Polipozisler (FAP):

Otozomal dominant kalıtılan bu hastalıkta kolonda yüzlerce benign polip mevcuttur. Mevcut poliplerin malignleşme potansiyeli vardır (28).

FAP'in üç farklı varyantı bulunmaktadır (28);

- Gardner Sendromu
- Turcot Sendromu
- Ailesel Adenomatöz Polipozis Koli (AAPC)

b) Kalıtsal Nonpolipozis Kolon Sendromları (HNPCC)= Lynch Sendromu:

APC gen mutasyon mekanizmasına ek olarak hatalı eşleşme tamir (mismatch repair=MMR) genlerindeki mutasyonların bu hastalığın patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir (31).

HNPCC için Amsterdam kriterleri tanımlanmıştır (32). Buna kriterlere göre:

- KRK aile üyelerinin en az üçünde olmalıdır.
- Üç aile üyesinden bir tanesi, diğer ikisinin birinci dereceden akrabası olmalıdır.
- Birbirini takip eden en az iki nesil KRK'dan etkilenmiş olmalıdır.
- Etkilenen aile üyelerinin en az bir tanesinde 50 yaşından daha önce KRK ortaya çıkmalıdır.
- Kanser tanısı patolojik olarak doğrulanmalıdır.

c) Hamartamatöz Polipozis Sendromları (33):

- Peutz-Jeghers Sendromu
- Familial Juvenil Polipozis
- Hereditör karışık yapıli Polipozis Sendromu
- PTEN Hamartom Tümör Sendromu

1.1.1.2.2. Çevresel Faktörler ve Diyet

KRK görülme sıklığı toplumların diyet alışkanlığı ile oldukça ilişkilidir. Özellikle sedanter yaşam tarzına sahip, hayvansal yağlardan zengin, yüksek kalorili diyetle beslenen kişilerde görülme oranı daha fazladır (34). Epidemiyolojik çalışmalar uzun süreli et tüketiminin kolorektal tümörler için önemli bir risk faktörü olduğunu ortaya koymuştur (35). Bunun yanı sıra alkol tüketimi, sigara kullanımı, obezitenin de risk faktörü olduğu bilinmektedir (36, 37). Sebze ve meyveden zengin diyetle beslenmeye bağlı artmış folik asit alımı (38), fiziksel aktivite, östrojen replasman tedavisi ve uzun süreli nonsteroid antiinflatuvar ilaç (NSAİİ) kullanımı gibi durumlar ise KRK insidansını azaltmaktadır (34).

Epidemiyolojik faktörlerle KKK arasındaki ilişkinin temelinde yatan moleküler sebepler kesin olarak aydınlatılamamıştır. Etin pişirilmesi esnasında ortaya çıkan heterosiklik aminlerin fekal safra asitlerini uyarması ve reaktif oksijen radikallerinin üretiminin bu yolda olası bir mekanizma olduğu düşünülmektedir (39). Folik asit gibi sebze antikarsinojenleri ve antioksidanlar detoksifiye enzimleri indükler. Lif fermentasyonu neticesinde koruyucu özellikteki uçucu yağ asitleri üretilir. Barsaktan hızlı geçişe bağlı olarak kolorektal epitelyumla temas azalır (38).

Bunların yanı sıra terapötik pelvik radyasyon da etiyolojide rol oynayan çevresel nedenler arasındadır (40, 41).

1.1.1.2.3. İnflamatuvar Barsak Hastalıkları

KKK gelişiminde bir diğer etiyolojik risk faktörü de inflamatuvar barsak hastalıklarının iki majör formu olan Ülseratif kolon ve Chron hastalığıdır (42, 43). Ülseratif kolit premalign bir hastalık olarak kabul görmektedir. Ülseratif kolitin KKK'ye bağlı ölüm oranlarını yaklaşık 4,4 kat arttırdığı yapılan popülasyon temelli çalışmalarda gösterilmiştir. Klinik çalışmalarda ise bu oran daha yüksektir ve ülseratif kolitin KKK insidansını 20 kat arttırdığını göstermektedir. Chron hastalığı ise KKK insidansını 3 kat arttırmaktadır (39).

1.1.1.2.4. Adenomlar

KKK'lerin büyük bir çoğunluğunun adenom zemininden geliştiği kabul edilmektedir (44-46). Sporadik kolorektal karsinomların yaklaşık %80'inde görülen APC/ β -katenin yolundaki defekt sonucu adenom- karsinom dönüşümü, lokalize bir epitel proliferasyonu ile küçük adenomların oluşumuyla başlamakta bunların progresif olarak genişlemesiyle devam ederek invaziv kanserle sonuçlanmaktadır (30).

1.1.1.3. Kolonun Anatomisi ve Embriyolojisi

Kolon, gastrointestinal sistemin ileoçekal valv ile rektosigmoid köşe arasındaki yaklaşık 150 cm'lik bölümünü teşkil eder. Sırasıyla çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon ve sigmoid kolon şeklinde devam ederek rektosigmoid köşede rektum ile birleşir (47).

1.1.1.3.1. Çekum

Kalın barsağın ilk parçası çekumdur. Tüm yüzeyleri periton ile örtülüdür. Kolonun en geniş kısmı olan çekum yaklaşık 7,5–8,5 cm çaptadır. Kolon ilerledikçe

belirgin olarak daralır, en dar olduğu kısmı ise 2,5 cm çapı ile sigmoid kolondur. Buna bağlı olarak, çekum tümörleri klinik olarak semptom verdiklerinde büyük boyutlarda olmalarına rağmen, sigmoid kolon tümörleri küçük boyutlardayken bile semptom verirler. Distal kolon obstruksiyonuna bağlı perforasyonun en sık görüldüğü yer de çekumdur (48, 49).

Çekumun iç yan ve arka yüzüne, ileoçekal valvin 2 cm altına appendiks açılır. Ortalama uzunluğu 9 cm (2-20) olup, kör olarak sonlanan tübüler bir yapıdır (50).

1.1.1.3.2. Çıkan Kolon

Çekumdan itibaren yukarı karaciğer sağ lob komşuluğuna kadar ilerleyen kolon bölümüdür, burada hepatik fleksurayı oluşturarak transvers kolon olarak devam eder. Yaklaşık uzunluğu 15-20 cm'dir. Ön ve yan kısımları periton ile kaplıdır, arka kısımda gözeli toldt fasyası aracılığıyla karın arka duvarına tutunur. Yan periton ile toldt fasyasının birleştiği nokta toldt çizgisidir (50).

1.1.1.3.3. Transvers Kolon

Sağ kolonun köşesinden başlayan transvers kolon batını sağdan sola kat eder, dalağın ön kısmında sol kolonun köşesini oluşturarak (ki bu kısım splenik fleksuradır) buradan itibaren aşağı döner. Ortalama uzunluğu 50 cm'dir ve tamamı periton ile kaplıdır. Pankreas ve sol böbrek kapsülüne mezosu aracılığıyla asılarak batını alt ve üst olmak üzere iki bölüme ayırır. Enfeksiyonların batin içine yayılımını engellemek açısından bu oluşum önemli bir bariyer oluşturur. Omentum majus, transvers kolonun ön-üst kısmına yapışarak ince barsakları önden örter ve aşağıya pelvise doğru uzanır (50, 51).

1.1.1.3.4. İnen Kolon

Splenik fleksuradan başlayarak pelvis girişine kadar ki yaklaşık 25 cm'lik kolon parçasıdır. Pelvis girişinde sigmoid kolon şeklinde devam eder. Ön ve yan kısımları periton ile kaplıyken arka kısmında periton yoktur (50, 51).

1.1.1.3.5. Sigmoid Kolon

İnen kolonun devamı sigmoid kolondur. Yaklaşık 40 cm olan boyu değişkenlik gösterir. Rektosigmoid köşeden itibaren rektum olarak devam eder. Tamamı peritonla kaplıdır. Mezosu aracılığıyla ters v şeklinde batin arka duvarına tutunur. Üreter, mesane, kadınlarda uterus, iliak arter, sakral plexus, priform kası ile komşuluğu vardır (47, 51).

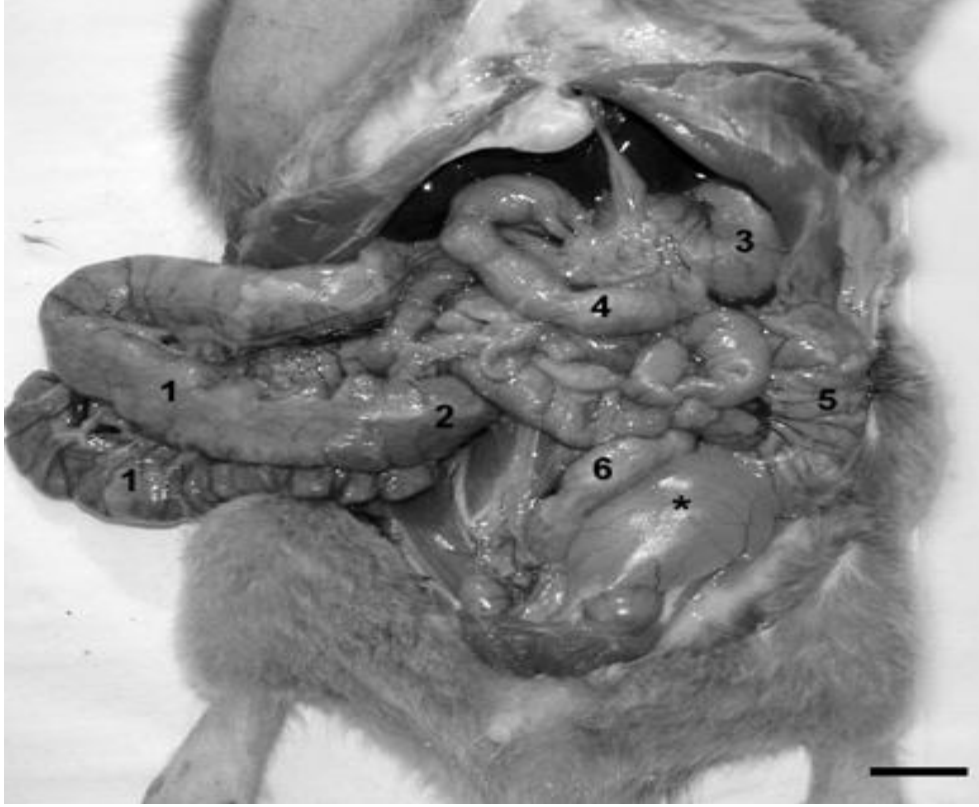
1.1.1.3.6. Rektum Anatomisi

Rektum, yaklaşık olarak 12-15 cm uzunluğundadır. Rektum lümenine doğru uzanan Houston valfleri diye adlandırılan üç ayrı submukozal kıvrım içerir. Arkada presakral fasya, presakral venöz pleksus ve pelvik sinirleri rektumdan ayırır. S4 seviyesinden itibaren rektosakral fasya (Waldeyer Fasyası) öne ve aşağı doğru uzanarak anorektal bileşke seviyesindeki fasia propriayaya yapışır (51). Denonvilliers fasyası rektumu erkekte prostat ve seminal vezikülden ayırırken, kadında ise vaginadan ayırır. Lateral ligamentler rektumun alt bölümünü destekler. Cerrahi anal kanal 2-4 cm uzunluğunda olup anorektal bileşkeden başlar, anal girişte biter ve genellikle erkeklerde kadınlardan daha uzundur. Dentate ya da pektinate line kolumnar rektal mukoza ile skuamöz anoderm arasında bulunan geçiş bölgesini işaret eder. Dentate çizginin 1-3 cm proksimalindeki mukozanın histolojik yapısı; kolumnar, küboidal ve skuamöz epitelin özelliklerine sahiptir ve bu bölge anal geçiş bölgesi (anal transion zone) olarak anılır. Dentate çizgi etrafında Morgagni kolonları olarak bilinen longitudinal mukoza kıvrımları vardır. Morgagni kolonlarına anal kriptler boşalır (52). Distal rektumda iç düz kas kalınlaşarak internal anal sfinkteri meydana getirir. Bu da subkutan, süperfisiyal ve derin eksternal sfinkter ile çevrilmiştir. Derin eksternal anal sfinkter puborektal kasın bir uzantısıdır. Puborektalis, ileokoksigeus ve pubokoksigeus kasları pelvik tabanın levator ani kaslarını oluşturur (52).

1.1.1.3.7. Ratlarda Kolon Anatomisi

Ratların gastrointestinal sistem anatomisi temelde insan anatomisi ile oldukça benzerlik göstermesine rağmen safra keselerinin olmayışı ve duodenum anatomisindeki farklılıklar göze çarpmaktadır. Duodenum S şeklinde karaciğerin viseral yüzünü takip ederek ilk önce sağa, sonra orta hatta yönelir, transvers kolon ile arasında bulunan bağlantı kolonun disseksiyonu esnasında önemlidir. Ratlarda, ileum direkt kolona açılır, insanda bulunan ilioçekal valv yapısı yoktur. Çekum ratlarda da kolonun en geniş bölümüdür ve 6-9 cm. uzunluğundadır. Devamında daralarak insandaki gibi çıkan kolon, transvers kolon ve inen kolon bölümlerini oluşturur. Ortalama uzunluğu 21-24 cm'dir. Makroskopik olarak ayırt edilebilen tenya yapısı yoktur. Rektumu kolonun diğer segmentlerinden ayırt eden özelliği ise mukozal oblik pililerin bağırsak uzun eksenine paralel olmasıdır. İnsandan farklı olarak

kolonun tamamına yakını mobildir ve visseral periton ile örtülüdür. Bu özellikleri ile rat kolonu anatomik açıdan kolorektal kanser modeli oluşturmak amacıyla, uzun zamandır kullanılan bir modeldir (53) (Şekil 1).



Şekil 1. Rat Kolon Anatomisi

(1) ve (2) çıkan kolon, (3) mide, (4) duodenum, (5) çekum ve (6) inen kolon , * mesane (53).

1.1.1.4. Kolonun Histolojisi

Kalın barsak duvarı; mukoza, submukoza, muskularis propriya ve seroza (perikolik yağ dokusu) olmak üzere 4 tabakadan oluşur. Mukoza da kendi içinde epitelyum, lamina propriya ve muskularis mukoza olarak üç tabakaya ayrılır (54, 55).

1. Tunika mukoza: Mukozal yüzey küboidal epitel ya da tek sıralı alçak kolumnar epitelle döşeli olup goblet hücreleri ve absorbatif hücreler içerir. Mukozal yüzeye açılan Liberkühn kriptleri de matür absorbtif hücreler ve goblet hücreleriyle devam eder. Buna ek olarak immatür ve indiferansiye prekürsör hücreler, paneth hücreleri ve endokrin hücreler de kriptlerin bazalinde çok sayıda bulunur. Goblet hücreleri müsin sentez, depo ve salgılamasında görevliken absorbtif hücreler ise su ve elektrolitleri absorbe eder.

2. Tunika submukoza: Lamina proprianın hücresel içeriğini barındıran, nöral pleksusu (Meissner pleksusu) bulunan, gevşek bağ dokusundan meydana gelmiş bir tabakadır.

3. Tunika muskularis: Bu tabakada içte sirküler, dışta ise longitudinal kas tabakaları vardır ve bu iki tabakanın arasında myenterik Auerbach pleksusu bulunur.

4. Tunika seroza: Tek sıralı yassılaştırmış veya küboidal mezotelyal hücreler ile döşeli peritona ek olarak fibroelastik dokudan oluşur. Bu tabakada kan damarları ve lenfatikler bulunur. Transvers kolon, sigmoid kolon, çekum ve appendiksi tam olarak sarar.

1.1.1.5. Kolorektal Kanserlerde Histopatoloji

Makroskopik Özellikler: Makroskopik özellikler açısından büyük boyuttaki tümörlerde üç tür vardır (56).

- Lümene doğru kitlesel büyüyen tip: Bu makroskopik tip daha çok çekum ve çıkan kolonda görülür. Tümörün lümen içindeki kısmı intramural bölümünden daha fazladır.

- İnfiltratif-ülser tip: Özellikle transvers ve inen kolonla rektumda sık görülür.

- Anüler-konstrüktif tip: Daha çok rektum ve sol kolonda görülür

Mikroskopik Özellikler:

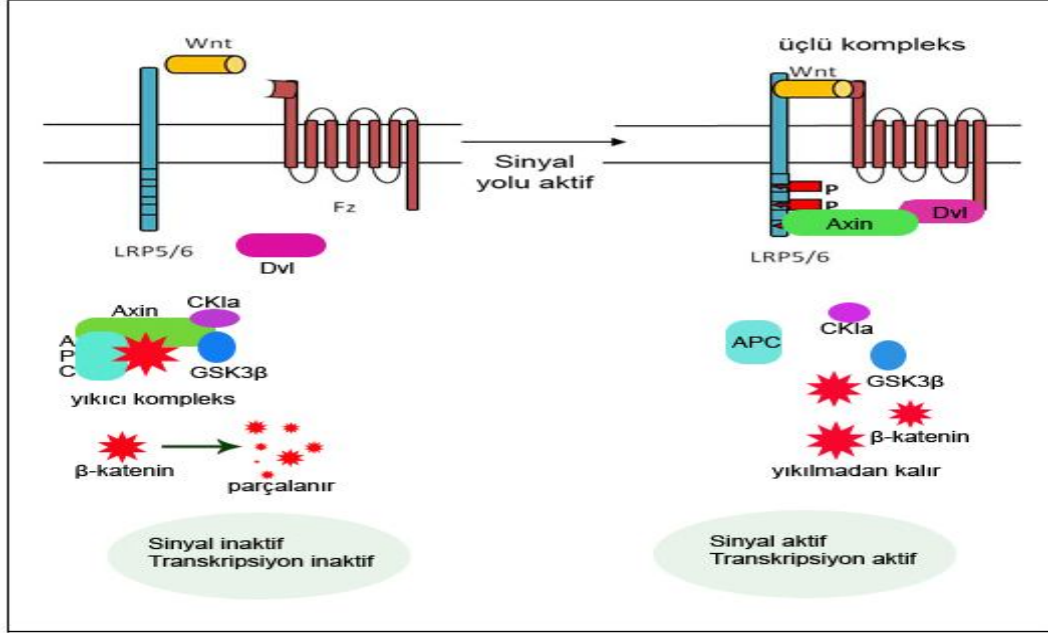
WHO'ya göre kolorektal karsinom histolojik sınıflaması aşağıdaki gibidir (56):

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

1.1.1.6. Kolorektal Karsinogenez

Sporadik gelişen KRK'ların yaklaşık %80-90'ında APC mutasyonu ile birlikte Wingless ve Int-1 genleri (Wnt)/ β -katenin yolağının uygunsuz aktivasyonu ortaya çıkmaktadır (57-59). Multifonksiyonel bir gen olan APC'nin en iyi karakterize

edilmiş etkisi glikojen sentaz kinaz- 3 β (GSK-3 β) ve aksin ile oluşturduğu kompleks yoluyla β -kateninin fosforilasyonu ve devamında ubiquitin proteazom aracılı yıkımıyla Wnt/ β -katenin sinyal yolağının kontrolünü sağlamasıdır (58, 60) (Şekil 2).



Şekil 2. WNT/Beta-Katenin Sinyal Yolağı (61).

β -kateninin görevi, farklılaşmış hücrelerde hücre iskeletinin aktin flamanlarına, E-kaderin epiteliyal adezyon molekülünü bağlamaktır. İnsan neoplazmlarında APC mutasyonları sonucu fonksiyon kaybıyla birlikte patolojik bir inhibisyon ortaya çıkar. Bu inhibisyonla hücre içi β -katenin birikir ve çekirdeğe transloke olur. Nükleer β -katenin, T-hücrel faktör 4 (TCF-4) gibi bazı nükleer faktörlere bağlanarak transkripsiyonel aktivasyon için çok etkili bir kompleks oluşturur (62, 63).

TCF-4/ β -katenin transkripsiyonel aktivitesinin hedef aldığı ilk genlerden biri siklin D1 genidir. Siklin D1, retinoblastom (Rb) genini fosforilleyerek onu inaktive eder. İnaktif Rb, aktifken kendisine bağlı olan transkripsiyon uzama faktörü-2 (E2F)'yi serbest bırakır E2F de hücre siklüsünün G1-S geçişi için aktive genlerden meydana gelmiş nükleer kompleksi oluşturur ve hücre döngüsü bozulur. Bu bilgilere dayanarak β -kateninin kolorektal kanser gelişiminde etkili bir onkogen olduğu varsayılmıştır (62, 64).

K-ras (Rat Anjiyo Sarkom) geni de kolon kanserlerinde %50 oranında mutasyona uğramış kolorektal kanserlerle ilişkili major onkojenik genlerden biridir

(65). Bu gen hücre içi sinyal transdüksiyonunda görev alır ve 1 cm'den küçük adenomların %10'undan azında, 1 cm'den büyük adenomların yaklaşık %50'sinde, karsinomların ise yaklaşık %50'sinde mutasyona uğramıştır. Kolon kanserlerinin %70-80'inde ise 17p kromozomunda kayıp tespit edilmiştir. Bu kromozomal delesyon hücre siklüsünün düzenlenmesinde kritik öneme sahip p53 genini etkiler (66). Telomeraz, kromozom sabitleşmesinde görev alır. Katalitik bir alt ünite gibi davranan telomerik reverse transkriptaz (TERT) enzimi ile birlikte bir ribonükleoprotein kompleksi yapısındadır. Telomeraz aktivitesi hücrelerin ölümsüzlüğü için gereklidir. Çoğu adenomda telomeraz aktivitesi bulunmazken kolorektal karsinomun da içinde bulunduğu birçok kanser türünde ise telomeraz aktivitesi artmıştır (66).

1.1.1.7. Kolorektal Karsinom Gelişim Evreleri

Erken adenom evresi

APC gen inaktivasyonu (APC geni allellerinden birinde kayıp diğerinde mutasyon) ile birlikte hücrelerde proliferasyonun uyarılması sonucu ilk olarak mikroadenomlar oluşur. COX-2 ekspresyonunun da katkıda bulunduğu bu evrede normal epitelden adenoma bir geçiş vardır (Şekil 3). Ayrıca bu süreçte artan Protein Kinaz C beta 2 (PKC β 2) ekspresyonu hem TGF- β sinyal yolağını baskılamak yoluyla, hem de COX 2 ekspresyonunu indükleyerek kanser gelişimine katkıda bulunur (67).

Geç adenom evresi

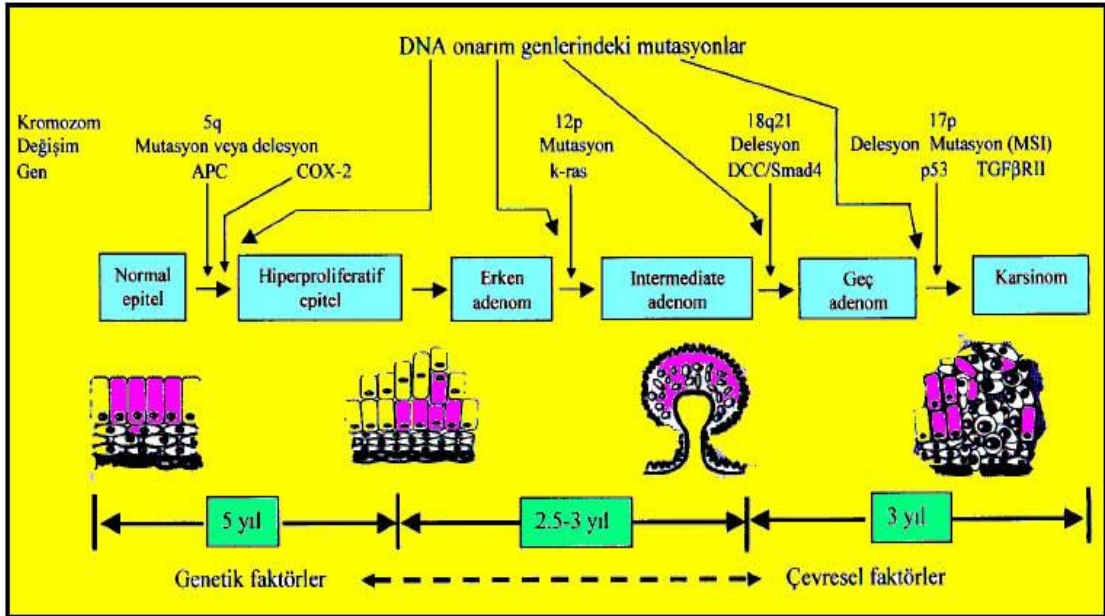
K-ras mutasyonu ile birlikte, proliferatif olmuş hücrelerden biri polip üzerinde bir alanda hızla büyüyen bir hücre dizisinin oluşumuna neden olur (monoklonal çoğalma). Bu evrede adenomun büyümesini hızlandıran bir diğer etken de anjiyogenezi uyaran faktörlerdir (68).

Displazi evresi

Adenomlarda displastik değişiklikler bu evrede izlenir. Hücrelerin hızlı proliferasyonu esnasında mutant APC/K-ras klonlarının bazı hücrelerinde olaya p53 gen mutasyonları da katılır (Şekil 3). Bu evrede p53 mutasyonlarına ek olarak heterozigozite kaybı (LOH; Loss of Heterozigosity) gerçekleşir ve bu nedenle gende inaktivasyon da görülmeye başlanır (68).

Kanser evresi ve metastaz

Bir hücrede p53 genine ait allellerden birisinde mutasyon, diğer allelde de kayıp olması durumunda apoptozisin inhibe olmasıyla birlikte, LOH ile kontrolsüz çoğalma yoluyla malign fenotip gelişir. Birçok yeni mutasyonun oluşmasına neden olan kanser hücrelerindeki kontrolsüz çoğalma (genomik kaos) sonucu invazyon ve metastaz tetiklenir (68).



Şekil 3. Kolon kanseri gelişiminin moleküler modeli (69).

1.1.1.8. Kolorektal Karsinomda Lokalizasyon

Karsinomların yaklaşık %50'si rektosigmoid bölgede lokalizedir. Ancak bu özellik giderek azalmakta ve olgular proksimale doğru kaymaktadır (70, 71).

Riskin düşük olduğu ülkelerde KRK çekum ve çıkan kolonda, sol kolondan daha sık görülürken; yüksek riskli ülkelerde ise rektosigmoid bölgede görülme oranı daha yüksektir (72, 73). Birden fazla odaklı karsinom ise vakaların yaklaşık %3-6'sında görülür (70).

1.1.2. NSAİİ'lar ve COX Enzim Yolağı

1.1.2.1. NSAİİ'lar'ın Genel Özellikleri

NSAİİ'lar temel olarak ağrı ve inflamasyon gibi durumların kontrolünde analjezik, antipiretik, antiinflamatuvar etkiye sahip olan ilaçlardır ve etkilerini yarışmalı, geri dönüşümlü olarak farklı düzeyde COX-1 ve COX-2 enzim inhibisyonu yoluyla gösterirler (74). Buna karşın NSAİİ'lar, COX inhibisyonu

birlikte prostaglandin (PG) sentezini azaltarak inflamasyonu baskımlarken diğeryandan da özellikle COX-1 inhibisyonuyla ortaya çıkan gastrointestinal yan etkilere neden olmaktadır (75). NSAİİ'lar antiinflamatuvar ve analjezik etkileri nedeniyle romatoid artrit, ankilozan spondilit, gut artrit, sistemik lupus eritematozus ve diğerkollajen doku hastalıkları, juvenil kronik artrit, osteoartrit gibi hastalıklarda sıklıkla kullanılırlar. Bu hastalıklara ek olarak tendinit, tenosinovit, bursit, periartrit gibi yumuşak doku lezyonlarında, bel-boyun ve kanser ağrılarında, dismenorede, oral ve maksillofasiyal cerrahide de tercih edilmektedirler (76, 77).

NSAİİ'ların etki mekanizmaları kısaca şu şekilde özetlenebilir:

- COX enzim inhibisyonu yoluyla PG sentezini azaltmak (78).
- Lizozomal membranın stabilizasyonu (Bu yolla pro-inflamatuvar etkinlik gösteren lizozomal enzimlerin salınımını inhibe ederler) (79).
- Serbest oksijen radikallerinin inhibe edilmesi (79).
- Lipooksijenaz inhibisyonu yoluyla lökotrienlerin sentezini azaltmak (78).
- İnflamatuvar hücrelerin baskılanması (İltihap mediyatörü sitokinlerle etkileşim sonucu ve polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) çeşitli uyarılarla oluşan aktivasyonunun inhibisyonu yoluyla (79).

NSAİİ'ların kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmaları ise aşağıdaki gibidir (75, 79):

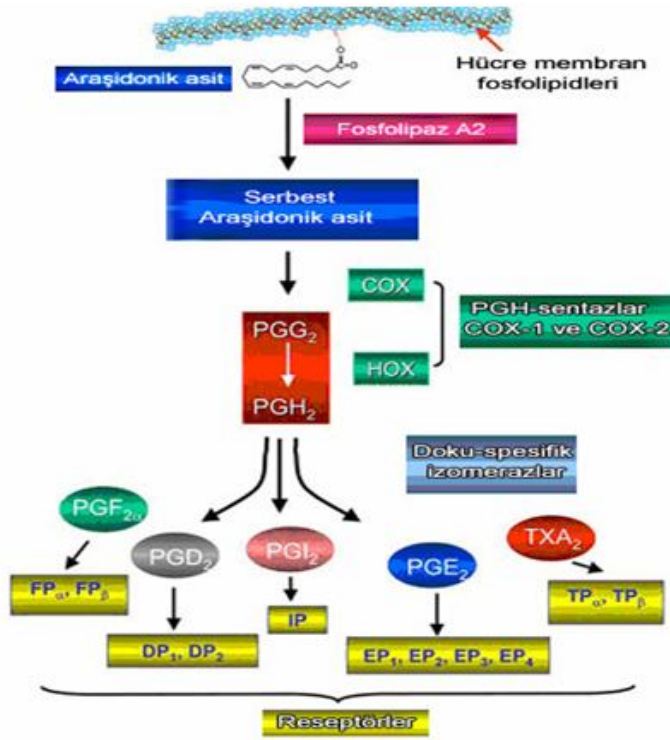
- Salisilatlar (Aspirin, Diflunisal)
- Paraaminofenol türevleri (Asetaminofen)
- Asetik asid türevleri (İndometazin, Diklofenak, Etodolak, Sulindak, Mefenamik asid, Meklofenamatlar, Flufenamik asid, Ketorolak)
- Propiyonik asid türevleri (Naproksen, İbuprofen, Fenoprofen, Ketoprofen, Oksaprozin, Flurbiprofen)
- Pirazolon türevleri (Aminopirin, Propifenazon, Metimazol soydum (dipiron), Fenilbutazon, Oksifenbutazon)
- Profenler (fenilpropionik asid türevleri)
- Enolik asid türevleri (Nabumeton, Piroksikam, Meloksikam)
- Selektif COX-2 inhibitörleri (Selekoksisib, Rofekoksib, Valdekoksib, Etorikoksib, Parekoksib, Lumirakoksib).
- Diğerya ilaçlar (Glukozamin hidroklorür).

NSAİİ'lar, COX-1 ve COX-2 üzerindeki etki güçlerine göre 4 gruba ayrılır (79):

1. COX-1'e özgül (spesifik) NSAİİ'lar
2. COX'lara özgül olmayan NSAİİ'lar
3. COX-2'e selektif NSAİİ'lar
4. COX-2'e özgül (spesifik) NSAİİ'lar

NSAİİ'ların ilk temsilcisi Aspirin'dir. COX-1 ve COX-2 molekülünde, substrat araşidonik asidin (AA) içine girerek bağlandığı kanal çeperindeki bir amino asid rezidüsünü asetilleyerek bu enzimleri geri dönüşümsüz olarak inhibe eder; diğer NSAİİ'lar ise geri dönüşlü inhibisyona neden olurlar (79). NSAİİ'lar Kimyasal çeşitlilik açısından geniş bir yelpazeye sahip olmalarına rağmen tamamı COX'un aktif bölgesinin altındaki Arjinin (Arg)-120 ile iyon çifti oluşturan bir karboksilat fonksiyonuna (AA ile benzer) sahiptirler (80).

PG'lerin sentezi hücre membranının yapısındaki fosfolipidlerden fosfolipaz-A2 enzimi yoluyla oluşan AA'den başlamaktadır (Şekil-4). NSAİİ'lar analjezik, antianflamatuvar, antipiretik etkilerini PG sentezinde görevli COX enzimini (prostaglandin G/H sentaz) inhibe ederek gösterirler. COX enzimi AA'ı önce PGG₂'ye daha sonra da PGH₂'ye dönüştürmektedir. Hücrelerde sentezlenen bu siklik endoperoksidler de spesifik olarak farklı prostanoidlere (PG'ler, tromboksan(TX) ve prostasiklin (PGI₂)) dönüştürülürler (78, 81).

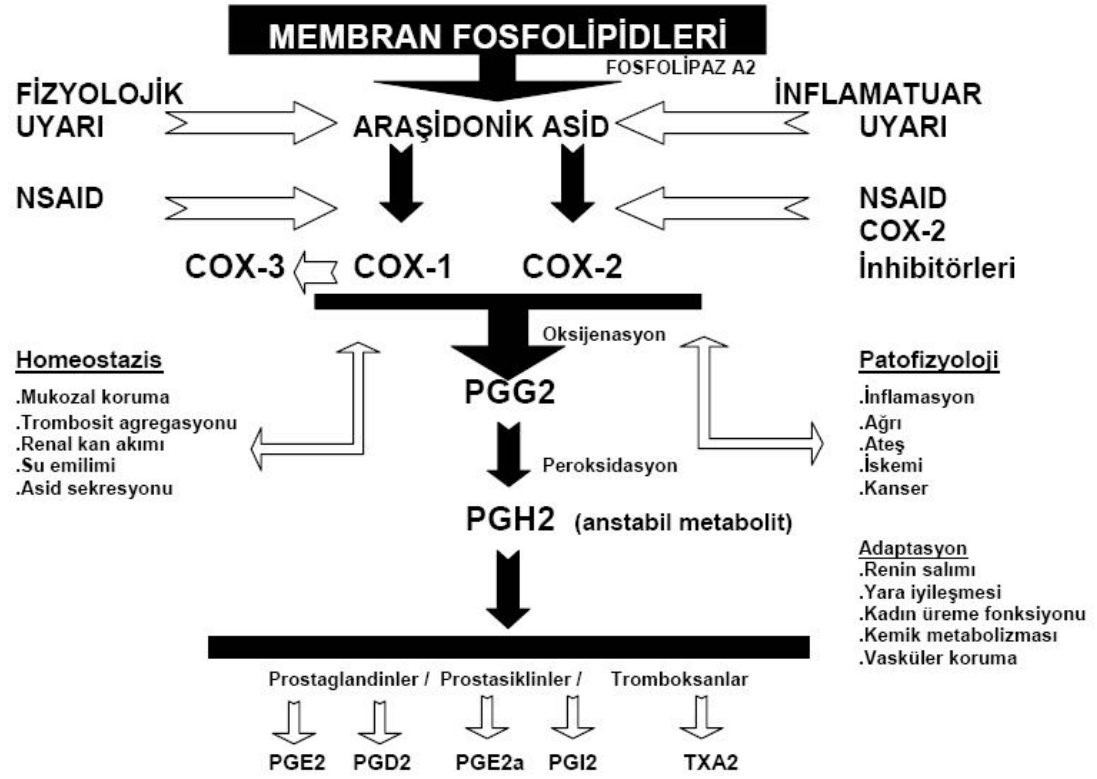


Şekil 4. Prostanoid sentez yolağı ve spesifik reseptörleri: 4 çift bağ taşıyan 20 karbonlu yağ asidi AA, fosfolipazlar aracılığıyla membran fosfolipidlerinden salınarak enzimatik reaksiyonlarla PGE₂, PGF₂alfa, PGD₂, PGI₂ ve TXA₂ gibi çeşitli prostanoidlere metabolize olur. Prostanoidlerin sentez aşamasında, üç enzimatik aşamalı, koordinasyonlu aktivite rol oynar: 1) Membran fosfolipidlerinden, fosfolipaz A2 yoluyla AA salınımı. 2) PGH-sentazlar (COX-1 ve COX-2) tarafından AA'nın nonstabil endoperoksit PGH₂'ye dönüşümü. 3) Farklı yapılara sahip hücre ve doku spesifik dağılım özelliğindeki izomerazlarca değişik prostanoidlere metabolize edilmesi. Farklı prostanoidler, G-protein çiftli rodopsin ailesine ait spesifik hücre membran reseptörlerini aktive ederler (82).

1.1.2.2. COX Enzimi

COX ya da prostaglandin endoperoksit sentaz (PGHS) enzimi AA'ten PG'lerin sentezinde rol oynayan anahtar enzimdir. PG'ler vücutta eritrositler dışında birçok hücrede üretilen, çeşitli kimyasal ve mekanik uyarılar sonucu salınan lipid mediyatörleridir. İnflamasyon, ağrı, ateş ve ödemin en önemli mediyatörleridirler (83). Prostanoidler, gastrointestinal sistemin korunması, trombosit agregasyonu, böbreklerde idrar oluşumu, uterus düz kasının kasılması gibi birçok fizyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde ve bazı patolojik durumlarda (inflamasyon, kanser) büyük oranda rol oynamaktadırlar (84-86).

NSAİİ'larca sentezlerinin inhibe edilmesi organizmada fizyopatolojik fonksiyonlarda büyük değişikliklere neden olur (86) (Şekil 5).



Şekil 5. COX enzimleri ve Eikosanoidlerin sentezi. Fizyolojik ve patofizyolojik etkileri (87).

Önceleri NSAİİ'ların mevcut tek bir COX enzimi üzerine etki ettiği düşünülürken zaman içinde farklı genler tarafından sentez edilen COX-1 (yapısal, konstitütif) ve COX-2 (uyarılabilen) iki izoformunun olduğu tanımlanmıştır (83). Bu iki izoforma ek olarak daha sonraları özellikle asetaminofen inhibisyonuna duyarlı bir COX-1 varyantı olarak COX-3 enzimi de tanımlanmıştır (88). Her iki COX enzimi de katalitik alandan membrana bağlandığı alana doğru uzanan bir kanal içermektedir. Bu COX izoformlarının aminoasit dizilimi %60 benzer olmasına rağmen COX-2 enziminin aktif bölgesi COX-1'den %20 daha büyüktür ve yapı olarak biraz farklıdır. Bunlar, sıklıkla aminoasit diziliminde iki aminoasit değişiminden kaynaklanan farklılıklarıdır. COX-1'de 523. konumunda izolösün (Ile) bulunurken COX-2'de bu aminoasit, valin (val) ile yer değiştirmiştir. Ayrıca Ile-434'un COX-2'de val/Ile değişimi ve komşusundaki fenilalanin (Phe)-518 aminoasiti, COX-2 enziminin aktif bölgesinde fark edilebilir bir hacim arttırmak

suretiyle ana kanalda COX-2' nin uyarılması ve seçici COX-2 inhibitörleri etkisi için özel hidrofilik bir yan cep oluşmasını sağlamaktadır. Phe-518 aminoasiti bu cep için alanı genişleterek daha çok substratın hidrofilik yan cebe ulaşmasını sağlar (78, 89).

COX enzimleri, endoplazmik retikulum lümenal yüzeyinde ve çekirdek zarında bulunan membrana bağlı heme proteindirler. NSAİİ'lerin büyük çoğunluğu COX enziminin aktif bölgesine bağlanmak için AA'le yarışır. COX enzim kanalına substrat ve inhibitör bağlanmasında sekiz aminoasit kalıntısının önemli rolü vardır (90, 91).

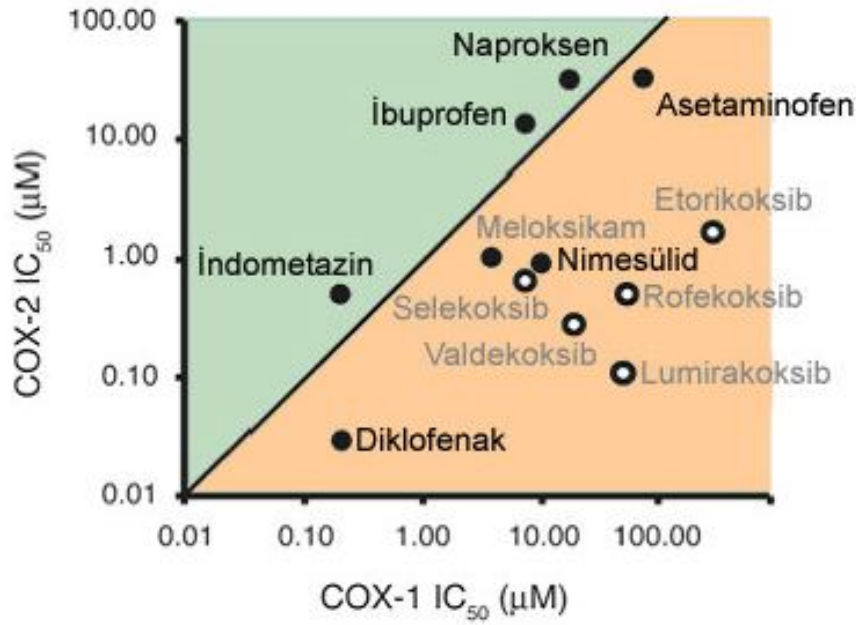
COX-1, COX enziminin fizyolojik fonksiyonlarda görev alan yapısal izoformudur. Normal hücre aktivitesini düzenleyen PG'lerin sentezlenmesinde yer alır. Aktivasyon durumunda ise farklı fonksiyonlarda görev yapar. Örnek olarak; PGI₂ üretimi, endotelyumdan salıverildiğinde antitrombojenik, gastrik mukoza tarafından salıverildiğinde hücre koruyucu etkisi vardır. Beklenmeyen kanamaların engellenmesi için trombositlerin agregasyonu da, TXA₂ üretimini indükleyen trombositlerdeki COX-1 varlığıyla gerçekleşir (83).

Birinci kromozomun uzun kolunda yerleşmiş olan COX-2, 587 aminoasitten oluşur (78, 92).

COX-2 promotor bölgelerinde taşıdığı inflamatuvar mediatörlere duyarlı transkripsiyon faktörü sayesinde hızlı uyarılabilir. COX-2 enzimi özellikle inflamasyon ve neoplazinin geliştiği dokularda daha çok eksprese olmakta ve inflamasyonda görevli PG'lerin sentezine aracılık etmektedir. Normal dokularda aktivitesi ölçülemeyecek kadar düşüktür. Normal fizyolojik koşullarda hücrelerde COX-2 aktivitesi yokken bakteriyel lipopolisakkaritler, sitokinler (İnterlökin (IL)-1 α , IL-6) ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF α) gibi uyarıların etkisiyle makrofajlarda, monositlerde, sinoviyal hücrelerde, kondrositlerde, fibroblastlarda ve endotel hücrelerinde kısa sürede COX-2 ekspresyonu artar (79, 92, 93).

1.1.2.3. COX-2 İnhibitörleri

Mevcut NSAİİ'lar COX-1 ve COX-2 enzimlerine farklı derecelerde selektivite göstermektedirler. COX enziminin iki izoformunun relatif etkileri COX-1 ve COX-2 için IC₅₀'nin (Bir ilacın, hedef etkisinin yarısını göstermesi için gerekli olan konsantrasyonu) oranı olarak tanımlanmıştır (79) ve buna göre NSAİİ'ların COX-1 ve COX-2 inhibisyonu üzerine göreceli etkileri ortaya çıkmaktadır (Şekil 6).



Şekil 6. COX inhibisyonunun seçicilik spektrumu. Klasik NSAİİ'ların ve COX-2 inhibitörlerinin, COX-1 ve COX-2 üzerine göreceli etkileri (89). COX-1 ve COX-2'yi %50 (IC₅₀) oranında inhibe etmek için gerekli ilaç konsantrasyonları in vitro ortamda COX-1 ve COX-2 aktivitesinin tüm kanda analizini kullanarak ölçülmüştür. Diagonal çizgi eşit COX-1 ve COX-2 inhibisyonunu göstermektedir. Çizginin altında kalan ilaçlar (turuncu), çizginin üstünde kalan ilaçlara göre (yeşil) COX-2'nin daha güçlü inhibitörleridir. Çizgiye olan uzaklık, seçiciliğin ölçüsünü göstermektedir. Örnek olarak, lumirakoksib, çizgiye olan uzaklığı en fazla olan ilaç olduğundan, COX-2'ye seçiciliği de en yüksek olan ilaçtır. Selekoksib ve diklofenak'ın ise, çizgiye olan uzaklıkları benzer olduğundan, COX-2 seçicilikleri de buna bağlı olarak benzerdir; bununla birlikte diklofenak daha düşük konsantrasyonlarda etki eder ve bundan dolayı sol tarafa daha yakın pozisyonundadır.

Halen kullanılmakta olan COX-2 enzim inhibitörü ilaçlar (79):

1. COX-2'ye selektif NSAİİ'lar (meloksikam, etodolak),
2. COX-2'ye spesifik NSAİİ'lar (selekoksib, rofekoksib, etorikoksib, valdekoksib) olarak iki gruba ayrılmaktadır. COX-2'ye selektif olan NSAİİ'lar yüksek dozlarda COX-1'i inhibe edebilmelerine rağmen düşük dozlarda COX-2'ye spesiflik göstermektedir. COX-2'nin spesifik inhibitörleri ise maksimum dozlarda klinik kullanımda bile COX-1'i inhibe etmediği kabul edilen COX-2 inhibitörleridir (79).

Hem selektif hem de spesifik COX-2 inhibitörlerinin her ikisi de klasik kullanımda selektif COX-2 inhibitörleri olarak ifade edilmektedir. Selektif COX-2 inhibitörlerinin yapısında, klasik NSAİİ'lar için karakteristik olan karboksilat grubu

bulunmamaktadır. Karboksilat grubu yerine yapılarında COX-2'nin aktif bölgesinde bulunan hidrofilik yan cepteki Arg-513 ile etkileşebilen sülfon veya sülfonamid grupları bulunmaktadır (94). Bu bileşiklerin çoğu bilimsel olarak COX-2'nin yapısı tanımlandıktan sonra geliştirildiğinden selektif COX-2 inhibitörlerinin rasyonel olarak tasarlanmasında kristalografik verilerden faydalanılmıştır (78). COX-2'ye özgül ilaçlar; selekoksib, valdekoksib, etorikoksib, lumirakoksib ve rofekoksibtir. Rofekoksib, 2002 yılından bu yana yapılan klinik çalışmalar sonucunda myokard infarktüsü riskini arttırdığı için üretici firma tarafından 2004 yılında piyasadan çekilmiştir. Sonrasında valdekoksib de aynı nedenle piyasadan çekilmiştir (79).

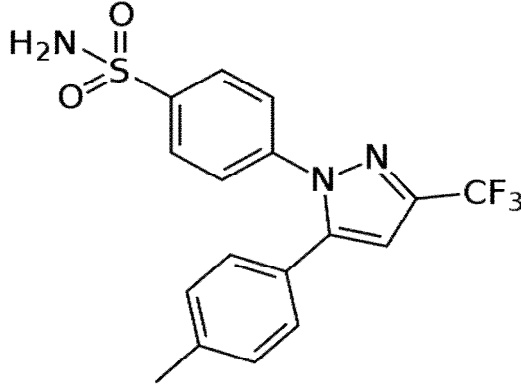
COX-1 yoluyla renal fonksiyonlardan ve gastrik mukozanın bütünlüğünün sağlanmasından sorumlu PG'ler üretilirken, inflamatuvar yanıtlarla oluşan PG'ler ise yalnızca COX-2 yoluyla üretilir. COX-2'nin böbrekler üzerinde iyileştirici etkilere sahip olmasının yanında, hem doğal hem de patolojik (karaciğer sirozu, renal yetmezlik ve konjestif kalp yetmezliği) bazı şartlarda renal fonksiyonun önemli bir bölümünün düzenlenmesinde görev alır. Bazı patolojik durumlarda NSAİİ'lar ve/veya selektif COX-2 inhibitörü kullanımı vazodilatör özellikteki PG'lerin sentezini azaltacağından renal iskemik risk artacaktır (95).

Selektif COX-2 inhibitörleri vücutta doğal PGI_2/TXA_2 oranını etkilerler ve bu yolla önemli kardiyovasküler yan etkilere neden olurlar. PGI_2 , trombosit agregasyon ve adezyonunu önleyen bir PG'dir ve sentezi COX-2 enzimi yoluyla indüklendiği için spesifik COX-2 inhibitörlerinin trombotik etki potansiyelleri ortaya çıkmıştır. Ayrıca bu ilaçların klinik kullanımda COX-1 üzerine etki etmemeleri bu yolla sentezlenen ve protrombotik etkili bir prostanoid olan TX seviyelerini de arttırmakta ve bu yolla da tromboza eğilim artmaktadır. Bu olaylar spesifik COX-2 inhibitörlerinin kardiyovasküler sistem üzerindeki yan etkilerini açıklayan mekanizmalardır. Bu yan etkiler; ölüme neden olabilecek tromboembolik olaylar, hipertansiyon, myokard infarktüsü ve trombotik inme şeklinde sayılabilir (79). Rofekoksib ve Selekoksib gibi spesifik COX-2 inhibitörlerinin piyasadan çekilmesi de bu yan etkilerden kaynaklanmaktadır.

1.1.2.3.1. Selekoksib

Bir diarilpirazol türevi olan Selekoksib, 4-[5-(4-Metilfenil)-3-(triflorometil)pyrazol-1-il] benzen sulfonamid kimyasal yapısındadır (96) (Şekil 7). COX-2'ye

özgül ilaçlar içinde ilk piyasaya sürülmüştür. COX-2 ve COX-1 inhibisyonuyla ilgili IC₅₀ değerlerine göre değerlendirildiğinde COX-2'ye 375 kez daha selektiftir (79). Selekoksisib'in polar sülfonamid yapısındaki yan zinciri COX-2'nin aktif bağlanma bölgesindeki yan cep ile etkileşime geçen bölümdür (97).



Şekil 7. Selekoksisibin kimyasal yapısı (98).

Yüksek doz uygulamalarında bile trombositlerin fonksiyonunu bozmadığı ve serum trombaksan düzeyini etkilemediği gösterilmiştir. Maksimum plazma düzeylerine yaklaşık 3 saatte ulaşır, eliminasyon yarı ömrü ise ortalama 11,2 saattir. Analjezik etki potansiyeli ise Aspirine eşdeğerdir (79). Selekoksisib büyük oranda sitokrom P450 2C9 enzimi ile metabolize edilir. İnsan plazmasında, alkol, karboksilik asit ve bunların glukuronid konjugatları olarak başlıca üç metaboliti tespit edilmiştir. Bu metabolitler COX-1 veya COX-2 inhibitörleri olarak inaktif haldedirler (99). Diğer birçok NSAİİ gibi Selekoksisib de en fazla albumin olmak üzere plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanır (>%97). Dokular içinde geniş bir dağılım hacmi vardır (100).

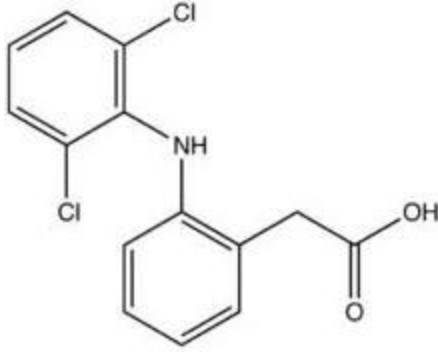
Selekoksisib'in en önemli endikasyonları romatoid artrit ve osteoartritteki ağrı ve inflamasyona ait belirtilerin giderilmesidir. Bahsedilen bu endikasyonlarda kullanımında günde 1000 mg naproksen kadar etkili bulunmuştur (79). Bunlara ek olarak akut ağrılar, cerrahi girişim sonrası dental ağrılar, menstrüel ağrılar ve FAP'lı hastalarda kolorektal polipleri azaltmak amacıyla kullanılır (101-103).

Başlıca yan etkileri; karın ağrısı, epigastrik rahatsızlık hissi, sersemlik, su retansiyonu, bulantı, daire baş ağrısı ve kaşıntıdır. Kan basıncını yükseltebilir (79).

Ülkemizde Selekoksisib etken maddesi içeren preparatlara muhtemel kardiyovasküler yan etkilerinden dolayı 2. sınıf geri çekilme uygulanmıştır (104).

1.1.2.3.2. Diklofenak

Bir fenil asetik asit türevi olan diklofenak, selektif COX-2 inhibitörleri içinde gruplandırılan kısa yarı ömürlü bir NSAİİ'tir. Moleküler ağırlığı 296,148 g/mol, moleküler formülü $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$, kimyasal yapısı; 2-[2-(2,6-diklorofenil) aminofenil] etanoik asit şeklindedir (105) (Şekil 8).



Şekil 8. Diklofenak'ın kimyasal yapısı (105).

Analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etkinliği olan Diklofenak osteoartrite karşı indometazin kadar, romatoid artrite karşı da indometazin ve aspirin kadar etkili olduğu bulunmuştur (79). Diklofenak, COX-2 selektivitesi yüksek bir NSAİİ'tir (106). Bu gruptaki diğer ilaçlar gibi mide ve duodenum mukozası üzerine olan olumsuz etkileri diğer NSAİİ'lardan daha zayıftır. Diklofenak'la tedavi edilen hastaların yaklaşık % 10'unda yan etki oluşturur ki bu yan etkilerin çoğu gastrointestinal sistemle alakalıdır. Aplastik anemi de nadir görülen bir yan etkisidir (79). Mide barsak kanalından tam olarak ve hızlı absorbe edilir. Maksimum plazma düzeyine 1,5-2 saatte ulaşır. Plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanır. İnaktivasyonu karaciğerde hidrosillenmek ve konjugasyon suretiyle gerçekleşir. Böbreklerden ve kısmen karaciğerden itrah edilir ve eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 1,2-1,8 saattir (79).

1.1.2.4. COX-2'nin Moleküler Düzenlenmesi ve Karsinogenez

COX-1 enziminin amino terminalinde fazla 17 aminoasit zinciri içermesi, COX-2 enziminin ise karboksi terminal ucunda 18 aminoasitlik ek zincir olması, COX enzimleri arasındaki en önemli farktır. Bu iki izoenzimin transkripsiyon ve translasyon seviyelerindeki düzenlenmeleri de farklıdır. COX-2'de mesajcı Ribonükleik asit (mRNA) parçalanmasını hızlandıran 3'-transloke olmayan Shaw-

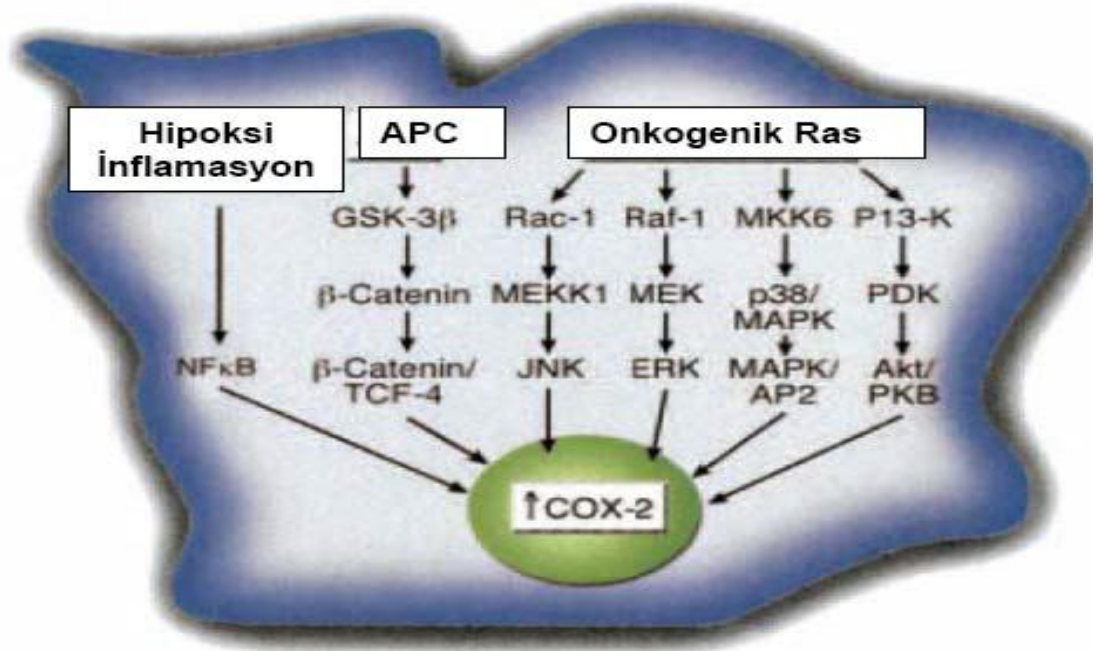
Kamen zincirlerinin birkaç kopyası bulunur, mRNA parçalanmasıyla paralel olarak COX-2 kopyaları da hızlıca parçalanmaktadır. Buna rağmen inflamasyonla birlikte salınan proinflamatuvar sitokinlerle bu COX-2 kopyaları stabilize olur ve COX-2 protein düzeyi de artar. COX-2'in ekspresyonunun kontrolü açısından transkripsiyonal ve translasyonel olarak regüle edilmesi oldukça önemlidir (107).

AA'ten PG sentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan COX-2'nin birçok kanser patogenezinde rol aldığı bilinmektedir (108, 109).

Yapılan çalışmalarla COX-2 enziminin, hücre proliferasyonu, artmış anjiyogenez, defektif apoptoz, metastaz artışı, immün supresyon, mutajenik etki, oksidatif ürünlerde artış ve aromataz enzim indüksiyonu gibi mekanizmalar üzerinden kanser gelişimini indüklediği ve bu çoklu mekanizmalarla karsinogenezde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (109, 110).

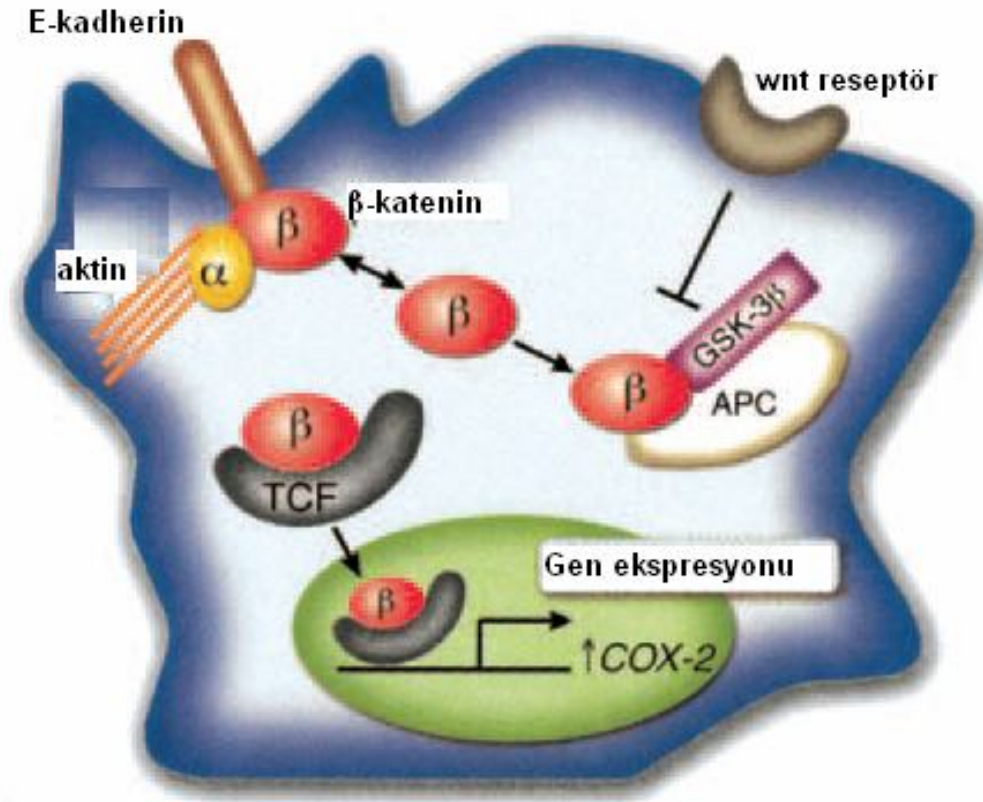
Apoptozis, programlı hücre ölümü olarak tanımlanır. Fizyolojik ve patolojik süreçler apoptotik hücre ölümünü etkiler. Tümör gelişiminde anti-apoptotik mekanizmalar önemli bir yere sahiptir. Proliferasyon artışı, antiapoptotik mekanizmalarla birlikte gösterilir. COX-2 ilişkili apoptoz inhibisyonu birçok tümör dokusunda gösterilmiştir (111). COX-2'nin hücre döngüsünün G1 fazında yavaşlamaya neden olması apoptozda direnci de beraberinde getirir. NSAİİ'lar tümör dokusunda apoptozisi indükleyerek tümör regresyonuna yol açarlar (111, 112).

COX-2 proteininin KRK'lerdeki aşırı ekspresyonu; inflamasyon ve hipoksi, APC gen mutasyonu, onkogenik Ras mutasyonu gibi farklı mekanizmalar üzerinden ortaya çıkabilmektedir (113) (Şekil 9).



Şekil 9. COX-2 aktivasyon yolları (113). Mitojen-aktive eden protein kinaz (MAPK), ekstraselüler regüle eden kinaz (ERK), MAPK kinaz (MKK), MAPK/ERK kinaz (MEK), MAPK kinaz kinaz (MEKK), c-Jun NH2-terminal kinaz (JNK); fosfatidilinozitol 3-kinaz (PI3-K), 3-fosfoinositide-bağlı kinaz (PDK), Protein kinaz B (Akt ya da PKB)

Bunlar içinde en önemlilerinden biri COX-2'nin inflamasyon ve hipoksiyle üretilen çeşitli sitokinler yoluyla aktive olan NFκB aracılığıyla regüle olabilmesidir. (114). Kanserli epitel hücrelerinde COX-2 ekspresyonunun APC geni ve Wnt/β-katenin sinyal yolağı tarafından düzenlenmesi bir diğer mekanizmadır. Wild-tip APC' nin başlıca görevi β-katenine bağlanmak ve indirgemektir. β-katenin sitoplazmada hem serbest halde hem de membrana bağlı olarak bulunabilir. Fizyolojik koşullarda sitozolik β-katenin, wild-tip APC protein ve yardımcı iki protein (aksin ve GSK-3β)'den oluşan kompleksin aktive olması ile parçalanmaktadır. APC gen mutasyonunda, APC proteininin β-katenine bağlama bölgelerinde fonksiyon bozukluğu gelişir ve β-kateninin miktarı artarak yüksek oranda çekirdeğe transloke olur. Burada TCF-4, lenfoid geliştiren faktör (LEF-1) ile beraber bir transkripsiyon faktörü gibi etki ederek adenomdan-karsinom dönüşümüne kadar geçen sürede kompleks etki gösterir (113, 115) (Şekil 10).



Şekil 10. COX-2 ve APC yolağı (113). Sitoplazmik β -kateninin, wild-tip APC protein, yardımcı proteinler kompleksi (aktin ve glikojen sentaz kinaz [GSK]-3 β) ile degradasyonu. APC mutasyonu ile protein sentezi indüklenir ve serbest β -kateninin nükleusa transloke olur. COX-2, siklooksijenaz-2; wnt, wingless and Int-1 genleri.

Transkripsiyonal olarak aktif β -katenin ve TCF kompleksleri, c-myc, siklinD1, Peroksizom proliferatör aktive edici reseptör δ (PPAR δ) ve COX-2 gibi spesifik genlerin hepsinin ortak bağlanma bölgesi TCF-4'e bağlanmaktadır. COX-2, wild-tip APC indüksiyonu sonucu azalırken (downregülasyon), APC mutasyona uğradığında β kateninin nükleer birikimi ile artmaktadır (up-regülasyon). Kolon kanser hücrelerinde COX-2 ekspresyonu transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel mekanizmalarla düzenlenmektedir (113).

Ortak özellikleri yaygın NSAİİ kullanımı olan romatoid artritli hastalar üzerinde yapılan çalışmalar, bu hastalarda gastrointestinal sistem kanserlerinin daha az görüldüğünü ortaya koymuştur. Bununla paralel olarak NSAİİ'lerin bu hastalardaki kolon kanseri görülme sıklığındaki düşüşten sorumlu olabileceği fikrini aklı getirmiştir. NSAİİ'lerin kanser gelişimi üzerine etkileriyle ilgili gözlemsel ve

kontrollü olarak 90'lı yıllardan itibaren yapılan birçok epidemiyolojik çalışmayla KKK riskini önemli oranda azalttığı ifade edilmiştir (116-118).

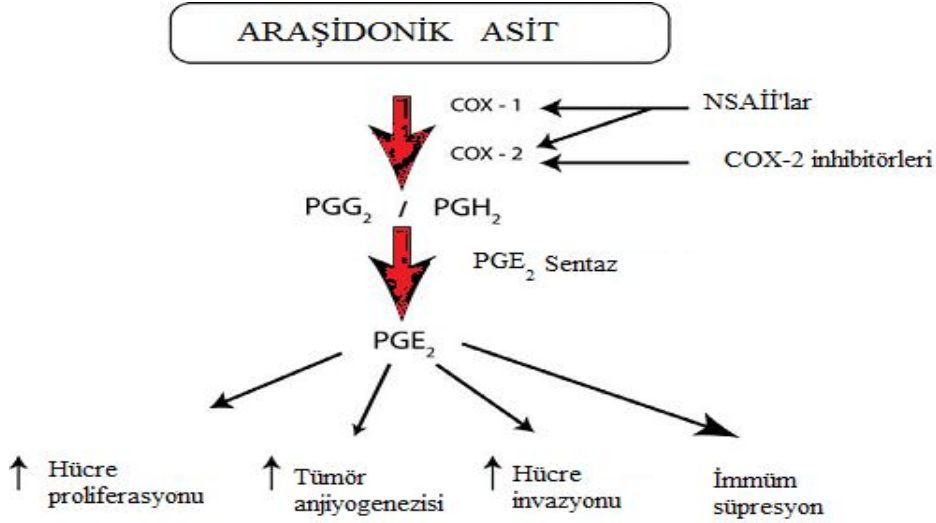
Spesifik bir COX-2 inhibitörü olan Rofekoksib'in FAP hastalarında kullanımı sonucu, poliplerin sayısı ve büyüklüklerinde belirgin bir azalmaya sebep olduğu saptanmıştır (119, 120). Bir diğer spesifik COX-2 inhibitörü olan Selekoksisib'in FAP'lı hastalarda kullanımı sonucu da polip sayısının önemli oranda azaldığı gösterilmiştir (103). Bu çalışmalara paralel yapılan birçok çalışmayla elde edilen sonuçlara bağlı olarak Selekoksisib'in Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (USFDA) tarafından FAP hastalarında kullanımı onaylanmıştır (121).

Kanser gelişimi üzerine COX-2'nin etkileri, yapılan çalışmalarla PGE₂ üretimine bağımlı ve PG'den bağımsız etkiler olarak ortaya çıkmıştır (92).

COX-2'nin enzimatik reaksiyonu sonucu ortaya çıkan PG'ler, hücre büyümesinden, apoptozis ve angiogeneze kadar kanser gelişiminde rol oynayan basamakları etkilemektedir. PG'lerin hücre gelişimin birçok basamağında rol oynadığı ve hücre büyümeyle diferansiyasyonda etkin rolü olduğu gösterilmiştir. Örnek olarak COX-2'nin uyarılması sonucunda barsak epitel hücrelerinde adezyonun arttığı ve apoptotik uyarılara yanıtın azaldığı gösterilmiştir (122, 123).

PGE₂ üretiminden bağımsız mekanizma; ilk olarak COX-2'nin, KKK'lerde direkt olarak karsinogenezi aktive ettiği şeklindedir. Fenoller, halojenize pestisitler, aflatoxin ve polisiklik hidrokarbonlar COX-2 peroksidaz aktivitesini etkileyebilir. İkinci olarak ise PGH₂ malondialdehide dönüşebilir ve bu direk mutajen olarak deoksiniüksosidi etkileyebilir. Sonuçta, proapoptotik aktiviteye sahip serbest AA düzeyleri COX substratı olduğu için COX-2 aktivasyonu ile birlikte azalmaktadır (124).

PGE₂ üretimine bağımlı mekanizma; AA'ten COX enzimi yoluyla sentezlenen PGE₂, hücre proliferasyonu, lokal immün supresyon ve anjiyogenezisi indüklerken apoptozisi inhibe etmekte ve hücre motilitesini arttırmaktadır (92, 125, 126) (Şekil 11).



Şekil 11. PG sentez yolağı ve PGE₂'nin kanser gelişimi üzerine etkileri (126).

Son yıllarda yapılan birçok çalışmada, kolon kanserlerinde artmış COX-2 ekspresyonu ile PGE₂ düzeyleri ve bunların karsinogenezdeki mekanizmaları araştırılmıştır. PGE₂ ile Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)'nün, kolon kanser hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonunda sinerjistik etki gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu durum da COX-2/ PGE₂ oranının kanser gelişimi üzerindeki etkilerini bir reseptör tirozin kinaz sinyal yolu üzerinden gösterdiğini destekler niteliktedir (127).

Dışardan PGE₂ verilmesinin ve artmış COX-2 ekspresyonunun ise B hücreli lenfoma-2 geni (Bcl-2) düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir. Bcl-2, intrinsik apoptotik yolağı bloke etmek için mitokondriyal proapoptotik proteinlerin serbestleşmesini inhibe eder (128).

Artmış COX-2 ekspresyonun tümör proliferasyonu ve metastaz üzerine olan etkileri anjiyogenezi indüklemesi temeline dayanır. COX-2 aynı zamanda, VEGF gibi proanjiogenik faktörlerin salınımını artırır. Tümörde COX-2'nin artmış ekspresyonu, VEGF salınımı ve mikrodamar yoğunluğunda artış ile ilişkili bulunmuştur (129).

Buna göre;

COX-2'nin PGE₂ üretiminden bağımsız etkileri

- Serbest AA düzeylerinde azalma
- Karsinogenezin aktive olması

-Malondialdehid üretiminde artış

COX-2'nin PGE₂ üretimine bağlı etkileri

-Hücre proliferasyonunun uyarılması

-Hücre motilitesinde artış

-Apoptozisin inhibisyonu

-Anjiyogenezisin uyarılması

-İnvazyon ve metastaz yeteneğinde artma

-Lokal immünsüpresyonun gelişiminin tetiklenmesi şeklinde özetlenebilir.

1.1.3. Anjiyogenezis ve İlgili Parametreler

1.1.3.1. Anjiyogenezis

Anjiyogenezis vücutta fizyolojik ve patolojik şartların her ikisinde de ortaya çıkar. Fizyolojik olarak ortaya çıktığı durumlar; yara iyileşmesi, menstrüal siklus, embriyogenezis ve benzeri durumlardır. Patolojik olarak ise öncelikle tümörler olmak üzere romatoid artrit, psöriazis ve retinopatiler gibi hastalıklarda ortaya çıkar (130, 131).

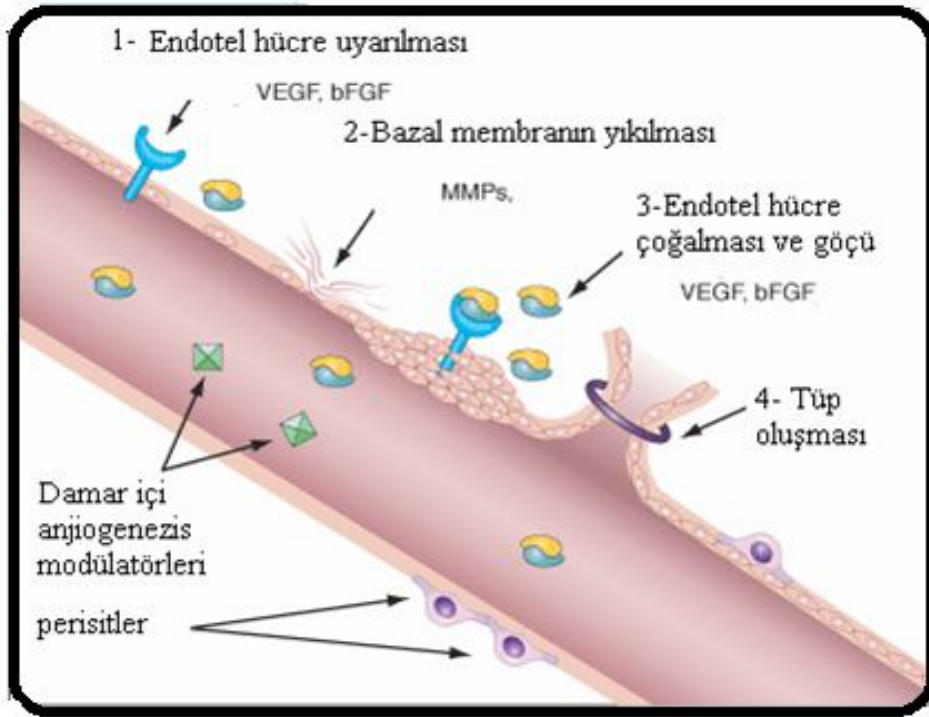
Tomurcuklanma mekanizması ve damar içi doku yapılanması anjiyogenezis oluşumundaki temel iki mekanizmadır. Endotel hücre göçü, çoğalması ve damar lümeni gelişimi gibi basamaklar tomurcuklanma mekanizmasının temelini oluşturur ve tomurcuklanma mevcut büyük damarlardan küçük kan damarlarının tomurcuklanma şeklinde oluşması olarak tanımlanır. Damar içi doku yapılanması ise doku kıvrımlarının damar içine invaze olmasıyla damar lümeninin bölünmesi şeklinde tanımlanmaktadır (132, 133).

Anjiyogenezis birçok basamağın birbirini takip ettiği bir olaylar zinciridir. Başlangıçta anjiyogenezisi başlatacak bir etken ya da stimulus oluşmaktadır (örneğin hipoksi ya da inflamasyon) (134, 135).

Anjiyogenezin başlamasıyla aşağıdaki olayları kapsayan karmaşık bir süreç ortaya çıkar (134-136) (Şekil 12).

- Bazal membran ve ESM'in proteolitik enzimlerle yıkılması: Anjiyogenik faktörler MMP'lar ve plazminojen aktivatör enzimlerini aktive eder. Bu enzimler bazal membranı ve ESM'i yıkar.

- Endotel migrasyonu: Anjiyogenik faktörler endotel hücrelerindeki reseptörlerine bağlanarak onları aktive eder ve endotel hücrelerinin ESM içinde göçünü sağlarlar.
- Endotel proliferasyonu: ESM içinde göç eden endotel hücreleri büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalır.
- Tüp oluşumu, matürasyon, anjiyogenezin inhibisyonu: Proliferasyon durur, endotel hücreleri morfolojilerini değiştirerek bir lümen oluşturacak şekilde integrinler aracılığıyla birbirlerine sıkıca tutunarak tüp oluşumunu gerçekleştirirler. Çoğunlukla perisitlerin ve vasküler düz kas hücrelerin endotelyuma katılması ve yeni bazal membranın sentezlenmesi ile anjiyenez tamamlanır. Yeni oluşan kapillerler olgunlaşırlar ve en son olarakta anjiyogenezis inhibe edilir.

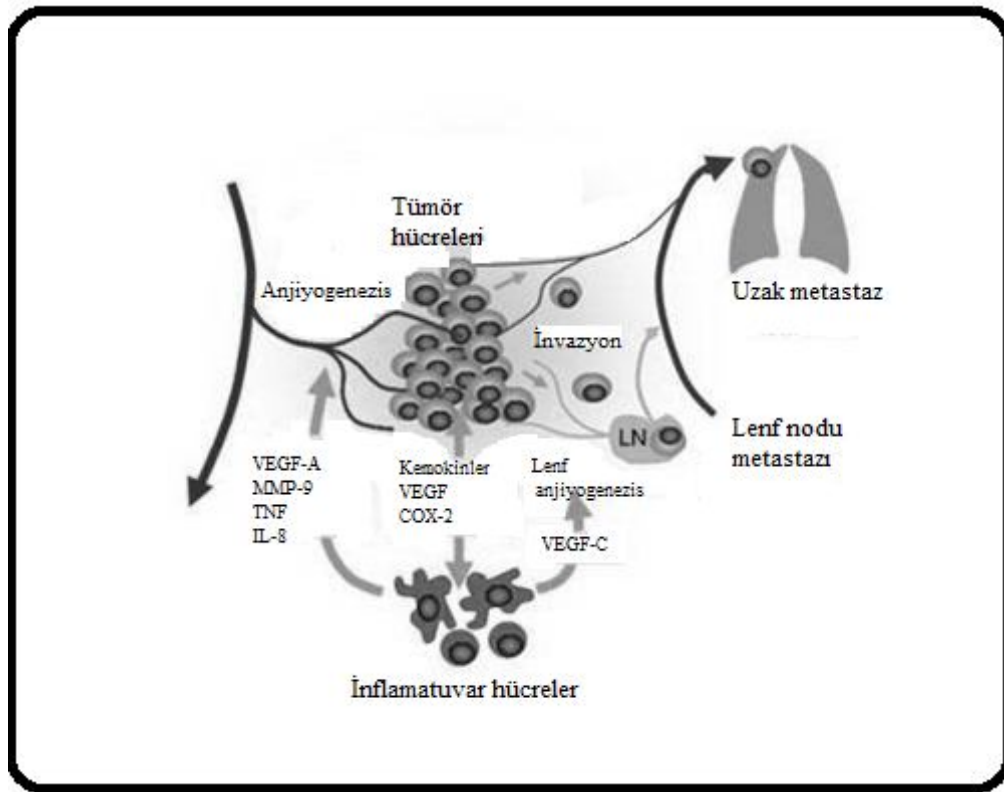


Şekil 12. Anjiyogenesis oluşum sürecinin şematik şekli (137).

Tümöral anjiyogenezis fizyolojik anjiyogenezisten farklıdır. Fizyolojik anjiyogenezis stabil bir olay olup kendi kendisini sınırlandırırken tümöral anjiyogenezis stabil değildir. Hipoksi sonucu tümöral anjiyogenezis ortaya çıkar. Tümöral anjiyogenezis sonucu ise tümörün büyümesi hız kazanır. Tümör büyüdükçe ortam yine hipoksik hale gelir ve yine anjiyogenezis stimüle olur. Dolayısı ile

tümöral anjiyogenezis bir kısır döngü şeklinde devam eder, fizyolojik anjiyogenezis gibi sınırlı bir olay değildir (138).

Tümör anjiyogenezis süreci; spesifik büyüme faktörleri, endotel hücre reseptörlerinin aktivasyonu ve endotel hücrelerinin çoğalma kapasitesi ile bu süreci destekleyen hücre dışı matriks komponentleri (139), birçok sitokin ve kemokinin de etkili olduğu, invazyon ve metastazı kolaylaştıran karmaşık bir süreçtir (134, 140) (Şekil 13).



Şekil 13. Tümüral anjiyogenezis ve etkili parametreler (138).

1.1.3.2. VEGF

Anjiyogenezis sürecinde etkili birçok ajan vardır. Bu ajanlar tümör hücrelerinden, monosit, fibroblast gibi ortamdaki mevcut diğer hücrelerden salınabildiği gibi kollajen matriksin proteolitik yıkımı sonucu da açığa çıkabilirler (139).

Anjiyogenik moleküller içinde en önemlisi ve en çok araştırılanı VEGF'dir. VEGF homodimerik, heparin-bağlayıcı glikoprotein yapısındadır ve çeşitli alt grupları tanımlanmıştır. VEGF A, B, C, D, E, ya da aminoasit sayılarına göre

VEGF121, VEGF165, VEGF189, VEGF206 ve VEGF145 gibi izoformları bulunmaktadır (141, 142).

VEGF'ün bioaktivitesi spesifik reseptörlerine ve koreseptörlerine bağlanması ile oluşur. Bu reseptör ve koreseptörler, vasküler ve lenf damarı endotel hücrelerinde, monosit ve makrofajlarda, hematopoetik stem hücrelerde, epiteliyal hücrelerde, fibroblastlarda, düz kas hücrelerinde ve myojenik prekürsör hücrelerde bulunur (143). VEGF tirozin kinaz yapısındaki mevcut üç reseptörü yoluyla biyolojik aktivitesini gerçekleştirir. Bu reseptörler VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (flk-1/KDR) ve VEGF-R3 (flt-4) olarak sıralanabilir. VEGF-R1 ve R2 reseptörleri endotel hücreleri üzerinde bulunurken VEGF-R3 lenf damarları üzerinde lokalizedir (144-146).

VEGF reseptörlerinin aktivasyonu; fosfolipaz-C, fosfoinositol-3 kinaz ve Ras GTPaz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinleri fosforile olur ve endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve diferansiasyonu sağlanır (139).

Anjiyogenezisin VEGF-bağımlı bir mediyatörü olan Nitrik oksit (NO), VEGF'in NO sentaz enzimi üzerindeki uyarıcı etkisi sonucu oluşur ve endotel hücre migrasyonunda rol alır (147).

VEGF salınımını uyaran en önemli faktör hipoksidir. Hipoksik ortamda düzeyi hızla artan hipoksiyle indüklenen transkripsiyon faktör-1 (HIF-1), VEGF salınımını uyarır ve VEGF endotel hücreler üzerindeki reseptörlerine bağlanır, bununla birlikte anjiyogenezise yol açan bir tirozin kinaz yolağı aktive olur (148). Bunun dışında çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler, hormonlar, reaktif oksijen radikalleri ve NO de VEGF salınımını stimüle eden diğer nedenlerdir (143). Temel anjiyogenik faktör olmasının yanı sıra; vasküler permeabiliteyi arttırıcı etki gösterir. Bu etkiyi damarlarda; endotel hücreleri arasında fenestrasyon, veziküler organeller ve transselüler bağ oluşumuna olanak sağlayarak gerçekleştirir. Endotel hücreleri için migratuvar özelliğinin dışında VEGF; ESM yıkımından sorumlu olan MMP'lar ile ürokinaz ve doku- tipi plazminojen aktivatorlerinin salınımını da uyarır. Sonuç olarak invazyon ve metastazı kolaylaştırıcı etkiye de sahiptir (149).

1.1.3.3. Matriks Metalloproteinazlar (MMP)

Karmaşık ve dinamik bir oluşum olan ESM, protein ve proteoglikan yapıları içeren, yapısal bir destek doku olmakla kalmayıp aynı zamanda hücre proliferasyonu,

farklılaşması ve migrasyonu ile yapışma, dokuların morfolojik gelişimi gibi birçok biyolojik aktivitede de görev almaktadır. ESM, tümoral dokunun büyümesi ve tümör hücresinin yayılımını önlemek amacıyla primer bir bariyer görevi üstlenmiştir. Tümör hücreleri, bu bariyeri aşmak için metalloproteinazları kullanırlar (11, 150).

Bağ dokusu hücrelerince salgılanan MMP'lar, uterus involüsyonu, kemik resorpsiyonu, yara iyileşmesi gibi fizyolojik olaylarla kanser gelişimi gibi patolojik süreçlerde rol alan endopeptidazlardır (151). MMP'lar, yaklaşık 28 enzimden oluşan, fizyolojik ve patolojik doku yıkımında anahtar rol oynayan ekstrasellüler proteazlardır (152, 153).

Karsinogenezis de dahil olmak üzere, artrit, inflamasyon, multipl skleroz, kronik yaralar, kronik akciğer hasarı, bronşiyal astım, pulmoner hipertansiyon MMP'lerin rol oynadığı belli başlı patolojik durumlardır (154).

MMP'lar yapılarına ve substrat özgüllüklerine göre 5 alt grupta sınıflandırılabilirler (155) (Tablo 1).

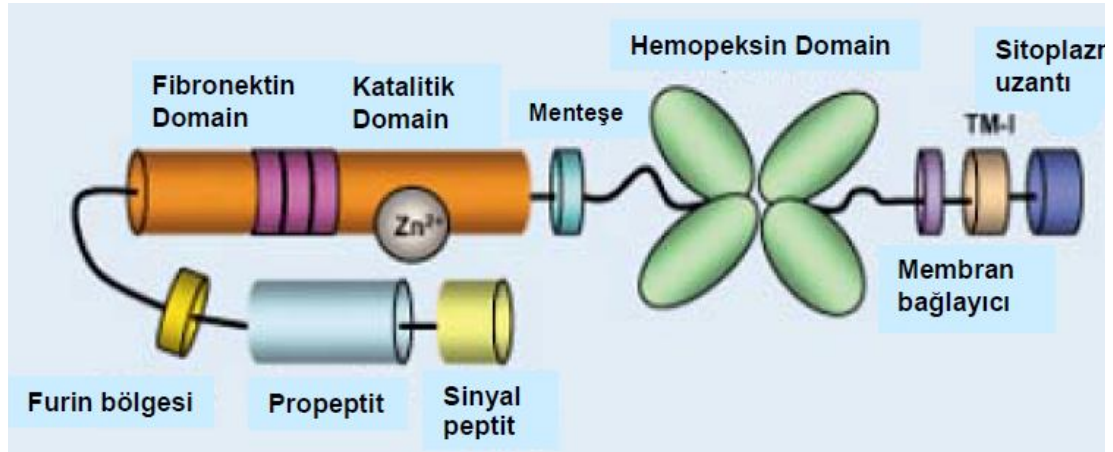
1. Kollajenazlar
2. Stromelisinler
3. Jelatinazlar
4. Membran tipi MMPler (MT-MMP)
5. Sınıflandırılmayan MMP'lar

Tablo 1. İnsanlarda metalloproteinaz ailesinin üyeleri (11).

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

Yapısal olarak incelendiğinde ise MMP'lar şu temel bölümlerden oluşur (156) (Şekil 14):

- Sinyal peptit
- Propeptit
- Çinko bağlayıcı bölge içeren katalizör kısım
- Hemopeksin benzeri kısım (substrat spesifitesini belirler)
- Katalizör kısmı hemopeksin benzeri kısma bağlayan prolinden zengin bölge

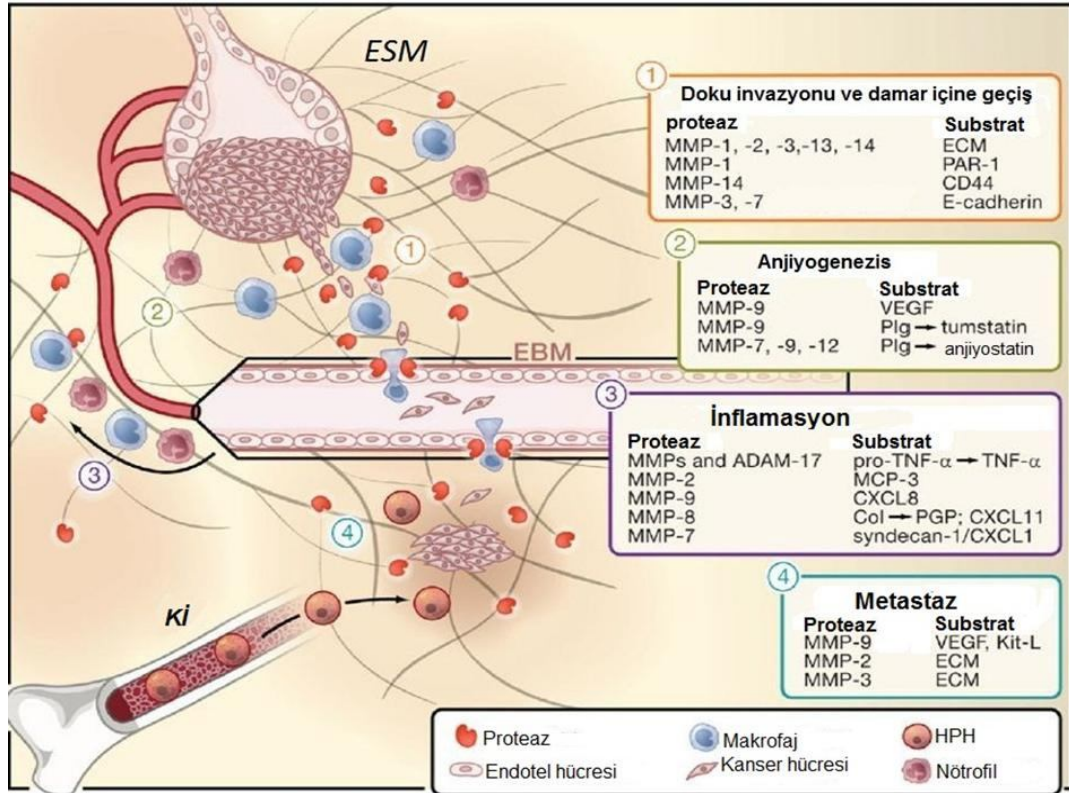


Şekil 14. Matris metalloproteinaz domain yapısı (157).

MMP'lar yapısal olarak birtakım ortak özelliklere sahiptirler. Endoplazmik retikulumdan ilk sentezlenen protein, sinyal peptittir. Propeptit bölge ile katalitik çinko bağlayan bölge etkileşerek enzimin inaktif halde kalmasını sağlar. Katalizör bölge, propeptit bölgenin ayrılmasıyla beraber yapısındaki çinko iyonları sayesinde enzim aktivitesini sağlayan bölgedir. MMP-7 ve MMP-26 dışındaki diğer MMP'lar C terminalinde hemopeksin/fibronektin benzeri hem bağlayan peptid yapılı bir bölge içerirler. Bu bölge endojen doku inhibitörleri olan TIMP'ların jelatinaz grubu MMP'lara (MMP-2, MMP-9) ve MMP-13'e bağlanması ile ilişkilidir (12).

Kanser gelişiminde MMP'ların rolleri yaklaşık olarak 40 yıldır araştırılmaktadır. Bu enzimler; metastaz ve invazyon, anjiyogenezis, apoptozisin inhibisyonu, antitümör savunma mekanizmaları yoluyla karsinogenez sürecinde yer almaları nedeni ile kanser araştırmaları için hedef konuma gelmiş moleküllerdir (158, 159).

MMP'lar kanser gelişim sürecinde inflamasyon, anjiyogenezis, invazyon ve metastaza kadar birçok aşamada etkili moleküllerdir (158) (Şekil 15).



Şekil 15. Kanser oluşum sürecinde MMPlerin rolleri (158).

PAR-1 (Proteinaz aktive reseptör), Plg (Plazminojen), PGP (Prolinglisin-prolin), CXCL (Kemokin ligandları), MCP-3 (Monosit kemoatraktan protein-3) HPH (Hemopoetik progenitör hücre).

Hücrel organizasyon ve kontakt inhibisyonun kaybı kanser gelişim sürecindeki ana mekanizmalardır. MMP'lar, hücrelerin hem diğer hücreler, hem de ESM elemanlarıyla kontakt mekanizmalarını etkiler (158, 159).

MMP'lar epiteliyal mezenkimal değişim aşamasında invazyon ve metastaz üzerine etki ederler. Aktivitelerinin artmasına ek olarak invazyon sürecinde belli bir alanda odaklanırlar. MMP-2, MMP-9, MMP-14 ESM parçalanması aşamasında birlikte çalışırlar (160). Metastaz sürecinde MMP aracılı sinyal üretimi önemlidir. MMP-1 varlığında MMP-aracılı sinyal üretimiyle birlikte metastaz artmaktadır. Proteinaz aktive reseptörler (PAR), bir dizi G-proteini ile eşleşmiş reseptörlerdir ve kanser hücresinin göçüyle tümör invazyonunu etkileyebilir. PAR-1, akciğer, kolon ve meme kanserlerinde artar (161).

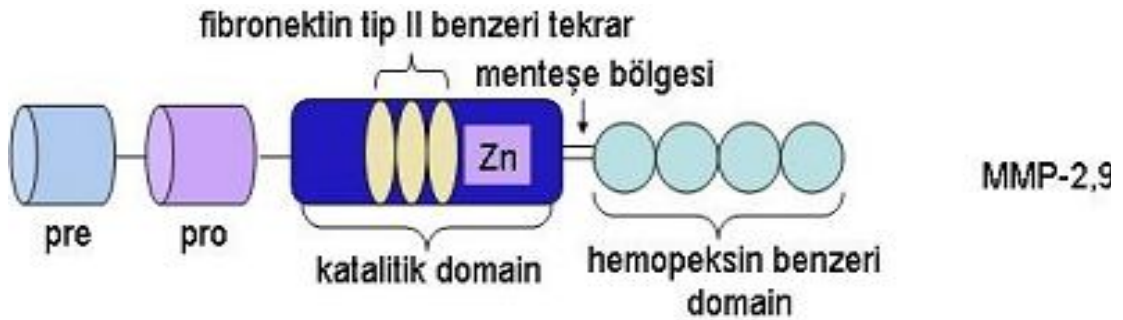
MMP'ların anjiyogenezis aşamasında da önemli fonksiyonları vardır. MMP-2, MMP-9 ve MMP-14 tümör anjiyogenezisinde başlıca rol oynarken; MMP-1 ve

MMP-7 daha az oranda etkilidir (162). Anjiyogenezisin ilk basamağı olan bazal membranın, mikrovasküler bazal membran ve intertisyuma ayrılması MMP enzimleri tarafından gerçekleştirilir (163). Anjiyogenezisin regülasyonunda özellikle MMP-9 ESM'in çözünmesinde, yeni damar oluşumunun başlangıcında ve devam etmesinde önemli görev alır (164). MMP'lerin anjiyogenik etkilerinin yanı sıra endostatin oluşumuna katkıda bulunarak gösterdikleri anti-anjiyogenik etkileri, anjiyogenezin regülasyonu sürecinde proteinler arası etkileşimin karmaşıklığı açısından dikkat çekicidir (16).

İnflamatuvar süreç boyunca immün hücrelerin ekstrasvasyonu endotelial bazal membranın ve diğer matris komponentlerinin proteolitik yıkımı ile sonuçlanır. Birçok kanser türünde MMP'lar, kanserin erken tanısı, progresyonunun takibi ve metastazın saptanmasında kullanılabilir (165).

1.1.3.3.1. Jelatinazlar; MMP-2 ve MMP-9

Jelatinazların iki üyesi olan MMP-2 (Jelatinaz A) ve MMP-9 (Jelatinaz B) kollajen ve jelatin etkileşimleri için gerekli fibronektin benzeri bölüm ve 210 aminoasit içeren C-terminal hemopeksin benzeri bölümden oluşur. Hemopeksin benzeri bölüm substrat spesifitesini belirlemede anahtar rol oynar. Ayrıca jelatinazların yapısında katalitik bölge ve C-terminal hemopeksin benzeri bölüm arasında proline zengin, bağlayıcı bölge yer alır (166-168) (Şekil 16).



Şekil 16. Jelatinazların genel yapısı (12)

MMP-2 jelatinaz, 72 kDa ağırlığındaki MMP-2'dir (169). Yapısında jelatinle etkileşim sağlayan fibronektin benzeri bölge ve birden fazla O-bağlı oligosakaritlerin etkileşim sitelerini içeren serin/prolin/treonin aminoasitlerinden zengin tip V kollajen benzeri bölge, katalitik bölge ve hemopeksin benzeri bölgeler bulunmaktadır (170). Latent formda proenzim olarak salınan MMP-2'nin aktifleşmesi için hemopeksin

benzeri bölümüne TIMP-2'nin C terminal bölümü bağlanarak bir kompleks oluştururlar ve hücre yüzeyine yerleşerek burada membran tip MMP-1(MT-MMP-1)'in aktif kısmıyla birleşir ve üçlü bir kompleks meydana gelir. Bu üçlü kompleks proMMP-2'nin başka bir MT-MMP yoluyla aktifleşmesini sağlar (171). MMP-2'nin spesifik inhibitörü olan TIMP-2 pro MMP-2'nin aktifleşmesi aşamasında da etkilidir.

MMP-9, bazal membrandaki özellikle tip IV kollajeni yıkan bir endopeptidazdır (172). 92 kDa'luk bir molekül olan MMP-9, MMP ailesinin en büyük üyesidir (173). Sinyal peptidi, propeptit bölgesi, çinko atomu bağlayan bölge, COOH-terminal hemopeksin benzeri bölgeleri yapısında bulundurur. Katalitik bölge ve hemopeksin benzeri bölge arasında prolinden zengin bağlayıcı bölge yer alır. C-terminal hemopeksin benzeri bölge substrat spesifitesinin belirlemede anahtar rol oynar. Fibronektin benzeri bölge ise kollajen ve jelatinlere bağlanmayı kolaylaştırır (168).

Pro MMP-2 ve TIMP-2 arasında MMP-2'nin aktifleşmesi için gerekli olan noninhibitör kompleksin bir benzeri de pro MMP-9 ve TIMP-1 arasında meydana gelir ve olaya MT-MMP'ların katılımıyla da MMP-9 aktifleşir (171).

Malign dokularda en fazla tespit edilen, tümör saldırganlığı ve metastatik potansiyelle en fazla ilişkisinin olduğu saptanan MMP'lar MMP-9 ve MMP-2 dir (172, 173).

Makrofaj kaynaklı MMP-2 ve 9 immün hücrelerin beyne göçünde etkili mediatörlerdir. Tümör ilişkili makrofajlardan kaynaklanan MMP'ların kanser hücrelerinin kan dolaşımına geçişinde etkili olduğu da düşünülmektedir (174).

Kolorektal kanserlerde MMP-2 ve MMP-9'un artışı birçok çalışmayla gösterilmiş ve potansiyel birer biyobelirteç olarak kullanılabilecekleri ifade edilmiştir (175-177).

1.1.3.4. Metalloproteinaz Doku İnhibitörleri (TIMP)

MMP'ların sahip olduğu proteolitik aktiviteleri, spesifik olmayan α -2 makroglobulin, α -1 antiproteaz gibi inhibitörler ve spesifik olan inhibitörlerince yani TIMP'lar tarafından engellenir (155). TIMP'lar bağ dokusu metabolizmasının düzenlenmesinde anahtar rol oynarlar. Pek çok dokuda ve vücut sıvılarında bulunurlar. MMP'lara latent enzim formunun aktivasyonu ve katalitik aktivitenin sürdürülmesini de inhibe etmek amacıyla irreversible ve non-kovalent olarak

bağlanırlar. Böylece TIMP'ler MMP enzim aktivitesiyle MMP/TIMP oranını kontrol altında tutarlar. İnsanlarda TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4 olmak üzere bugüne dek tanımlanmış dört çeşit TIMP bulunmaktadır. TIMP'lar da MMP'lar gibi vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, kan hücreleri, bağ dokusu hücreleri ve makrofajlarca sentez edilirler. TIMP'lar matriksteki yerleşimleri ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi yönünden aralarında birtakım farklılıklar olmasına rağmen, MMP aktivitesini inhibe etme açısından benzer özellikler gösterirler (10, 12).

TIMP-2, 21 kDa ağırlığında glikolize olmamış bir proteindir, MMP-9 dışındaki MMP'ları inhibe eder. Spesifik olarak MMP-2'yi inhibe eder (178). TIMP-2 pro-MMP-2 ve MT1-MMP arasında bir adaptör molekülü olarak hareket ederek, MMP-2'nin aktivasyonuna da katılır (155). Pro MMP-2'nin aktivasyonu için TIMP-2'nin C-terminal bölümüyle pro MMP-2'nin hemopeksin benzeri bölgesi etkileşirken, Aktif MMP-2'nin inhibisyonu için ise TIMP-2'nin N- terminal ucuyla MMP-2'nin katalitik bölümü etkileşir (171). MMP-2'nin TIMP-2 ile inhibe olması ve MMP-9'un ise TIMP-1 tarafından inhibe edilmesi, TIMP'ların değişik MMP türlerine göre farklı özgüllük gösterdiğinin ifadesidir (12).

Klinik alanda kanser tedavisinde TIMP'lerin metalloproteinaz inhibitörü olarak tedavi amaçlı kullanımı güncel bir yaklaşım değildir. Bunun nedeni ise, biyolojik aktif proteinlerin üretimindeki zorluklar ve ilaç dağılımının optimize edilememesidir. Ayrıca TIMP'ler MMP'ları inhibe etme özelliklerinin yanı sıra birçok karmaşık fonksiyonu olan proteinlerdir. TIMP'lerin yalnız MMP inhibisyonu özelliğinin olmaması onların tek başına tedavide kullanımlarını engellemektedir (179, 180).

1.1.3.5. Hücre Adezyon Molekülleri

Hücrelerin birbirlerine ve ESM komponentlerine yapışması diğer adıyla adezyon, organizmanın tüm yaşamı boyunca, tüm doku ve organların oluşum, devam ve yeniden şekillenmesi aşamasında oldukça önemlidir. Bir başka anlatımla, hücre yapışma olayları ve kemoatraktanlar, hormonlar ve sitokinler gibi eriyebilir birtakım faktörler arasındaki etkileşim, multisellüler organizmanın oluşumu ve işlevi üzerine oldukça etkilidir. Morfojenik ve işlevsel organizasyonuna ek olarak; hücre-hücre ve hücre-matriks adezyonu, yabancı antijen ve patojenlere karşı konakçı savunmasında da temeldir (181). Lökositlerin dolaşımdan ayrılarak inflamasyon alanına göçü için

önce endotel hücrelerine daha sonrada ESM komponentlerine bağlanması gerekir. Yine, immün cevabın başlangıcında antijeni tanıyabilmesi için lenfositlerin antijen sunan hücrelere, hücre aracılı sitoliz gibi fonksiyonlarını yapabilmeleri için de hedef hücreye yapışmaları gerekmektedir. Bu yapışma olayları, lökositlerin yüzeylerinde bulunan ve diğer hücre yüzeylerindeki veya ESM proteinleriyle etkileşen hücre adezyon molekülleri yoluyla gerçekleşir. Bu moleküller sadece antijen sunumu, lökositlerin aktivasyonu, lökositlerin inflamasyon alanına göçü, hedef hücrenin eritilmesi gibi hücre-hücre etkileşimlerini gerektiren immün ve inflamatuvar olaylarda değil, embriyogenez, yara iyileşmesi ve metastaz oluşumu gibi birçok süreçte de görev alırlar (182, 183).

Vertebralılarda en az 6 tane hücre adezyon molekülü ailesi tanımlanmıştır. Bir adezyon molekülünü bu ailelerden biri içine dahil etmek oldukça özel yapısal profilinin varlığına ve o aileyi karakterize eden özel yapışma hızlandırıcı alanların varlığına dayanır (184).

Hücre adezyon molekülü ailesi aşağıdaki gibi sınıflandırılır (184):

- Kaderinler
- İmmünoglobulin (Ig) Süpergen Ailesi
- İntegrinler
- Selektinler
- Hücre Yüzey Müsinleri
- Hücre Yüzey Proteoglikanlar

Ig süpergen ailesinin bir üyesi olan ICAM, hücre adezyon moleküllerinin en bilinenlerindendir. ICAM-1; endotel hücreleri, lenfositler, monositler gibi birçok hücrede normal şartlarda düşük seviyelerde bulunurken, IL-1, Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF α), interferon-gama (IFN- γ) gibi sitokinlerin indükleyici etkisiyle düzeyleri artar. Bu artış akut ve kronik inflamasyon alanlarında gerçekleşir. ICAM-1, integrin ailesinden lökositlerin tamamında bulunan lenfosit fonksiyon ilişkili antijen-1 (LFA-1) ve esas olarak nötrofillerde, monositlerde ve eozinofillerde bulunan makrofaj antijen-1 (Mac-1) ile birleşir. Aynı zamanda rinovirüsler için de reseptör işlevi görür (184).

ICAM-1'in ekstraselüler kısmının proteolitik ayrılması sonucu solubl formu (sICAM-1) ortaya çıkar. Bu formun plazma düzeyleri, patolojik durumlarda

inflamasyonun şiddeti ile paralellik gösterir. Birçok enfeksiyöz, inflamatuvar ve neoplastik hastalıkta serum ICAM-1 düzeyleri artmıştır (184).

ICAM-1 lenfosit agregasyonu ile birlikte lenfositlerin endotele adezyonunu sağlayarak lökosit migrasyonunu düzenler. İnflamatuvar sitokinlerden bazıları (IL-1, TNF α , İnterferon- γ) hücrel aktivasyona yol açarak ICAM-1'in hücre yüzeyinde ekspresyonunu artırırlar. Hücre Yüzeyinde ICAM-1'in ekspresyonundaki bu artış, immün sistem aktivasyonunun ve oluşan immün cevabın en erken göstergelerinden biridir (185, 186).

Hücre adezyon moleküllerinin, hücre-hücre etkileşimlerde ve hücre ile hücre dışı matriks bileşenleri arası etkileşimlerde önemli görevleri vardır. Kanser hücrelerinin adezyon özelliklerinde meydana gelen değişiklikler, bu hücrelerin malign potansiyellerini önemli oranda etkilemektedir ICAM-1 ve VCAM-1, tümöre infiltrate olarak hücrel ve humoral immün cevap ile tümörün sitolizine yardımcı olmaktadır (17, 187).

1.1.3.6. Kemokinler

Kemokinler sitokin ailesinin yeni bir üyesidir. Yaklaşık 50 ayrı üyesi olan bu mediatörlerin normal biyolojik ve patolojik süreçte düzenleyici türde birçok görevleri vardır. Kromozom üzerinde belirli bölgelerde toplanan kemokin genleri uyarıldıktan sonra heparin-bağlayıcı nitelikte ve 8 ila 18 kilodalton ağırlığında protein sentezlerler. Moleküldeki sistein (C) aminoasidinin pozisyonu esas alınarak sınıflandırılır ve buna göre isimlendirilirler. Alfa-kemokinler, amino terminal ucundaki iki sistein arasında bir amino asit bulundurduğu için CXC kemokinler olarak tanımlanırlar. Beta-kemokinler ise uçtaki sisteinler yan yana oldukları için CC-kemokinler olarak adlandırılırlar. Alfa-kemokinler CXC dizilerinde nötrofiller için kemotaktik özelliğe sahip olan glutamik asit-lösin-arjinin aminoasit dizilerini içerirken, lenfositler üzerinde kemotaktik etkili aminoasit dizilerini içermezler. Beta kemokinler ise nötrofiller üzerine etkili olmalarına rağmen; monositler, eozinofiller, bazofiller ve lenfositler üzerine de farklı seçicilikte etki gösterirler (188). Günümüzde tanımlanmış, 28 CC kemokin, 16 CXC kemokin, 2 C kemokin ve 1 tane de CX3C kemokin üyesi bulunmaktadır. Bunlardan özellikle CC ve CXC kemokin ailelerinin üyeleri hastalıkların araştırılması ve şekillendirilmesi sürecinde dikkatleri üzerlerine çekmektedirler (189).

Kemokinlerin hücreler üzerinde bağlandıkları yaklaşık 20 tane reseptörü tanımlanmıştır. Bu reseptörler G-proteinine bağımlı türde hücre-içi sinyal iletimi yapan reseptörlerdir. Kemokinlerin reseptörleriyle etkileşimleri sonucunda sinyal iletimi ile uyarılan hücreler, doku zedelenmesi, inflamasyon veya ilgili bölgeye migrasyon (kemotaksis) yapmak üzere harekete geçerler (188).

CC kemokinlerin, fagositik ve granüler lökositler üzerine etkiyle direkt hücre migrasyonu ve kemoatraktan cevap oluşumuna katkıda bulunmalarının yanı sıra, süperoksit anyonları üzerine etki etme, integrin aktivasyonu, mikroorganizmalara karşı savunma, homeostazis, hücre gelişim süreci, inflamasyon, anjiyogenezis, tümör gelişimi, metastazis, selektin/integrin lökosit aktivasyonu, otoimmün hastalıklar ve havayolu hastalıkları gibi birçok olayda da çeşitli görevleri vardır (187).

Kemokinler ve kendilerine ait reseptörleri aracılığıyla anjiyogenezis ve tümör büyümesini modüle etmekte, stem hücre proliferasyonunu ise inhibe etmektedirler (188).

Monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) ya da CC kemokin ligand-2 (CCL-2), inflamasyon süreci boyunca hücre göçünde görev alan CC kemokin ailesinin bir üyesidir. Sitokinlerle uyarılmış endotel hücrelerinden ve vasküler düz kas hücrelerinden, dolaşımdaki monositleri inflamasyon bölgesine çekmek için salgılanır (189-191).

MCP-1'in temel fonksiyonu dolaşan monositlerin dokulara transmigrasyonunun indüklenmesidir ancak bunun yanı sıra süperoksit üretiminin artırılması sitokin sekresyonunun indüklenmesi ve adhezyon moleküllerinin ekspresyonunun artırılması gibi birçok farklı etkiye de sahiptir (192, 193).

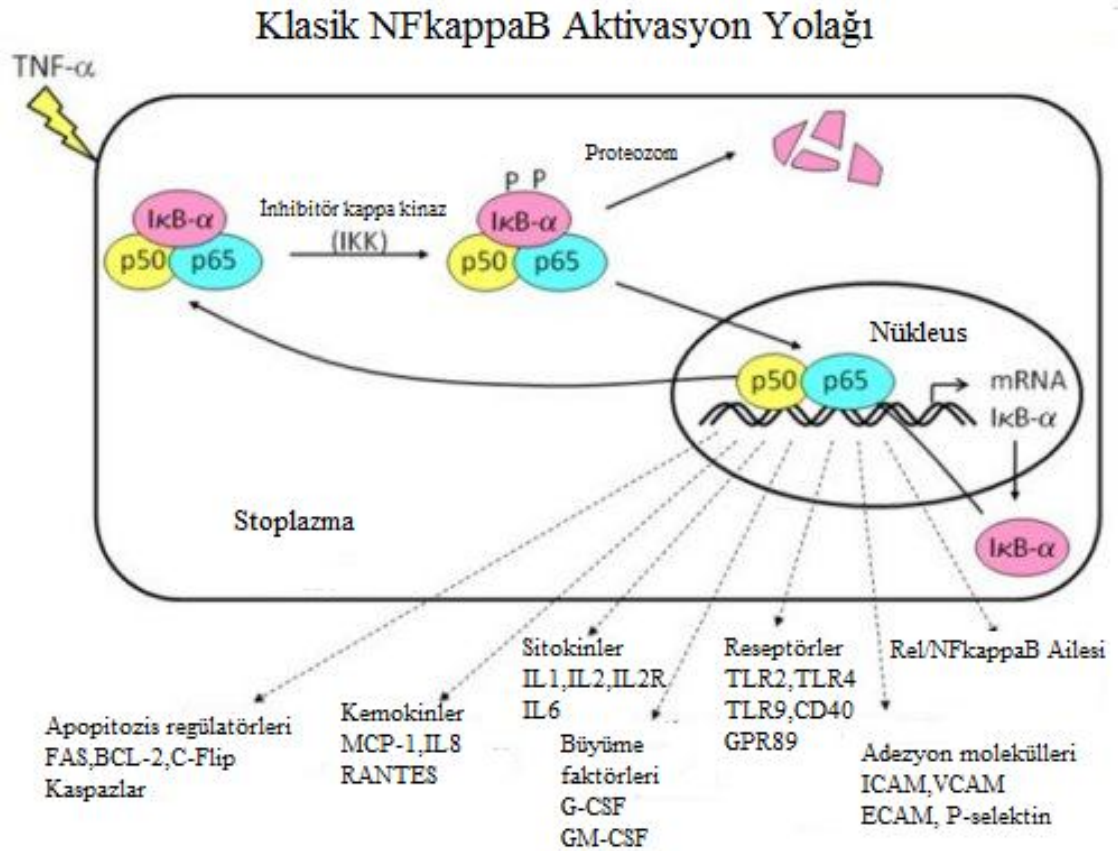
MCP-1 gibi birçok sitokin ve kemokin, NF- κ B gibi transkripsiyonel faktörlerle beraber birçok kronik hastalık ve kanser için birer biyobelirteçtir (194).

1.1.3.7. Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B)

Bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B Rel-family proteinlerinin heterodimerik bir kompleksidir (195). Transkripsiyon faktörlerinin bilinen beş proteininden p50 ve p65'in heterodimer bir oluşumu olan NF- κ B, G0 fazındaki hücrelerin sitoplazmasında sentezlenir ve inhibitörü olan inhibitör kappa B (I κ B) proteinleri ile beraber sitoplazmada inaktif olarak bulunur. NF- κ B; sitokinler,

radasyon ve bazı kemoterapötik ajanlar, mitojenler, büyüme faktörleri, bakteriyel ya da viral genler, gibi birbirinden farklı geniş spektrumlu indükleyicilerle fosforilasyon, ubikuitinasyon ve I κ B'nin proteozom-aracılı degradasyonu sonucu aktive olur (195, 196).

TNF α ya da diğer bazı sitokinler, hücresel stimülasyonun gerçekleşmesi için bazı kinazların aktivasyonuna öncülük eder. İnhibitör κ B kinaz (I κ K), I κ B'yi hedef degradasyon için seçerek fosforiller. I κ B'nin degradasyonundan sonra sitoplazmada sessiz halde bekleyen NF- κ B serbestleşerek nükleusa transloke olur. Nükleusta transaktiviteden sorumlu genlerin ya da hedef genlerin promotor bölgelerinde spesifik DNA dizileri içeren bağlanma bölgeleriyle NF- κ B arasındaki etkileşim gerçekleşir (195, 197, 198) (Şekil 17). Yeni sentezlenen I κ B'ler nükleusa transloke olarak oradaki NF- κ B dimerleriyle birleşerek onları nükleustan elimine eder. Aynı anda sitoplazmada bulunan protein A20 de TNF α reseptörünün aktivitesini süprese eder (199).



Şekil 17. NF- κ B Aktivasyon yolağı (200).

Kolorektal kanserler de dahil olmak üzere birçok kanser türü üzerinde yapılan araştırmalarda NF- κ B aktivitesi araştırılmıştır (201-206).

NF- κ B; hücre büyümesi ve diferansiyasyonu, apoptozisin regülasyonu, anjiyogenezis, invazyon ve metastaz üzerine etkili neoplastik transformasyondan sorumlu birçok genin ekspresyonunu kontrol etmektedir (207-210).

Bunun yanı sıra NF- κ B'nin aktivasyonunun antikanser tedavi direnci açısından da önemli olduğu bilinmektedir (211).

1.1.4. Kimyasal Karsinojenlerle Deneysel Kanser Modeli Oluşturma

1.1.4.1. Deneysel Kolon Kanser Modeli

Deneysel kanser modeli oluşturulurken, oluşacak tümörün biyolojik özelliklerini ve ilaçların sitotoksik etkilerini en iyi şekilde gösterecek deney hayvanını seçmek, tümör oluşum oranını arttırmak için en uygun tür, soy, yaş ve cinsiyeti belirleyerek işe başlamak bu tür çalışmalarda esastır. Deneysel kanser çalışmalarında, özellikle kimyasal karsinojenler aracılığıyla tümör oluşturulması veya transplante edilebilen tümörlerin kullanımı daha ön plandadır (212, 213).

Kolon kanseri gelişme insidansı, kullanılan karsinojenik ajanın dozu, uygulama sıklığı, uygulama zamanı ve uygulama şekline bağlıdır (214). Bunun yanı sıra kullanılan deney hayvanının yaş, cinsiyet, genetik durum gibi özellikleri de tümör gelişme insidansı üzerine etkilidir (215).

Deney hayvanlarında barsakta tümör oluşturulması konusunda ilk deneysel çalışma 1941 yılında Lorenz ve Stewart tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada, oral olarak dibenzantresan veya metilkolantren verilen farelerin ince bağırsaklarında multipl tümörlerin ortaya çıktığı fakat kolonda tümör gelişmediği gösterilmiştir (216).

Sonrasında 1952 ve 1962 yılında yapılan 2 çalışmada dimetilaminobifenil ve bitkisel bir ürün olan cycasin (metilazoksimethanol glikozid) kullanılarak deneysel olarak kolon kanseri oluşturulmuştur (217, 218).

Bu çalışmaları takiben sıçanlar üzerinde daha etkili iki karsinojenik ajan 1,2 dimetilhidrazin (DMH) ve azoksimetan (AOM) bulunmuştur. Bunlara ek olarak sonraki araştırmalarda ise direkt etkili olan N-metil-N-nitro-N-nitrozoguanidin (MNNG) ve N-metil-N-nitrozüre (MNU) gibi karsinojenler kullanılmıştır. Bu karsinojenik ajanların kemirgenlerdeki aktivasyon dereceleri birbirinden farklıdır ve

sıçanlarda daha etkilidirler. Sıçanlar içinde ise Sprague-Dawley cinsi sıçanlar bu karsinojenlere karşı en hassas cinstir. DMH'nin DNA'ya bağlanmasında 10 farklı varyasyon, proteinlere bağlanmasında ise 3 farklı varyasyon gözlenir ve bu durum kullanılacak deney hayvanları arasındaki genetik farklılıkları önemli kılmaktadır (219).

Kolon kanseri indüklemeye en sık tercih edilen güncel karsinojenler DMH ve ona ait metabolitler AOM, MNNG ve MNU'dur (215).

1.1.4.2. 1,2 Dimetilhidrazin (DMH) ve Etki Mekanizması

DMH; $\text{CH}_3\text{NHNHCH}_3$ kimyasal yapısında olan özellikle distal kolonda belirgin olmak üzere kolon kanserini indüklemeye sık kullanılan son derece toksik ve çevreye zarar veren bir ajandır (212, 220).

DMH, bir metilhidrazin türevidir ve aktifleşmesi için, organizmada metil radikali salan bileşiklere dönüşmesi gerekir. DNA üzerine metilleyerek mutajenik etki gösteren DMH, RNA üzerindeki etkisiyle de protein sentezini bozar.

DMH ve AOM'nın karsinojenik etki gösterebilmeleri için önce metabolik olarak aktifleşmeleri gerekmektedir. DMH ile karsinogenezis oluşumu şu aşamalarda gerçekleşir; Öncelikle DMH'nin karaciğerde AOM ve azoksimetanolle dönüşür. Sonrasında azoksimetanol glukuronik asitle konjuge edilir ve bilier ekskresyona uğrar. Kolon lümeninde glukuronoidler bakteriyel hidroliz sonucu aktif karsinojen metabolitlere dönüşürler (213).

DMH önce azometan sonrasında da sırasıyla AOM, metilazoksimetanol, etan, ve karbonyuma dönüşür. DMH metabolize olurken birtakım serbest radikaller üretilir. Bu metabolik yolun son ürünlerinden biri olan metildiazonyum iyonu DNA, RNA ve proteinleri metilleme özelliğindedir. Böylelikle karsinogenezis süreci başlatılmış olur (221).

DMH ile oluşan DNA hasarının kansere dönüşmesi 2 aşamada gerçekleşir. İlk olarak, spesifik genlerin DNA'larına kimyasal karsinojen ile geriye dönüşümsüz zarar verilir ve sonrasında hücreler karsinojenik hücrelere dönüşerek daha fazla büyüyemezler. Bu aşamadan sonra tümörlerin büyümek için uyarıya ihtiyaçları vardır. Bunun için ise ikinci aşamada, büyüme faktörlerinin salınımı başlar ve tümör latent evreden çıkar, büyüme indüklenir (222).

DMH kullanılarak oluşturulan deneysel kolon tümörleri, epitel kaynaklı olup histolojik, morfolojik ve anatomik olarak insan kolon neoplazmalarına benzerler. DMH'ın hızlı bir şekilde metabolize olarak vücuttan temizlenmesi kullanımındaki önemli avantajlarından biridir (223-225).

DMH uygulamalarında kolon kanserini indüklemeye farklı deney hayvanları kullanıldığı gibi farklı veriliş yolları da tercih edilmiş ve en çok kullanılan yöntem subkutan (s.c) yol olmuştur. Çünkü DMH'nin oral yoldan ratlara verilmesi sonucu düşük tümör insidansı görülürken (%30), intramüsküler (i.m) uygulamalarda %80 oranında, s.c uygulamalarda ise %100 oranında tümör geliştiği gözlenmiştir (215).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Deney Hayvanları ve Deney Grupları

Çalışma, deney hayvanlarının seçimi esnasında ve yapılan uygulamalar sırasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu (08.11.2012, Toplantı Sayısı: 2012/11, Karar No: 100) onayı alınarak Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Birimi'nde (FÜDAM) standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yürütüldü.

Deneyde 48 adet, sekiz haftalık erkek Sprague Dawley türü sıçan kullanıldı. Sıçanlar araştırma süresince 22-24 °C sabit sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık/karanlık dönemlerin bulunduğu, otomatik olarak klimatize edilen odalarda 5'erli ve 3'erli gruplar halinde, hayvanlar için hazırlanmış özel kafeslerde korundu. Hayvanların beslenmesi Elazığ yem fabrikasından temin edilen standart 8mm'lik pellet cinsi yem ve çeşme suyu ile sağlandı. Ratların beslenmesinde kullanılan yemin bileşimi Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Standart rat yemi

Yem Bileşimi	
Su (en çok)	% 12
Ham protein (en az)	% 24
Ham selüloz (en çok)	% 7
Ham kül (en çok)	% 8
HCl'de çözünmeyen kül (en çok)	% 2
NaCl (en çok)	% 1
Mineral Karması *	% 1.25
Vitamin Karması **	%1.25
Metabolik enerji	2650 kcal/kg

* Mineral Karması: Kalsiyum (% 1.0-2.8), Fosfor (% 0.9), Sodyum (%0.5-0.7), Mangan (10 mg/kg), Çinko (4 mg/kg).

** Vitamin Karması: Vitamin A (300 IU/kg), Vit. D₃ (1000 IU/kg), Vit. E (60 mg/kg), Vit. B₂ (4 mg/kg).

Bir haftalık uyum süresinin sonunda sıçanların kiloları ölçülerek kontrol grubunda 8, DMH grubunda 16, DMH+Diklofenak grubunda 12 ve DMH+Selekoksisib grubunda ise 12 hayvan olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrıldı (Denek sayıları mortalite oranlarına göre seçildi).

Deney süresince hayvanlar günlük olarak kontrol edildi ve haftalık kilo takibi yapıldı. Kilo takibinin yanı sıra makroskopik olarak, tüy dökülmesi, dışkılama bozuklukları ve anal lezyonlar açısından genel morfolojik görünümeleri değerlendirildi, kayıt altına alındı.

2.1.2. DMH İle Deneysel Kanseri Modeline İlişkin Protokolün Oluşturulması

DMH ile deneysel kolon kanseri oluşturulmasına ilişkin çalışmalar çok uzun yıllardır devam etmektedir. Yapılan bu çalışmalarda ilaç dozu, ilacın veriliş yolu, uygulama süresi ve uygulama süresinin bitimini takiben başlayan kanser gelişim sürecinin izlendiği bekleme süresi açısından farklı protokoller uygulanmıştır. Karaca ve ark (214), toplam 40 fareden oluşan çalışmalarında hayvanları 4 gruba ayırmış, 12 hafta boyunca 20mg/kg dozundaki DMH'ni haftada bir kez s.c enjeksiyonla uygulamışlardır. Son enjeksiyonu takiben 1. gruptaki hayvanları 6 hafta, 2. gruptaki hayvanları 12 hafta, 3. gruptaki hayvanları 18 hafta ve 4. gruptaki hayvanları ise 24 hafta sonra sakrifiye ederek histopatolojik inceleme sonucu tümör gelişim oranlarını değerlendirmişlerdir. Buna göre 1. grupta tümör izlenmezken, 2. Gruptaki hayvanların %71,4'ünde 3 ve 4. gruptaki hayvanların ise tamamında tümör gelişimi izlendiği bildirmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada, kolon kanserini indüklemek için 20 mg/kg DMH, 12 hafta süresince, farelere haftada bir kez s.c yoldan enjekte edilmiş ve son DMH dozundan 12 hafta sonra sakrifiye edilen farelerde %100 kolonik tümör geliştiği bildirilmiştir (225).

Sıçanlarda DMH, AOM, MNU gibi farklı karsinojenlerin değişen doz ve sürelerde kullanımı sonucu yine değişen latent süreler sonunda farklı oranlarda tümöral dönüşümle sonuçlandığını gösteren birçok çalışma mevcuttur (226).

Bütün bu bilgiler ışığında çalışmamızda DMH'ne ait protokolü şu şekilde belirledik; 12 hafta boyunca s.c yoldan 25mg/kg dozda DMH haftada bir kez enjekte edildi. Enjeksiyonlar sıçanların bel omurları seviyesinde sırt bölgesinden rotasyon şeklinde uygulandı. DMH uygulamaları esnasında hayvanları irrite etmemek ve

enfeksiyon gelişimini önlemek amacıyla her hayvan için ayrı bir insülin enjektörü kullanıldı. Son DMH enjeksiyonunu takiben 13 hafta, tümoral dönüşüm için beklenen latent dönem olarak belirlendi ve bu sürenin sonunda 25. haftanın bitiminde deney hayvanları kurban edildi.

2.1.3. Kullanılan Kimyasalların Hazırlanışı

DMH; DMH (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA) 1milimolar (mM) Etilen diamintetraasetikasit (EDTA)-salin içinde, sodyum hidroksit (NaOH) ile pH'ı 7 olacak şekilde ayarlanarak, s.c enjeksiyondan hemen önce taze olarak hazırlandı (227).

Diklofenak (Dikloron tablet, Deva Holding A.Ş, Türkiye) ve Selekoksib (Santa Cruz Biotechnology, USA); kullanılan NSAİİ'lerin dozları bildirilen ED50 (medyan etkin doz) değerine dayanarak terapötik doz aralığında belirlendi. Belirlenen bu değerler Diklofenak için 8mg/kg (227), Selekoksib için 6mg/kg (18) idi.

Diklofenak ve Selekoksib'i çözmek amacıyla terapötik birçok ilaç ve kimyasallar için güçlü çözücü etkiye sahip polar bir solvent olan Dimetilsülfoksit (DMSO) (Merc-chemicals, Emplura, Germany) kullanıldı. DMSO'ı tercih etmemizdeki sebepler; antiinflamatuvar, bakteriyostatik, immünmodülatör, serbest oksijen radikallerini tutucu ve temizleyici özelliklerinin olmasının yanı sıra ilaçların membran penetrasyonu ve transportunu artırıcı etkiye sahip olması idi (229-231).

Diklofenak ve Selekoksib deney süresi boyunca hergün DMSO içinde çözüldükten sonra 2:1 (DMSO:su; v:v) oranında distile su ile dilüe edilerek, oral uygulamadan hemen önce taze olarak hazırlandı ve 8 milimetrelik (mm) orogastrik sonda aracılığıyla gavaj yoluyla hayvanlara verildi. Bu uygulama esnasında hayvanları irrite etmemek ve uygulama kolaylığı sağlamak amacıyla sıçanlarda eter inhalasyonu yoluyla kısa süreli bir sedasyon oluşturuldu.

2.1.4. Deney Grupları

Grup 1; Kontrol Grubu (n=8): 25 hafta süreyle standart sıçan yemi ile beslenen, 1 mM EDTA-salinin, s.c yolla haftada bir kez 12 hafta boyunca enjekte edildiği, 25 haftalık deney süreci boyunca 8mm'lik orogastrik sonda aracılığıyla, oral gavaj yoluyla DMSO'in 1 ml/gün'lük dilüe dozunun hergün uygulandığı, 25 hafta sonunda kurban edilerek alınan kan örneklerinden biyokimyasal parametrelerin

çalışıldığı, alınan doku örneklerinden ise histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemelerin yapıldığı grup.

Grup 2; DMH Grubu (n=16): 25 hafta süresince standart sıçan yemi ile beslenen, 1 mM EDTA-salin içinde 25 mg/kg dozundaki DMH'nin haftada 1 kez s.c yolla 12 hafta boyunca enjekte edildiği, 8mm'lik orogastrik sonda aracılığıyla, oral gavaj yoluyla DMSO'in deney süresince hergün uygulandığı, 25 hafta sonunda sakrifiye edilerek alınan kan örneklerinden biyokimyasal parametrelerin çalışıldığı, alınan doku örneklerinden ise histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemelerin yapıldığı grup.

Grup 3; DMH+Diklofenak Grubu (n=12): 25 hafta süresince standart sıçan yemi ile beslenen, 25 mg/kg dozundaki DMH'nin 1 mM EDTA-salin içinde haftada 1 kez s.c yolla 12 hafta boyunca enjekte edildiği, DMH ile eş zamanlı olarak başlanan 8 mg/kg dozundaki Diklofenak'ın (227, 229), DMSO içinde çözülerek 25 haftalık deney süreci boyunca 8mm'lik orogastrik sonda aracılığıyla oral gavaj yoluyla hergün uygulandığı, 25 hafta sonunda sakrifiye edilerek alınan kan örneklerinden biyokimyasal parametrelerin çalışıldığı, alınan doku örneklerinden ise histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemelerin yapıldığı grup.

Grup 4; DMH+Selekoksib Grubu (n=12): 25 hafta süresince standart sıçan yemi ile beslenen, 25 mg/kg dozundaki DMH'nin 1 mM EDTA-salin içinde haftada 1 kez s.c yolla 12 hafta boyunca enjekte edildiği, DMH ile eş zamanlı olarak başlanan 6 mg/kg dozundaki Selekoksib'in (18), DMSO içinde çözülerek 25 haftalık deney süreci boyunca 8mm'lik orogastrik sonda aracılığıyla oral gavaj yoluyla hergün uygulandığı, 25 hafta sonunda sakrifiye edilerek alınan kan örneklerinden biyokimyasal parametrelerin çalışıldığı, alınan doku örneklerinden ise histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemelerin yapıldığı grup.

2.1.5. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması

25 haftalık deney süresi sonunda hayvanlar steril aletler kullanılarak sakrifiye edildi. Kan örnekleri analizler için uygun olacak şekilde EDTA'lı tüplere alındı. Alınan kanlar 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek (Heraeus Biofuge Stratos; Kendo Laboratory Products, Osterode-Germany) plazmaları ayrıldı. Çalışmada değerlendirilecek olan parametre sayısı fazla olduğu için, elde edilen plazmalar

küçük porsiyonlar halinde polipropilen tüplere konuldu, analizler yapılana kadar -80°C’de saklandı.

Histopatolojik ve immünohistokimyasal analizler için hayvanların abdominal kaviteleri açılarak, karın bölgesindeki organların patolojik yönden makroskobik değerlendirilmesi yapıldıktan sonra, bu bölgedeki organlar sağ tarafa doğru uzaklaştırıldı ve kolona ulaşıldı. Daha sonra çekum bulunarak bu hizadan itibaren rektosigmoid bileşkeye kadar kolon ve devamında da rektum ince bir makas yardımı ile diseke edilerek takip edildi. Kolon ve rektum, dokuya zarar verilmeden çıkarıldı ve derhal %10’luk formaldehit içinde tespit edildi. Böylelikle alınan tüm örnekler belirlenen yöntemlerle analiz edilmek üzere hazır hale geldi.

2.2. Yöntem

2.2.1. Enzim İmmün Ölçümler

İmmünolojik reaksiyonları tespit etmek ve ölçmek için kullanılan enzim immün ölçüm (EIA) yöntemi, enzimlerin katalitik özelliklerinin kullanılması ilkesine dayanır. EIA’da belirteç olarak en çok kullanılan enzimler; alkalin fosfataz, horseradish peroksidaz (yaban turpu), glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ve β -galaktozidaz’dır. Bu metodun enzim bağlı immunosorbant ölçüm (ELISA), EIA ve Enzim-multipl immün ölçüm tekniği (EMIT) gibi farklı isimleri de vardır. ELISA, klinik analizlerde sıklıkla tercih edilen heterojen EIA tekniğidir. ELISA yöntemi, serum, plazma ve doku homojenatlarında araştırılan antijenlerin (Ag) spesifik antikor (Ab) molekülleri ile kompleks oluşturmaları esasına dayanır. Bu tip ölçümde, reaksiyona giren bileşenlerinden biri katı faz yüzeye bağlanır (sorbent). Bu katı faz, mikrotitrasyon kuyucuğu olabilir. Bağlama nonspesifik adsorbsiyon, kimyasal veya immunokimyasal bağlama şeklinde gerçekleşebilir ve serbest işaretli olan reaktifi bağlı olandan ayırma işlemini kolaylaştırır. Tipik ELISA tekniğinde, ölçülecek olan antijeni içeren kalibratör veya örnek, katı faz antikoruyla bağlanması amacıyla belli bir süre inkübasyona bırakılır. Bu sayede antijen spesifik (özümlü) antikoruyla reaksiyona girer ve immunasyon sağlanmış olur. Katı faz yıkama işleminden sonra, bağlı antikordan farklı, enzim işaretli antikor ortama eklenir (Enzyme Linked) ve katı faz Ab:Ag:Ab-enzim sandiviç kompleksi meydana gelir. Ortamdaki bağlı olmayan antikor ise yıkama ile uzaklaştırılır ve enzim substratı eklenir. Enzim işaretleyici, ortama eklenen substratı ürüne dönüştürür, oluşan ürün miktarı örnekteki antijen

miktarı ile orantılıdır. Substrat kompleks içerisindeki enzim ile renkli ürün oluşturacak şekilde reaksiyona girmektedir. Dolayısıyla oluşan son ürün renklidir. Ortaya çıkan bu renkli ürün kompleksi konsantrasyonların hesaplanması için ELISA sayacında okutulur (Assay). ELISA ile örnekteki antikor miktarı da ölçülebilir. Burada ise antikor yerine antijen, katı faza bağlanır ve analit antikor için spesifik enzim işaretli antikor ikinci reaktif olarak kullanılır (233).

2.2.1.1. Plazma VEGF Düzeylerinin Ölçümü

Plazma VEGF düzeyleri, sıçan VEGF- ELISA kiti (Boster, Boster Biological Technology LTD. Katalog no:EK0540, USA) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar ELX800 ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak 450 nm’de okutuldu. Plate yıkamalarında ise otomatik yıkayıcı olarak Bio-tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) kullanıldı. Sonuçlar pg/ml olarak belirtildi. Ölçüm aralığı 15,6 -1000 pg/ml, sensitivitesi <1pg/ml idi.

2.2.1.2. Plazma ICAM-1 Düzeylerinin Ölçümü

Plazma ICAM-1 düzeyleri, sıçan ICAM -ELISA kiti (Boster Immunoleader, Boster Biological Technology Co. Inc. Katalog no:EK0372, USA) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar ELX800 ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak 450 nm’de okutuldu. Plate yıkamalarında ise otomatik yıkayıcı olarak Bio-tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) kullanıldı. Sonuçlar pg/ml olarak belirtildi. Ölçüm aralığı 31,2-2000 pg/ml, sensitivitesi <2pg/ml idi.

2.2.1.3. Plazma MMP-2 Düzeylerinin Ölçümü

Plazma MMP-2 düzeyleri, sıçan MMP-2-ELISA kiti (Boster, Boster Biological Technology LTD. Katalog no:EK0639, USA) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar ELX800 ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak 450 nm’de okutuldu. Plate yıkamalarında ise otomatik yıkayıcı olarak Bio-tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) kullanıldı. Test sonuçları 1:4 dilüsyon nedeniyle 4 ile çarpıldı ve pg/mL olarak belirtildi. Ölçüm aralığı 156-10,000 pg/ml idi.

2.2.1.4. Plazma MMP-9 Düzeylerinin Ölçümü

Plazma MMP-9 düzeyleri, sıçan MMP-9-ELISA kiti (EastBiopharm, Hangzhou EastBiopharm CO. LTD. Katalog no: CK-E30434, China) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar ELX800 ELISA okuyucusunda

spektrofotometrik olarak 450 nm’de okutuldu. Plate yıkamalarında ise otomatik yıkayıcı olarak Bio-tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) kullanıldı. Sonuçlar ng/ml olarak belirtildi. Ölçüm aralığı 0,05-10 ng/ml idi.

2.2.1.5. Plazma TIMP-2 Düzeylerinin Ölçümü

Plazma TIMP-2 düzeyleri, rat TIMP-2-ELISA kiti (EastBiopharm, Hangzhou EastBiopharm CO. LTD. Katalog no: CK-E30522, China) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar ELX800 ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak 450 nm’de okutuldu. Plate yıkamalarında ise otomatik yıkayıcı olarak Bio-tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) kullanıldı. Sonuçlar ng/ml olarak belirtildi. Ölçüm aralığı 0,5-90 ng/ml idi.

2.2.1.6. Plazma MCP-1 Düzeylerinin Ölçümü

Plazma MCP-1 düzeyleri, sıçan MCP-1-ELISA kiti (Assay Biotech OmniKine, Assay Biotechnology Company, katalog no: OK-0210, USA) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Absorbanslar ELX800 ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak 450 nm’de okutuldu. Plate yıkamalarında ise otomatik yıkayıcı olarak Bio-tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) kullanıldı. Sonuçlar pg/ml olarak belirtildi. Ölçüm aralığı 47-3000 pg/ml idi.

2.2.2. Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Analizler

2.2.2.1. Histopatolojik İncelemelerin yapılışı

Sakrifiye edilerek kolorektal dokuları çıkarılan sıçanlarda yapılan makroskobik değerlendirmeler sonunda resimler çekildi. Histopatolojik inceleme için, çekum hizasından itibaren rektumu da içine alacak şekilde çıkarılan kolorektal dokuya ait lümen içeriği serum fizyolojik ile temizlendi ve doku %10’luk formaldehit içinde tespit edildi. Sonrasında longitudinal olarak açılan kolorektal doku incelenmek üzere proksimal, orta, distal kolon ve rektum olarak 4 bölüme ayrıldı. Tespiti yapılan dokulardan, rutin histolojik takiplerinden sonra parafin bloklar hazırlanarak mikrotomda 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Daha sonra histolojik kesitler, hematoxilen-eozin (HE) ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi. Lezyonlar Olympus BX43 ışık mikroskopu ile incelenerek, Olympus DP72 görüntüleme cihazı ile fotoğraflandı. Saptanan lezyonlar histopatolojik olarak (inflamasyon, hafiften şiddetliye kadar değişen derecelerde displazi ve adeno karsinom) sınıflandırıldı. Bu sınıflandırma deneyimli ve birbirinden bağımsız iki

patoloji uzmanı tarafından yapıldı ve gruplardaki histopatolojik lezyonların sayısı belirlendi.

2.2.2.2. Histopatolojik Sınıflandırma kriterleri

Histopatolojik olarak lezyonların sınıflandırılması aşağıda ana başlıklar halinde tanımlanan kriterlere uygun olarak yapıldı (234).

Displastik değişiklikler:

- **Hafif Displazi:** Bir prekanseröz lezyon olan displazi, belirli hücresel ve yapısal değişikliklerle tanımlanmış dokudaki anormal durumlar olarak ifade edilir. Tubül, kript ve villüs yapıları düzenli olan, iç veya sigara şeklinde uzamış hiperkromatik çekirdekli hücreler tarafından çevrelenmiş ve çekirdek zarı düzenli olan yapılardır. Displazinin histolojik açıdan asıl özelliği olgunlaşmamış hücrelerin sayısındaki artış ile sonuçlanan aşırı hücre çoğalmasdır. Etkilenen kriptlerde taban yapısı normaldir ve sayıca çoğalmış hücrelerde müsin salgısı yoktur.
- **Şiddetli Displazi:** Hiperkromatik çekirdek tabaka halinde ve çok şekillidir. Epitelin üst kısmından lümene doğru uzanır. Hafif displaziye oranla daha derinde olmakla birlikte lamina propria'ya invazyon yoktur. Lieberkühn bezlerinin etrafında anormal epitelyum yapısı izlenir. Bununla birlikte mukozadaki bezlerde tomurcuklanma, dallanma ve yapısal bir düzensizlik izlenmeye başlanır.

Karsinom: Mikroskobik açıdan KRK'lar iyi, orta veya az derecede diferansiasyon gösterebilirler. Tümör hücrelerinin içeriğinde kolumnar hücreler, goblet hücreleri ve nadiren endokrin hücreler bulunur. Çok iyi diferansiye tümörler intraglandular papiller katlanmalara sahiptir. Hücrelerde belirgin pleomorfizm vardır. Karsinom aşamasının karakteristik özelliği çekirdeğin aşırı derecede hiperkromatik ve büyük olmasıdır. Çekirdek sitoplazma oranı değişmiştir, normalde 1:4 veya 1:6 olan bu oran 1:1'e yaklaşmıştır. Mitotik hücreler de çok sayıda ve atipik özelliğe sahiptir.

- **İntramukozal Karsinom:** Şiddetli displazideki özelliklere ek olarak tümör hücreleri, lamina propria'nın mukozal stromasına invazidir ve muskularis mukoza ile birleşmiştir ancak buraya invazyon yoktur. Bezlerde de aynı şekilde muskularis mukozaya invazyon izlenmez.

- **İnvaziv Karsinom:** Muskularis mukoza ve submukozaya doğru invazyon izlenir. Malign özellikteki epitel ve bezler muskularis mukozaya, submukozaya ve daha ilerisine invazedir

2.2.2.3. İmmünohistokimyasal Yöntemin İlkesi

İmmünohistokimyasal (İHK) yöntemin esası, belirli bir dokuda bulunan spesifik maddelerin (antijen) tespiti için işaretlenmiş antikorların kullanılmasıdır. Oluşan antijen-antikor komplekslerinin yerleşimleri ya ışık (immünohistokimya) ya da elektron mikroskopla (ultrastrüktürel immunositokimya) gözlenebilir. Çok düşük konsantrasyonlardaki antijenlerin bile tesbiti mümkündür (235).

2.2.2.4. İmmünohistokimyasal İncelemelerin Yapılışı

Kolon dokularına ait bloklardan elde edilen 4µm kalınlığındaki kesitler poly-lysine kaplı lamalar üzerine alındı. İlk olarak 10 dakika etüvde 60°C sıcaklıkta bekletilen lamalar daha sonra Nfκ-B (Thermo scientific, Rabbit Anti- Nfκ-B Polyclonal Antibody, 100 ul, 1/100, USA), MMP-2 (Bioss, Rabbit Anti-MMP-2 Polyclonal Antibody, 100 ul, 1/100, USA) ve MMP-9 (Bioss, Rabbit Anti-MMP-9 Polyclonal Antibody, 100 ul, 1/100, USA) boyamaları için mevcut kit prosedürlerine uygun şekilde hazırlanarak otomatik boyama cihazında (Ventana Medical System, SN: 712299, REF: 750-700, Arizona, USA) işleme alındı. Primer antikor ile işlemiden sonra lamalar musluk suyunda yıkanarak ultramount ile kapatıldı. Pozitif kontrol olarak Nfκ-B için prostat dokusu, MMP-2 için rat beyin dokusu ve kolon mukozasına ait örnekler, MMP-9 için ise rat over dokusuna ait örnekler kullanıldı. Hazırlanan preparatlar Olympus BX 50 ışık mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde boyanmanın şiddeti ve yaygınlığı esas alındı. MMP-2 ve MMP-9 için sitoplazmik, Nfκ-B için nükleer immün boyanmanın şiddeti ve yaygınlığı 0'dan +4'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlandı (0:Yok, +1:Çok Az, +2:Az, +3:Orta, +4:Şiddetli).

2.2.3. İstatistiksel Analizler

Veri setinin istatistiksel analizi SPSS yazılımı ile gerçekleştirildi. Parametrik testlerin ön şartlarını sağlayan değişkenlere ilişkin grup karşılaştırmalarında Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve ardından çoklu karşılaştırma yöntemlerinden

LSD testi kullanıldı. $p < 0,05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi.

3. BULGULAR

3.1. Gruplara ait vücut ağırlığı değerleri

Çalışma sonunda ölçülen vücut ağırlığı ortalamaları DMH grubunda $337,27 \pm 46,69$ gr kontrol grubunda $362,125 \pm 26,32$ gr idi. Bu iki grupta ağırlık ortalamaları açısından istatistiksel anlamlı fark yoktu. Tedavi gruplarından DMH+Selekoksib grubunda $368,0 \pm 34,54$ gr ve DMH+Diklofenak grubunda $342,2 \pm 31,71$ gr olarak tespit ettiğimiz vücut ağırlığı ortalamaları kontrol grubu ve DMH grubuyla karşılaştırıldığında her iki karşılaştırma için de istatistiksel anlamlı farklılık gözlenmedi.

3.2. Gruplara ait makroskopik değerlendirmeler

Çalışmaya Kontrol grubunda 8, DMH grubunda 16, DMH+Diklofenak grubunda 12 ve DMH+Selekoksib grubunda da 12 olmak üzere toplam 48 adet erkek Sprague Dawley türü sıçan kullanılarak başlandı. Çalışmamızın 4. ve 6. haftaları arasında DMH+Diklofenak grubundan 2, DMH+Selekoksib grubundan da 2 olmak üzere toplam 4 adet hayvan kaybedildi ve çalışmaya toplamda 44 adet hayvanla devam edildi. (Kontrol n=8, DMH n=16, DMH+Diklofenak n=10, DMH+Selekoksib n=10).

Sıçanların tüy dökülmesi, dışkılama bozuklukları ve anal lezyonlar gibi genel morfolojik görünimleri makroskopik olarak değerlendirildi. DMH grubundaki hayvanların tüylerinde kontrollerle karşılaştırıldığında renk değişikliği, kabalaşma ve yer yer dökülmeler (Şekil 19, 20) tespit edildi. Tedavi gruplarındaki hayvanların bazılarında da benzer değişiklikler gözlemlememize rağmen DMH grubundaki kadar yaygın değildi. Yine DMH grubunda özellikle son haftalarda 2 hayvanda kanlı dışkılama gözlemledik (Şekil 21). Diğer gruplardaki hayvanların dışkılama özelliklerine ait herhangi bir değişiklik tespit etmedik.

Sakrifikasyon esnasında ve sonrasında çıkardığımız organ ve dokuların makroskopik incelemesi sonucu; özellikle DMH grubundaki hayvanların büyük bir çoğunluğunda belirgin adezyonlar (Şekil 23), kolorektal dokuda yaygın tümoral oluşumlar (Şekil 28, 30, 31) kolon lümeninde tıkanıklık (Şekil 26) ve kolonda invajinasyon, megakolon (Şekil 24, 25) gibi bulgular gözlemledik. Yine aynı gruptaki hayvanlarda diğer organ değerlendirmeleri sonucu bazı hayvanların

özellikle karaciğerlerinde tümöral oluşumlar (Şekil 32, 33) ve nekrotik alanlarla (Şekil 34), böbreklerde tümöral oluşumlar (Şekil 35) makroskopik gözlemlerimiz arasındaydı. Yine DMH grubundaki birkaç hayvanın akciğerleri de kontrollerden çıkardığımız normal akciğerlerden farklı görünümdeydi. DMH ile eş zamanlı olarak Selekoksib kullandığımız grupta 1 hayvanda, Diklofenak kullandığımız grupta da 2 hayvanda kolorektal dokuda farklılaşmalar ve tümöral oluşumlar gözlemledik. Bu gruplardaki hayvanların diğer organlarına ait değerlendirmelerimizde ise sadece DMH+Diklofenak grubunda 1 hayvanda karaciğerde farklılaşmalar gözlemlemedik.



Şekil 18. Kontrol Grubunda genel görünüm



Şekil 19. DMH Grubunda tüy dökülmesi, tüylerde renk değişikliği



Şekil 20. DMH Grubunda sırt bölgesinde tüy dökülmesi



Şekil 21. DMH Grubunda rektal kanama



Şekil 22. Orta hat laparotomi ile abdominal kavitenin açılması



Şekil 23. DMH Grubunda kolonla çevre dokular arasında adezyonlar



Şekil 24. DMH Grubunda kolonda invajinasyon



Şekil 25. DMH Grubunda kolonda invajinasyon ve megakolonla birlikte genel görünümde bozulma



Şekil 26. Kolon lümeninde geçişi tamamen engelleyen tıkanıklık ve tıkanıklığın üst kısmında lümen içeriğinin birikimi.



Şekil 27. Kolorektal dokunun bütünlüğü bozulmadan çıkarılmış hali



Şekil 28. Lümen içeriği temizlenmiş kolorektal dokuda tümoral oluşuma ait makroskobik görünüm



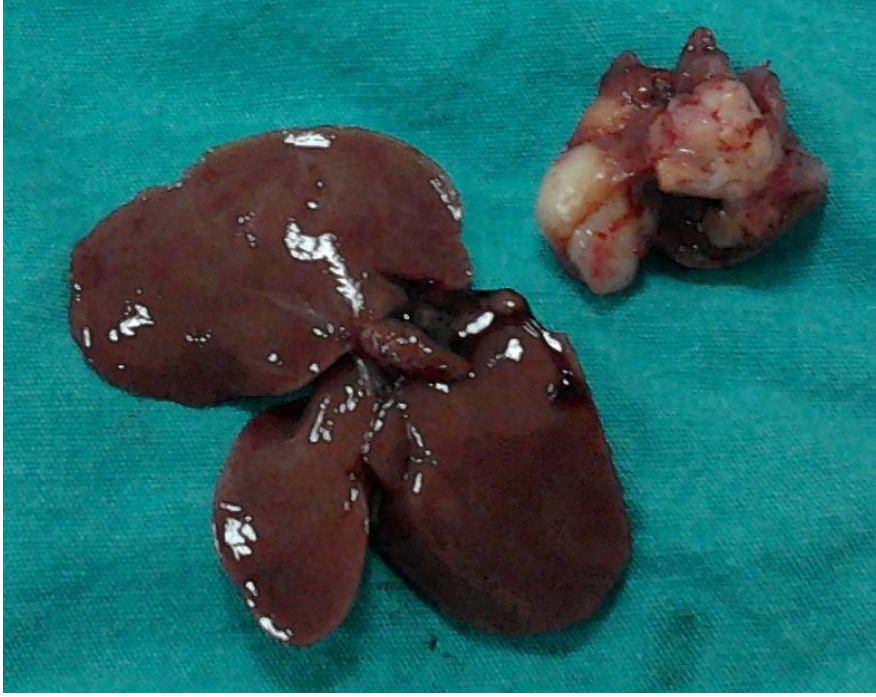
Şekil 29. Longitudinal olarak açılmış kolonun distal parçası



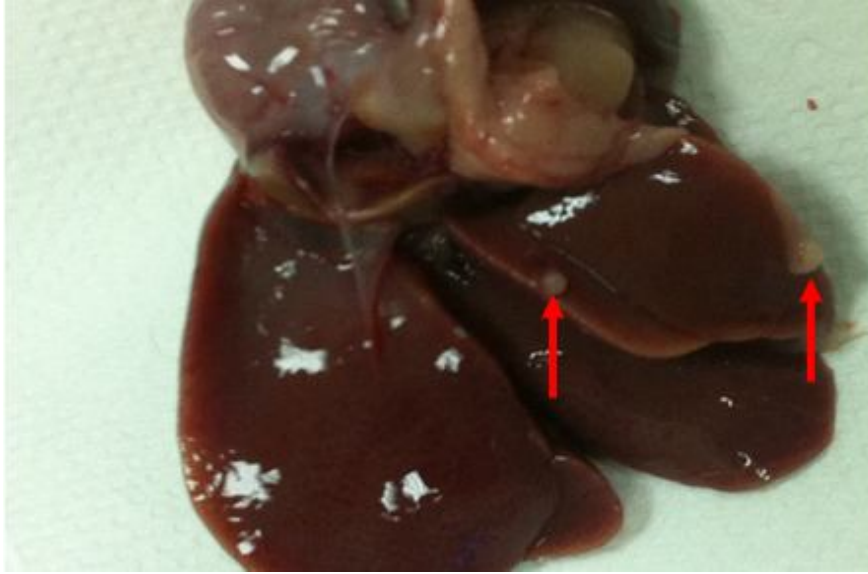
Şekil 30. DMH Grubunda çekumda lokalize kolon lümeninde geçişi izin vermeyerek tıkanıklığa neden olan tümöral oluşum. Şekil 30'da çekum kolonun bütününden ayrılarak görüntülenmiştir.



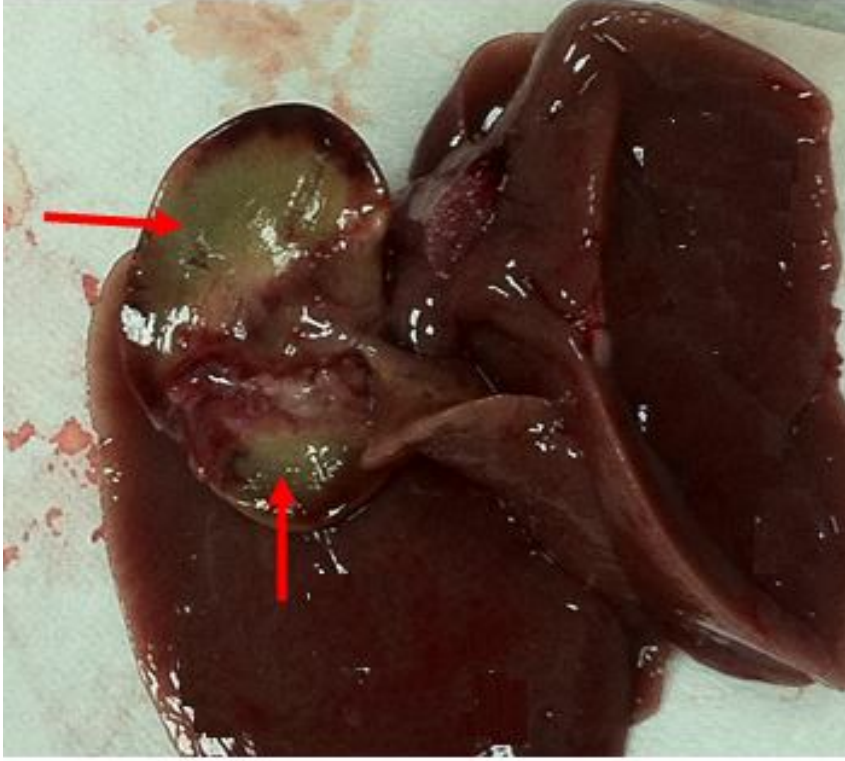
Şekil 31. Çekumda lokalize tümörün kesitsel görüntüsü



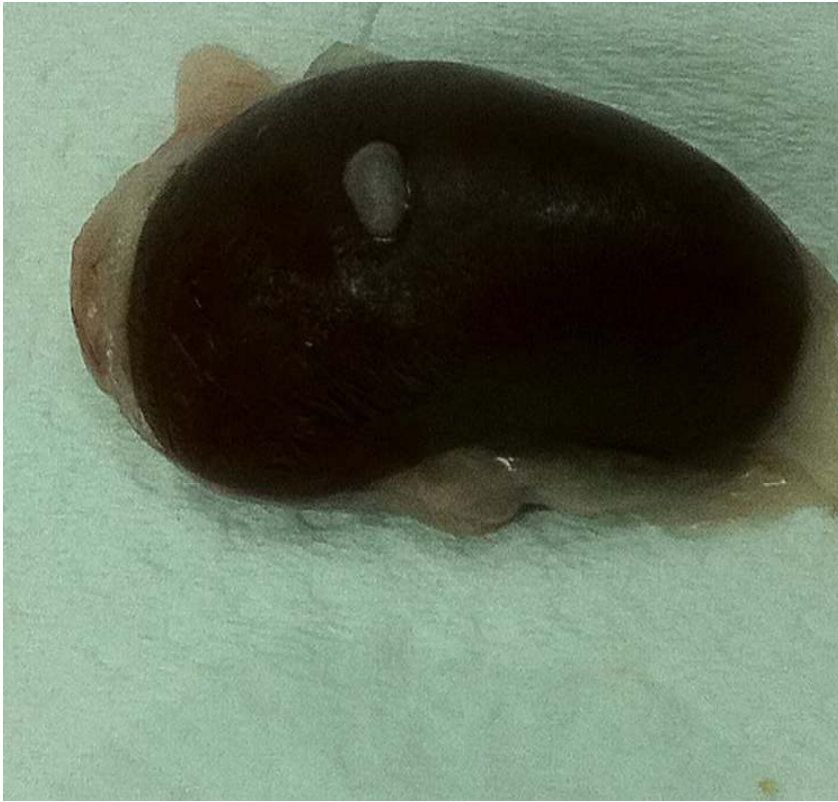
Şekil 32. DMH Grubunda karaciğerde lokalize ve karaciğerin bir lobunu tamamen destrüksiyona uğratmış tümöral oluşum.



Şekil 33. DMH Grubunda karaciğerde bir lobda lokalize küçük tümöral oluşumlar.



Şekil 34. DMH Grubunda karaciğerde nekrotik bir alan.

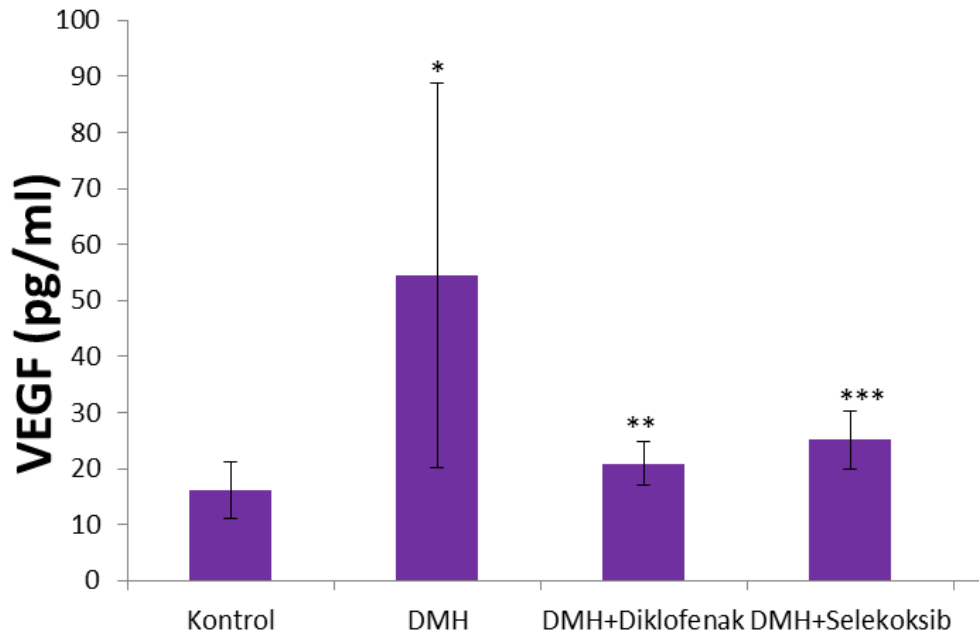


Şekil 35. DMH Grubunda böbrek yüzeyinde tümoral oluşum.

3.3. Biyokimyasal Değerlendirmeler

3.3.1. Plazma VEGF Düzeyleri

VEGF düzeyleri DMH grubunda ($54,54 \pm 34,3$ pg/ml) kontrol grubuna göre ($16,1 \pm 5,09$ pg/ml) istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek tespit edildi ($p < 0,0001$). DMH grubu ile DMH+Diklofenak ($20,84 \pm 3,85$ pg/ml) grubu ve DMH+Selekoksisib ($25,18 \pm 5,18$ pg/ml) grubu karşılaştırıldığında, tedavi gruplarının her ikisinde de VEGF düzeylerinde istatistiksel anlamlı düşüş tespit edildi ($p < 0,0001$, $p = 0,001$; sırasıyla) (Şekil 36, Tablo 4).



Şekil 36. Gruplara ait plazma VEGF düzeyleri

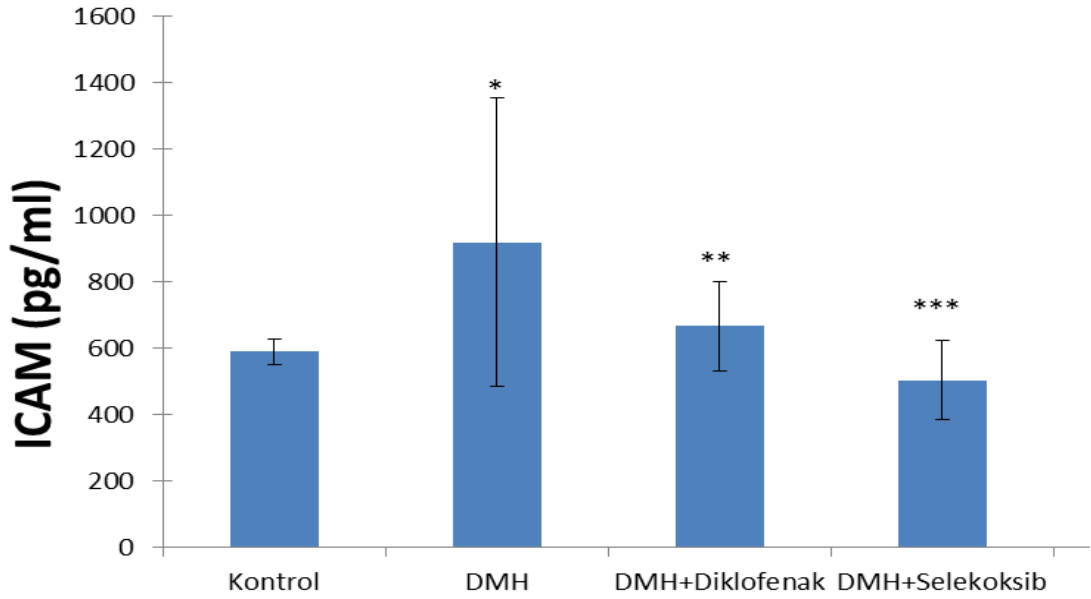
* $p < 0,0001$; kontrolle karşılaştırma; ** $p < 0,0001$; DMH grubu ile karşılaştırma

*** $p = 0,001$; DMH grubu ile karşılaştırma

3.3.2. Plazma ICAM-1 Düzeyleri

ICAM-1 düzeyleri DMH grubunda ($918,43 \pm 435,25$ pg/ml) kontrol grubuna göre ($590,16 \pm 38,7$ pg/ml) istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek tespit edildi ($p = 0,01$). DMH+Diklofenak grubunun plazma ICAM-1 seviyesi $666,02 \pm 134,78$ pg/ml, DMH+Selekoksisib grubu ortalaması ise $503,85 \pm 119,47$ pg/ml idi. DMH grubu ile tedavi grupları karşılaştırıldığında her ikisinde de plazma ICAM-1

düzeylerinde istatistiksel anlamlı düşüş tespit edildi ($p<0,05$, $p=0,001$; sırasıyla) (Şekil 37, Tablo 4).



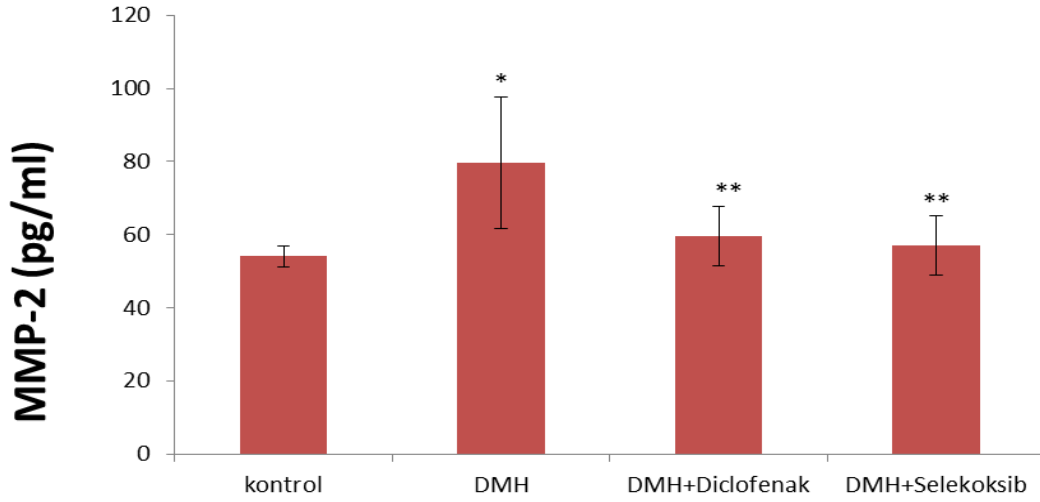
Şekil 37. Gruplara ait plazma ICAM-1 düzeyleri

* $p=0,01$; kontrolle karşılaştırma; ** $p<0,05$; DMH grubu ile karşılaştırma

*** $p=0,001$; DMH grubu ile karşılaştırma

3.3.3. Plazma MMP-2 Düzeyleri

MMP-2 düzeyleri DMH grubunda ($79,69 \pm 18,1$ pg/ml) kontrol grubuna göre ($54,09 \pm 2,87$ pg/ml) istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek tespit edildi ($p<0,0001$). DMH grubu ile tedavi grupları karşılaştırıldığında hem DMH+Diklofenak ($59,62 \pm 8,22$ pg/ml) grubunda ($p<0,0001$) hem de DMH+Selekoksib ($56,92 \pm 8,16$ pg/ml) grubunda ($p<0,0001$) MMP-2 düzeylerinde istatistiksel anlamlı düşüş tespit edildi (Şekil 38, Tablo 3).

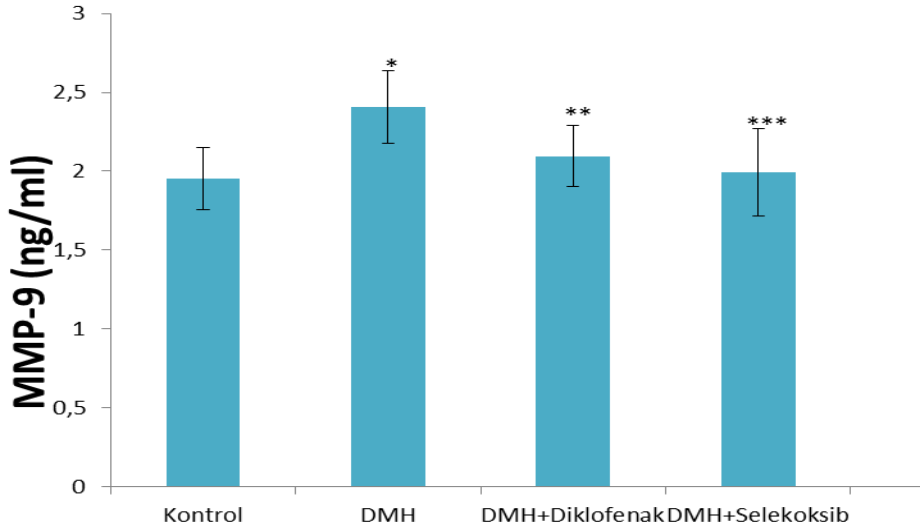


Şekil 38. Gruplara ait plazma MMP-2 düzeyleri

*p<0,0001; Kontrolle karşılaştırma; **p<0,0001; DMH grubu ile karşılaştırma

3.3.4. Plazma MMP-9 Düzeyleri

MMP-9 düzeyleri DMH grubunda ($2,4 \pm 0,23$ ng/ml) kontrol grubuna göre ($1,95 \pm 0,19$ ng/ml) istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseldi ($p < 0,0001$). DMH grubu ile tedavi gruplarından DMH+Diklofenak ($2,09 \pm 0,19$ ng/ml) grubu karşılaştırıldığında anlamlı düşme ($p = 0,002$) ve DMH grubu ile tedavi gruplarından DMH+Selekoksisib ($1,99 \pm 0,27$ ng/ml) grubu karşılaştırıldığında yine istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma ($p < 0,0001$) görüldü (Şekil 39, Tablo 3).



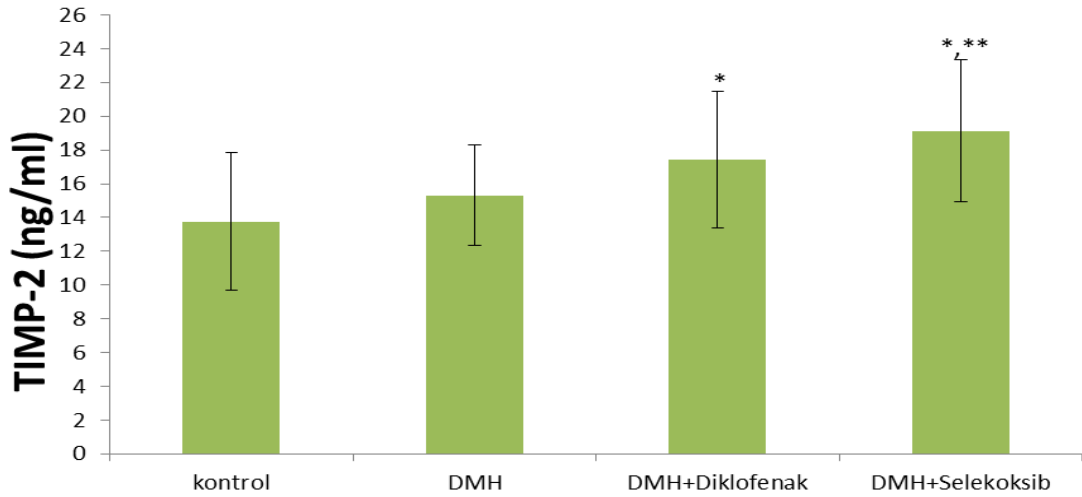
Şekil 39. Gruplara ait plazma MMP-9 düzeyleri

*p<0,0001; kontrolle karşılaştırma, **p=0,002; DMH grubu ile karşılaştırma

***p<0,0001; DMH grubu ile karşılaştırma

3.3.5. Plazma TIMP-2 Düzeyleri

TIMP-2 düzeyleri DMH grubunda ($15,32 \pm 2,97$ ng/ml) kontrol grubuna göre ($13,75 \pm 4,07$ ng/ml) artmış olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$). DMH grubu ile DMH+Diklofenak ($17,44 \pm 4,03$ ng/ml) tedavi grubu karşılaştırıldığında tedavi grubunda bir artış olmasına rağmen bu artış da istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$). DMH grubu ile tedavi gruplarından DMH+Selekoksisib ($19,13 \pm 4,22$ ng/ml) grubu karşılaştırıldığında ($p < 0,05$) ise bu tedavi grubunda istatistiksel anlamlı bir artış tespit ettik. Kontrol grubu ile tedavi grupları karşılaştırıldığında her iki tedavi grubunda da plazma TIMP-2 düzeylerinde istatistiksel anlamlı artış tespit edildi ($p < 0,05$, $p < 0,005$; sırasıyla) (Şekil 40, Tablo 3).

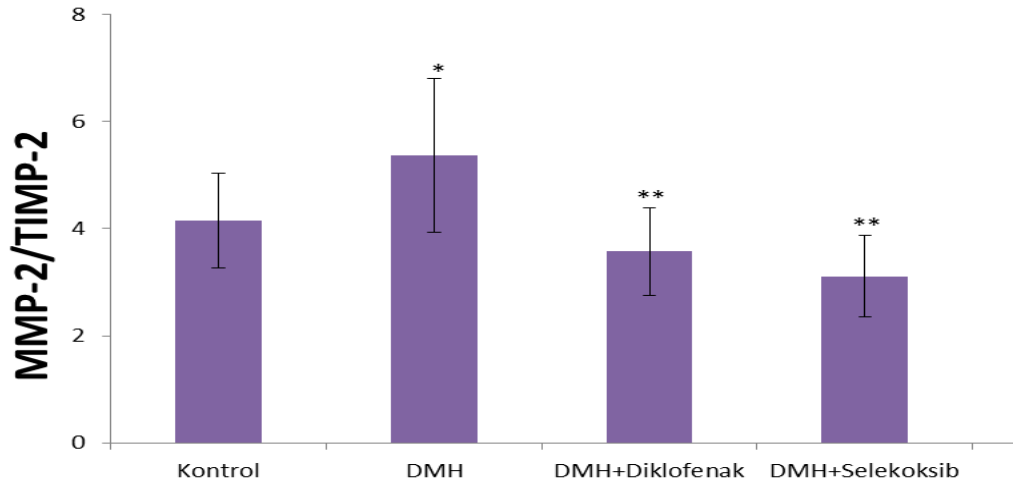


Şekil 40. Gruplara ait plazma TIMP-2 düzeyleri

** $p < 0,05$; DMH grubu ile karşılaştırma; * $p < 0,05$; kontrolle karşılaştırma

3.3.6. Plazma MMP-2/ TIMP-2 Oranları

MMP-2/ TIMP-2 oranları DMH grubunda ($5,36 \pm 1,43$) kontrollere göre ($4,1 \pm 0,89$) istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek tespit edildi ($p = 0,014$). DMH grubu ile DMH+Diklofenak grubu ($3,56 \pm 0,81$) karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı düşüş ($p < 0,0001$) ve DMH grubu ile tedavi gruplarından DMH+Selekoksisib grubu ($3,11 \pm 0,76$) karşılaştırıldığında ($p < 0,0001$) ise yine anlamlı azalma tespit edildi. Yani tedavi gruplarının her ikisinde de MMP-2/ TIMP-2 oranlarında DMH grubuna göre istatistiksel anlamlı düşüş görüldü (Şekil 41, Tablo 3).



Şekil 41. Gruplara ait plazma MMP-2/TIMP-2 oranları

*p<0,05; kontrolle karşılaştırma **p<0,0001; DMH grubu ile karşılaştırma

Tablo 3. Gruplara ait plazma MMP-2, MMP-9, TIMP-2 düzeyleri ve MMP-2/TIMP-2 Oranları

	MMP-2 (pg/ml)	MMP-9 (ng/ml)	TIMP-2 (ng/ml)	MMP-2/ TIMP-2 Oranı
KONTROL (n=8)	54,09 ± 2,87	1,95 ± 0,19	13,75 ± 4,07	4,15 ± 0,89
DMH (n=16)	79,63 ± 18,12*	2,40 ± 0,23 [^]	15,32 ± 2,97	5,36 ± 1,43 ^b
DMH+DİKLOFENAK (n=10)	59,62 ± 8,22**	2,09 ± 0,19 ^{^^}	17,44 ± 4,03 ^a	3,56 ± 0,81 ^{bb}
DMH+SELEKOKSİB (n=10)	56,92 ± 8,16**	1,99 ± 0,27 ^{^^^}	19,13 ± 4,22 ^{aa}	3,11 ± 0,76 ^{bb}

*: p<0,0001, kontrolle karşılaştırma

**p<0,0001, DMH ile karşılaştırma

^b: p<0,05 (p=0,014), kontrolle karşılaştırma

^{bb}: p<0,0001, DMH ile karşılaştırma

[^]: p<0,0001, kontrolle karşılaştırma

^{^^}: p<0,01 (p=0,002), DMH ile karşılaştırma

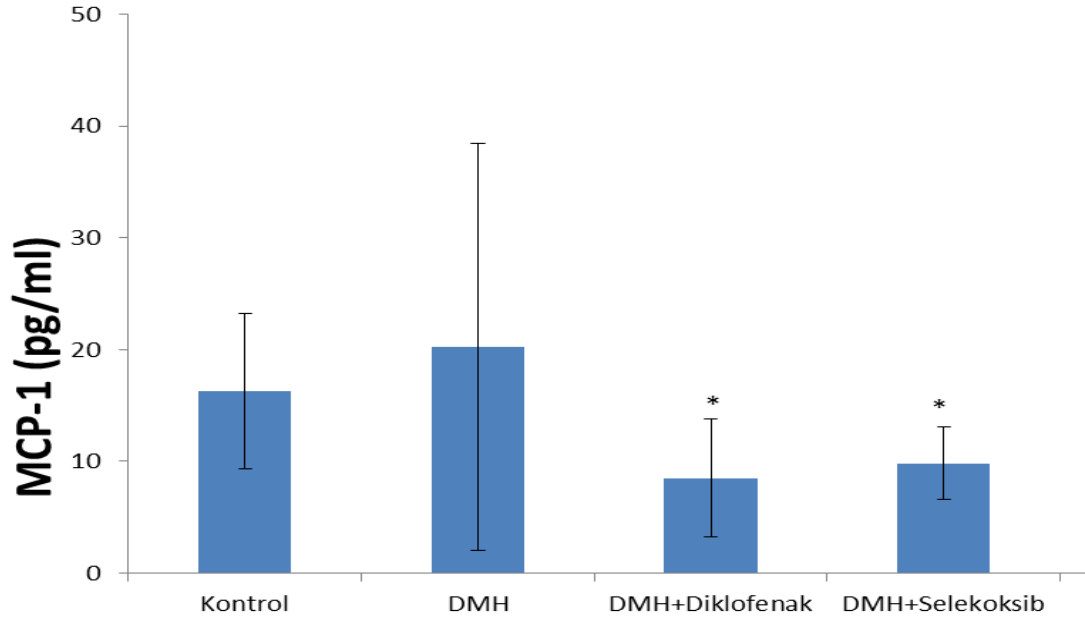
^{^^^}: p<0,0001, DMH ile karşılaştırma

^a: p<0,05, kontrolle karşılaştırma

^{aa}: p<0,05, DMH ile karşılaştırma

3.3.7. Plazma MCP-1 Düzeyleri

MCP-1 düzeyleri DMH grubunda (20,24±18,17 pg/ml) kontrol grubuna göre (16,3±6,96 pg/ml) artmış olmasına rağmen, DMH grubunda MCP-1'e ait standart sapmaların yüksek olması nedeniyle bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0,05). DMH grubunun MCP-1 düzeyleri ile tedavi grupları karşılaştırıldığında hem DMH+Diklofenak grubu (8,52 ±5,28 pg/ml) (p<0,05) hem de DMH+Selekoksib grubunda (9,83 ±3,25 pg/ml) (p<0,05) istatistiksel anlamlı düşüş tespit edildi (Şekil 42, Tablo 4).



Şekil 42. Gruplara ait plazma MCP-1 düzeyleri

*p<0,05; DMH grubu ile karşılaştırma

Tablo 4. Gruplara ait plazma VEGF, ICAM-1, MCP-1 düzeyleri

	VEGF (pg/ml)	ICAM-1 (pg/ml)	MCP-1 (pg/ml)
KONTROL (n=8)	16,11 ± 5,09	590,16 ± 38,72	16,30 ± 6,96
DMH (n=16)	54,54 ± 34,30*	918,43 ± 435,25^	20,24 ± 18,17
DMH+DİKLOFENAK (n=10)	20,84 ± 3,85**	666,02 ± 134,78^^	8,52 ± 5,28 ^a
DMH+SELEKOKSİB (n=10)	25,18 ± 5,18***	503,85 ± 119,47^^^	9,83 ± 3,25 ^a

*: p<0,0001, kontrolle karşılaştırma

** : p<0,0001, DMH ile karşılaştırma

***: p=0,001, DMH ile karşılaştırma

^a: p<0,05, DMH ile karşılaştırma

^: p=0,01, kontrolle karşılaştırma

^^: p<0,05, DMH ile karşılaştırma

^^^: p=0,001, DMH ile karşılaştırma

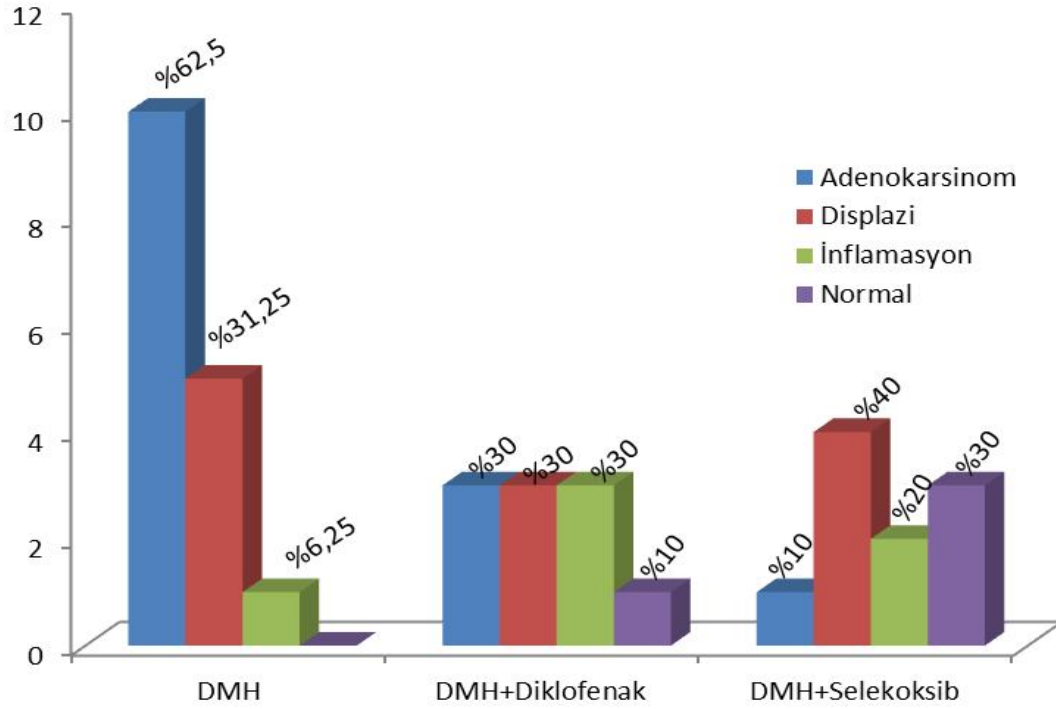
3.4. Tüm Gruplarda Kolorektal Dokunun Histopatolojik Değerlendirmesi

Kontrol grubundaki hayvanlarda herhangi bir patolojik lezyon tespit edilmedi, kontroller normal olarak değerlendirildi.

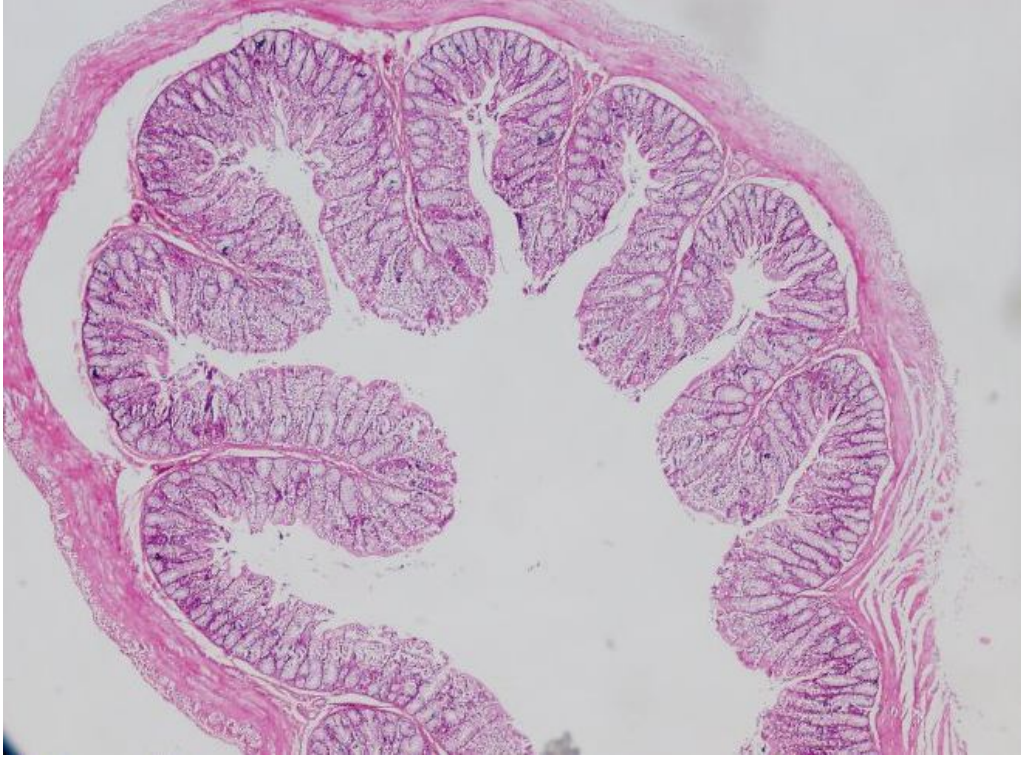
DMH grubundaki 16 hayvanın 10 tanesinde (%62,5) adenokarsinom (invaziv ve intramukozal), 5 tanesinde (%31,25) hafiften şiddetliye kadar değişen derecelerde ancak şiddetli displazinin hakim olduğu displazi ve 1 tanesinde (% 6,25) de şiddetli inflamatuvar değişiklikler gözlemledik (Şekil 43).

DMH+Diklofenak grubundaki 10 hayvanın 3 tanesinde (%30) adenokarsinom, 3 tanesinde (%30) displazi, 3 tanesinde de (%30) inflamatuvar değişiklikler gözlemledik. Bu gruptaki hayvanların 1 tanesinde (%10) ise herhangi bir patolojik lezyona rastlanmadı ve normal olarak değerlendirildi (Şekil 43).

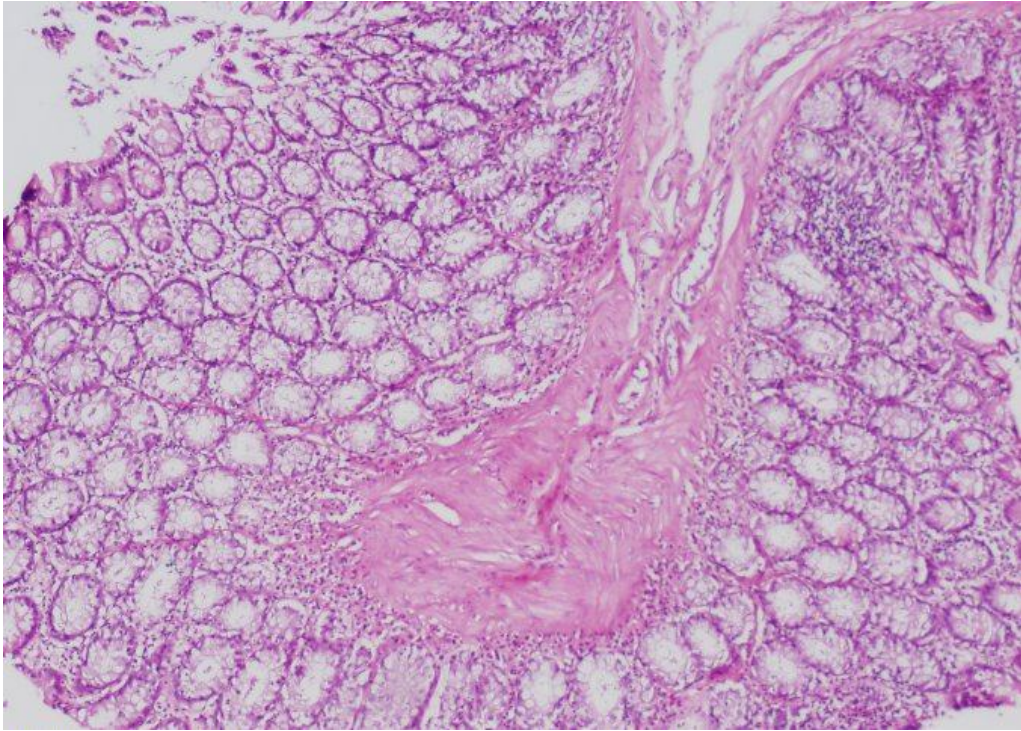
DMH+Selekoksib grubundaki 10 hayvanın 1 tanesinde (%10) adenokarsinom, 4 tanesinde (%40) displazi, 2 tanesinde de (%20) inflamatuvar değişiklikler gözlemledik. Bu gruptaki hayvanların 3 tanesinde (%30) ise herhangi bir patolojik lezyona rastlanmadı ve normal olarak değerlendirildi (Şekil 43).



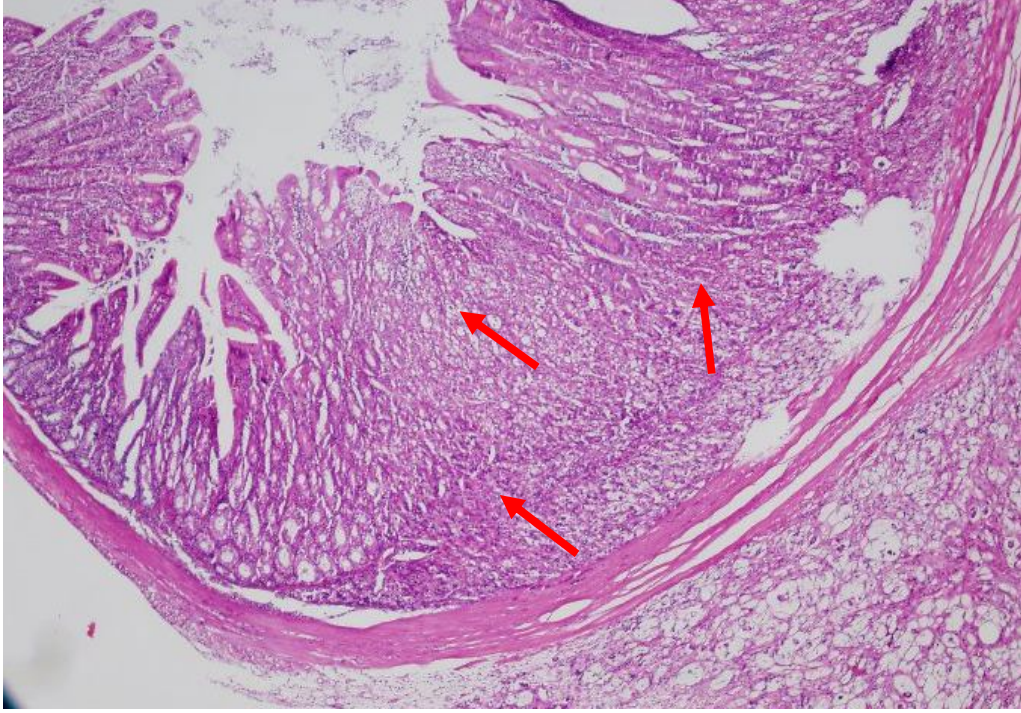
Şekil 43. DMH Grubu ve tedavi gruplarında histopatolojik lezyonlara ait oranlar



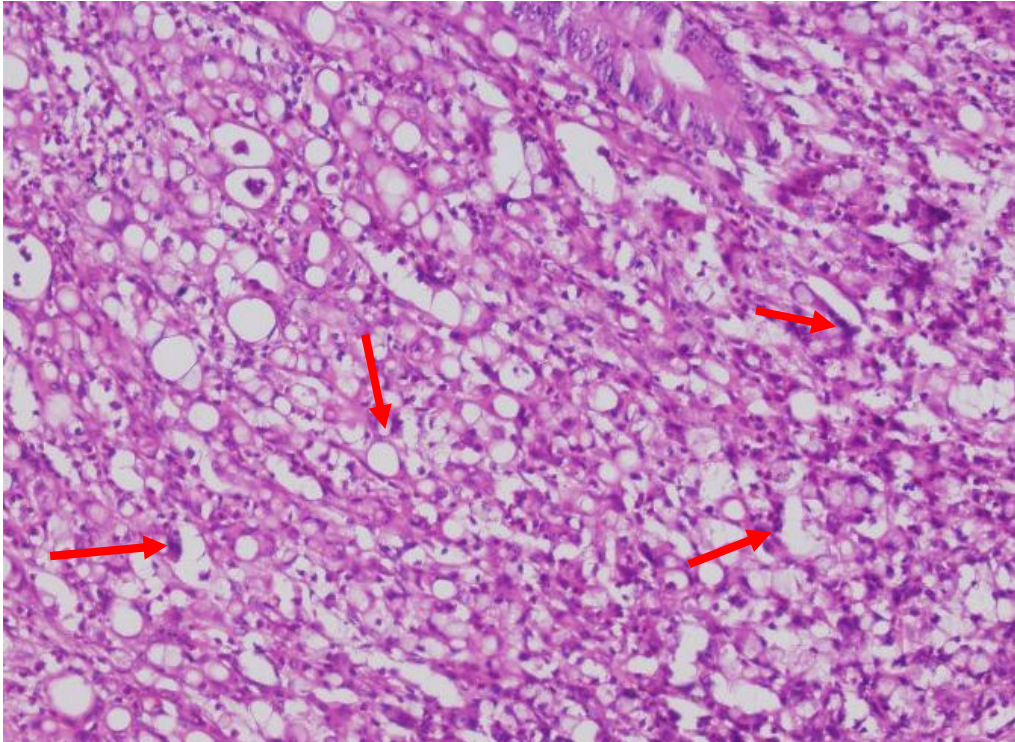
Şekil 44. Kontrol Grubunda kolonda normal histopatolojik görünüm. (HE). (x4).



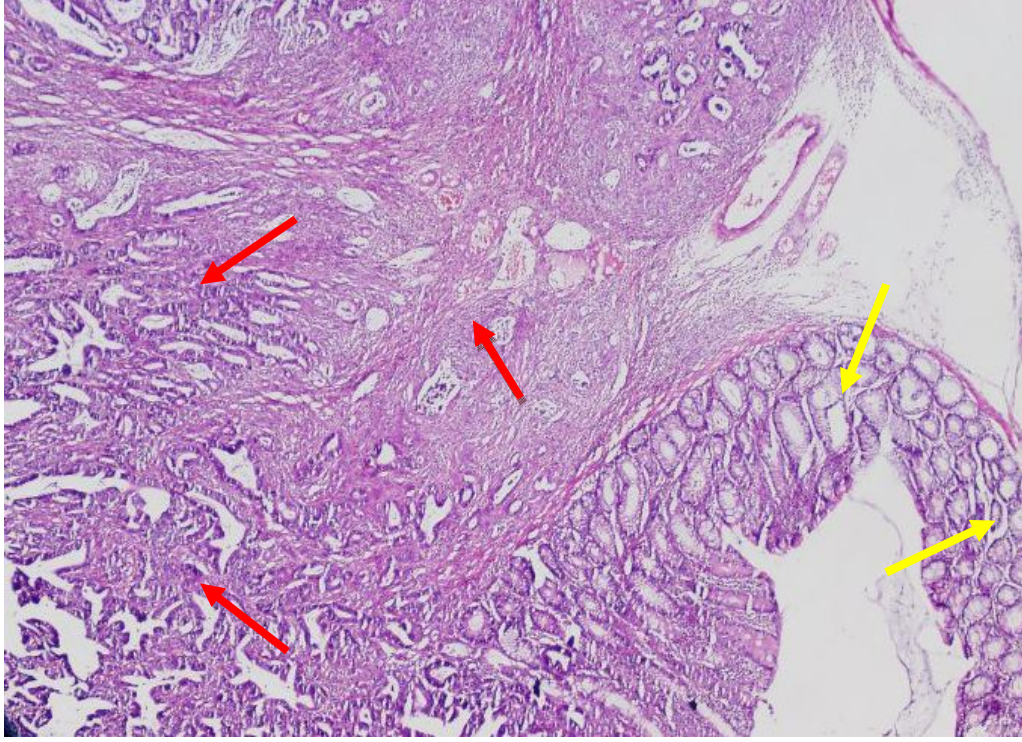
Şekil 45. Kontrol Grubunda kolonda normal histopatolojik görünüm. (HE). (x10).



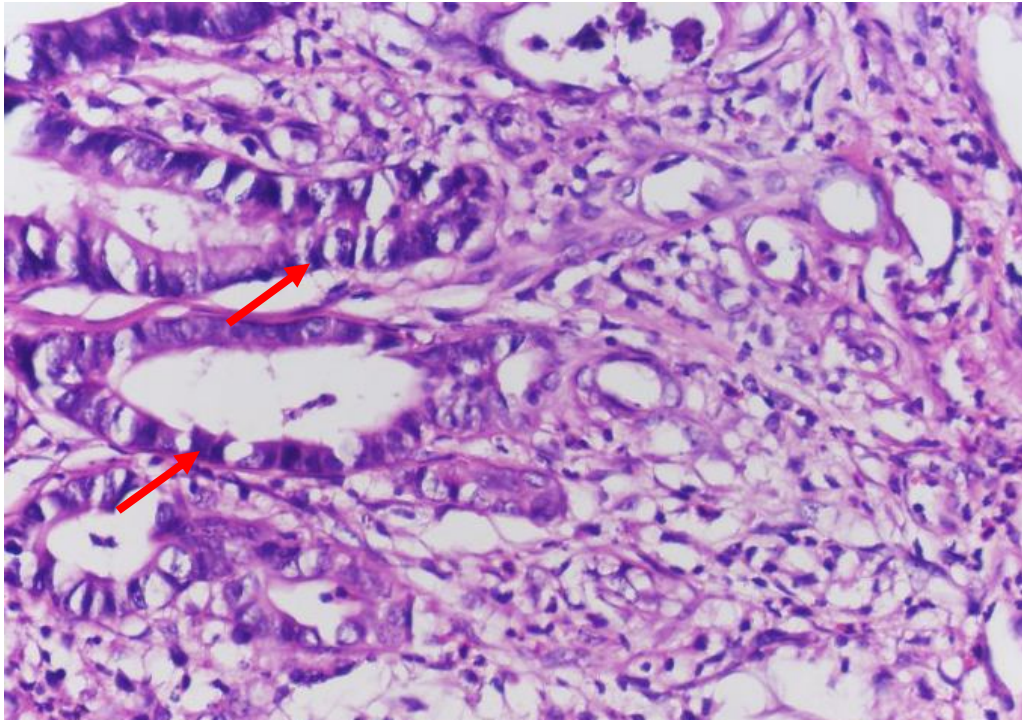
Şekil 46. DMH Grubunda kolonda invaziv karsinoma ait histopatolojik görünüm. (HE). (x10).



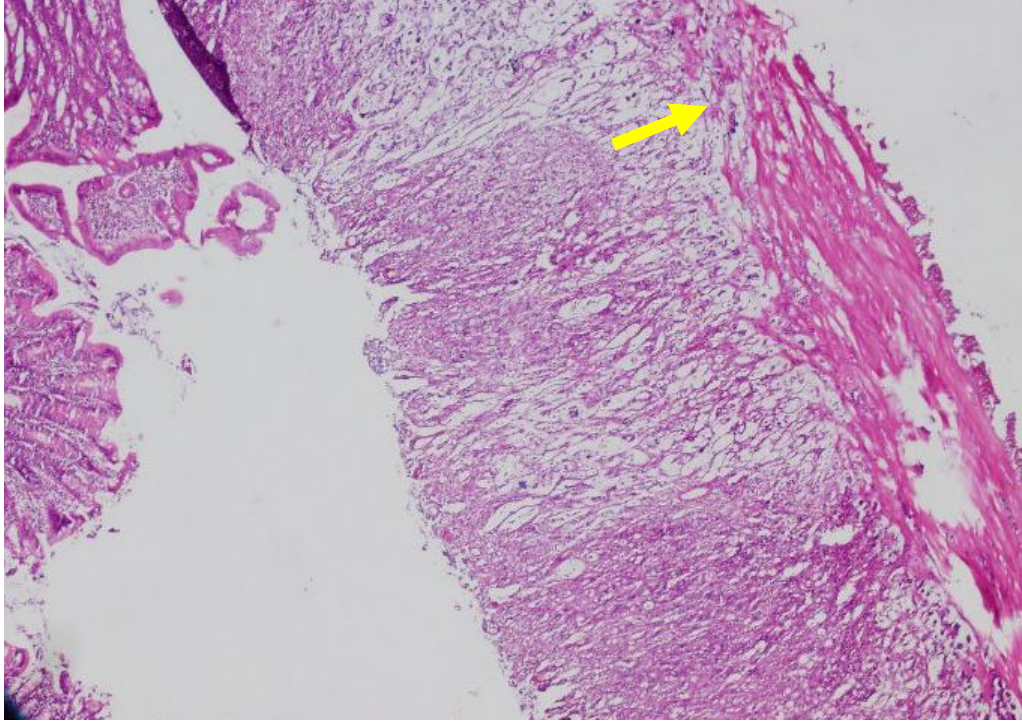
Şekil 47. DMH Grubunda kolonda invaziv müsinöz adeno karsinoma ait histopatolojik görünüm. (Tüm alanda yaygın müsinöz adeno karsinom) (HE). (x20).



Şekil 48. DMH Grubunda kolonda invaziv karsinom. Normal dokudan kansere geçişe ait histopatolojik görünüm. →: İnvaziv karsinom gelişen alanlar →: Normal kolon mukozası. (HE). (x4).



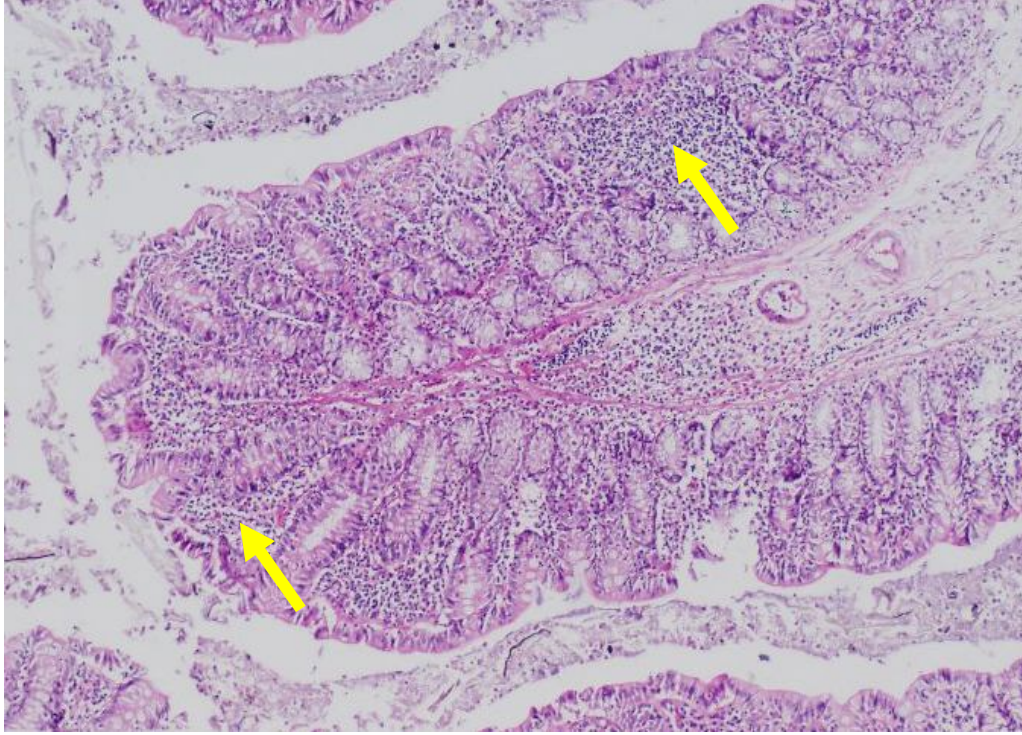
Şekil 49. DMH Grubunda kolonda invaziv karsinom. Atipik hücelere ait histopatolojik görünüm. (HE). (x40).



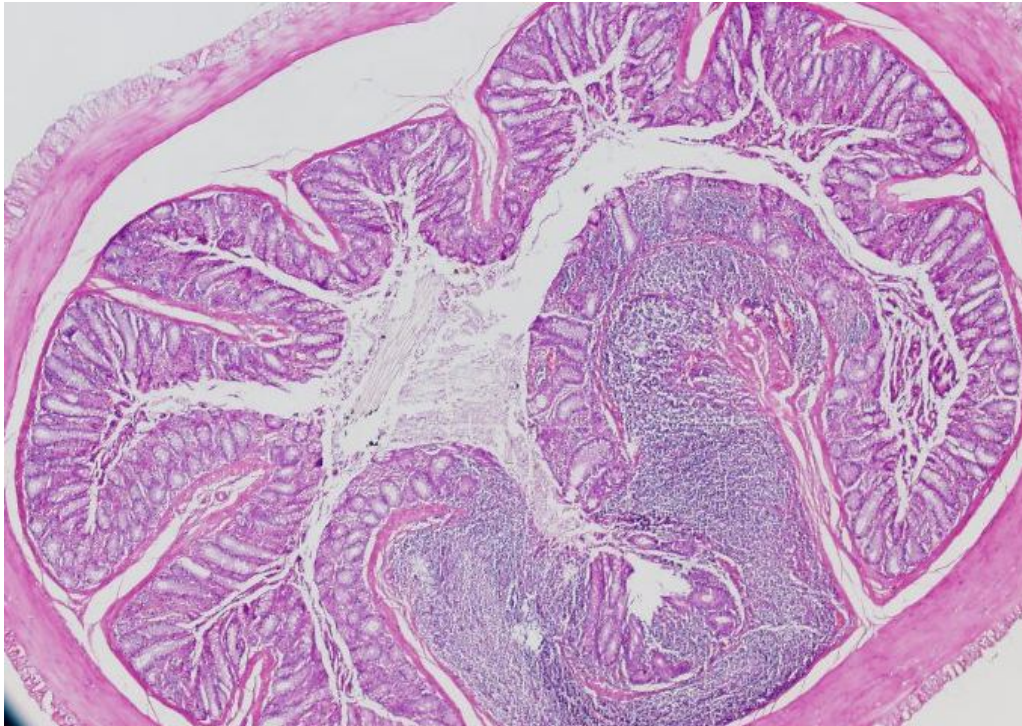
Şekil 50. DMH Grubunda kolonda invaziv karsinom. Kas dokusuna invazyona ait histopatolojik görünüm. (HE). (x4)



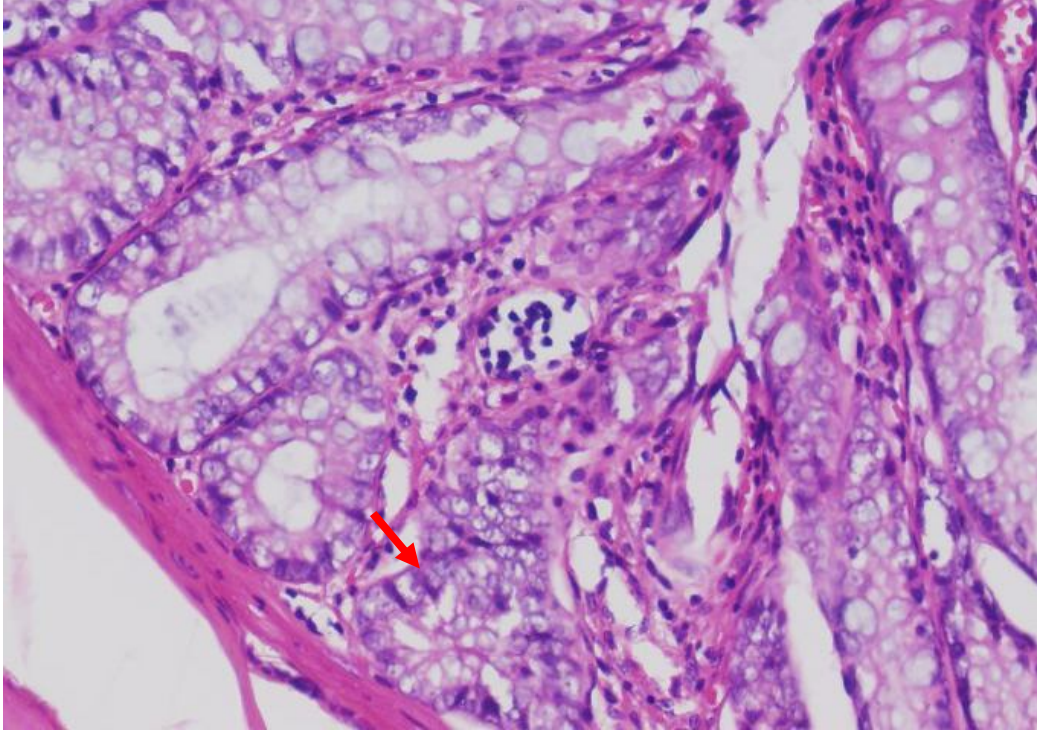
Şekil 51. DMH+Diklofenak Grubunda kolonda normal histopatolojik görünüm. (HE). (x10).



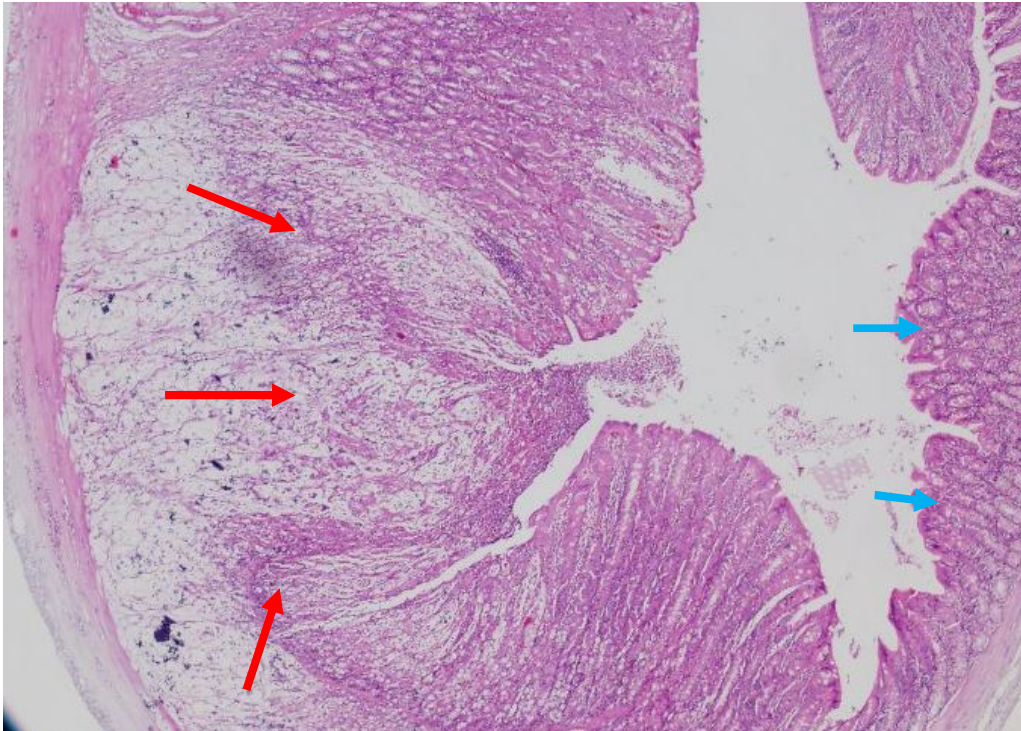
Şekil 52. DMH+Diklofenak Grubunda kolonda inflamasyon,inflamatuvar hücre infiltrasyonuna ait histopatolojik görünüm. (HE). (x10).



Şekil 53. DMH+Diklofenak Grubunda kolonda displastik değişiklikler ve lenfoid hiperplaziye ait histopatolojik görünüm. (HE). (x4).



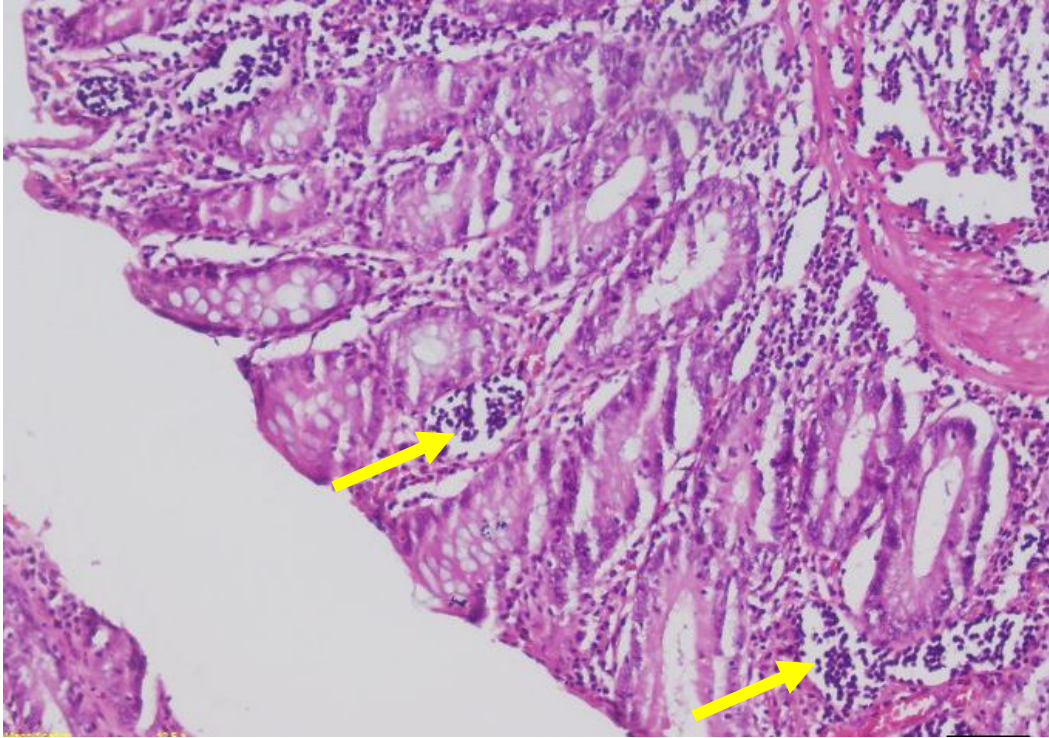
Şekil 54. DMH+Diklofenak Grubunda kolonda displastik değişikliklere ait histopatolojik görünüm. (HE). (x40).



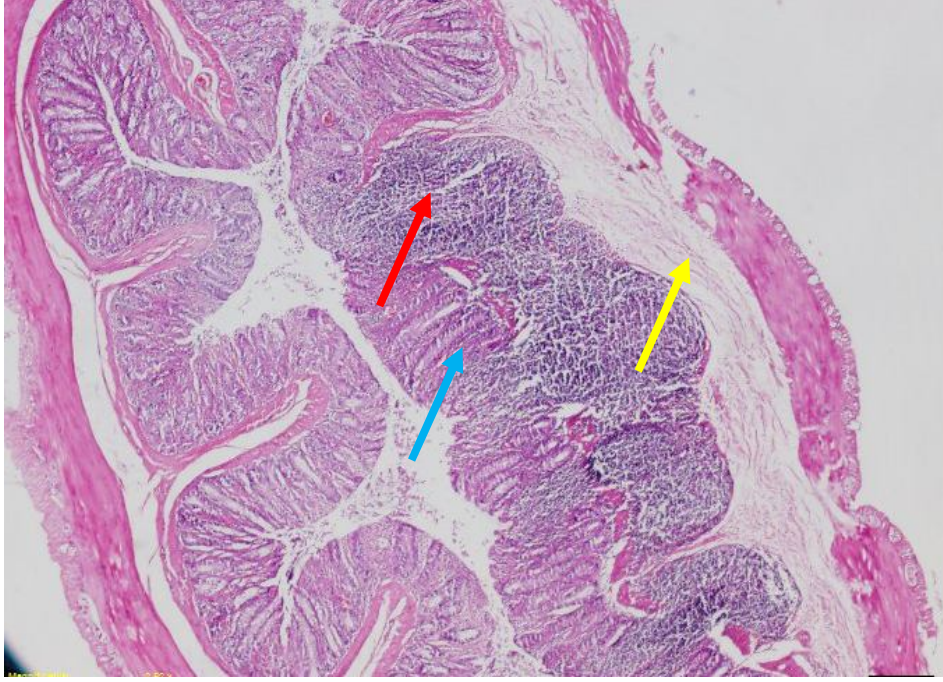
Şekil 55. DMH+Diklofenak Grubunda kolonda invaziv karsinoma ait histopatolojik görünüm. →: İnvaziv adenokarsinom →: Normal kolon mukozası. (HE). (x4).



Şekil 56. DMH+Selekoksib Grubunda kolonda normal histopatolojik görünüm. (HE). (x4).

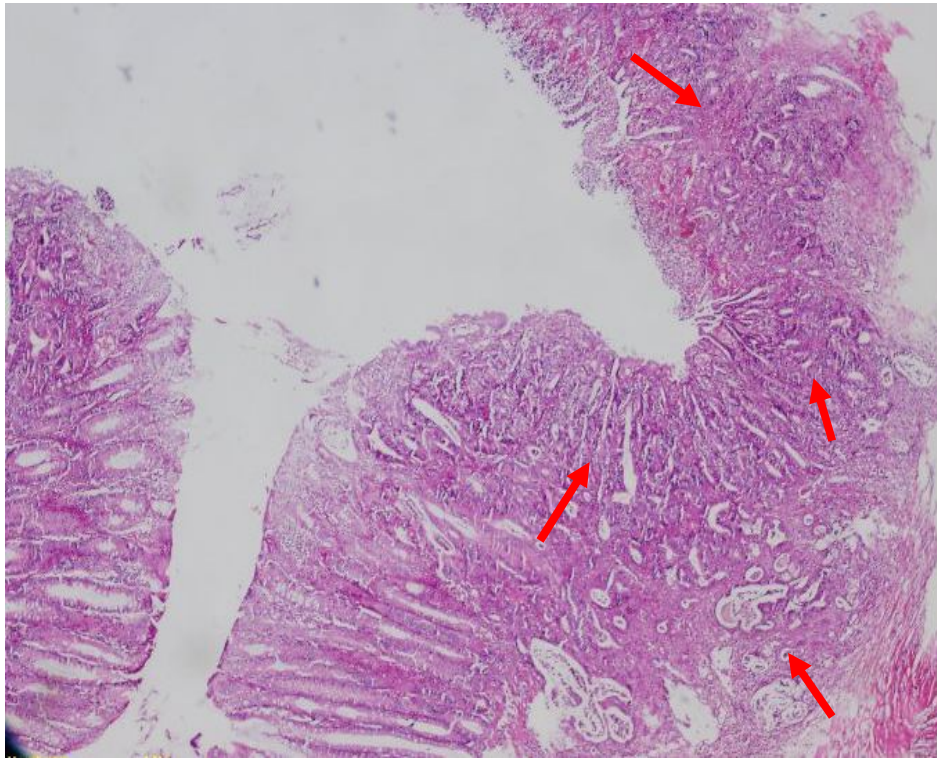


Şekil 57. DMH+Selekoksib Grubunda kolonda inflamasyon, polimorfonüveli (PMN) lökosit infiltrasyonuna ait histopatolojik görünüm. (HE). (x40).

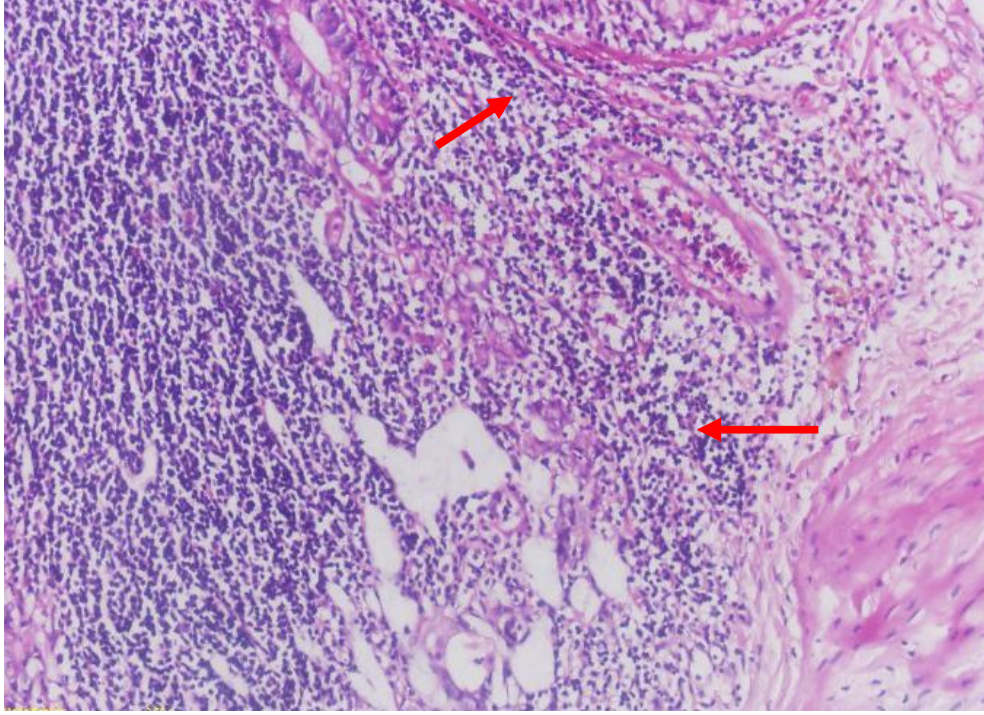


Şekil 58. DMH+Selekoksib Grubunda kolon epitelinde displastik değişikliklerle birlikte bozulmaya başlamış bez yapısı, lenf nodu hiperplazisi ve submukozal ödeme ait histopatolojik görünüm.

→: lenf nodu hiperplazisi →: submukozal ödeme →: displastik değişiklikler (HE). (x4).



Şekil 59. DMH+Selekoksib grubunda sadece bir hayvanda tespit edilen invaziv karsinoma ait histopatolojik görünüm. (HE). (x4).

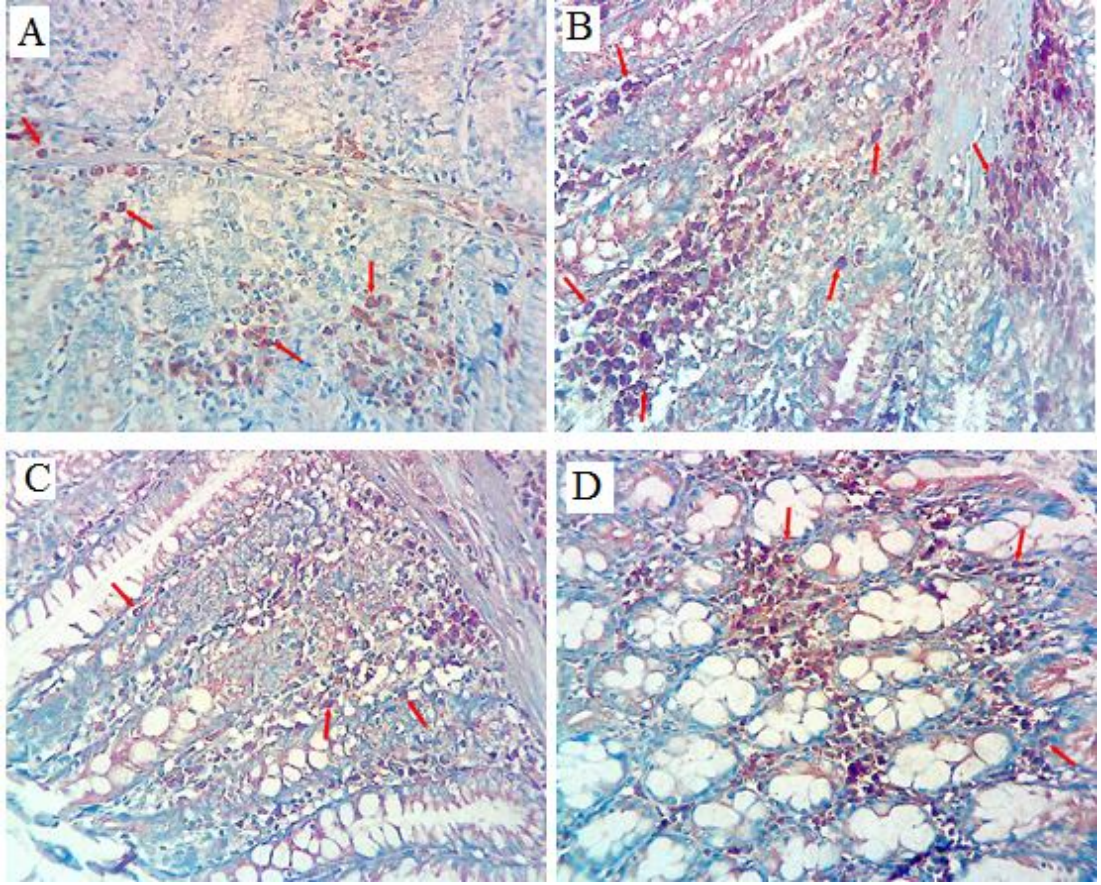


Şekil 60. DMH+Selekoksib Grubunda sadece bir hayvanda tespit edilen invaziv karsinomda peritümoral alandaki yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonlarına ait histopatolojik görünüm. (HE). (x4).

3.5. Tüm Gruplarda Kolorektal Dokunun İmmünohistokimyasal Değerlendirmesi

3.5.1 MMP-2 İmmünreaktivitesinin Değerlendirilmesi

MMP-2 immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; MMP-2 immünreaktivitesi kontrol grubunda +3 şiddetinde ve yaygınlığında gözlemlendi (kırmızı ok) (Şekil 61A). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DMH grubunda MMP-2 immünreaktivitesinde artış vardı ve +4 şiddetinde ve yaygınlığında olduğu görüldü (kırmızı ok) (Şekil 61B). Selekoksib'in tedavi olarak verildiği DMH+Selekoksib grubunda ise DMH grubuna göre MMP-2 immünreaktivitesinin azaldığı izlendi ve +3 şiddetinde ve yaygınlığında değerlendirildi (kırmızı ok) (Şekil 61C). Diklofenak'ın tedavi olarak verildiği DMH+Diklofenak grubunda ise DMH grubuna göre MMP-2 immünreaktivitesinin azaldığı izlendi ve +3 şiddetinde ve yaygınlığında değerlendirildi (kırmızı ok) (Şekil 61D).

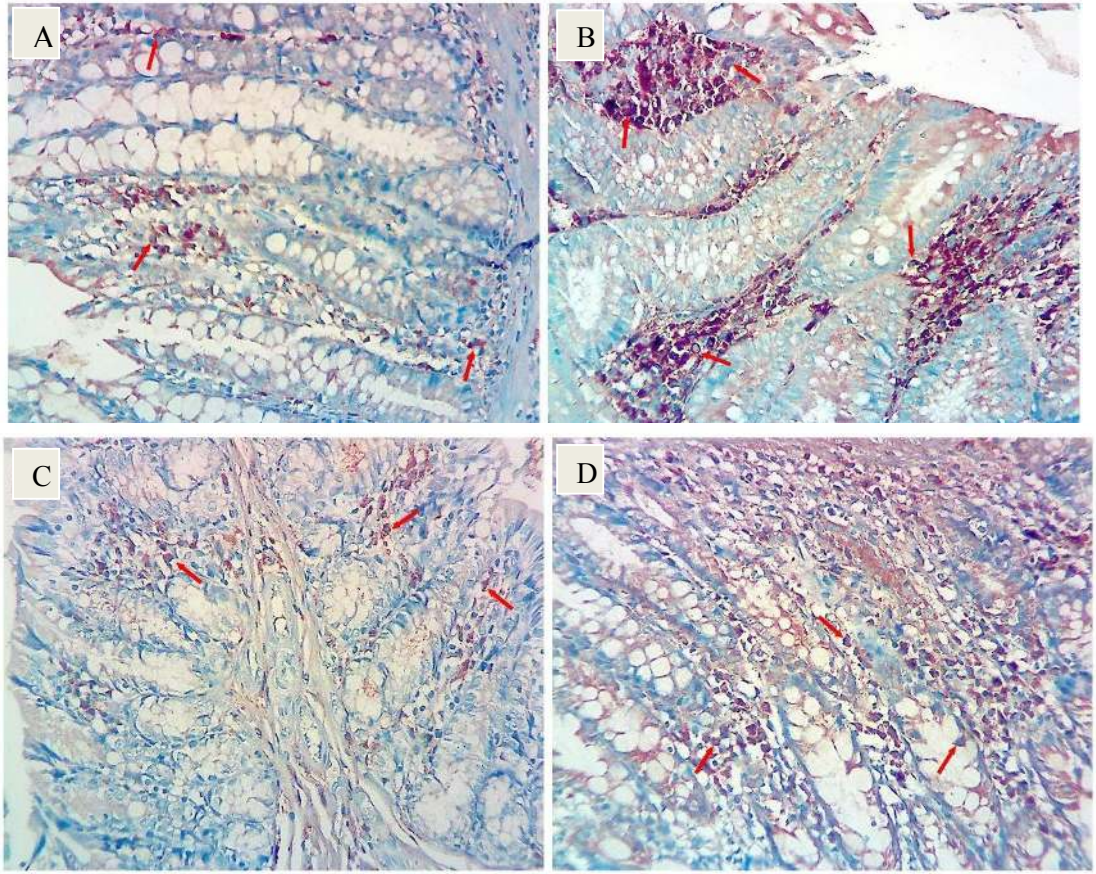


Şekil 61. MMP-2'nin gruplara ait immünohistokimyasal boyanma özellikleri. (x4)

A: Kontrol; **B:** DMH; **C:** DMH+Selekoksib; **D:** DMH+Diklofenak

3.5.2. MMP-9 İmmünreaktivitesinin Değerlendirilmesi

MMP-9 immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; MMP-9 immünreaktivitesi kontrol grubunda +2 şiddetinde ve yaygınlığında gözlemlendi (kırmızı ok) (Şekil 62A). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DMH grubunda MMP-9 immünreaktivitesinde belirgin bir artış vardı ve +4 şiddetinde ve yaygınlığında olduğu görüldü (kırmızı ok) (Şekil 62B). Selekoksib'in tedavi olarak verildiği DMH+Selekoksib grubunda ise DMH grubuna göre MMP-9 immünreaktivitesinin belirgin olarak azaldığı izlendi ve +2 şiddetinde ve yaygınlığında değerlendirildi (kırmızı ok) (Şekil 62C). Diklofenak'ın tedavi olarak verildiği DMH+Diklofenak grubunda ise DMH grubuna göre MMP-9 immünreaktivitesinin azaldığı izlendi ve +3 şiddetinde ve yaygınlığında değerlendirildi (kırmızı ok) (Şekil 62D).

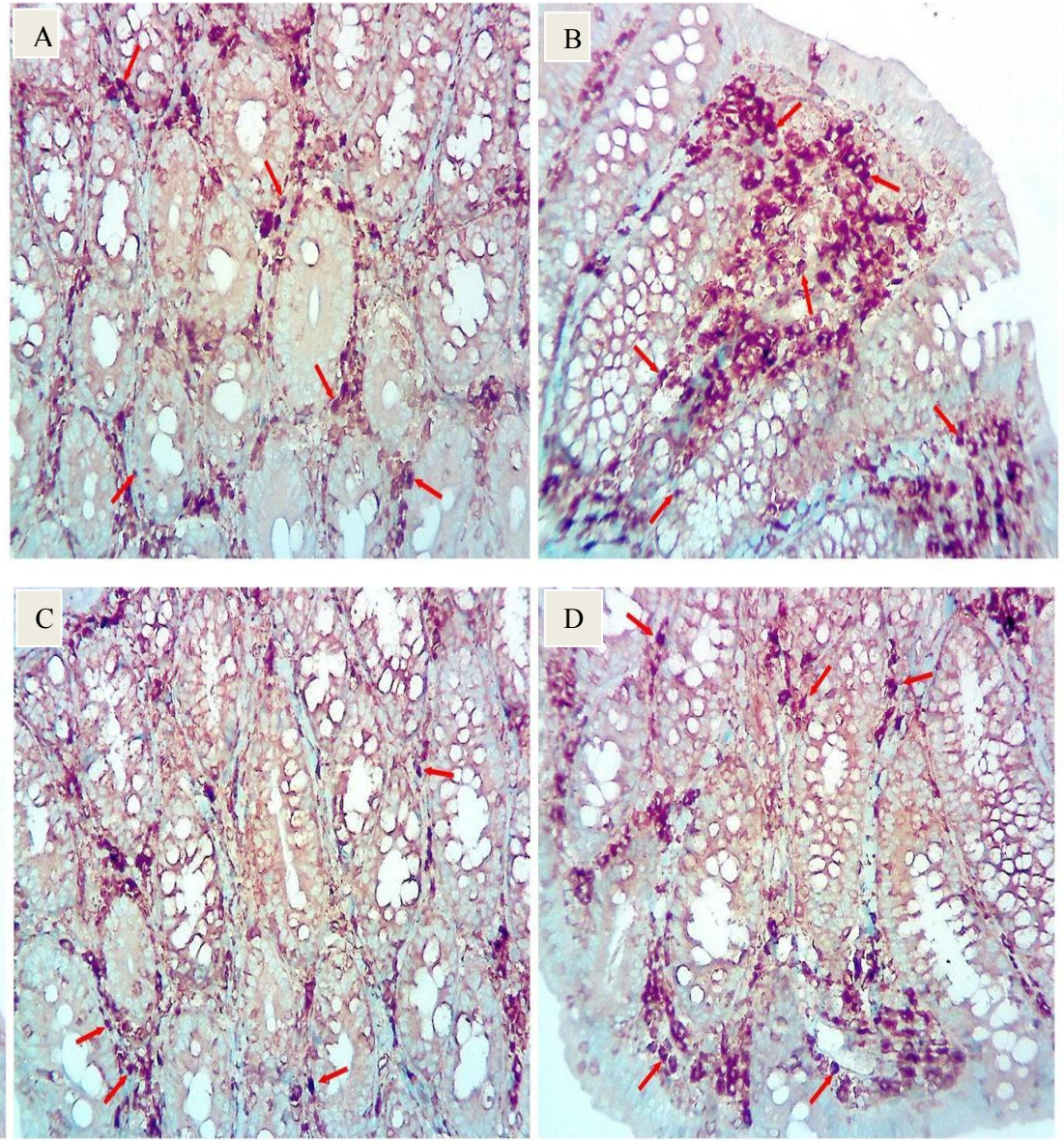


Şekil 62. MMP-9'un gruplara ait immünohistokimyasal boyanma özellikleri. (x4)

A: Kontrol; **B:** DMH; **C:** DMH+Selekoksib; **D:** DMH+Diklofenak

3.5.3. Nfκ-B İmmünreaktivitesinin Değerlendirilmesi

Nfκ-B immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; Nfκ-B immünreaktivitesi kontrol grubunda +2 şiddetinde ve yaygınlığında gözlemlendi (kırmızı ok) (Şekil 63A). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DMH grubunda Nfκ-B immünreaktivitesinde artış vardı ve +3 şiddetinde ve yaygınlığında olduğu görüldü (kırmızı ok) (Şekil 63B). Seleksib'in tedavi olarak verildiği DMH+Seleksib grubunda ise DMH grubuna göre Nfκ-B immünreaktivitesinin belirgin olarak azaldığı izlendi ve +1 şiddetinde ve yaygınlığında değerlendirildi (kırmızı ok) (Şekil 63C). Diklofenak'ın tedavi olarak verildiği DMH+Diklofenak grubunda ise DMH grubuna göre Nfκ-B immünreaktivitesinin azaldığı izlendi ve +2 şiddetinde ve yaygınlığında değerlendirildi (kırmızı ok) (Şekil 63D).



Şekil 63. Nfk-B'nin gruplara ait immünohistokimyasal boyanma özellikleri. (x4)

A: Kontrol; **B:** DMH; **C:** DMH+Selekoksisib; **D:** DMH+Diklofenak

4. TARTIŞMA

Kolorektal kanserler dünya çapında en yaygın üçüncü kanser türü haline gelmiştir. Son zamanlarda çeşitli tedavi modaliteleri geliştirilmiş olmasına rağmen, dünya çapında kansere bağlı ölümlerin en yaygın sebeplerinden biri olmaya devam etmektedir (204, 236).

Kolorektal kanserlerin patogenezi oldukça kompleks bir süreçtir. Bu süreç çevresel faktörlere bağlı etkileşimler, bireysel kansere yatkınlıkla ilgili genetik özellikler ve kolorektal epiteldeki somatik değişikliklerin birikimi gibi birçok etkiyi bünyesinde barındırmaktadır (237). Kolorektal kanserlerin büyük çoğunluğu displastik adenomatöz poliplerden kaynaklanan sporadik olarak ortaya çıkan tümörlerdir (44, 238).

Birçok basamağı içeren bu süreç başlangıçta genetik değişikliklerin birikimiyle kolon epitel hücrelerine tümör gelişimi yönünde selektif bir büyüme için olanak sağlar (58).

Bu büyümeyi takiben normal kolon epitel hücrelerinden adenomatöz polibe dönüşüm gerçekleşir ve süreç invaziv KRK gelişimiyle sonlanır. Bu değişiklikler hücre büyümesinin regülasyonunda etkili APC, Smad4 ve p53 gibi tümör süpresör genler ya da K-ras, c-myc, c-neu, c-src gibi onkogenlerdeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkar (239). KRK’de sırasıyla ortaya çıkan genetik değişiklikler; histolojik progresyon, küçük premalign adenom, malign adenomdan metastatik tümöre dönüşüm ve hastalığın evreleri (erken, geç) üzerine etkilidir (240).

KRK’lerin yaklaşık %10’u ise iyi tanımlanmış hereditör sendromların zemininden gelişmektedir. Bu sendromların iki ana formu; Hereditör nonpolipozis koli (HNPCC) ve Familial adenomatosis polipozis (FAP)’dir (241, 242).

İnsan tümörlerinin çok aşamalı gelişim sürecinde kanser işaretleri olarak tanımlanan (hall marks of cancer) özellikler 2000 yılında Hanahan ve Weinberg (243), tarafından 6 adet edinilmiş biyolojik yetenek olarak ortaya koyulmuştur. Bu 6 adet özellik; proliferatif sinyallerin sürdürülmesi, büyüme süpresyonundan kaçış, hücre ölümüne direnç (apoptozisin inhibisyonu), anjiyogenezisin indüklenmesi, invazyon ve metastazın aktive olması, replikatif immortaliteye olanak sağlanması olarak bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar tarafından 2011 yılında (244) bu 6 kanser işareti olarak tanımlanan özelliğe 4 yeni özellik daha ilave edilmiştir. Bu yeni kanser

işaretleri ise; anormal metabolik yolak (hücrel enerji kaynaklarının serbestlenmesi), immün sistemden kaçış, instabil genom ve mutasyon ile tümör ilişkili inflamasyondur. Aslında bu edinilmiş yetenekler, hücre sağ kalımıyla ilgili kontrol mekanizmalarından, proliferasyon, migrasyon, invazyon, komşu hücrelerle ve stromayla etkileşime kadar birçok aşamadaki anormalliği temsil eder ve bu şekilde özetlenebilir (240).

Belirlenen bu özelliklerle birlikte terapötik hedefler ortaya koyulmuş ve bunlara yönelik birçok yeni tedavi modalitesi geliştirilmiştir. Hedefe yönelik bu tedavi şekillerinden bazıları; indüklenen anjiyogenezise yönelik VEGF sinyal inhibitörleri, immün sistemden kaçışa karşı immün aktive edici sitotoksik T lenfosit antijen 4m antikoru (CTLA4 mAb), apoptozisin inhibisyonuna karşı proapoptotik BH3 mimetikler, hücrel enerji kaynaklarının serbestlenmesine karşı aerobik glikoliz inhibitörleri, proliferatif sinyallerin sürdürülmesine karşı EGFR inhibitörleri, replikatif immortaliteye karşı telomerez inhibitörleri, genom instabilitesi ve mutasyona karşı Poli (ADP riboz) polimeraz (PARP) inhibitörleri, büyüme süpresyonundan kaçışa karşı siklin bağımlı kinaz inhibitörleri, tümör ilişkili inflamasyona karşı ise selektif NSAİİ'lerdir (244).

Kanser için belirlenen bu temel işaretler birçok kanser türü için olduğu gibi KRK'ler için de geçerlidir ve KRK'lerin etiopatogenenezindeki karmaşıklık ile çok basamaklı gelişim süreci ve uygulanabilecek yeni terapötik yaklaşımlar açısından dikkate değerdir.

KRK gelişiminde, genetik ve epigenetik anormalliklerin ortaya çıkmasının yanı sıra ciddi bir inflamatuvar ortam oluşumu da önemli rol oynamaktadır (245). Reaktif tümör stromasının işaretleri; belirgin bir lökosit infiltrasyonu, kan damarı ağrı, matriks proteinleri ile aşırı artmış sitokin ve kemokinlerdir (245, 246).

İnflamasyon ve kanser arasındaki ilişki şematik olarak intrinsik ve ekstrinsik olarak iki yol halinde gösterilebilir. İntrinsik yol genetik değişikliklerle süre gelen, inflamasyon ve neoplaziye neden olan yol (örnek olarak onkogenler) iken, ekstrinsik yol ise inflamatuvar barsak hastalıklarında olduğu gibi kronik bir infeksiyon ortamındaki inflamatuvar lökositler ya da kalıcı inflamatuvar olaylarla süregelen artmış kanser riskidir (114). Ortaya çıkan kanıtlar da kanser ilişkili inflamasyonun genetik instabiliteyi teşvik ettiğini göstermektedir (247).

Kanser ilişkili inflamasyon, karsinogenez gelişimini, malign hücrelerin proliferasyonu, anjiyogenezis ve tümör metastazı gibi birçok süreçte etkiler (248, 249). Böylelikle, kanser ilişkili inflamasyon yenilikçi tanısal ve terapötik stratejiler için yeni bir hedefi temsil eder duruma gelmiştir (250).

KRK'lerin başlangıcına APC gen mutasyonu ile birlikte WNT/ β -katenin-sinyal yolağındaki karışıklığın neden olduğu bilinmektedir (60, 250).

Bununla birlikte COX-2'nin anormal ekspresyonu KRK'lerin çoğunda görülmekte ve bu durumun KRK gelişiminde kritik role sahip olduğu düşünülmektedir (251).

COX-2 ekspresyonunun kontrolü transkripsiyonal ve translasyonel olarak regüle edilmesi temeline dayanmaktadır. Normal şartlar altında bu düzenlenme esnasında parçalanmış mRNA'lara paralel olarak COX-2 kopyaları da hızla parçalanır. Buna rağmen inflamasyon esnasında açığa çıkan proinflamatuvar sitokinler yoluyla fizyolojik koşullarda parçalanmış bu COX-2 kopyaları stabilize olur ve COX-2 protein düzeyleri artar (107).

KRK'lerde COX-2'nin artmış ekspresyonu birden fazla mekanizma ile ortaya çıkmaktadır. Bunlardan biri; hipoksi ve inflamasyonla birlikte artan sitokinler aracılığıyla bir transkripsiyon faktörü olan NF κ B'nin aktif formuna dönüşüp çekirdeğe transloke olması sonucu COX-2 gen ekspresyonunu arttırmasıdır. (113, 114, 204).

Diğeri ise; fizyolojik şartlarda sitozolde bulunan β -katenin, wild-tip APC protein ve yardımcı iki protein (akşin ve GSK-3 β)'den oluşan kompleksin aktivasyonu ile parçalanmaktadır. APC gen mutasyonunda ise APC proteininin β -katenine bağlama bölgelerinde fonksiyon bozukluğu gelişir ve bu durum β -kateninin artan miktarıyla birlikte yüksek oranda çekirdeğe transloke olmasıyla sonuçlanır. Çekirdekte TCF-4 ve LEF-1 ile birlikte bir transkripsiyon faktörü gibi etki gösterir ve COX-2 gen ekspresyonu artar (113).

Araşidonik asitten PG sentezinde hız kısıtlayıcı basamak üzerine etkili olan COX-2'nin KRK'leri de içeren birçok kanserde artmış ekspresyonları gösterilmiş ve yine KRK'leri de içeren birçok kanserin patogeneğinde rol aldığı bildirilmiştir (58, 252-257).

İnsan çalışmaları ve deneysel hayvan modellerinde COX-2 enziminin, hücre proliferasyonu, artmış anjiyogenezis, defektif apoptozis, metastaz artışı, immün süpresyon, mutajenik etki, oksidatif ürünlerde artış ve aromataz enzim indüksiyonu gibi mekanizmalar üzerinden kanser gelişimini indüklediği ve bu çoklu mekanizmalarla karsinogenezde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (109, 110).

Yapılan birçok çalışmada NSAİİ kullanımıyla FAP'lı hastalarda adenom sayısı ve büyüklüklerinde azalmayla birlikte KRK insidanslarında da azalma tespit edilmiştir. Yine kemoprevensiyon amacıyla bu ilaçların kullanımı sonucu kolonda polip gelişiminin ya da polipektomi sonrası rekürrens insidanslarında azalma olduğu gösterilmiştir (236, 253).

Yine son yıllarda yapılan birçok çalışmada KRK tanısı almış hastalarda artmış COX-2 ekspresyonu ile birlikte düzenli aspirin kullanımının düşük mortalite riski ile bağlantılı olduğu ortaya konulmuştur (258, 259).

NSAİİ kullanımına bağlı bu etkilerin PG metabolizması, inflamasyon ve karsinogenez üzerine etkili COX-2 enzim inhibisyonu yoluyla bağlantılı olduğu öne sürülmüştür (259, 260).

Son yıllarda COX-2'nin apoptozisin inhibisyonu ve anjiyogenezin stimülasyonuna neden olmasının yanısıra Bcl-2 gen ekspresyonunun indüksiyonu ile de bağlantılı olduğuna dair kanıtlar artmaktadır (261, 262).

Bu çalışmada tüm bu bilgiler ışığında KRK'in gelişim aşamasında artan COX-2 gen ekspresyonuna yönelik olarak COX-2 inhibitörleri kullanılarak bu ilaçların karsinogenez üzerine etkileri araştırıldı ve bu amaçla ratlarda 1,2 DMH ile indüklenmiş deneysel bir KRK modeli oluşturuldu.

Sıçanlarda 1,2 DMH ile oluşturulan deneysel kolon kanser modeli insan kolon kanserini histopatolojik ve moleküler açıdan çok iyi taklit ettiğinden, kolon kanseri için yapılan kemoprevensiyon çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir. 1,2 DMH'nin bir metaboliti olan metilazoksimetanol safra ya da kan yoluyla kolona taşınarak nihai karsinojenik metaboliti olan metildiazonyum iyonuna dönüşür ki bu metabolit kolon epitel hücrelerinde, biyomoleküllerin metilasyonu yoluyla oksidatif stresi ortaya çıkarır. Bu durum kolondaki inflamasyon ve tümör gelişimi için promutajenik olaylara yol açar (204).

Çalışmamızda 25 haftalık deney süresi sonunda deney gruplarındaki hayvanlarda, histopatolojik olarak, yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonundan, displastik değişiklikler ve invaziv adenokarsinoma kadar değişen derecelerde farklılaşmalar tespit ettik. DMH grubundaki hayvanların kolorektal dokularına ait kesitlerin histopatolojik olarak değerlendirilmesi sonucu bu gruptaki hayvanların %6,25'inde yoğun inflamasyon, %31,25'inde değişen derecelerde displazi (bu grupta çoğunlukla şiddetli displazi) ve %62,5'sinde ise adenokarsinom geliştiği izlendi. Bu bulgular Karaca ve ark. (214) ile Thulesen ve ark.'nın (225) yaptıkları çalışma sonuçlarıyla uyumluydu. Çalışmamızda henüz displazi gelişmemiş hayvanlarda izlediğimiz şiddetli inflamatuvar alanlarla, displastik değişimlerin yakınındaki alanlarda ve karsinom gelişen hayvanlarda da peritümöral alandaki yoğun inflamasyon önemli bir bulgu olarak dikkatimizi çekti ve tümör ilişkili inflamasyonun değerlendirilmesiyle bu yönde uygulanabilecek tedavi modalitelerinin belirlenmesi açısından dikkate değerdi. Verilen karsinogen ajanla öncelikle inflamasyonun indüklendiğini, inflamatuvar sitokinlerle beraber karsinogenezde etkili birçok moleküler yolağın aktive olarak displastik değişimin başladığını, sonrasında olayın invaziv karsinom gelişimi ve metastaz gibi birbirini izleyen çoklu bir süreç olarak devam ettiğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda son DMH enjeksiyonunu takiben kanser gelişimi için beklenen latent sürenin daha uzun tutulabilmesi mümkün olsaydı özellikle NSAİİ tedavisi uygulanmayan DMH grubunda henüz inflamasyon ve displazi düzeyindeki lezyonlar da, büyük oranda tümöral dönüşüm gösterebilecekti. Nitekim yapılan deneysel kolorektal kanser modeli içerikli çalışmalarda kanser gelişimi 10 haftadan 2 yıla kadar değişen latent sürelerde ve değişen oranlarda ortaya çıkabilmektedir (226).

Çalışmamızda DMH ile eş zamanlı uygulanmaya başlanan birer COX-2 inhibitörü olan Diklofenak ve Selekoksisib kullanımıyla bu gruplardaki hayvanların kolonlarına ait kesitlerin histopatolojik olarak değerlendirilmesi sonucu DMH grubuyla karşılaştırıldığında özellikle karsinom tanısı alan hayvanların sayısında belirgin azalma olduğunu gözlemledik. Buna paralel olarak karsinogenez sürecinde etkili birçok parametrenin de NSAİİ kullanımıyla birlikte belirgin olarak değiştiğini tespit ettik. Bu bulgular Selekoksisib ve Diklofenak'ı da içeren COX-2 inhibitörü

birçok NSAİİ'nin KRK'lerdeki etkilerine yönelik son yıllarda yapılan çalışmalarla da uyumluydu (18, 263-266).

Bu çalışmalardan Vaish ve ark.'nın (18) yaptığı, in vivo deneysel kolon kanseri modelinde DMH uygulanması ile farelerde kolon tümörünün başlatılmasında mevcut inflamatuvar yolların rolü ve birer COX-2 inhibitörü olan NSAİİ'lerden Sulindak ve Selekoksib'in pro ve antiinflamatuvar sitokinler, transkripsiyon faktörleri ve COX-2 ekspresyonu üzerindeki kemopreventif etkilerini araştırdıkları çalışmada; DMH uygulanan grupta multipl plak lezyon sayısı %100 iken beraberinde NSAİİ uygulanan gruplarda insidans %62,5 olmuş, anormal kript odaklarında da buna paralel olarak DMH uygulanan grupla karşılaştırıldığında Sulindak ve Selekoksib uygulanan gruplarda azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmanın devamında DMH grubunda, IL-1 β , IL-2 ve IFN- γ gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin artmış ekspresyonu kolonun inflamatuvar stres altında olduğu fikrini vermiştir. Bu proinflamatuvar sitokinler ise inflamasyonla beraber bir transkripsiyon faktörü olan NF κ B'nin aktifleşerek çekirdeğe transloke olmasına neden olarak beraberinde artmış COX-2 ekspresyonu ve karsinogenezde etkili birçok basamakla sinyal yolağının aktive olmasına neden olmaktadır sonucuna varmışlardır. Vaish ve ark.'nın bu çalışma ile DMH grubunda NF κ B ve COX-2'nin artmış ekspresyonlarını göstermeleri ve NSAİİ kullanımıyla proinflamatuvar sitokinler, NF κ B ve COX-2 ekspresyonlarında azalma, antiinflamatuvar sitokin ekspresyonlarında ise artış olduğunu ortaya koymaları, KRK ile inflamasyon ilişkisini ve bu süreçte NSAİİ'lerin bilinen anti inflamatuvar rollerine ek olarak NF κ B ve COX-2 yolakları üzerindeki etkilerini desteklemektedir (18).

NF κ B, doğal bağışıklık ve inflamasyonun regülasyonunda anahtar role sahip bir transkripsiyon faktörüdür. NF κ B sinyal yolağı hem prekanseröz kronik inflamasyon hem de kanser ilişkili inflamasyonda kritik role sahiptir. Fizyolojik şartlarda NF κ B'nin inaktif formu muhafaza edilirken kolorektal karsinomu da içeren birçok kanser türünde yapısal olarak aktiftir (114, 204).

Aktive NF κ B, artmış hücre proliferasyonu ve azalmış apoptozis, inflamatuvar hücrelerin artışı ve hücre içi adezyonlarda değişim, primer patojenik sinyallerin amplifikasyonu, tümör oluşumunun başlaması ya da ivme kazanması gibi birbirini izleyen çoklu hücresel fonksiyonları indükler (267). Bu durum kolon kanser

hücreleri de dahil birçok kanser tipinde gösterilmiş ve COX-2, NFκB yolağının hedef genlerinden biri olarak belirlenmiştir (204, 268-271).

Çalışmamızda kanser gelişim sürecinde, inflamasyondan başlamak üzere tümöral dönüşüm ve metastaza kadar birçok aşamada kritik rollere sahip olan NFκB'nin immünohistokimyasal olarak boyanma şiddeti ve yaygınlığını değerlendirdik. DMH grubunda kontrol grubuna oranla artmış boyanma şiddeti ve yaygınlığı tespit ettik. Bu bulgular diğer çalışma sonuçlarıyla uyumluydu (204, 269).

NSAİİ'lerle tedavi ettiğimiz gruplarda NFκB'nin immünohistokimyasal olarak boyanma şiddeti ve yaygınlığını DMH grubuyla karşılaştırdığımızda; DMH+Selekoksisib grubunda aktivitenin önemli oranda azaldığını, DMH+Diklofenak grubunda ise NFκB aktivitesinde azalma olmasına rağmen Selekoksisib grubundaki azalma kadar belirgin olmadığını gözlemledik. Bu sonuçlar, 2010 yılında Adelaide ve ark. (270) ile 2011 yılında Vaish ve ark.'nın (18) yaptığı Selekoksisib tedavisiyle azalan NFκB aktivitesi ile ilgili çalışma sonuçlarını destekler niteliktedir. Çalışmamızda NSAİİ'lardan olan COX-2 inhibitörlerinin kullanımıyla beraber azalan NFκB aktivitesi şu soruyu aklımıza getirdi. COX-2 inhibitörleri karsinogenez sürecindeki etkilerini sadece COX-2 enzim ihbibisyonu yoluyla mı göstermektedir yoksa başta NFκB yolağı olmak üzere COX-2 bağımsız mekanizmalar üzerinden de etkileri var mıdır? Elde ettiğimiz veriler ışığında biz, COX-2 inhibitörlerinin COX-2 enzim ihbibisyonu ile beraber COX-2'den bağımsız mekanizmalar üzerinden de etkileri olduğunu düşünmekteyiz. Öyle ki bu ilaçların NFκB aktivitesini azaltarak bu yolağın hedef genlerinden biri olan COX-2 düzeylerini de beraberinde azaltmak koşuluyla kendi etkilerini bu şekilde potansiyalize ettiği kanaatindeyiz. Nitekim Adelaide ve ark. (270) yaptıkları çalışmada uzun süre Selekoksisib kullanımıyla, İκK'ların baskılandığını göstermişlerdir. İκK'ların baskılanması NFκB'nin inhibitör proteini olan İnhibitör κB'nin fosforile olmasını engelleyerek sitoplazmadan çekirdeğe transloke olmasını engellemekte ve bu yolla NFκB'nin aktifleşmesini inhibe etmektedir.

Biz bu ilaçların COX-2 bağımsız etkilerini birer antiinflamatuvar ilaç olmaları da göz önünde bulundurulduğunda, NFκB yolağının aktive olmasında etkili başta IL-1β olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerin inhibisyonu ve antiinflamatuvar sitokinlerin artışı yoluyla da gösterdikleri düşüncesindeyiz. Vaish

ve ark.'nın (18) yaptıkları çalışma sonucu elde ettikleri veriler ve 90'lı yılların ikinci yarısından itibaren NSAİİ'lerin COX-2'den bağımsız etkilerinin de olduğuna dair kanıtların artmış olması, bizim bu düşüncemizi desteklemekle beraber bu ilaçların antiinflamatuvar ajanlar olarak kullanılmasının yanı sıra kemopreventif ajanlar olarak da kullanımını gündeme getirmiştir (272-274).

Diğer yandan IL-1 β artışının MEK/p44/42 ve p38 MAPK yolağını aktive ederek COX-2 gen ekspresyonlarında artışa neden olduğu tespit edilmiştir (275). Tümör ilişkili inflamasyon açısından değerlendirildiğinde bu durum önemli bir mekanizma olarak karşımıza çıkmaktadır. COX-2 inhibitörü kullanımıyla ortaya çıkan antiinflamatuvar etkinlikle proinflamatuvar bir sitokin olan IL-1 β düzeylerinin azalması sonucu sadece NF κ B yolağının değil, MEK/p44/42 ve p38 MAPK yolağının da aktivasyonunun engellenmesi sonucu COX-2 protein düzeylerinin düştüğü düşüncesindeyiz.

Çalışmamızda tümör gelişim sürecinde olmazsa olmaz basamaklardan biri olan anjiyogenezis ve anjiyogeneziste etkili parametreler de değerlendirildi. Anjiyogenezis KRK gelişimini ve metastazı teşvik eden kritik bir süreçtir (276). Tümör anjiyogenezisi; spesifik büyüme faktörleri, endotel hücre reseptörlerinin aktivasyonu ve endotel hücrelerinin çoğalma kapasitesi ile tüm bu aşamaları destekleyen hücre dışı matriks komponentlerini de içeren kompleks bir süreçtir. Bu süreçte etkili olan ajanlar tümör hücrelerinden, monosit, fibroblast gibi ortamdaki mevcut hücrelerden salınabildiği gibi kollajen matriksinin proteolitik yıkımı sonucu da açığa çıkabilirler (139).

Karsinogenez sürecinde COX-2 ve NF κ B ekspresyonları ve aktivitelerindeki artışla beraber anjiyogenezin indüklendiği bilinmektedir. Nitekim NF κ B'nin transkripsiyonel hedefleri arasında COX-2'nin yanı sıra VEGF, büyüme faktörleri, adezyon moleküllerinden ICAM, VCAM, birçok inflamatuvar sitokin ile MCP-1'i de içeren kemokinleri kodlayan genler bulunmaktadır (261, 262, 270, 277).

VEGF, iyi karakterize edilmiş bir anjiyogenik faktördür ve hem benign hem de malign olaylardaki yeni damar gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (278). Vasküler endotelial hücreler için güçlü spesifik bir mitojen olan VEGF, bu hücrelerin proliferasyonu ve migrasyonunu indükler, bu nedenle tümör metastazı ve karsinogenez esnasında da majör bir anjiyogenik faktör olarak kabul edilir (279, 280).

Bu çalışmada anjiyogeneze ait belirteçlerden biri olan VEGF düzeylerini değerlendirdik. DMH grubundaki VEGF düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmıştı ($p<0.0001$). Bu sonuç karsinogenez sürecinde indüklenen anjiyogeneze ait bir kanıt olması nedeniyle önemliydi ve Amano ve ark. (281) Jalba ve ark.(278) Kaur ve ark.(266) ile Sadık NA'nın (204) yaptığı çalışma sonuçları ile uyumluydu. Tedavi gruplarında DMH ile eşzamanlı kullanmaya başladığımız Diklofenak ve Selekoksisib ile VEGF düzeylerinde, DMH grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı oranda azalma olduğunu tespit ettik ($p<0.0001$ ve $p=0.001$, sırasıyla). Bu ilaçların kullanımıyla elde ettiğimiz VEGF düzeylerindeki düşüş, Kaur ve ark. (266) ile Ninomiya ve ark.'nın (282) yaptıkları çalışmalar ve diğer birçok çalışma sonucuyla uyumluydu.

Kolon kanserini de içeren birçok kanser türünde COX-2 yolağının önemli bir ürünü olan PGE₂'in VEGF ve anjiyogenezin önemli bir düzenleyicisi olduğu ve ekzojen PGE₂ stimülasyonun kolon kanser hücre hatlarında VEGF ekspresyonlarında artışa neden olduğu bildirilmiştir (283). Çalışmamızda NSAİİ'lar ile tedavi sonucu bu ilaçların COX-2 bağımlı mekanizma üzerinden PGE₂ düzeyleri ile birlikte VEGF düzeylerini azalttığı, COX-2 bağımsız mekanizma üzerinden ise NFκB'nin aktivasyonunu engelleyerek bu yolağın transkripsiyonel hedef genlerinden olan VEGF düzeylerini azalttığı, tüm bu ve benzer mekanizmalar üzerinden anjiyogenezisi inhibe ettiğini düşünmekteyiz.

Endotel hücreleri için migratuvar özelliğinin dışında VEGF; hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan MMP'ların salınımını da uyarır. Sonuç olarak anjiyogenezin indüksiyonu dışında invazyon ve metastazı kolaylaştırıcı etkiye de sahiptir (284). Kanser gelişiminde matriksin ve bazal membranın yıkımından sorumlu bu enzimlerin rolleri yaklaşık olarak 40 yıldır araştırılmaktadır. Bu enzimler; karsinogenez sürecinde anjiyogenezis ve apoptozisten, metastaz ve invazyona kadar birçok aşamada yer almaları nedeni ile kanser araştırmaları için hedef konuma gelmiş moleküllerdir (158, 159).

İnflamatuvar süreç boyunca immun hücrelerin ekstrasvazasyonu endotelial bazal membranın ve diğer matriks komponentlerinin proteolitik yıkımı ile sonuçlanır. Birçok kanser türünde MMP'ların, kanserin erken tanısı, progresyonunun takibi ve metastazın saptanmasında kullanılabileceği ifade edilmiştir (165). Tümör hücreleri

ve endotel hücreleri için en önemli bariyer olan bazal membranın içerdiği tip-IV kollejeni yıkan MMP-2 ve MMP-9, malignitenin derecesiyle korele olarak birçok metastatik tümörde yüksek olarak bulunmuştur (139). Birçok MMP, kolorektal kanserlerde potansiyel birer belirteç olarak çalışılmıştır (177).

Bu çalışmada MMP-2 ve MMP-9 ile MMP-2'in doku inhibitörü olan TIMP-2 düzeyleri değerlendirildi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, DMH grubunda MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinde anlamlı oranda bir artış olduğunu tespit ettik (her iki parametre için de $p < 0,0001$). MMP-2 ve MMP-9'a ait immünohistokimyasal boyanma özellikleri de ELISA sonuçlarımızı destekler nitelikteydi. Nitekim kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, DMH grubunda MMP-2 ve MMP-9'nin boyanma şiddeti ve yaygınlığının da artmış olduğunu gözlemledik. Elde ettiğimiz sonuçlar kolorektal kanserlerde MMP'ların artışının gösterildiği birçok çalışma sonucuyla uyumluydu (175, 285-287).

MMP'ların anjiyogenesis üzerine farklı mekanizmalar üzerinden pozitif ve negatif etkileri vardır. Anjiyogenesisin ilk basamağı olan bazal membran, mikrovasküler bazal membran ve intertisyuma ayrılması MMP enzimleri tarafından gerçekleştirilir (163).

MMP-9'ın, ESM'den VEGF mobilizasyonunu sağladığı (288), anjiyogenesisin regülasyonunda da ESM'in çözünmesi, yeni damar oluşumunun başlangıcı ve devam etmesinde önemli görevlerinin olduğu bilinmektedir (164).

MMP'ların anjiyogenesisin yanı sıra invazyon ve uzak metastaz süreçlerinde de rol aldığı bilinmektedir (289). Sundov ve ark. (290) kolon kanserli hastalar üzerinde yaptıkları çalışmalarında artmış MMP-2 ekspresyonunun vasküler invazyon ve yüksek tümör derecesi (high grade) gibi tümörün agresif davranışlarını gösteren histopatolojik parametrelerle belirgin ilişkisinin olduğunu göstermişlerdir. Biz de çalışmamızda histopatolojik olarak KKK tanısı alan sıçanlara ait plazma MMP-2 düzeyleri içinde, makroskobik olarak karaciğerlerinde tümöral oluşumlar gözlemlediğimiz (metastaz) sıçanların MMP-2 düzeylerinin ortalamanın çok üstünde olduğunu tespit ettik. Ancak histopatolojik olarak metastaz değerlendirmesi yapmadığımız için bu gözlemlerimizi istatistiksel olarak analiz etmedik. Hilska ve ark. (177) ise yaptıkları çalışmada çeşitli evredeki kolorektal kanserli hastalarda MMP-2'nin artmış ekspresyonunun hastalarda kısa yaşam süresiyle bağlantılı

olduğunu göstermişlerdir. Langenskiöld ve ark.'da (291) yükselmiş plazma MMP-2 düzeylerinin lenf nodu metastazı ile korelasyon gösterdiğini tespit etmişlerdir.

MMP-9' un artmış düzeyleri özellikle adenomdan karsinoma geçişte erken aşamadan itibaren tespit edilmiş ve primer olarak inflamatuvar hücreler tarafından üretildiği gösterilmiştir (292). Bu durum tümör ilişkili inflamasyon da göz önünde bulundurulduğunda önemli bir tespittir. Bizim çalışmamızda da DMH grubunda kontrollere göre MMP-9'un artmış olması inflamasyon-adenom-karsinom dönüşümünde MMP-9'un etkinliğinin değerlendirilmesi açısından dikkate değerdir. Ustymowicz, (293) KRK'li hastalar üzerinde yaptığı çalışmada, MMP-9 ekspresyonlarının belirgin olarak arttığını ve bu artışla tümör gelişimi, vasküler invazyon ve lenf nodu metastazı arasında güçlü bir korelasyon olduğunu tespit etmiştir. Cho ve ark.(294) ise kanser dokusunda artmış MMP-9 boyanmasının lenf nodu tutulumundan bağımsız olarak ta kötü prognozla ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Ünsal ve ark.'da (176) evre-2 ve evre-3 rektum kanserli hastalar üzerinde yaptıkları retrospektif çalışmada immünohistokimyasal olarak artan MMP-9 boyanma şiddeti ve yaygınlığının tümör evresi ve diferansiasyon özelliği ile bağlantılı olduğunu ortaya koymuşlardır. Nitekim genel sağkalım oranının, kötü diferansiye ve MMP-9 ekspresyonunun arttığı tümörlerde azaldığını göstermişlerdir. Yaptıkları çok değişkenli analizlere bağlı olarak artmış MMP-9 ekspresyonunun, azalmış genel sağkalımın bağımsız bir belirleyicisi olduğunu ifade etmişlerdir. Tutton ve ark. (295) ise tüm bunlara ek olarak kolorektal kanserin rezeksiyonundan sonra MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinde düşüş olduğunu tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda MMP-2'nin doku inhibitörü olan TIMP-2 düzeylerini de değerlendirdik. TIMP'lar bağ dokusu metabolizmasının düzenlenmesinde anahtar role sahiptirler. MMP'lara irreversibl ve non-kovalent bağlanarak latent enzim formunun aktivasyonu ve katalitik aktivitelerinin sürdürülmesinin inhibisyonu aşamasında görev yaparlar. Böylelikle TIMP'lar MMP enzim aktivitesini hem proenzim aktivasyonu aşamasında hem de substrat parçalanması esnasında etkileyerek MMP/TIMP dengesini regüle ederler (10).

Çalışmamızda Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DMH grubunda TIMP-2 düzeylerinin artmış olduğunu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gözlemledik. Sonuçlarımız Gershtein ve ark.'nın. (296) KRK'li hastalar üzerinde

yaptıkları değerlendirmelerde MMP-2, MMP-3 ve MMP-13 düzeylerindeki anlamlı artışa rağmen TIMP-2 düzeylerindeki artışın istatistiksel anlam ifade etmediğini tespit ettikleri çalışma sonuçlarıyla uyumluluk göstermekteydi. Roca ve ark. (297) ise kolorektal dokularda MMP'larla beraber TIMP-2'nin de artmış ekspresyonunu tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda çeşitli fizyopatolojik süreçlerde önem arzeden MMP/TIMP oranını da değerlendirdik ve bu amaçla MMP-2 ve spesifik inhibitörü TIMP-2'ye ait verilerimizi kullandık. DMH grubunda kontrollerle karşılaştırıldığında belirgin olarak artmış bir MMP-2/TIMP-2 oranıyla karşılaştık ($p=0.014$). Collins ve ark.'nın (298) KRK dokulardaki TIMP-2 ekspresyonu ile normal dokulardaki TIMP-2 ekspresyonunu karşılaştırdıkları ancak istatistiksel anlamlılık tespit edemedikleri, bununla beraber MMP-2/TIMP-2 oranında kanserli dokularda normal dokulara oranla anlamlı bir artış gözlemledikleri çalışma sonuçlarıyla uyumluydu. Pesta ve ark. da (299) yaptıkları çalışmada artan tümör evresine paralel olarak MMP-2/TIMP-2 oranlarının da anlamlı düzeyde arttığını tespit etmişlerdir.

TIMP'ların tümör invazyonu ve metastazın inhibisyonunda rol oynadığına dair giderek artan kanıtlar vardır ve bununla ilgili 90'lı yılların başından itibaren yapılan bazı in vitro çalışmalarda çeşitli tümör hücrelerinde artmış TIMP-2 ekspresyonunun tümör invazivliği ve metastazı kısıtladığının gösterilmesiyle beraber bu konuda yapılan çalışmalar hız kazanmıştır (300-302).

Wan ve ark. (303) kolorektal dokularda MMP-2, MMP-7 MT1-MMP, TIMP-2 ve TIMP-3 mRNA ekspresyonlarını değerlendirdikleri çalışmalarında, TIMP-2 ve TIMP-3 ekspresyonlarının indüklenmesi ya da MMP-2, MT1-MMP, MMP-7 mRNA ekspresyonlarının süprese edilmesiyle invazyon ve metastazın inhibe olabileceğini ifade etmişlerdir.

TIMP-2 hem MMP'ların bir inhibitörüdür hem de pro-MMP-2 aktivasyonunun hücrel mekanizması için gereklidir (304). TIMP'ların dual etkili oluşları insan kanserlerinde niçin yüksek değerlerinin değil de düşük değerlerinin kötü sağkalımın bir belirleyicisi olduğunu açıklamaktadır (305).

Çalışmamızda DMH grubuyla Diklofenak ve Selekoksisib tedavisi yapılan gruplardaki MMP-2, MMP-9 ve TIMP-2 seviyeleri karşılaştırıldığında her iki tedavi grubunda da MMP-2 ve MMP-9 seviyelerindeki belirgin azalmaya paralel olarak

immünohistokimyasal boyanma şiddeti ve yaygınlığında da azalma olduğunu gözlemledik. TIMP-2 seviyeleri ise Diklofenak ve Selekoksisib ile tedavi edilen gruplarda DMH grubuyla karşılaştırıldığında Diklofenak grubunda istatistiksel anlamlı bir artış yokken, Selekoksisib grubunda ise oldukça anlamlı bir artış gözlemledik ($p=0.015$). Melania ve ark. (306) yaptıkları çalışmada FAP'lı hastalarda Selekoksisib kullanımı ile TIMP-2'nin de aralarında olduğu dolaşımdaki 14 adet anjiyogenik biyobelirteci değerlendirmişlerdir. Selekoksisib kullanımı ile FAP'lı hastalarda TIMP-2 düzeylerinde belirgin artış olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sonuç bizim çalışma sonucumuzu destekler nitelikteydi. Baker ve ark. (307), Nyberg ve ark. (308) ile Stetler-Stevenson ve Seo (309) yaptıkları çalışma sonuçlarıyla TIMP-2'nin MMP'lerden bağımsız, diferansiasyon, apoptozis ve migrasyonu da içeren hücre kaderi üzerine etkili mekanizmalarda rol aldığını ortaya koymuşlardır. Bu mekanizmalardan biri, FGF-2 stimülasyonu ile ortaya çıkan endotelial hücre proliferasyonunu TIMP-2'nin inhibe etmesidir. TIMP-2'nin FGF-2 stimülasyonu ile aktive olan bu sinyal yolağı üzerindeki inhibitör etkisinin MMP inhibisyonundan bağımsız olup $\alpha\beta 1$ integrin aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir (304, 310).

Hoegy ve ark. (311) ise büyüme faktörlerinin stimülasyonunda etkili tirozin kinaz tipi reseptör (TKR) cevabıyla oluşan hücresel büyümenin regülasyonunda TIMP-2'nin mitojenik cevabı süprese ettiğini göstermişlerdir. Yapılan birçok çalışma ile TIMP-2'nin MMP inhibisyonundan bağımsız daha birçok mekanizma üzerinden antianjiyogenik etkilerinin olduğu ortaya konulmuştur (312, 313).

Bu çalışmalara örnek, Feldman ve ark.'nın (314) çalışmaları sonucu ortaya koydukları, TIMP-2'nin antianjiyogenik fonksiyonlarının mitojenle aktive protein kinaz fosfataz-1(MAPKP-1)'in artışı ile bağlantılı olduğudur. Tümörde TIMP-2'nin artmış ekspresyonu ile birlikte ortaya çıkan MAPKP-1'in artışı, p38 MAPK'ın defosforilasyonuna öncülük etmekte, bununla birlikte tümör büyümesi ve anjiyogenezis inhibe olmaktadır. Bu da TIMP'ların MMP'lerden bağımsız antianjiyogenik etkilerine verilebilecek güzel bir örnektir. Diğer yandan VEGF ve FGF-2 gibi proanjiyogenik büyüme faktörlerinin direkt MMP ekspresyonunu indükleyerek tümör oluşumu ve tümör mikroçevresindeki yeni kan damarlarının invazyonunu kolaylaştırdığı bilinmektedir (284, 315).

Büyüme faktörlerine ait sinyal yollarıyla integrinler arasındaki etkileşimin koordinasyonu anjiyogenezisin regülasyonunda önemlidir. Nitekim TIMP-2'nin, $\alpha 3\beta 1$ integrinin aracılık ettiği bu yollar üzerindeki inhibitör etkisi sonucu da antianjiyogenik etkisinin ortaya çıktığı gösterilmiştir (316).

Son yıllarda yapılan birçok çalışmayla TIMP-2 ekspresyonunun baskılanmasının belirgin epigenetik mekanizmalarla düzenlendiği ortaya koyulmuştur (317-320).

Bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar ve yukarıda bahsedilen birçok çalışma sonucu da göstermektedir ki tümöral gelişim sürecinde MMP'lar ve onların spesifik inhibitörleri olan TIMP'lar kritik öneme sahiptir. Tüm bu veriler ışığında biz MMP'ların KRK gelişim sürecinde anjiyogenezis aşamasından itibaren invazyon ve metastazı da içeren birçok süreçte efektif görev yapan ve süreçlerin her birini tetikleyen moleküller olduğu düşüncesindeyiz. TIMP-2'nin ise tümöral gelişim sürecinde MMP'lar kadar belirgin artış göstermemesini ise şu şekilde açıklayabiliriz:

TIMP-2, MT1-MMP yoluyla MMP-2'nin pro-enzim formunun aktivasyonu, sonrasında da aktif MMP-2'nin katalitik aktivitesinin inhibisyonu aşamasında görev yapmaktadır. Sahip olduğu bu dual etkiden dolayı TIMP-2 düzeyleri kanserli dokularda MMP-2 ile paralel bir artış seyri gösterememiştir. Bu nedenle MMP-2/TIMP-2 oranı önem arz etmektedir. Bu oranın belli bir eşik değeri aşmasıyla birlikte TIMP-2 düzeylerinin azalmaya başladığı ve üzerindeki inhibitör etki ortadan kalkan MMP-2'nin de aşırı dercede arttığı düşüncesindeyiz. MMP-2/TIMP-2 oranındaki artışla birlikte, yapılan diğer çalışmalarla paralel olarak tümör agresifliğinin arttığı düşüncesindeyiz.

Yukarıda bahsettiğimiz birçok çalışmayla ortaya koyulmuş olan TIMP-2'nin MMP-2'den bağımsız çoklu potansiyel etkilere sahip oluşunun da tümöral dokularda anlamlı bir artış gösterememesinin bir diğer sebebi olabileceği düşüncesindeyiz. Diğer yandan TIMP-2'nin kanserli dokularda epigenetik mekanizmalarla düzenlenerek, tümör hücre invazyonunu inhibe edici özelliğinin kısıtlanmasının da tümör hücrelerinin sahip olduğu özel yeteneklerden biri olduğu ve genetik regülasyon yollarıyla da TIMP-2 düzeylerinin kanserli dokularda kontrol altına alındığı kanaatindeyiz.

Çalışmamızda DMH ile birlikte Diklofenak ve Selekoksib gibi selektif COX-2 inhibitörü NSAİİ kullanımıyla, DMH grubuyla karşılaştırıldığında MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinde belirgin azalma olmasına karşın TIMP-2 düzeylerinde özellikle Selekoksib grubunda anlamlı artış tespit etmemiz bu ilaçların karsinogenez sürecindeki etkinliklerinin anlaşılması açısından dikkat çekicidir. Kullandığımız NSAİİ'lerin MMP'ları azaltmak, TIMP-2 düzeylerini de arttırmak yoluyla da kanser gelişiminin inhibisyonuna katkıda bulunduğunu tespit ettik. Bu etkilerini hem COX-2'yi bağımlı hem de COX-2'den bağımsız mekanizmalar üzerinden gösterdiğini düşünmekteyiz.

Son zamanlarda NFκB'nin bazı hücrelerde hızlı bir şekilde MT1-MMP ekspresyonuna neden olduğu tespit edilmiştir (321). Sina ve ark. (322) yaptıkları çalışmada COX-2'nin indüksiyonuyla ilişkili MT1-MMP aracılı hücre içi sinyalleri içeren, IκK/NF-κB bağımlı bir yolağın varlığını ifade etmişler ve Pro MMP-2 aktivasyonundaki rolü bilinen MT1-MMP'nin katalitik etkilerinin dışında da farklı mekanizmalar üzerinden etkili olduğunu belirtmişlerdir. Bu bilgilerle bağlantılı olarak daha önce de vurguladığımız gibi Selekoksib kullanımıyla IκK'lar baskılanarak NFκB'nin inhibitör proteini olan IκB'nin fosforile olması engellenmekte böylelikle NFκB'nin sitoplazmadan çekirdeğe transloke olması ve bu yolla aktifleşmesi inhibe olmaktadır (270). Biz de Selekoksib kullanımıyla hem COX-2 hem de NFκB yolağının inhibe olduğunu bununla bağlantılı olarak ta MT1-MMP'larla, aktivasyonunda görev aldıkları MMP'lar ve COX-2 ekspresyonlarının azalarak anjiyogenezis, invazyon, metastaz gibi süreçlerde tümör gelişiminin süprese edildiği düşüncesindeyiz. Bir diğer düşüncemiz de yine önceden açıkladığımız birçok mekanizmaya (NFκB yolağı, COX-2/ PGE₂ yolağı vs.) bağlı olarak bu ilaçların VEGF düzeylerini azalttığı, VEGF'in MMP ekspresyonlarını indüklediği (149, 284) bilgisinden yola çıkarak bu azalmanın MMP seviyelerindeki düşüşe katkıda bulunduğudır. Ayrıca COX-2 inhibitörü kullanımıyla tespit ettiğimiz artan TIMP düzeylerinin, inhibisyon yoluyla da MMP düzeylerinde azalmaya neden olduğudur. Öte yandan karsinogenez sürecinde erken aşamada inflamasyonla birlikte inflamatuvar hücrelerden MMP'ların salınımı indüklenmektedir. Bu süreçte kullandığımız NSAİİ'lerin antiinflamatuvar etki göstererek te MMP üretimini azalttığı kanaatindeyiz. Bu bahsettiğimiz mekanizmalar görüldüğü gibi birbirleriyle

bağlantılı çoklu potansiyel etkilerin görüldüğü kompleks bir döngü olarak karşımıza çıkmakta ve süreç daha da karmaşık bir hal almaktadır.

Çalışmamızda anjiyogenezis, tümör invazyonu ve metastaz gelişimi için kritik öneme sahip adezyon moleküllerinden ICAM-1 düzeyleri de değerlendirildi. ICAM-1'in ekstraselüler kısmının proteolitik ayrılması sonucu solubl formu (sICAM-1) ortaya çıkar. Bu formun plazma düzeyleri, patolojik durumlarda inflamasyonun şiddeti ile paralellik gösterir. Birçok enfeksiyöz, inflamatuvar ve neoplastik hastalıkta serum ICAM-1 düzeyleri artmıştır (323).

Çalışmamızda DMH grubundaki ICAM-1 düzeylerini kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda belirgin bir artış olduğunu gözlemledik ($p=0,01$). Bu bulgular kolorektal kanserlerde adezyon moleküllerinin arttığını gösteren önceki çalışma sonuçlarıyla uyumlu ve onları teyit eder nitelikteydi (324-327).

Chen ve ark. (328) rektum adenokarsinomlu hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada bu hastaların vasküler endotelyal hücrelerinde NF κ B ve ICAM-1 ekspresyonlarında belirgin artış tespit etmişler, bunu ICAM-1'in promotor bölgeleri üzerinde bulunan ve NF κ B'nin bağlandığı bir etkileşim dizisinin varlığıyla açıklamışlardır. Nitekim bizim çalışmamızda da DMH grubunda immuno histokimyasal NF κ B ekspresyonlarındaki artış, tıpkı plazma VEGF düzeylerindeki artışta olduğu gibi plazma ICAM-1 düzeylerindeki artış ile de paralellik göstermektedir ve ICAM'ı kodlayan genlerin VEGF'i kodlayan genler gibi NF κ B'nin transkripsiyonel hedefleri arasında olduğunu destekler niteliktedir. Normal şartlarda insan epitelyum hücreleri ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonlarından yoksundur, fakat IL-1 β , IL-6, TNF α gibi proinflamatuvar sitokin cevabıyla beraber ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonlarının indüklendiği rapor edilmiştir (270, 329, 330).

Bu durum bizim de bu çalışmada üzerinde durduğumuz tümör ilişkili inflamasyonun değerlendirilmesi açısından önem arz etmektedir. Tümöral dönüşümde, inflamasyon aşamasından invazyon ve metastaza kadar geçen süreçte inflamasyonla birlikte adezyon özelliklerinde değişimlerin başladığı ve buna ait biyobelirteçlerin de beraberinde yükselmeye başladığı düşüncesindeyiz. Çalışmamızda Diklofenak ve Selekoksib kullanımıyla beraber plazma ICAM-1 düzeylerinde belirgin azalma olduğunu tespit ettik ($p<0,05$ ve $p=0,001$ sırasıyla).

Elde ettiğimiz bu sonuçlar Gallicchio ve ark (331) ile Dianzani ve ark.'nın (257) yaptıkları çalışma sonuçlarıyla uyumluydu.

Gallicchio ve ark'nın (331) yaptıkları çalışmada hücre kültür yöntemiyle elde ettikleri kolon kanser hücre hatlarında (HT29) Selekoksisib kullanımıyla birlikte doz ve zaman bağımlı olarak ICAM ve VCAM ekspresyonlarının azaldığını göstermişlerdir. Selekoksisib'in p38 ve p55 MAPK'nın inhibisyonu ve bir proapoptotik yolağın aktivasyonu yoluyla COX-2'den bağımsız bir mekanizma üzerinden bu etkileri gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

K-ras onkogen mutasyonu KRKlerin yaklaşık %32'sinde gösterilmiştir. Bu onkogenlerdeki mutasyonla Ras sinyal yolağındaki efektör proteinlerde fosforilasyon yoluyla aktivasyon gerçekleşir (332, 333). Bu sinyal yolağındaki efektör proteinlerden biri olan MAPK ailesi; gen ekspresyonu, hücre bölünmesi, hücre canlılığı, apoptoz, metabolizma, farklılaşma ve motilite ile ilişkili süreçlerin kontrolündeki sinyal iletimi yollarını oluştururlar (334). p38/MAPK'nın Selekoksisib tarafından inhibe edildiğinin ve yine Selekoksisib kullanımıyla bir proapoptotik yolağın aktivasyonun gösterilmesi (331). Selekoksisib'in karsinogenez sürecinde farklı moleküler hedefler üzerinden gösterdiği etkiler açısından dikkate değerdir. K-Ras onkogen mutasyonu ile birlikte bu sinyal kaskadının aktive olması KRK'lerdeki COX-2 ekspresyonunda artışa neden olan farklı mekanizmalardan biri olarak kabul edilmiştir (113). Biz Selekoksisib'in bu yolak üzerindeki inhibitör etkisiyle Ras protein ailesinin aktivasyonu sonucu karsinogenez sürecinde ortaya çıkan artmış COX-2 ekspresyonları da dahil olmak üzere birçok moleküler mekanizmayı baskıladığını ve bunun Selekoksisib'in COX-2'den bağımsız etkilerine güzel bir örnek olduğu düşüncesindeyiz. Bunun yanı sıra Selekoksisibin farklı yollar tarafından indüklenen COX-2 ekspresyonunu doğrudan inhibe ederek de COX-2'den bağımsız etkilerini, direkt COX-2 bağımlı etkileriyle birleştirerek potansiyalize ettiği düşüncesindeyiz.

Bu çalışmada son olarak bir kemokin olan MCP-1 düzeyleri değerlendirildi. MCP-1'in tümörögenizde bir kemoatraktan ve anjiyogenik modülatör olarak önemli bir yerinin olduğu bilinmektedir. Kemokinler ve bunlara ait kemokin reseptörleri kolon kanserini de içeren birçok kanser türünde, kanserin başlaması ve ilerlemesinde önemli rol oynayan kronik inflamasyonun mediatörleri olarak tanımlanmışlardır (335, 336).

Kemokinlerin tümör ilişkili makrofajlar, nötrofiller, lenfositler, endotelial hücreler, fibroblastlar gibi tümör mikroçevresi içindeki hücrelerce üretildiği ortaya koyulmuştur (336).

Çalışmamızda DMH grubunda MCP-1 düzeylerinin kontrollerle karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı olamayan bir artış olduğunu gözlemledik (DMH grubundaki standart sapmanın fazla olması nedeniyle). Sonuçlarımız kolorektal tümör gelişimiyle artan MCP-1 ve/veya ona ait reseptörlerin artışının gösterildiği McClellan ve ark. (337) Hillenbrand ve ark. (338) Götlind ve ark. (339). ile Wolf ve ark.'nın (340) yaptıkları çalışma sonuçları ve daha birçok çalışma sonucuyla uyumluydu. Çalışmamızda DMH grubuyla karşılaştırıldığında DMH+Diklofenak ve DMH+Selekoksisib gruplarında NSAİİ tedavisiyle beraber MCP-1 düzeylerinin belirgin olarak azaldığını gözlemledik ($p=0,019$ ve $p=0,036$, sırasıyla). Elde ettiğimiz sonuçlar Kaur ve ark. (341) ile Muta ve ark.'nın (342). yaptıkları, tümöral dokularda COX-2 inhibitörü kullanımıyla azalan MCP-1 düzeylerinin gösterildiği çalışma sonuçlarıyla uyumluydu.

Bir tümör süpresör gen olan p53, MCP-1(CCL-2) gibi inflamatuvar genleri de düzenleyen bir proteindir (343, 344). Tang ve ark. (343) yaptıkları çalışmayla fare makrofajlarında ultraviole ile indüklenmiş p53 birikiminin lipopolisakkaritle indüklenen CCL-2 üretiminde belirgin azalmayla sonuçlandığını bildirmişlerdir. p53'ün NFκB aracılı inflamatuvar yanıtı baskıladığı da gösterilmiştir (343).

Ueda ve ark. (345) MCP-1'in transkripsiyonel regülasyonunda NFκB yolağının da etkili olduğunu vurgulamışlardır. Bilindiği gibi NFκB inflamasyon ilişkili kanserde bir tümör organizatörü gibi görev yapmaktadır (346). KRK'lerde MCP-1 (CCL-2) ekspresyonundaki artışla beraber intrakolonik masif makrofaj infiltrasyonu gerçekleşir ki bu da COX-2 artışıyla sonuçlanır (347). Malisetty ve ark. (348) kolon kanserinde COX-2 ve p53 ilişkisini değerlendirdikleri çalışmalarında kolon kanserinde yükselen COX-2 seviyelerine bağlı olarak artan prostanooidler yoluyla p53'ün inaktif formda sitoplazmada biriktiğini, Selekoksisib kullanımıyla doz ve zaman bağımlı olarak p53'ün nükleer lokalizasyonunun artarak bir transkripsiyon faktörü gibi aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Nitekim p53'ün bir transkripsiyon faktörü gibi fonksiyon görebilmesi için nükleer lokalizasyonu şarttır. Strese yanıt olarak posttranslasyonel modifikasyonla aktive olan p53 nükleusa lokalize olur.

Birçok sayıda efektör genin transkripsiyonel aktivitesiyle hücre döngüsünün durması ya da apoptozisi uyarır (349, 350).

Bunun yanı sıra birçok malign ve premalign doku sıklıkla sitoplazmada transkripsiyonel olarak inaktif p53 formunu barındırmaktadır (348).

Tüm incelediğimiz bu literatür bilgileri ve çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, kolorektal tümörlerde gelişimin başlangıcındaki inflamasyon aşamasından itibaren karsinom gelişene kadar geçen süreçteki MCP-1 düzeyleri ve kullandığımız COX-2 inhibitörleriyle beraber değişen MCP-1 düzeyleri üzerine etkili çoklu mekanizmaların şu şekilde gerçekleşebildiği düşüncesindeyiz;

➤ Tümör mikroçevresindeki tümör ilişkili inflamatuvar hücrelerden diğer kronik inflamasyon mediatörleri gibi MCP-1 salınımı da artmaktadır.

➤ MCP-1 artışıyla kolonda artan makrofaj infiltrasyonu ile beraber karsinogenez sürecindeki etkinliği bilinen COX-2 düzeyleri artar, ayrıca anjiyogenezis indüklenir.

➤ Yükselen COX-2 ile birlikte artan prostanoidler aracılığıyla birçok malign ve premalign dokuda sitoplazmik inaktif p53 formu artar.

➤ MCP-1'in transkripsiyonel regülasyonunda p53 ve NFκB etkilidir. Nükleer p53, MCP-1 düzeylerini düşürerek tümör gelişimini süprese edici rol oynarken, NFκB ise hedef genlerinden biri olan MCP-1 düzeylerini arttırarak tümör gelişimini indükler.

➤ COX-2 inhibitörlerinden özellikle Selekoksisib kullanımıyla beraber, PG üretimi azalarak sitoplazmada inaktif olarak kalan p53'ün nükleusa translokasyonu artmakta ve aktifleşmektedir. Nükleer aktif p53, regülasyonunda görev aldığı MCP-1 üzerine direkt etkiyle seviyelerini düşürürken diğer yandan bir tümör süpresör gen olarak ta NFκB aracılı sinyal yolağını antiinflamatuvar etkinlikle baskılamakta ve bu yolağın tümorogenezde etkili diğer hedef genlerine ait ürünlerle birlikte MCP-1 düzeylerini de düşürerek tümör gelişimini süprese edebilmektedir.

Sonuç olarak; bu çalışmada DMH ile indüklenmiş deneysel KKK modelinde tümöral gelişim sürecinde COX-2 inhibitörlerinin etkinliği ve bu süreçte başta anjiyogenezis olmak üzere hücre proliferasyonu, apoptozis ve metastaz gibi aşamalarda etkin rol oynayan VEGF, ICAM-1, MMP-2, MMP-9, TIMP-2, MCP-1 ve bir transkripsiyon faktörü olan NFκB'nin değişen düzeyleri ve ekspresyonları

değerlendirildi. Oluşturduğumuz KRK modelinde histopatolojik değerlendirme sonucu, DMH uygulanan grupta ulaştığımız yüksek tümör insidansı nedeniyle izlediğimiz protokolün oldukça başarılı olduğu, bu deneysel modelin insan KRK'lerini çok iyi taklit ettiği de göz önünde bulundurulduğunda bu tür çalışmalarda kullanılabilecek etkin bir model olduğu düşüncesindeyiz.

Kontrol grubuyla DMH uygulanan grup karşılaştırıldığında VEGF, ICAM-1, MMP-2, MMP-9'un dolaşımdaki artmış düzeyleriyle birlikte, NFκB, MMP-2 ve MMP-9'un immünohistokimyasal olarak artmış ekspresyonu, TIMP-2 düzeylerinde istatistiksel anlamlı olmayan değişim, MMP-2/TIMP-2 oranında ise belirgin artış tespit etmemiz ve bu parametrelerdeki değişimlerin literatür destekli olması, KRK'in erken aşamada tespiti açısından birer biyobelirteç olarak kullanılabileceklerini düşündürmektedir.

Tümör ilişkili inflamasyon son yıllarda yapılan çalışmalarla birlikte terapötik hedef konumuna gelmiş kanser işaretlerinden biridir. Çalışmamızda DMH uygulamasıyla histopatolojik olarak peritümoral alanlarda ve beraberinde tümör gelişmeyen dokularda da birçok alanda gözlemlediğimiz yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonlarının varlığı dikkate değerdi. Bu durumdan hareketle, çalışmamızda tümör gelişiminin başlangıcındaki inflamasyonla birlikte değerlendirdiğimiz parametrelerin tümünün düzeylerinde değişikliklerin başladığı, bu parametrelerdeki değişikliklerle birlikte inflamatuvar hücrelerle bu hücrelerden salınan birçok kemokin ve sitokin aracılığıyla kanser gelişim sürecinde ilk adımın atıldığı düşüncesindeyiz. Devamında yukarıda bahsettiğimiz ya da bahsedemediğimiz, keşfedilmiş ya da henüz keşfedilememiş birçok genetik mekanizma ve biyokimyasal sinyal yolağının birbiri içine geçmiş çoklu mekanizmalar olarak silsile halinde aktive olarak kanser gelişimi ve metastazla sonlandığı düşüncesindeyiz. Dolayısıyla, inflamasyon kanser ilişkisi göz önünde bulundurularak hem erken tanı hem de bu hedefe yönelik yeni tedavi şekillerinin geliştirilmesi açısından çok daha fazla çalışma yapılması gerektiği düşüncesindeyiz.

KRK gelişiminde etkili yollardan birisi olan COX-2 enzim yolağı çalışmamızın temel hedeflerinden biriydi. Bu amaçla birer COX-2 inhibitörü olan Diklofenak ve Selekoksib kullanımıyla birlikte DMH grubuyla karşılaştırıldığında DMH+Diklofenak ve DMH+Selekoksib gruplarında biyokimyasal ve immüno

histokimyasal olarak değerlendirdiğimiz parametrelere ait sonuçların, histopatolojik olarak tespit ettiğimiz tümör ve displastik lezyon insidanslarındaki belirgin azalmayı destekler nitelikte olduğunu gözlemledik. COX-2 inhibitörlerinin kullanımıyla birlikte oluşan bu etkilerin hem COX-2 bağımlı hem de COX-2 bağımsız mekanizmalar üzerinden ortaya çıktığını düşünmekteyiz. Son yıllarda KRK'lerde COX-2 inhibitörlerinin kullanımıyla elde edilen olumlu sonuçlara ait birçok çalışma verisi mevcuttur ve her geçen gün bu çalışmalara yenileri eklenmektedir. KRK'lerin gelişim sürecindeki karmaşık ve çoklu mekanizmalar COX-2 inhibitörleriyle tedavi esnasında da bu karmaşıklığını muhafaza etmektedir. Nitekim bu ilaçlarla tedavi esnasında da yukarıda bahsettiğimiz birçok moleküler yolak olaya dahil olmaktadır. Bu oklu potansiyel mekanizmaları içeren kompleks yapı göz önünde bulundurulduğunda gerek COX-2 inhibitörlerinin KRK'lerde kullanımının yeni bir boyut kazanması, gerekse farklı moleküler hedeflere ait mevcut bilgilerimizin zenginleşerek bu hedeflere yönelik yeni tedavi modalitelerinin geliştirilebilmesi için yapılacak çalışmaların hız kazanmasıyla, kanserden ölümlerin önemli bir sebebi haline gelmiş olan KRK'lerin tedavisinde umut verici yeni gelişmelerin olabileceği kanaatindeyiz.

5. KAYNAKLAR

1. Jemal A, Siegel R, Ward E. Cancer statistics, 2006. CA Cancer J Clin 2006; 56: 106-130.
2. Ay ME, Terzioglu O, Terzi C, Ay Ö. Kolorektal Kanserlerde, p21, p27, p57 Siklin Bagımlı Kinaz inhibitör Geni (cdk) Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi. Akademik Gastroenteroloji Dergisi, 2006; 5: 20-25.
3. Alemdaroglu K, Akçal T, Bugra D, Kolon Rektum ve Anal Bölge Hastalıkları. Türk Kolon ve Rektum Cerrahisi Dernegi Dergisi, 2003.
4. Shıımızu K, Oku N. Cancar Antiangiogenik terapy. Biol. Pharm. Bull 2004; 27: 599-605.
5. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. Nat Rev Cancer 2002; 2: 563-572.
6. Bosman F, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. J Pathology 2003; 200: 423-428.
7. Zigrino P, Löffek S, Mauch C. Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion. Biochime, 2005; 87: 321-328.
8. Çağlar M, Kansu E. Kemokinler, kemokin reseptörleri ve inflamasyon. Ankem Derg 2004; 18: 164-168.
9. Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. Cancer Metastasis Rev 2006; 25: 9-34.
10. Öncel M. Matrix Metalloproteinases and Cancer. Eur J Basic Med Sci 2012; 2: 91-100.
11. Apakkan AS, Bayındır O, Özmen D, Metalloproteinazlar, inhibitörleri ve ilişkili Fizyolojik ve Patolojik Durumlar. Türkiye Klin Tıp Bilimleri 2001; 21: 332-342.
12. Reel B. Matriks Metalloproteinaz Enzimleri ve Ateroskleroz Türkiye Klin Tıp Bilimleri 2006; 26: 527-537.

13. Ferreras M, Felbor U, Lenhard T, Olsen BR. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Letter* 2000; 486: 247-251.
14. Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* 2004; 6: 203–208.
15. Orłowski RZ, Baldwin AS JR. NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med* 2002; 8: 385–389.
16. Novick AC, Campbell SC: Renal tumors, in Walsh PC, Retik AB: *Campbell's Urology* 8th ed. 2002; 2672-2731.
17. Hemmerlein B, Scherbening J, Kugler A. Expression of VCAM-1, ICAM-1, E and P- Selectine and tumor-associated macrophages in renal cell carcinoma: *Histopathology*; 2000; 37: 78-83.
18. Vaish V, Sanyal SN. Chemopreventive effects of NSAIDs on cytokines and transcription factors during the early stages of colorectal cancer *Pharmacological reports* 2011; 63 1210-1221.
19. Cheadle EJ, Riyad K, Subar D. Eotaxin-2 and colorectal cancer: A potential target for immune therapy. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5719–5728.
20. Azumaya M, Kobayashi M, Ajioka Y, Honma T, Suzuki Y, Takeuchi M, et al. Size-dependent expression of COX-2 in sporadic colorectal adenomas relative to adenomas in patients with familial adenomatous polyposis, *Pathol Int* 2002; 52: 272-276.
21. Sheehan K, O'Connell F, O'Grady A, Conroy R, Leader M. Byrne M, et al. The relationship between COX-2 expression and characteristics of malignant transformation in human colorectal adenomas, *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2004; 16: 619-625.
22. Ota S, Bamba H, Kato A, Kawamoto C, Yoshida Y, Fujiwara K. Review article: COX-2, prostanoids and colon cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 2: 102-106.
23. Dube C, Rostom A, Lewin G. The Use of aspirin for primary prevention of colorectal cancer: a systematic review prepared for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2007; 146: 365-375.

24. Boyle P, Leon ME. Epidemiology of colorectal cancer. *Br Med Bull* 2002; 64: 1-25.
25. Köşüş A, Ateş M, Köşüş N. Alt gastrointestinal sistem belirtileri ile başvuran kadınlarda endoskopi bulguları. *Türkiye Klin. Tıp Bilimleri* 2008; 28: 635-639.
26. Hawk ET, Limburg PJ, Viner JL. Epidemiology and prevention of colorectal cancer. *Surg Clin N Am* 2002; 82: 905-941.
27. Edwards BK, Howe HL, Ries LAG. Annual report to the nation on the status of cancer, 1973–1999, featuring implications of age and aging on U.S. cancer burden. *Cancer* 2002; 94: 2766-2792.
28. Büyükdoğan M. Kolorektal kanserde genetik ve etiyolojik faktörler. *Selçuk Tıp Derg* 2009; 25: 171-180.
29. Strate L, Syngal S. Hereditary colon cancer syndromes, *Cancer Cause and Control*. 2005; 16: 201-213.
30. Belluco C, Esposito G, Bertorelle R, Alaggio R, Giacomelli L, Bianchi LC, et al. Fas ligand is up-regulated during the colorectal Adenoma-carcinoma sequence. *EJSO* 2002; 28: 120-125.
31. Eva AL, Wielders HH, Isik G, Hein R. Functional Analysis in Mouse Embryonic Stem Cells Reveals Wild-Type Activity for Three Msh6 Variants Found in Suspected Lynch Syndrome Patients. *PLoS One* 2013; 8: 747-766.
32. Joseph MP, Sheray NC, Melyssa A, Rondell PG, Nadia PW, Bharati B, et al. Lynch syndrome in a predominantly Afrocentric population: a clinicopathological and genetic study. *Can J Surg* 2012; 55: 294–300.
33. Stojcev Z, Borun P, Hermann J, Krokowicz P, Cichy W, Kubaszewski L, et al. Hamartomatous polyposis syndromes. *Hered Cancer Clin Pract* 2013; 11: 4.
34. Mary BT, Alfred IN, Roberd MB. Risk Factors for Advanced Colorectal Adenomas: A Pooled Analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 622-629.
35. Cross AJ, Ferrucci LM, Risch A. A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer Res* 2010; 70: 2406.

36. Dai Z, Xu YC, Niu L. Obesity and colorectal cancer risk: a meta-analysis of cohort studies. *World J Gastroenterol* 2007 21; 13: 4199-4206.
37. Shimizu N, Nagata C, Shimizu H. Height, weight, and alcohol consumption in relation to the risk of colorectal cancer in Japan: a prospective study. *Br J Cancer* 2003; 88: 1038.
38. Cole BF, Baron JA, Sandler RS, Haile RW, Ahnen DJ, Bresalier RS, et al. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial. *JAMA* 2007; 297: 2351–2359.
39. Hamilton RS Aaltonen LA (eds). *Tumors of Colon and Rectum. Pathology and Genetics of Tumors of the Digestive System*, IARCPress Lyon, 2000: 101-314.
40. Cooper HS. Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology. Mills SE. *Intestinal Neoplasms*. Vol 2, 4 th ed: Lipincott Williams &Wilkins, 2004: 1543-1601.
41. Baxter NN, Tepper JE, Durham SB. Increased risk of rectal cancer after prostate radiation: a population-based study. *Gastroenterology* 2005; 128: 819.
42. Zhu QC, Gao RY, Wu W, Qin HL. Epithelial-mesenchymal Transition and Its Role in the Pathogenesis of Colorectal Cancer. . *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14: 2689-2698.
43. Theiss AL. Sphingosine-1-phosphate: Driver of NFκB and STAT3 persistent activation in chronic intestinal inflammation and colitis-associated cancer. *JAKSTAT*. 2013; 2: 241-250.
44. Pedro LP, Efrain BC, Isabel A. Prognostic significance of circumferential margin involvement in Rectal Adenocarcinoma Treated With preoperative Chemoradio Therapy and Low Anterior Resection. *J Surgical Oncology* 2005; 90: 20-25.
45. Jass JR. Diagnostic Histopathology of Tumours. In Fletcher CDM, Livingstone C. *Tumours of the Small and Large Intestines (Including the Anal region)*. Vol 1, second ed: 2000: 369-409.
46. Elkablawy AM, Maxwell P, Williamson K, Anderson N, Hamilton PW. Apoptosis and cell-cycle regulatory proteins in colorectal carcinoma: 56 Relationship to tumour stage and patient survival. *Journal of Pathology* 2001; 194: 436-443.

47. Buğra D. Genel Konular. Kolon Rektum ve Anal Bölge Hastalıkları. Alemdaroğlu K, Akçal T, Buğra D. 2. Baskı: 17-20, İstanbul, 2004.
48. Romolo JL. Embryology and anatomy of the colon. Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 1996; 4: 3-16.
49. Noory N, Abbaszadeh E. Cecal dilatation and perforation after cesarean section. Int J Gynecol Obstet 2003; 81: 47-48.
50. Keith L. Moore Arthur F. Dalley Pelvis ve Perineum, Klinik Yönelik Anatomi, Nobel Kitabevi 4.Baskı, 2007; 385-388.
51. José MNJ, Angelita HG. Anatomy and Embryology of the Colon, Rectum, and Anus. Bruce G. Wolff, James W. Fleshman, David E. Beck, John H. Pemberton, Steven D. Wexner(editors). The ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery. Springer Science+Business Media, LLC 2007: 1-22.
52. Schwartz's principles of surgery 8. Baskı 2009 Kell M.Bullard and David A. Rothenberg 28: 1097-1098.
53. Menekşe E. Deneysel kolit modeli üzerine 3-amino benzamid'in kolon patlama basıncı üzerine etkisi. Uzmanlık Tezi. Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Genel Cerrahi Kliniği, Ankara 2007.
54. Crawford JM, Kumar V. Robbins Temel Patoloji. Çevikbaş U. Ağız Boşluğu ve Gastrointestinal Sistem. 7. ed, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2003: 563-590.
55. Harpaz N, Saxena R. Modern Surgical Pathology. Weidner N, Cote RJ, Suster S, Weiss LM. Gastrointestinal Tract, Large Intestine. Vol 1, 1 st ed: Saunders, 2003: 749-852.
56. Küpelioğlu A. Kolorektal kanserde histopatoloji. Türkiye klinikleri cerrahi kolorektal Kanser Özel Sayısı-1 2004; Cilt 9: 25-27.
57. Voloshanenko O, Erdmann G, Dubash TD, Augustin I, Metzger M, Moffa G, et al. Wnt secretion is required to maintain high levels of Wnt activity in colon cancer cells. . Nat Commun. 2013; 4: 2610.
58. Dan A. Dixon, Fernando F. Blanco, Annalisa Bruno, and Paola Patrignani Chapter 2: Mechanistic Aspects of COX-2 Expression in Colorectal Neoplasia. Recent Results Cancer Res. 2013; 191: 7-37.

59. Santaolalla R, Daniel AS, Jose RR, Julie MD, Cristhine P, Cecilia L, et al. TLR4 Activates the β -catenin Pathway to cause intestinal neoplasia. PLoS One 2013; 8(5): e63298.
60. Elliott KL, Catimel B, Church NL, Coates JL, Burgess AW, Layton MJ, Faux MC. Immunopurification of adenomatous polyposis coli (APC) proteins. BMC Res Notes. 2013; 6: 429.
61. WNT/Beta-Katenin Sinyal Yolunun Sitoplazmik Biyomolekülleri. Hanife Güler Dönmez, Şayeste Demirezen, Mehmet Sinan Beksaç DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi Cilt 2011; 5: 189 – 199.
62. Thomas K. Molecular pathology and morphogenesis of colorectal cancer. Türk Patoloji Derneği Mezuniyet Sonrası Eğitim Toplantısı. İstanbul: Gastrointestinal Sistem Patolojisi Günleri, 2005: 38- 46.
63. Zeller J, Turbiak AJ, Powelson IA, Lee S, Sun D, Showalter HD, Fearon ER. Investigation of 3-aryl-pyrimido[5,4-e][1,2,4] triazine-5,7-diones as small molecule antagonists of β -catenin/TCF transcription. Bioorg Med Chem Lett 2013; 23: 5814-5820.
64. Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1999; 39: 295-312.
65. Mannan A, Hahn-Strömberg V. K-ras mutations are correlated to lymph node metastasis and tumor stage, but not to the growth pattern of colon carcinoma. . APMIS. 2012; 120: 459-468.
66. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. The gastrointestinal tract. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7 th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders Company, 2005: 857- 869.
67. Yu W, Murray NR, Weemes C. Role of cyclooxygenase 2 in protein kinase C beta II mediated colon carcinogenesis. J Biol Chem 2003; 278: 11167-11174.
68. Samur M, Akbulut H. Kolorektal Karsinogenez ve Herediter Durumlar. Hematoloji-Onkoloji 2003; 5: 115-121.

69. Dobrucalı A. <http://www.drahmetdobrucali.com/hastaliklar/kalin-barsak-kanseri-kolon-kanseri-kolorektal-kanser> Erişim Tarihi: 10.10.2013.
70. Rosai J. Gastrointestinal tract. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, Volume 1. 9th ed. Mosby, 2004: 776-855.
71. Figen D. Kolorektal karsinomda sınıflama ve prognostik faktörler. Türk Patoloji Derneği Mezuniyet sonrası Eğitim Toplantısı. İstanbul: Gastrointestinal Sistem Patolojisi Günleri, 2005: 47- 56.
72. Fenoglio- Preiser CM, Noffsinger AE, Stemmermann GN, Lantz PE, Listrom MB, Rilke FO. Carcinomas and other epithelial and neuroendocrine tumors of the large intestine. Gastrointestinal pathology an atlas and text. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999: 909-1068.
73. Christine A. Iacobuzio-D, Elizabeth M. Epithelial neoplasms of the colorectum. In: Gastrointestinal and Liver Pathology. Churchill Livingstone Elsevier, 2005: 367-394.
74. Ketenci. A. Nonsteroid Antiinflamatuvar İlaçlar. Doktor dergisi. Fiziksel Tıp Rehabilitasyon. Şubat-Mart 2012: 86-88.
75. Süzer Ö. Nonsteroidal Antiinflamatuvar İlaçların Farmakolojisi. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloj Anabilim Dalı. www.onersuzer.com. 2009.
76. Ruperto N, Nikishina I, Pachanov ED. A randomized, double-blind clinical trial of two doses of meloxicam compared with naproxen in children with juvenile idiopathic arthritis: Short- and long-term efficacy and safety results. Arthritis Rheum 2005; 52: 563-572.
77. Savage MG, Henry MA. Preoperative nonsteroidal anti-inflammatory agents: Review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004; 98: 146-152.
78. Umut SG, Nesrin GK. Antiinflamatuvar Tedavide Yeni Bir Yaklaşım: Siklooksijenaz ve 5-Lipooksijenazın Dual İnhibitörleri. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi 2010; 30: 81-118.

79. Melli M. Non-Steroidal Antiinflamatuvar İlaçlar. Kayaalp. O (editör). Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 13.Baskı. Ankara. Pelikan yayıncılık, 2012: 869-902.
80. Dannhardt G, Kiefer W. Cyclooxygenase Inhibitors Current Status and Future Prospects. Eur J Med Chem 2001; 36: 109.
81. Smyth, EM, Burke, A, Fitzgerald, GA. Lipid-Derived Autacoids: Eicosanoids And Platelet-Activating Factor. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 2006.
82. Patrignani, P, Capone ML, Tacconelli, S. Clinical Pharmacology of Novel Selective COX-2 Inhibitors. Current Pharmaceutical Design, 2004; 10: 589-601.
83. Botting RM, Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927-2004) Journal of Therm Biol 2006; 31: 208-219.
84. Patrono C, Patrignani P, Garcia Rodriguez LA. Cyclooxygenase selective inhibition of prostanoid formation: transducing biochemical selectivity into clinical read-outs. J Clin Invest 2001; 108: 7-13.
85. Smith WL, Langenbach R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. J Clin Invest; 2001; 12: 1491-1495.
86. Fitzgerald GA, Patrono C. The Coxibs, selective inhibitors of Cyclooxygenase-2. New Engl J Med 2001; 345: 433-442.
87. Şenli MS. Kolorektal kanserlerde Bcl-2 ve COX-2 Ekspresyonlarının Klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi. Uzmanlık Tezi. Mersin: Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, 2006.
88. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression Communicated by John Vane, William Harvey Foundation, London, United Kingdom, 2002.
89. Grosser, T, Fries, S, FitzGerald, GA. Biological Basis for the Cardiovascular Consequences of COX-2 Inhibition: Therapeutic Challenges and Opportunities, The J Clinical Inv 2006; 116: 4.

90. Joanne VR, Ginter T, Michael P. COX-2 Selectivity and Antiinflammatory Processes. *Current Med Chemistry* 2000; 7: 1145-1161.
91. Luong C, Miller A, Barnett J. Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol* 1996; 3: 927-933.
92. Wendum D, Masliah J, Trugnan G, Flejou JF. Cyclooxygenase-2 and its role in colorectal cancer development. *Virchows Arch* 2004; 445: 327-333.
93. Sam TM, Gayathri DS, Prasanth BV. Efficacy and Safety of COX-2 Inhibitors in the Clinical Management of Arthritis: Mini Review *ISRN Pharmacol* 2011; 2011: 480291.
94. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenase-1 and -2. *Ann al Rev Pharmacol Toxicol*, 1998; 38: 97.
95. Gambaro G. Strategies to Safely Interfere with Prostanoid Activity while Avoiding Adverse Renal Effects: Could COX-2 and COX-LOX Dual Inhibition be the Answer? *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2002; 17: 1159.
96. Penning TD, Talley JJ, Bertenshaw SR. Synthesis and Biological Evaluation of the 1.5 Diarylpyrazole Class of Cyclooxygenase-2 Inhibitors: Identification of 4-[5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-1-yl]benzenesulfonamide(SC-58634, Celecoxib). *J Med Chem* 1997; 40: 1347–1365.
97. Joseph TD, Gary RM, Barbara GW, Gary CY, Robert L. Talbert *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach (Pharmacotherapy (Dipiro). 7th edition. New York: McGraw-Hill Medical, 2008.*
98. Celebrex (celecoxib) product monograph page 31 of 53 (2013) http://www.pfizer.ca/en/our_products/products/monograph/125.
99. Paulson SK, Hribar JD, Liu NW, Hajdu E, Bible RH Jr, Piergies A, Karim A. Metabolism and excretion of [(14)C]celecoxib in healthy male volunteers. *Drug Metab Dispos.* 2000; 28: 308-314.
100. Paulson SK, Zhang JY, Breau AP, Hribar JD, Liu NW, Jessen SM, et al Pharmacokinetics, tissue distribution, metabolism and excretion of celecoxib in rats. *Drug Metab Dispos* 2000; 28: 514-521.

101. Clemett D, Goa KL, Celecoxib: a review of its use in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and acute pain. *Drugs* 2000; 59: 957-980.
102. Tive L. Celecoxib clinical profile. *Rheumatology* 2000; 39: 21-28.
103. Bertagnolli MM, Eagle CJ, Zauber AG. Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. *N Engl J Med* 2006; 355: 873–884.
104. Pfizer (2006) Celebrex® Kapsül. Rx Media Pharma. Prospektüsü.
105. Özok ÖA, Abdominal Histerektomilerde Postoperatif İntravenöz Parasatemol İle Diklofenak Kullanımının İntravenöz Hasta Kontrollü Analjezide Morfin Tüketimi Ve Analjezi Kalitesi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. İstanbul: T.C. Sağlık Bakanlığı Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi I. Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği. 2008.
106. Fosbol EL, Folke F, Jacobsen S, Rasmussen JN, Sorensen R, Schramm TK, et al. Cause-Specific Cardiovascular Risk Associated With Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs Among Healthy Individuals. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2010; 3: 395–405.
107. Gupta RA, DuBois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nature Med* 2001; 1: 11-21.
108. Anderson WF, Umar A, Hawk ET. Cyclooxygenase inhibition in cancer prevention and treatment. *Expert Opin Pharmacother* 2003; 4: 2193-2204.
109. Arun B, Goss P. The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention. *Seminars in Oncology* 2004; 31: 2-29.
110. Denkert C, Winzer K J, Hauptmann S. Prognostic impact of Cyclooxygenase-2 in breast cancer. *Clinical Breast cancer* 2004; 4: 61-66.
111. Singh B, Lucci A. Role of Cyclooxygenase-2 in Breast Cancer. *Journal of Surgical Research* 2002; 108: 173-179.
112. Basu DG, Pathangey L, Tinder LM, LaGioia M, Gendler SJ, Pinku M. Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis in breast cancer cells in an in vivo model of spontaneous metastatic breast cancer. *Mol cancer Res* 2004; 11: 1-10.

113. Brown JR, DuBois RN. COX-2: a Molecular Target for Colorectal Cancer Prevention. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2840-2855.
114. Erreni M, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated Macrophages (TAM) and Inflammation in Colorectal Cancer. *Cancer Microenvironment* 2011; 4: 141–154.
115. Bright-Thomas RM, Hargest R. APC, beta-Catenin and hTCF-4: An unholy trinity in the genesis of colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 107-117.
116. Gridley G, McLaughlin JK, Ekblom A. Incidence of cancer among patients with rheumatoid arthritis. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 307-311.
117. Giardiello FM, Offerhaus GJA, DuBois RN. The role of nonsteroidal antiinflammatory drugs in colorectal cancer prevention. *Eur J Cancer* 1995; 31: 1071-1076.
118. Gwyn K, Sinicrope FA. Chemoprevention of Colorectal Cancer. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 13-21.
119. Oshima M, Murai N, Kargman S, Arguello M, Luk P, Kwong E, et al. Chemoprevention of intestinal polyposis in the Apcdelta716 mouse by rofecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res* 2001; 15: 61: 1733-1740.
120. Soumaoro LT, Uetake H, Higuchi T, Takagi Y, Enomoto M, Sugihara K. Cyclooxygenase-2 expression: a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8465-8471.
121. Koehne CH, Dubois RN. COX-2 inhibition and colorectal cancer. *Semin Oncol* 2004; 31: 12-21.
122. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Cell* 1995; 83, 493–501.
123. Sheng GG, Shao J, Sheng H. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of H-ras-transformed rat intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 1997; 113: 1883–1891.
124. Surette ME, Fonten AN, Bernatchez C. Perturbations in the control of cellular arachidonic acid levels block cell growth and induce apoptosis in HL-60 cells. *Carcinogenesis* 1999; 20: 757-763.

125. Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 2009; 30: 377-386.
126. Dore M. Cyclooxygenase-2 Expression in Animal Cancers. *The American College of Veterinary Pathologists* 2011. *Veterinary Pathology* 2011; 48: 254-265.
127. Ghosh N, Chaki R, Mandal V, Mandal SC. COX-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacol Rep* 2010; 62: 233-244.
128. Chen XL, Su BS, Sun RQ, Zhang J, Wang YL. Relationship between expression and distribution of cyclooxygenase-2 and bcl-2 in human gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1212-1228.
129. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998; 93: 705-716.
130. Rosen L. Antiangiogenic Strategies and Agents in Clinical Trials. *The Oncologist* 2000; 5: 20-27.
131. Wickström SA, Alitalo K, Keski J. An Endostatin-derived Peptide Interacts with Integrins and regulates Actin Cytoskeleton and Migration of Endothelial Cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 20178-20185.
132. Beck L, D'Amore PA. Vascular Development: cellular and molecular regulation. *The FASEB Journal* 1997; 11: 365-373.
133. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res* 2004; 117: 3-32.
134. Konukoğlu D, Turhan S. M. Molecular basis of angiogenesis mechanisms and tumor angiogenesis. *Cerrahpaşa J Med* 2005; 36: 42-48.
135. Kılıç T, Yıldırım Ö, Şahin S, Pamir MN. Glial tümörlerin anjiyogenezi, *Türk Nöroşirürji Dergisi* 2005; 15: 1-9.
136. Güran Ş, Fen T, Tunca Y. Anjiyogenezis ve Antianjiyogenik İlaçların Kansere Tedavisindeki Rolü. *T Klin Tıp Bilimleri* 2004; 24: 380-382.

137. Joan H. Schiller A, Mark A. Angiogenesis Inhibition in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. Socinski, Faculty and Disclosures CME Released: www.medspace.org. 09/26/2006 Medscape Oncology © 2006 Medscape, LLC, 2006.
138. Aydın R. Tümör Anjiyogenezi Derleme. Cerrahpaşa Öğrenci Bilimsel Dergisi 2008; 11: 1.
139. Güllü İH, Akalın İ. Metastaz biyolojisi. Üroonkoloji Dergisi 2005; 4; 16-19.
140. Özuysal S, Tümöral angiogenezis, Türk Patoloji Dergisi, 2001; 17: 90-93.
141. Ferrara N. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. Curr Opin Biotechnol 2000; 11: 617-624.
142. Suarez SC, Pieren ML, Cariolato SA, Hoffmann MA, Bogucki CM, Wood JK. A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS 2006; 17: 2067-2077.
143. Bren EC. VEGF in Biological Control. J Cell Biochem 2007; 102: 1358-67.
144. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME,. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. Nat Med 2001; 7: 186-191.
145. Kliche S, Waltenberger J. VEGF receptor signaling and endothelial function. IUBMB Life 2001; 52: 61-66.
146. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. Cellular Signalling 2007; 19: 2003–2012.
147. Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. Lancet Oncol 2001; 2: 149-156.
148. Harmey J. VEGF and cancer. Georgetown, Tex: Landes Bioscience/Eurekah.com New York, N.Y. Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2004.
149. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev 1997; 18: 4-25.

150. Sethi CS, Bailey TA, Luthert PJ, Chong NHV. Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders. *Br J Ophthalmol* 2000; 84: 654–64.
151. Öncel M. Matrix Metalloproteinases and Cancer. *Eur J Basic Med Sci* 2012; 2: 91-100.
152. Soydinç HO, Çamlıca H, Duranyılmaz D. Matriks metalloproteinazlar ve akciğer kanseri. *Türk Onkoloji Dergisi* 2006; 21: 53–56.
153. Krizkova S, Zitka O, Masarik M. Clinical importance of matrix metalloproteinases. *Bratisl Lek Lsty* 2011; 112: 435-40.
154. Ohbayashi H. Matrix metalloproteinases in lung diseases. *Curr Protein Pept Sci* 2002; 3: 409-421.
155. Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy. *J Nation Cancer Ins* 2001; 93: 178–184.
156. Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG. Matrix MetalloProteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of MetalloProteinases (TIMPs): positive and negative regulators intumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol* 2010; 20: 161–168.
157. Güzel S. Akut Miyokard İnfarktüsünde Serum Matriks Metalloproteinaz–9 Düzeyleri. Uzmanlık Tezi. İstanbul: Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya, 2008.
158. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *NIH Public Access* 2010; 141: 52–67.
159. Amelina C, Caruntu ID, Gîuşca SE, Balan RA. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J of Morphol Embryol* 2010; 51: 215–228.
160. Noe V, Fingleton B, Jacobs K. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* 2001; 114: 111–118.
161. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; 438: 820–827.
162. Alexander CM, Selvarajan S, Mudgett J, Werb Z. Stromelysin-1 regulates adipogenesis during mammary gland involution. *J. Cell Biol* 2001; 152: 693–670.

163. Jackson CJ, Schriber L. Angiogenesis in rheumatoid arthritis, (Ed). Hochberg MC, Silman AJ, Smolen AJ, Weinblatt M E, Rheumatology, 3. Baski, Mosby, 2003: 851-884.
164. Fraser A, Fearon U, Reece R, Emery P. Matrix metalloproteinase 9, apoptosis, and vascular morphology in early arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2001; 44: 2024-2028.
165. Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix Metalloproteinases As Novel Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Human Cancer. *J Clinical Oncology* 2009; 27: 5287-5297.
166. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827-883.
167. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes And Development* 2000; 14: 2123-2133.
168. Lijnen HR. Extracellular proteolysis in the development and progression of atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2002; 30; 163-167.
169. Viappiani S, Nicolescu AC, Holt A, Sawicki G, Crawford BD, León H, et al. Activation and modulation of 72kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione *Biochem Pharmacol.* 2009; 77: 826-834.
170. Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, et al. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 851-859.
171. Ekaterina M, Tuuttila A, Bergmann U, Tryggvason Karl. Structural insight into the complex formation of latent matrix metalloproteinase 2 with tissue inhibitor of metalloproteinase 2. *PNAS* 2002; 11: 7414–7419.
172. Yang SF, Hsieh YS, Lin CL, Hsu NY, Chiou HL, Chou FP, et al. Increased plasma levels of urokinase plasminogen activator and matrix metalloproteinase-9 in nonsmall cell lung cancer patients *Clin Chim Acta* 2005; 354: 91-99.
173. Laack E, Kohler A, Kugler C, Dierlamm T, Knuffmann C, Vohwinkel G, et al. Pretreatment serum levels of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2002; 13: 1550-1557.

174. Friedl P, Wolf K. Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Cancer Res* 2008; 68: 7247–7249.
175. ET Waas, RMLM Lomme, J DeGroot, Th Wobbes and T Hendriks. Tissue levels of active matrix metalloproteinase-2 and -9 in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2002; 86: 1876–1883.
176. Unsal D, Akyurek N, Uner A, Erpolat OP, Han U, Akmansu M, Menten BB, Dursun A. Gelatinase B expression as a prognostic factor in patients with stage II/III rectal carcinoma treated by postoperative adjuvant therapy. *Am J Clin Oncol* 2008; 31: 55-63.
177. Hilska M, Roberts PJ, Collan YU. Prognostic significance of matrix metalloproteinases-1, -2, -7 and -13 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2, -3 and -4 in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2007; 121: 714-723.
178. Çınar Z. İleri Evre Akciğer Kanseri Tedavi Öncesi Doku Ve Serum MMP-2, MMP-9 ve TIMP-1 Düzeylerinin Klinikopatolojik Faktörler İle İlişkisi Ve Prognostik Önemi. Uzmanlık Tezi. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, 2010.
179. Fernandez CA, Butterfield C, Jackson G. Structural and functional uncoupling of the enzymatic and angiogenic inhibitory activities of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2): Loop 6 is a novel angiogenesis inhibitor. *J Biol Chem* 2003; 278: 40989-40995.
180. Seo DW, Li H, Guedez L. TIMP -2 mediated inhibition of angiogenesis: An MMP independent mechanism. *Cell* 2003; 114: 171-180.
181. Önder MR, Barutcuoğlu B. Endotel 1. Basım, İstanbul, 2005; 68-71.
182. Öngen Z, Yılmaz Y. Aterosklerozun patogenezi. Koroner Kalp Hastalığı Primer ve Sekonder Korunma 2001. Kültürsay H (ed). İstanbul: Argos iletişim Hizmetleri, 2001: 31-66.
183. Framingham Heart Study. <http://www.nhlbi.nih.gov/about/framingham> National Heart, Lung, and Blood institut, update: 2002.

184. Savaş İ, Kaya A, Ural Gürkan Ö, Eriş B, Gönüllü U. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserli Hastalarda Serum İntraselüler Adezyon Molekülü (sICAM-1). *Tuberkuloz ve Toraks Dergisi* 2000; 48: 306-311.
185. Hossain M, Qadri SM, Su Y, Liu L ICAM-1-mediated leukocyte adhesion is critical for the activation of endothelial LSP1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013; 304: 895-904.
186. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokine Receptors *Pharmacol Rev* 2000; 52: 145-176.
187. Loetscher P, Moser B, Baggiolini M. Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Adv Immunol* 2000; 74: 127–180.
188. Çağlar M, Kansu E. Kemokinler, Kemokin Reseptörleri ve İnflamasyon. *ANKEM Derg* 2004; 18: 164-168.
189. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001; 2: 108-115.
190. Viedt C, Vogel J, Athanasiou T, Shen W, Orth SR, Kübler W, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 induces proliferation and interleukin-6 production in human smooth muscle cells by differential activation of nuclear factor- κ B and activator protein-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 914-920.
191. Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res* 2004; 95: 858-866.
192. Aukrust P, Ueland T, Müller F, Andreassen AK, Nordoy I, Aas H, Kjekshus J, Simonsen S, Froland SS, Gullestad L. Elevated circulating levels of C-C chemokines in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1998; 97: 1136-1143.
193. Conti P, Pang X, Boucher W, Letourneau, Reale M, Barbacane RC, et al. Impact of RANTES and MCP-1 chemokines on in vivo mast cell recruitment in rat skin injection model and their role in modifying the protein and their role in modifying the protein and mRNA levels for histidine decarboxylase. *Blood* 1997; 89: 4120-4127.
194. Tetè S, Nicoletti M, Saggini A, Maccauro G, Rosati M, Conti F, et al. Nutrition and cancer prevention. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2012; 25: 573-581.

- 195.** Greten FR, Karin M. The IKK/NF- κ B activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett* 2004; 206: 193-199.
- 196.** Andela VB, Schwarz EM, Puzas JE, O'Keefe RJ, Rosier RN. Tumor metastasis and the reciprocal regulation of prometastatic and antimetastatic factors by nuclear factor kappaB. *Cancer Res* 2000; 60: 6557-6662.
- 197.** Ghosh S, Karin M. Missingpieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* 2002; 109: 81–96.
- 198.** Biswas DK, Martin KJ, McAlister C. Apoptosis caused by chemotherapeutic inhibition of nuclear factor- κ B activation. *Cancer Res* 2003; 63: 290–295.
- 199.** Wang Y, Paszek P, Horton CA, Kell DB, White MRH, Broomhead DS, et al. Interactions among oscillatory pathways in NF-kappa B signaling: BMC Systems Biology 2011; 5: 23–28.
- 200.** Cyrne L, Marinho S, Antunes F. Modulation of gene expression by hydrogen peroxide. Redox Biology Group. <http://redox.fc.ul.pt/research.html>
- 201.** Goyama S, Mulloy JC. NF- κ B: a coordinator for epigenetic regulation by MLL. *Cancer Cell* 2013; 24: 401-402.
- 202.** Peri S, Devarajan K, Yang DH, Knudson AG, Balachandran S. Meta-Analysis Identifies NF- κ B as a Therapeutic Target in Renal Cancer. *PLoS One*. 2013 Oct 7; 8: 76746.
- 203.** Shao H, Yang B, Hu R, Wang Y. Matrine effectively inhibits the proliferation of breast cancer cells through a mechanism related to the NF- κ B signaling pathway. *Oncol Lett* 2013; 6: 517-520.
- 204.** Sadik NA. Chemopreventive efficacy of green tea drinking against 1,2-dimethyl hydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Cell biochemistry and function*. *Cell Biochem Funct* 2013 Volume 31, Issue 3, pages 196–207.
- 205.** Yamanaka N, Sasaki N, Tasaki A, Nakashima H, Kubo M, Morisaki T, et al. Nuclear factor-kappaB p55 is a prognostic indicator in gastric carcinoma. *Anticancer Res* 2004; 24: 1071-1075.

- 206.** Li ZM, Pu YW, Zhu BS. Blockade of NF- κ B nuclear translocation results in the inhibition of the invasiveness of human gastric cancer cells. *Oncol Lett* 2013; 6: 432-436.
- 207.** Arlt A, Vorndamm J, Muerkoster S, Yu H, Schmidt WE, Folsch UR, et al. Autocrine production of interleukin 1 β confers constitutive nuclear factor kappaB activity and chemoresistance in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Res* 2002; 62: 910-916.
- 208.** Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 2006 May 25; 441: 431-436.
- 209.** Karin M. NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets. *Mol Carcinog* 2006; 45: 355-361.
- 210.** Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS. NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors* 2007; 29: 19-35.
- 211.** Milligan SA, Nopajaroonsri C. Inhibition of NFkappa B with proteasome inhibitors enhances apoptosis in human lung adenocarcinoma cells in vitro. *Anticancer Res* 2001; 21: 39-44.
- 212.** Zeybek Ü. Deneysel Kanser Modelleri. Kalıtsal Hastalıklara Moleküler Tıp Açısından Bakış Sempozyumu 24-25 Eylül 2003: 283-310.
- 213.** Karaca Ö. Farelerde Deneysel Olarak Oluşturulan Kolon Kanseri Üzerine Endostatin'in Etkileri Doktora Tezi. Kayseri: Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı, 2008.
- 214.** Karaca Ö, Ertekin T, Canöz Ö, Hacıoğlu M, Ekin N, Elmalı F. Ülger H. 1,2-Dimetilhidrazin ile Balb/C Türü Farelerde Deneysel Kolon Kanserinindüklenmesi. *Türkiye Klin. Tıp Bilimleri* 2010; 30: 1-44.
- 215.** Heijstek O, Kranenburg IHM, Borel R. Mouse Models of Colorectal Cancer and Liver Metastases. *Dig Surg* 2005; 22: 16-25.
- 216.** Lorenz E, Stewart HL. Intestinal carcinoma and other lesion in mice following oral administration of 1,2,5,6-dibenzanthracene and 2-Omethylcholanthrene. *J Natl Cancer Inst*, 1941; 1: 17-40.

217. Walpole AL, Williams M, Roberts DC. The carcinogenic action of 4 aminodiphenyl and 3,2 dimethyl 4-aminodiphenyl. *Br J Ind Med* 1952; 9: 255-263.
218. Laquer GL, Mickelson O, Whiting MG. Carcinogenic properties of nuts from cycas circinalis indigenous to Guam. *J Natl Cancer Inst* 1963; 31: 919-923.
219. Harris CC, Autrup H, Stoner GD. Metabolism of dimethylnitrosamine and 1,2-Dimethylhydrazine in cultered human bronchi. *Cancer Research* 1977; 37: 2309-2311.
220. Li Wei, Chong-Bi Li. Effect Of Oral Lactococcus Lactis Containing Endostatin On 1,2 Dimetylhydrazine- induced Colon Tumor in Rats. *World Gastroenteral* 2005; 11: 7242-7247.
221. Choudhary G, Hansen H, Donkin S, Kirman C. Toxicological Profile Forhydrazines. *Eylül* 1997: 71-72.
222. Wu RY, Chiang H, Shao BJ. Effects of 2.45-GHz Microwave Radiation and Phorbol Ester1 2-0-Tetradecanoylphorbol-I 3-Acetateon Dimethylhydrazine-Induced Colon Cancer in Mice *Bioelectromagnetics* 1994: 15531-15538.
223. Jackson PE, Cooper DP, Connor PJ. The Relationship Between 1,2 Dimethylhydrazine Dose and the Induction of Colon Tumours: Tumor Development in Female SWR Mice Does Not Require a K-ras Mutational Event. *Carcinogenesis* 1999; 20: 509-513.
224. Karaca Ö, Ertekin T, Canöz Ö, Hacıoğulları M, Ekinçi N, Elmalı F, Ülger H. 1,2-Dimetilhidrazin ile Balb/C Türü Farelerde Deneysel Kolon Kanserinin İndüklenmesi. *Türkiye Klin Tıp Bilimleri* 2010; 30: 1-22.
225. Thulesen J, Hartmann B, Hare KJ, Kissow H, Orskov C, Holst JJ, et al. Glucagon-like peptide 2 (GLP-2) accelerates the growth of colonic neoplasms in mice. *Gut* 2004; 53: 1145-1150.
226. Morten Kobæk-Larsen, Inger T, Axel D, Claus F, Merel RH. Overview review of colorectal cancer and its metastases in rodent models: comparative aspects with those in humans. *Comparative Medicine*, 2000: 50.
227. Kaur SM. Nath SS. Evaluation of chemopreventive response of two cyclooxygenase-2 inhibitors, etoricoxib and diclofenac in rat colon cancer using FTIR and NMR spectroscopic techniques. *Nutr Hosp* 2010; 25: 577-585.

228. Brayton CF. Dimethyl sulfoxid (DMSO). Cornell Vet 1986; 76: 61-90.
229. Tsimoyiannis EC, Tsimoyiannis JC, Sarros CJ, Akalestos GC, Moutesidou KJ, Lekkas ET, Kotoulas OB. The rol of oxygen derived free radicals in peritoneal adhesion formation induced by ileal ischemia reperfusion. Acta Chir Scand 1989; 155: 171-174.
230. Moore RM, Bertone AL. Perioperative medical therapy for horses with inlestial ischemia. Compendium Continuing Education Article 1992; 14: 1514-1521.
231. Southwood LL Baxter GM, Hutchison JM, Shuster R. Survey of dipIomates of the american coolage of veterinary surgeons regarding postoperative intraabdominal adhesion formation in horses undergoing abdominal surgery. JAVMA 1997; 211: 1573-1576.
232. Kaur J, Sanyal SN. Association of P13-Kinase and Wnt signaling in non-steroidal anti-inflammatory drugs- induced apoptosis in experimental colon cancer. J Biomed Sci 2009; 1: 395-405.
233. Bozkurt M. Tip 2 Diyabetli Hastalarda İnsülin Direnci ve Beta Hücre Fonksiyonu ile Leptin, Grelin, Obestatin ve Resistin İlişkisi. Uzmanlık Tezi. Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 2009.
234. Karaca Ö. Farelerde Deneysel Olarak Oluşturulan Kolon Kanseri Üzerine Endostatin'in Etkileri. Doktora Tezi. Kayseri Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Anatomi Ana Bilim Dalı, 2008.
235. <http://www.dako.com/dist/index/knowledgecenter/kcpublications/kcpublicationsedu/immunohistochemicalstainingmethods.htm>) Erişim tarihi: 15.10. 2013.
236. Tetsuji Takayama, Hiroyuki Nagashima, Masahiro Maeda, et al. Randomized Double-Blind Trial of Sulindac and Etodolac to Eradicate Aberrant Crypt Foci and to Prevent Sporadic Colorectal Polyps Clin Cancer Res; 2011; 17: 3803-3811.
237. Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW. Colorectal cancer. Lancet 2005; 365: 153–165.
238. Hazewinkel Y, de Wijkerslooth TR, Stoop EM, Bossuyt PM, Biermann K, van de Vijver MJ, et al. Prevalence of serrated polyps and association with synchronous advanced neoplasia in screening colonoscopy. Endoscopy 2013 [Epub ahead of print].

239. Calvert PM, Frucht H. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med* 2002; 137: 603–612.
240. Greenhough A, Helena JM, Smartt AE, Moore HR, Roberts, Ann CW, Cet al. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 2009; 3: 377–386.
241. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 919–932.
242. Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev* 2007; 21: 2525–2538.
243. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of cancer. *Review Cell* 2000; 100: 57–70.
244. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation *Cell* 2011; 144: 646–674.
245. Talmadge JE, Donkor M, Scholar E. Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 373–400.
246. Wang D, Dubois RN, Richmond A. The role of chemokines in intestinal inflammation and cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9: 688–696.
247. Mantovani A, Garlanda C, Allavena P. Molecular pathways and targets in cancer-related inflammation. *Ann Med* 2010; 42: 161–170.
248. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357: 539–545.
249. Witz IP. The tumor microenvironment: the making of a paradigm. *Cancer Microenviron* 2010; 2: 9–17.
250. Reya T. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005; 434: 843–850.
251. Sinicrope FA. Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2004; 23: 63–75.
252. Peng CL, Yih-Jyh L, Chung-Ta L, Hsiao-Sheng L, Jenq-Chang L. Cyclooxygenase-2 expression in the tumor environment is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients. *Oncol Lett* 2013; 6: 733–739.

253. Jaudah Al-Maghrabi, Abdelbaset B, Eman E, Kari S, Abdulrahman S, Mohmmad Al-Q, Mahmoud Al-Ahwal. Cyclooxygenase-2 expression as a predictor of outcome in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2012; 18: 1793–1799.
254. Ioannis S, Tariq S, Marie-France P, Balaji K, Zaver MB. COX-2 in cancer: Gordian knot or Achilles heel? *Front Pharmacol* 2013; 4: 34.
255. Grzegorz S, Baldys-Waligórska A, Małgorzata T, Dariusz A, Alicja HD, Filip. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in pituitary tumours. *Med Sci Monit* 2012; 18: 252–259.
256. Bai J, Yahui L, Ping Z, Yingchao W, Guangyi W. COX-2 Expression and Tumor Angiogenesis in Thyroid Carcinoma Patients among Northeast Chinese Population-Result of a Single-Center Study. *Int J Med Sci* 2012; 9: 237–242.
257. Dianzani C, Brucato L, Gallicchio M, Rosa AC, Collino M, Fantozzi R. Celecoxib modulates adhesion of HT29 colon cancer cells to vascular endothelial cells by inhibiting ICAM-1 and VCAM-1 expression. *Br J Pharma* 2008; 153: 1153–1161.
258. Logan RF, Grainge MJ, Shepherd VC, Armitage NC, Muir KR. Aspirin and folic acid for the prevention of recurrent colorectal adenomas. *Gastroenterology* 2008; 134: 29-38.
259. Chan AT, Ogino S, Fuchs CS. Aspirin use and survival after diagnosis of colorectal cancer. *JAMA* 2009; 302: 649-658.
260. Yao M, Zhou W, Sangha S, Albert A, Chang AJ, Liu TC, Wolfe MM. Effects of nonselective cyclooxygenase inhibition with low-dose ibuprofen on tumor growth, angiogenesis, metastasis, and survival in a mouse model of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1618-1628.
261. Abbate A, Limana F, Capogrossi MC, Santini D, Biondi-Zoccai GG, Scarpa S, et al. Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) inhibition reduces apoptosis in acute myocardial infarction. *Apoptosis* 2006; 11: 1061-1063.
262. Sahin M, Sahin E, Gümüslü S. Cyclooxygenase-2 in cancer and angiogenesis. *Angiology* 2009; 60: 242-253.

263. Xiao H, Zhang Q, Lin Y, Reddy BS, Yang CS. Combination of atorvastatin and celecoxib synergistically induces cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Int J Cancer* 2008; 122, 2115–2124.
264. Vaish V, Tanwar L, Kaur J, Sanyal SN: Chemopreventive effects of non steroidal anti-inflammatory drugs in early neoplasm of experimental colorectal cancer: An apoptosome study. *J Gastrointest Canc* 2011; 42: 195–203.
265. Jasmeet KS, Sanyal N. Alterations in membrane fluidity and dynamics in experimental colon cancer and its chemoprevention by diclofenac. *Mol Cell Biochem* 2010; 341: 99–108.
266. Jasmeet KS, Sanyal N. Diclofenac, a selective COX-2 inhibitor, inhibits DMH-induced colon tumorigenesis through suppression of MCP-1, MIP-1 α and VEGF. *Molecular Carcinogenesis* 2011; 50: 707-718.
267. Ayesha Ahmed. (Review) Prognostic and Therapeutic Role of Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) in Breast Cancer. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 2010; 22: 3-11.
268. Lind DS, Hochwald SN, Malaty J, Rekkas S. Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery* 2001; 130, 363–369.
269. Hardwick JC, van den Brink GR, Offerhaus GJ, van Deventer SJ. NF-kappaB, p38 MAPK and JNK are highly expressed and active in the stroma of human colonic adenomatous polyps. *Oncogene* 2001; 20: 819–827.
270. Adelaide M. Carothers, Jennifer S. Davids, Beatrice C. Damas, and Monica M. Bertagnolli. Persistent Cox-2 inhibition downregulates NF- κ B resulting in chronic intestinal inflammation in the Min/+ mouse model of colon tumorigenesis. *Cancer Res* 2010; 70: 4433–4442.
271. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2: 301–310.
272. Chiu CH, McEntee MF, Whelan J. Sulindac causes rapid regression of preexisting tumors in Min/+ mice independent of prostaglandin biosynthesis. *Cancer Res* 1997; 57: 4267 – 4273.

273. Bak AW, McKnight W, Li P, Del Soldato P, Calignano A, Cirino G, Wallace JL. Cyclooxygenase-independent chemoprevention with an aspirin derivative in a rat model of colonic adenocarcinoma. *Life Sci* 1998; 62: 367 -373.
274. Piazza GA, Rahm AK, Finn TS, Fryer BH, Li H, Stoumen AL, et al. Apoptosis primarily accounts for the growth-inhibitory properties of sulindac metabolites and involves a mechanism that is independent of cyclooxygenase inhibition, cell cycle arrest, and p53 induction. *Cancer Res* 1997; 57: 2452 - 2459.
275. Fan XM, Wong BC, Lin MC, Cho CH, Wang WP, Kung HF, Lam SK. Interleukin-1beta induces cyclo-oxygenase-2 expression in gastric cancer cells by the p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1098-1104.
276. Yingmiao Liu, Mark DS, Anuradha B, Herbert P, Nan SW, Wanda H, et al. Correlation of angiogenic biomarker signatures with clinical outcomes in metastatic colorectal cancer patients receiving capecitabine, oxaliplatin, and bevacizumab. *Cancer Medicine* 2013; 2: 234–242.
277. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NFkappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18: 6853-6866.
278. Jalbă CS, Jalbă BA, Corina N, Zlatian O, Ioana M, Bârcă A, et al. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor-A in colorectal cancer. *Rom J Morphol Embryol* 2011, 52: 775–781.
279. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000; 60: 203–212.
280. Bastian Hoesel and Johannes A Schmid. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer* 2013; 12: 86.
281. Hideki A, Izumi H, Hirahito E, Hidero K, Shohei Y, Takayuki M, et al. Host prostaglandin E₂-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J Exp Med* 2003; 197: 221–232.
282. Itasu N, Noboru N, Katsunobu O, Hironori H, Hidehiro T, Hirohisa K, et al. Antitumor and anti-metastatic effects of cyclooxygenase-2inhibition by celecoxib on

- human colorectal carcinomaxenografts in nude mouse rectum. *Oncology Reports* 2012; 28: 777-784.
283. Luciana B. Gentile¹, Bruno Piva, Bruno LD. Hypertonic stress induces vegf production in human colon cancer cell line Caco-2: inhibitory role of autocrine PGE2. *PLoS One* 2011; 6: 25193.
 284. Heissig B, Hattori K, Friedrich M, Rafii S, Werb Z. Angiogenesis: vascular remodeling of the extracellular matrix involves metalloproteinases. *Current Opinion in Hematology* 2003; 10: 136–141.
 285. Honda T, Yamamoto I, Inagawa H. Angiogenesis-, metastasis- and signaling pathway-related factor dynamics in human colon cancer cells following interaction with monocytes. *Anticancer Res* 2013; 33: 2895-2900.
 286. Ding PR, Kong LH, Lin JZ, Pan ZZ. Expression of molecular markers detected by immunohistochemistry and risk of lymph node metastasis in stage T1 and T2 colorectal cancers. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi (Chinese journal of oncology)*. 2013; 35: 277-281.
 287. Claudia MG, Archana KY, Nina L, Alice M, Sofia D, Margareta MM. GM-CSF enhances tumor invasion by elevated MMP-2, -9, and -26 expression. *Cancer Med* 2013; 2: 117–129.
 288. Handsley MM, Edwards DR. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 2005; 115: 849-860.
 289. Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J Pharmacol* 2006; 533: 133-144.
 290. Sundov Z, Tomić S, Vilović K, Kunac N, Kalebić M, Bezić J. Immunohistochemically Detected High Expression of Matrix Metalloproteinase-2 as Predictor of Poor Prognosis in Duke's B Colon Cancer. *Croat Med J* 2008; 49: 636-642.
 291. Langenskiöld M, Holmdahl L, Falk P. Increased plasma MMP-2 protein expression in lymph node-positive patients with colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2005; 20: 245-252.

292. Zucker S, Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2004; 23: 101-117.
293. Guzińska-Ustymowicz K. MMP-9 and cathepsin B expression in tumor budding as an indicator of a more aggressive phenotype of colorectal cancer (CRC). *Anticancer Res* 2006; 26: 1589–1594.
294. Cho YB, Lee WY, Song SY. Matrix metalloproteinase-9 activity is associated with poor prognosis in T3-T4 node-negative colorectal cancer. *Hum Pathol* 2007; 38: 1603-1610.
295. Tutton MG, George ML, Eccles SA. Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumour expression in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2003; 107: 541-550.
296. Gershtein ES, Korotkova EA, Prorokov VV, Kushlinsky NE. Matrix metalloproteinases 2, 3, 13 and their type 2 tissue inhibitor in tumors and plasma of patients with colorectal cancer. *Bull Exp Biol Med.* 2008; 145: 362-366.
297. Roca F, Mauro LV, Morandi A, Bonadeo F, Vaccaro C, Quintana GO, et al. Prognostic value of E-cadherin, beta-catenin, MMPs (7 and 9), and TIMPs (1 and 2) in patients with colorectal carcinoma. *J Surg Oncol.* 2006; 93: 151-160.
298. Collins HM, Morris TM, Watson SA. Spectrum of matrix metalloproteinase expression in primary and metastatic colon cancer: relationship to the tissue inhibitors of metalloproteinases and membrane type-1-matrix metalloproteinase. *Br J Cancer* 2001; 84: 1664–1670.
299. Pesta M, Holubec JR, Topolcan O, Cerna I M, Rupert K, Holubec S, et al. Quantitative Estimation of Matrix Metalloproteinases 2 and 7 (MMP-2, MMP-7) and Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases 1 and 2 (TIMP-1, TIMP-2) in Colorectal Carcinoma Tissue Samples. *Anticancer Research* 2005; 25: 3387-3392.
300. DeClerck YA, Perez N, Shimada H, Boone TC. Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res* 1992; 52: 701-708.
301. Valente P, Fassina G, Melchiori A, Masiello L. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int. J. Cancer* 1998; 75: 246-253.

- 302.** Logan AW, Mario AC, Sashko D. Analysis of the MMP-dependent and independent functions of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 on the invasiveness of breast cancer cells. *J Cell Commun Signal* 2012; 6: 87–95.
- 303.** Wan Y, Wei Q, Pan Y, Liu Y. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in colorectal neoplasm. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. (Chinese Journal of Surgery) 2000; 38: 510-513.
- 304.** William G. Stetler-Stevenson. The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *Cancer Metastasis Rev* 2008; 27: 57–66.
- 305.** Noel A, Maillard C, Rocks N, Jost M, Chabottaux V, Sounni NE, et al. Membrane associated proteases and their inhibitors in tumour angiogenesis. *J Clin Pathol* 2004; 57: 577–584.
- 306.** Melania D, Stefania T, Emanuela R, Annalisa B, Thorsten JM, Paola A, et al. Effects of Celecoxib on Prostanoid Biosynthesis and Circulating Angiogenesis Proteins in Familial Adenomatous Polyposis. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 2012; 341: 242–250.
- 307.** Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002; 115: 3719–3727.
- 308.** Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res* 2005; 65: 3967–3979.
- 309.** Stetler-Stevenson WG, Seo DW. TIMP-2: an endogenous inhibitor of angiogenesis. *Trends Mol Med* 2005; 11: 97–103.
- 310.** Seo DW, Kima SH, Eoma SH, Yoona HJ, Choa YR, Kima PH, et al. TIMP-2 disrupts FGF-2-induced downstream signaling pathways. *Microvasc Res* 2008; 76: 145–151.
- 311.** Hoegy SE, Oh HR, Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) suppresses TKR-growth factor signaling independent of metalloproteinase inhibition. *J Biol Chem* 2001; 276: 3203-3214.

312. Dong-Wan Seo, Hongmei Li, Liliana Guedez, Paul T. Wingfield, Tere Diaz, Rita Salloum, Bei-yang Wei, and William G. Stetler-Stevenson. TIMP-2 Mediated Inhibition of Angiogenesis: An MMP-Independent Mechanism. *Cell* Vol 2003; 114: 171–180.
313. Cecilia AF, Catherine B, Geraldine J, Marsha AM. Structural and Functional Uncoupling of the Enzymatic and Angiogenic Inhibitory Activities of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 (TIMP-2). *J Biol Chem* 2003; 278: 40989-40995.
314. Andrew LF, William G, Stetler-Stevenson G, Vladimir K, Galina BH, Richard D, et al. Modulation of Tumor-host Interactions, Angiogenesis, and Tumor Growth by Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2 via a Novel Mechanism. *Cancer Research* 2004; 64: 4481–4486.
315. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353–364.
316. Seo DW, Li H, Guedez L, Wingfield PT, Diaz T, Salloum R, et al. TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: An MMP-independent mechanism. *Cell* 2003; 114: 171–180.
317. Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R. A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet* 2002; 31: 141-149.
318. Ivanova T, Vinokurova S, Petrenko A, Eshilev E. Frequent hypermethylation of 5' flanking region of TIMP-2 gene in cervical cancer. *Int J Cancer* 2004; 108: 882-886.
319. Galm O, Suzuki H, Akiyama Y, Esteller M. Inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene by promoter hypermethylation in lymphoid malignancies. *Oncogene* 2005; 24: 4799-4805.
320. Andrei VC, Nor ES, Albert GR, Alex Y. Strongin Epigenetic Control of the Invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 Axis in. *J Biol Chem* 2009; 284: 27-34.
321. Miller AM, Nolan MJ, Choi J, Koga T, Shen X, Yue BY, Knepper PA. Lactate treatment causes NF-kappaB activation and CD44 shedding in cultured trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 1615–1621.

322. Sina A, Sébastien PB, Roy A, Laurent P, Jian C, Borhane A. The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKK γ /NF- κ B-dependent pathway. *J Cell Commun Signal* 2010; 4: 31–38.
323. Terekeci MH, Fiahan B, Top C. Hücre Adezyon Molekülleri. *Nobel Med* 2008; 4: 4-10.
324. Velikova G, Banks RE, Gearing A, Hemingway I, Forbes MA, Preston SR, et al. Serum concentrations of soluble adhesion molecules in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998; 77: 1857-1863.
325. Maeda K, Kang SM, Sawada T, Nishiguchi Y, Yashiro M, Ogawa Y, et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 and prognosis in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2002; 9: 511-514.
326. Dymicka-Piekarska V, Kemon H. Does colorectal cancer clinical advancement affect adhesion molecules (sP-selectin, sE-selectin and ICAM-1) concentration? *Thromb Res* 2009; 124: 80-83.
327. Toiyama Y, Miki C, Inoue Y, Okugawa Y, Koike Y, Yokoe T, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 as a prognostic marker for stage II colorectal cancer patients. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 1617-1624.
328. Chen Y, Li R, Wang R, Liu Z. The significance of nuclear factor kappa Bp65 (NF kappa Bp65) expression on the vascular endothelial cells of rectum adenocarcinoma of human. *Journal of West China University of Medical Sciences* 2001; 32: 196-199.
329. Kaiserlian D, Rigal D, Abello J, Revillard JP. Expression, function and regulation of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human intestinal epithelial cell lines. *Eur J Immunol* 1991; 21: 2415–2421.
330. Parkos CA, Colgan SP, Diamond MS, Nusrat A, Liang TW, Springer TA, et al. Expression and polarization of intercellular adhesion molecule-1 on human intestinal epithelia: consequences for CD11b/CD18-mediated interactions with neutrophils. *Mol Med* 1996; 2: 489–505.
331. Gallicchio M, Rosa AC, Dianzani C, Brucato L, Benetti E, Collino M, Fantozzi R. Celecoxib decreases expression of the adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in a colon cancer cell line (HT29). *Br J Pharmacol* 2008; 153: 870–878.

332. Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Canc* 2007; 7: 295-308.
333. Telkoparan P, Tazebay UH. Ras Protein Ailesi: Hücresel İşlevi, Moleküler Kontrolü, Onkogenezdaki Rolü. *Türk Biyokimya Dergisi* 2011; 36; 367–373.
334. Goldsmith ZG, Dhanasekaran DN. G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 2007; 26: 3122-42.
335. Singh S, Sadanandam A, Singh RK. Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 453–467.
336. Lazenec G, Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med* 2010; 16: 133.
337. McClellan JL, Davis JM, Steiner JL, Day SD, Steck SE, Carmichael MD, Murphy EA. Intestinal inflammatory cytokine response in relation to tumorigenesis in the *Apc(Min/+)* mouse. *Cytokine* 2012; 57: 113-119.
338. Hillenbrand A, Fassler J, Huber N, Xu P, Henne-Bruns D, Templin M, et al. Changed adipocytokine concentrations in colorectal tumor patients and morbidly obese patients compared to healthy controls. *BMC Cancer* 2012; 23; 12: 545.
339. Götlind YY, Fritsch FM, Kumawat AK, Strid H, Willén R, Rangel I, et al. Interplay between T(h)1 and T(h)17 effector T-cell pathways in the pathogenesis of spontaneous colitis and colon cancer in the *Gai2*-deficient mouse. *Int Immunol*. 2013; 25: 35-44.
340. Wolf MJ, Hoos A, Bauer J, Boettcher S, Knust M, Weber A, et al. Endothelial CCR2 signaling induced by colon carcinoma cells enables extravasation via the JAK2-Stat5 and p38MAPK pathway. *Cancer Cell* 2012; 22: 91105.
341. Jasmeet KS, Sanyal N. Diclofenac, a selective COX-2 inhibitor, inhibits DMH-induced colon tumorigenesis through suppression of MCP-1, MIP-1 α and VEGF. *Molecular Carcinogenesis*. 2011; 50: 707–718.
342. Muta M, Matsumoto G, Nakashima E, Toi M. Mechanical analysis of tumor growth regression by the cyclooxygenase-2 inhibitor, DFU, in a Walker256 rat tumor model: importance of monocyte chemoattractant protein-1 modulation. *Clin Cancer Res*. 2006; 12: 264-272.

343. Tang X, Asano M, O'Reilly A, Farquhar A, Yang Y, Amar S *Curr Mol Med*. p53 is an important regulator of CCL2 gene expression. 2012; 12: 929-943.
344. Hacke K, Rincon-Orozco B, Buchwalter G, Siehler SY, Wasylyk B, Wiesmüller L, Rösl F. Regulation of MCP-1 chemokine transcription by p53. *Mol Cancer*. 2010; 20; 9: 82.
345. Ueda A, Ishigatsubo Y, Okubo T, Yoshimura T. Transcriptional regulation of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. Cooperation of two NF-kappaB sites and NF-kappaB/Rel subunit specificity. *J Biol Chem* 1997; 272: 31092-31099.
346. Pikarsky E. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 2004; 431: 461–466.
347. Popivanova BK, Kostadinova FI, Furuichi K, Shamekh MM, Kondo T, Wada T, et al. Blockade of a chemokine, CCL2, reduces chronic colitis-associated carcinogenesis in mice. *Cancer Res* 2009; 69: 7884-7892.
348. Malisetty VS, Christopher RH, Chinthalapally VR. Inhibition of COX-2 in Colon Cancer Cell Lines by Celecoxib Increases the Nuclear Localization of Active p53. *Cancer Res* 2003; 63: 5239-5242.
349. Micheal BK, Gerard PZ. Partitioning p53 in the cytoplasm. *Cell* 2003; 112: 1–5.
350. Xiong, Y, Hannon, G. J, Zhang, H, Casso, D, Kobayashi, R, Beach, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature (Lond)*, 1993; 366: 701–704.

6. ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Elazığ'da dünyaya geldim. Eğitim-Öğretim hayatımın lise son sınıfa kadar olan bölümünü İzmir ve Ankara'da, lise son sınıfı da Elazığ'da tamamladıktan sonra 1994 yılında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesinde yüksek öğrenimime başladım. Buradaki 7 yıllık tıp eğitimimi tamamladıktan sonra 2002 yılında Kırıkkale ili Sulakyurt ilçesinde göreve başladım. Aynı ilçede farklı köy ve beldelerde yaklaşık 1 yıl çalıştıktan sonra 2 yıl İlçe Merkez Sağlık Ocağında sorumlu hekimlik ve İlçe Sağlık Grup Başkanlığı görevlerini yürüttüm. 2005-2008 yılları arasında Bilecik ili Söğüt ilçesi Merkez Sağlık Ocağı ve ilçe Devlet Hastanesinde, sonrasında da yaklaşık 3 ay Balıkesir ili Edremit ilçesi 2 no'lu Merkez Sağlık Ocağında görev yaptım. 2009 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladım. Halen aynı Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım. Evli ve 2 çocuk annesiyim.