

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyokimya Anabilim Dalı**

LİKOPENİN ANJİYOGENEZ OLUŞUMUNA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Mehmet ŞAHİN

Doktora Tezi

Antalya, 2009

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyokimya Anabilim Dalı**

LİKOPENİN ANJİYOGENEZ OLUŞUMUNA ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Mehmet ŞAHİN

Doktora Tezi

**Tez Danışmanı
Prof.Dr. Saadet GÜMÜŞLÜ**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje No: 2006.03.0122.005)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2009

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında en az bir yurt dışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıdadır (orjinalleri ekte sunulmuştur).

1. Şahin M., Şahin E., Gümüşlü S.: Cyclooxygenase-2 in Cancer and Angiogenesis. Angiology, 60(2): 242-253, 2009.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyokimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir ..18...../12...../2009.

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Saadet GÜMÜŞLÜ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Üye : Prof.Dr. Gültekin YÜCEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Üye : Prof.Dr. A.Semra KOÇTÜRK
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Üye : Prof.Dr. Salih ŞANLIOĞLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı



Üye : Doç.Dr. Emin Türkay KORGUN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2009 tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü
Prof.Dr. İsmail ÜSTÜNEL

ÖZET

Anjiyogenez, var olan damarlardan yeni kan damarlarının oluşum prosesidir. Bu süreç bazı fizyolojik ve patolojik durumlarda önemli bir rol oynar. Solid tümörler, büyüme ve metastaz için anjiyogeneze bağımlıdır. Yeni kan damar ağları tümör dokularına penetre olduktan sonra, hücelere besin ve oksijen sağlarken atık ürünleri uzaklaştırır. Neoanjiyogenik sürecin inhibisyonu ile tümör büyümesinin bloke olabileme potansiyeli, solid tümör tedavisinde ilgi çekici bir yaklaşım sunmaktadır.

Karotenoidlerden biri olan likopen, bitkiler ve fotosentetik mikroorganizmalar tarafından sentezlenir. Çok güçlü bir antioksidan olan likopen serbest radikallere karşı oldukça reaktiftir. Likopenin serum veya doku düzeyleri ile çeşitli kanser türlerinin insidansı arasında zıt bir ilişki olduğu bilinmektedir.

Likopenin kanser hücrelerinin çoğalmasını baskıladığı çeşitli çalışmalarda gösterilmesine rağmen, endotelial hücreler üzerine ve kanser tedavisinde önemli olan anjiyogenez oluşum sürecine likopenin etkilerini gösteren bir çalışmaya literatürde rastlanamamıştır. Ayrıca, bir kaç çalışmada likopenin metastaz üzerine de etkili olduğu gösterilmesine karşın, metastaz oluşumuna zemin hazırlayan endotelial hücrelerin damar oluşturma prosesi ile likopen arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışma olmadığı görülmüştür. Bu nedenle, bu çalışmada likopenin kanser gelişiminde çok önemli bir rolü olan endotelial hücrelerin anjiyogenez oluşturmaları üzerine etkilerinin araştırılması ve likopenin olası anti-anjiyogenik etkilerinin, etkisi bilinen apigenin ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, likopen veya apigenin ile muamele edilmiş olan HUVEC endotelial hücrelerde kapiller benzeri tübüler ağ oluşturma deneyi ile in vitro anjiyogenez, metil tetrazolyum boyası yardımıyla canlı hücre yüzdeleri, Boyden Chamber sistemi ile hücre migrasyon düzeyleri ve yara iyileşmesi deneyi kullanılarak yönsel hücre migrasyonu ölçülmüştür.

Çalışmamızda, likopen ve apigeninin endotelial hücrelerde doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu ve deneyde kullanılan en etkin dozda hücre migrasyonunu kontrole göre baskıladığı görülmüştür. Likopen ve apigeninin doza bağlı olarak kapiller benzeri tüp uzunluklarını azalttığı ve tüp oluşumunu inhibe ettiği bulunmuştur.

Bu çalışmada, kemoprevensiyon ajan olarak düşünülen likopenin endotelial hücreler ve anjiyogenez üzerine de etkili olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden, bu çalışma, likopen ve endotelial hücreler ile ilişkili ileriki anjiyogenez deneylerine öncü bir çalışma olarak ışık tutabilecektir.

Anahtar Kelimeler : Anjiyogenez, HUVEC, likopen, apigenin, hücre migrasyonu, tüp oluşumu, hücre proliferasyonu.

ABSTRACT

Angiogenesis is the formation process of new blood vessels from preexisting ones. This process plays an important role in some physiological and pathological conditions. Solid tumors depend on angiogenesis for growth and metastasis. After the new networks of blood vessels penetrate into tumor tissues, they supply nutrients and oxygen and removing waste products. The potential to block tumor growth by inhibition of the neoangiogenic process represents an intriguing approach to the treatment of solid tumors.

Lycopene, one of the carotenoids, is synthesized by plants and photosynthetic micro-organisms. Lycopene which is a powerful antioxidant is highly reactive towards free radicals. Serum and tissue lycopene levels have been known to be inversely related to the incidence of several types of cancer.

Although lycopene was shown to repress the proliferation of cancer cells, it couldn't be seemed any study in literature showing effects of lycopene on endothelial cells and on the formation process of angiogenesis which is important in cancer therapy. Besides, in several studies, though it was shown lycopene is also effective on metastasis, it was seen there was no study investigating relationship between lycopene and vessel formation process of endothelial cells supplying basic facilities for metastasis formation. Therefore, in this study, it was aimed to be searched the effects of lycopene on angiogenesis process of endothelial cells playing an important role in cancer development, and to be compared with apigenin which it is known the effects of. For this aim, we measured in vitro angiogenesis by capillary-like tubular network formation assay, the percentages of viable cells by methyl tetrazolium salt staining assay, cell migration levels by Boyden Chamber system and directional cell migration by wound healing assay in HUVEC endothelial cells which were treated with lycopene or apigenin.

In our study, it was seen that lycopene and apigenin repressed the cell proliferation as a dose dependent manner and cell migration at the most effective dose used in the experiment as compared with controls in endothelial cells. It was found that lycopene and apigenin decreased the capillary-like tube lengths as a dose dependent manner and inhibited tube formation.

In this study, lycopene which has been thought as a chemoprevention agent has been shown to be effective on endothelial cells and angiogenesis, as well. Therefore, as a leading study, this study will be able to direct further angiogenesis experiments related with lycopene and endothelial cells.

Keywords : Angiogenesis, HUVEC, lycopene, apigenin, cell migration, tube formation, cell proliferation.

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerekleşmesindeki katkılarından dolayı aşağıda belirtilen kişilere içtenlikle teşekkür ederim.

Sayın danışman hocam Prof.Dr. Saadet Gümüşlü'ye tezimin gerekleşmesi için göstermiş olduğu bilimsel katkı ve manevi destekten dolayı,

Gen Tedavi Ünitesi'nde laboratuvar olanaklarını sunarak deneylerimi gerekleştirmemi sağlayan Sayın Prof.Dr. Salih Şanlıoğlu'na,

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan sevgili eşim Dr. Emel Şahin'e, gösterdiği özveri ve destekten dolayı,

Şu anda beni dünya gözüyle görmeseler de, benim eğitim ve öğretim hayatım boyunca bana özgüven aşılayan ve her türlü imkanı sağlayan sevgili anneme ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	SAYFA
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
GİRİŞ	1-3
GENEL BİLGİLER	4-27
2.1. Anjiyogenez	4
2.1.1. Anjiyogenezin mekanizması	4
2.1.2. Tümör anjiyogenezinde rol alan faktörler	5
2.1.2.1. Vasküler endotelyal büyüme faktörü ve reseptörleri	5
2.1.2.2. Fibroblast büyüme faktörleri	8
2.1.2.3. Anjiyopoietinler ve tie reseptörleri	8
2.1.2.4. Transforme edici büyüme faktörü-β	9
2.1.2.5. İnterlökin-8 ve matriks metalloproteinaz-2	10
2.1.3. Anjiyogenez ve kanser	10
2.1.3.1. Kanserın anjiyogenik şalteri (‘angiogenic switch’)	11
2.1.3.2. Kemopreventif ajanlar ile neoanjiyogenezin inhibisyonu	11
2.2. Likopen	13
2.2.1. Likopenin kimyası	14
2.2.2. Likopenin etki mekanizmaları ve moleküler hedefleri	16
2.2.2.1. Likopenin antioksidan aktivitesi	17
2.2.2.2. Likopen ve antioksidan yanıt elementi (ARE)	19
2.2.2.3. Apoptozis	19
2.2.2.4. Hücre döngüsünün durdurulması	19
2.2.2.5. Büyüme faktörleri ve sinyal yolları	20
2.2.2.6. Hücre invazyonu ve metastaz	20
2.2.3. Epidemiyolojik kanıtlar	21
2.2.3.1. Kanser	21

2.2.3.2. Kardiyovasküler hastalıklar	22
2.2.4. Gıda kaynakları ve biyoeldeelilebilirlik	22
2.3. Apigenin	23
2.3.1. Apigeninin kimyasal yapısı ve özellikleri	24
2.3.2. Apigeninin biyolojik özellikleri	25
2.3.3. Apigenin ve kanser	27
GEREÇLER VE YÖNTEMLER	28-42
3.1. Hücre kültürü	28
3.1.1. Flaskların ve çok kuyucuklu petrilerin hazırlanması	28
3.1.2. Hücrelerin pasajlanması	28
3.1.3. Hücrelerin dondurulması	28
3.1.4. Hücre kültüründe kullanılan solüsyonlar	29
3.2. Likopen ve apigeninin hazırlanması	31
3.2.1. Likopenin hazırlanması	31
3.2.2. Apigeninin hazırlanması	31
3.3. Likopen ve apigeninin hücre proliferasyonuna etkilerinin incelenmesi	31
3.3.1. MTT deneyi	32
3.4. Likopen ve apigeninin kapiller benzeri tübüler ağ oluşumuna etkilerinin incelenmesi	34
3.4.1. Matrijelin hazırlanması ve uygulanması	34
3.5. Likopen ve apigeninin HUVEC endotelyal hücre migrasyonuna etkilerinin incelenmesi	35
3.5.1. Endotelyal hücre migrasyon deneyinin uygulanması	36
3.6. Yara iyileşmesi deneyi	40
3.7. İstatistiksel analiz	42
BULGULAR	43-54
4.1. Apigeninin hücre proliferasyonuna etkisi	43
4.2. Likopenin hücre proliferasyonuna etkisi	44
4.3. Apigeninin kapiller benzeri tübüler ağ oluşumuna etkisi	45
4.4. Likopenin kapiller benzeri tübüler ağ oluşumuna etkisi	47
4.5. Apigeninin endotelyal hücre migrasyonuna etkisi	49
4.6. Likopenin endotelyal hücre migrasyonuna etkisi	52
TARTIŞMA	55-59
SONUÇLAR	60
KAYNAKLAR	61-79
ÖZGEÇMİŞ	80

- EK 1.** Şahin M., Şahin E., Gümüşlü S.: Cyclooxygenase-2 in Cancer and Angiogenesis. *Angiology*, 60(2): 242-253, 2009.

SİMGELER VE KISALTMALAR

VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IGFBP-3	: IGF-bağlayıcı protein-3
MAPK	: Mitojen ile aktive olan protein kinaz
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
VEGFR	: Vasküler endotelyal büyüme faktör reseptörü
uPA	: Ürokinaz-benzeri plazminojen aktivatör
uPAR	: Ürokinaz-benzeri plazminojen aktivatör reseptörü
tPA	: Doku tip plazminojen aktivatör
PAI-1	: Plazminojen aktivatör inhibitör-1
ECM	: Ekstraselüler matriks
uPAR	: Ürokinaz-benzeri plazminojen aktivatör reseptörü
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü beta
AP-2	: Aktivatör protein-2
HIF-1α	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 α
MMP	: Matriks metalloproteinase
Ang	: Anjiyopoietin
IL-8	: İnterlökin-8
CAM	: Korioallantoik membran
RTK	: Reseptör tirozin kinaz
ROS	: Reaktif oksijen türleri
ARE	: Antioksidan yanıt elementi
SOD	: Süperoksit dismutaz
EPHX	: Epoksit hidrolaz
PDGF	: Platelet-kaynaklı büyüme faktörü
HMG-CoA	: 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A
THF	: Tetra hidrofuran
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluen
DMSO	: Dimetil sülfoksit
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör- α
HUVEC	: İnsan umbilikal ven endotelyal hücreleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
2.1.1. Tümör anjiyogenezinde tetikleyici mekanizma	5
2.1.2. Anjiyogenik faktörlerin oluşturduğu bazı anjiyogenezin mekanizmaları	6
2.1.3. Kemopreventif ajanlar ve tümör oluşumu	13
2.2.1. Likopenin yapısı	14
2.2.2. Likopenin <i>trans</i> ve <i>cis</i> izomerlerinin yapısı	15
2.2.3. Kronik hastalıkları önlemede likopenin rolü için önerilen mekanizmalar	17
2.3.1. Apigeninin kimyasal yapısı	25
3.3.1. Endotelyal hücre migrasyon ölçüm prensibinin şematik gösterimi	39
4.1.1. Apigenin uygulanan HUVEC hücrelerine ait canlı hücre yüzdeleri	43
4.2.1. Likopen uygulanan HUVEC hücrelerine ait canlı hücre yüzdeleri	44
4.3.1. Apigenin uygulanan HUVEC hücrelerine ait kapiller benzeri tüp oluşturma grafiği	45
4.3.2. Apigenin uygulanan HUVEC hücrelerine ait kapiller benzeri tüp oluşturma resimleri	46
4.4.1. Likopen uygulanan HUVEC hücrelerine ait kapiller benzeri tüp oluşturma grafiği	47
4.4.2. Likopen uygulanan HUVEC hücrelerine ait kapiller benzeri tüp oluşturma resimleri	48
4.5.1. Apigenin uygulanan HUVEC hücrelerine ait migrasyon grafiği	49
4.5.2. Apigenin uygulanan hücrelere ait migrasyon boşluğu grafiği	50
4.5.3. Apigenin uygulanan HUVEC hücrelerinin migrasyonuna ait floresans mikroskop resimleri	51
4.6.1. Likopen uygulanan HUVEC hücrelerine ait migrasyon grafiği	52
4.6.2. Likopen uygulanan hücrelere ait migrasyon boşluğu grafiği	53

4.6.3. Likopen uygulanan HUVEC hücrelerinin migrasyonuna ait floresan mikroskop resimleri
--

54

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
2.2.1. İnsan ve ratlardaki ortalama likopen düzeyleri	16
2.3.1. Yaygın olarak bulunan bazı bitki flavoidlerinin kimyasal yapısı ve kaynağı	23
2.3.2. En yüksek miktarda apigenin içeren bazı bitki türleri ve parçaları	24

GİRİŞ

Kanser, kontrolsüz hücre bölünmesi ve hücrelerin komşu dokulara veya uzak dokulara göçü ile sonuçlanabilen önemli bir sağlık sorunudur. Kanser tedavilerinde asıl hedef, kontrolsüz tümör hücre proliferasyonunun ve anjiyogenezin önlenmesidir (1). Anjiyogenez, yeni kapiller kan damarlarının oluşum prosesidir. Yetişkinlerde endotelial hücrelerin proliferasyon hızı, diğer birçok hücre tipine göre çok daha yavaştır. Fizyolojik olarak sıkı bir regülasyon altında ve nadiren gerçekleşen anjiyogenez, yara iyileşmesi esnasında ve dişi üreme sisteminde meydana gelmektedir (2). Bunların dışında anjiyogenezin indüksiyonu potansiyel bir tehlike işaretidir. Regülasyonu bozulmuş anjiyogenez çeşitli patolojiler ile sonuçlanır (3). Bu patolojik durumlara örnek olarak romatoid artrit (4), diyabetik retinopati (5), psöriyazis ve juvenil hemanjiyoma (6) verilebilir. Bunlara ilaveten, tümör gelişimi için büyüme faktörlerinin tümör hücrelerine ulaştırılması ve kanser hücrelerinin yayılması da anjiyogenez aracılığıyla gerçekleşir (3). Anjiyogenez oluşmadıkça (prevasküler faz) tümör genellikle 2-3 mm³ den daha fazla büyüyemez. Bu büyüklüğe ulaşmaya kadar bir milyon veya daha fazla hücre içeren tümörler, büyüme ve canlılıkları için gerekli besin ve oksijen ihtiyacını basit difüzyon yolu ile sağlarlar (7). Tümörün daha fazla büyüebilmesi için yeni kapillerlerin oluşması gerekmektedir. Tümör içi yeni kan damarları, hücrelerin dolaşıma girmesi ve farklı organlara metastaz olması için de bir yol sağlamaktadır (8). Anjiyogenezi tetikleyen doku hipoksisi solid tümörlerin karakteristik bir özelliği olup, tümör büyümesinin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Hipoksi, tümörlü dokunun düşük oksijen miktarına adaptasyon yeteneğidir (9). Hipoksinin tümör hücrelerinden vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) sekresyonuna neden olduğu bilinmektedir (10, 11). Endotelial hücrelerindeki VEGF reseptörleri ve VEGF arasındaki etkileşim, reseptör aracılı kinaz aktivitesine ve tümör anjiyogenezine öncülük eden kritik sinyal yollarının başlamasına neden olur (12). VEGF ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) tümör anjiyogenezinin gelişiminde önemli rollere sahiptir. Endotelial hücreler için çok özel bir mitojen ve geçirgenlik faktörü olan VEGF'nin, çeşitli tümör tiplerinde ve tümör hücre dizilerinde upregüle edildiği bilinmektedir (13-15).

Anti-antiijenik tedavi için geliştirilen yaklaşımların hepsi tümör hücresinden çok, endotelial hücreyi hedef almaktadır. Tümör hücresinin yok edilmesi ikinci planda kalmıştır. Bu yaklaşımların teorikteki avantajı, endotelial hücrelerin transforme olmaması ve ilaç direnci ile sonuçlanan mutasyonların görülmemesidir. Ayrıca, endotele yönelik tedaviler tümörün orijinine bakılmaksızın tüm solid

tümörlere uygulanabilir özelliktedir. Bunun yanında, tümör hücrelerinin merkezine ilaçların ulaştırılması geleneksel tedavinin en önemli problemi olduğu için, endotelial hücreleri kanda taşıyan ajanlarla hedef almak avantaj sağlamaktadır (16).

Likopen kırk karbonlu ($C_{40}H_{56}$) asiklik bir karotenoid olup, 11 tane konjuge çift bağ içermektedir. Yaklaşık 600 karotenoidten biri olan likopen de diğer karotenoidler gibi yapısıyla ilişkili renk ve fotokimyasal özellikler taşır. Özellikle domateste bol miktarda bulunan likopen, bu bitkiye karakteristik kırmızı rengini vermektedir (17, 18). Serum likopen düzeyleri ile mesane kanseri (19) ve meme kanseri (20) arasında zıt bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Likopenin akciğer, meme ve endometrium gibi çeşitli peripherel kanser tiplerinin proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (21). Epidemiyolojik çalışmalar, domates ürünleri ve likopenin diyetle alımı ile prostat kanser riski arasında zıt bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Likopen prostat kanserine karşı koruyucu bir maddedir (22-26). Likopen, prostat kanserine karşı koruyucu etkilerini, aralarında IGF-1, IGFBP-3, Cx43 ve karsinojen metabolize edici enzimlerin de bulunduğu bazı proteinlerin modülasyonunu sağlamak yoluyla gösterir (27).

Likopenin, hücre kültür sisteminde insan endometrial, meme ve akciğer kanser hücrelerinin IGF-1 aracılı proliferasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (28). Ayrıca, G0/G1 fazında hücre siklusunun inhibisyonu ve hücre farklılaşmasının indüksiyonu ile HL-60 hücre büyümesinde de bir azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (29). Fare osteoblastlarının likopen ile muamelesi sonucunda, hücre farklılaşmasının indüklendiği ve proliferasyonun inhibe edildiği bildirilmiştir (30).

Likopenin, serum ile indüklenmiş MCF-7 hücrelerinde siklin D1 düzeyinde azalmayı indüklediği ve sonuçta cdk2 ve cdk4 aktivitelerinde bir azalma olduğu gösterilmiştir (31). Benzer bir çalışmada, likopen ve trans retinoik asit ile IGF-1' in mitojenik aktivitesinin inhibe edildiği ve bu inhibisyonu IGF-1'in stimüle ettiği, siklin D1 indüksiyonunun baskılanması yoluyla gerçekleştiği bildirilmiştir (32). Bilinen bir onkogen olan siklin D1 (33), hücre siklus ilerlemesindeki anahtar elementlerden biridir. Yüksek düzeylerdeki IGF-1, prostat kanser riskinin artışı ile ilişkilidir ve likopen IGF-1 sinyalini etkilemektedir (34).

Yapılan bir çalışmada, likopenin MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (35). Likopenin, MCF-7 hücre siklusunu bloke ettiği ve proliferasyonu inhibe ettiği bildirilmiştir (36). Likopenin LNCaP insan prostat kanser hücrelerinin proliferasyonuna etkisini inceleyen bir çalışmada, hücrelerin büyümesinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (37).

İnsan ağız boşluğu tümörü kaynaklı KB-1 hücreleri ile yapılan bir çalışmada, likopen ile inkübe edilen hücrelerin gap junctional iletişimin oluşmasında anahtar bir protein olan konneksin 43'ün hem transkripsiyonunu hem de ekspresyonunu önemli derecede arttırdığı ve KB-1 tümör hücrelerinin proliferasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (38). Likopenin, ratlara transplante edilen C-6 glioma hücrelerinin gelişimini de inhibe ettiği gösterilmiştir (39).

Hwang ve ark. (40), SK-Hep1 insan hepatoma hücrelerinde likopenin hücre büyümesini doza bağlı olarak inhibe ettiğini ve hücrelerin adhezyon, invazyon ve migrasyonunu inhibe ederek antimetastatik özellikler sergilediğini göstermişlerdir. Ayrıca, SK-Hep-1 hücrelerinin likopen ile muamelesi sonucunda, metastaz baskılayıcı bir gen olan Nm23-H1 ekspresyonunun indüklendiği gösterilmiştir (41).

Apigenin'in (4,5,7,-trihidroksiflavon) anti-inflamatuar, anti-karsinojenik ve serbest radikal tutucu özelliklerinin (42), transformasyonu (43), anjiyogenezi (44) ve tümör oluşumunun (45) inhibisyonunu da içeren bazı anti-tümör etkilerinin olduğu bilinmektedir. Ayrıca kolon (46), meme (47), deri (48) ve prostat (49) kanserlerini de içeren çeşitli insan kanser hücrelerinde, apigeninin hücre çoğalmasının inhibisyonu ve apoptozisi indüklediği gösterilmiştir.

Kanser hücrelerinin büyüme faktörlerini sentezlemesi ve salgılamasının, endotelial hücrelerin proliferasyonuna ve anjiyogeneze öncülük ettiği bilinmektedir. Likopenin kanser hücrelerinin çoğalmasını negatif yönde etkilediği çeşitli çalışmalar ile gösterilmesine rağmen, kanser tedavisinde önemli bir yere sahip olan anjiyogeneze oluşum sürecine ve endotelial hücreler üzerine likopenin etkilerini gösteren bir çalışmaya literatürde rastlanamamıştır. Buna ek olarak, bir kaç çalışmada (40, 41) likopenin metastaz üzerine de etkili olduğu gösterilmesine karşın, metastaz oluşumuna zemin hazırlayan endotelial hücrelerin damar oluşturma süreci ile likopen arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışma yapılmadığı görülmüştür. Bu nedenle, bu çalışmada likopenin kanser gelişiminde çok önemli bir rolü olan anjiyogeneze sürecine ve endotelial hücreler üzerine etkilerinin araştırılması ve likopenin etkilerinin, anti-anjiyogenik etkisi bilinen apigenin ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Anjiyogenez

Anjiyogenez, yeni kapiller kan damarlarının oluşum prosesidir. Yetişkinlerde endotelial hücrelerin proliferasyon hızı, diğer birçok hücre tipine göre çok daha yavaştır. Fizyolojik olarak sıkı bir regülasyon altında ve nadiren gerçekleşen anjiyogenez, yara iyileşmesi esnasında ve dişi üreme sisteminde meydana gelmektedir (2). Bunların dışında anjiyogenezin indüksiyonu potansiyel bir tehlike işaretidir. Regülasyonu bozulmuş anjiyogenez çeşitli patolojiler ile sonuçlanır (3). Bu patolojik durumlara örnek olarak romatoid artrit (4), diyabetik retinopati (5), psöriyazis ve juvenil hemanjiyoma (6) verilebilir. Bunlara ilaveten, tümör gelişimi için büyüme faktörlerinin tümör hücrelerine ulaştırılması ve kanser hücrelerinin yayılması da anjiyogenez aracılığıyla gerçekleşir (3).

Umut vaat eden in vivo ve in vitro çalışmalar sayesinde terapötik stratejilerin gelişimi hız kazanmıştır. Anjiyogenik terapiler, iskemik kalp hastalıkları ve ciddi periferik vasküler hastalıklar gibi iskemik koşullarda kan damar büyümesinin uyarılmasını kapsarken, diyabet, romatoid artrit veya tümör gelişimi gibi koşullarda anjiyogenezin inhibisyonunu içermektedir (50).

2.1.1. Anjiyogenezin mekanizması

Anjiyogenez, hücreler ile ekstraselüler matriks komponentleri arasındaki kapsamlı bir etkileşimin gerçekleştiği, çok basamaklı ve karmaşık bir olaydır. Anjiyogenezde 4 farklı ardışık basamak vardır (51):

- 1- Bazal membranın proteazlar ile yıkımı.
- 2- Endotelial hücrelerin interstitial alana migrasyonu.
- 3- Endotelial hücrelerin proliferasyonu.
- 4- Lümen oluşumu, perisitlerin toplanması ile yeni bazal membranın oluşumu, anastomozların oluşumu ve son olarak kan akışı.

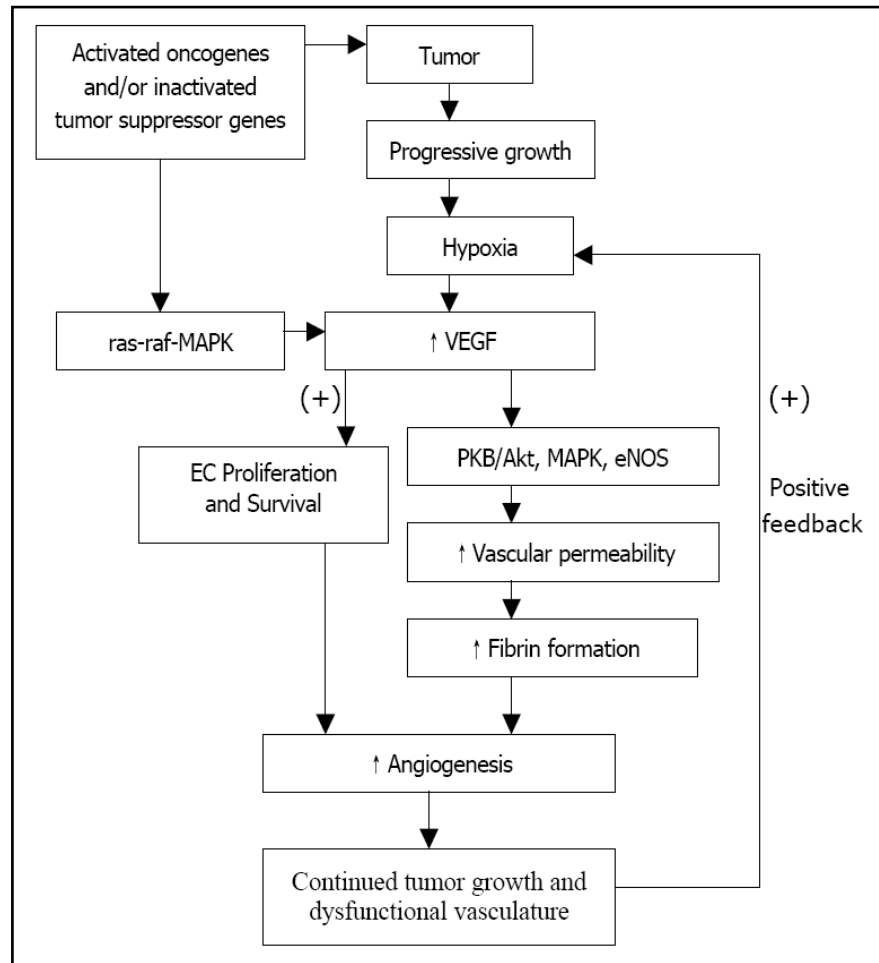
Mikrodamarlardaki anjiyogenik yanıt komşu endotelial hücreler, perisitler ve onları çevreleyen ekstraselüler matriks arasındaki hücresel adeziv etkileşimlerdeki değişiklikler ile ilişkilidir. Aktif neovaskülerizasyon prosesinde, aktive olmuş endotelial hücreler; kendi hücre iskeletlerini yeniden organize ederler, integrinler ve selektinler gibi hücre yüzey adhezyon moleküllerini eksprese ederler, proteolitik enzimleri sekrete ederler ve komşu ekstraselüler matrikslerini yeniden düzenlerler. Bu olaylar kapiller tomurcukların oluşumu tarafından takip edilir. Bazal membranın yeniden kurulmasına, lümen oluşumuna ve diğer yeni veya önceden varolan damarlar

ile anastomozlaşmasına ve son olarak bütün mikrodamarların oluşumuna öncülük eden endotelial hücrelerin migrasyonu, çoğalması, uzaması, yönlenmesi ve farklılaşmasının indüklenmesi için otokrin ve/veya parakrin anjiyogenik faktörler varolmalıdır (7).

2.1.2. Tümör anjiyogenezinde rol alan faktörler

2.1.2.1. Vasküler endotelial büyüme faktörü ve reseptörleri

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) veya bilinen diğer adıyla vasküler permeabilite faktörü (VPF) heparin-bağlayıcı bir anjiyogenik büyüme faktörü olup çeşitli tümör tiplerinde yüksek derecede eksprese edilir. Luminal ve abluminal plazma membranları arasındaki metabolit transportunu kolaylaştıran küçük damarlardaki endotelial hücrelerde kümelenmiş veziküller vardır. VEGF, veziküler-vakuolar organellerin aktivitesini artırarak endotelial hücre permeabilitesini artırabilir (52).

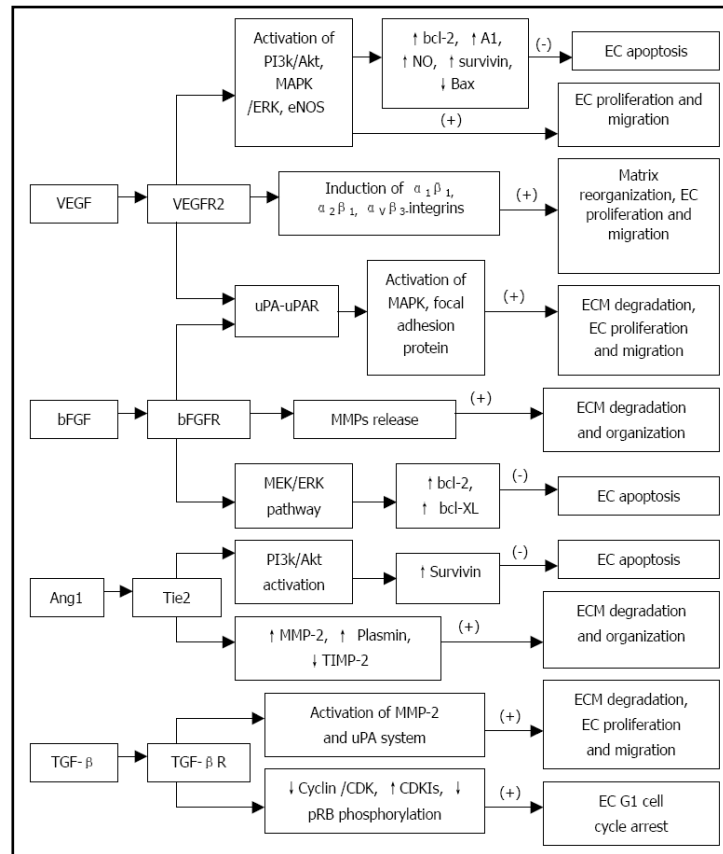


Şekil 2.1.1. Tümör anjiyogenezinde tetikleyici mekanizma (7).

Alternatif olarak, mitojen ile aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal iletim yolağını kullanan VEGF, caderin/catenin kompleklerinin yeniden düzenlenmesi yoluyla, tek sıralı endotelial hücreler arasında bulunan bağlantıları gevşeterek permeabiliteyi arttırabilir (53, 54). Ayrıca, insan umbilikal ven endotelial hücreleri kullanan bazı çalışmalar, VEGF'nin endotelial hücre permeabilitesini PKB/Akt, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve MAP kinaz bağımlı yolların aktivasyonu ile arttırdığını göstermektedir (55) (Şekil 2.1.1).

Artan vasküler permeabilite plazma proteinlerinin ekstrasvazasyonuna ve ECM'nin endotelial ve stromal hücre migrasyonu için elverişli hale gelmesine sebep olur.

VEGF, endotelial hücrelere spesifik bir mitojendir ve yüksek afiniteli reseptörlerine (Flt-1/VEGFR-1, Flk-1/KDR/VEGFR-2) bağlandığında inositolün hidrolizi yoluyla ikinci mesajcılarının oluşumunu tetikler ve bu yüzden heparin-benzeri moleküllerin varlığında reseptörlerin otofosforilasyonunu indükler, fosfatidilinositol metabolik sinyal iletim yollarını açar ve endotelial hücrelerdeki MAP kinazları aktive eder. Sonuç olarak, VEGF mitojenik etkilerini endotelial hücre proliferasyonunu arttırarak gösterir (56, 57).



Şekil 2.1.2. Anjiyogenik faktörlerin oluşturduğu bazı anjiyogenez mekanizmaları (7).

VEGF, anjiyogenez için gerekli ECM komponentlerini yeniden biçimlendirecek olan dengelenmiş bir proteolizis sistemini indükler. VEGF, endotelial hücrelerde ürokinaz-benzeri plazminojen aktivatör (uPA), doku tip plazminojen aktivatör (tPA), plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) (58, 59), proteolitik enzimler, doku faktörleri ve interstitial kollajenaz üretimini uyarır (60). Plazminojen aktivatörler plazminojeni, ECM bileşenlerini yıkan plazmine aktive eder. Bazal membranın yeniden modellenmesine ek olarak, ürokinaz-benzeri plazminojen aktivatör reseptörü (uPAR)'ne bağlanan uPA ayrıca, endotelial hücrelerde hücre içi sinyal iletimine aracılık eder. Endotelial hücrelerde uPAR'a bağlanma, fokal adhezyon moleküllerinin fosforilasyonuna ve MAP kinazların aktivasyonuna (61) sebep olur, yani uPA bu yol sayesinde endotelial hücre migrasyonuna ve proliferasyonuna etki eder (Şekil 2.1.2).

VEGF ayrıca, hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve matriks reorganizasyonunu uyaran $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ -integrinlerinin ekspresyonlarını indüklemek suretiyle de anjiyogenik etkilerini gösterir (Şekil 2.1.2). Bu integrinlerin antagonistleri VEGF'nin indüklediği anjiyogenezi inhibe etmede etkilidir (62, 63).

VEGF, vasküler endotelial hücreler için çok spesifik bir mitojen olmasının yanı sıra yeni oluşan immatür damarlardaki endotelial hücreler için de güçlü bir canlılık faktörüdür. VEGF, anjiyopoietin-1 ve $\alpha_v\beta_3$ gibi bazı endotelial canlılık faktörleri, p53, p21, p16 ve p27 ile proapoptotik protein olan Bax'ı baskımlarken, PI3K/Akt, p42/44 MAP kinazlar, bcl-2, A1 ve survivin gibi canlılık yollarını aktive eder (7) (Şekil 2.1.2). P42/p44 MAP kinazlar, VEGF promotörünün proksimal bölgesinde (-88/-66) AP-2/Sp1 (aktivatör protein-2) kompleksinin toplanması yoluyla onun transkripsiyonunu aktive ederek veya hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 α 'ın (HIF-1 α) direkt fosforilasyonu yoluyla VEGF ekspresyonunu destekler (64). VEGF, PI3-kinazın downstream bir hedefi olan serin-threonin protein kinaz Akt'nin ekspresyonunu KDR/Flt-1 reseptörü aracılığıyla indükler. Bu yolak güçlü bir şekilde çeşitli apoptozis sinyal yolunu bloke eder (65, 66), endotelial hücre migrasyonunu destekler (67) ve HIF'in ekspresyonunu artırır (68). PI3K'nın farmakolojik inhibisyonu veya dominant-negatif Akt mutanları ile transfeksiyon, endotelial hücreler üzerine VEGF'nin antiapoptotik etkilerini ortadan kaldırır. Bu bulgular; VEGFR2 ve PI3K/Akt sinyal iletim yolunun endotelial hücre canlılığını artırıcı önemli bir etken olduğunu göstermektedir. Antiapoptotik VEGF'nin aracılık ettiği downstream efektör yollardan biri de Akt-bağımlı endotelial nitrik oksit sentaz (e-NOS)'ın aktivasyonu olup bu yol endotelial hücre canlılığını arttırmaktadır (Şekil 2.1.2). VEGF ile indüklenmiş MAPK/ekstraselüler sinyal ile regüle edilen kinaz (ERK) yolunun aktivasyonu ve stres ile aktive edilen protein kinaz/c-jun amino terminal kinaz yolunun inhibisyonu da VEGF'nin aracılık ettiği antiapoptotik etkilere karışmaktadır (7, 69) (Şekil 2.1.2). PI3K/Akt yolunun aktivasyonu antiapoptotik etkilerin yanı sıra VEGF'nin endotelial hücrelerdeki migrasyon etkilerine de Akt-bağımlı fosforilasyon ve eNOS'un aktivasyonu yoluyla aracılık eder (70) (Şekil 2.1.2).

VEGF mRNA'sının ekspresyonu nekrotik alanlara komşu hipoksik tümör hücrelerinde en yüksek düzeydedir. Hipoksi ile indüklenen VEGF mRNA'sının transkripsiyonuna, HIF-1 proteininin VEGF promotorunda lokalize olan bir HIF-1 bağlanma bölgesine bağlanması ve stres ile indüklenebilir bir PI3K/Akt yolunun aktivasyonu aracılık etmektedir (68, 71).

Aslında progresif tümör büyümesi sürekli bir hipoksi oluşturur ve VEGF, bFGF, IL-8, TNF- α , TGF- β çeşitli pro-anjiyogenik bileşikleri artırır. Bu bileşikler ise damar hiper-permeabilitesinin artışı, plazma proteinlerinin serbestleşmesi, proteazların indüksiyonu, fibrin oluşumu, endotelial hücre proliferasyonu, migrasyonu gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla anjiyogenezi ve fibrinolizisi destekler. Sonuç olarak, sürekli tümör büyümesi ve disfonksiyonel damar oluşumu gerçekleşir ki bu durum pozitif besleme ile tümörlerin içinde sürekli bir hipoksik durum oluşturur (7) (Şekil 2.1.1).

2.1.2.2. Fibroblast büyüme faktörleri

Fibroblast büyüme faktörleri (FGF) ve onların reseptörleri çeşitli kanser tiplerinde yüksek derecede eksprese edilirler. FGF önemli bir tümör anjiyogenik ve endotelial hücre canlılık faktörüdür. bFGF, MEK/ERK sinyal yolu ile bcl-XL ve bcl-2 antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu indüklemektedir (72) (Şekil 2.1.2). Tümörlerde VEGF mRNA'sının ekspresyonu bFGF'nin ekspresyonu ile artmaktadır. Ayrıca bFGF mikrovasküler endotelial hücrelerde VEGF reseptörlerinde bir artış sağlarlar (73). aFGF ve bFGF, endotelial hücreler için mitojenik olup endotelial hücre migrasyonunu ve bazal membranı yıkma yeteneğinde olan PA ve kollajenazın endotelial hücrelerdeki üretimini stimüle ederler (74) (Şekil 2.1.2). FGF'ler ECM'nin üretiminden, MMP'lerin salınımından ve ECM'nin selektif degradasyonu ve organizasyonundan sorumludurlar (75) (Şekil 2.1.2). FGF'lerin yüksek afiniteli reseptörlerine bağlanması tirozin kinaz aktivasyonuna ve sonuçta erken gen ekspresyonu ve hücre proliferasyonuna öncülük eden bir kaskadın çalışmasına sebep olurlar. FGF reseptörleri ligand bağlandığında dimerize olurlar ve tirozin rezidüsünde transfosforilasyon gerçekleşir.

2.1.2.3. Anjiyopoietinler ve tie reseptörleri

Anjiyopoietin-1 (Ang-1) ve anjiyopoietin-2 (Ang-2), Tie-2 reseptörleri sayesinde kendi agonist ve antagonist sinyal etkisinden dolayı pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogeniktir (76). Endojen VEGF-A'nın varlığında, Ang-2 bazal laminanın yeniden modellenmesini, endotelial hücrelerin proliferasyonunu, migrasyonunu ve kapiller çapta hızlı bir artışı destekleyerek yeni kan damarlarının filizlenmesini indükler (76). Buna zıt olarak, endojen VEGF aktivitesinin inhibisyonu durumunda Ang-2 endotelial hücrelerin ölümünü ve damar regresyonunu destekler (76). Ang-1 hem Tie-2'nin hem de PI 3'-kinazın p85 alt ünitesinin fosforilasyonunu indükler ve doza bağımlı olarak PI 3'-kinaz aktivitesini artırır. Bu durum, Tie-2 reseptörünün, PI 3'-kinazın ve Akt'nin, Ang-1'in parakrin aktivitesi ile indüklenen endotelial hücre

canlılığına öncülük eden sinyal iletim yolağında önemli elementler olduğunu göstermektedir (77) (Şekil 2.1.2). Alternatif olarak, Ang-1, kritik bir canlılık mesajcısı olan Akt'yi aktive ederek ve geniş spektrumlu bir apoptozis inhibitörü olan survivini upregüle etmek suretiyle endotelial hücre apoptozisini önlemektedir (78, 79) (Şekil 2.1.2). Bununla birlikte, bcl-2'nin ekspresyonu üzerine etkisi yoktur (79). Ang-1 tarafından endotelial hücrelerden plazmin ve MMP-2 sekresyonunun artışı ve TIMP-2 sekresyonunun baskılanması da endotelial hücrelerin sürgün vermesinin indüklenmesi için önemli bir belirteçtir (80) (Şekil 2.1.2). PI 3'-kinaz inhibitörleri, Ang-1 ile stimüle edilen p125^{FAK}'ın tirozin fosforilasyonunu, endotelial hücrelerden MMP-2 ve plazmin sekresyonunu ve migrasyonu inhibe etmektedir (80).

Ang-2, endotelial hücrelerde Ang-1-aracılı Tie-2 otofosforilasyonunu bloke etmektedir ve Ang-1/Tie-2-aracılı anjiyogeneze, kan damarlarının aşırı dallanmasını ve filizlenmesini önlemek için bir kontrol noktası olarak davranmaktadır (7).

2.1.2.4. Transforme edici büyüme faktörü- β

Transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β) hücre büyümesi ve farklılaşmayı, ECM şekillenmesini, hücresel adhezyon özelliklerini, anjiyogenezi ve immün fonksiyonları regüle eden çok fonksiyonlu polipeptidlerdir. TGF- β 1 etkilerini TGF- β tip I ve tip II reseptörleri aracılığıyla, Smad proteinleri, p38 MAPK ve ERK gibi yollardaki hücre içi mediatörleri aktive etmek için kullanır (81). Kültür hücrelerinin çoğu tarafından sekrete edilen TGF- β biyolojik olarak inaktif formdadır ve TGF- β reseptörlerine bağlanamazlar. Latent TGF- β , plazmin ve katepsin D gibi proteazlar, düşük pH, üre gibi ajanlar ve ısı tarafından aktive edilirler (82, 83). İmmünohistokimyasal çalışmalar, TGF- β 1'in gastrik karsinomada VEGF ekspresyonunun upregülasyonu yoluyla dolaylı olarak anjiyogenezi stimüle ederek tümör progresyonuna katkıda bulunabileceğini göstermiştir (84). Ayrıca, TGF- β 1'in antianjiyogenik molekül olan anjiyostatinin oluşumunu insan pankreatik kanser hücrelerinde zaman ve doza bağımlı olarak inhibe ettiğini ve bu etkiye plazminojen/plazmin sisteminin modülasyonu yoluyla aracılık edildiği gösterilmiştir (85). TGF- β sadece siklinlerin ve CDKların ekspresyonu ve aktivitesini inhibe etmekle kalmaz ayrıca siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI)'ni indükler. p15 ve p27 gibi CDKI'lar, siklin/CDK'lara bağlanır, pRB'nin fosforilasyonunu önler ve bu nedenle endotelial hücreleri de içeren çoğu epitelyal hücreleri geç G1 fazında tutar (33) (Şekil 2.1.2). PANC-1 ve IMIM-PC1 hücrelerinin TGF- β ile muamelesi sonucu hem matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) hem de uPA sisteminin aktivitesi ve ekspresyonunda kuvvetli artışlar gözlenmiştir. Bu hücrelerin MMP-2 ve uPA sisteminin inhibitörleri ile muamelesi ise TGF- β ile indüklenen invaziv durumu önemli ölçüde azaltmıştır. Bu durum TGF- β 'nın, MMP-2 ve uPA sistemini aracı kullanarak, tümör hücre invazyonunda otokrin tavır sergilediğini göstermektedir (86) (Şekil 2.1.2). Bunlara ek olarak, TGF- β anjiyogenik faktörleri sekrete eden inflamatuvar mediatörlerin toplanması yoluyla da dolaylı bir şekilde anjiyogenezi stimüle etmektedir.

2.1.2.5. İnterlökkin-8 ve matriks metalloproteinaz-2

Bazal membranın ve ECM'nin proteolitik degradasyonunu kolaylaştıran MMP aktivitesinin artışı tümör anjiyogenezi kadar tümör büyümesi ve metastaz ile de ilişkilidir. Neoplastik dokularda artış gösteren interlökkin-8 (IL-8) mRNA'sının ekspresyonu yaygın neovaskülerizasyon, tümör progresyonu ve canlılık ile ilişkilidir. Ayrıca, IL-8 ile transfekte edilen tümör hücrelerinde MMP-2 mRNA düzeyleri artış gösterirken VEGF ve bFGF mRNA düzeyleri değişmez (87, 88). Bu durum, IL-8 ile indüklenen MMP-2 üretiminin, tümör hücrelerinin anjiyogenezi indüklemek için kullandığı önemli bir mekanizma olduğunu göstermektedir. IL-8 ayrıca hipoksi tarafından da upregüle edilmektedir (87). MMP-2'nin inhibisyonu, kuş korioallantoik membrana (CAM) implante edilen tümörlerin büyümesini ve neovaskülerizasyonunu önemli ölçüde inhibe eder (89).

2.1.3. Anjiyogenez ve kanser

Kanser kontrolsüz hücre bölünmesi ve hücrelerin komşu dokulara veya uzak dokulara göçü ile sonuçlanabilen önemli sağlık sorunlarından biridir. Tümör dokularında meydana gelen anjiyogenez prosesi 1970'li yıllarda ilgi odağı olmuştur. Kanser tedavilerinde asıl hedef, kontrolsüz tümör hücre proliferasyonunun ve anjiyogenezin önlenmesidir. Anti-anjiyogenik tedavi sonucunda, gebelik veya yara iyileşmesi gibi bir durumun olmadığı koşullarda, herhangi bir yan etki olmaksızın sadece tümör dokusunun etrafındaki damar oluşumu engellenmek suretiyle etkili bir yaklaşım gerçekleştirilebilmektedir (1, 90, 91).

Anti-anjiyogenik tedavi için geliştirilen yaklaşımların hepsi tümör hücresinden çok endotelial hücreleri hedef almaktadır. Tümör hücresinin yok edilmesi ikinci planda kalmıştır. Bu yaklaşımların teorikteki avantajı, endotelial hücrelerin transforme olmaması ve ilaç direnci ile sonuçlanan mutasyonların görülmemesidir. Ayrıca, endotele yönelik tedaviler tümörün orijinine bakılmaksızın tüm solid tümörlere uygulanabilir özelliktedir. Bunun yanında, tümör hücrelerinin merkezine ilaçların ulaştırılması geleneksel tedavinin en önemli problemi olduğu için, endotelial hücreleri kanda taşıyan ajanlarla hedef almak avantaj sağlamaktadır (16).

Anjiyogenez oluşmadıkça (prevasküler fazda) tümör genellikle 2-3 mm³ den daha fazla büyüyemez. Bu büyüklüğe ulaşınca kadar, bir milyon veya daha fazla hücre içeren tümörler, büyüme ve canlılıkları için gerekli besin ve oksijen ihtiyacını basit difüzyon yolu ile sağlarlar (7). Tümörün daha fazla büyüebilmesi ve metastaz yapabilmesi için yeni kapillerlerin oluşması gerekmektedir. Tümör içi yeni kan damarları, hücrelerin dolaşıma girmesi ve farklı organlara metastaz olması için bir yol sağlarlar (8). Anjiyogenezi tetikleyen doku hipoksisi solid tümörlerin karakteristik bir özelliği olup, tümör büyümesinin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Hipoksi, tümörlü dokunun düşük oksijen miktarına adaptasyon yeteneğidir (9). Hipoksi sonucunda daha agresif kanser fenotipi oluşur (92).

2.1.3.1. Kanserin anjiyogenik şalteri ('angiogenic switch')

Anjiyogenik fenotip birçok basamakta malign tümörün gelişimine hizmet eder. Tümör hücreleri anjiyogenezin pozitif regülatörlerinin bir veya daha fazlasını aşırı ekprese edebilir, ekstraselüler matriksden bir anjiyogenik proteini mobilize edebilir, makrofajlar gibi hücreleri toplayabilir (bunlar kendi anjiyogenik proteinlerini üretir) veya bu proseslerin bir kombinasyonu ile meşgul olabilirler. Tümör anjiyogenezin tümörün salgıladığı anjiyogenik büyüme faktörleri aracılık etmektedir (7). Bu faktörler endotelial hücrelerde ekprese edilen yüzey reseptörleri ile etkileşime girerler. Örneğin, en yaygın bulunan anjiyogenik büyüme faktörlerinden olan VEGF ve bFGF, endotelial hücrelere rastlandığında membranda bulunan tirozin kinaz reseptörlerine bağlanırlar ve reseptörlerin dimerizasyonuna ve reseptörlerin yüzeyindeki tirozinlerin otofosforilasyonunun aktivasyonuna öncülük ederler. Böylece PI3-kinaz, Src, Grb2/m-SOS-1 gibi bazı sinyal proteinleri, sinyal iletilicileri ve transkripsiyon aktivatörlerini (STATlar) (herbiri src-homoloji-2 (SH-2) domenleri içerir) başlatırlar (7, 93). Bu proteinlerdeki SH-2 bölgelerinin reseptör tirozin kinazlar (RTK) üzerindeki fosfotirozinlere bağlanması, hücre döngü mekanizmasının tetiklenmesi için gerekli çeşitli yolları aktive etmektedir. GTP-bağlayıcı protein üzerinden giden ve mitojen ile aktive edilen protein kinaz kaskadını (MAPK) ve ardından çekirdekteki transkripsiyon faktörlerini aktive eden yol en iyi çalışılan yoldur (93).

Bir tümör hücresinin anjiyogenik olması için bir anjiyogenik faktörün artması yeterli olmayıp, aynı zamanda damar büyümesinin bazı negatif regülatörleri veya inhibitörlerinin de azalmasına ihtiyaç olabilir (94).

Eğer lokal ortamda anjiyogenik faktörlerin üstünlüğü veya çoğunluğu varsa, yeni damar oluşumu kapillerler olarak devam edebilir veya matür venüller ya da arteriollere farklılaşabilir. Bunun yerine lokal çevre değişirse yani anjiyostatik faktörler üstün duruma geçerse, yeni damarlar geriler. Bu regresyona aracılık eden anjiyostatik faktörler ya apoptozisi indükler veya endotelial hücrelerin hücre siklusunu durdururlar. Bu yüzden, anjiyogenik fenotipi oluşturan şalter, mikrodamar büyümesinin pozitif ve negatif regülatörleri arasındaki lokal dengedeki dönüşümü ile regüle edilmektedir (51, 94).

2.1.3.2. Kemopreventif ajanlar ile neoanjiyogenezin inhibisyonu

Biyomedikal araştırmalar yarım asrı aşan bir süredir kanser teşhisi ve tedavisi için yeni enstrümanları ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, bugün bir solid tümör metastatik faza girdiğinde hastanın iyileşme şansı hala dramatik olarak düşmektedir. Görünürdeki tümör kütlesi cerrahi müdahale ile yok edilmesine rağmen küçük primer tümörler ve mikrometastazlara karşı noninvaziv terapiler ile savaşılmalıdır. Birçok klinik protokol, yüksek doz irradyasyon veya kemoterapi üzerine kurulu çok agresif yaklaşımlara dayanmaktadır. Ayrıca, her iki metod da genellikle ciddi yan

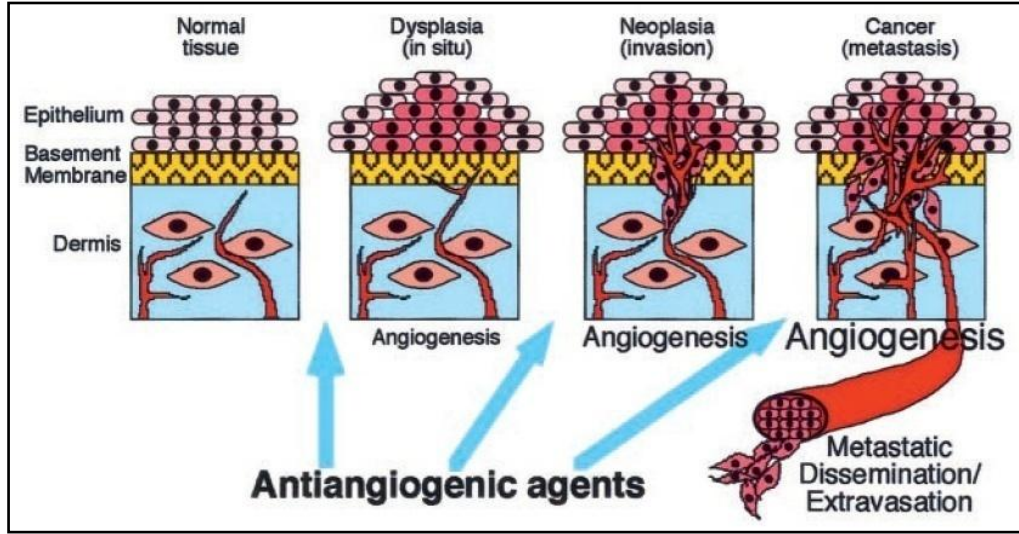
etkilerle birlikte bazı tümör tiplerine karşı kısmi etki göstermektedir (95). Tümör anjiyogenezinin kanser gelişimindeki kritik rolü yaklaşık 40 yıl önce Folkman ve ark. tarafından öncü çalışmalar ile ortaya atılmıştır (96). Buna rağmen, ancak son yıllarda etkili anti-anjiyogenik strateji geliştirmek için ve endotelial hücre fizyolojisi için gerekli bilgi birikimi sağlanmışır. Endotelial hücreler terapi için ayrıcalıklı bir hedeftir çünkü, tüm solid tümörlerde müşterek bir hücre tipidir. Her bir kanser aslında kendine özgü ayrı bir hastalığı göstermesine rağmen, tümör endoteliumu nispeten tek biçimli ve normal bir hücre tipidir (95).

Kanser hücreleri, fibroblast büyüme faktörü (bFGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), interlökin 8 (IL-8), transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), ve endotelial hücre toplanmasına ve çoğalmasına sebep olan diğer çeşitli anjiyogenik faktörleri üretebilirler (95). Bu uyarılar sürekli olduğundan tümör endoteliumunun olgun bir damar ağına farklılaşması nadiren tamamlanır ve tümör damarları anormal bir morfoloji gösterirler. Bu şablon, tümör tarafından endotelial hücre toplanmasının ve çoğalmasının inhibisyonu yoluyla, spesifik olarak tümör anjiyogenezinin hedeflenmesinin mümkün olabileceğini göstermektedir (95).

Antianjiyogenik yaklaşımın bir başka avantajı da, bu normal hücre tipinin düşük mutageniz oranından dolayı, çoklu-ilaç direnç mekanizmalarının gelişimi ile ortaya çıkan tedaviye karşı direncin endotelial hücrelerde gerçekleşmemesidir (97). Tümör büyümesinin blokajı, vasküler toplanmanın kronik bir inhibisyonunu gerektirir ki bu durum Hanahan ve Folkman tarafından 'anjyostazis' olarak belirtilmiştir (98). Bu yüzden uzun süreli tedavi gerekli olup düşük toksisiteli veya toksik olmayan moleküllerin tanımlanması ve karakterize edilmesi önemlidir.

Primer tümörlerin kansere dönüşme riski yüksek olan kişilerdeki bu durumu engellemede veya cerrahi müdahaleden sonra tümörün yeniden çıkmasını önlemede, doğal ve sentetik bileşiklerin saptanması için son 20 yılda önemli çabalar sarfedilmiştir. Kansere karşı kemopreventif ajanların kullanımının amacı karsinogenez ilerlemesini yavaşlatmak, geri dönüşümü sağlamak veya inhibe etmektir. Uzun peryotlarda kullanılması gerektiğinden dolayı, kemopreventif ilaçların toksisitesi olmamalı ve iyi tolere edilebilmelidir (95).

Neoanjiyogenezin inhibisyonu ya sekonder bir önleme yoluyla premalignant tümörün ilerlemesi tersine çevirir ya da hastalığın gerilemesine katkıda bulunur. Antianjiyogenik ajanlar mikrometastazların daha ilerlemesini önleyebilirler. Tümörün anjiyogenezi indüklediği nokta olarak belirtilen 'anjyogenik şalter' hem hayvan hem de insan tümörlerinde, tümorigenezdeki erken meydana gelen bir olaydır ve erken müdahale tümör büyümesini kesebilir. Bu yüzden antianjiyogenez hiperplastik odakların büyümesini ve ardından tümör gelişimini sınırlandırmak için primer engellemede uygulanabilir (95) (Şekil 2.1.3).



Şekil 2.1.3. Kemopreventif ajanlar ve tümör oluşumu. Kemopreventif ajanlar, tümörigenezin farklı aşamalarında anjiyogenik prosesi bozabilir. Preneoplastik aşama esnasında erken olarak meydana çıkan anjiyogenik şalter anjiyopreventif ajanlar tarafından, displaziden invaziv kansere ilerlemeye sebep olan fenotipik ve moleküler değişikliklerden önce kesilebilir (95).

2.2. Likopen

Kanser ve kardiyovasküler hastalıkları da içeren kronik hastalıklar temel ölüm sebeplerinden biridir. Genetik faktörler ve yaş ile birlikte, yaşam biçimi ve diyet de göz önüne alınması gereken önemli risk faktörleridir (99). Tüm kanserlerin yaklaşık %50'si diyetle ilişkilendirilir (100, 101).

Reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından indüklenen oksidatif stres, kanser ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili araştırmalarda temel ilgi odaklarından biridir. ROS, düzenli metabolik aktivite, yaşam biçimi ve diyet yoluyla endojen olarak oluşturulan yüksek derecede reaktif okside edici moleküllerdir. Bu moleküller hücresel komponentler ile reaksiyona girerek lipidler, proteinler ve DNA gibi kritik hücresel biyomoleküllerin oksidatif hasara uğramasına sebep olur. Bu hasarın bazı kronik hastalıkların sebebinde önemli bir rol oynayabileceğini gösteren güçlü deliller vardır (101-104).

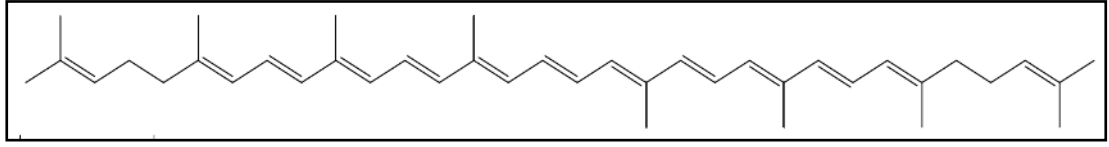
Antioksidanlar ROS'u inaktive eden koruyucu ajanlardır ve bundan dolayı oksidatif hasarı önemli ölçüde geciktirir veya önlerler. Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidanlar insan hücrelerinde doğal olarak bulunurlar. Buna ek olarak, vitamin E, vitamin C, polifenoller ve karotenoidler gibi antioksidanlar gıdalardan elde edilirler. Diyet kılavuzları kanser ve koroner arter hastalıklarını kapsayan kronik hastalıklar ile mücadele için zengin antioksidan kaynaklar olan bitkisel gıdaları fazlaca tüketmeyi önermektedir. Vitamin E, vitamin C, karotenoidler ve polifenoller gibi diyetle alınan antioksidanların hastalıkları

önlemedeki rolleri önemli bir ilgi odağı olmuştur. Bu antioksidanların önemli ölçüde anti-kanser ve anti-aterojenik özelliklere sahip olduğu görülmektedir. Meyve ve sebzelerle zengin diyetler pek çok kronik hastalık riskinde azalma ile ilişkilidir (101).

Oksidasyona karşı savunmada önemli olduğu düşünülen bir diğer diyetsetel antioksidan likopendir (105, 106).

2.2.1. Likopenin kimyası

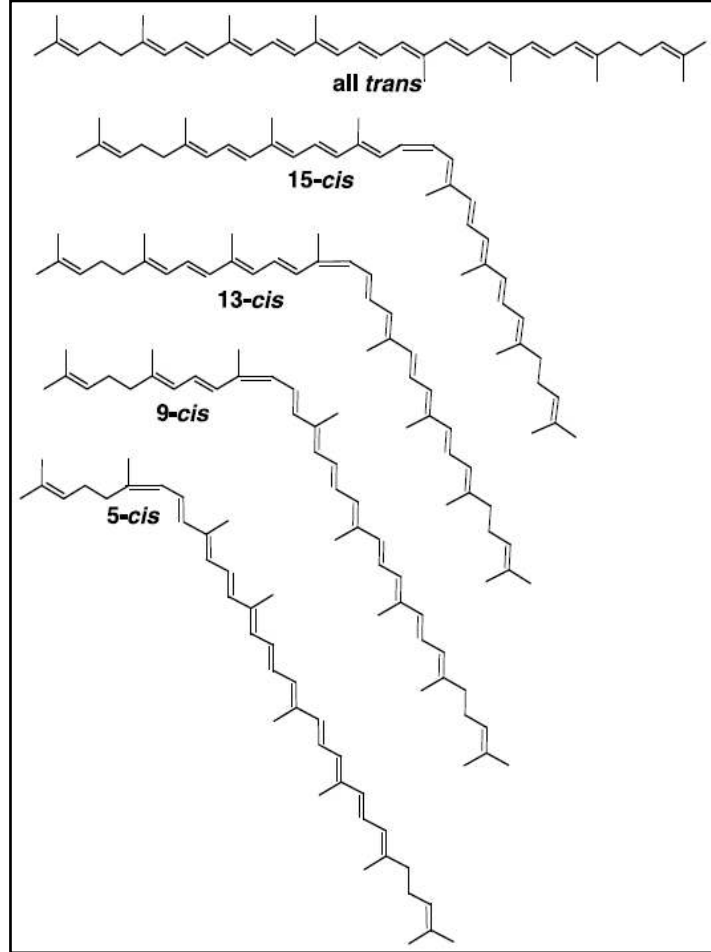
Likopen, bitkiler ve fotosentetik mikroorganizmalar tarafından sentezlenen 600'den fazla karotenoidden biridir (107). Bu doğal pigment hayvanlar tarafından sentezlenemez. Molekül ağırlığı 536 olan likopen, tetraterpen hidrokarbonlardan biri olup 40 karbon atomu ve 56 hidrojen atomundan oluşmaktadır (108) (Şekil 2.2.1). Likopen lipofilik bir hidrokarbondur ve kloroform, benzen ve eterde çözünürken metanol, etanol ve suda hemen hemen hiç çözünmezler. Likopenin 444, 470 ve 502 nm'de maksimum absorbands vermesi ona karakteristik kırmızı rengini ve elektronik olarak uyarılmış çeşitli türlerden enerji alma yeteneğini verir (107). Likopen, domateste (*Lycopersicon esculentum* L.) en fazla bulunan karotenoiddir ve türe bağlı olarak konsantrasyon aralığı 0.9-4.2 mg/100g arasında değişir (106).



Şekil 2.2.1. Likopenin yapısı (107).

İşlenmemiş domates ile karşılaştırıldığında, domates salçası ve ketçap, likopenin konsantre kaynaklarıdır (33–68 mg/100 g). Diğer yenilebilir likopen kaynakları kuşburnu (109), karpuz, papaya, greyfurt ve guava'dır (110). Karotenoidlerin hidrokarbon karoten sınıfına ait olan likopen asiklidir ve 11 konjuge ve 2 unkonjuge çift bağ içeren yüksek derecede doymamış bir hidrokarbondur (Şekil 2.2.1). Likopenin asiklik olması ve β -iyonon halkası içermemesinden dolayı, provitamin A aktivitesine sahip değildir ve biyokimyası β -karoten ve α -karoten gibi karotenlerden ayrıdır. Biyolojik olarak all-trans izomer olarak sentezlenen likopen, doğal kaynaklarda predominant olarak all-trans formda bulunur ki bu form termodinamik olarak en stabil formdur (107). Bununla birlikte, ışığa, ısıya veya bu çift bağların kimyasal reaksiyonlarına maruz kaldığında, likopenin çeşitli mono veya poli cis izomerlerinin üretimi gerçekleşir (106). Diyet likopeninin predominant olarak all-trans formda olmasına rağmen, insan serumunda ve dokularda likopen, %50'den fazla oranda cis-formlarda izomerik bir karışım halindedir (111). En yaygın cis izomerlerin yapıları Şekil 2.2.2'de gösterilmiştir. Likopenin uzamış konjuge polien zinciri elektronca zengin bir sistemdir ve elektrofilik reaktifler tarafından saldırılara karşı bir hedefdir. Bu nedenle likopen gibi karotenoidler stabil olmayıp serbest radikallere ve oksijene karşı yüksek derecede reaktiftirler (112). Likopen, oksidasyon ile ve OH' ve çeşitli peroksil radikaller gibi serbest radikaller ile hızlıca yıkılır.

Likopenin bu reaktivitesi onun biyolojik sistemlerdeki antioksidan aktivitesinin kaynağıdır ve bu durum likopenin bir kemoprevensiyon ajanı olarak etkinliğini destekleyebilir (107).



Şekil 2.2.2. Likopenin *trans* ve *cis* izomerlerinin yapısı (101).

En güçlü antioksidanlardan biri olan likopenin singlet oksijeni yakalama yeteneği β -karotenden 2 kat, α -tokoferolden 10 kat daha fazladır (113-116). İnsan plazmasındaki predominant karotenoid olan likopen düzeyi, yaşam biçiminden ve bazı biyolojik faktörlerden etkilenmektedir (117). Lipofilik doğasından dolayı likopen ve diğer karotenoidler serumda düşük dansiteli ve çok düşük dansiteli lipoprotein fraksiyonunda yoğun olarak bulunur (106). Ayrıca, likopen vücutta adrenal bez, testisler, karaciğer ve prostat bezinde yoğun bir şekilde toplanmıştır (111, 118-120). Tablo 2.2.1 çeşitli insan ve rat dokularındaki likopen düzeylerini göstermektedir. Doku-spesifik likopen dağılımı bu antioksidanın rolünde önemli olabilir. Bununla birlikte, diğer karotenoidlerden farklı olarak, serum ve dokulardaki likopen düzeyleri meyve ve sebzelerden total alınma miktarıyla tam olarak korelasyon göstermez (101, 121, 122).

Tablo 2.2.1. İnsan ve ratlardaki ortalama likopen düzeyleri (101).

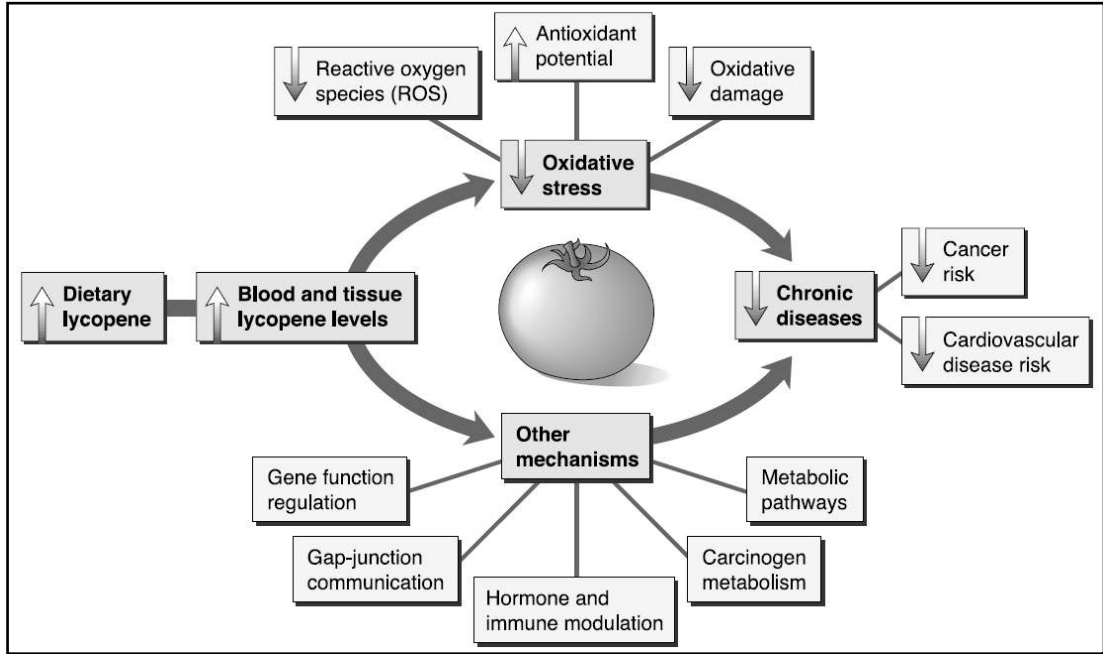
Tissue	Mean lycopene level (and SD), nmol/g wet weight	
	Humans	Rats
Testes	4.34–21.36	NA
Spleen	NA	21.21 (2.22)
Adrenal gland	1.90–21.60	NA
Liver	1.28–5.72	20.30 (1.90)
Prostate gland	0.80	0.32 (0.06)
Breast	0.78	NA
Pancreas	0.70	NA
Lung	0.22–0.57	0.115 (0.015)
Heart	NA	0.08 (0.03)
Kidney	0.15–0.62	NA
Colon	0.31	0.046 (0.006)
Skin	0.42	NA
Ovary	0.30	NA
Stomach	0.20	NA
Brain	ND	0.017 (0.006)

Note: SD = standard deviation, NA = not available, ND = not detectable.
*Fischer 344 male rats were fed the AIN-93M diet supplemented with 10 ppm of lycopene for 2 months (AIN = American Institute of Nutrition).

2.2.2. Likopenin etki mekanizmaları ve moleküler hedefleri

İnsanlardaki biyolojik etkileri vitamin A'dan farklı mekanizmalara yorulan likopenin antikarsinojenik ve antiaterojenik aktivitelerini açıklamak için iki majör mekanizma hipotezi önerilmektedir. Bunlar; nonoksidatif ve oksidatif mekanizmalardır. Kronik hastalıkların önlenmesinde likopen için önerilen mekanizmalar şekil 2.2.3' de özetlenmiştir.

Karotenoidler bitkilerde ışığı absorblar, fotosentez prosesi ile enerjiyi klorofile transfer eder ve foto-oksidatif hasara karşı korur (123, 124). İnsanlarda, karotenoidler primer olarak provitamin A'nın diyetel kaynağı olarak fonksiyon görürler (106). Bununla birlikte, likopen A vitamini oluşturmak için gerekli β -iyonon halka yapısı içermez ve provitamin A aktivitesine sahip değildir (125). Bu yüzden, likopenin insanlarda bilinen fizyolojik fonksiyonu yoktur. Buna rağmen, likopenin hücrelerdeki bazı potansiyel moleküler hedefleri saptanmıştır (107).



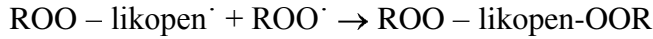
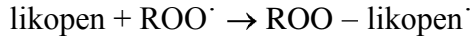
Şekil 2.2.3. Kronik hastalıkları önlemede likopenin rolü için önerilen mekanizmalar. Diyetel likopen vücutta likopenin artırır. Likopen antioksidan olarak ROS'u yakalayabilir, total antioksidan potansiyeli artırır veya lipidlere (lipoproteinler, membran lipidleri), proteinlere (önemli enzimler) ve DNA'ya (genetik materyal) karşı oksidatif hasarı azaltabilir. Böylece oksidatif stresi azaltır. Azalan oksidatif stres, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar için riskin azalmasına öncülük edebilir. Alternatif olarak, vücutta likopenin artması gen fonksiyonlarını regüle edebilir, hücrelerarası iletişimi geliştirir, hormon ve immün yanıtı düzenleyebilir veya metabolizmayı regüle edebilir. Bu yüzden, kronik hastalık riskini düşürebilir. Bu mekanizmalar ayrıca birbirleriyle ilişkili bir şekilde sağlığa faydalı olmak için aynı zamanda gerçekleşebilir (101).

2.2.2.1. Likopenin antioksidan aktivitesi

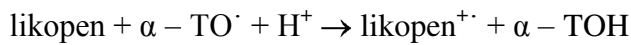
Reaktif oksijen türleri arasında; süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($OH^{\cdot}$), peroksil ($RO_2^{\cdot}$) ve alkoksil ($RO^{\cdot}$) radikalleri kadar singlet oksijen, ozon (O_3) ve H_2O_2 gibi hem okside edici ajan hem de kolayca radikallere dönüşebilen non-radikal türler bulunmaktadır (126). Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), tek elektron transferi ile mitokondrial respirasyon esnasında oksijenden oluşabilir ve hidroksil radikallerinin majör bir kaynağıdır. $O_2^{\cdot-}$, ya spontan olarak ya da süperoksit dismutaz enzimi ile hidrojen peroksit'e dönüşebilir. Bu madde membrandan transport olarak metal iyonları ile reaksiyona girerek orada hidroksil radikallerini oluşturur (127). $O_2^{\cdot-}$ 'nin varlığında geçiş metalleri indirgenir ve daha sonra bir Fenton reaksiyonu ile hidrojen peroksitten hidroksil radikallerinin oluşumunu katalizler. Demir ve bakır, hidroksil radikallerinin in vivo en uygun promotorlarıdır (128). Singlet oksijen 1O_2 , fotooksidasyonla, enzimatik olarak veya biyomembranların lipid peroksidasyon sürecinde oluşabilen bir başka yüksek derecede reaktif oksijen türüdür. Likopen, çok sayıdaki konjuge çift bağ sisteminden dolayı, singlet oksijeni ve serbest radikalleri yok edebilir (129). Yaklaşık 600 doğal karotenoid arasında en etkili singlet oksijen yakalayıcısının likopen olduğu bildirilmiştir (116).

ROS tarafından oluşan oksidatif stres sonucunda karbonhidratlar, proteinler, lipidler ve DNA gibi makromoleküller hasara uğrarlar ve bu durum karsinogenez, yaşlanma ve kardiyovasküler hastalıkların gelişimde rol oynayabilir. Likopen, singlet oksijen ve serbest radikal yakalayıcısı olarak oksidatif strese karşı koruyucu olabilmektedir. Likopen çeşitli mekanizmalar ile bir antioksidan olarak fonksiyon görebilmektedir. En iyi belgelenen mekanizmalardan birinin, singlet oksijeni (1O_2) yok etmesi olduğu düşünülmektedir (130). Singlet oksijen ile reaksiyon sonucu uyarılan likopen diğer moleküllerin uyarılmasına ve reaktif türlerin oluşumuna sebep olabilecek yeterli enerjiye sahip değildir. Onun fazla enerjisi çevre moleküllere bir seri vibrasyonel ve rotasyonel etkileşimler vasıtasıyla dağıtılır ve daha sonra rejenere olan karotenoid ilave singlet oksijen moleküllerini yakalayabilir. Bu yol ile binlerce singlet oksijen molekülleri bir tek likopen molekülü tarafından etkisizleştirilir (131). Bir karotenoidin serbest radikali etkisizleştirme kapasitesi primer olarak içerdiği konjuge çift bağ sayısına bağlıdır. Bu durum likopenin singlet oksijeni yakalamada neden çok etkili olduğunu açıklamaktadır (107).

Likopenin antioksidan aktivitesi için bir diğer mekanizma serbest radikaller ile reaksiyondur (112). Bu reaksiyonlarda oluşan karbon-merkezli karotenoid radikaller uzun polien zinciri tarafından resonant olarak stabilize edilir. Elektron dansitesi zincir boyunca uniform değildir ve sonlara doğru daha büyük olup, bu yüzden reaksiyon için tercih edilen bölgelerdir. Bu nedenle, bir tek likopen molekülü birden fazla serbest radikalin etkinliğini giderebilmektedir (130).



Ayrıca, likopenin vitamin E ve vitamin C radikallerini onararak in vivo bir antioksidan olarak davranabileceği de bildirilmiştir (132):



Likopenin hücre kültüründe peroksinitrit muamelesinin neden olduğu protein nitrasyonunu ve DNA zincir kırılmalarını inhibe ettiği gösterilmiştir (133). H_2O_2 ile muamele edilen Hep3B hücrelerinde, likopenin doza-bağımlı olarak DNA hasarını azalttığı bulunmuştur (134).

Likopenin prostat kanser hücrelerinde hücresel lokalizasyonu incelenmiş ve % 81'inin nükleusta lokalize olduğu belirtilmiştir (% 55 nüklear membranda ve % 26 nüklear matrikste) (135). Likopenin nükleustaki lokalizasyonu ile onun DNA koruyucu etkileri uyumludur (133, 134, 136).

2.2.2.2. Likopen ve antioksidan yanıt elementi (ARE)

ROS ve serbest radikallerin direkt etkisizleştirilmesine ek olarak, likopen antioksidan yanıt elementi (ARE)'ni upregüle edebilir ve bu nedenle süperoksit dismutaz, glutatyon S-transferaz ve quinon redüktaz gibi hücreleri ROS ve diğer elektrofilik moleküllerden koruyan hücresel enzimlerin üretimini stimüle eder. Örneğin; likopenin HepG2 ve MCF-7 hücrelerinde ARE'yi Nrf2 nükleer transkripsiyon yolağı aracılığıyla upregüle ettiği gösterilmiştir (137). Buna ek olarak, androjene duyarlı prostat hücrelerinde (LNCaP) ARE tarafından regüle edilen protein ekspresyonlarının, likopenin tarafından arttırıldığı gösterilmiştir (107). Bu proteinler arasında epoksit hidrolaz 1 (EPHX1), süperoksit dismutaz-1 (SOD-1), katalaz (CAT) ve metal bağlayıcı protein transferin (TF) bulunmaktadır. Bu nedenle, likopen sadece antioksidan olarak fonksiyon görmez aynı zamanda DNA, lipidler ve proteinlere hasar verebilecek ROS ve diğer elektrofilik türlere karşı hücreleri korumaya yardımcı olan enzimlerin üretilmesi için stimülasyon yapar (107).

2.2.2.3. Apoptozis

Komşu hücrelere ve dokulara zarar vermeden hücrelerin eliminasyonuna öncülük eden bir seri programlı olaylar dizisi olan apoptozis, sağlıklı, aşırı veya anormal hücrelerin ölümü ile sağlığı korumaya katkıda bulunur. Hasarlı hücreler apoptozise uğramazlarsa, immortal olurlar ve kanser hücreleri oluşturabilirler. Son zamanlarda, insan prostat kanser hücreleri ve diğer dokulardan hücre dizileriyle yapılan çalışmalarda likopenin apoptozisi uyardığı ve bu yüzden kemoterapötik bir ajan olarak potansiyele sahip olabileceği bildirilmiştir. LNCaP hücrelerinde likopenin apoptozisi konsantrasyona bağımlı olarak indüklediği bildirilmiştir (138). LNCaP hücrelerinde apoptozisin spesifik indikatörlerinden mitokondrial fonksiyonun azalması, mitokondrial transmembran potansiyelinin düşmesi, mitokondrial sitokrom c'nin salınması ve anneksin V bağlanması artışı gözlenmiştir. Likopenin androjen-bağımsız hücre dizisi PC3 hücrelerinde de apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (139). İnsan kolon karsinoma hücrelerinin de likopen ile muamelesinin apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (140).

2.2.2.4. Hücre döngüsünün durdurulması

Kanser hücreleri proliferasyon hızını kontrol etme ve hücre siklusunu regüle etme yeteneğini kaybetmiştir. Likopenin G1 fazında hücre siklusunu durdurabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Hep3B insan hepatoma hücrelerinin büyümesinin likopen tarafından % 20-50 inhibe edildiği bulunmuştur (134). Spesifik olarak, likopenin G0/G1 durdurulmasını ve S faz blokasyonunu indüklediği bulunmuştur. İnsan LNCaP ve PC3 prostat kanser hücre dizilerinde yapılan benzer bir çalışmada likopenin G0/G1 fazında mitotik durdurulmayı indüklediği ve buna siklin D1 ve E ile siklin bağımlı kinaz 4 düzeylerinde azalmanın aracılık ettiği gösterilmiştir (141). Siklin D1'in azalması yoluyla G0/G1 fazında hücre siklus progresyonunun, insan meme MCF-7 ve endometrial ECC-1 kanser hücrelerinde, likopen tarafından inhibe

edildiği gösterilmiştir (32). Rb ve p53 anti-onkogenlerin fosforilasyonunun baskılanması yoluyla likopen, fare hepatositlerinin bölünmesini G0/G1 hücre siklus fazında inhibe etmektedir (142). Likopenin degradasyon ürünü olan apo-10'-likopenoik asitin 0.5-10 μM 'lık konsantrasyonlarda, siklin E düzeylerinin azalması ve hücre siklus regülatuar proteinleri p21 ve p27 düzeylerinin artışı ile G1/S fazında, insan akciğer kanser hücre dizisi A549'un büyümesinin durdurulmasını sağladığı bildirilmiştir (143). Likopenin antiproliferatif etkileri ayrıca insan meme kanser hücre dizisi MCF-7 (144), rat prostat kanser AT3 hücreleri (145), primer insan prostat epitelyum hücreleri (146), insan eritrolösemi hücre dizisi K562, Raji hücreleri ve insan kolon kanser HuCC hücrelerinde de gösterilmiştir (140).

2.2.2.5. Büyüme faktörleri ve sinyal yolları

Platelet-kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) dermal fibroblast kemotaksisi için bir mitojen olarak fonksiyon görür (147) ve tümör anjiyogenezini stimüle edebilir (148). PDGF, melanomanın büyümesini, invazyonunu ve metastazını kolaylaştırdığından dolayı, PDGF'nin bu etkilerinin inhibisyonu melanoma progresyonunun durdurulması için bir mekanizma olabilir. İnsan fibroblast hücre dizisi Hs68 ve insan metastatik melanoma hücre dizisi A2058 ile hem tek tek hem de birlikte kültür sisteminde yapılan in vitro çalışmalarda, likopenin PDGF ile indüklenen Hs68 migrasyonunu inhibe ettiği, PDGF ile indüklenen fosforilasyonu azalttığı ve PDGF ile indüklenen sinyali zayıflattığı gösterilmiştir (149). Buna ek olarak likopenin insan plazmasında PDGF'ye bağlandığı bildirilmiştir (107). Bu yüzden, bu in vitro çalışmalar likopenin melanoma gelişimini kontrol etmeye yardımcı olabileceğini göstermektedir (107).

2.2.2.6. Hücre invazyonu ve metastaz

Yüksek derecede invaziv insan hepatoma hücre dizisi SK-Hep-1 ile yapılan çalışmalarda likopenin antimetastatik ve anti-invazyon aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Likopenin 5 ve 10 μM 'lık dozlarının matriks metalloproteinazlar MMP-2 ve MMP-9'un jelatinolitik aktivitelerini azalttığı ve SK-Hep1 hücrelerinin adhezyon, invazyon ve migrasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (40). Benzer likopen konsantrasyonlarının SK-Hep1 hücrelerinde MMP-9 ekspresyonlarını baskıladığı başka bir çalışmada doğrulanmış (150) ve nm23-H1 metastaz baskılayıcı geni indüklediği bulunmuştur (41). Bu çalışmalar, hepatokarsinoma hücrelerinin invazyonu ve metastazının likopen tarafından inhibe edilebileceğini göstermektedir.

Bunlara ek olarak oksidatif olmayan mekanizmalar arasında, likopenin antikarsinojenik etkilerinin fare embryo fibroblast hücrelerinde gap-junction iletişiminin regülasyonundan dolayı olduğu gösterilmiştir (151, 152). Rat karaciğerinde karsinojenin uyardığı preneoplastik lezyonlara karşı koruyucu mekanizmanın, karaciğer metabolize edici enzim olan sitokrom P450 2E1'in likopen indüklü modülasyonu olduğu önerilmiştir (153). Likopen çeşitli kanser hücre dizilerinde güçlü mitojenlerden olan insulin-benzeri büyüme faktörleri ile indüklenen

hücrel proliferasyonu azaltır (21). İntratinik T-hücre farklılaşmasındaki regülasyonunun (immüno-modülasyon), farelerde likopen muamelesi ile meme tümör büyümesinin baskılanması için bir mekanizma olabileceğini göstermektedir (154, 155). Likopenin ayrıca HMG-CoA (3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A) redüktazı inhibe etmek suretiyle hipokolesterolemik bir ajan olarak davrandığı da gösterilmiştir (156).

2.2.3. Epidemiyolojik kanıtlar

2.2.3.1. Kanser

Aralarında domatesin de bulunduğu, sebze ve meyveden zengin akdeniz diyetinin bölgedeki daha düşük kanser oranlarından sorumlu olduğu gösterilmiştir (157). Domates ve domates ürünlerinin diyetle alınmasının daha düşük kanser riski ile ilişkili olduğu bazı epidemiyolojik çalışmalarda bulunmuştur (24). Yüksek oranda domates alınmasının bir vaka-kontrol çalışmasında sindirim yolu kanserlerine karşı koruyucu etkileri olduğu (158) ve yaşlı bir ABD popülasyonunun kanserden ölüm oranında %50'lik bir azalma gösterdiği bildirilmiştir (159). En etkileyici sonuç 'ABD Health Professionals Follow-up Study'den (25) gelmiş olup çeşitli karotenoidler ve retinol alımının prostat kanser riskiyle ilişkisini değerlendirmiştir. Çeşitli domates ürünlerinden tahmini likopen alımı prostat kanser riskiyle zıt bir şekilde ilişkilidir ve bu sonuç herhangi diğer karotenoid ile gözlenmemiştir. Haftada 10 veya daha sık bir domates ürünü tüketimi sonucu riskte neredeyse %35'lik bir azalma gözlenmiştir ve hatta koruyucu etki daha ileri veya agresif prostat kanserinde daha kuvvetlidir (101). Likopenin serum ve doku düzeylerinin meme kanseri (160) ve prostat kanseri (23, 161) riskiyle de zıt olarak ilişkili olduğu ve β -karoteni de içeren diğer önemli karotenoidlerle ise önemli bir bağlantı olmadığı gösterilmiştir (23, 161). Prostat kanserli hastalarda likopen düzeyinin düşük olduğu ve serum lipidleri ve proteinlerin oksidasyonunun yüksek düzeylerde olduğu bulunmuştur (161).

Domates ve domates kaynaklı ürünlerin, likopen ve kanserin incelendiği, aralarında ekolojik, vaka-kontrol, diyet ve kan örneğini baz alan 72 epidemiyolojik çalışmayı konu alan bir raporda (24) ortaya şu sonuçlar çıkmıştır: 57 çalışmada domates alımı veya dolaşımdaki likopen düzeyi ile bazı kanser türlerinin riski arasında zıt bir durum söz konusudur; 35 vakada ilişki istatistiksel olarak anlamlıdır. Fazla miktarda domates tüketimi veya yüksek likopen düzeylerinin yan etkilerini gösteren bir çalışma yoktur. Domates ekstraktının oleoresin kapsülleri olarak takviyesinin prostat kanserli hastalarda prostat spesifik antijen düzeylerini azalttığı bildirilmiştir (101).

Likopenin kanserin önlenmesindeki rolüne dair epidemiyolojik kanıtların ikna edici olmasına rağmen, bu rol ispatlanmamıştır. Araştırmacıların çoğu domates veya ürünü olan likopenin lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidatif hasarına etkilerini incelemişlerdir (162-164). Likopenin bu kritik hücrel biyomolekülleri koruyarak, karsinogenezi ve aterosklerozisi önlediği iddia edilmektedir (162-164).

Sağlıklı insanlarda, likopen veya domates içermeyen diyetler likopen kaybına ve lipid oksidasyonunda artışa sebep olurken (165), diyet yoluyla 1 haftalık likopen alımı serum likopen düzeylerini arttırmaktadır ve lipidler, proteinler, lipoproteinler ve DNA'nın endojen oksidasyon düzeylerini azaltmaktadır (162, 163).

2.2.3.2. Kardiyovasküler hastalıklar

Kan dolaşımında kolesterol taşıyan düşük dansiteli lipoproteinlerin oksidasyonu aterosklerozis oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (166, 167). Antioksidan gıdaların oksidatif hasarı inhibe etme yeteneğinden dolayı ateroskleroz gelişimini yavaşlattığına inanılmaktadır (167, 168). Bazı kontrollü klinik deney ve epidemiyolojik çalışmalarda antioksidan özelliklerine atıf yapılan E vitamininin koruyucu etkileri olduğu belirtilmiştir (169, 170). Bununla birlikte, Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) çalışmasında 400 IU/d E vitamininin yüksek riskli hastalara 4.5 yıl verilmesinin kardiyovasküler durum üzerine herhangi bir faydalı etkisinin olmadığı gösterilmiştir (171). Buna karşın, likopen içeren domates ve domates ürünlerinin tüketimini gösteren çalışmalar kardiyovasküler hastalık riskinin azaldığını göstermiştir (156, 162, 172). Çok merkezli bir vaka-kontrol çalışmasında, akut miyokard enfarktüsü ile antioksidan durum arasındaki ilişki değerlendirilmiştir (172). Bu çalışmada, maruz kalmadaki değişkenliği maksimize etmek için kişiler 10 avrupa ülkesinden toplanmıştır. Ayrıca, uzun süreli maruziyette kan antioksidan düzeylerinden daha iyi bir indikatör olan adipoz doku antioksidan düzeyleri, antioksidan durum belirteci olarak kullanılmıştır. Adipoz dokunun biopsi örnekleri enfarktüstten sonra direkt alınmış ve çeşitli karotenoidler analiz edilmiş ve β -karoten düzeylerinin değil ama sadece likopen düzeylerinin koruyucu olduğu bulunmuştur. Bir başka çalışmada, daha düşük kan likopen düzeylerinin artmış risk ve koroner arter hastalığından ölüm ile ilişkili olduğu bulunmuştur (173).

2.2.4. Gıda kaynakları ve biyoeldeelilebilirlik

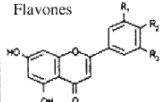
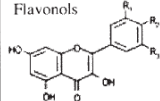
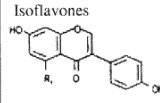
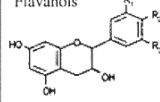
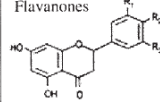
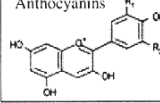
Domates, karpuz, pembe greyfurt, kayısı ve pembe guava'yı içeren kırmızı meyve ve sebzeler likopen içermektedir (101). Domates suyu, ketçap, ezme, salça, sos ve çorba gibi işlenmiş domates ürünlerindeki hepsi de likopenin iyi birer diyet kaynağıdır. Farklı domates ürünlerinden likopenin karşılaştırmalı biyoeldeelilebilirlik değerleri bilinmemesine rağmen, işlenmiş domates ürünlerindeki likopenin çiğ domatese göre daha biyoeldeelilebilir olduğu görülmektedir (174, 175). İşlenmeden dolayı likopenin gıda matriksinden salınımı, diyet lipidlerinin varlığı ve bir all-trans'dan bir cis konformasyonuna ısı ile indüklenen izomerizasyonu likopenin biyoeldeelilebilirliğini artırır (101). Likopenin biyoeldeelilebilirliği ayrıca dozajdan ve β -karoten gibi diğer karotenoidlerin varlığından da etkilenmektedir. Likopenin β -karoten ile birlikte alınmasındaki biyoeldeelilebilirliği tek başına alınmasına göre önemli ölçüde daha yüksektir (176).

2.3. Apigenin

Kansere karşı korunmayı sağladığı düşünülen bitkisel kaynaklı temel ajanlar arasında flavonoidler ve diyetel lifler bulunmaktadır. Flavonoidler en yaygın ve geniş dağılım gösteren polifenolik bileşikler olup her tarafta rastlanılabilen bitki orjinli gıdalarda mevcuttur (177).

Flavonoidler, kimyasal tanımlama olarak bir veya daha çok hidroksil gruba sahip müşterek bir fenilkromanon yapısından (C6-C3-C6) oluşan maddeler olup yaklaşık 5000 bileşiği kapsar (177). Bunlar genel olarak, flavonlar, flavanoller (kateşinler), izoflavonlar, flavonoller, flavanonlar ve antosiyaninler olarak sınıflandırılırlar (Tablo 2.3.1).

Tablo 2.3.1. Yaygın olarak bulunan bazı bitki flavonoidlerinin kimyasal yapısı ve kaynağı (177).

Structure	Representative flavonoids	Source
	R1=H, R2=OH: Apigenin R1=R2=OH: Luteolin	Celery, parsley, thyme, onions etc. Red pepper, onions, lettuce, berries etc.
	R2=OH, R1=R3=H: Kaempferol R1=R2=OH, R3=H: Quercetin R1=R2=R3=OH: Myricetin	Black tea etc. Olive oil, apple peels, kale etc.
	R1=H: Daidzein R1=OH: Genistein	Soybeans, legumes etc. Soybeans, legumes etc.
	R1=R2=OH, R3=H: Catechins R1=R2=R3=OH: Gallocatechin	Green tea etc. Green tea etc.
	R1=H, R2=OH: Naringenin R1=R2=OH: Eriodictyol R1=OH, R2=OCH3: Hesperetin	Citrus fruits, grape fruits etc. Tomatoes, mint, citrus fruits etc. Citrus fruits, grape fruits etc.
	R1=H, R2=H: Pelargonidin R1=OH, R2=H: Cyanidin R1=R2=OH: Delphinidin R1=OCH3, R2=OH: Petunidin R1=R2=OCH3: Malvidin	Aubergines, radishes etc. Red wine, beans, berries etc. Pomegranate, cherries, berries etc. Cherries, strawberries etc. Cherries, berries, blackcurrants etc.

Flavonlar ve flavonoller yapısal olarak benzer olup, flavonoller 3. karbon pozisyonunda ekstra bir hidroksile sahiptir. Flavonoidlerin birçok memeli sisteminde in vitro ve in vivo çeşitli biyolojik etkiler sergilediği gösterilmiştir. Bu moleküller serbest radikal tutucusu ve antioksidan olarak davranır ve antimutajenik, antienflamatuar, antiviral ve purgatif etkiler gösterirler. Ayrıca, flavonoidler tarafından indüklenen diğer biyolojik etkilerden bazıları, düşük dansiteli lipoproteinlerin azaltılması, trombosit agregasyonunun inhibe edilmesi ve hücre proliferasyonunun azaltılması olarak söylenebilir (177-181). Bu etkiler onların hücre döngüsünü inhibe etme, oksidatif stresi azaltma, detoksifikasyon enzimlerinin

etkinliğini arttırma, apoptozisi indükleme ve immün sistemi stimüle etme faaliyeti ile ilişkilidir (177, 178, 180, 181). Flavonoidlerin yapısındaki bu özellikler onların, sağlık-arttırıcı ve kanser önlenmesindeki etkinliğini de içeren hastalık-önleyici diyetel etkilere sahip yararlı bileşikler sınıfında olarak kategorize edilmesini sağlar. Bu moleküllerin ek bir yararı da çok az toksik olmasıdır ki bu onları kemoprevensiyon protokolleri için önemli bir seçenek yapar (177).

Apigenin; maydonoz, soğanlar, portakal, çay, papatya, bazı baharatlar ve buğday filizleri gibi yaygın meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunmaktadır (177). En fazla apigenin içeren bitkiler Tablo 2.3.2’de gösterilmektedir. Apigeninin kemopreventif özellikleri ilk olarak Birt ve ark. (182) tarafından gösterilmiştir. Yapılan çalışmada, apigeninin fare derisinde TPA ile indüklenen ornitin dekarboksilaz aktivitesinin inhibisyonu yoluyla antimitojenik ve anti-promosyon özellikleri gösterilmiştir. Apigenin ile yapılan bu başlangıç çalışmaları bir kemopreventif ve/veya kemoterapötik olarak apigeninin gelişiminde daha fazla bir ilgi oluşturmuştur.

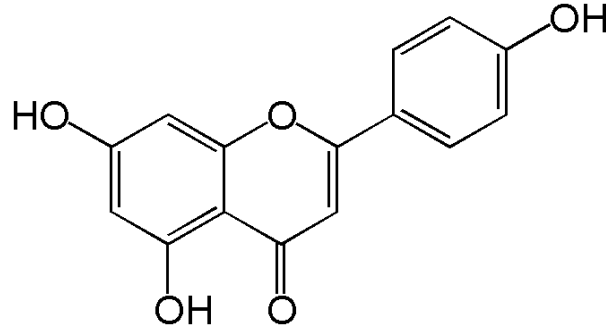
Tablo 2.3.2. En yüksek miktarda apigenin içeren bazı bitki türleri ve parçaları (177).

<i>Achillea millefolium</i>	Yarrow (plant)
<i>Apium graveolens</i>	Celery (plant)
<i>Artemisia dracunculus</i>	Tarragon (plant)
<i>Camellia sinensis</i>	Tea (leaf)
<i>Chamaemelum nobile</i>	Perennial chamomile (plant)
<i>Coriandrum sativum</i>	Cilantro (fruit)
<i>Digitalis purpurea</i>	Purple foxglove (flower)
<i>Echinacea spp</i>	Coneflower (leaf)
<i>Ginkgo biloba</i>	Biloba (leaf)
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Licorice (root)
<i>Linum usitatissimum</i>	Flax (plant)
<i>Marrubium vulgare</i>	Horehound (plant)
<i>Matricaria retcutita</i>	Annual chamomile (plant)
<i>Mentha spicata</i>	Spearmint (leaf)
<i>Ocimum basilicum</i>	Basil (plant)
<i>Origanum vulgare</i>	Oregano (plant)

2.3.1. Apigeninin kimyasal yapısı ve özellikleri

Apigenin flavon yapısal sınıfına ait bir flavonoid olup kimyasal olarak 4', 5, 7,-trihidroksiflavon olarak bilinmektedir (Şekil 2.3.1). Apigenin düşük molekül ağırlıklı bir flavonoid (MA: 270.24) olup saf formu sarıdır. Apigenin suda neredeyse hiç çözünmezken sıcak alkolde orta derecede, dilüe KOH ve DMSO’da çözünür (177). Saf apigenin yüksek derecede stabil değildir ve -20°C’de saklanması önerilmektedir (177). Yüzyıllardır apigeninden faydalanılmaktadır. Örneğin, yüksek seviyede apigenin içeren passion flower bitkisi astım, intransigent insomnia, Parkinson hastalığı, nevralsi ve zona gibi hastalıkları tedavi etmek için etkili bir şekilde kullanılmaktadır (177). Apigenin antispazmodik, antiflojistik ve antibakteriyel

etkileriyle bilinen papatyanın majör bir bileşenidir. Papatya çayı asırlardır hazımsızlığı azaltma veya gastriti rahatlatmak için halk arasında kullanılmaktadır (177). Ayrıca papatya preparatları cilt bakım ürünlerinde kütanöz enflamasyonu ve diğer dermatolojik hastalıkları azaltmak için de yaygın olarak faydalanılmaktadır (183). Tüm papatya bitkisinin alkolik tentürü gargara, krem veya merhem gibi şekillerde topikal olarak ve ayrıca vapor inhalant olarak da kullanılmaktadır (177). Son yıllarda ise apigenin bir kanser kemopreventif ajanı olarak tanınmaktadır.



Şekil 2.3.1. Apigeninin kimyasal yapısı (177), (<http://en.wikipedia.org/wiki/Apigenin>).

2.3.2. Apigeninin biyolojik özellikleri

Apigenin, son yıllarda yararlı ve sağlık arttırıcı bir ajan olarak özel bir ilgi kazanmıştır. Yapısal olarak ilişkili diğer flavonoidler ile karşılaştırıldığında, kanser hücrelerine göre normal hücrelerde düşük toksisiteye sahiptir (49). Çeşitli çalışmalar apigeninin antioksidan, antimutajenik, antikarsinojenik, antienflamatuar, antiproliferatif ve antiprogresyon özelliklerine sahip olduğunu teyit etmiştir. Apigeninin, Chinese hamster ovaryum hücrelerinde nitropiren ile indüklenen genotoksisiteye karşı antimutajenik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (184). Ayrıca benzopiren ve 2-aminoantrasen ile indüklenen bakterial mutagenezi de inhibe ettiği gösterilmiştir (184). Çeşitli laboratuvar çalışmaları hücre kültüründe ve in vivo tümör modellerinde apigeninin metal şelasyonunu arttırdığı, serbest radikalleri tuttuğunu ve faz II detoksifikasyon enzimlerini stimüle ettiğini göstermiştir (185). Karsinojenik müdahaleden önce apigenin muamelesinin hayvan deri ve kolon kanser modellerinde koruyucu bir etki gösterdiği bildirilmiştir (186, 187). Apigenin, tümör promosyonunda majör rol oynayan bir enzim olan ornitin dekarboksilazın güçlü bir inhibitörüdür (45). Bunlara ek olarak, apigenin glutatyonun hücre içi konsantrasyonunu artırır ve oksidatif strese karşı endojen savunmayı güçlendirir (188). Apigeninin antikarsinojenik etkisi bir cilt karsinogenez modelinde de gösterilmiştir. Apigeninin topikal uygulanması dimetil benzantrasen ile indüklenen cilt tümörlerini inhibe etmektedir (45). Apigenin ayrıca UV ile indüklenen kanser insidansını azalttığı ve benzer deneylerde tümörsüz canlılığı arttırdığı gösterilmiştir.

(186). LPS ile indüklenen siklooksijenaz-2 ve nitrik oksit sentaz-2 aktivitesinin ve fare makrofajlarındaki ekspresyonun baskılanması, apigeninin antienflamatuar özelliklerini göstermektedir (189). Başka bir çalışmada, apigenin muamelesi, yapısal ve tümör nekrosis faktör- α (TNF- α) ile indüklenen nükleer faktör (NF)- κ B aktivasyonunu endotelial hücrelerde baskıladığı bildirilmiştir (190). Bazı çalışmalar apigeninin geniş ölçüde moleküler sinyal etkileri sergilediğini de göstermiştir (191). Apigenin, protein kinaz C aktivitesini, MAP kinazı, C3H1 fare embriyonik fibroblastlarını ve v-H-ras ile transforme edilen NIH3T3 hücrelerinde downstream onkogenleri inhibe etmektedir (192, 193). Apigenin, protein-tirozin kinazların iyi bilinen bir inhibitörü olup izole edilen hepatositlerde bir MAPK olan peroksizom proliferasyon ile regüle edilen kinazı bloke ettiği gösterilmiştir (194). Ayrıca apigenin neonatal rat kardiyak miyositlerinde, kalsiyumun dışa doğru itilmesini sağlayan önemli bir protein olan Na⁺/Ca²⁺ dönüştürücüsünün ekspresyonunu azaltmaktadır (195). Apigenin muamelesi sonucunda fosforillenmiş EGFR tirozin kinaz ve diğer MAPK'lar ile onların nükleer substratı olan c-myc'nin düzeylerini azaltır ve anaplastik tiroid kanser hücrelerinde apoptozise sebep olduğu bilinmektedir (196). Bunlara ek olarak, apigeninin hem insan prostat hem de meme kanser hücrelerinde kazein kinaz-2'nin ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (197, 198).

Apigenin etkilerini hücre döngüsü üzerinde de göstermektedir. Bir dizi malign hücrelerin apigenin ile muamelesi, artan p53 protein stabilitesi ile birlikte, p34 (cdc2) kinaz aktivitesini inhibe ederek geri dönüşümlü G2/M ve G0/G1 durmasını indükler (199, 200). Apigenin, LNCaP ve DU145 hücrelerinde, WAF1/p21 düzeylerini indükleyerek hücre döngüsünün durmasını indükler (201, 202). Ayrıca, çeşitli malign hücrelerde de apigeninin apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (48, 203, 204). Apigenin muamelesi Bax/Bcl-2 oranını apoptozisten yana değiştirmektedir ve bu durum kaspaz aktivasyonu ve PARP kesimine öncülük eden sitokrom c'nin salınımı ve Apaf-1'in indüksiyonu ile ilişkilidir (202). Apigenin, proteaz üretimini regüle ederek tümör hücre invazyonu ve metastazını inhibe etmede de etkilidir (205). Apigenin ayrıca TNF α ile indüklenen intraselüler adhezyon molekülü-1 upregülasyonunu da inhibe etmektedir (206). Bazı in vivo çalışmalarda, apigeninin endotelium ile tümör hücrelerinin etkileşimini bozarak, melanoma akciğer metastazlarını inhibe ettiği gösterilmiştir (207). Buna ek olarak, endotelial hücrelerin apigenin ile muamelesi, HIF-1 α 'nın degradasyonu yoluyla, anjiyogenezde önemli bir faktör olan VEGF ekspresyonunun baskılanması ile sonuçlanmaktadır (208). İnsan ovaryum kanser hücrelerinde apigeninin, PI3K/Akt/p70S6K1 ve HDM2/p53 yoluyla aracılığıyla, HIF-1 α ve VEGF ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (209). Apigenin, insan plasental mikrozomlarda, aromataz ve 17- β -hidroksisteroid dehidrogenaz aktivitelerinin de etkili bir inhibitörüdür ve sonuçta steroid metabolizmasını etkiler (210). Dişi farelere apigenin verilmesinin uterin ağırlıkta ve östrojen reseptörü- α 'nın uterin konsantrasyonunda önemli bir artışa neden olduğu gösterilmiştir (211). Androjen bağımlı insan prostat kanser hücreleri olan LNCaP

hücrelerinde PSA'nın intraselüler ve sekrete edilen düzeyleri apigenin ile azalmaktadır (201). Oral yol ile apigenin verilmesi, prostat tümör zenograftlarında IGF-1 düzeylerini baskılar ve IGF-1'in vasküler dolaşımda tutulmasını sağlayan bir bağlayıcı protein olan IGFBP-3 düzeylerini arttırır (212). Bu  alışmalar apigeninin hormon-ililşkili kanserlerde de inhibe edici bir potansiyeli olduğunu göstermektedir.

Apigeninin diğer önemli hedefleri ise her biri kanser gelişimi ve progresyonu ile ililşkili olan, ısı çok proteinleri (208), telomeraz (213), yağ asit sentaz (214), matriks metalloproteinaz (215), aril hidrokarbon reseptör aktivitesi (216) ve HER2/neu (217)'dur.

2.3.3. Apigenin ve kanser

Potansiyel antioksidan ve antienflamatuar aktiviteleri, apigeninin olası sağlık faydalarına olan ilgiyi arttırmaktadır. Epidemiyolojik ve vaka-kontrol çalışmalarından artan sayıda elde edilen kanıtlar bitki flavonoidlerinin daha fazla alımının kanseri de içeren kronik hastalık riskini azalttığını göstermektedir (218, 219).

Kemopreventif özelliklere sahip olduğu çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda gösterilen (220, 221) flavonoidlerin, aralarında akciğer, meme ve prostat kanser hücrelerinin de bulunduğu tümör hücrelerinin in vitro çoğalmasını inhibe ettiği bildirilmiştir (222-224).

Buna ek olarak flavonoidlerin çeşitli in vitro çalışmalarda antianjiyogenik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (44, 225). Fotsis ve ark. apigenin ve 3-hidroksiflavonun, sığır kapiller endotelyal hücrelerin proliferasyonunu ve in vitro anjiyogenezi genistein molekülünden daha güçlü bir şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir (44, 226).

Not: Genel bilgilerin yazılmasında ana kaynak olarak 7, 95, 101, 107, 177. yayınlar kullanıldı.

GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Hücre kültürü

Endotelial hücreler olarak HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) kullanıldı. Hücreler 1 mL'lik sekonder kültür halinde ve EGM-2 besiyerinde dondurulmuş olarak BD' den temin edildi ve sıvı azotta saklandı. Bir tüpte yaklaşık 500.000 hücre bulunmaktadır. Hücreler, jelatin ile kaplanmış 75 cm²'lik flasklarda çözüldü. EGM-2 besiyeri günaşırı yenilendi. Hücreler flaskı tam olarak kaplamadan önce yeni flasklara pasajlandı.

4-6. pasajlardaki hücreler deneylerde kullanıldı. Deneyler için hücreler 75 cm²'lik, 25 cm²'lik flasklarda veya 6, 12 veya 24 kuyucuklu petrilere hazırlanmış olan EGM-2 besiyeri içinde, 37 °C sıcaklık, % 5 CO₂ ve % 95 nem içeren ortamda üretildi.

3.1.1. Flaskların ve çok kuyucuklu petrilere hazırlanması

Jelatin solüsyonu 37 °C' lik su banyosunda berraklaşana kadar bekletildikten sonra 1:1 oranında steril fofat tamponlu tuz (PBS) ile karıştırıldı ve filtreden geçirildi. Hücre kültürünün yapılacağı flasklara veya kuyucuklu petrilere yeterli miktarda ilave edildikten sonra etüvde 37 °C' de yaklaşık 30 dakika bekletildi. Fazla miktardaki jelatinin alınmasının ardından endotelial hücre kültürüne uygun hale gelmiş oldu.

3.1.2. Hücrelerin pasajlanması

İlk alınan hücreler deneylerde kullanılmadan pasajlama işlemlerine geçildi. Flasklarda besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra 10 mL HEPES tamponlanmış tuz solüsyonu ile yıkandı. Tripsini inhibe edebilecek serumu uzaklaştırmak için yapılan bu işlemde sonra 75 cm²'lik flask için 5 mL tripsin eklendi. Ardından 2-3 dakika 37 °C' de inkübe edilen hücreler kaldırıldı. Flaskın içerisine 10 mL tripsin nötralize edici solüsyon eklendi, steril 50 mL'lik tüplere konuldu ve 180 x g' de 7 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden alınan hücrelerin üzerindeki medyum yenilendi ve hücreler pipet ile yukarı-aşağı işleminden sonra eşit miktar jelatinize edilmiş flasklara bölündü.

3.1.3. Hücrelerin dondurulması

Pasajlanan flaskların bir bölümü donduruldu. Bunun için 50 mL'lik steril tüpe aşağıdaki şekilde dondurma solüsyonu hazırlandı ve santrifüjden alınan hücrelerin üzerine eklenerek 2 mL lik dondurma tüplerine pipetlendi. Bu tüpler, daha önce

izopropanol konulan kademeli dondurma kabına yerleştirilerek – 80 °C’ de yaklaşık 1 gün bekletildi. Buradan alınan hücreler hızlıca sıvı nitrojen tankına yerleştirildi.

Hücre dondurma solüsyonu:

- % 80 EBM-2 besiyeri
- %10 FBS
- %10 DMSO

3.1.4. Hücre kültüründe kullanılan solüsyonlar

Endotelial üretme besiyeri (EGM-2: Endothelial Growth Medium) (Lonza):

EGM-2 sıvı besiyeri hazırlanırken aşağıdaki bileşenler steril koşullarda besiyerine eklendi.

- Endotelial hücre bazal besiyeri (EBM-2: Endothelial Cell Basal medium-2): 500 mL’lik sıvı besiyeri + 2-8 °C’de saklanır.
- Fetal Sığır serumu (FBS): 10 mL FBS besiyerine eklenir. Son konsantrasyonu % 2’ dir.
- Antibiyotik- Antimikotik solüsyon: 5 mL’lik solüsyon besiyerine eklenir. Medyumun total hacminin % 1’ini oluşturmaktadır.
- Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF): 0.5 mL’lik solüsyon besiyerine eklenir.
- Fibroblast büyüme faktörü (FGF): 2 mL’lik solüsyon besiyerine eklenir.
- Hidrokortizon: 0.2 mL’lik solüsyon besiyerine eklenir.
- İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1): 0.5 mL’lik solüsyon besiyerine eklenir.
- Epidermal büyüme faktörü (EGF): 0.5 mL’lik solüsyon besiyerine eklenir.
- Askorbik asit: 0.5 mL’lik solüsyon besiyerine eklenir.
- Heparin: 0.5 mL’lik solüsyon besiyerine eklenir.
- Gentamisin sülfat: 0.5 mL’lik solüsyon besiyerine eklenir.

Yukarıda sıralanan maddeler karıştırıldıktan sonra hazırlanan sıvı besiyeri 100 mL'lik steril şişelere eşit olarak paylaştırıldı ve kullanılmadığı sürece +4 °C'de saklandı (pH: 7.2-7.4).

Antibiyotik-antimikotik çözelti (Biological Industries): 100 mL'lik şişede sıvı olarak temin edilmiştir. İçerisinde 10000 U/mL penisilin sülfat, 10 mg/mL streptomisin sülfat ve 25 µg/mL amfoterisin B antibiyotik-antimikotik kokteyli bulunmaktadır. Son kullanma tarihine kadar -20°C'de saklanır.

Jelatin solüsyonu (Sigma): 100 mL'lik şişelerde hazır solüsyon olarak temin edildi. + 2-8 °C'de saklanır.

Fetal sığır serumu (FBS) (Biochrom): 100 mL'lik şişelerde ve ısıyla inaktive edilmiş halde temin edilmiştir. Son kullanma tarihine kadar -20°C'de saklanır.

Fosfat tamponlu tuz (PBS) (pH: 7.2-7.3): 2.68 mM KCl, 136.9 mM NaCl, 1.47 mM KH₂PO₄ ve 8.06 mM Na₂HPO₄ içerir.

Hazırlanışı: 0.2 g KCl, 8.0 g NaCl, 0.2 g KH₂PO₄ ve 2.88 g Na₂HPO₄.12H₂O tartılır ve 1 L'lik beher içinde bidistile su ile çözülür. pH'sı ayarlandıktan sonra balon jojede hacim 1 L'ye tamamlanır. 121 °C'de 20 dakika otoklav edilir ve +4 °C'de saklanır.

Tripsin-EDTA (Lonza): 0.25 mg/mL tripsin içeren 100 mL'lik solüsyon olarak temin edildi. Orijinal şişesinden kullanılmıştır. Son kullanma tarihine kadar -20°C'de saklanır.

Tripsin nötralize edici solüsyon (TNS) (Lonza): 100 mL'lik solüsyon olarak temin edildi. Orijinal şişesinden kullanılmıştır. Son kullanma tarihine kadar -20°C'de saklanır. TNS çözüldükten sonra +4°C'de 1 ay saklanabilmektedir.

HEPES ile tamponlanmış tuz solüsyonu (Lonza): 100 mL'lik solüsyon olarak temin edildi. Orijinal şişesinden kullanılmıştır. Son kullanma tarihine kadar -20°C'de saklanır. TNS çözüldükten sonra +4°C'de 1 ay saklanabilmektedir.

Tripan mavisi çözeltisi (Amresco): % 0.4'lük konsantrasyonda temin edilmiştir. Oda sıcaklığında saklanır. Hücre sayımı sırasında 1:1 oranında hücre ile karıştırılarak kullanıldı.

3.2. Likopen ve apigeninin hazırlanması

Gerekli solüsyonlar

Dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck): 1 L'lik şişede temin edilmiştir. Oda sıcaklığında saklanır.

Tetrahidrofur (THF) (AppliChem): 1 L'lik şişede temin edilmiştir. İçerisinde % 0.025 bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) içermektedir. Oda sıcaklığında saklanır.

3.2.1. Likopenin hazırlanması

Likopen (Sigma) ışık geçirmeyen tüpte uç kısmı ince cam çeperli olarak toz halinde temin edildi ve -80°C 'de saklandı. Likopen stok çözeltisi hazırlanırken uç kısmındaki cam ince enjektör iğnesi ile kırıldı ve 10 mM'lık stok solüsyonu olarak THF/BHT çözeltisi içerisinde çözüldü. Ağzı parafilmle kapatıldı ve kullanılmadığı sürece -80°C 'de muhafaza edildi. Likopen ekstrakte haldeyken hassas olduğu için uzun süre dışarıda tutulmadı. Likopenin stabilitesini ve hücre tarafından alımını arttırmak için Martin ve ark. (227) ile Lin ve ark.'nın (228) yöntemi kullanıldı. Bu yöntem doğrultusunda stok çözeltisi hazırlandıktan sonra dilüsyon işlemi FBS içerisinde yapıldı. Yaklaşık 1 dakika vortekslendi ve son konsantrasyonları 0 μM , 1 μM , 5 μM ve 10 μM (yaklaşık olarak 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ ve 5 $\mu\text{g/ml}$) olacak şekilde hücrelere uygulandı. Kontrol grubunda da, likopen içermeyen THF/BHT FBS içerisinde çözüldü ve dilüe edildi. Hücrelere uygulanan THF konsantrasyonu maksimum % 0,1'dir.

3.2.2. Apigeninin hazırlanması

Toz halinde alınan apigenin -20°C 'de saklandı. Stok solüsyonu DMSO içerisinde 5 mg/ml olarak hazırlandı. Bu çözelti de -20°C 'de muhafaza edildi. Gerekli dilüsyonlar EGM-2 besiyerinde yapıldı. Deneylerde son konsantrasyonu 5 $\mu\text{g/ml}$ ve 10 $\mu\text{g/ml}$ (18.5 μM ve 37 μM) olacak şekilde kullanıldı. Hücrelere uygulanan DMSO'nun son konsantrasyonu en fazla % 0.2' dir.

3.3. Likopen ve apigeninin hücre proliferasyonuna etkilerinin incelenmesi

Endotelyal hücreler 24-kuyucuklu hücre kültür kaplarında $\sim 2.5 \times 10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde kültüre edildi. Hücreler % 70-80 yoğunluğa ulaşana kadar EGM-2 medyumunu ile beslendi. İstenilen yoğunluğa ulaşan hücreler % 0.1 FBS içeren EBM-2 medyumunu ile yaklaşık 24 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda aşağıda gösterildiği gibi ilaç uygulamaları yapıldı.

1. Kontrol I grubu: Üretilen hücrelerin besiyeri, % 0.2 DMSO içeren yeni besiyeri ile değiştirildi ve 37 °C'de % 5 CO₂ ve % 90 nem içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.
2. Kontrol II grubu: Üretilen hücrelerin besiyeri, % 0.1 THF içeren yeni besiyeri ile değiştirildi ve 37 °C'de % 5 CO₂ ve % 90 nem içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.
3. Likopen grubu: EBM-2 besiyerinde inkübe edilmiş hücrelerin besiyeri, THF/BHT'de çözülmüş 1, 5 ve 10 µM'lık konsantrasyonlarda likopen içeren yeni besiyeri ile değiştirildi ve 37 °C'de % 5 CO₂ ve % 90 nem içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.
4. Apigenin grubu: EBM-2 besiyerinde inkübe edilmiş hücrelerin besiyeri, DMSO'da çözülmüş 5 ve 10 µg/ml'lik konsantrasyonlarda Apigenin içeren EGM-2 besiyeri ile değiştirildi ve 37 °C'de % 5 CO₂ ve % 90 nem içeren etüvde inkübe edildi.

İlaç uygulanan hücreler inkübatörde 24 saat bekletildikten sonra, Mosmann'ın (229) MTT yöntemi modifiye edilerek proliferasyon deneyi yapıldı.

3.3.1. MTT deneyi

Gerekli malzemeler

1. MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (AppliChem): 5 g'lık şişede toz olarak temin edildi. 2-8 °C'de saklanır.
2. Sodyum bikarbonat (NaHCO₃) (Sigma): Toz halinde temin edildi. Oda sıcaklığında saklanır.
3. RPMI toz besiyeri (Sigma): Toz halinde ve steril olarak temin edildi. 2-8 °C'de son kullanma tarihine kadar muhafaza edilir.
4. Hidroklorik asit (Merck): Sıvı halde oda sıcaklığında saklanır.
5. İzopropanol (Merck): Sıvı halde oda sıcaklığında saklanır.
6. 24-kuyucuklu petri (BD-Falcon)

MTT stok: 5 mg/ml MTT, fenol red içermeyen serumsuz RPMI-1640 içinde hazırlanır ve 0.2 µm'lik filtreden geçirilir.

MTT çalışma solüsyonu: Stok solüsyonu 1:10 oranında sulandırılmış MTT içeren RPMI medyumunu hazırlanır.

Fenol red içermeyen RPMI toz besiyeri hazırlanması:

1. Fenol red içermeyen RPMI toz besiyeri (Sigma-R8755)'nin bir şişesi, 1L steril distile su yavaş yavaş eklenerek çözülür. Suyun sıcaklığı 15-20 °C olmalıdır.
2. Medyumun tamamen çözünmesi için pH, 1N HCl ile 4.0'e ayarlanır.
3. Çözeltinin üzerine 2 g NaHCO₃ (veya 26.7 mL NaHCO₃ (% 7.5 w/v)) eklenir. Çözünene kadar yavaşça karıştırılır. Son pH 7.1 olmalıdır (Filtrasyon pH'yı 0.1-0.3 birim yükseltebilir).
4. Çözeltinin pH'sı 1 M HCl veya 1 M NaOH ile 7.2-7.5'e ayarlanır.
5. Son olarak, hazırlanan medyum 0.2 µm'lik filtreden geçirilir.

Prosedür

1. Kültüre edilen hücreler RPMI ile yıkandı.
2. MTT çalışma solüsyonu hazırlandı.
3. 500 µL (24 kuyucuklu petri için) MTT solüsyonu kuyucuklara eklendi. 37°C'de 30 dakika ila 3 saat arası inkübe edildi.
4. İnkübasyondan sonra, MTT'li medyumlar uzaklaştırıldı.
5. Oluşan formazan kristalleri, 500 µL (24 kuyucuklu petri için) asidik izopropanol (mutlak izopropanolda hazırlanmış 0.04 M HCl [10 mL izopropanolden 33 µL atılıp yerine 33 µL HCl eklenerek hazırlanır]) çözeltisiyle çözünür hale getirildi. Birkaç kez pipetle alt üst edildi.
6. Oluşan renk, 570 nm dalga boyunda, 650 nm referans dalga boyu ayarlanarak kolorimetrik petri okuyucuda ölçüldü.

Hücre proliferasyon deneyi 5 kez tekrar edildi.

3.4. Likopen ve apigeninin kapiller benzeri tübüler ağ oluşumuna etkilerinin incelenmesi

Gerekli Malzemeler:

1. 24-kuyucuklu petriler: BD-Falcon' dan steril olarak temin edildi.
2. Matrijel Bazal Membran Matriks: Matrigel™ Matriks, BD Bioscience' dan 10 ml'lik cam şişelerde temin edildi. -20°C'de son kullanma tarihine kadar muhafaza edilebilmektedir. Matrigel™ Matriks, 22 °C'de hızlıca jel olduğundan dolayı oda sıcaklığında bekletilmez.
Anjiyogenez deneyleri için oldukça önemli olan Matrijel bazal membran matriks, zengin ekstraselüler matriks proteinleri içeren bir tümör olan Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) fare sarkomadan elde edilen bir maddedir. Major bileşenleri başta laminin olmak üzere kollajen IV, heparan sülfat proteoglikanları, entaktin ve nidojendir. Matrigel™ Matriks ayrıca TGF-β, FGF, doku plazminojen aktivatör ve EHS tümöründe doğal olarak meydana gelen diğer büyüme faktörlerini içermektedir (Kaynak: BD Bioscience, Matrigel™ Matriks Data Sheet) .

3.4.1. Matrijelin hazırlanması ve uygulanması

1. Tüm işlemler steril koşullarda gerçekleştirildi.
2. Matrijel bazal membran matriks buz üzerinde 4°C'de gece boyu çözülerek sıvı hale geçmesi sağlandı. İlk kez çözülen Matrigel™ aliquatlandı.
3. Bu deneyler için kullanılan 24 kuyucuklu petriler ve pipetler için ön soğutma yapıldı. Aliquatlama öncesinde de tüpler buzda bekletildi.
4. Her bir kuyucuğa 250 µl Matrijel Bazal Membran Matriks pipetlendi.
5. Yaklaşık 60 dakika 37 °C'de inkübe edildi ve jel kıvamına gelmesi sağlandı.

Prosedür

Anjiyogenezin in vitro göstergesi olan tüp oluşturma deneyleri için, EGM-2 medyumunda beslenen endotelial hücreler % 0.1 FBS içeren ve büyüme faktörleri içermeyen EBM-2 besiyerinde yaklaşık 24 saat 37 °C'de inkübe edildi. Bu süre sonunda tripsinize edilen hücreler 180 x g'de santrifüj edildi. Süpernatant döküldükten sonra ılık EGM-2 medyumunda süspanse edildi. 24 kuyucuklu petrilerin her bir kuyucuğunda 25.000 hücre olacak şekilde matrijel matriksin üzerine eklendi. İlaç uygulamaları aşağıdaki şekilde yapıldı.

1. Kontrol I grubu: Eklenen hücrelerin besiyerine son konsantrasyonu % 0.2 olacak şekilde DMSO eklendi. 37 °C’de % 5 CO₂ ve % 90 nem içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.
2. Kontrol II grubu: Eklenen hücrelerin besiyerine son konsantrasyonu % 0.1 olacak şekilde THF eklendi. 37 °C’de % 5 CO₂ ve % 90 nem içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.
3. Likopen grubu: Daha önceden anlatılan şekilde hazırlanan, THF/BHT’de çözülmüş likopenin son konsantrasyonu 1, 5 ve 10 µM olacak şekilde besiyerine eklendi. 37 °C’de % 5 CO₂ ve % 90 nem içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.
4. Apigenin grubu: DMSO’da çözülmüş apigeninin son konsantrasyonu 5 ve 10 µg/ml olacak şekilde besiyerine eklendi. 37 °C’de % 5 CO₂ ve % 90 nem içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.

İlaç uygulanan hücreler inkübatörde 24 saat bekletildikten sonra binoküler inverted mikroskop altında 4x objektif kullanılarak görüntülendi ve fotoğrafları çekildi. 3 farklı bölgenin tüp uzunlukları, UTHSCSA ImageTool Version 3.0 programı kullanılarak hesaplandı ve ortalamaları alındı. Deney 5 kez tekrar edildi.

3.5. Likopen ve apigeninin HUVEC endotelial hücre migrasyonuna etkilerinin incelenmesi

Anjiyogenezin oluşumu esnasında endotelial hücrelerin kemoattraktan maddelere doğru göçü söz konusudur. Bu deney için, EGM-2 medyumunda beslenen endotelial hücreler % 0.5 albumin (BSA) içeren ve büyüme faktörleri içermeyen EBM-2 besiyerinde yaklaşık 18 saat 37 °C’de inkübe edildi. Bu süre sonunda Akkutaz ile kaldırılan hücreler 1500 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant döküldükten sonra ılık EGM-2 medyumunda süspansiyon edildi. Hücreler, 1.0 x 10⁶ hücre/ml olacak şekilde ayarlandı. 24 kuyucuklu petrilerin içerisindeki ek petrilerin herbir kuyucuğuna 200 µl hücre süspansiyonundan eklendi. İlaç uygulamaları bu kuyucuklara aşağıdaki şekilde uygulandı.

1. Kontrol I grubu: Eklenen hücrelerin besiyerine son konsantrasyonu % 0.2 olacak şekilde DMSO eklendi. 37 °C’de % 5 CO₂ ve % 90 nem içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.
2. Kontrol II grubu: Eklenen hücrelerin besiyerine son konsantrasyonu % 0.1 olacak şekilde THF eklendi. 37 °C’de % 5 CO₂ ve % 90 nem içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.

3. Likopen grubu: Daha önceden anlatılan şekilde hazırlanan, THF/BHT'de çözülmüş likopenin son konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde besiyerine eklendi. 37 °C'de % 5 CO₂ ve % 90 nem içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.
4. Apigenin grubu: DMSO'da çözülmüş apigeninin son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde besiyerine eklendi. 37 °C'de % 5 CO₂ ve % 90 nem içeren etüvde 24 saat inkübe edildi.

Bu deney grupları hem test hemde kontrol petrilere uygulandı.

İlaç uygulanan hücreler inkübatörde 24 saat bekletildikten sonra, florometrede 480/520 nm filtre setinde ölçümleri yapıldı. Deney 5 kez tekrar edildi.

3.5.1. Endotelial hücre migrasyon deneyinin uygulanması

Endotelial migrasyon ölçümü için Millipore QCM™ 3 µm Endotelial Migrasyon kiti (ECM201) kullanıldı. Teknik olarak bu yöntemde migrasyon için en yaygın olarak kullanılan Boyden Chamber ölçümü modifiye edilerek kullanılmıştır. Boyden Chamber sistemi iki-odalı bir sistem olup bu odacıklar arasında bir ara yüzey olarak porlu bir membran kullanılmaktadır. Hücreler, altında porlu membran bulunan üst odacığa ekilirler. Alt odacığa ise kemoattraktanlar yerleştirilirler. Üst odacıktaki hücreler porlu membranı geçerek kemoattraktanlara doğru göçerler ve alt odacığa doğru hareket ederler. Bu şekilde migrasyona uğrayan hücreler boyanarak sayılırlar. CyQUANT® GR yeşil floresan boyası hücresel nükleik asitlere bağlandığında güçlü bir floresan artışı sergilerler.

Standart bir Boyden ölçümünde tipik olarak 3'den 12 µm' ye kadar membran por çapı kullanılır. Daha küçük por çapı hücrelerin migrasyona uğramasına daha fazla direnç gösterirler. Bu deneyde 3 µm membran por çapı kullanılmıştır. Bu por çapı fibroblastların migrasyonu için uygun olmamasına rağmen endotelial hücrelerin optimal migrasyonunu destekler.

Ek odacığın altı fibronektin ile kaplı olduğundan endotelial hücre migrasyonu ve adhezyonu için optimal koşullar sağlamaktadır.

Gerekli malzemeler

Kit bileşenleri:

1. Fibronektin Test Petrisi: İnsan fibronektini ile kaplanmış Boyden Chamber'ları içeren 24-kuyucuklu kültür petrilidir. 2-8 °C' de saklanır.
2. BSA Kontrol Petrisi: BSA ile kaplı Boyden Chamber'ları içeren 24-kuyucuklu kültür petrilidir. Deneyin kontrolü olarak kullanılır. 2-8 °C' de saklanır.
3. 4 X Hücre lizis tamponu. 2-8 °C' de saklanır.
4. CyQuant GR Dye®. 2-8 °C' de saklanır.

5. 96-kuyucuklu petri
6. 24-kuyucuklu kültür petrileri.
7. Akkutaz: Tripsin benzeri hücre kaldırma solüsyonudur. -20 °C’de saklanır.

Diğer materyaller:

1. Steril PBS
2. Serumsuz %0.5 BSA içeren EBM-2 medyum.
3. FBS
4. Hemasitometre
5. Tripan mavisi
6. Floresan plate okuyucu

Ölçüm prensibi

Fibronektin kaplı insertler ve BSA ile kaplanmış migrasyon kontrol insertleri florometrik araçlar yoluyla hücre migrasyonu için kantitatif sonuçlar sağlamaktadır. Membrandaki 3µm’lik porlar aracılığıyla migrate olan hücreler membranın altına geçerler. Membranın altından çözülen ve ardından lizis edilen hücreler CyQuant GR boyası kullanılarak boyanır (Şekil 3.3.1).

Hücre harvesti

1. HUVEC hücreleri serum ve büyüme faktörleri içeren EGM-2 besiyerinde büyütülür.
2. Hücreler deneyden önce serum ve büyüme faktörleri içermeyen, % 0.5 BSA içeren bazal besiyerinde yaklaşık 18 saat inkübe edilir.
3. Hücreler bir kez yaklaşık 5 ml steril Akkutaz solüsyonu ile yıkanır.
4. Hücrelerin kaldırılması için yeni 5 ml Akutaz solüsyonu eklenir ve 37 °C’de 5 dk inkübe edilir.
5. Hücreler dikkatlice petriden alınır ve % 0.5 BSA içeren serumsuz medyumda iki kez yıkanır.
6. 1500 rpm’de 10 dk santrifüj edilir.
7. Pellet, 5 ml % 0.5 BSA içeren serumsuz medyumda resüspanse edilir.

8. Hücreler sayılır ve hacim ml'de 1.0×10^6 hücre olacak şekilde ayarlanır.

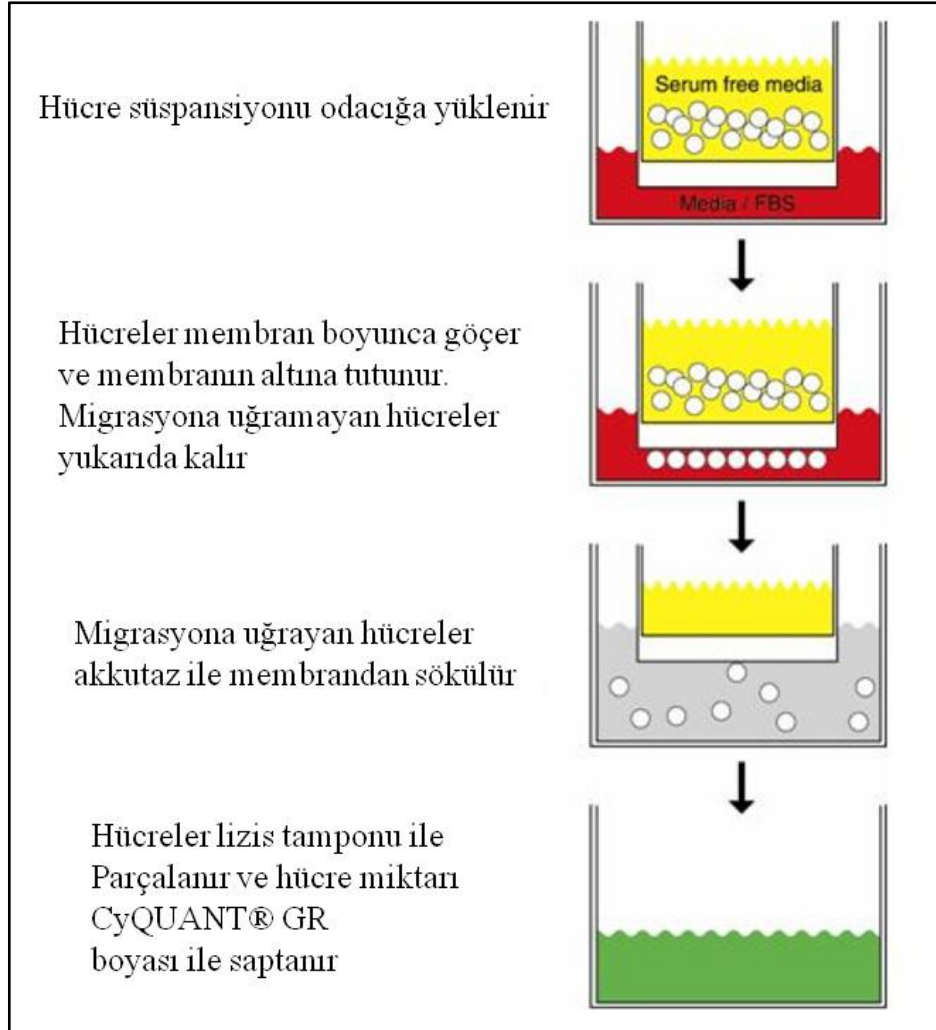
Ölçüm metodu

1. Petriler deneyden önce buzdolabından çıkarılarak oda sıcaklığına getirildi.
2. Yukarıda anlatıldığı gibi, hücre süspansiyonu ml'de 1.0×10^6 hücre olacak şekilde ayarlandı.
3. Steril kabin içerisinde test ve kontrol petrilere açıldı.
4. Boyden chamber'ların alt bölmesine içerisinde büyüme faktörleri + % 10 FBS olan ve olmayan besiyerinden 300 µl eklendi. Arayüzde hava olmamasına dikkat edildi ve Boyden chamber membranının alt kuyucuktaki medyum ile teması sağlandı.
5. Hem fibronektin kaplı test petrilerinin Boyden chamber'larına hem de BSA kaplı kontrol petrilerinin Boyden chamber'larına hücre süspansiyonundan 200 µl eklendi. BSA kaplı olanlar test örneklerinin migrasyon kontrolleridir.
6. Petrilerin kapakları kapatıldı ve CO₂ inkübatöründe 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

Boyama prosedürü

1. Yeni 24-kuyucuklu petrilere açıldı.
2. Bu kuyucuklara ılık Akkutaz solüsyonundan 225 µl eklendi.
3. CO₂ inkübatöründen alınan migrasyon petrilerindeki migrasyon odacığı dikkatlice çıkarıldı ve içerisindeki hücreler/medyumlar dikkatli bir şekilde aspire edildi.
4. Odacıklar daha sonra içerisinde Akkutaz solüsyonu olan 24-kuyucuklu petrilere konuldu.
5. 37°C'de 30 dk inkübe edildi.
6. İnkübasyon esnasında hücrelerin tamamen koparılması için migrasyon odacıkları birkaç kez ileriye ve geriye doğru yatırıldı.
7. Tüm örnekler için yeterli lizis tamponu/boya solüsyonu hazırlandı. CyQuant GR boyası 4x lizis tamponu ile 1:75 dilüe edilmektedir. Lizis tamponu/boya solüsyonundan, içerisinde 225 µl hücre kaldırma solüsyonu olan her bir kuyucuğa, 75 µl eklendi.

8. 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
9. 96-kuyucuklu petrilerin her bir kuyucuğuna 200 µl transfer edildi.
10. Floresans petri okuyucuda 480/520 nm filtre seti kullanılarak okuma yapıldı.



Şekil 3.3.1. Endotelial hücre migrasyon ölçüm prensibinin şematik gösterimi. (Kaynak: Millipore kit klavuzu).

3.6. Yara iyileşmesi deneyi

Yara iyileşmesi deneyi hücre migrasyonunun gösterilmesi için bir başka yöntemdir. Bu deney Schleef ve Birdwell'in (230) metodu modifiye edilerek yapıldı. Çift katmanlı fosfolipid membrana bağlanıp kırmızı floresan ışığa veren **1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'- tetrametilindocarbocyanine perchlorate (Dil)** boyası Sigma'dan 100 mg olarak toz halinde temin edildi. DMSO içerisinde 1 mg/ml stok solüsyon olarak hazırlandı. Deney için 1:200 oranında normal büyüme medyumuna içerisinde dilüe edildi.

Deneyin yapılışı

12-kuyucuklu petrilerde EGM-2 besiyerinde büyütülen HUVEC endotelial hücreler kuyucukları yaklaşık % 90 oranında doldurduğunda EGM-2 medyumunu alınarak, içerisinde % 0.1 serum içeren EBM-2 besiyeri ile CO₂ inkübatöründe 37°C'de 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonra hücreler merkezden çapı boyunca steril 200 µl'lik pipet ucu ile çizildi. Steril PBS ile bir kez yıkanan hücrelere aşağıdaki şekilde ilaç uygulamaları yapıldı.

1. Kontrol I grubu: Hücrelerin bulunduğu kuyucuklara EGM-2 içerisinde son konsantrasyonu % 0.2 olacak şekilde DMSO eklendi. 37 °C'de % 5 CO₂ ve %90 nem içeren etüvde inkübe edildi.
2. Kontrol II grubu: Hücrelerin bulunduğu kuyucuklara EGM-2 içerisinde son konsantrasyonu % 0.1 olacak şekilde THF eklendi. 37 °C'de % 5 CO₂ ve %90 nem içeren etüvde inkübe edildi.
3. Likopen grubu: Daha önceden anlatılan şekilde hazırlanan, THF/BHT'de çözülmüş likopenin son konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde besiyerine eklendi. 37 °C'de % 5 CO₂ ve %90 nem içeren etüvde inkübe edildi.
4. Apigenin grubu: DMSO'da çözülmüş apigeninin son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde besiyerine eklendi. 37 °C'de % 5 CO₂ ve %90 nem içeren etüvde inkübe edildi.

Hücreler 14 saat izlendi. Kontrol gruplarındaki hücrelerin migrasyonu sonucunda karşılıklı olarak birbirlerine yaklaşımları gözlemlendiğinde aşağıdaki uygulamalar yapıldı:

1. Petrilerin besiyeri uzaklaştırıldı.
2. 100 µl boyama medyumunu tüm hücrelere yedirildi.
3. 37 °C'de yaklaşık 20 dakika inkübe edildi.

4. Boyama medyumu alındı.
5. 3 kez ılık büyüme medyumu ile yıkandı.
6. 10 dakika inkübe edildi.
7. Medyum uzaklaştırıldı.
8. Binoküler inverted floresan mikroskopta 40x büyütmede incelendi ve fotoğrafları çekildi.
9. Hücreler arasındaki boşluk (migrasyon uzaklığı) UTHSCSA ImageTool Version 3.0 programı kullanılarak hesaplandı. Migrasyon uzaklığı için 10 farklı noktadan ölçüm alındı ve bunların ortalaması hesaplandı. Yara iyileşmesi deneyi 5 kez tekrar edildi.

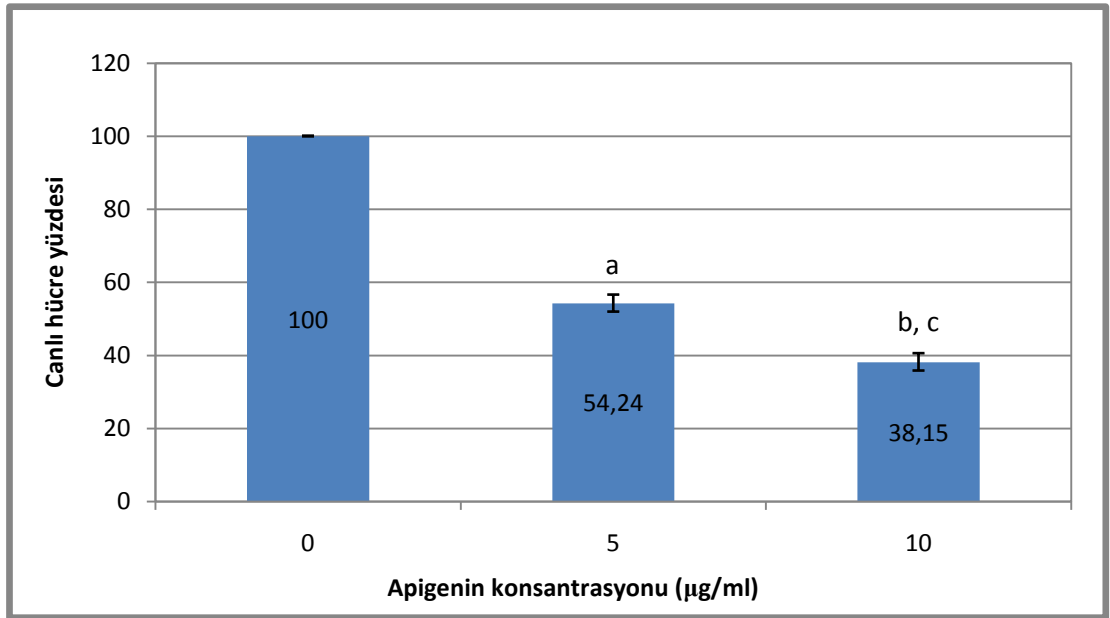
3.7. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler için GraphPad Software'in (San Diego, CA) Prism Programı kullanıldı. Verilerin ortalama $\pm$ standart sapma ($\pm$ SD) değerlerinin analizi, tanımlayıcı istatistiklerden Column Statistics testi ile yapıldı. Deney gruplarının karşılaştırılması için nonparametrik testlerden student t-testi ve One-way ANOVA'nın Tukey's Multiple Comparison testi yapıldı.

BULGULAR

4.1. Apigeninin hücre proliferasyonuna etkisi

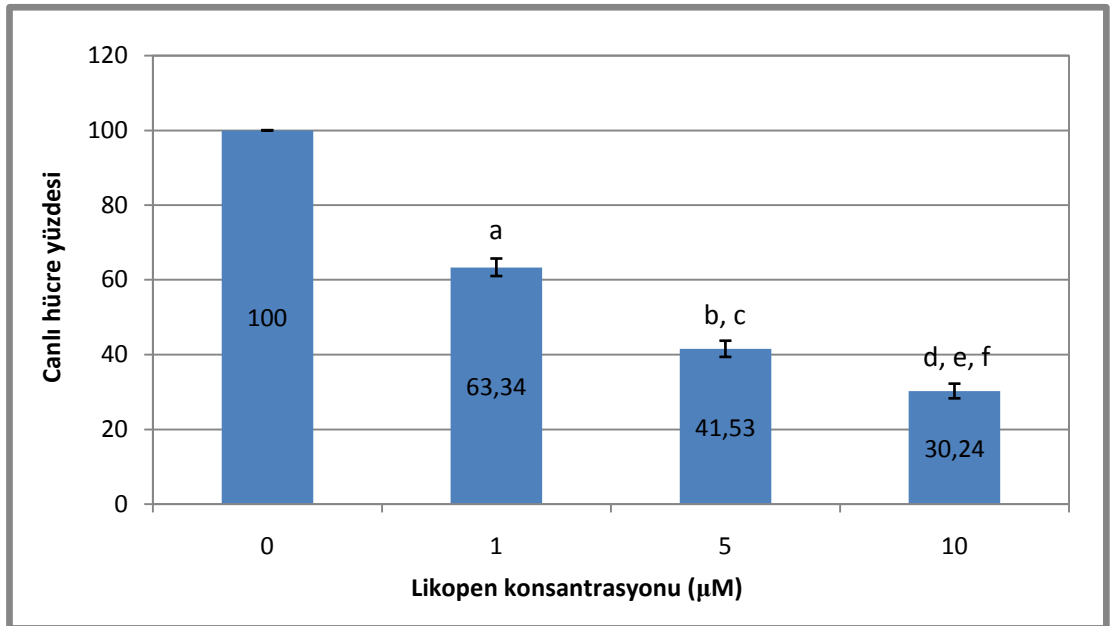
İki farklı dozda apigenin uygulanan HUVEC endotelial hücrelere ait hücre canlılık grafiği, Şekil 4.1.1’de gösterilmiştir. 5 µg/ml ve 10 µg/ml’lik dozlarda uygulanan apigenin endotelial hücrelerin proliferasyonunu veya canlı hücre yüzdeleri kontrolle göre anlamlı olarak ($p<0.001$) azaltmıştır. HUVEC hücrelerinin 10 µg/ml’lik dozda apigenin ile muamelesi proliferasyonun baskılanması üzerine 5 µg/ml’lik doza göre daha etkili görülmüştür ($p<0.001$).



Şekil 4.1.1. Apigenin uygulanan HUVEC hücrelerine ait canlı hücre yüzdeleri. a: Kontrol ve 5 µg/ml apigenin, b: Kontrol ve 10 µg/ml apigenin, c: 5 µg/ml apigenin ve 10 µg/ml apigeninin istatistiksel karşılaştırması.

4.2. Likopenin hücre proliferasyonuna etkisi

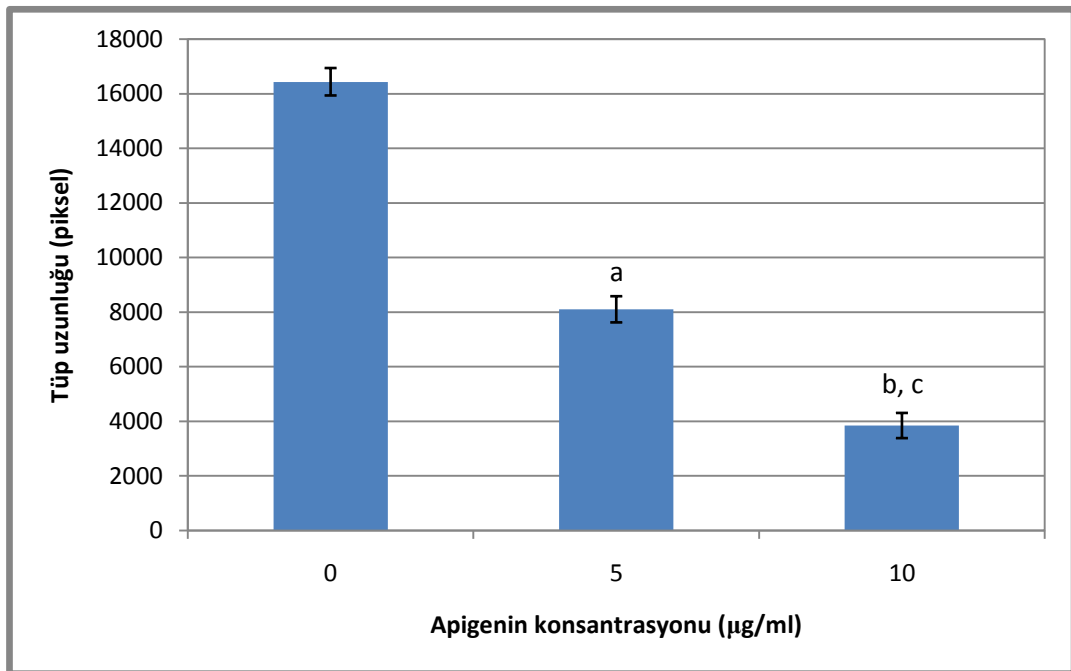
Üç farklı dozda likopen uygulanan HUVEC endotelial hücrelere ait hücre canlılık grafiği, Şekil 4.2.1’de gösterilmiştir. 1 μ M, 5 μ M ve 10 μ M’lık dozlarda uygulanan likopen, endotelial hücrelerin proliferasyonunu veya canlı hücre yüzdelerini kontrole göre anlamlı olarak ($p<0.001$) azaltmıştır. HUVEC hücrelerinin 10 μ M’lık dozda likopen ile muamelesinin, proliferasyonun baskılanması üzerine diğer dozlara göre daha etkili olduğu bulunmuştur ($p<0.001$). Ayrıca, canlılık yüzdesi dozlar arasında da anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$).



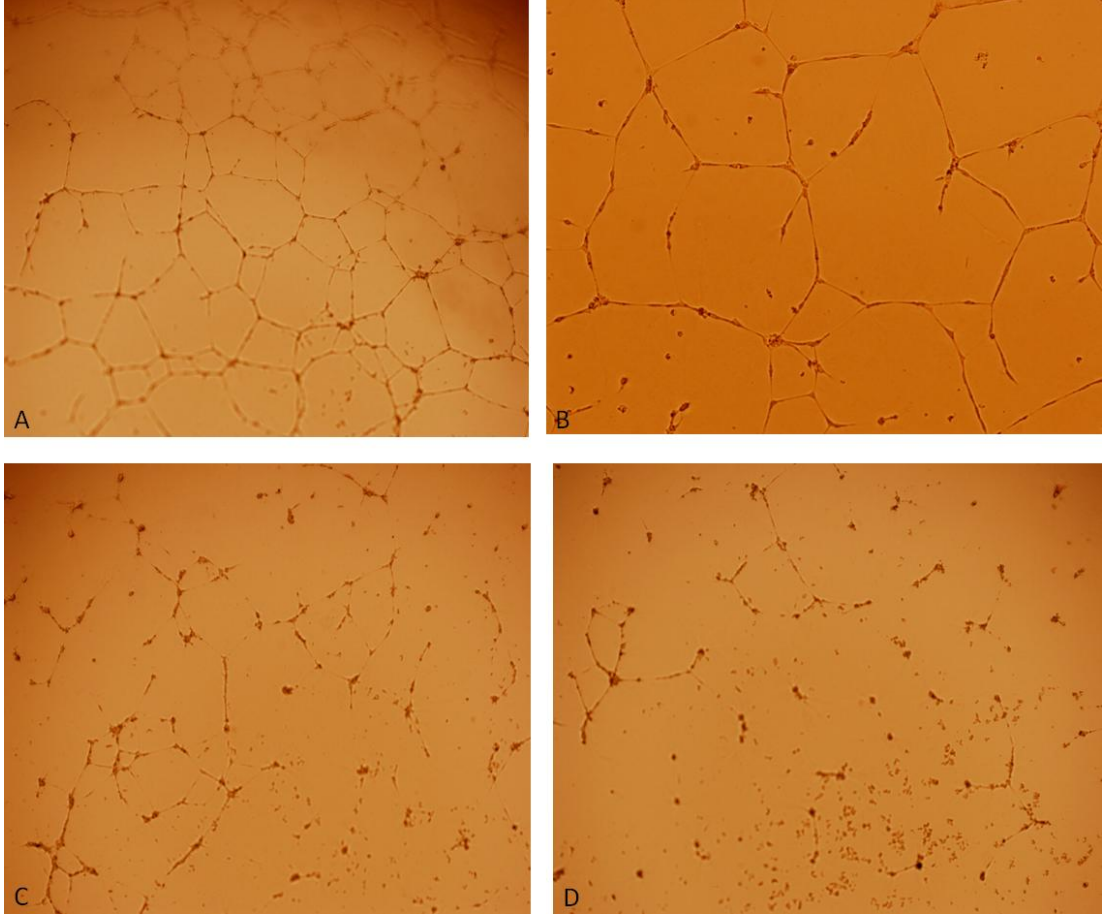
Şekil 4.2.1. Likopen uygulanan HUVEC hücrelerine ait canlı hücre yüzdeleri. a: Kontrol ve 1 μ M likopen, b: Kontrol ve 5 μ M likopen, c: 1 μ M likopen ve 5 μ M likopen, d: Kontrol ve 10 μ M likopen, e: 1 μ M likopen ve 10 μ M likopen, f: 5 μ M likopen ve 10 μ M likopenin istatistiksel karşılaştırması.

4.3. Apigeninin kapiller benzeri tübüler ağ oluşumuna etkisi

İki farklı dozda apigenin uygulanan HUVEC endotelial hücrelere ait tüp uzunluklarını gösteren grafik Şekil 4.3.1’de ve bu gruplara ait tübüler ağların ışık mikroskopundaki görüntüleri Şekil 4.3.2’de gösterilmiştir. 5 µg/ml ve 10 µg/ml’lik dozlarda uygulanan apigenin endotelial hücrelerin matrijel matrikste tüp oluşturma özelliklerini kontrole göre anlamlı olarak ($p<0.001$) azaltmıştır. HUVEC hücrelerinin 10 µg/ml’lik dozda apigenin ile muamelesi proliferasyonun baskılanması üzerine 5 µg/ml’lik doza göre daha etkili görülmüştür ($p<0.001$).



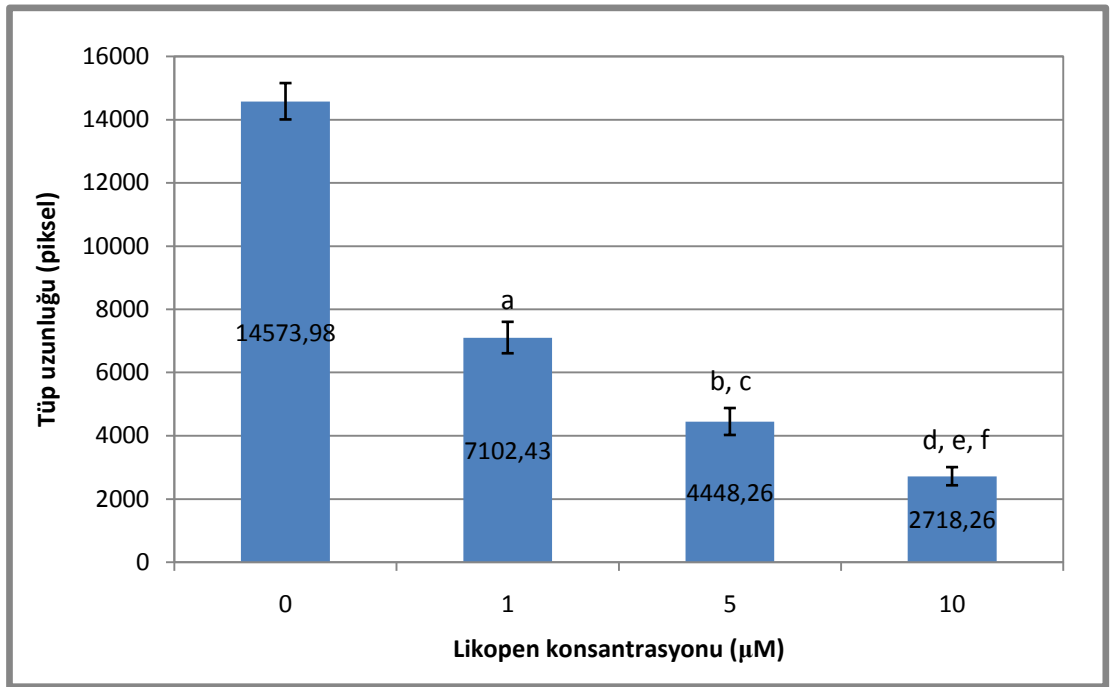
Şekil 4.3.1. Apigenin uygulanan HUVEC hücrelerine ait kapiller benzeri tüp oluşturma grafiği. a: Kontrol ve 5 µg/ml apigenin, b: Kontrol ve 10 µg/ml apigenin, c: 5 µg/ml apigenin ve 10 µg/ml apigeninin istatistiksel karşılaştırması.



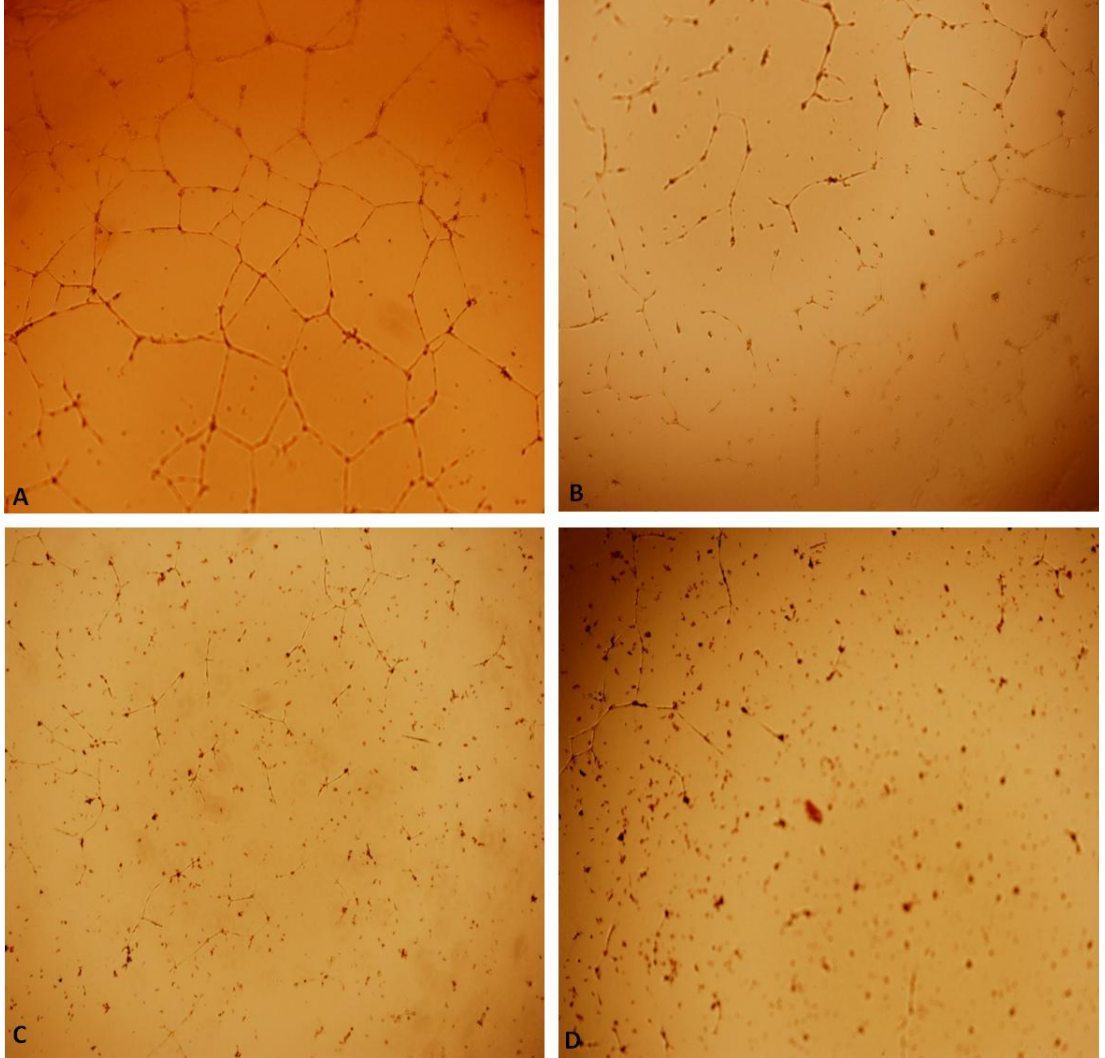
Şekil 4.3.2. Apigenin uygulanan HUVEC hücrelerine ait kapiller benzeri tüp oluşturma resimleri. A: Kontrol (DMSO) 40x büyütme, B: Kontrol (DMSO) 400x büyütme, C: 5 µg/ml apigenin, 40x büyütme, D: 10 µg/ml apigenin, 40x büyütme.

4.4. Likopenin kapiller benzeri tübüler ağ oluşumuna etkisi

Üç farklı dozda likopen uygulanan HUVEC endotelial hücrelere ait tüp uzunluklarını gösteren grafik Şekil 4.4.1’de ve bu gruplara ait tübüler ağların ışık mikroskopundaki görüntüleri Şekil 4.4.2’de gösterilmiştir. 1 μ M, 5 μ M ve 10 μ M’lık dozlarda uygulanan likopen, endotelial hücrelerin matrijel matrikte tüp oluşturma özelliklerini kontrole göre anlamlı olarak ($p<0.001$) azaltmıştır. HUVEC hücrelerinin 10 μ M’lık dozda likopen ile muamelesinin tüp oluşumunun baskılanması üzerine diğer dozlara göre daha etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca, tüp uzunluğu bakımından da dozlar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$).



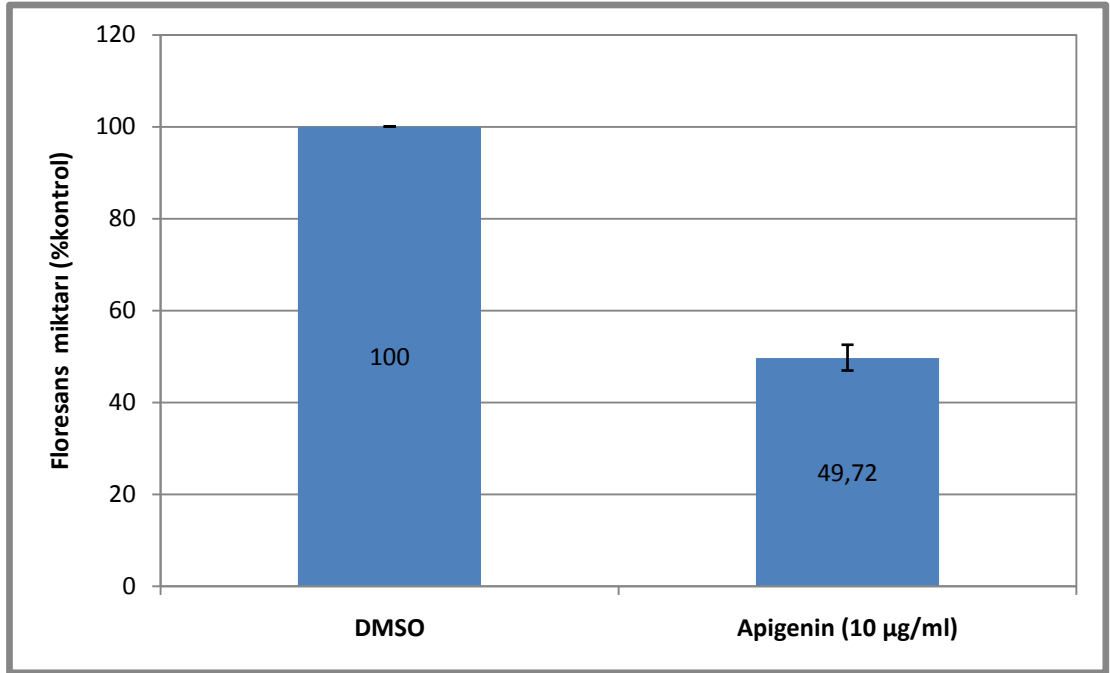
Şekil 4.4.1. Likopen uygulanan HUVEC hücrelerine ait kapiller benzeri tüp oluşturma grafiği. a: Kontrol ve 1 μ M likopen, b: Kontrol ve 5 μ M likopen, c: 1 μ M likopen ve 5 μ M likopen, d: Kontrol ve 10 μ M likopen, e: 1 μ M likopen ve 10 μ M likopen, f: 5 μ M likopen ve 10 μ M likopenin istatistiksel karşılaştırması.



Şekil 4.4.2. Likopen uygulanan HUVEC hücrelerine ait kapiller benzeri tüp oluşturma resimleri. A: Kontrol (THF), B: 1 μ M likopen, C: 5 μ M likopen, D: 10 μ M likopen uygulanan hücreler. 40x büyütme.

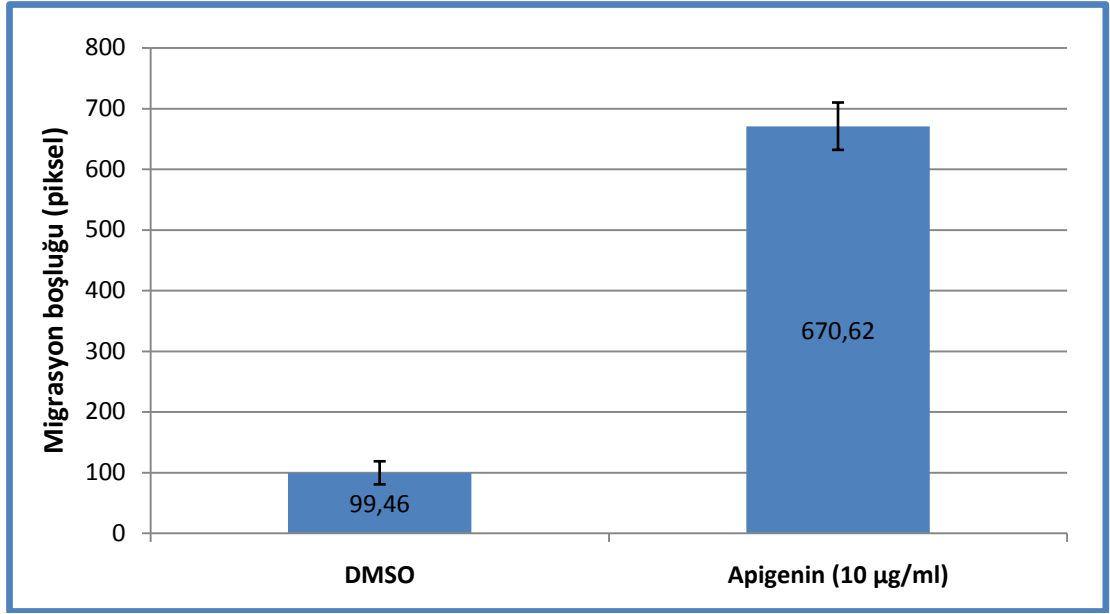
4.5. Apigeninin endotelial hücre migrasyonuna etkisi

Fibronektin kaplı membranlardaki 3 µm çapındaki porlardan endotelial hücre migrasyonu üzerine 10 µg/ml’lik dozdaki apigeninin, kontrole göre anlamlı derecede baskılayıcı etkisi bulunmuştur ($p<0.001$). Apigeninin migrasyon üzerine etkisi Şekil 4.5.1’de gösterilmiştir.

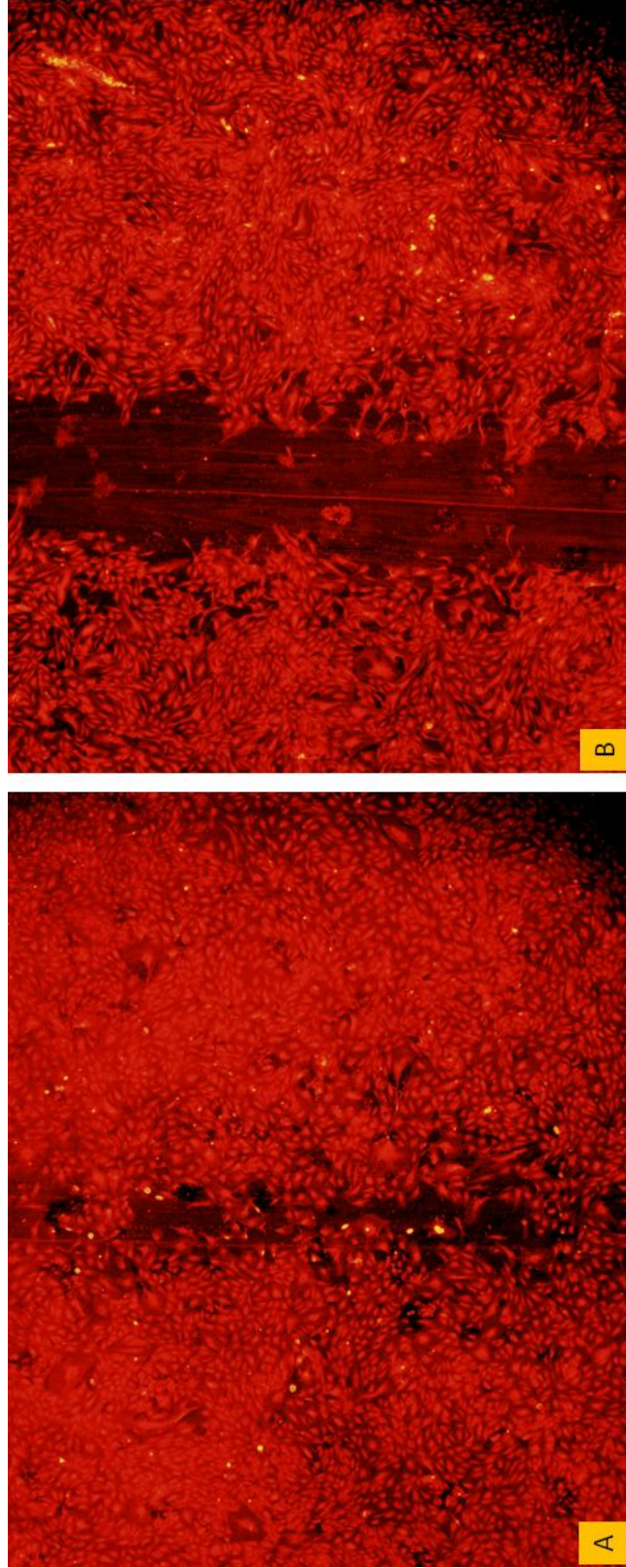


Şekil 4.5.1. Apigenin uygulanan HUVEC hücrelerine ait migrasyon grafiği. 10 µg/ml’lik apigenin, kontrole (DMSO) göre floresans yüzdesini anlamlı olarak baskılamıştır ($p<0.001$).

Migrasyonun bir başka gösterim şekli olan yara iyileşmesi deneyinin sonuçları Şekil 4.5.2 ve floresans mikroskop altında çekilen görüntüleri Şekil 4.5.3’de gösterilmiştir. 10 µg/ml’lik dozda apigenin kontrole göre anlamlı olarak migrasyonu baskılamıştır ($p<0.001$).



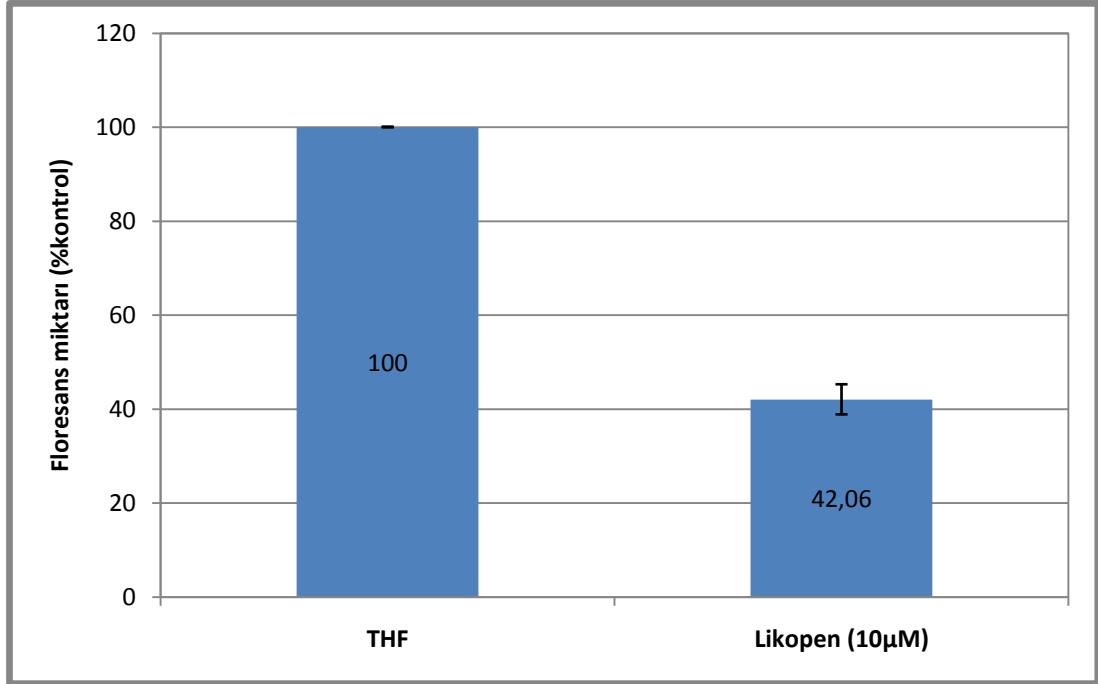
Şekil 4.5.2. Apigenin uygulanan hücelere ait migrasyon boşluğu grafiği. 10 µg/ml’lik apigenin, kontrole (DMSO) göre migrasyon boşluğunu anlamlı olarak arttırmıştır ($p<0.001$).



Şekil 4.5.3. Apigenin uygulanan HUVEC hücrelerinin migrasyonuna ait floresans mikroskop resimleri. A: Kontrol (DMSO), B: Apigenin (10 µg/ml). 40x büyütme.

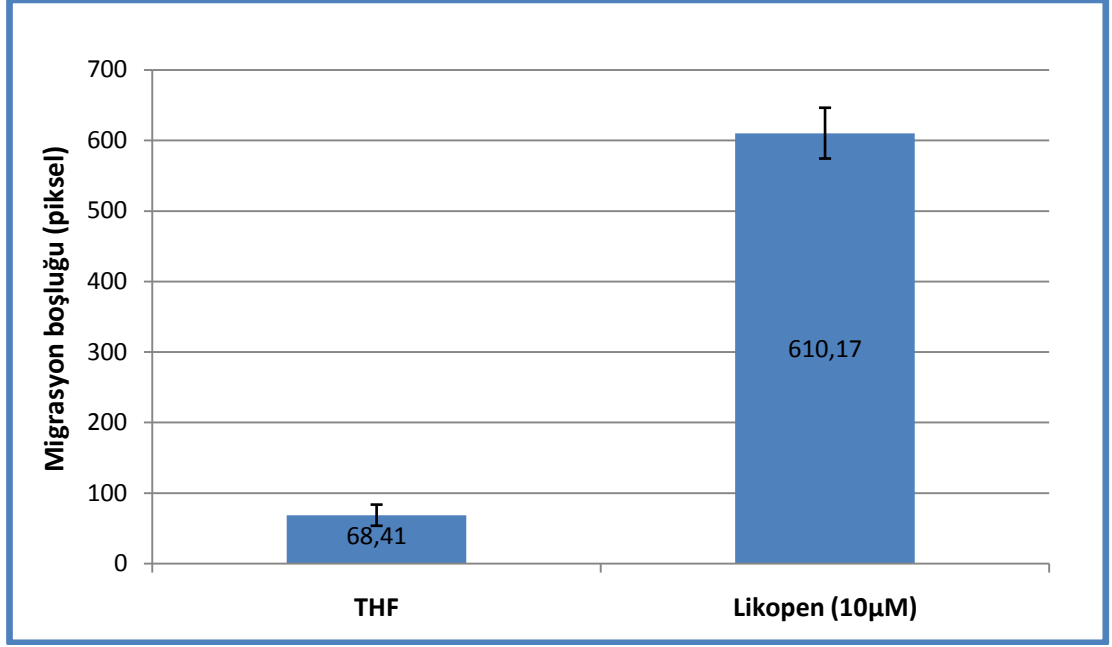
4.6. Likopenin endotelyal hücre migrasyonuna etkisi

Fibronektin kaplı membranlardaki 3 µm çapındaki porlardan endotelyal hücre migrasyonu üzerine, 10 µM'lık dozdaki likopenin kontrole göre anlamlı derecede baskılayıcı etkisi bulunmuştur ($p<0.001$). Likopenin migrasyon üzerine etkisi Şekil 4.6.1'de gösterilmiştir.

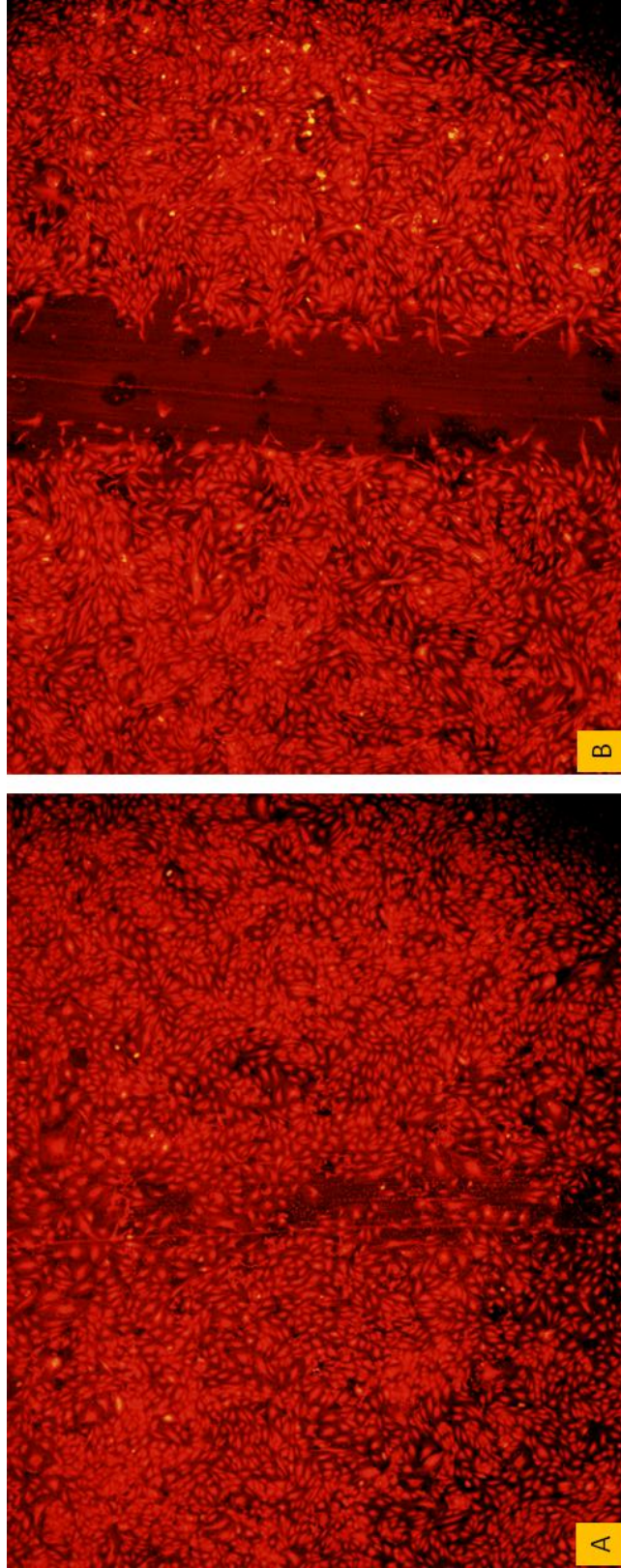


Şekil 4.6.1. Likopen uygulanan HUVEC hücrelerine ait migrasyon grafiği. 10 µM'lık likopen, kontrole (THF) göre floresans yüzdesini anlamlı olarak baskılamıştır ($p<0.001$).

Migrasyonun bir başka gösterim şekli olan yara iyileşmesi deneyinin grafiği Şekil 4.6.2 ve floresans mikroskop altında çekilen görüntüleri Şekil 4.6.3'de gösterilmiştir. 10 µM'lık dozda likopen kontrole göre anlamlı olarak migrasyonu baskılamıştır ($p<0.001$).



Şekil 4.6.2. Likopen uygulanan hücelere ait migrasyon boşluğu grafiği. 10 µM’lık likopen, kontrole (THF) göre hüceler arasındaki boşluğu anlamlı olarak arttırmıştır ($p<0.001$).



Şekil 4.6.3. Likopen uygulanan HUVEC hücrelerinin migrasyonuna ait floresans mikroskop resimleri.
A: Kontrol (THF), B: Likopen (10 µM). 40x büyütme.

TARTIŞMA

Anjiyogenez var olan damarlardan yeni kan damarlarının oluşumu olup, sıkı bir denetim altındadır ve yetişkinlerde nadiren gerçekleşir. Yetişkinlerdeki bazı fizyolojik oluşumlar dışında genellikle çeşitli patolojik durumlarda meydana gelir (2, 3). Bu patolojiler arasında en önemlilerden biri kanserdir. Tümör gelişimi için gerekli besin ve oksijenin tümör hücrelerine ulaştırılmasına ek olarak, kanser hücrelerinin yayılması da anjiyogenez aracılığıyla gerçekleşir (3). Kanser hücrelerinin başka doku veya organlara göçü olan metastaz için anjiyogenez gereklidir. Kanser dünya çapında yılda yaklaşık 7 milyon insanın ölümüne neden olan major bir halk sağlığı sorunudur. Her yıl 11 milyondan daha fazla insana kanser teşhisi konulmaktadır ve 2020'ye kadar her yıl 16 milyon yeni vakanın olacağı tahmin edilmektedir (177).

Kanser hücrelerinin hedeflenmesi ile karşılaştırıldığında endotelial hücrelere karşı stratejiler geliştirmenin bazı avantajları vardır. Şöyle ki; yarım asrı aşan bir süredir biyomedikal araştırmalar kanser teşhisi ve tedavisi için yeni enstrümanları ortaya koymakla birlikte, bugün bir solid tümör metastatik faza girdiğinde hastanın iyileşme şansı hala dramatik olarak düşmektedir. Görünürdeki tümör kütlesi cerrahi müdahale ile yok edilmesine rağmen, küçük primer tümörler ve mikrometastazlara karşı noninvaziv terapiler ile savaşılmalıdır. Birçok klinik protokoller yüksek doz irradyasyon veya kemoterapi üzerine kurulu çok agresif yaklaşımlara dayanmaktadır. Ayrıca, her iki metod bazı tümör tiplerine genellikle ciddi yan etkilerle birlikte kısmi etki gösterir (95). Tümör anjiyogenezinin kanser gelişimindeki kritik rolü yaklaşık 40 yıl önce Folkman ve ark. tarafından öncü çalışmalar ile ortaya atılmış olmasına rağmen (96), ancak son yıllarda etkili anti-anjiyogenik strateji geliştirmek için ve endotelial hücre fizyoloji için gerekli bilgi birikimi sağlanmıştır.

Endotelial hücreler terapi için ayrıcalıklı bir hedeftir çünkü, tüm solid tümörlerde müşterek bir hücre tipidir. Her bir kanser aslında kendine özgü ayrı bir hastalığı göstermesine rağmen, tümör endoteliumu nispeten tek biçimli ve normal bir hücre tipidir (95). Bir başka avantajı; yetişkinlerde endotelial hücrelerin proliferasyon hızının diğer birçok hücre tipine göre çok daha yavaş olmasıdır. Bu sayede anormal proliferasyonu spesifik olarak engellendiğinde diğer normal hücreler etkilenmeyebilirler.

Kanser hücreleri fibroblast büyüme faktörü (bFGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), interlökin 8 (IL-8), transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) ve

endotelial hücre toplanmasına ve çoğalmasına sebep olan diğler çeşitli anjiyogenik faktörler üretebilirler. Bu uyarılar sürekli olduğundan tümör endoteliumunun uygun bir damar ağına farklılaşması nadiren tamamlanır ve tümör damarları anormal bir morfoloji gösterirler. Bu şablon, tümör tarafından endotelial hücre toplanmasının ve çoğalmasının inhibisyonu yoluyla, spesifik olarak tümör anjiyogenezinin hedeflenmesinin mümkün olabileceğini göstermektedir.

Antianjiyogenik yaklaşımın bir başka avantajı, bu normal hücre tipinin düşük mutageniz oranından dolayı, çoklu-ilaç direnç mekanizmalarının gelişimi sayesinde gerçekleşen tedaviye karşı direncin, endotelial hücrelerde gerçekleşmemesidir (97). Tümör büyümesinin blokajı, vasküler toplanmanın kronik inhibisyonunu gerektirir ki bu durum Hanahan ve Folkman tarafından 'anjiyostazis' olarak belirtilmiştir (98).

Bu yüzden uzun süreli tedavi gerekli olup, düşük toksisiteli veya toksik olmayan moleküllerin tanımlanması ve karakterize edilmesi önemlidir. Primer tümörlerin kansere dönüşme riski yüksek olan kişilerdeki bu durumu engellemede veya cerrahi müdahaleden sonra tümörün yeniden çıkmasını önlemede, doğal ve sentetik bileşiklerin saptanması için önemli çabalar sarfedilmektedir. Kansere karşı kemopreventif ajanların kullanımının amacı karsinogenez ilerlemesini yavaşlatmak, geri dönüşümü sağlamak veya inhibe etmektir. Uzun peryotlarda kullanılması gerektiğinden dolayı, kemopreventif ilaçların toksisitesi olmamalı ve iyi tolere edilmelidir (95).

Biz bu çalışmada, doğada bulunan yaklaşık 600 karotenoidden biri olan likopenin endotelial hücreler üzerine etkilerini araştırdık. Likopen kimyası gereği çok güçlü antioksidan aktiviteye sahip bir moleküldür. Çeşitli epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar sonucunda likopenin kanseri önlemede önemli ajan olduğu ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte, likopenin direkt endotelial hücrelere ve anjiyogeneze etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu amaçla yapılan çalışmamızda, likopenin endotelial hücrelere ve anjiyogenez üzerine etkilerini araştırdık. Bu çalışma literatürdeki bu boşluğu doldurmak adına ilk olma özelliğini taşımaktadır.

Daha önceden bahsettiğimiz gibi, endotelial hücreler yetişkinlerde normal olarak sıkı bir regülasyonla kontrol edilmesine rağmen, kanser hücrelerinin oluşturduğu çevresel şartlar altında regülasyon dengesi yeni damar oluşumu lehine kayar. Bu sayede endotelial hücrelerin proliferasyonu artar, tümörlü dokunun oluşturduğu kemoattraktanlara doğru migrasyona uğrarlar ve kapiller ağ oluşturmak üzere bir ağ oluştururlar. Çalışmamızda bu basamakları incelemek amacıyla: 1- literatürde in vitro anjiyogenezin göstergesi olarak kabul edilen, hücrelerin Matrijel Matriste kapiller benzeri tübüler ağ oluşturma, 2- hücre proliferasyonu ve 3- hücre migrasyonu yeteneklerinin likopenden etkilenip etkilenmediğine baktık.

Matrijel Matriks bir kanser türünden elde edilen bir ekstraselüler matriks olup içerisinde anjiyogenez oluşumu için gerekli maddeleri içermektedir. Ayrıca, in vivo anjiyogenez için gerekli VEGF ve FGF gibi kanser hücreleri tarafından ortama salınan bazı büyüme faktörleri çalışmamızda endotelial hücrelerin besiyerine eklenmiştir. Bu şartlar altında kontrol hücrelerinde yaygın tüp oluşumu gözledik. Aynı şartlar altında likopen uygulanan gruplarda tüp oluşumu azalmıştır.

Deneyimizde 0, 1, 5 ve 10 μM 'lık konsantrasyonlarda likopen grupları oluşturduk. Likopen konsantrasyona bağlı olarak anlamlı şekilde anjiyogenezi inhibe etmektedir. Her bir doz kontrole göre ve dozlar birbiri arasında anlamlı fark göstermiştir.

Anjiyogenezi baskılayıcı etkileri, çeşitli çalışmalarla gösterilen (215, 231, 232) apigenin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Çalışmamızda, 5 ve 10 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlarda deney grubu oluşturuldu. Apigeninin doza bağlı olarak tüp oluşumunu kontrole göre anlamlı olarak inhibe ettiğini gösterdik. 5 $\mu\text{g/ml}$ ve 10 $\mu\text{g/ml}$ apigeninler arasındaki fark da anlamlı bulunmuştur.

Endotelial hücrelerin proliferasyonu anjiyogenez esnasında artmaktadır. Bu nedenle, deneyimizde MTT metodu kullanarak hücre proliferasyonu incelenmiştir. Serum ve büyüme faktörlerinin bulunduğu ortamda likopenin tüm dozlarda endotelial hücre proliferasyonunu anlamlı olarak inhibe ettiğini gözlemledik. Meydana gelen inhibisyon doza bağlı olarak gerçekleşmiştir. En etkili görünen 10 μM 'lık doz proliferasyonu % 69.76 azaltırken, 5 μM likopen % 58.47 ve 1 μM 'lık dozun % 36,66 oranında proliferasyon üzerinde baskılayıcı etkileri görülmüştür. Bütün konsantrasyonların birbiri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. LNCaP prostat kanser hücre dizilerinde yapılan bir çalışmada likopen muamelesinin hücre proliferasyonunu azalttığını gösterilmiştir (141).

Başka bir çalışmada, insan kolon kanser (HuCC), myeloid lösemi (K562) ve lenfoma (Raji) hücre dizilerinde likopenin hücre proliferasyon kapasitesini baskıladığı gösterilmiştir (140).

Likopenin, hücre kültür sisteminde insan endometrial, meme ve akciğer kanser hücrelerinin IGF-1 aracılı proliferasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (28). Bunlara ek olarak, likopenin MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği de gösterilmiştir (35). İnsan ağız boşluğu tümörü kaynaklı KB-1 hücreleri ile yapılan bir çalışmada, likopen ile inkübe edilen hücrelerin gap junctional iletişimin oluşmasında anahtar bir protein olan konneksin 43'ün hem transkripsiyonunu hem de ekspresyonunu önemli derecede arttırdığı ve KB-1 tümör hücrelerinin proliferasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (38). Görüldüğü gibi, hücre tipleri farklı olsa da likopenin hücre

proliferasyonu üzerine genel olarak gösterdiği baskılayıcı etkiler çalışmamızla uyumludur.

Apigenin hem 5 µg/ml hem de 10 µg/ml olarak uygulanmış ve her iki dozun da kontrole göre anlamlı olarak, sırasıyla % 45.76 ve % 61.85 oranında endotelial hücre proliferasyonunu anlamlı olarak inhibe edici etkileri gözlemlenmiştir. Apigeninin 10 µg/ml' lik dozu daha etkilidir ve 5 µg/ml'lik konsantrasyondaki apigenine göre anlamlı olarak farklı bulunmuştur.

Bir diğer önemli parametre olan endotelial hücrelerin migrasyonu, 2 farklı metod kullanılarak ölçülmüştür. Hücreler in vivo olarak ekstraselüler matriksten invaze olarak hedefe doğru veya kemoattraktanlara doğru migrate olurlar. Kullandığımız ilk metotta bu şartları in vitro gerçekleştirmeye olanak sağlayan kit kullanılmıştır. Hücrelerin fibronektin kaplı porlu membranlardan migrate olma oranları ölçülmüştür. Deneyin kontrolü olarak aynı şartlar altında BSA kaplı porlu membranlar kullanılmıştır. Bu metotta hücrelerin migrasyonu için kullanılan por çapı 3 µm'dir. Bu yöntem için likopenin en etkin dozu olan 10 µM'lık doz incelenmiştir. 10 µM likopen kontrole göre anlamlı olarak yaklaşık % 57.94 oranında endotelial hücre migrasyonunu baskılamıştır.

Migrasyon için apigenin 10 µg/ml'lik dozda uygulanmıştır. Apigeninin porlu membranlardan endotelial hücre migrasyonunu anlamlı olarak % 50.28 oranında inhibe ettiği gözlenmiştir.

Uyguladığımız diğer metod, in vivo yara iyileşmesi esnasındaki hücre migrasyonunun, in vitro şartlarda taklit edilmesi esasına dayanmaktadır. Bu metod yönle ilgili migrasyonu göstermektedir. Bunun için petride monolayer hücreler çizilerek bir boşluk meydana getirilir. Bu yöntem için de likopenin en etkin dozu olan 10 µM'lık doz incelenmiştir. 10 µM'lık dozdaki likopenin kontrole göre anlamlı olarak endotelial hücre göçünü baskıladığı görülmüştür. Apigenin de deneyde kullandığımız daha etkin doz olan 10 µg/ml olarak uygulanmıştır. Apigenin endotelial hücrelerin yön ile ilgili migrasyonunu kontrole göre anlamlı olarak baskılamıştır.

Hwang ve ark. (40), SK-Hep1 insan hepatoma hücrelerinde likopenin hücre büyümesini doza bağlı olarak inhibe ettiğini ve hücrelerin adhezyon, invazyon ve migrasyonunu inhibe ederek antimetastatik özellikler sergilediğini göstermişlerdir. Ayrıca, SK-Hep-1 hücrelerinin likopen ile muamelesi sonucunda, metastaz baskılayıcı bir gen olan Nm23-H1 ekspresyonunun indüklendiği ve hücrelerin migrasyonu ve invazyonunun baskılandığı gösterilmiştir (41). Yüksek derecede invaziv olan SK-Hep1 ile yapılan çalışmalarda da gösterilen, likopenin anti-migrasyon etkisi çalışmamızın sonuçlarını desteklemektedir.

Çalışmamız, flavonoid ve karotenoidlerin kronik hastalıklara karşı savunulan koruyucu etkileriyle uyum göstermiştir ve bu savları desteklemektedir. Ayrıca, çalışmamızda tam olarak bir doz karşılaştırması olmasa da, apigenin ve likopenin aynı deney şartları altında anjiyogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir.

Sonuç olarak; bu çalışma kansere karşı koruyucu etkileri çeşitli çalışmalar ile gösterilen likopenin, literatürde rastlanmayan endotelial hücrelere ve anjiyogenez üzerine etkilerini göstermesi bakımından önemlidir. Yapılan bu deneyler literatürdeki bu boşluğu doldurmak adına ilk olma özelliğini taşımaktadır. Bununla birlikte, daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu çalışma, likopen ile endotelial hücreler ve anjiyogenez ile ilişkili ileriki olası deneylere öncü bir çalışma olarak ışık tutabilecektir.

SONUÇLAR

Çalışmamızın sonuçlarını şu şekilde özetleyebiliriz:

1. Likopen, ilk defa bizim çalışmamızda endotelial hücrelerde uygulandığı için, çalışmamız literatüre önemli bir katkıda bulunacaktır.
2. Çalışmamızda kullandığımız HUVEC endotelial hücrelerinin likopen ve apigenin ile muamelesinin, doza bağlı bir şekilde hücre proliferasyonunu azalttığı görülmüştür.
3. Bu çalışmada, likopen ve apigeninin endotelial hücrelerin kapiller benzeri tübüler ağ oluşturma özelliklerini doza bağlı olarak azalttığı gösterilmiştir.
4. Yaptığımız bu çalışmada, hücre migrasyonu 2 farklı metotta incelenmiş olup hem apigenin hem de likopenin anlamlı olarak endotelial hücre migrasyonunu baskıladıkları bulunmuştur.
5. Çalışmamızda likopenin 10µM'lık dozunun daha etkili olduğu gösterilmiştir.
6. Bu çalışma, kansere karşı koruyucu etkileri çeşitli çalışmalar ile gösterilen likopenin, anjiyogenez üzerine etkilerini göstermesi bakımından öncü bir çalışma olarak literatüre katkıda bulunacaktır.
7. Çalışmamız, flavonoid ve karotenoidlerin kronik hastalıklara karşı savunulan koruyucu etkilerini desteklemektedir.
8. Bu çalışma, likopen ve apigenin için tam olarak bir doz karşılaştırması olmasa da, apigenin ve likopenin aynı deney şartlarında anjiyogenezi inhibe ettiğini göstermiştir.
9. Yaptığımız bu çalışma, likopen ile endotelial hücrelerde yapılacak ileriki anjiyogenez çalışmalarına ışık tutabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70, 2000.
2. Hyder, S. M. and Stancel, G. M. Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. *Mol Endocrinol*, 13: 806-811, 1999.
3. Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1: 27-31, 1995.
4. Koch, A. E. Review: angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 41: 951-962, 1998.
5. Ferrara, N. and Alitalo, K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med*, 5: 1359-1364, 1999.
6. Powell, J. Update on hemangiomas and vascular malformations. *Curr Opin Pediatr*, 11: 457-463, 1999.
7. Gupta, M. K. and Qin, R. Y. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol*, 9: 1144-1155, 2003.
8. Liekens, S., De Clercq, E., and Neyts, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol*, 61: 253-270, 2001.
9. Shannon, A. M., Bouchier-Hayes, D. J., Condrón, C. M., and Toomey, D. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat Rev*, 29: 297-307, 2003.
10. Harris, A. L. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*, 2: 38-47, 2002.
11. Semenza, G. L. HIF-1: using two hands to flip the angiogenic switch. *Cancer Metastasis Rev*, 19: 59-65, 2000.
12. Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J., and Holash, J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407: 242-248, 2000.
13. Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S., and Dvorak, H. F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219: 983-985, 1983.
14. Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V., and Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246: 1306-1309, 1989.

15. Senger, D. R., Perruzzi, C. A., Feder, J., and Dvorak, H. F. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res*, 46: 5629-5632, 1986.
16. Hayes, A. J., Li, L. Y., and Lippman, M. E. Science, medicine, and the future. Antivascular therapy: a new approach to cancer treatment. *Bmj*, 318: 853-856, 1999.
17. Hadley, C. W., Miller, E. C., Schwartz, S. J., and Clinton, S. K. Tomatoes, lycopene, and prostate cancer: progress and promise. *Exp Biol Med* (Maywood), 227: 869-880, 2002.
18. Khachik, F., Beecher, G. R., and Smith, J. C., Jr. Lutein, lycopene, and their oxidative metabolites in chemoprevention of cancer. *J Cell Biochem Suppl*, 22: 236-246, 1995.
19. Helzlsouer, K. J., Comstock, G. W., and Morris, J. S. Selenium, lycopene, alpha-tocopherol, beta-carotene, retinol, and subsequent bladder cancer. *Cancer Res*, 49: 6144-6148, 1989.
20. Potischman, N., McCulloch, C. E., Byers, T., Nemoto, T., Stubbe, N., Milch, R., Parker, R., Rasmussen, K. M., Root, M., Graham, S., and et al. Breast cancer and dietary and plasma concentrations of carotenoids and vitamin A. *Am J Clin Nutr*, 52: 909-915, 1990.
21. Levy, J., Bosin, E., Feldman, B., Giat, Y., Miinster, A., Danilenko, M., and Sharoni, Y. Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either alpha-carotene or beta-carotene. *Nutr Cancer*, 24: 257-266, 1995.
22. Giovannucci, E. and Clinton, S. K. Tomatoes, lycopene, and prostate cancer. *Proc Soc Exp Biol Med*, 218: 129-139, 1998.
23. Gann, P. H., Ma, J., Giovannucci, E., Willett, W., Sacks, F. M., Hennekens, C. H., and Stampfer, M. J. Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: results of a prospective analysis. *Cancer Res*, 59: 1225-1230, 1999.
24. Giovannucci, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst*, 91: 317-331, 1999.
25. Giovannucci, E., Ascherio, A., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., and Willett, W. C. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 87: 1767-1776, 1995.
26. Kelloff, G. J., Lieberman, R., Steele, V. E., Boone, C. W., Lubet, R. A., Kopelovitch, L., Malone, W. A., Crowell, J. A., and Sigman, C. C. Chemoprevention of prostate cancer: concepts and strategies. *Eur Urol*, 35: 342-350, 1999.

27. Kucuk, O. Chemoprevention of prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 21: 111-124, 2002.
28. Karas, M., Amir, H., Fishman, D., Danilenko, M., Segal, S., Nahum, A., Koifmann, A., Giat, Y., Levy, J., and Sharoni, Y. Lycopene interferes with cell cycle progression and insulin-like growth factor I signaling in mammary cancer cells. *Nutr Cancer*, 36: 101-111, 2000.
29. Amir, H., Karas, M., Giat, J., Danilenko, M., Levy, R., Yermiah, T., Levy, J., and Sharoni, Y. Lycopene and 1,25-dihydroxyvitamin D3 cooperate in the inhibition of cell cycle progression and induction of differentiation in HL-60 leukemic cells. *Nutr Cancer*, 33: 105-112, 1999.
30. Park, C. K., Ishimi, Y., Ohmura, M., Yamaguchi, M., and Ikegami, S. Vitamin A and carotenoids stimulate differentiation of mouse osteoblastic cells. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 43: 281-296, 1997.
31. Nahum, A., Hirsch, K., Danilenko, M., Watts, C. K., Prall, O. W., Levy, J., and Sharoni, Y. Lycopene inhibition of cell cycle progression in breast and endometrial cancer cells is associated with reduction in cyclin D levels and retention of p27(Kip1) in the cyclin E-cdk2 complexes. *Oncogene*, 20: 3428-3436, 2001.
32. Nahum, A., Zeller, L., Danilenko, M., Prall, O. W., Watts, C. K., Sutherland, R. L., Levy, J., and Sharoni, Y. Lycopene inhibition of IGF-induced cancer cell growth depends on the level of cyclin D1. *Eur J Nutr*, 45: 275-282, 2006.
33. Sherr, C. J. Cancer cell cycles. *Science*, 274: 1672-1677, 1996.
34. Chan, J. M., Stampfer, M. J., Giovannucci, E., Ma, J., and Pollak, M. Insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-binding protein-3 and prostate cancer risk: epidemiological studies. *Growth Horm IGF Res*, 10 Suppl A: S32-33, 2000.
35. Prakash, P., Russell, R. M., and Krinsky, N. I. In vitro inhibition of proliferation of estrogen-dependent and estrogen-independent human breast cancer cells treated with carotenoids or retinoids. *J Nutr*, 131: 1574-1580, 2001.
36. Li, Z., Wang, Y., and Mo, B. [The effects of carotenoids on the proliferation of human breast cancer cell and gene expression of bcl-2]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*, 36: 254-257, 2002.
37. Kim, L., Rao, A. V., and Rao, L. G. Effect of lycopene on prostate LNCaP cancer cells in culture. *J Med Food*, 5: 181-187, 2002.
38. Livny, O., Kaplan, I., Reifen, R., Polak-Charcon, S., Madar, Z., and Schwartz, B. Lycopene inhibits proliferation and enhances gap-junction communication of KB-1 human oral tumor cells. *J Nutr*, 132: 3754-3759, 2002.

39. Wang, C. J., Chou, M. Y., and Lin, J. K. Inhibition of growth and development of the transplantable C-6 glioma cells inoculated in rats by retinoids and carotenoids. *Cancer Lett*, 48: 135-142, 1989.
40. Hwang, E. S. and Lee, H. J. Inhibitory effects of lycopene on the adhesion, invasion, and migration of SK-Hep1 human hepatoma cells. *Exp Biol Med* (Maywood), 231: 322-327, 2006.
41. Huang, C. S., Shih, M. K., Chuang, C. H., and Hu, M. L. Lycopene inhibits cell migration and invasion and upregulates Nm23-H1 in a highly invasive hepatocarcinoma, SK-Hep-1 cells. *J Nutr*, 135: 2119-2123, 2005.
42. Kim, H. P., Mani, I., Iversen, L., and Ziboh, V. A. Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 58: 17-24, 1998.
43. Kuo, M. L. and Yang, N. C. Reversion of v-H-ras-transformed NIH 3T3 cells by apigenin through inhibiting mitogen activated protein kinase and its downstream oncogenes. *Biochem Biophys Res Commun*, 212: 767-775, 1995.
44. Fotsis, T., Pepper, M. S., Aktas, E., Breit, S., Rasku, S., Adlercreutz, H., Wahala, K., Montesano, R., and Schweigerer, L. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res*, 57: 2916-2921, 1997.
45. Wei, H., Tye, L., Bresnick, E., and Birt, D. F. Inhibitory effect of apigenin, a plant flavonoid, on epidermal ornithine decarboxylase and skin tumor promotion in mice. *Cancer Res*, 50: 499-502, 1990.
46. Wang, W., Heideman, L., Chung, C. S., Pelling, J. C., Koehler, K. J., and Birt, D. F. Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. *Mol Carcinog*, 28: 102-110, 2000.
47. Yin, F., Giuliano, A. E., Law, R. E., and Van Herle, A. J. Apigenin inhibits growth and induces G2/M arrest by modulating cyclin-CDK regulators and ERK MAP kinase activation in breast carcinoma cells. *Anticancer Res*, 21: 413-420, 2001.
48. Iwashita, K., Kobori, M., Yamaki, K., and Tsushida, T. Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 64: 1813-1820, 2000.
49. Gupta, S., Afaq, F., and Mukhtar, H. Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 287: 914-920, 2001.

50. Smith, J., Kontermann, R. E., Embleton, J., and Kumar, S. Antibody phage display technologies with special reference to angiogenesis. *Faseb J*, 19: 331-341, 2005.
51. Bussolino, F., Mantovani, A., and Persico, G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem Sci*, 22: 251-256, 1997.
52. Kohn, S., Nagy, J. A., Dvorak, H. F., and Dvorak, A. M. Pathways of macromolecular tracer transport across venules and small veins. Structural basis for the hyperpermeability of tumor blood vessels. *Lab Invest*, 67: 596-607, 1992.
53. Esser, S., Lampugnani, M. G., Corada, M., Dejana, E., and Risau, W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci*, 111 (Pt 13): 1853-1865, 1998.
54. Kevil, C. G., Payne, D. K., Mire, E., and Alexander, J. S. Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *J Biol Chem*, 273: 15099-15103, 1998.
55. Lal, B. K., Varma, S., Pappas, P. J., Hobson, R. W., 2nd, and Duran, W. N. VEGF increases permeability of the endothelial cell monolayer by activation of PKB/akt, endothelial nitric-oxide synthase, and MAP kinase pathways. *Microvasc Res*, 62: 252-262, 2001.
56. Ferrara, N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280: C1358-1366, 2001.
57. Doanes, A. M., Hegland, D. D., Sethi, R., Kovesdi, I., Bruder, J. T., and Finkel, T. VEGF stimulates MAPK through a pathway that is unique for receptor tyrosine kinases. *Biochem Biophys Res Commun*, 255: 545-548, 1999.
58. Mandriota, S. J., Seghezzi, G., Vassalli, J. D., Ferrara, N., Wasi, S., Mazziere, R., Mignatti, P., and Pepper, M. S. Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 270: 9709-9716, 1995.
59. Pepper, M. S., Ferrara, N., Orci, L., and Montesano, R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 181: 902-906, 1991.
60. Unemori, E. N., Ferrara, N., Bauer, E. A., and Amento, E. P. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol*, 153: 557-562, 1992.

61. Tang, H., Kerins, D. M., Hao, Q., Inagami, T., and Vaughan, D. E. The urokinase-type plasminogen activator receptor mediates tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and activation of mitogen-activated protein kinase in cultured endothelial cells. *J Biol Chem*, 273: 18268-18272, 1998.
62. Senger, D. R., Claffey, K. P., Benes, J. E., Perruzzi, C. A., Sergiou, A. P., and Detmar, M. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 13612-13617, 1997.
63. Senger, D. R., Ledbetter, S. R., Claffey, K. P., Papadopoulos-Sergiou, A., Peruzzi, C. A., and Detmar, M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the $\alpha v\beta 3$ integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol*, 149: 293-305, 1996.
64. Berra, E., Milanini, J., Richard, D. E., Le Gall, M., Vinals, F., Gothie, E., Roux, D., Pages, G., and Pouyssegur, J. Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochem Pharmacol*, 60: 1171-1178, 2000.
65. Khwaja, A. Akt is more than just a Bad kinase. *Nature*, 401: 33-34, 1999.
66. Fujio, Y. and Walsh, K. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *J Biol Chem*, 274: 16349-16354, 1999.
67. Morales-Ruiz, M., Fulton, D., Sowa, G., Languino, L. R., Fujio, Y., Walsh, K., and Sessa, W. C. Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt. *Circ Res*, 86: 892-896, 2000.
68. Mazure, N. M., Chen, E. Y., Laderoute, K. R., and Giaccia, A. J. Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. *Blood*, 90: 3322-3331, 1997.
69. Gupta, K., Kshirsagar, S., Li, W., Gui, L., Ramakrishnan, S., Gupta, P., Law, P. Y., and Hebbel, R. P. VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. *Exp Cell Res*, 247: 495-504, 1999.
70. Dimmeler, S., Dernbach, E., and Zeiher, A. M. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett*, 477: 258-262, 2000.
71. Buchler, P., Reber, H. A., Buchler, M., Shrinkante, S., Buchler, M. W., Friess, H., Semenza, G. L., and Hines, O. J. Hypoxia-inducible factor 1 regulates vascular endothelial growth factor expression in human pancreatic cancer. *Pancreas*, 26: 56-64, 2003.

72. Pardo, O. E., Arcaro, A., Salerno, G., Raguz, S., Downward, J., and Seckl, M. J. Fibroblast growth factor-2 induces translational regulation of Bcl-XL and Bcl-2 via a MEK-dependent pathway: correlation with resistance to etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 277: 12040-12046, 2002.
73. Mandriota, S. J. and Pepper, M. S. Vascular endothelial growth factor-induced in vitro angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor. *J Cell Sci*, 110 (Pt 18): 2293-2302, 1997.
74. Sato, Y. and Rifkin, D. B. Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis. *J Cell Biol*, 107: 1199-1205, 1988.
75. Ausprunk, D. H. and Folkman, J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res*, 14: 53-65, 1977.
76. Lobov, I. B., Brooks, P. C., and Lang, R. A. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 11205-11210, 2002.
77. Kim, I., Kim, H. G., So, J. N., Kim, J. H., Kwak, H. J., and Koh, G. Y. Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Circ Res*, 86: 24-29, 2000.
78. Papapetropoulos, A., Fulton, D., Mahboubi, K., Kalb, R. G., O'Connor, D. S., Li, F., Altieri, D. C., and Sessa, W. C. Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *J Biol Chem*, 275: 9102-9105, 2000.
79. Harfouche, R., Hassessian, H. M., Guo, Y., Faivre, V., Srikant, C. B., Yancopoulos, G. D., and Hussain, S. N. Mechanisms which mediate the antiapoptotic effects of angiopoietin-1 on endothelial cells. *Microvasc Res*, 64: 135-147, 2002.
80. Kim, I., Kim, H. G., Moon, S. O., Chae, S. W., So, J. N., Koh, K. N., Ahn, B. C., and Koh, G. Y. Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. *Circ Res*, 86: 952-959, 2000.
81. Laping, N. J., Grygielko, E., Mathur, A., Butter, S., Bomberger, J., Tweed, C., Martin, W., Fornwald, J., Lehr, R., Harling, J., Gaster, L., Callahan, J. F., and Olson, B. A. Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542. *Mol Pharmacol*, 62: 58-64, 2002.
82. Lawrence, D. A., Pircher, R., and Jullien, P. Conversion of a high molecular weight latent beta-TGF from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weight active beta-TGF under acidic conditions. *Biochem Biophys Res Commun*, 133: 1026-1034, 1985.

83. Lyons, R. M., Keski-Oja, J., and Moses, H. L. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol*, 106: 1659-1665, 1988.
84. Saito, H., Tsujitani, S., Oka, S., Kondo, A., Ikeguchi, M., Maeta, M., and Kaibara, N. The expression of transforming growth factor-beta1 is significantly correlated with the expression of vascular endothelial growth factor and poor prognosis of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer*, 86: 1455-1462, 1999.
85. O'Mahony, C. A., Albo, D., Tuszynski, G. P., and Berger, D. H. Transforming growth factor-beta 1 inhibits generation of angiostatin by human pancreatic cancer cells. *Surgery*, 124: 388-393, 1998.
86. Ellenrieder, V., Hendler, S. F., Ruhland, C., Boeck, W., Adler, G., and Gress, T. M. TGF-beta-induced invasiveness of pancreatic cancer cells is mediated by matrix metalloproteinase-2 and the urokinase plasminogen activator system. *Int J Cancer*, 93: 204-211, 2001.
87. Bar-Eli, M. Role of interleukin-8 in tumor growth and metastasis of human melanoma. *Pathobiology*, 67: 12-18, 1999.
88. Kitadai, Y., Takahashi, Y., Haruma, K., Naka, K., Sumii, K., Yokozaki, H., Yasui, W., Mukaida, N., Ohmoto, Y., Kajiyama, G., Fidler, I. J., and Tahara, E. Transfection of interleukin-8 increases angiogenesis and tumorigenesis of human gastric carcinoma cells in nude mice. *Br J Cancer*, 81: 647-653, 1999.
89. Brooks, P. C., Silletti, S., von Schalscha, T. L., Friedlander, M., and Cheresch, D. A. Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell*, 92: 391-400, 1998.
90. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285: 1182-1186, 1971.
91. Cherrington, J. M., Strawn, L. M., and Shawver, L. K. New paradigms for the treatment of cancer: the role of anti-angiogenesis agents. *Adv Cancer Res*, 79: 1-38, 2000.
92. Coffey, R. N., Morrissey, C., Taylor, C. T., Fitzpatrick, J. M., and Watson, R. W. Resistance to caspase-dependent, hypoxia-induced apoptosis is not hypoxia-inducible factor-1 alpha mediated in prostate carcinoma cells. *Cancer*, 103: 1363-1374, 2005.
93. Sebti, S. M. and Hamilton, A. D. Design of growth factor antagonists with antiangiogenic and antitumor properties. *Oncogene*, 19: 6566-6573, 2000.
94. Dameron, K. M., Volpert, O. V., Tainsky, M. A., and Bouck, N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science*, 265: 1582-1584, 1994.

95. Tosetti, F., Ferrari, N., De Flora, S., and Albini, A. Angioprevention': angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents. *Faseb J*, 16: 2-14, 2002.
96. Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C., and Williams, G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med*, 133: 275-288, 1971.
97. Boehm, T., Folkman, J., Browder, T., and O'Reilly, M. S. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*, 390: 404-407, 1997.
98. Hanahan, D. and Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86: 353-364, 1996.
99. Trichopoulos, D. and Willett, W. C. Nutrition and cancer. *Cancer Causes Control*, 7: 3-4, 1996.
100. Williams, G. M., Williams, C. L., and Weisburger, J. H. Diet and cancer prevention: the fiber first diet. *Toxicol Sci*, 52: 72-86, 1999.
101. Agarwal, S. and Rao, A. V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Cmaj*, 163: 739-744, 2000.
102. Ames, B. N., Gold, L. S., and Willett, W. C. The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 5258-5265, 1995.
103. Witztum, J. L. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet*, 344: 793-795, 1994.
104. Halliwell, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 344: 721-724, 1994.
105. Rao, A. V. and Agarwal, S. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *J Am Coll Nutr*, 19: 563-569, 2000.
106. Clinton, S. K. Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr Rev*, 56: 35-51, 1998.
107. van Breemen, R. B. and Pajkovic, N. Multitargeted therapy of cancer by lycopene. *Cancer Lett*, 269: 339-351, 2008.
108. Olson, J. A. and Krinsky, N. I. Introduction: the colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators. *Faseb J*, 9: 1547-1550, 1995.
109. Bohm, V., Frohlich, K., and Bitsch, R. Rosehip -- a "new" source of lycopene? *Mol Aspects Med*, 24: 385-389, 2003.
110. Mangels, A. R., Holden, J. M., Beecher, G. R., Forman, M. R., and Lanza, E. Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. *J Am Diet Assoc*, 93: 284-296, 1993.

111. Stahl, W., Schwarz, W., Sundquist, A. R., and Sies, H. cis-trans isomers of lycopene and beta-carotene in human serum and tissues. *Arch Biochem Biophys*, 294: 173-177, 1992.
112. Krinsky, N. I. The antioxidant and biological properties of the carotenoids. *Ann N Y Acad Sci*, 854: 443-447, 1998.
113. Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M., and Rice-Evans, C. A. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett*, 384: 240-242, 1996.
114. Mortensen, A. and Skibsted, L. H. Relative stability of carotenoid radical cations and homologue tocopheroxyl radicals. A real time kinetic study of antioxidant hierarchy. *FEBS Lett*, 417: 261-266, 1997.
115. Woodall, A. A., Lee, S. W., Weesie, R. J., Jackson, M. J., and Britton, G. Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity. *Biochim Biophys Acta*, 1336: 33-42, 1997.
116. Di Mascio, P., Kaiser, S., and Sies, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys*, 274: 532-538, 1989.
117. Erdman, J. W., Jr., Bierer, T. L., and Gugger, E. T. Absorption and transport of carotenoids. *Ann N Y Acad Sci*, 691: 76-85, 1993.
118. Kaplan, L. A., Lau, J. M., and Stein, E. A. Carotenoid composition, concentrations, and relationships in various human organs. *Clin Physiol Biochem*, 8: 1-10, 1990.
119. Schmitz, H. H., Poor, C. L., Wellman, R. B., and Erdman, J. W., Jr. Concentrations of selected carotenoids and vitamin A in human liver, kidney and lung tissue. *J Nutr*, 121: 1613-1621, 1991.
120. Nierenberg, D. W. and Nann, S. L. A method for determining concentrations of retinol, tocopherol, and five carotenoids in human plasma and tissue samples. *Am J Clin Nutr*, 56: 417-426, 1992.
121. Michaud, D. S., Giovannucci, E. L., Ascherio, A., Rimm, E. B., Forman, M. R., Sampson, L., and Willett, W. C. Associations of plasma carotenoid concentrations and dietary intake of specific carotenoids in samples of two prospective cohort studies using a new carotenoid database. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 7: 283-290, 1998.
122. Freeman, V. L., Meydani, M., Yong, S., Pyle, J., Wan, Y., Arvizu-Durazo, R., and Liao, Y. Prostatic levels of tocopherols, carotenoids, and retinol in relation to plasma levels and self-reported usual dietary intake. *Am J Epidemiol*, 151: 109-118, 2000.
123. Armstrong, G. A. and Hearst, J. E. Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *Faseb J*, 10: 228-237, 1996.

124. Demmig-Adams, B., Gilmore, A. M., and Adams, W. W., 3rd Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants. *Faseb J*, 10: 403-412, 1996.
125. Stahl, W. and Sies, H. Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? *Arch Biochem Biophys*, 336: 1-9, 1996.
126. Wiseman, H. and Halliwell, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J*, 313 (Pt 1): 17-29, 1996.
127. Huang, H. Y., Helzlsouer, K. J., and Appel, L. J. The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: results from a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9: 647-652, 2000.
128. Frelon, S., Douki, T., Favier, A., and Cadet, J. Hydroxyl radical is not the main reactive species involved in the degradation of DNA bases by copper in the presence of hydrogen peroxide. *Chem Res Toxicol*, 16: 191-197, 2003.
129. Britton, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Faseb J*, 9: 1551-1558, 1995.
130. Krinsky, N. I. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med*, 200: 248-254, 1992.
131. Krinsky, N. I. Overview of lycopene, carotenoids, and disease prevention. *Proc Soc Exp Biol Med*, 218: 95-97, 1998.
132. Bast, A., Haenen, G. R., van den Berg, R., and van den Berg, H. Antioxidant effects of carotenoids. *Int J Vitam Nutr Res*, 68: 399-403, 1998.
133. Muzandu, K., Ishizuka, M., Sakamoto, K. Q., Shaban, Z., El Bohi, K., Kazusaka, A., and Fujita, S. Effect of lycopene and beta-carotene on peroxynitrite-mediated cellular modifications. *Toxicol Appl Pharmacol*, 215: 330-340, 2006.
134. Park, Y. O., Hwang, E. S., and Moon, T. W. The effect of lycopene on cell growth and oxidative DNA damage of Hep3B human hepatoma cells. *Biofactors*, 23: 129-139, 2005.
135. Liu, A., Pajkovic, N., Pang, Y., Zhu, D., Calamini, B., Mesecar, A. L., and van Breemen, R. B. Absorption and subcellular localization of lycopene in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 5: 2879-2885, 2006.
136. Muzandu, K., El Bohi, K., Shaban, Z., Ishizuka, M., Kazusaka, A., and Fujita, S. Lycopene and beta-carotene ameliorate catechol estrogen-mediated DNA damage. *Jpn J Vet Res*, 52: 173-184, 2005.
137. Ben-Dor, A., Steiner, M., Gheber, L., Danilenko, M., Dubi, N., Linnewiel, K., Zick, A., Sharoni, Y., and Levy, J. Carotenoids activate the antioxidant response element transcription system. *Mol Cancer Ther*, 4: 177-186, 2005.

138. Hantz, H. L., Young, L. F., and Martin, K. R. Physiologically attainable concentrations of lycopene induce mitochondrial apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 230: 171-179, 2005.
139. Kanagaraj, P., Vijayababu, M. R., Ravisankar, B., Anbalagan, J., Aruldas, M. M., and Arunakaran, J. Effect of lycopene on insulin-like growth factor-I, IGF binding protein-3 and IGF type-I receptor in prostate cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 133: 351-359, 2007.
140. Salman, H., Bergman, M., Djaldetti, M., and Bessler, H. Lycopene affects proliferation and apoptosis of four malignant cell lines. *Biomed Pharmacother*, 61: 366-369, 2007.
141. Ivanov, N. I., Cowell, S. P., Brown, P., Rennie, P. S., Guns, E. S., and Cox, M. E. Lycopene differentially induces quiescence and apoptosis in androgen-responsive and -independent prostate cancer cell lines. *Clin Nutr*, 26: 252-263, 2007.
142. Matsushima-Nishiwaki, R., Shidoji, Y., Nishiwaki, S., Yamada, T., Moriwaki, H., and Muto, Y. Suppression by carotenoids of microcystin-induced morphological changes in mouse hepatocytes. *Lipids*, 30: 1029-1034, 1995.
143. Lian, F., Smith, D. E., Ernst, H., Russell, R. M., and Wang, X. D. Apo-10'-lycopenoic acid inhibits lung cancer cell growth in vitro, and suppresses lung tumorigenesis in the A/J mouse model in vivo. *Carcinogenesis*, 28: 1567-1574, 2007.
144. Fornelli, F., Leone, A., Verdesca, I., Minervini, F., and Zacheo, G. The influence of lycopene on the proliferation of human breast cell line (MCF-7). *Toxicol In Vitro*, 21: 217-223, 2007.
145. Gunasekera, R. S., Sewgobind, K., Desai, S., Dunn, L., Black, H. S., McKeehan, W. L., and Patil, B. Lycopene and lutein inhibit proliferation in rat prostate carcinoma cells. *Nutr Cancer*, 58: 171-177, 2007.
146. Barber, N. J., Zhang, X., Zhu, G., Pramanik, R., Barber, J. A., Martin, F. L., Morris, J. D., and Muir, G. H. Lycopene inhibits DNA synthesis in primary prostate epithelial cells in vitro and its administration is associated with a reduced prostate-specific antigen velocity in a phase II clinical study. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 9: 407-413, 2006.
147. Heldin, C. H. and Westermark, B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*, 79: 1283-1316, 1999.
148. Ruiter, D., Bogenrieder, T., Elder, D., and Herlyn, M. Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. *Lancet Oncol*, 3: 35-43, 2002.
149. Chiang, H. S., Wu, W. B., Fang, J. Y., Chen, D. F., Chen, B. H., Huang, C. C., Chen, Y. T., and Hung, C. F. Lycopene inhibits PDGF-BB-induced

signaling and migration in human dermal fibroblasts through interaction with PDGF-BB. *Life Sci*, 81: 1509-1517, 2007.

150. Huang, C. S., Fan, Y. E., Lin, C. Y., and Hu, M. L. Lycopene inhibits matrix metalloproteinase-9 expression and down-regulates the binding activity of nuclear factor-kappa B and stimulatory protein-1. *J Nutr Biochem*, 18: 449-456, 2007.
151. Zhang, L. X., Cooney, R. V., and Bertram, J. S. Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. *Carcinogenesis*, 12: 2109-2114, 1991.
152. Zhang, L. X., Cooney, R. V., and Bertram, J. S. Carotenoids up-regulate connexin43 gene expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. *Cancer Res*, 52: 5707-5712, 1992.
153. Astorg, P., Gradelet, S., Berges, R., and Suschetet, M. Dietary lycopene decreases the initiation of liver preneoplastic foci by diethylnitrosamine in the rat. *Nutr Cancer*, 29: 60-68, 1997.
154. Nagasawa, H., Mitamura, T., Sakamoto, S., and Yamamoto, K. Effects of lycopene on spontaneous mammary tumour development in SHN virgin mice. *Anticancer Res*, 15: 1173-1178, 1995.
155. Kobayashi, T., Iijima, K., Mitamura, T., Toriizuka, K., Cyong, J. C., and Nagasawa, H. Effects of lycopene, a carotenoid, on intrathymic T cell differentiation and peripheral CD4/CD8 ratio in a high mammary tumor strain of SHN retired mice. *Anticancer Drugs*, 7: 195-198, 1996.
156. Fuhrman, B., Elis, A., and Aviram, M. Hypocholesterolemic effect of lycopene and beta-carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 233: 658-662, 1997.
157. La Vecchia, C. Mediterranean epidemiological evidence on tomatoes and the prevention of digestive-tract cancers. *Proc Soc Exp Biol Med*, 218: 125-128, 1998.
158. Franceschi, S., Bidoli, E., La Vecchia, C., Talamini, R., D'Avanzo, B., and Negri, E. Tomatoes and risk of digestive-tract cancers. *Int J Cancer*, 59: 181-184, 1994.
159. Colditz, G. A., Branch, L. G., Lipnick, R. J., Willett, W. C., Rosner, B., Posner, B. M., and Hennekens, C. H. Increased green and yellow vegetable intake and lowered cancer deaths in an elderly population. *Am J Clin Nutr*, 41: 32-36, 1985.
160. Dorgan, J. F., Sowell, A., Swanson, C. A., Potischman, N., Miller, R., Schussler, N., and Stephenson, H. E., Jr. Relationships of serum carotenoids, retinol, alpha-tocopherol, and selenium with breast cancer risk: results from a

prospective study in Columbia, Missouri (United States). *Cancer Causes Control*, 9: 89-97, 1998.

161. Rao, A. V., Fleshner, N., and Agarwal, S. Serum and tissue lycopene and biomarkers of oxidation in prostate cancer patients: a case-control study. *Nutr Cancer*, 33: 159-164, 1999.
162. Agarwal, S. and Rao, A. V. Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study. *Lipids*, 33: 981-984, 1998.
163. Rao, A. V. and Agarwal, S. Bioavailability and in vivo antioxidant properties of lycopene from tomato products and their possible role in the prevention of cancer. *Nutr Cancer*, 31: 199-203, 1998.
164. Pool-Zobel, B. L., Bub, A., Muller, H., Wollowski, I., and Rechkemmer, G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis*, 18: 1847-1850, 1997.
165. Matos, H. R., Di Mascio, P., and Medeiros, M. H. Protective effect of lycopene on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture. *Arch Biochem Biophys*, 383: 56-59, 2000.
166. Parthasarathy, S., Steinberg, D., and Witztum, J. L. The role of oxidized low-density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Annu Rev Med*, 43: 219-225, 1992.
167. Heller, F. R., Descamps, O., and Hondekjær, J. C. LDL oxidation: therapeutic perspectives. *Atherosclerosis*, 137 Suppl: S25-31, 1998.
168. Morris, D. L., Kritchevsky, S. B., and Davis, C. E. Serum carotenoids and coronary heart disease. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial and Follow-up Study. *Jama*, 272: 1439-1441, 1994.
169. Hodis, H. N., Mack, W. J., LaBree, L., Cashin-Hemphill, L., Sevanian, A., Johnson, R., and Azen, S. P. Serial coronary angiographic evidence that antioxidant vitamin intake reduces progression of coronary artery atherosclerosis. *Jama*, 273: 1849-1854, 1995.
170. Paolisso, G., Gambardella, A., Giugliano, D., Galzerano, D., Amato, L., Volpe, C., Balbi, V., Varricchio, M., and D'Onofrio, F. Chronic intake of pharmacological doses of vitamin E might be useful in the therapy of elderly patients with coronary heart disease. *Am J Clin Nutr*, 61: 848-852, 1995.
171. Yusuf, S., Dagenais, G., Pogue, J., Bosch, J., and Sleight, P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*, 342: 154-160, 2000.
172. Kohlmeier, L., Kark, J. D., Gomez-Gracia, E., Martin, B. C., Steck, S. E., Kardinaal, A. F., Ringstad, J., Thamm, M., Masaev, V., Riemersma, R.,

- Martin-Moreno, J. M., Huttunen, J. K., and Kok, F. J. Lycopene and myocardial infarction risk in the EURAMIC Study. *Am J Epidemiol*, 146: 618-626, 1997.
173. Kristenson, M., Zieden, B., Kucinskiene, Z., Elinder, L. S., Bergdahl, B., Elwing, B., Abaravicius, A., Razinkoviene, L., Calkauskas, H., and Olsson, A. G. Antioxidant state and mortality from coronary heart disease in Lithuanian and Swedish men: concomitant cross sectional study of men aged 50. *Bmj*, 314: 629-633, 1997.
 174. Stahl, W. and Sies, H. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. *J Nutr*, 122: 2161-2166, 1992.
 175. Gartner, C., Stahl, W., and Sies, H. Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *Am J Clin Nutr*, 66: 116-122, 1997.
 176. Johnson, E. J., Qin, J., Krinsky, N. I., and Russell, R. M. Ingestion by men of a combined dose of beta-carotene and lycopene does not affect the absorption of beta-carotene but improves that of lycopene. *J Nutr*, 127: 1833-1837, 1997.
 177. Patel, D., Shukla, S., and Gupta, S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). *Int J Oncol*, 30: 233-245, 2007.
 178. Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T., and Newmark, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr*, 21: 381-406, 2001.
 179. Surh, Y. J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*, 3: 768-780, 2003.
 180. O'Prey, J., Brown, J., Fleming, J., and Harrison, P. R. Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelial cells. *Biochem Pharmacol*, 66: 2075-2088, 2003.
 181. Thiery-Vuillemin, A., Nguyen, T., Pivot, X., Spano, J. P., Dufresne, A., and Soria, J. C. Molecularly targeted agents: their promise as cancer chemopreventive interventions. *Eur J Cancer*, 41: 2003-2015, 2005.
 182. Birt, D. F., Walker, B., Tibbels, M. G., and Bresnick, E. Anti-mutagenesis and anti-promotion by apigenin, robinetin and indole-3-carbinol. *Carcinogenesis*, 7: 959-963, 1986.
 183. Graf, J. Herbal anti-inflammatory agents for skin disease. *Skin Therapy Lett*, 5: 3-5, 2000.
 184. Kuo, M. L., Lee, K. C., and Lin, J. K. Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by apigenin, tannic acid, ellagic acid and indole-3-carbinol in the Salmonella and CHO systems. *Mutat Res*, 270: 87-95, 1992.

185. Middleton, E., Jr., Kandaswami, C., and Theoharides, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, 52: 673-751, 2000.
186. Birt, D. F., Mitchell, D., Gold, B., Pour, P., and Pinch, H. C. Inhibition of ultraviolet light induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by apigenin, a plant flavonoid. *Anticancer Res*, 17: 85-91, 1997.
187. Van Dross, R., Xue, Y., Knudson, A., and Pelling, J. C. The chemopreventive bioflavonoid apigenin modulates signal transduction pathways in keratinocyte and colon carcinoma cell lines. *J Nutr*, 133: 3800S-3804S, 2003.
188. Myhrstad, M. C., Carlsen, H., Nordstrom, O., Blomhoff, R., and Moskaug, J. O. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic Biol Med*, 32: 386-393, 2002.
189. Liang, Y. C., Huang, Y. T., Tsai, S. H., Lin-Shiau, S. Y., Chen, C. F., and Lin, J. K. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 20: 1945-1952, 1999.
190. Choi, J. S., Choi, Y. J., Park, S. H., Kang, J. S., and Kang, Y. H. Flavones mitigate tumor necrosis factor-alpha-induced adhesion molecule upregulation in cultured human endothelial cells: role of nuclear factor-kappa B. *J Nutr*, 134: 1013-1019, 2004.
191. Williams, R. J., Spencer, J. P., and Rice-Evans, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med*, 36: 838-849, 2004.
192. Lee, S. F. and Lin, J. K. Inhibitory effects of phytopolyphenols on TPA-induced transformation, PKC activation, and c-jun expression in mouse fibroblast cells. *Nutr Cancer*, 28: 177-183, 1997.
193. Lin, J. K., Chen, Y. C., Huang, Y. T., and Lin-Shiau, S. Y. Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanisms of cancer chemoprevention by apigenin and curcumin. *J Cell Biochem Suppl*, 28-29: 39-48, 1997.
194. Mounho, B. J. and Thrall, B. D. The extracellular signal-regulated kinase pathway contributes to mitogenic and antiapoptotic effects of peroxisome proliferators in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*, 159: 125-133, 1999.
195. Carrillo, C., Cafferata, E. G., Genovese, J., O'Reilly, M., Roberts, A. B., and Santa-Coloma, T. A. TGF-beta1 up-regulates the mRNA for the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in neonatal rat cardiac myocytes. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 44: 543-551, 1998.
196. Yin, F., Giuliano, A. E., and Van Herle, A. J. Signal pathways involved in apigenin inhibition of growth and induction of apoptosis of human anaplastic thyroid cancer cells (ARO). *Anticancer Res*, 19: 4297-4303, 1999.

197. Hessenauer, A., Montenarh, M., and Gotz, C. Inhibition of CK2 activity provokes different responses in hormone-sensitive and hormone-refractory prostate cancer cells. *Int J Oncol*, 22: 1263-1270, 2003.
198. Landesman-Bollag, E., Song, D. H., Romieu-Mourez, R., Sussman, D. J., Cardiff, R. D., Sonenshein, G. E., and Seldin, D. C. Protein kinase CK2: signaling and tumorigenesis in the mammary gland. *Mol Cell Biochem*, 227: 153-165, 2001.
199. Plaumann, B., Fritsche, M., Rimpler, H., Brandner, G., and Hess, R. D. Flavonoids activate wild-type p53. *Oncogene*, 13: 1605-1614, 1996.
200. Lepley, D. M. and Pelling, J. C. Induction of p21/WAF1 and G1 cell-cycle arrest by the chemopreventive agent apigenin. *Mol Carcinog*, 19: 74-82, 1997.
201. Gupta, S., Afaq, F., and Mukhtar, H. Involvement of nuclear factor-kappa B, Bax and Bcl-2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma cells. *Oncogene*, 21: 3727-3738, 2002.
202. Shukla, S. and Gupta, S. Molecular mechanisms for apigenin-induced cell-cycle arrest and apoptosis of hormone refractory human prostate carcinoma DU145 cells. *Mol Carcinog*, 39: 114-126, 2004.
203. Wang, I. K., Lin-Shiau, S. Y., and Lin, J. K. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur J Cancer*, 35: 1517-1525, 1999.
204. Hirano, T., Oka, K., and Akiba, M. Antiproliferative effects of synthetic and naturally occurring flavonoids on tumor cells of the human breast carcinoma cell line, ZR-75-1. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 64: 69-78, 1989.
205. Lindenmeyer, F., Li, H., Menashi, S., Soria, C., and Lu, H. Apigenin acts on the tumor cell invasion process and regulates protease production. *Nutr Cancer*, 39: 139-147, 2001.
206. Panes, J., Gerritsen, M. E., Anderson, D. C., Miyasaka, M., and Granger, D. N. Apigenin inhibits tumor necrosis factor-induced intercellular adhesion molecule-1 upregulation in vivo. *Microcirculation*, 3: 279-286, 1996.
207. Piantelli, M., Rossi, C., Iezzi, M., La Sorda, R., Iacobelli, S., Alberti, S., and Natali, P. G. Flavonoids inhibit melanoma lung metastasis by impairing tumor cells endothelium interactions. *J Cell Physiol*, 207: 23-29, 2006.
208. Osada, M., Imaoka, S., and Funae, Y. Apigenin suppresses the expression of VEGF, an important factor for angiogenesis, in endothelial cells via degradation of HIF-1alpha protein. *FEBS Lett*, 575: 59-63, 2004.

209. Fang, J., Xia, C., Cao, Z., Zheng, J. Z., Reed, E., and Jiang, B. H. Apigenin inhibits VEGF and HIF-1 expression via PI3K/AKT/p70S6K1 and HDM2/p53 pathways. *Faseb J*, 19: 342-353, 2005.
210. Le Bail, J. C., Laroche, T., Marre-Fournier, F., and Habrioux, G. Aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibition by flavonoids. *Cancer Lett*, 133: 101-106, 1998.
211. Hiremath, S. P., Badami, S., Hunasagatta, S. K., and Patil, S. B. Antifertility and hormonal properties of flavones of *Striga orobanchioides*. *Eur J Pharmacol*, 391: 193-197, 2000.
212. Shukla, S., Mishra, A., Fu, P., MacLennan, G. T., Resnick, M. I., and Gupta, S. Up-regulation of insulin-like growth factor binding protein-3 by apigenin leads to growth inhibition and apoptosis of 22Rv1 xenograft in athymic nude mice. *Faseb J*, 19: 2042-2044, 2005.
213. Menichincheri, M., Ballinari, D., Bargiotti, A., Bonomini, L., Ceccarelli, W., D'Alessio, R., Fretta, A., Moll, J., Polucci, P., Soncini, C., Tibolla, M., Trosset, J. Y., and Vanotti, E. Catecholic flavonoids acting as telomerase inhibitors. *J Med Chem*, 47: 6466-6475, 2004.
214. Brusselmans, K., Vrolix, R., Verhoeven, G., and Swinnen, J. V. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *J Biol Chem*, 280: 5636-5645, 2005.
215. Kim, M. H. Flavonoids inhibit VEGF/bFGF-induced angiogenesis in vitro by inhibiting the matrix-degrading proteases. *J Cell Biochem*, 89: 529-538, 2003.
216. Reiners, J. J., Jr., Clift, R., and Mathieu, P. Suppression of cell cycle progression by flavonoids: dependence on the aryl hydrocarbon receptor. *Carcinogenesis*, 20: 1561-1566, 1999.
217. Way, T. D., Kao, M. C., and Lin, J. K. Apigenin induces apoptosis through proteasomal degradation of HER2/neu in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem*, 279: 4479-4489, 2004.
218. Mennen, L. I., Sapinho, D., de Bree, A., Arnault, N., Bertrais, S., Galan, P., and Hercberg, S. Consumption of foods rich in flavonoids is related to a decreased cardiovascular risk in apparently healthy French women. *J Nutr*, 134: 923-926, 2004.
219. Xu, W. H., Zheng, W., Xiang, Y. B., Ruan, Z. X., Cheng, J. R., Dai, Q., Gao, Y. T., and Shu, X. O. Soya food intake and risk of endometrial cancer among Chinese women in Shanghai: population based case-control study. *Bmj*, 328: 1285, 2004.
220. Miller, A. B. Diet and cancer. A review. *Acta Oncol*, 29: 87-95, 1990.

221. Kennedy, A. R. The evidence for soybean products as cancer preventive agents. *J Nutr*, 125: 733S-743S, 1995.
222. Lian, F., Bhuiyan, M., Li, Y. W., Wall, N., Kraut, M., and Sarkar, F. H. Genistein-induced G2-M arrest, p21WAF1 upregulation, and apoptosis in a non-small-cell lung cancer cell line. *Nutr Cancer*, 31: 184-191, 1998.
223. Shao, Z. M., Alpaugh, M. L., Fontana, J. A., and Barsky, S. H. Genistein inhibits proliferation similarly in estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cell lines characterized by P21WAF1/CIP1 induction, G2/M arrest, and apoptosis. *J Cell Biochem*, 69: 44-54, 1998.
224. Davis, J. N., Kucuk, O., and Sarkar, F. H. Genistein inhibits NF-kappa B activation in prostate cancer cells. *Nutr Cancer*, 35: 167-174, 1999.
225. Fotsis, T., Pepper, M., Adlercreutz, H., Hase, T., Montesano, R., and Schweigerer, L. Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis. *J Nutr*, 125: 790S-797S, 1995.
226. Fotsis, T., Pepper, M. S., Montesano, R., Aktas, E., Breit, S., Schweigerer, L., Rasku, S., Wahala, K., and Adlercreutz, H. Phytoestrogens and inhibition of angiogenesis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 12: 649-666, 1998.
227. Martin, K. R., Wu, D., and Meydani, M. The effect of carotenoids on the expression of cell surface adhesion molecules and binding of monocytes to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*, 150: 265-274, 2000.
228. Lin, C. Y., Huang, C. S., and Hu, M. L. The use of fetal bovine serum as delivery vehicle to improve the uptake and stability of lycopene in cell culture studies. *Br J Nutr*, 98: 226-232, 2007.
229. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65: 55-63, 1983.
230. Schleef, R. R. and Birdwell, C. R. The effect of fibrin on endothelial cell migration in vitro. *Tissue Cell*, 14: 629-636, 1982.
231. Erdogan, A., Most, A. K., Wienecke, B., Fehsecke, A., Leckband, C., Voss, R., Grebe, M. T., Tillmanns, H., Schaefer, C. A., and Kuhlmann, C. R. Apigenin-induced nitric oxide production involves calcium-activated potassium channels and is responsible for antiangiogenic effects. *J Thromb Haemost*, 5: 1774-1781, 2007.
232. Trochon, V., Blot, E., Cymbalista, F., Engelmann, C., Tang, R. P., Thomaidis, A., Vasse, M., Soria, J., Lu, H., and Soria, C. Apigenin inhibits endothelial-cell proliferation in G(2)/M phase whereas it stimulates smooth-muscle cells by inhibiting P21 and P27 expression. *Int J Cancer*, 85: 691-696, 2000.

ÖZGEÇMİŞ

Mehmet ŞAHİN 19 Şubat 1978 yılında Adana’da doğmuştur. İlkokul öğrenimini 1985-1989 yılları arasında Adana Hürriyet İlkokulu’nda ve son dönemi Malatya Hidayet İlkokulu’nda, orta okul öğrenimini 1989-1992 yılları arasında Malatya Kubilay Lisesi’nde, lise öğrenimini 1992-1995 yılları arasında Malatya Kubilay Lisesi’nde, yüksek öğrenimini 1995-1999 yılları arasında Ankara Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde ve yüksek lisans öğrenimini 2000-2003 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı’nda tamamlamıştır. 2003 yılında aynı bölümde Doktora öğrenimine başlamıştır. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce’dir. Evlidir ve 1 kız çocuğu babasıdır.

EKLER

Cyclooxygenase-2 in Cancer and Angiogenesis

Mehmet Sahin, Emel Sahin and Saadet Gümüslü

Angiology 2009; 60; 242 originally published online May 27, 2008;

DOI: 10.1177/0003319708318378

The online version of this article can be found at:

<http://ang.sagepub.com/cgi/content/abstract/60/2/242>

Published by:



<http://www.sagepublications.com>

Additional services and information for *Angiology* can be found at:

Email Alerts: <http://ang.sagepub.com/cgi/alerts>

Subscriptions: <http://ang.sagepub.com/subscriptions>

Reprints: <http://www.sagepub.com/journalsReprints.nav>

Permissions: <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>

Citations <http://ang.sagepub.com/cgi/content/refs/60/2/242>

Cyclooxygenase-2 in Cancer and Angiogenesis

Mehmet Şahin, MSc, Emel Şahin, MSc, and
Saadet Gümüslü, PhD

Tumor angiogenesis is a process where new blood vessels are formed from preexisting ones, resulting in several pathologies. Solid tumors induce angiogenesis to obtain the required nutrients and oxygen. Otherwise, tumors do not grow beyond 2 to 3 mm in diameter. Cyclooxygenase-2, an inducible enzyme important in inflammation, catalyzes the production of prostanoids from arachidonic acid. Cyclooxygenase-2 plays an important role in several cancer types, including colorectal, gastric, prostate, breast, lung, and endometrial

cancer. Besides, cyclooxygenase-2 has been implicated in the progression and angiogenesis of cancers. Cyclooxygenase-2 inhibitors have been used to block angiogenesis and tumor proliferation. In this review, the recent studies related to the role of cyclooxygenase-2 in several cancer types and tumor-induced angiogenesis were compiled.

Keywords: cyclooxygenase-2; angiogenesis; cancer; endothelial cells

Angiogenesis, the formation of new blood vessels from the existing vasculature, is essential for tumor growth and metastasis.¹ In addition to tumor growth, angiogenesis plays a role in other human pathologies, including rheumatoid arthritis,² diabetic retinopathy,³ atherosclerosis,⁴ psoriasis,⁵ and chronic airway inflammation.⁶ In human physiology, angiogenesis is also known to occur during reproduction and wound healing.⁷ As first suggested by Folkman in 1971,⁸ tumor growth is dependent on nutritional support derived from the local blood supply. Tumors smaller than 2 mm are generally considered capable of maintaining their nutritional needs through diffusion of oxygen and nutrients from surrounding vasculature and remain relatively dormant because of these nutritional and oxygen restrictions.⁹

Cyclooxygenase-2 (COX-2) was first identified as an oncogene-responsive COX.^{10,11} Laboratory and animal studies have shown that COX-2 may be involved in carcinogenesis, tumor promotion and

progression.^{12,13} Recently, COX-2 was also found to play a role in tumor angiogenesis.¹⁴ Cyclooxygenase-2, present at a basal level in certain tissues, is an early response gene and induced by oncogenes, carcinogens, tumor promoters, and some angiogenesis inducers, such as vascular endothelial growth factor (VEGF),¹⁵ basic fibroblast growth factor (bFGF),¹⁶ and hypoxia.¹⁷ For example, COX-2 is undetectable in normal intestinal mucosa,^{12,18} whereas increased COX-2 expression has been found in up to 85% of colorectal adenocarcinomas. Although this percentage (85%) in a cancer type may be sufficient to focus on COX-2, we may wonder which cancer types are also affected by this enzyme. Role of COX-2 in several cancer types is demonstrated in this review.

The most important strategy in studies that aim to show roles of COX-2 in cancer and angiogenesis is the use of COX-2 inhibitors in studies. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been used clinically for more than 100 years, and there have been studies about their anticancer effects in rodent animals for over 2 decades.¹⁹ Waddell and Loughry²⁰ began to administer sulindac to Gardner patients in 1983 to treat colon polyposis and gained a curative effect. For a long time, it has been assumed that the antiproliferative effects of NSAIDs are dependent on inhibition of COX activity and prostaglandin

From the Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Akdeniz University, Antalya, Turkey.

Address correspondence to: Saadet Gümüslü, PhD, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Akdeniz University, Antalya 07070, Turkey; e-mail: sgumuslu@akdeniz.edu.tr.

synthesis. Likewise, COX-2 selective inhibitors are also able to induce cell differentiation and cell apoptosis²¹ and inhibit angiogenesis²² and cell invasion/migration.^{23,24}

In this review, after briefly introducing the COX-2 and its product, we discuss the studies that assessed COX-2 in some cancer types. In brief, importance of COX-2 in cancer and angiogenesis will be collectively expressed in this review. In addition, this review will report which mechanisms are used by COX-2 in angiogenesis.

What is COX-2?

The COXs (prostaglandin H₂ synthases [EC 1.14.99.1]), which are membrane-bound enzymes, are members of the mammalian heme-dependent peroxidase family.²⁵ Cyclooxygenases are the rate-limiting enzymes that catalyze the conversion of arachidonic acid released from membrane phospholipids to prostaglandin H₂ (PGH₂) and reactive oxygen species.²⁶ Mainly 2 COX isoforms, COX-1 and COX-2, have been identified.²⁷ Both are homodimeric, glycosylated, and heme-containing proteins with 2 catalytic sites.²⁷

The proteins actually share ~60% homology at the amino acid level.²⁸ The primary structures of nascent COX-1 and COX-2 are 600-602 (depending on the species) and 604 amino acids, respectively,²⁹ and both isoforms are then processed into mature forms by removal of signal peptides. In spite of the similarities, the isoenzymes exhibit differences in patterns of tissue expression and cellular function. Although COX-1 is a constitutively expressed enzyme in most mammalian tissues and maintains normal cellular physiological functions, such as platelet aggregation and gastric cytoprotection,³⁰ COX-2 is normally expressed at a very low level in most tissues and is highly inducible by growth factors, cytokines, and tumor promoters.^{27,31}

Recently, another COX enzyme, COX-3, was reported to be a splice variant of COX-1.³² COX-3 is made from the COX-1 gene but retains intron 1 in its messenger RNA (mRNA). In humans, COX-3 mRNA was found to be expressed as a 5.2 kilobase transcript that was most abundant in cerebral cortex and heart.²⁸

An increasing amount of evidence suggests that the COX isozymes have direct roles in many human pathological processes. These include thrombosis,³³ inflammation, pain and fever,³⁴ various cancers,³⁵⁻³⁷ and neurological disorders, such as Alzheimer³⁸ and Parkinson³⁹ diseases.

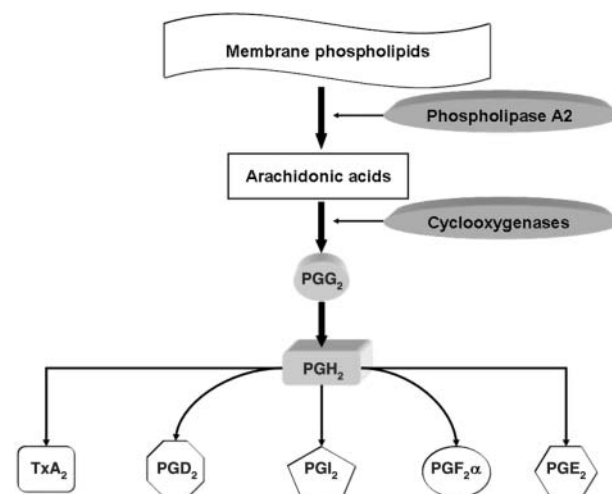


Figure 1. Metabolic products of cyclooxygenase-2.

PGD₂ indicates prostaglandin D₂; PGE₂, prostaglandin E₂; PGF₂α, prostaglandin F₂α; PGG₂, prostaglandin G₂; PGH₂, prostaglandin H₂; PGI₂, prostaglandin I₂; TxA₂, thromboxane A₂.

Metabolic Products of COX-2

Prostanoids, COX metabolites of arachidonic acid, consist of prostaglandin D₂ (PGD₂), prostaglandin E₂ (PGE₂), prostaglandin F₂α (PGF₂α), prostaglandin I₂ (PGI₂), and thromboxane A₂ (TXA₂; Figure 1). They activate cell and tissue specific receptors that belong to a subfamily of the G-protein-coupled receptor superfamily of 7 transmembrane spanning proteins.⁴⁰ There are at least 9 known prostaglandin receptors. Prostaglandin E₂ exerts its effects through interactions with EP1-EP4 (PGE₂ receptor subtypes). Similarly, PGD₂ binds to own receptors, DP1-DP2 subtypes. In contrast, PGF₂α, PGI₂, and TXA₂ have only single receptors FP, IP, and TP, respectively.⁴⁰

Cyclooxygenase-2 metabolic products, including PGE₂, PGI₂, and TXA₂, increase endothelial cell migration and experimental angiogenesis.^{41,42} It is reported that PGE₂ supports tumor growth by inducing angiogenesis.^{43,44} Prostaglandin E₂, the main COX-2 product, induces matrix metalloproteinases (MMPs), VEGF, and bFGF, which are important mediators of angiogenesis.^{45,46}

Although in a VEGF-induced mouse corneal model of angiogenesis, the selective COX-2 inhibitor NS-398 inhibited angiogenesis;⁴⁷ this inhibitory effect was reversed by PGE₂ indicating that VEGF-induced and COX-2-mediated experimental angiogenesis was activated by PGE₂. There is also data suggesting that the angiogenic effects of PGE₂ are

mediated by upregulation of chemokine receptor (CXCR4) on human endothelial cells.⁴⁸ Furthermore, increased COX-2 expression and high levels of PGE₂ appear to stimulate both the synthesis of several angiogenic factors and migration/tube formation of endothelial cells.^{22,49,50} Gastric cancer cells in which COX-2 inhibited by the antisense complementary DNA (cDNA) or NS-398 showed antiangiogenic activity, but addition of PGE₂ up to 10 mM failed to completely restore the inhibitory effects, particularly on human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) proliferation and migration. This result might suggest that part of the antiangiogenic effects was mediated by nonprostaglandin-dependent pathway.⁵¹

In addition to PGE₂, another important COX-2 product in angiogenesis is TXA₂. However, TXA₂ receptor null mice show no overt developmental vascularization defects or disorders of pregnancy, gestation, or delivery.⁵² It was reported that endothelial migration and corneal angiogenesis can be inhibited by a TXA₂ receptor antagonist, SQ29548, and that a TXA₂ agonist, U46619, reconstituted both migration and angiogenesis responses under COX-2-inhibited conditions.⁵³ These findings suggest that COX-2 exerts its effects through prostaglandin, especially PGE₂.

COX-2 in Cancers

Cancers develop through multiple mechanistic strategies, including continuing replication, evading apoptosis, and promoting angiogenesis.⁵⁴ Evidence is rapidly accumulating that chronic inflammation may contribute to carcinogenesis through upregulation of growth, angiogenesis, and metastasis in a number of neoplasms.⁵⁵ It was reported that forced overexpression of COX-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice⁵⁶ and promote the growth and invasion of tumors.^{23,57} In contrast, anti-inflammatories could reduce the incidence rate and mortality from digestive tract carcinomas.⁵⁸⁻⁶⁴

COX-2 in Colorectal Cancers

Several studies concluded that COX-2 plays a critical role in the development of colorectal cancer, and COX-2 inhibitors have preventive effects on this type of cancer.⁶⁵⁻⁶⁷

Matrix metalloproteinase is a necessary protein for invasiveness of cancer cells.^{23,57} Cyclooxygenase-2 alters protein expression related with invasiveness, tumorigenesis, apoptosis, and angiogenesis. For example,

overexpression of the COX-2 gene as a result of transfection induces the expression of MMP-2 and membrane-type MMP, which promote invasiveness.²³ Rat intestinal epithelial cells overexpressing COX-2 protein were resistant to butyrate-induced apoptosis and had elevated bcl-2 protein expression, an apoptosis-repressor gene.²¹ Besides, forced COX-2 overexpression enhances the metastatic potential of colon carcinoma cells (CaCo-2) through processes that are sensitive to COX-2 inhibitors.²³ A 40% to 50% reduction of colorectal cancer was reported in individuals taking NSAIDs.⁶⁸ Similarly, Yao et al⁶⁹ recently demonstrated that ibuprofen, which is a nonselective inhibitor, decreased both tumor growth and the potential for liver metastasis, at least in part, by modulating tumor angiogenesis in a mouse model of colorectal cancer.

However, nonselective inhibitors are well known to have side effects on the gastrointestinal system. Selective COX-2 inhibition helps us to determine its specific effect on the expression of cellular proteins. It has been recently shown that rofecoxib, a COX-2 selective inhibitor, decreased not only the COX-2 expression but also cyclin D1, VEGF, MMP-2, and MMP-9 expressions.⁷⁰ Rofecoxib reduces the incidence of colon cancer in rats treated with chemical carcinogens,⁶⁶ and it is effective in preventing the metastasis of colorectal cancer to the liver in mice.⁷⁰ In addition to chemical suppression, genetic knock-out of the COX-2 gene has also been shown to suppress tumorigenesis in rodent models of familial adenomatous polyposis, a genetic disease leading to colonic carcinoma.⁷¹

Therefore, blocking of COX-2 activity may be effective in the treatment of colorectal cancers. Besides, clinical studies in patients with chronic inflammatory disease demonstrated an effect on reducing colorectal cancer risk and mortality after long-term use of aspirin or NSAIDs.⁷²

COX-2 in Gastric Cancers

Unlike COX-1, human gastric mucosa normally expresses no detectable levels of COX-2 protein.^{73,74} However, in gastric cancer, COX-2 expression was significantly increased compared with that in the paracancerous tissues.⁷⁵ In addition to an association between COX-2 overexpression and gastric cancer occurrence,⁷⁶ COX-2 expression closely correlated with the depth of tumor invasion and lymph node metastasis in gastric cancer.^{75,77-79}

Colorectal and gastric cancers are alike regarding their response to COX-2 inhibition. Cyclooxygenase-2 inhibitors significantly reduce both the volume and weight values of tumors compared with controls.⁸⁰ For example, COX-2 depletion by antisense cDNA leads to growth suppression and reduces the malignant phenotype of gastric cancer cells.⁸¹ The dramatic studies performed on gastric cancer xenografts demonstrated importance of COX-2 in this cancer type. Inhibition of COX-2 protein with sulindac or celecoxib, a specific inhibitor of COX-2 (NS-398), in gastric cancer xenografts that express COX-2 increases apoptosis of the cancer cells *in vivo*.⁸² Similarly, celecoxib prevents cancer development in a rat model of carcinogen-induced gastric cancer.⁸³ Taken together, these findings strongly support the therapeutic potential of COX-2 inhibition in gastric cancer treatment and prevention.

COX-2 in Skin Cancers

Although COX-2 is absent in normal skin, in various epithelial cancers, including those of the skin, its expression is increased.⁸⁴⁻⁸⁶ It is well known that ultraviolet (UV) is mutagenic and carcinogenic. In human skin, COX-2 expression and angiogenesis are inducible by UV.⁸⁷⁻⁸⁹ Cyclooxygenase-2 inhibition reduces the incidence, volume, and multiplicity of skin tumors induced by UV.⁹⁰⁻⁹³ A recent study performed to clarify signaling pathways showed that in a model of skin cancer cells, mitogen-activated protein kinases, specifically p38, and Jun N-terminal kinase (JNK) appear to play a major role in the expression of UV-A-induced COX-2.⁹⁴

COX-2 in Prostate Cancers

Cyclooxygenase-2 plays a significant role in prostate cancer, a common malignancy. Increased expression of COX-2 has been shown in human prostatic cancer tissue, high-grade prostatic intraepithelial neoplasia,⁹⁵⁻⁹⁹ and prostate cancer cell lines LNCaP and PC-3.^{100,101}

It is unclear whether blockade of COX-2 can arrest all prostate tumors. However, *in vivo* growth of PC-3 tumors in nude mouse xenograft models can be blocked by inhibition of COX-2.¹⁰² Additionally, prostaglandin synthesis inhibitors are known to reduce MMP release and inhibit prostate tumor cell invasiveness.⁵⁷

COX-2 in Breast Cancers

Despite no detectable expression in normal breast tissue, COX-2 expression is detected in human

breast tumors.¹⁰³ Immunohistochemical analysis of 86 breast tumors detected COX-2 protein expression in 79% of all tumors studied.¹⁰⁴ The inhibition of COX-2 via specific COX-2 inhibitors is able to prevent mammary tumor development in rat models.¹⁰⁵ In addition to this inhibition, COX-2 inhibitors retard mammary tumor progression by affecting tumor cell migration, invasion, and angiogenesis.¹⁰⁶

COX-2 in Endometrial Cancers

Immunohistochemical analysis revealed that COX-2 expression to be significantly elevated in endometrial carcinoma compared with normal endometrium.^{107,108} Upregulated COX-2 expression in endometrial cancer correlated with facilitation of tumor growth via angiogenesis in association with VEGF.¹⁰⁹

Poorly differentiated endometrial carcinomas are more frequently COX-2 positive than moderately or well-differentiated ones.¹¹⁰ As a result of the study, we could say COX-2 may be more involved in local tumor spread than in the metastatic process. However, Li et al¹⁰⁷ showed that there was higher expression of COX-2 in the well-differentiated areas compared with the poorly differentiated areas. In another study, COX-2 expression remained high at the early status and was downregulated after myometrial invasion.¹¹¹

COX-2 in Lung Cancers

Lung cancer is the most common cancer type. Similar to other cancers, immunohistochemical staining showed that COX-2 protein expression was elevated in lung cancer cells, tumor-infiltrating inflammatory cells, and microvessel endothelial cells.^{112,113}

Various epidemiological studies showed that NSAIDs and celecoxib inhibit the growth of murine and human lung cancer-derived cell lines both *in vitro* and *in vivo*.¹¹⁴ High tumoral COX-2 mRNA expression is also significantly associated with early relapse and short survival.¹¹²

In addition to all data mentioned above, constitutive overexpression of COX-2 has also been reported in other types of human cancers, including hepatocellular carcinoma, pancreatic cancer, head and neck cancer, squamous cell cancer, malignant melanoma, bladder cancer, ampullary carcinoma, renal cell carcinomas, and advanced ovarian serous carcinomas.¹¹⁵⁻¹²³

In conclusion, the presence of COX-2 expression has been reported in most cancer types. Overexpressed COX-2 usually supports invasiveness and the growth

of cancer cells by triggering cellular factors, which plays a role in this process, such as MMPs.

COX-2 in Angiogenesis

Angiogenesis, a process that leads to formation of new blood vessels, is a prerequisite for tumor growth because the enlarging tumor requires oxygen and nutrients.⁴⁴ In fact, initiation, promotion, progression, invasion, and metastasis of the tumor rely on the angiogenic process that is generally accepted as an indicator of prognosis.^{1,124} The angiogenic switch is considered to be the result of an imbalance between proangiogenic and antiangiogenic factors.¹²⁵ In other words, cancer-induced angiogenesis is the result of increased expression of angiogenic factors, or decreased expression of antiangiogenic factors, or a combination of both events.¹²⁶

Cyclooxygenase-2 is expressed in newly formed blood vessels within tumors grown in animals, whereas under normal physiological conditions the quiescent vasculature only expresses the COX-1 enzyme.¹²⁷ Therefore, one of the mechanisms by which COX-2 acts as a tumor promoter is through the stimulation of angiogenesis.²² Previous studies found that COX-2 expression correlates significantly with metastasis and have suggested that COX-2 overexpression may enhance tumorigenic potential by promoting angiogenesis.^{108,128} For example, when endothelial cells were cultured with cancer cells overexpressing COX-2, angiogenesis occurred,²² and this event was inhibited by selective COX-2 inhibitors in endothelial cells *in vitro*.¹²⁹ Cyclooxygenase-2 modulates angiogenesis by augmenting the release of angiogenic peptides, such as VEGF, thymidine phosphorylase, bFGF, and nitric oxide, by the tumor cells.^{22,109} The relationship between VEGF, as a main angiogenesis stimulator, and COX-2 is clarified below.

VEGF and Hypoxia-Inducible Factor-1 in COX-2-Related Angiogenesis

Several factors, including bFGF, acidic fibroblast growth factor, PGE₂, VEGF, transforming growth factor (TGF)- α , TGF- β , and tumor necrosis factor, are involved in tumor angiogenesis.¹³⁰ Vascular endothelial growth factor, a highly specific mitogen of vessel endothelial cells, is the most potent tumor angiogenic factor and is capable of promoting proliferation and

migration of endothelial cells and increasing vascular permeability.¹³¹ This growth factor plays an important role in determining the biological aggressiveness of neoplastic cells and thus their metastatic potential.^{132,133}

Most of the studies demonstrate that COX-2 overexpression correlates with VEGF mRNA or protein production.^{121,134,135} The activity of COX-2 in interstitial cells is necessary for secretion of VEGF, proliferation of endothelial cells, and new vessel formation.²¹ Neoplasms overexpressing COX-2 often express VEGF and FGF at the same time^{136,137} suggesting that their coordinated expression in cancer-induced angiogenesis may facilitate tumor growth via angiogenesis.^{138,139} Cyclooxygenase-2 expression has been detected in the angiogenic vasculature present within the tumors and preexisting vasculature adjacent to cancer lesions, suggesting COX-2 may induce newly formed blood vessels to sustain tumor cell viability and growth.⁷⁵ In colorectal carcinoma, strong COX-2 expression, as evidenced by immunostaining, is highly correlated with tumor microvascular density, that is, a large number of small vessels form around the areas that express COX-2.¹⁴⁰

The expression rate of VEGF is high in patients with positive COX-2 expression (25/28), whereas low in COX-2 negative patients (2/7).¹⁴¹ Moreover, COX-2^{-/-} mouse fibroblasts show a 94% reduction in VEGF protein levels compared with wild-type fibroblasts.¹⁴²

It has been recently suggested that VEGF-activated pathways of p38 and JNKs are necessary for COX-2 expression in endothelial cells.¹⁵ Interestingly, activation of protein kinase C and inducible nitric oxide synthase is also found to be required for VEGF-induced COX-2 expression,¹⁴³ indicating that there are multiple pathways involved in the induction of COX-2 expression by VEGF.

Inhibition of COX-2 by NSAIDs leads to restricted angiogenesis and downregulates production of proangiogenic factors, such as VEGF and bFGF.¹⁴⁴ Cheng et al¹⁴⁵ demonstrated that treatment of the COX-2 overexpressing cells with a COX-2 selective inhibitor, NS-398 (10 mM), decreased PGE₂ level and attenuated VEGF expression.

The main stimulus for VEGF expression is hypoxia, which activates the VEGF gene through increasing hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α .¹⁴⁶ Hypoxia-inducible factor-1 α dimerizes with HIF-1 β and then binds to the hypoxic response element of the target genes, including VEGF.¹⁴⁷ Recent studies discovered that HIF-1 α is also regulated by oxygen-independent

mechanisms, including activation of oncogenes, mutation of tumor suppressor genes, transition metals, nitric oxide, reactive oxygen species, growth factors, and mechanical stress.^{148,149}

Jones et al¹⁵⁰ reported that NSAIDs increased the expression of the von Hippel Lindau tumor suppressor, which targets proteins for ubiquitination and leads to reduced amounts of HIF-1 α , and this event results in suppression of VEGF expression. Moreover, recently, it has been proposed that the proangiogenic effect of COX-2-generated PGE₂ may be due to an increased rate of HIF-1 α protein synthesis.^{50,151}

The effects of COX-2 and other mediators, VEGF and HIF-1, may be explained by recent findings. Huang et al¹⁵² demonstrated that cell lines transfected with a COX-2 expressing vector showed increases in both proliferation and tube formation of endothelial cells and showed that these in vitro angiogenic effects on HUVECs were reduced by blocking VEGF with either an anti-VEGF antibody or a NS-398, a COX-2 inhibitor. They reported that concomitant upregulation of HIF-1 α and VEGF occurred in these cells. This work also showed that HIF-1 α and VEGF were simultaneously increased by exogenous PGE₂ stimulation and reversed by blocking the PGE₂ receptor. Moreover, VEGF production was markedly reduced in those cells treated either by a NS-398 or by an antisense to HIF-1 α .

Briefly, VEGF can induce COX-2 via multiple mechanisms and that COX-2 can increase VEGF via HIF-1. The blockade of COX-2 can suppress VEGF (the most potent angiogenesis activator), which is clinically relevant. A variety of in vivo and in vitro studies showed the potency of the COX-2 inhibition. SC-236, a COX-2 selective inhibitor, is effective in reducing angiogenesis driven by bFGF, whereas SC-560, a COX-1 selective inhibitor, is ineffective in the matrigel rat model.¹⁵³ Conditioned media obtained from gastric cancer cells that are stably transfected with COX-2 antisense cDNA or treated with NS-398 can inhibit the in vitro proliferation, migration, and tube formation of HUVECs. In addition, the Matrigel plug assay also shows that a COX-2 antisense transfectant can block the in vivo angiogenesis induced by gastric cancer cells.⁵¹ A similar study and result was also reported by Wu et al.¹⁵ Celecoxib and another COX-2 inhibitor, sulindac, decrease the level of microvessel density and VEGF at the mRNA level in gastric cancer xenografts.⁸⁰ In addition, increased production of proangiogenic factors, including VEGF, bFGF, TGF- β and platelet-derived

growth factor, and overexpressed COX-2, can be blocked by aspirin and NS-398 in an endothelial cell/colon cancer coculture system.²² However, selection of the COX inhibitors is considerable. Because nonspecific COX inhibitors inhibit COX-2 and COX-1 at the same time, they may have fatal side effects. Therefore, they are not ideal for long-term treatments. However, recently developed selective COX-2 inhibitors might be more suitable to treat tumorigenesis and tumor angiogenesis.

Conclusions

The COXs are membrane-bound enzymes that catalyze the conversion of arachidonic acid to PGH₂. COX-1 and COX-2 are homodimeric, glycosylated, and heme-containing proteins. Constitutively expressed COX-1 maintains normal cellular physiological functions. But COX-2 is expressed at a very low level and can be induced by tumor promoters, growth factors, and cytokines. The products of the COX-2 reaction are PGD₂, PGE₂, PGF₂ α , PGI₂, and TXA₂. These metabolites of the COX-2 have cell specific receptors. Cyclooxygenase-2 exerts its effects through its reaction products. If COX-2 activity increases in cells, its metabolites, such as PGE₂, affect metabolic pathways via specific receptor subtypes (eg, EP1-EP4 for PGE₂).

We tried to explain the role of COX-2 in cancer and angiogenesis related with tumors. Angiogenesis shows aggressiveness of tumors. If a new vascular formation does not develop, existing tumor do not grow. Important progress has occurred in tumor angiogenesis research. Trials on targeted therapy against angiogenesis are ongoing to block or postpone tumor angiogenesis to cure cancer. Several studies demonstrated that COX-2 protein and mRNA levels increase in several cancer types, including colorectal cancer, gastric cancer, prostate cancer, breast cancer, lung cancer, and endometrial cancer.

That COX-2 is observed in nearly all cancer types does not mean that any cancer type is COX-2 dependent in all people. However, these observations might be important to identify cancer prognosis and to determine therapy strategies.

In vitro or in vivo studies have shown that COX-2 inhibitors are effective against the formation of tumors and angiogenesis. Inhibition of COX-2 is associated with marked in vitro and in vivo tumor suppressive effects. Epidemiologic studies have shown that there was a 40% to 50% reduction in mortality

from colorectal cancer in individuals taking NSAIDs, which presumably reduce the risk of colorectal cancer at least in part by inhibiting COX-2. Traditional NSAIDs inhibit both enzymes, whereas the new class of COX-2 selective inhibitors preferentially inhibits COX-2. The use of nonselective COX inhibitors is associated with adverse gastrointestinal events, such as upper gastrointestinal bleeding, whereas COX-2 selective inhibitors are thought to exert their anti-inflammatory and antineoplastic properties with diminished toxicity. The side effect of nonspecific NSAIDs on gastric mucosa is due to the inhibition of COX-1 enzyme, which is thought to play a role in gastric protection via prostanoids. Thus, currently, many clinical trials are underway to evaluate selective COX-2 inhibitors as agents for preventing or treating human cancers and inflammatory. However, the clinical use of COX-2 inhibitors combined with other chemotherapeutic agents may be more effective than the use of COX-2 inhibitors alone. Further studies must be performed to confirm, and possibly improve, optimal treatment strategies.

Vascular endothelial growth factor is the most potent angiogenesis stimulator. Thus, the blockage of the VEGF is necessary to fight tumor angiogenesis. Besides, the first antiangiogenic agent approved by the US Food and Drug Administration is a humanized anti-VEGF monoclonal antibody (bevacizumab). In this review, we discussed the relationship between VEGF and COX-2. Briefly, VEGF and bFGF induce COX-2 expression in endothelial cells. Prostaglandins production by COX-2 could stimulate VEGF and bFGF expression in cancer cells. These data suggest that COX-2 may play critical role in tumor angiogenesis as a positive feedback cycle between cancer cells and endothelial cells (Figure 2). As determined above, inhibition of this communication by COX-2 inhibitors may be curative against angiogenesis-dependent tumor growth.

Although several in vitro studies have shown that COX-2 expression in cancer cell lines causes inhibition of apoptosis, increased cell proliferation, stimulation of angiogenesis, and suppression of immunosurveillance, the exact mechanism responsible for the association between COX-2 overexpression and tumorigenesis remains unclear.

In summary, both isoforms, constitutive COX-1 and inducible COX-2, catalyze the production of prostanoids from arachidonic acid. Enhanced COX-2-induced synthesis of prostaglandins stimulates cancer cell proliferation, promotes angiogenesis, inhibits apoptosis, and increases metastatic potential. However,

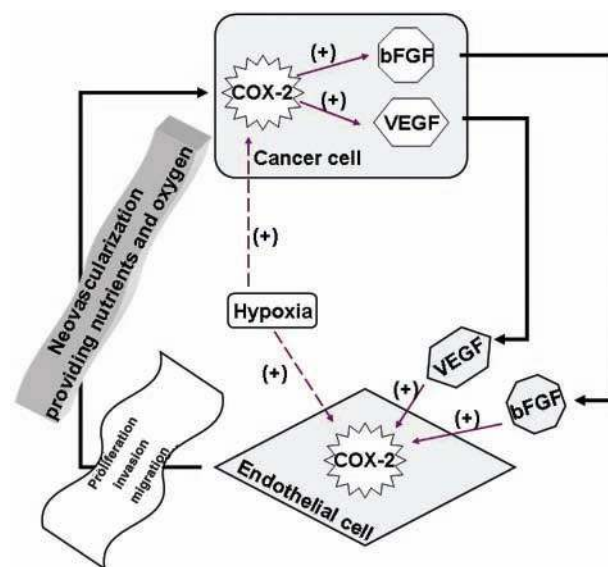


Figure 2. Positive feedback cycle in tumor angiogenesis. bFGF indicates basic fibroblast growth factor; COX-2, cyclooxygenase-2; VEGF, vascular endothelial growth factor.

overexpression of COX-2 is likely to be a consequence of multiple effects during carcinogenesis. Although preliminary studies are promising, there is still a long way to go. Upstream and downstream metabolic pathways of COX-2 by which it plays a role in tumor angiogenesis must be the subject of further research.

Acknowledgement

This study was supported by Akdeniz University Research Projects Unit.

References

1. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*. 1995;1:27-31.
2. Colville-Nash PR, Scott DL. Angiogenesis and rheumatoid arthritis; pathogenic and therapeutic implications. *Ann Rheum Dis*. 1992;51:919-925.
3. Ishibashi T, Murata T, Kohno T, et al. Peripheral chorioretinal neovascularization in proliferative diabetic retinopathy: histopathologic and ultrastructural study. *Ophthalmology*. 1999;213:154-158.
4. Sueishi K, Yonemitsu Y, Nakagawa K, et al. Atherosclerosis and angiogenesis. Its pathophysiological significance in humans as well as in an animal model induced by the gene transfer of vascular endothelial growth factor. *Ann NY Acad Sci*. 1997;811:311-322.

5. Li VW, Li WW. Cyclosporine and angiogenesis in psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 1996;35:1019-1021.
6. Thurston G, Murphy TJ, Baluk P, et al. Angiogenesis in mice with chronic airway inflammation: strain-dependent differences. *Am J Pathol.* 1998;153:1099-1112.
7. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992;267:10931-10934.
8. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971;285:1182-1186.
9. Ryan CJ, Lin AM, Small EJ. Angiogenesis inhibition plus chemotherapy for metastatic hormone refractory prostate cancer: history and rationale. *Urol Oncol.* 2006;24:250-253.
10. Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, et al. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:2692-2696.
11. Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, et al. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem.* 1991;266:12866-12872.
12. Taketo MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part II). *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:1609-1620.
13. Kune GA, Kune S, Watson LF. Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations, and medications: case control results from the Melbourne colorectal cancer study. *Cancer Res.* 1998;48:4399-4404.
14. Iniguez MA, Rodriguez A, Volpert OV, et al. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends Mol Med.* 2003;9:73-78.
15. Wu G, Luo J, Rana JS, et al. Involvement of COX-2 in VEGF-induced angiogenesis via P38 and JNK pathways in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2006;69:512-519.
16. Kage K, Fujita N, Oh-hara T, et al. Basic fibroblast growth factor induces cyclooxygenase-2 expression in endothelial cells derived from bone. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;254:259-263.
17. Schmedtje JFJ, Ji YS, Liu WL, et al. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF- κ B p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1997;272:601-608.
18. Taketo MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:1529-1536.
19. Pollard M, Luckert PH. Effect of indomethacin on intestinal tumors induced in rats by the acetate derivative of dimethylnitrosamine. *Science.* 1981;214:558-559.
20. Waddell WR, Loughry RW. Sulindac for polyposis of the colon. *J Surg Oncol.* 1983;24:83-87.
21. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell.* 1995;83:493-501.
22. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell.* 1998;93:705-716.
23. Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:3336-3340.
24. Cheng J, Imanishi H, Amuro Y, et al. NS-398, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, inhibited cell growth and induced cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Int J Cancer.* 2002;99:755-761.
25. Garavito RM, Mulichak AM. The structure of mammalian cyclooxygenases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2003;32:183-206.
26. Rao AM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Lipid alterations in transient forebrain ischemia: possible new mechanisms of CDP-choline neuroprotection. *J Neurochem.* 2000;75:2528-2535.
27. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem.* 1996;271:33157-33160.
28. Warner TD, Mitchell JA. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J.* 2004;18:790-804.
29. Smith WL, DeWitt DL. *Advances in Immunology.* San Diego, CA: Academic Press; 1996.
30. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38:97-120.
31. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 1998;12:1063-1073.
32. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:13926-13931.
33. Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med.* 1994;330:1287-1294.
34. Crofford LJ, Lipsky PE, Brooks P, Abramson SB, Simon LS, van de Putte LB. Basic biology and clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors. *Arthritis Rheum.* 2000;43:4-13.
35. Kalgutkar AS, Zhao Z. Discovery and design of selective cyclooxygenase-2 inhibitors as non-ulcerogenic, anti-inflammatory drugs with potential utility as anti-cancer agents. *Curr Drug Targets.* 2001;2:79-106.
36. Moore BC, Simmons DL. COX-2 inhibition, apoptosis, and chemoprevention by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Curr Med Chem.* 2000;7:1131-1144.
37. Song X, Lin HP, Johnson AJ, et al. Cyclooxygenase-2, player or spectator in cyclooxygenase-2 inhibitor-induced apoptosis in prostate cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:585-591.
38. McGeer PL, McGeer EG. Inflammation of the brain in Alzheimer's disease: implications for therapy. *J Leukoc Biol.* 1999;65:409-415.
39. Smythies J. On the function of neuromelanin. *Proc Biol Sci.* 1996;263:487-489.
40. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* 2001;294:1871-1875.

41. Gullino PM. Prostaglandins and gangliosides of tumor microenvironment: their role in angiogenesis. *Acta Oncol.* 1995;34:439-441.
42. Nie D, Lamberti M, Zacharek A, et al. Thromboxane A2 regulation of endothelial cell migration, angiogenesis and tumor metastasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;267:245-251.
43. Form DM, Auerbach R. PGE2 and angiogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1983;172:214-218.
44. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996;86:353-364.
45. Cheng T, Cao W, Wen R, et al. Prostaglandin E2 induces vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor mRNA expression in cultured rat muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39:581-591.
46. Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett.* 1995;372:83-87.
47. Hernandez GL, Volpert OV, Iniguez MA, et al. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin a: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *J Exp Med.* 2001;193:607-620.
48. Salcedo R, Zhang X, Young HA, et al. Angiogenic effects of prostaglandin E2 are mediated by up-regulation of CXCR4 on human microvascular endothelial cells. *Blood.* 2003;102:1966-1977.
49. Jones MK, Wang H, Peskar BM, et al. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med.* 1999;5:1348-1349.
50. Fukuda R, Kelly B, Semenza GL. Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res.* 2003;63:2330-2334.
51. Fu YG, Sung JJ, Wu KC, et al. Inhibition of gastric cancer-associated angiogenesis by antisense COX-2 transfectants. *Cancer Lett.* 2005;224:243-252.
52. Thomas DW, Mannon RB, Mannon PJ, et al. Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A2. *J Clin Invest.* 1998;102:1994-2001.
53. Daniel TO, Liu H, Morrow JD, et al. Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res.* 1999;59:4574-4577.
54. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.
55. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420:860-867.
56. Liu CH, Chang SH, Narko K, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem.* 2001;276:18563-18569.
57. Attiga FA, Fernandez PM, Weeraratna AT, et al. Inhibitors of prostaglandin synthesis inhibit human prostate tumor cell invasiveness and reduce the release of matrix metalloproteinases. *Cancer Res.* 2000;60:4629-4637.
58. Farrow DC, Vaughan TL, Hansten PD, et al. Use of aspirin and other nonsteroidal antiinflammatory drugs and risk of esophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998;7:97-102.
59. Garcia-Rodriguez LA, Huerta-Alvarez C. Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Epidemiology.* 2001;12:88-93.
60. Morgan G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and the chemoprevention of colorectal and nonaspirin oesophageal cancers. *Gut.* 1996;38:646-648.
61. Reeves MJ, Newcomb PA, Trentham-Dietz A, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and protection against colorectal cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996;5:955-960.
62. Thun MJ. NSAID use and decreased risk of gastrointestinal cancers. *Gastroenterol Clin North Am.* 1996;25:333-348.
63. Funkhouser EM, Sharp GB. Aspirin and reduced risk of esophageal carcinoma. *Cancer.* 1995;76:1116-1119.
64. Zhuang ZH, Wang LD. NSAID and digestive tract carcinomas. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi.* 2001;9:1050-1053.
65. Thun MJ, Hennekenn CH. *Cancer: Principles and Practice of Oncology.* Philadelphia, PA: Lippincott Williams Wilkins Press; 2001.
66. Kawamori T, Rao CV, Seibert K, et al. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 1998;58:409-412.
67. Reddy BS, Rao CV, Seibert K. Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitor for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 1996;56:4566-4569.
68. Smalley W, DuBios RN. Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drug. *Adv Pharmacol.* 1997;39:1-20.
69. Yao M, Zhou W, Sangha S, et al. 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.
70. Yao M, Kargman S, Lam EC, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 by rofecoxib attenuates the growth and metastatic potential of colorectal carcinoma in mice. *Cancer Res.* 2003;63:586-592.
71. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, et al. Suppression of intestinal polyposis in APCD716 knockout mice by inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 (COX-2). *Cell.* 1996;87:803-809.
72. Janne PA, Mayer RJ. Chemoprevention of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2000;342:1960-1968.
73. Mizuno H, Sakamoto C, Matsuda K, et al. Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. *Gastroenterology.* 1997;112:387-397.

74. Kargman S, Charleson S, Cartwright M, et al. Characterization of prostaglandin G/H synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology*. 1996;111:445-454.
75. Li HX, Chang XM, Song ZJ, et al. Correlation between expression of cyclooxygenase-2 and angiogenesis in human gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2003;9:674-677.
76. Saukkonen K, Rintahaka J, Sivula A, et al. Cyclooxygenase-2 and gastric carcinogenesis. *APMIS*. 2003;111:915-925.
77. Ohno R, Yoshinaga K, Fujita T, et al. Depth of invasion parallels increased cyclooxygenase-2 levels in patients with gastric carcinoma. *Cancer*. 2001;91:1876-1881.
78. Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric adenomas and adenocarcinomas. *J Surg Oncol*. 2001;76:26-30.
79. Murata H, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:451-455.
80. Wu YL, Fu SL, Zhang YP, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress angiogenesis and growth of gastric cancer xenografts. *Biomed Pharmacother*. 2005;59(suppl 2):289S-292S.
81. Wu H, Wu K, Yao L, et al. Antisense inhibition of cyclooxygenase-2 reduces malignant phenotype of gastric cancer cells. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2002;41:534-537.
82. Fu SL, Wu YL, Zhang YP, et al. Anti-cancer effects of COX-2 inhibitors and their correlation with angiogenesis and invasion in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2004;10:1971-1974.
83. Elder DJ, Halton DE, Hague A, et al. Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective nonsteroidal antiinflammatory drug: independence from COX-2 protein expression. *Clin Cancer Res*. 1997;3:1679-1683.
84. Thun MJ, Henley SJ, Patrano C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94:252-266.
85. Muller-Decker K, Reinerth G, Krieg P, et al. Prostaglandin-Hsynthase isozyme expression in normal and neoplastic skin. *Int J Cancer*. 1999;82:648-656.
86. Kagoura M, Toyoda M, Matsui C, et al. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in skin cancers. *J Cutan Pathol*. 2001;28:298-302.
87. Buckman SY, Gresham A, Hale P, et al. COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implication for the development of skin cancer. *Carcinogenesis*. 1998;19:723-729.
88. Bielenberg DR, Bucana CD, Sanchez R, et al. Molecular regulation of UVB-induced cutaneous angiogenesis. *J Invest Dermatol*. 1998;111:864-872.
89. Trompezinski S, Pernet I, Mayoux C, et al. Transforming growth factor-beta1 and ultraviolet A1 radiation increase production of vascular endothelial growth factor but not endothelin-1 in human dermal fibroblasts. *Br J Dermatol*. 2000;143:539-545.
90. Pentland AP, Schoggins JW, Scott GA, et al. Reduction of UV induced skin tumors in hairless mice by selective COX-2 inhibition. *Carcinogenesis*. 1999;20:1939-1944.
91. Fischer SM, Lo HH, Gordon GB, et al. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, and indomethacin against ultraviolet light-induced skin carcinogenesis. *Mol Carcinog*. 1999;25:231-240.
92. Orenge IF, Gerguis J, Phillips R, et al. Celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor as a potential chemopreventative to UV-induced skin cancer: a study in the hairless mouse model. *Arch Dermatol*. 2002;138:751-755.
93. Wilgus TA, Koki AT, Zweifel BS, et al. Inhibition of cutaneous ultraviolet light B-mediated inflammation and tumor formation with topical celecoxib treatment. *Mol Carcinog*. 2003;38:49-58.
94. Bachelor MA, Bowden GT. UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression. *Semin Cancer Biol*. 2004;14:131-138.
95. Kirschenbaum A, Klausner AP, Lee R, et al. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human prostate. *Urology*. 2000;56:671-676.
96. Uotila P, Valve E, Martikainen P, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human prostate cancer. *Urol Res*. 2001;29:25-28.
97. Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate*. 2000;42:73-78.
98. Madaan S, Abel PD, Chaudhary KS, et al. Cytoplasmic induction and overexpression of cyclooxygenase-2 in human prostate cancer: implications for prevention and treatment. *BJU Int*. 2000;86:736-741.
99. Yoshimura R, Sano H, Masuda C, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in prostate carcinoma. *Cancer*. 2000;89:589-596.
100. Hwang D, Scollard D, Byrne J, et al. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90:455-460.
101. Tjandrawinata RR, Dahiya R, Hughes-Fulford M. Induction of cyclooxygenase-2 mRNA by prostaglandin E-2 in human prostatic carcinoma cells. *Br J Cancer*. 1997;75:1111-1118.
102. Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses angiogenesis and the growth of prostate cancer in vivo. *J Urol*. 2000;164:820-825.
103. Parrett ML, Harris RE, Joarder FS, et al. Cyclooxygenase-2 gene expression in human breast cancer. *Int J Oncol*. 1997;10:503-507.
104. Davies G, Salter J, Hills M, et al. Correlation between cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in human breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9:2651-2656.

105. Harris RE, Alshafie GA, Abou-Issa H, et al. Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor. *Cancer Res.* 2000;60:2101-2103.
106. Rozic JG, Chakraborty C, Lala PK. Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis. *Int J Cancer.* 2001;93:497-506.
107. Li W, Xu RJ, Zhang HH, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with tumor angiogenesis in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2006;16:1673-1678.
108. Tong BJ, Tan J, Tajeda L, et al. Heightened expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptordelta in human endometrial adenocarcinoma. *Neoplasia.* 2000;2:483-490.
109. Fujiwaki R, Iida K, Kanasaki H, et al. Cyclooxygenase-2 expression in endometrial cancer: correlation with microvessel count and expression of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase. *Hum Pathol.* 2002;33:213-219.
110. Ferrandina G, Legge F, Ranelletti FO, et al. Cyclooxygenase-2 expression in endometrial carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and clinical outcome. *Cancer.* 2002;95:801-807.
111. Toyoki H, Fujimoto J, Sato E, et al. Clinical implications of expression of cyclooxygenase-2 related to angiogenesis in uterine endometrial cancers. *Ann Oncol.* 2005;16:51-55.
112. Yuan A, Yu CJ, Shun CT, et al. Total cyclooxygenase-2 mRNA levels correlate with vascular endothelial growth factor mRNA levels, tumor angiogenesis and prognosis in non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer.* 2005;115:545-555.
113. Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res.* 1998;58:4997-5001.
114. Rioux N, Castonguay A. Prevention of NNK-induced lung tumorigenesis in A/J mice by acetylsalicylic acid and NS-398. *Cancer Res.* 1998;58:5354-5360.
115. Cervello M, Foderaa D, Florena AM, et al. Correlation between expression of cyclooxygenase-2 and the presence of inflammatory cells in human primary hepatocellular carcinoma: possible role in tumor promotion and angiogenesis. *World J Gastroenterol.* 2005;11:4638-4643.
116. Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology.* 1999;29:688-689.
117. Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, et al. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res.* 1999;59:987-990.
118. Chan G, Boyle JO, Yang EK, et al. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* 1999;59:991-994.
119. Denkert C, Kobel M, Berger S, et al. Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma. *Cancer Res.* 2001;61:303-308.
120. Mohammed SI, Knapp DW, Bostwick DG, et al. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human invasive transitional cell carcinoma (TCC) of the urinary bladder. *Cancer Res.* 1999;59:5647-5650.
121. Perrone G, Santini D, Verzi A, et al. COX-2 expression in ampullary carcinoma: correlation with angiogenesis process and clinicopathological variables. *J Clin Pathol.* 2006;59:492-496.
122. Miyata Y, Koga S, Kanda S, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in renal cell carcinoma: correlation with tumor cell proliferation, apoptosis, angiogenesis, expression of matrix metalloproteinase-2, and survival. *Clin Cancer Res.* 2003;9:1741-1749.
123. Ali-Fehmi R, Che M, Khalifeh I, et al. The effect of cyclooxygenase-2 expression on tumor vascularity in advanced stage ovarian serous carcinoma. *Cancer.* 2003;98:1423-1429.
124. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000;407:249-257.
125. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:401-410.
126. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science.* 1987;235:442-447.
127. Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res.* 2000;60:1306-1311.
128. Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6:135-138.
129. Prescott SM. Is cyclooxygenase-2 the alpha and the omega in cancer? *J Clin Invest.* 2000;105:1511-1513.
130. Fidler IJ. *Cancer: Principles and Practice of Oncology.* Philadelphia, PA: Lippincott Raven Publishers; 1997.
131. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9:669-676.
132. Mandriota SJ, Seghezzi G, Vassalli JD, et al. Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1995;270:9709-9716.
133. Nakata S, Ito K, Fujimori M, et al. Involvement of vascular endothelial growth factor and urokinase-type plasminogen activator receptor in microvessel invasion in human colorectal cancers. *Int J Cancer.* 1998;79:179-186.
134. Gallo O, Franchi A, Magnelli L, et al. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia.* 2001;3:53-61.
135. Zhi YH, Liu RS, Song MM, et al. Cyclooxygenase-2 promotes angiogenesis by increasing vascular endothelial growth factor and predicts prognosis in gallbladder carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2005;11:3724-3728.

136. Koga T, Shibahara K, Kabashima A, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 and tumor angiogenesis in human gastric cancer. *Hepatogastroenterology*. 2004;51:1626-1630.
137. Fosslien E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci*. 2000;30:3-21.
138. Fosslien E. Review: molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis. *Ann Clin Lab Sci*. 2001;31:325-348.
139. Kim HS, Youm HR, Lee JS, et al. Correlation between cyclooxygenase-2 and tumor angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2003;42:163-170.
140. Masunaga R, Kohno H, Dhar DK, et al. Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res*. 2000;6:4064-4068.
141. Wu AW, Gu J, Li ZF, et al. COX-2 expression and tumor angiogenesis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2004;10:2323-2326.
142. Williams CS, Tsujii M, Reese J, et al. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest*. 2000;105:1589-1594.
143. Wu G, Mannam AP, Wu J, et al. Hypoxia induces myocyte-dependent COX-2 regulation in endothelial cells: role of VEGF. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H2420-H2429.
144. Gately S, Li WW. Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy. *Semin Oncol*. 2004;31:2-11.
145. Cheng AS, Chan HL, To KF, et al. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*. 2004;24:853-860.
146. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. 1998;394:485-490.
147. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med*. 2002;8:S62-S67.
148. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:721-732.
149. Chun YS, Kim MS, Park JW. Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1alpha. *J Korean Med Sci*. 2002;17:581-588.
150. Jones MK, Szabo IL, Kawanaka H, et al. Von Hippel Lindau tumor suppressor and HIF-1alpha: new targets of NSAIDs inhibition of hypoxia-induced angiogenesis. *FASEB J*. 2002;16:264-266.
151. Liu XH, Kirschenbaum A, Lu M, et al. Prostaglandin E2 induces hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization and nuclear localization in a human prostate cancer cell line. *J Biol Chem*. 2002;277:50081-50086.
152. Huang SP, Wu MS, Shun CT, et al. Cyclooxygenase-2 increases hypoxia-inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor to promote angiogenesis in gastric carcinoma. *J Biomed Sci*. 2005;12:229-241.
153. Masferrer JL, Koki A, Seibert K. COX-2 inhibitors. A new class of antiangiogenic agents. *Ann NY Acad Sci*. 1999;889:84-86.

For reprints and permissions queries, please visit SAGE's Web site at <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>.