

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RATLARDA AZOKSİMETAN UYGULANARAK OLUŞTURULAN
KOLOREKTAL KANSERDE LİKOPENİN SİKLOOKSİJENAZ-2
(COX-2), KASPAZ-3, KASPAZ-9, BAX, BCL-2, P53
PROTEİNLERİNİN EKSPRESYONU VE DNA HASARI ÜZERİNE
ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Abdullah ASLAN

**Anabilim Dalı: Biyoloji
Programı: Moleküler Biyoloji**

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU

MART – 2011

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RATLARDA AZOKSİMETAN UYGULANARAK OLUŞTURULAN
KOLOREKTAL KANSERDE LİKOPENİN SİKLOOKSİJENAZ-2 (COX-2),
KASPAZ-3, KASPAZ-9, BAX, BCL-2, P53 PROTEİNLERİNİN EKSPRESYONU
VE DNA HASARI ÜZERİNE ETKİSİ**

**DOKTORA TEZİ
Abdullah ASLAN
(06110201)**

**Anabilim Dalı: Biyoloji
Programı: Moleküler Biyoloji**

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Mehmet TUZCU

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 15 Şubat 2011

MART-2011

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RATLARDA AZOKSİMETAN UYGULANARAK OLUŞTURULAN
KOLOREKTAL KANSERDE LİKOPENİN SİKLOOKSİJENAZ-2 (COX-2),
KASPAZ-3, KASPAZ-9, BAX, BCL-2, P53 PROTEİNLERİNİN EKSPRESYONU
VE DNA HASARI ÜZERİNE ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

Abdullah ASLAN

(06110201)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 15 Şubat 2011

Tezin Savunulduğu Tarih: 11 Mart 2011

Tez Danışmanı : Yrd.Doç.Dr. Mehmet TUZCU (F.Ü)

Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Kazım ŞAHİN (F.Ü)

Doç. Dr. Ökkeş YILMAZ (F.Ü)

Doç. Dr. Mustafa KARATEPE (F.Ü)

Doç. Dr. Hakkı TAŞTAN (G.Ü)

MART-2011

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının oluşumunda bana her zaman yol gösteren, doktora öğrenimim süresince desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım tez danışmanım ve değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU'ya, araştırmanın yapılması sırasında bana her türlü desteği ve laboratuvar olanaklarını sunan Sayın Prof. Dr. Kazım ŞAHİN ve Doç. Dr. Nurhan ŞAHİN hocalarıma en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım. Çalışmanın planlanması aşamasında ve tez konusunun belirlenmesinde desteklerini gördüğüm Sayın Prof. Dr. Ömer KÜÇÜK hocama en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım. Araştırma süresince yardımlarını gördüğüm Sayın Prof. Dr. İbrahim ÖZERCAN ve Sayın Arş. Gör. Cemal ORHAN'a, bu çalışmaya maddi destek sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP, Proje no: 1798)'ne teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Sayın Prof. Dr. İbrahim Halil BAHÇECİOĞLU'na, Sayın Yrd. Doç. Dr. Fatih AKDEMİR'e, Sayın Arş. Gör. Zeynep TUZCU'ya, Sayın Arş. Gör. Hasan GENÇOĞLU'na, Sayın Arş. Gör. Can Ali AĞCA'ya ve Fırat Üniversitesi Biyoloji bölümündeki değerli hocalarıma teşekkür ediyorum. Eğitimim boyunca bana her zaman ve her konuda destek olan, aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Abdullah ASLAN

Elazığ-2011

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET.....	IV
ABSTRACT	V
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	VIII
KISALTMALAR ve SİMGELER	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kanser	2
2.1.1. Kolorektal Kanser.....	2
2.1.2. Kolorektal Kanser Oluşumu.....	3
2.1.3. Azoksimetan ve Etki Mekanizması	4
2.1.4. Kolon Kanserinin Genetiği	4
2.2. Domates Tozu ve Bileşimi.....	6
2.2.1. Likopenin Yapısı ve Biyosentezi	6
2.3. Likopen ve Kanser.....	8
2.4. Likopen ve DNA Hasarı	12
2.5. Apoptozis	13
2.5.1. Apoptotik Markerlar (Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2, p53 Proteinleri)	15
2.6. Siklooksijenaz-2 (cox-2) Enzimi.....	17
2.6.1. Siklooksijenaz-2 (cox-2) Enziminin Etki Mekanizması.....	19
3. MATERYAL ve METOD	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Kimyasal Maddeler	21
3.1.2. Likopen Kaynağı ve Diyet.....	21
3.2. Metod	21
3.2.1. Hayvan Materyali ve Araştırma Grupları	21

	<u>Sayfa no</u>
3.2.2. Azoksimetan Uygulaması ve Tümör Tiplendirmesi.....	22
3.2.3. Domates Tozunun Hazırlanışı ve Uygulanması.....	23
3.2.4. Doku Homojenizasyonu	23
3.2.5. DNA Hasarının Analizi	23
3.2.5.1. Kolon Dokusundan DNA İzolasyonu.....	24
3.2.6. SDS-PAGE ve Western Blotlama Tekniği ile Proteinlerin Analizi.....	24
3.2.6.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	25
3.2.6.2. Western Blotlama ile Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi.....	26
3.2.7. Siklooksijenaz-2 (cox-2) Ekspresyonunun Kontrolü	28
3.2.8. Kaspaz-3, Kaspaz -9, Bax, Bcl-2, p53 Proteinlerinin Analizi (Apoptotik Markerlar)	29
3.2.9. İstatistiksel Analizler	29
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	30
4.1. Bulgular	30
4.1.1. Histopatolojik Görüntüler	30
4.1.2. Dekapite Edilmiş Ratların Kolon Doku Makroskobik Görüntüleri	33
4.1.3. Kanserde Anormal Hücre Gelişimi (ACF).....	35
4.1.4. Tümör Tiplendirmesi.....	36
4.1.5. Canlı Ağırlık Değişimi ve Yem Tüketimi	38
4.1.6. DNA Hasarı.....	40
4.1.7. Cox-2 Enzim Ekspresyon Düzeyleri	42
4.1.8. Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2, p53 Proteinlerinin Ekspresyon Düzeyleri (Apoptotik Markerlar)	43
4.2. Tartışma.....	47
5. SONUÇ	53
6. KAYNAKLAR.....	54
7. ÖZGEÇMİŞ.....	65

ÖZET

DOKTORA TEZİ

RATLARDA AZOKSİMETAN UYGULANARAK OLUŞTURULAN KOLOREKTAL KANSERDE LİKOPENİN SİKLOOKSİJENAZ-2 (COX-2), KASPAZ-3, KASPAZ-9, BAX, BCL-2, P53 PROTEİNLERİNİN EKSPRESYONU VE DNA HASARI ÜZERİNE ETKİSİ

Abdullah ASLAN
Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
2011, Sayfa: 65

Domates ve domates ürünleri likopenin başlıca bir diyet kaynağıdır. Diyetle alınan domates tozunun (DT), farklı insan kanser türlerinde riski azaltmayla ilgisi olduğu için bu tezde, Wistar ratlarda azoksimetan (AOM) ile oluşturulan kolorektal kanserde DT'nun etkilerini araştırdık. Kolorektal dokularda siklooksijenaz-2 (cox-2), bax, bcl-2, kaspaz-3, kaspaz-9, p53 protein ekspresyon düzeylerini Western blotlama tekniği ile belirledik ve kolorektal dokulardaki DNA hasarını agaroz DNA jel elektroforezi ile tespit ettik. Çalışmada 60 tane Wistar rat, 4 gruba bölündü ve her grupta 15 tane rat yer aldı. 30 tane rata, (AOM ve AOM + DT grupları) AOM haftada bir kez 3 defa (15mg/kg canlı ağırlığında deri altı) enjekte edildi. Ratlar hem standart bir diyetle (kontrol grubu ve AOM grubu) hem de standart diyete kilogram başına %5 DT ilaveli (DT ve AOM +DT grupları) bir diyetle beslendi. Hayvanlar 20 hafta sonrasında dekapite edilerek kolorektal tümörler incelendi. Domates tozu uygulaması, AOM + DT grubunda, AOM grubuna göre, cox-2, bcl-2, kaspaz-3, kaspaz-9 ekspresyon düzeyleri bakımından anlamlı bir fark oluşturdu ($p<0.05$). DT uygulaması ile, kaspaz-3 ve bcl-2 ekspresyon düzeyleri artış gösterirken, kaspaz-9 ve p53 ekspresyon düzeyleri ise azalış gösterdi ($p<0.05$). Fakat bax ekspresyon düzeyi AOM + DT grubunda, AOM grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermedi ($p>0.05$). Domates tozu uygulaması, AOM + DT grubunda, AOM grubuna göre DNA hasarı oranı bakımından azalış gösterdi. Ayrıca AOM grubunda 8 adenokarsinom, 3 displazi tespit edilmiş iken, AOM+DT grubunda 2 adenokarsinom ve 5 displazi tespit edilmiştir ($p<0.05$). Bu sonuçlar, diyetle alınan DT'nun Wistar ratlarda kolorektal kanser oluşum oranını azalttığını göstermektedir ve bu bulgular, diyete DT uygulamasının, insanlarda da kolorektal kanser üzerinde önleyici etkisini araştırmaya ışık tutabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Likopen, apoptozis, DNA hasarı, cox-2, p53, kaspaz-3, kaspaz-9, bax, bcl-2, kolorektal kanser.

ABSTRACT

PhD THESIS

THE EFFECT OF LYCOPENE ON THE CYCLOOXYGENASE (COX-2), CASPASE-3, CASPASE-9, BAX, BCL-2, P53 PROTEIN EXPRESSION AND DNA DAMAGE IN RATS WITH AZOXYMETHANE-INDUCED COLORECTAL CANCER

Abdullah ASLAN

Firat University

Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

2011, Page: 65

Tomatoes and tomato products are the major dietary source of lycopene. Because dietary intake of tomato powder (TP) has been associated with a reduced risk of a variety of human cancers, in this thesis we investigated the effects of TP supplementation on the development of azoxymethane (AOM)-induced colorectal cancer in the Wistar rats. We also assessed colorectal tissue expression levels of cyclooxygenase-2 (cox-2), bax, bcl-2, caspase-3, caspase-9, p53 protein by Western blotting and we assessed tissue DNA damage by DNA agarose gel electrophoresis. Sixty rats were divided into four groups. Each group consists of fifteen animals. Thirty Wistar rats (AOM group and AOM + TP group) were injected once a week with azoxymethane (15mg/kg body weight subcutaneously) for a total of 3 weeks. Rats were fed either a basal diet (control group and AOM group) or the basal diet supplemented of 5% tomato powder per kilogram of diet. The animals were sacrificed after 20 weeks and the colorectal tumors were identified. Tomato powder supplementation, significantly differences in the AOM +DT group expression levels of cox-2, bcl-2, caspase-3, caspase-9, p53 compared with AOM group ($p < 0.05$). Expression levels of caspase-3 and bcl-2 increased, whereas expression levels of caspase-9 and p53 decreased with tomato powder supplementation ($p < 0.05$). But There were no significant differences in the AOM +DT group expression levels of bax compared with AOM group ($p > 0.05$). TP supplementation, decreased in the AOM +DT group rate of DNA damage compared with AOM group. In addition, while we found 8 adenocarcinomas and 3 dysplasia in AOM group, we found 2 adenocarcinomas and 5 dysplasia in AOM+TP group ($p < 0.05$). The results indicate that dietary supplementation with TP reduces the incidence and size of AOM-induced colorectal cancer occurring of in the Wistar rats and these findings should be conducted to investigate the efficacy of TP supplementation in the prevention of colorectal cancer in humans.

Key Words: Lycopene, apoptosis, DNA damage, cox-2, p53, caspase-3, caspase-9, bax, bcl-2, colorectal cancer.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa no

Şekil 1.	İnsana ait bir kolon görüntüsü	3
Şekil 2.	Azoksimetanın kimyasal yapısı	4
Şekil 3.	AOM ile oluşturulan tümörlerde gen metilasyonu (gen susturulması).....	6
Şekil 4.	Likopenin yapısı.....	7
Şekil 5.	Likopenin yapısı	7
Şekil 6.	Likopenin farklı pozisyonundaki yapıları	7
Şekil 7.	Karotenoidlerin etki mekanizması	11
Şekil 8.	Antioksidan sorumlu elementin (ARE) bağlı olduğu gen bölgesinden antioksidan enzim sentezi	12
Şekil 9.	Apoptotik süreç.....	14
Şekil 10.	Apoptoza uğrayacak hedef hücrede görülen morfolojik değişiklikler	14
Şekil 11.	Apoptoza uğramış hücrenin ölüm aşamaları	15
Şekil 12.	Sitokrom c ve apaf-1 aracılı apoptozis	17
Şekil 13.	Cox-1 ve cox-2 enzimlerinin farklı etki mekanizmaları	18
Şekil 14.	Araşidonik asit metabolizması.....	19
Şekil 15.	Kontrol grubuna ait histolojik görüntü (HE x 400).....	30
Şekil 16.	DT grubuna (pozitif kontrol) ait hücre görüntüsü (HE x 400)	31
Şekil 17.	Azoksimetan verilen gruba ait adenokarsinomda taşlı yüzük hücre görüntüsü (HE x 200).....	31
Şekil 18.	Azoksimetan verilen gruba ait adenokarsinomda taşlı yüzük hücre görüntüsü (HE x 200).....	32
Şekil 19.	Azoksimetan + DT verilen grupta orta şiddette displazi hücre görüntüsü (HE x 400).....	32
Şekil 20.	Azoksimetan + DT verilen grupta şiddetli displazi hücre görüntüsü (HE x 400).....	33
Şekil 21.	Dekapite edilmiş kontrol grubu kolon doku makroskobik görüntüsü.....	33
Şekil 22.	Dekapite edilmiş DT (pozitif kontrol) grubu kolon doku makroskobik görüntüsü.....	34
Şekil 23.	Dekapite edilmiş azoksimetan grubu kolon doku makroskobik görüntüsü.....	34

Şekil 24. Dekapite edilmiş DT + azoksimetan grubu kolon doku makroskobik görüntüsü.....	35
Şekil 25. Gruplarda görülen kript sayıları.....	36
Şekil 26. Gruplarda görülen displazi oranları	37
Şekil 27. Gruplarda görülen adenokarsinom oranları.....	37
Şekil 28. Gruplarda görülen bitiş canlı ağırlık oranları	39
Şekil 29. Gruplara göre günlük yem tüketim oranları	39
Şekil 30. Kontrol grubu ve deney grubu ratlarda hücresel DNA hasarı görüntüsü.....	40
Şekil 31. Farklı sürelerde jelde yürütülmüş ve farklı miktarlarda DNA örneği yüklenmiş agaroz DNA jel görüntüleri, kontrol grubu ve deney grubu ratlarda hücresel DNA hasarı görüntüsü.....	41
Şekil 32. Farklı sürelerde jelde yürütülmüş ve farklı miktarlarda DNA örneği yüklenmiş agaroz DNA jel görüntüleri, kontrol grubu ve deney grubu ratlarda hücresel DNA hasarı görüntüsü.....	41
Şekil 33. Farklı sürelerde jelde yürütülmüş ve farklı miktarlarda DNA örneği yüklenmiş agaroz DNA jel görüntüleri, kontrol grubu ve deney grubu ratlarda hücresel DNA hasarı görüntüsü.....	42
Şekil 34. Gruplara göre cox-2 enzim ekspresyon düzeyleri	42
Şekil 35. Gruplara göre bax protein ekspresyon düzeyleri	43
Şekil 36. Gruplara göre bcl-2 protein ekspresyon düzeyleri.....	44
Şekil 37. Gruplara göre kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyleri.....	44
Şekil 38. Gruplara göre kaspaz-9 protein ekspresyon düzeyleri.....	45
Şekil 39. Gruplara göre p53 protein ekspresyon düzeyleri.....	45

TABLolar LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Tablo 1. Meyve ve domates ürünlerinde bulunan likopen miktarı	9
Tablo 2. İnsan dokularında bulunan likopen düzeyleri	9
Tablo 3. Araştırma grupları	22
Tablo 4. Gruplarda görülen ACF oranları	35
Tablo 5. Azoksimetan verilen ratlarda DT'nun displazi ve adenokarsinom üzerine etkileri	36
Tablo 6. Azoksimetan verilen ratlarda DT'nun yem tüketimi ve canlı ağırlık üzerine etkileri.....	38

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kanserde Anormal Hücre Gelişimi.....	ACF
Adenin	A
Ailesel Adenomatöz Polipozis.....	FAP
Antioksidan Sorumlu Element.....	ARE
Apoptozis Proteaz Aktive Edici Faktör.....	Apaf
Astaksantin	AST
Azoksimetan	AOM
Bovin Serum Albumin	BSA
Canlı Ağırlık.....	CA
3,3'-Diaminobenzidin	DAB
Domates Tozu.....	DT
Dünya Sağlık Örgütü	WHO
Epigallokateşingallat.....	EGCG
Fenil Metil Sülfonil Florid	PMSF
Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi	FÜDAM
Fosfat Tamponu	PBS
Guanin	G
Hematoksilen Eosin	HE
Hidrojen Peroksit	H ₂ O ₂
Hücrelerarası Boşluk İletişimi	GAP
Hücreler Arası Düzenleyici Protein Kinaz.....	ERK
İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü.....	IGF
Lipit Peroksidasyon	LPO
Nükleer Faktör kappa B	NFkB
Örnek Uygulama Tamponu	SAB
Prostaglandin	PG
Protein Kinaz	PK
Reaktif Oksijen Türleri	ROS
Siklooksijenaz.....	COX
Sodyum Dodesil Sülfat	SDS

Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi	SDS-PAGE
Tekil Oksijen	O ₂
Tris-EDTA.....	TE
Tümör Nekrozis Faktör	TNF

1. GİRİŞ

Kanser, dünyadaki ölümlerin önde gelen sebeplerinden biridir. Dünya sağlık örgütü (WHO) verilerine göre, 2007 yılında ölümlerin %13'ü kanserden kaynaklanmıştır. Bu ölümlerde de özellikle kolon kanseri ve beyin kanseri ön plana çıkmaktadır (Munteanu vd., 2008; WHO, 2008; Sade vd., 2011). Kalın bağırsak ya da kolon ve rektum kanserleri, özellikle Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Kanada, İngiltere, Fransa, Almanya gibi gelişmiş ülkelerde önemli bir sağlık sorunudur. ABD'de yılda yaklaşık olarak 150.000, Avrupa'da 170.000 tüm dünyada ise yaklaşık olarak yılda bir milyon yeni vaka görülmektedir. Yaşam süresi boyunca toplumda her 50 kişiden birinde kolorektal kanser oluşmaktadır. ABD de tüm yeni kanser vakaları içinde görülme sıklığı erkekte ve kadında %11 oranı ile üçüncü sırayı almaktadır (American Cancer Society, 2008; Halpern vd., 2009; Nakao vd., 2009; Perse ve Cerar, 2011). Amerika'da 2008 yılında yapılan tahminlere göre kanser olgularının %10'u kolon kanserinden kaynaklanmakta ve bu hastalıktan erkeklerin %8'i, bayanların %9'u ölmektedir (Boateng vd., 2006; Munteanu vd., 2009). Türkiye de ise sindirim sistemi kanserleri içerisinde mide ve kolon kanserinin ilk sıralarda olduğu kabul edilmektedir (Değertekin vd., 1999).

Son yıllarda diyet ve beslenme uzmanları, günlük düzenli sebze ve meyve tüketiminin kanseri de içerisine alan bazı hastalık risklerini ortadan kaldırdığını belirtmişlerdir. Bu etkileri de sebze ve meyvelerde bulunan çeşitli antioksidanlar gerçekleştirmektedir. Bunlardan da polifenoller, askorbik asit, karotenoidler ve tokoferoller ön plana çıkmaktadır. Bu bileşikler özellikle serbest radikallerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırarak, farklı mekanizmaların gerçekleşmesini önlemektedirler. Buna bağlı olarak da farklı hastalıkların ortaya çıkışlarını da bu şekilde baskılamaktadırlar (Sahin vd., 2007; Du vd., 2009; Yu vd., 2011). Yapılan çalışmalarda kanser riskini önlemede sebze ve meyve tüketiminin, bir kaç kanser türünde özellikle de kolo-rektal kanser ve akciğer kanseri üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir (van Breda vd., 2008; Du vd., 2009). Domates ve domates ürünleri tüketimi farklı kanserleri önleyebilmektedir. Likopen bir karotenoid bileşiktir ve domatesin kanser önleyici etkisinde ön plana çıkmaktadır (Sahin vd., 2007; Seren vd., 2008; Sahin vd., 2010b).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

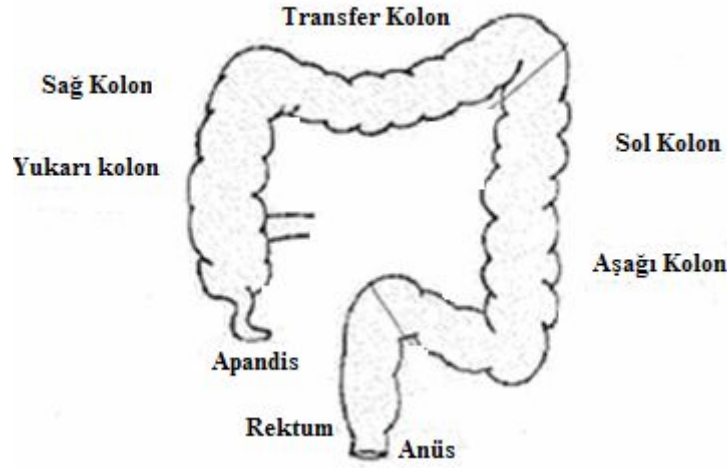
Sahip olduğumuz tüm vücutsal özelliklerimiz gibi hastalıklarımız ve hastalıklara yakalanma eğilimimiz veya hastalıkların bizlerdeki gelişimleri gibi özelliklerin tümünde genetik bir temel bulunmaktadır. 2007 Mayıs ayına kadar kanser hastalığı için etkisi belirlenmiş gen sayısı 421 iken 6251 gen de aday gen olarak yer almaktadır. Yaşamın ve canlılığın en temel birimi olan hücrenin iç ve dış çevresiyle haberleşmesini sağlayan sinyalleşmeler, normal hücrelerde sınırlı ve kontrollü bölünmeyi sağlarken kanser hücrelerinde kontrolsüz bölünme ve büyüme olarak algılanmaktadır (Lüleyap, 2008). Canlı organizmalarda görülen bu tür hücre çoğalma regülasyonu, bazen çeşitli faktörlerin etkisi ile bozulmaktadır. Canlının ihtiyacı olmadığı halde herhangi bir dokuda meydana gelen kontrolsüz hücre bölünmesi, sayısal olarak hücre artışına, normal bir hücreden kanserli bir hücre oluşumunda etkili olan genetik değişimlerin de süreci etkilemesi ile neticede tümör oluşumuna diğer bir ifade ile kansere sebep olmaktadır. Tümör bölgesindeki hücreler sayısal olarak aşırı bir artış gösterirler ve buna bağlı olarak artan besin ihtiyaçlarını karşılamak için kan ve lenf yoluyla diğer dokulara yayılmaya başlarlar. Bu hücreler şekil ve fonksiyon bakımından normal hücrelerden farklı bir durum gösterirler. Sonuçta hem yapısal hem de işlevsel bakımdan anormal bir doku kitlesi oluşur (Dilsiz, 2004; Pogribny, 2010).

Genellikle kanser ile eş anlamlı olarak kullanılan tümör, benign (iyi huylu) veya malign (kötü huylu) olmasına bakılmaksızın anormal hücre büyümesi olarak tanımlanmaktadır. Buna göre; benign tümörler, oluştukları bölgelerde kalarak orada sınırlı bir şekilde büyüyerek vücudun diğer bölgelerine sıçramayan iyi huylu özellikler taşıırken, malign tümörler ise sürekli bölünerek büyüyen, lenf ve kan dolaşımı ile metastaz yapma özelliği bulunan tümör türlerini tanımlamaktadır (Lüleyap, 2008).

2.1.1. Kolorektal Kanser

Kolon kanseri, sindirim sisteminin son kısmını oluşturan kalın bağırsak (kolon) kanseridir. Rektum kanseri kolonun 6 inçlik son kısmını oluşturan kanserdir. Bunların her ikisi birlikte kolorektal kanser olarak bilinmektedir. Bu kanser türü dünyada en yaygın olan kanser türlerinden biridir ve bu kanserden pek çok kişi yaşamını yitirmektedir. Özellikle de

gelişmiş ülkelerde fazla sayıda ölümlere sebep olmaktadır (Ricchi vd., 2003; Nakao vd., 2009; Tian vd., 2011). Amerikan kanser örgütüne göre, her yıl yaklaşık 50.000 den fazla insan bu hastalıktan ölmektedir. Son zamanlardaki araştırmalarda da kolon kanserinin erken evrede uygun yöntemlerle tespit edildiğinde, önlenilebileceği veya net bir teşhis konulabileceği görülmüştür (Halpern vd., 2009). Kolon kanserinin çoğu vakaları küçük ve adenomatöz polipler olarak bilinen iyi huylu hücre kümeleri şeklinde başlar. Zamanla bu poliplerin bazıları kolon kanserine dönüşmektedir (Borinstein vd., 2010).



Şekil 1. İnsana ait bir kolon görüntüsü (Leon ve Gregorio, 2001).

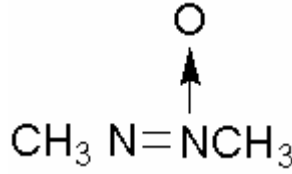
Kolorektal kanserin görülme sıklığı yaşa bağlı olarak değişmektedir. Yaklaşık olarak 2 milyona yakın insanda tespit edilen bu kanserin 65 ve daha üstü yaşlarda daha yoğun olarak bulunduğu tespit edilmiştir (Guessous vd., 2010).

2.1.2. Kolorektal Kanseri Oluşumu

Kanser, az sayıdaki vakada geniş detaylarıyla birlikte çalışılmış olmasına rağmen, hastalığın gelişiminin, çeşitli genetik değişikliklerin etkisi ile çok basamaklı bir süreç olduğu açıktır. Retinoblastoma ve Wilms tümörü gibi tümörler üzerinde yapılan çalışmalar, bazı durumlarda normal hücreyi malignan hücreye dönüştürmek için sadece sınırlı birkaç basamağın bile yeterli olduğunun saptanmasında yararlı olmuştur. Buna rağmen bu tümörlerde yapılan çalışmalar elde edilen sınırlı sayıdaki bilgiler, tümör ve metastaz oluşumuna sebep olan genetik olaylar zincirinin aydınlatılması için yetersiz kalmaktadır. Kolorektal kanser üzerine yapılan deneysel çalışmalarda, azoksimetan (AOM) uygulanan

deney hayvanlarında özellikle kolon ve rektumda kanser gelişiminin teşvik edildiği belirtilmektedir (Delker, vd., 1999; Elumalai vd., 2008). Çeşitli nedenlerden dolayı kolorektal kanser ile yapılan çalışmalar kötü huylu tümör oluşumunun nasıl meydana geldiğinin daha iyi anlaşılmasına ve bu konuda daha detaylı bilgilerin edinilmesine olanak sağlamıştır. Bu nedenlerden birincisi, malignant (kötü huylu) tümörlerin önceden var olan benign (iyi huylu) tümörlerden gelişmesidir. İkincisi ise pek çok birbirinden farklı kanser öncesi evrelerin oluşmasıdır ki, bu farklı evreler ayırt edilip çalışılabilir. Ayrıca kolorektal kanserin hem kalıtsal hem de sporadik (kalıtsal olmayan) formları vardır (Öner, 2003).

2.1.3. Azoksimetan ve Etki Mekanizması



Şekil 2. Azoksimetanın kimyasal yapısı.

Azoksimetan, 1,2 dimetilhidrazinin aktif bir metabolitidir ve kolona spesifik olup özellikle kolorektal hücrelerde kanser oluşumunu tetiklemektedir (Boateng vd., 2006). Genellikle ratlarda ve farelerde kolon kanseri oluşumunu gerçekleştirmektedir. Büyüme faktörü beta (TGF- β) sinyali üzerinde anormal değişimlere sebep olmaktadır, ayrıca TGF- α sentezini düzenlerken, trozin kinaz EGF reseptörünü aktive etmektedir. Azoksimetan, DNA'da nükleofilik bölgedeki bazlara kovalent bağlanarak bir takım değişikliklere sebep olmaktadır. O⁶-metilguanini indükleyerek DNA'da G→A dönüşümüne sebep olmakta ve böylece DNA'da mutasyona sebep olarak laboratuvar hayvanlarında kolorektal kanser oluşumunu tetiklemektedir (URL-1, 2010; Tan vd., 2011).

2.1.4. Kolon Kanserinin Genetiği

Çeşitli tümörlerdeki mutasyon analizleri sayesinde bağırsak epitel hücrelerinin tümör epitelyum hücrelerine dönüşmesinden sorumlu olan genetik basamakların doğası ve sayısı saptanabilmiştir (Öner, 2003). Kolon kanseri ile ilgili yapılan birçok çalışmada bu kanser türünün bir seri mekanizmalarla ortaya çıktığını göstermiştir. Bunlar arasında tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar (APC, p53), onkogenler, epigenetik değişimler (metilasyonlar) ön plana çıkmaktadır (Tuynman, 2004). Meydana gelen ilk mutasyon

normal epitelyum hücrelerinde meydana gelir. FAP (ailesel adenomatoz polipozis) vakalarında meydana gelen ilk mutasyon kalıtsaldır ve kolorektumda düzinelere veya yüzlerce iyi huylu adenomların gelişimine neden olmaktadır. Kendiliğinden oluşan vakalarda, başlatıcı mutasyonun tek bir hücrede meydana geldiği ve adenomdaki tüm hücrelerin bu hücrenin sahip olduğu mutasyonu taşıdığı belirtilmiştir. Meydana gelen ilk mutasyon 5. kromozomun uzun kolunda yerleşmiş olan APC (Adenomatozis polipozis coli) geninde oluşmaktadır (Öner, 2003).

Kolorektal kanserli hastalarda mutasyona uğramış APC gen ürünü olan inaktif halde APC proteininin tespit edildiği belirtilmiştir. Bu hastalarda APC gen mutasyonuna bağlı olarak preadenokarsinom gelişmekte ve daha ileriki aşamalarda ise tamamen adenoma gelişmektedir (Tuynman, 2004; Bissahoyo vd., 2005). Mutasyona uğramış olan APC geninden kromozom 5'in homolog kopyasında bulunan karşı allelin kaybı hücre çoğalması ve adenom oluşması için şart değildir. Kromozom 5'de önceden var olan bir mutasyonla birlikte adenom hücrelerindeki her iki mutasyonun bir araya gelmesi, adenomun daha büyümesine ve parmak benzeri ince çıkıntıların gelişmesine sebep olmaktadır (Öner, 2003). Sonunda ya p53 inaktivasyonundan ya da kaybından sorumlu olan 17 pozisyonundaki bir mutasyon, kanserli hücreye geçişe neden olmaktadır. Kısaca, p53 geninin normal ve mutant gen ürünlerinin yapısı ve fonksiyonları henüz kesin olarak tanımlanmamasına rağmen, kolon kanseri için ileri sürülen genetik model, hücre döngüsünün özgül geçiş noktalarındaki bozuklukları, onkogen ve tümör baskılayıcı genlerdeki ardışık mutasyonları kapsamaktadır (Öner, 2003).

P53 geninde olası bir mutasyon da kanser gelişimi için önemli bir unsur olmaktadır (Rao vd., 2011). Kolon kanserine kalıtsal yatkınlık durumlarında ilk mutasyon genetik olarak geçirilebilir, fakat geri kalan değişimlerin çevresel ajanların etkisi ile oluştuğuna inanılmaktadır. Bu çok basamaklı model diğer kanser tipleri için de uygulanabilir niteliktedir; fakat genlerin normal fonksiyonlarıyla ve mutasyona uğramış genler veya bu genlerin ürünlerinin tümör oluşumuna sebep olduğu moleküler mekanizmalar ile ilgili hala cevaplanmamış bir çok soru vardır (Öner, 2003).

Gen İsmi	Sembol	Tanımlama	Hyper metillenmiş insan veya fare tümörü
Siklin bağımlı kinaz inhibitör 2a izoformları p16 ve p19	Cdkn2a p16 Cdkn2a p19	Pek çok insan ve fare akciğer, prostat ve pankreas kanserlerinde metillenmişlerdir	her ikisi
Ölüm bağlantılı protein kinaz	Dapk	Kolorektal karsinom ve fare akciğer tümörünün %81'nde hiper metillenmiştir	her ikisi
O ⁶ – metil guanin – DNA metiltransferaz	Mgmt	Fare kolorektal kanseri ve deri tümöründe sıklıkla metillenmiştir	her ikisi
DNA bağlı 4 inhibitörü	Id4	İnsan ve fare kankanserinde metillenmiş	her ikisi
MutL homologu 1	Mlh1	Genellikle insan kolon tümörlerinde metillenmiştir	insan
Metillenmiş karaciğer tümörü 1	Mlt1	T antijen transgenik fare karaciğer tümöründe hiper metillenmiştir	fare

Şekil 3. AOM ile oluşturulan tümörlerde gen metilasyonu (gen susturulması) (Borinstein vd., 2010)

2.2. Domates Tozu ve Bileşimi

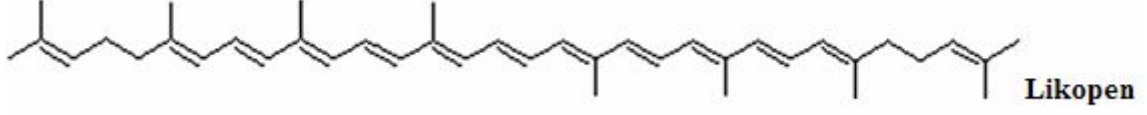
Domates ve domates ürünleri sağlıklı beslenme için oldukça önemli olan likopen, vitamin A, vitamin C, fenoller ve flavonoidler gibi biyoaktif bileşenler içermektedir. Bunlardan özellikle likopen üzerinde yapılan çalışmalarda, likopenin farklı kanser türleri üzerinde önleyici etkisinin olduğu belirtilmiştir (Sahin vd., 2008b; Seren vd., 2008).

Daha önce analizi yapılan güneşte kurutulmuş domates tozunun 1 g da %11 protein, %4,5 yağ, 0.8 mg likopen, 0.13 mg β-karoten, 1.73 mg vitamin C, ve 0.07 mg α-tokoferol bulunmaktadır (Sahin vd., 2008b).

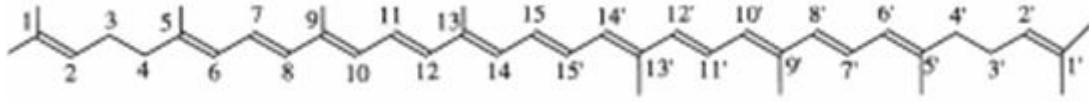
2.2.1. Likopenin Yapısı ve Biyosentezi

Likopen 11 konjuge çift bağa sahip asiklik yapıda bir karotendir. Normalde *all-trans* formunda bulunmaktadır. Çift bağlar izomerizasyon ve farklı *cis* izomer oluşumunda etkili olmaktadır. Bu durum bitkilerde ve plazmada ön plana çıkmaktadır. Polien zincirindeki uzun kromofor, likopenin kırmızı rengi ve antioksidan gücü ile ilişkilidir. Bu da tekil oksijen ve farklı radikaller ile savunmada etkilidir. Likopen bir dizi dört desaturaz reaksiyonu ile karoten ve fitoenden sentezlenmektedir. Bu reaksiyonlar yüksek yapılı bitkilerin plastidlerinde oluşmakta ve membrana bağlı iki desaturaz enzimi tarafından

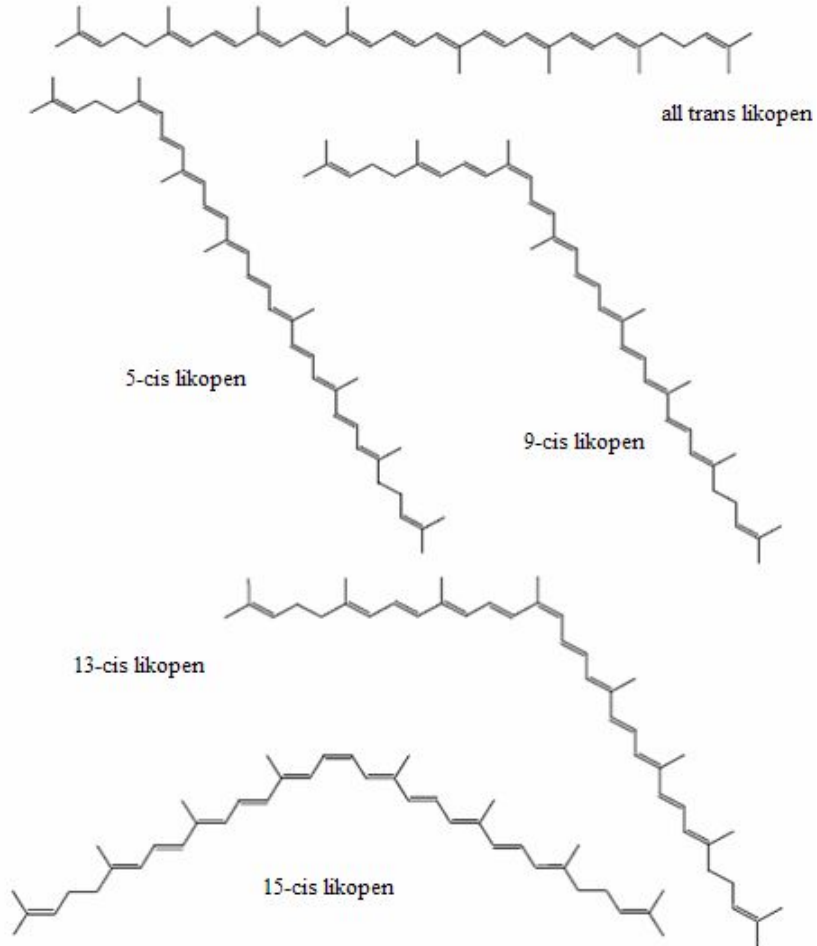
katalizlenmektedir, zincirin sonunda bulunan β -siklik halkanın açık olması, özellikle antioksidan aktivitede oldukça önemlidir (Bramley, 2000; Sahin vd., 2008a; Seren vd., 2008; Alshatwi vd., 2010).



Şekil 4. Likopenin yapısı (Campbell vd., 2007; Sahin vd., 2010b).



Şekil 5. Likopenin yapısı (Bramley, 2000).



Şekil 6. Likopenin farklı pozisyonadaki yapıları (Breemen ve Pajkovic, 2008).

2.3. Likopen ve Kanser

Likopen, sebze ve meyvelerde doğal olarak bulunan karoten (karotenoid) ailesine ait bir pigmenttir ve domatese kırmızı rengini vermektedir (Palozza vd., 2007; Sahin vd., 2008a; Seren vd., 2008). Diyetimizdeki likopenin en az % 85'i domates ve domates ürünlerinden elde edilmektedir. Vücutta likopen, karaciğer, kolon, akciğer, prostat gibi dokularda belirli oranlarda depolanmaktadır (tablo 2). Bu dokulardaki konsantrasyonu diğer karotenoidlerden daha fazladır. Karotenoidlerin bitkilerde en az 600 formu bulunmaktadır ve bitkilerin farklı renklerde olmasını sağlamaktadırlar. Bu karotenoidlerden sadece 14 tanesi insan doku plazmasında uygun seviyelerde bulunmaktadır. İnsanların diyetinde ve plazmasında en yaygın olarak bulunan karotenoidler, likopen, α -karoten, β -karoten, lutein, β -kriptoksantin ve α - tokoferol'dur. Bunlardan bazılarının önemli özellikleri vardır, örneğin, β -karoten vitamin A'ya dönüştürülebilmektedir (Giovannucci, 2002; Karadas vd., 2006; Sahin vd., 2010b). İnsanlar ve hayvanlar, likopen sentezleyemedikleri için diyetle alınması gerekmektedir. Bunun yanında bitkiler ve mikroorganizmalar likopen sentezleyebilmektedirler.

Likopen domates ve domates ürünleri, karpuz, greyfurt gibi meyvelerde bulunmaktadır. Özellikle bir antioksidandır ve tekil oksijen radikali temizleyicisidir, bu etkisi, β -karoten'den iki kat, α - tokoferol'den ise on kat daha fazladır. Ayrıca diğer karotenoidlere kıyasla antioksidan gücü, likopen > α - tokoferol > α -karoten > β -kriptoksantin = β -karoten > lutein'dir. *In vivo* ve *in vitro* oksidatif DNA hasarına karşı hücreleri korumaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda karotenoidlerin, mutasyon, karsinom oluşumu, hücre farklılaşması ve gelişimi üzerinde (şekil 7) düzenleyici etkilerinin olduğu da belirtilmiştir (Campbell vd., 2007; Rao, 2007; Sahin vd., 2008a; Seren vd., 2008; Sahin vd., 2010a; Sahin vd., 2010b). Domatesin yanında domates ürünleri de likopen açısından zengindir (tablo 1). Likopen, aynı zamanda güçlü bir antioksidan maddedir, hücreleri serbest radikal hasarından korumasının yanı sıra, hücreler arasındaki bağları güçlendirmekte ve hücre metabolizmasını geliştirmektedir (Bramley, 2000; Giovannucci, 2002; Rao, 2007; Sahin vd., 2007; Anthon vd., 2011).

Tablo 1. Meyve ve domates ürünlerinde bulunan likopen miktarı (Bramley, 2000).

Meyve veya Domates ürünü	Likopen miktarı µg/gr kuru ağırlık
Domates salçası	54-1500
Domates ketçabı	99-134
Piza sosu	127,1
Domates suyu	50-116
Karpuz	23-72
Domates sosu	62
Pembe guava	54
Papaya	20-53
Taze domates	8,8-42
Pembe greyfurt	33,6

Tablo 2. İnsan dokularında bulunan likopen düzeyleri (Bramley, 2000).

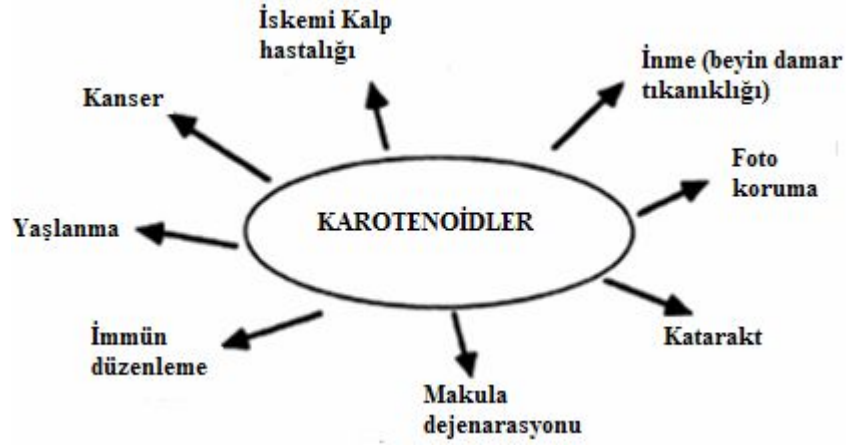
Doku	Likopen (nmol/g yaş ağırlık)
Yağ	0.2-1.3
Adrenal	1.9-21.6
Beyin	0.8
Kolon	0.3
Karaciğer	1.3-5.7
Akciğer	0.2-0.6
Yumurtalık	0.3
Prostat	0.8
Cilt	0.4
Mide	0.2
Testis	4.3-21.4

Likopenin, hücre döngüsü düzenleyici proteinlerin sentezini tetikleyerek kanser hücre gelişimini ve farklılaşmasını önlediği (Levy vd., 1995; Bertram, 1999; Karas vd., 2000; Seren vd., 2008), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1/IGF) bağlayıcı proteinleri aktive ettiği (Park vd., 1997; Rajah vd., 1999; Seren vd., 2008), Konneksin-43 (Cx-43)

geni üzerinde düzenleyici etkisinin olduğu, hücreler arası etkileşimi ve bağlantıyı arttırdığı (Mehta vd., 1989; Bertram vd., 1991; Chen vd., 1995; Matsushima vd., 1995; Seren vd., 2008), redoksu düzenlediği (Gius vd., 1999; Seren vd., 2008), DNA hasarını önlediği (Rao vd., 1999; Riso vd., 1999; Seren vd., 2008), interlökin (IL-6) ve androjenleri inaktif hale getirdiği (Siler vd., 2004; Seren vd., 2008), 5-lipoxygenase-43 enzimini inhibe ettiği (Hazai vd., 2006; Seren vd., 2008), immün sistemi güçlendirdiği (Chew vd., 2004; Seren vd., 2008), lipit peroksidasyonu önlediği, cox enzim inhibitörleri aktivitesini teşvik ettiği yapılmış olan çalışmalarda görülmüştür (Jewell vd., 1999; Seren vd., 2008). Likopenin etki mekanizmalarında görüldüğü gibi karotenoidlerden olan likopen, hücreler arası bağlantı (gap-junction) genlerinden olan Cx-43 ekspresyonunu arttırmaktadır, artan Cx-43 proteinine bağılı olarak da hücreler arasındaki iletişim sağlanmaktadır. Yapılmış olan farklı çalışmalarda da likopenin kolorektal kanserli dokularda serum insülin benzeri büyüme faktör oranını düşürdüğü ve böylece kolorektal kanseri yavaşlatabileceği belirtilmiştir (Küçük vd., 2002; Sahin vd., 2007; Seren, 2008).

Son yıllarda yapılmış olan çalışmalarda likopenin, özellikle kolorektal kanser üzerindeki etkileri üzerinde durulmuştur. Bu çalışmalara göre, diyetle alınan likopenin kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını önleyebileceği, normal hücreler arasındaki etkileşimi büyük oranda arttırabileceği vurgulanmıştır. Ayrıca kanserli dokularda anormal hücre gelişimi (ACF) oranını azalttığı da tespit edilmiştir. Yine özellikle serbest radikallere karşı antioksidan özelliğinin olduğu, yine bu süreçte ve kanser sürecinde DNA hasar oranını azalttığı da vurgulanmıştır (Rao vd., 1999; Riso vd., 1999; Matos vd., 2000; Wargovich vd., 2000; Giovannucci, 2002; Dias vd., 2010).

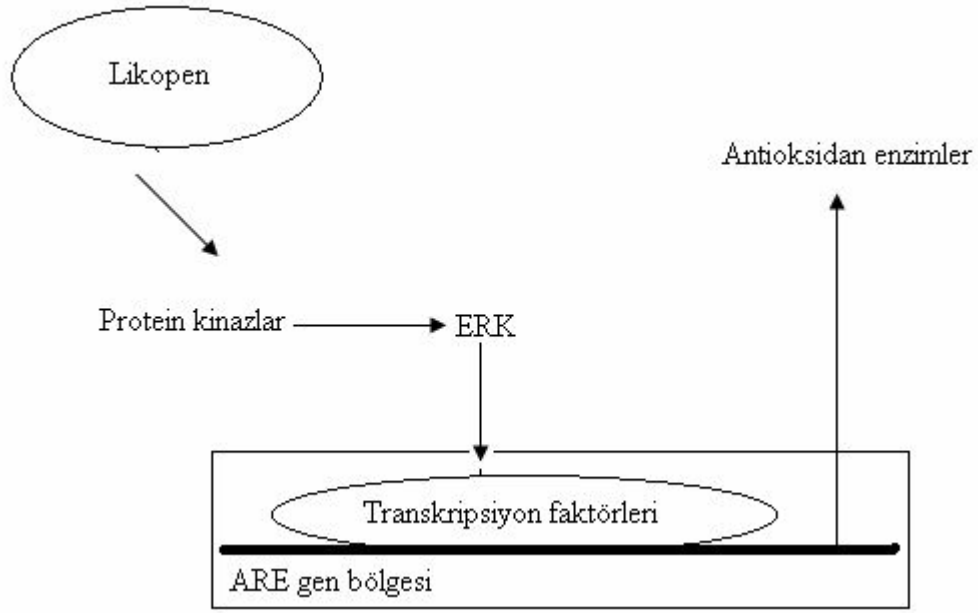
Kolorektal kanserden korunmada beslenmenin önemi büyüktür. Genellikle 45 yaş üstünde görülen kolon kanseri taşıyan bireyin ait olduğu ailenin birinci derecede yakın akrabalarının da risk altında olma ihtimali mevcuttur. Kolon kanserine yakalananların diyet uzmanlarının önerilerine uymaları önemlidir. Özellikle hayvansal kökenli ve protein içeren gıdalar, kızartılmış veya kavrulmuş etlerin tüketimini azaltmak bunların yerine taze sebze ve meyve tüketimine öncelik vermek yararlı olabilir. Örneğin ıspanak, domates, lahana, kırmızıbiber, brokoli ve turunçgillerin tüketimi önerilmektedir (Dilsiz, 2004).



Şekil 7. Karotenoidlerin etki mekanizması (Mayne, 1996).

Meyve ve sebzelerde bulunan likopen, vitamin E, β - karoten antioksidanların doğal kaynağını oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda da antioksidanların, özellikle likopen, vitamin E'nin birkaç kanser türünde, diabette, kalp hastalıklarında oldukça etkili oldukları görülmüştür. Özellikle de bu bileşikler, DNA hasarını azaltmakta, lipid peroksidasyonu önlemekte ve kanser hücrelerinin gelişimini ve yayılmasını durdurmaktadır (Sahin vd., 2006; Charoensiri vd., 2009; Liu vd., 2009; Liu vd., 2010).

Likopenin antikanser etkisi *in vivo* ve *in vitro* olarak hala çalışılmaktadır. Yapılmış olan bir çalışmada likopenin, N-methylnitrosourea etkenli kolon kanserini önleyebileceği bildirilmiştir (Bhuvaneshwaria vd., 2001). Ayrıca likopenin hücre-hücre etkileşimini arttırdığı, mutajenezi azalttığı da bildirilmiştir (Ferreira vd., 2004). Ayrıca likopenin antioksidan sorumlu elementi (ARE) aktive ederek, süperoksit dismütaz, glutatyon transferaz gibi bazı antioksidan enzimlerin sentezinde de rol aldığı belirtilmiştir (Moreira vd., 2005; Breemen ve Pajkovic, 2008; Sahin vd., 2010a).



Şekil 8. Antioksidan sorumlu elementin (ARE) bağlı olduğu gen bölgesinden antioksidan enzim sentezi

Şekil 8’de de görüldüğü gibi likopen etkisi ile bazı protein kinazlar aktifleşerek hücreler arası sinyal proteinini (ERK) aktive etmekte, bu proteinin etkisi ile de transkripsiyon faktörleri serbestleşerek antioksidan enzim sentezinden sorumlu ARE bölgesine bağlanmakta ve bu bölgeden antioksidan savunmasında görevli enzimlerin sentezini teşvik etmektedir (Breemen ve Pajkovic, 2008; Sahin vd., 2010a; Sahin vd., 2010c).

2.4. Likopen ve DNA Hasarı

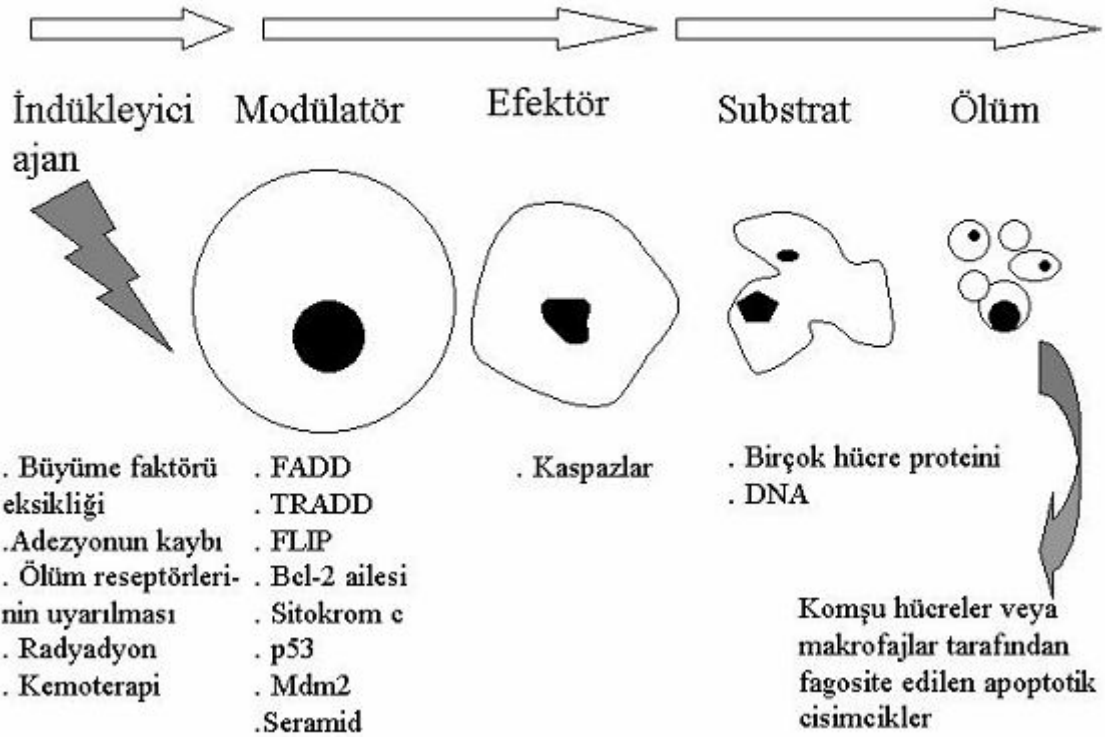
Reaktif oksijen ve nitrojen türleri, yüksek yapılı canlılarda normal hücre sel metabolizma, fagositoz, yangı, radyasyon ve ksenobiotikler gibi eksojen faktörler tarafından sürekli oluşturulmaktadır. Bu faktörlerin etkisi ile oluşan etkili radikaller, DNA, lipit, karbohidrat gibi biyomoleküllere zarar verebilmektedirler (Moreira vd., 2005; Benherlal ve Amurughan., 2008). Yapılmış olan çalışmalarda likopenin, hücreleri reaktif oksijen türlerine (ROS) ve oksidatif DNA hasarına karşı koruduğu belirtilmiştir (Rao, 2007; Sahin vd., 2007; Sahin vd., 2008b; Seren vd., 2008). DNA hasarı oluşumunda, DNA Polimeraz enzimlerinden poli (ADP-riboz) polimeraz enzimi inhibisyona uğrayarak DNA’da kırıklar meydana gelmektedir (Baydas vd., 2005).

2.5. Apoptozis

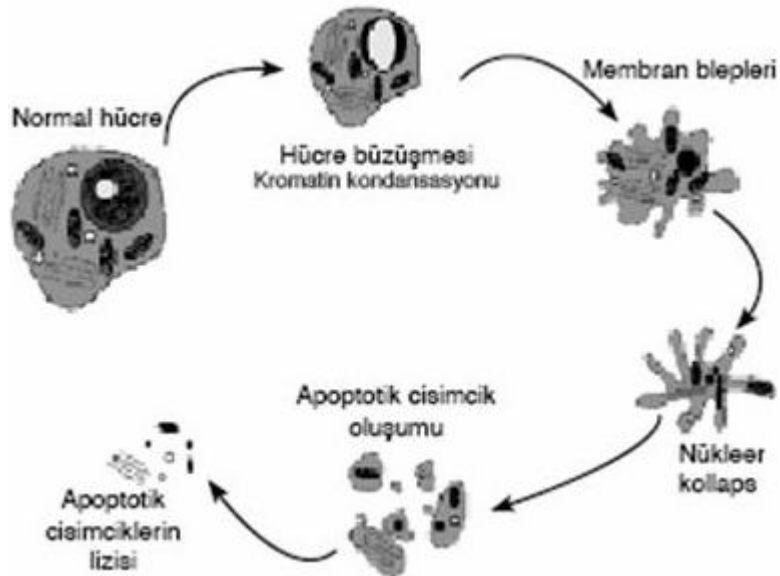
Apoptozis kelimesi eski yunan dilinde sonbahar mevsimindeki sararmış olan yaprakların dökülmesi anlamında kullanılmaktadır. Ayrıca programlanmış hücre ölümü, hücre ölümü, hücre intiharı, hücre kaybı olarak da tanımlanmaktadır. Tüm canlılar gibi hücreler de doğarlar, belirli bir süre yaşarlar ve sonra da ölürlür. Yaşam süresi, hücre tipine göre değişmekle birlikte kaza ve travma sonucu oluşan nekrozis dışında meydana gelen tüm hücre ölümleri apoptoz denilen programlanmış hücre ölümü ile gerçekleşmektedir. Programlanmış hücre ölümü; dengelenmiş hücre proliferasyonu ve dokulardaki hücre sayısının sabit tutulmasından sorumludur. Örneğin insanlarda 5×10^{11} kadar kan hücresi her gün programlanmış hücre ölümü ile kandan elimine edilmektedir (Lüleyap, 2008). Apoptozis özellikle doku homeostatisi ve istenmeyen etkilere karşı doku bütünlüğünün sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır (Plati vd., 2011).

Çok hücrelilerde bir hücre diğerlerini olumsuz yönde etkiliyorsa bu hücrenin tahrip edilmesi gerekir. Ayrıca bir hücre komşu hücrelerden uygun sinyali alamıyorsa yine yok olur (Dilsiz, 2004). DNA hasarının oluşması durumunda hasarın meydana geldiği hücre, apoptozise yönlendirilerek ortadan kaldırılmaktadır. Bu şekilde DNA yapısında zararlı mutasyonları bulunduran hücrelerin, kanserleşme potansiyeli ortadan kaldırılmış olur. İmmün sistemin önemli hücrelerinden biri olan T lenfositler timus bezinde olgunlaşırlar. Bu hücrelerin etkisiz olanları veya organizmanın kendi dokularına karşı reaksiyon verme potansiyeli taşıyanları dolaşıma girmeden önce apoptozis ile ortamdan uzaklaştırılırlar (şekil 9). İmmün sistemde meydana gelen diğer bir apoptoz türü ise sitotoksik T hücrelerinin hedef hücrelerini öldürme mekanizmasıdır. Sitotoksik T hücreleri hedef hücreyi özgül olarak tanıma sonucu, salgıladıkları 'perforinler' aracılığı ile hedef hücre zarında delikler oluşturarak membran yapısını bozarlar ve apoptoz tetiğinin çekilmesini başlatarak hücre intiharına neden olurlar (Lüleyap, 2008).

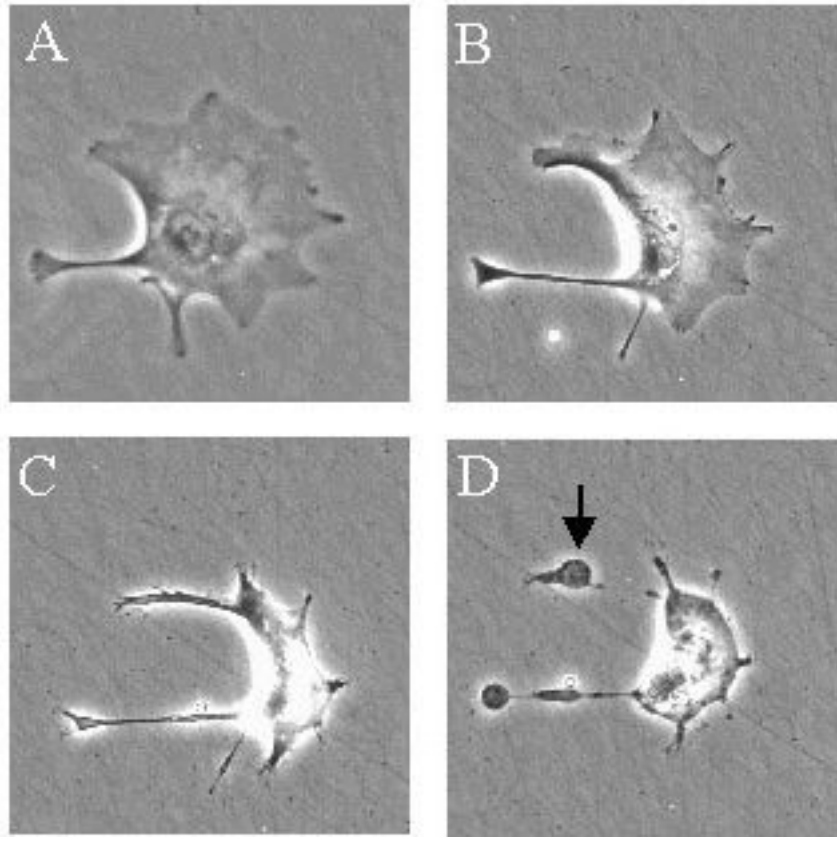
APOPTOTİK SÜREÇ



Şekil 9. Apoptotik süreç (URL-2, 2010)



Şekil 10. Apoptoza uğrayacak hedef hücrede görülen morfolojik değişiklikler (URL-3, 2010)



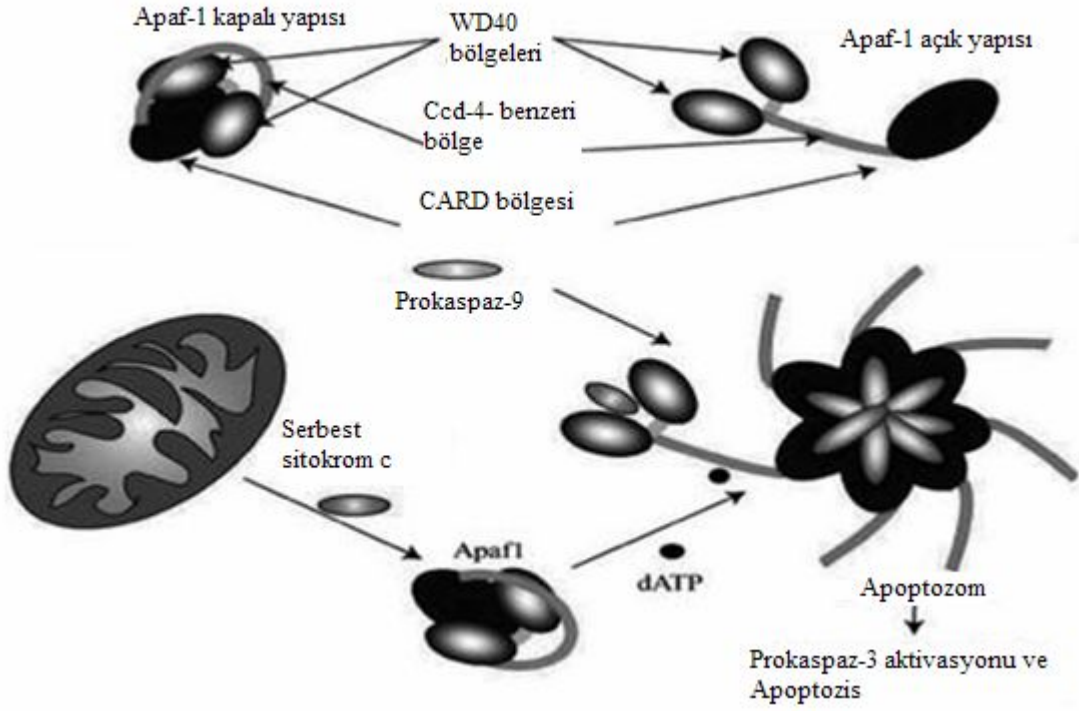
Şekil 11. Apoptoza uğramış hücrenin ölüm aşamaları
(URL-4, 2010)

Hücre ölürken çok aşamalı bir plan devreye girmektedir (şekil 10). Hücre iskeletini oluşturan aktin ve lamin proteinlerinin bölünmeleri ile hücre küçülmeye başlar (şekil 11 A). Hücre çekirdeğinde ise kromatin bozulur ve çekirdek yoğunlaşır. Pek çok hücre ölümünde çekirdek at nalı şeklini alır (şekil 11 B). Hücre gittikçe küçülür (şekil 11 C). Makrofajların yutmasına imkan verecek şekilde paketlenir. Makrofajlar bu sayede düzenli ve temiz bir şekilde bu paketlenmiş hücre artıklarını ortadan kaldırırlar. İşin ilginç yanı bu paketlerin yüzeyleri makrofajların onları tanıyabilmesine olanak sağlayan bir dönüşüm yaşarlar. Örneğin fosfatidilserin birimleri normalde hücrenin içindeyken dış yüzeyine gelir. Apoptozisin son aşamalarında zar kabarcıkları ve bazen de küçük veziküller gözlenir (şekil 11 D) (URL-4, 2010).

2.5.1. Apoptotik Markerlar (Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2, p53 Proteinleri)

Apoptozis mekanizması üzerinde kaspaz-3, kaspaz-9, bax, bcl-2, p53 proteinleri kilit bir rol oynamaktadır. Kaspazlar, başlatıcı ve efektör kaspazlar olarak ikiye

ayrılmaktadır. Sistein proteazlar olarak da adlandırılmaktadırlar, hücrede sitozolde lokalize olmuşlardır. Apoptozis’de özellikle aspartat rezidülerinden peptitleri yıkıma uğratılmaktadırlar, temel görevleri ise DNA polimeraz enzim aktivitesini önleyerek hücrenin apoptozise uğrayarak yok olmasını sağlamaktır. Bcl-2 protein ailesinin bir kısmı pro apoptotik bir kısmı ise anti apoptotiktir. Bu protein mitokondri zarı üzerinde lokalize olmuştur. Mitokondri porlarının geçirgenliğinin kontrolünü yapmaktadır. Anti apoptotik bir etkiye sahiptir ve apoptozisin baskılanmasında rol almaktadır. Bax proteini, proapoptotik bir proteindir. Mitokondri üzerinde yer almaktadır ve apoptozisin gerçekleşmesinde önemli bir rolü vardır. P53 proteini tümör baskılayıcı gen olarak da bilinmektedir, hücrede DNA tamirinde rol alan enzimlerin sentezini teşvik etmektedir. Ayrıca hücre döngüsü üzerinde de düzenleyici bir rolü vardır (Sawada vd., 2000; Nehls vd., 2007; Mousavi vd., 2009; Millau vd., 2010). Hücrede DNA hasarı olduğunda hücre döngüsünde, hücrenin G1 safhasında kalarak S safhasına geçişini durdurmaktadır. Hücrede oluşan DNA hasarını, DNA tamir enzimlerinin sentezini sağlayarak onarmaktadır, fakat bu hasar onarılamayacak düzeyde ise mitokondri zarı üzerinde bulunan bax proteininin sentezini tetikleyerek, hücrenin apoptozise uğramasını sağlamaktadır. Herhangi bir patolojik durumda hücre içerisinden gelen uyarılara bağlı olarak kaspazlar (kaspaz-8, kaspaz-9) aktif hale gelmekte kaspaz aktivasyonuna bağlı olarak apoptozis aktive edici faktör-1 (apaf-1) aktifleşmekte ve mitokondriden sitokrom c serbest hale gelmektedir, sonrasında ise apaf-1, sitokrom c, kaspaz-9 birleşerek apoptozom oluşmakta, bu oluşuma bağlı olarak da kaspaz-3 aktif hale gelerek hücrenin apoptozise uğrayarak yok edilmesi gerçekleşmektedir (şekil 12) (Abedin vd., 2007; Lüleyap, 2008).



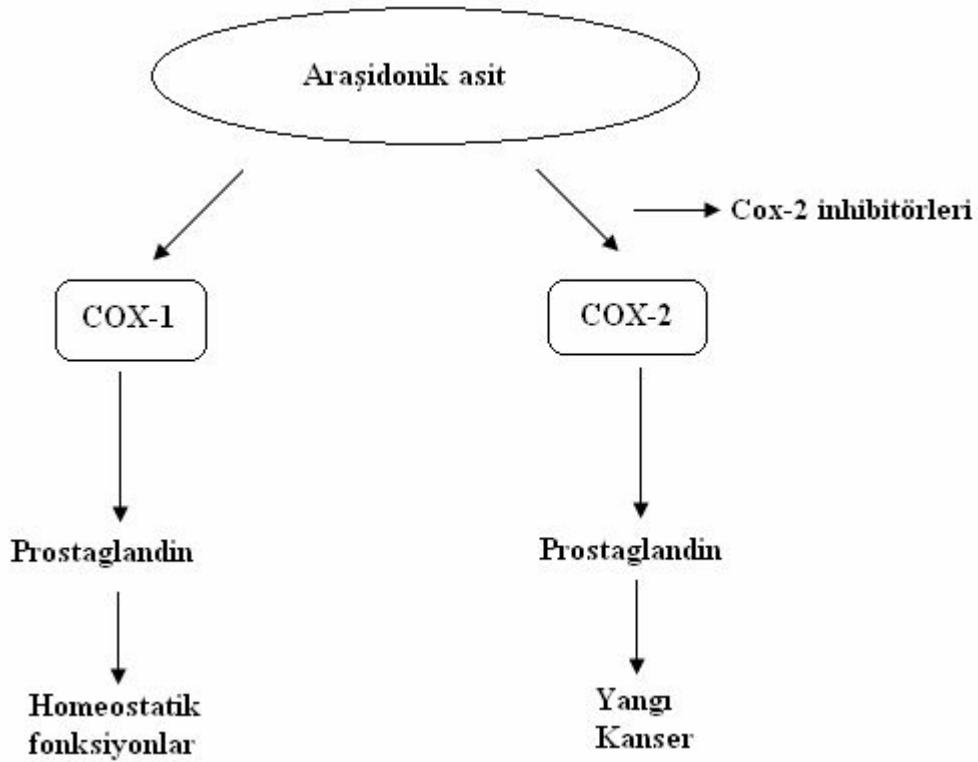
Şekil 12. Sitokrom c ve apaf-1 aracılı apoptozis (URL-5, 2010).

2.6. Siklooksijenaz-2 (Cox-2) Enzimi

Siklooksijenazların *cox-1* ve *cox-2* olarak en belirgin 2 izoformu bulunmaktadır. *Cox-1*, bir çok dokuda sentezlenmekte ve bağırsak mukoza bakımı, böbrek kan akışının düzenlenmesi gibi normal fizyolojik durumları düzenlemektedir. *Cox-2* ise, normal dokularda sentez oranı oldukça zayıf olan, kanser, yangı ve iltihabi reaksiyonlarda fazla oranda sentezlenen bir enzimdir. Kanserli hücrelerin gelişimi ve farklılaşmasında *cox-2* enziminin büyük rolü vardır ve bu mekanizmada oldukça önem arz etmektedir (Dannenberg vd., 2001; Baek, 2006; Sade vd., 2011). *Cox-2* enzimi kolon kanserinde araşidonik asit metabolizmasında görevli bir enzimdir ve kolon kanserinde kilit bir rol oynamaktadır (Strillacci vd., 2008). Normal dokulara göre kolorektal kanserli dokularda *cox-2* proteini daha fazla miktarda bulunmaktadır. Dokularda *cox-2* sentezini, endotoksinler, hormonlar, büyüme faktörleri, sitokin benzeri tümör nekrozis faktör (TNF), interlökinler ve interferonlar indüklemektedir. Herhangi bir patolojik durumda bu uyarıcı faktörlere bağlı olarak bu enzimin sentezinde bulunduğu dokuya göre büyük artışlar görülmektedir. Endotoksinler, interlökinler veya TNF, hücre yüzeylerindeki reseptörlerine bağlandığında, bazı protein kinazlar aktive olmakta buna bağlı olarak da nüklear faktör kapp B (NFkB) aktifleşerek çekirdekte *cox-2* gen promotör bölgesinden *cox-2* enzim sentezini teşvik etmektedir. Bu enzim sentezi ayrıca, araşidonik asit metabolizmasında oluşan

prostaglandin E₂ (PGE₂) reseptörüne bağlı olarak pozitif feedback mekanizması ile de düzenlenmektedir (Tuynman vd., 2004).

Yapılmış olan farklı çalışmalara göre, kolorektal adenokarsinomlarda % 90, kolorektal adenomlarda ise % 40-90 oranında cox-2 salınımı görülmektedir (Strillacci vd., 2008; Wendum vd., 2004). Siklooksijenazlar, prostaglandin sentezleyiciler olarak da bilinmektedirler. Özellikle de araşidonik asidin prostaglandinlere dönüşümünde etkilidirler. Yapılan çalışmalarda bu enzimin sentezlenmesinin engellendiği durumlarda kolorektal kanser hücre gelişiminin gerilediği görülmüştür (Nagendrababhu ve Sudhandiran, 2011). Cox-2 enziminin fazla oranda sentezlenmesi, kolon kanserli hastalarda tümöral hücrelerin gelişimi ve ilerlemesinde kilit bir rol oynamaktadır (Strillacci vd., 2008).

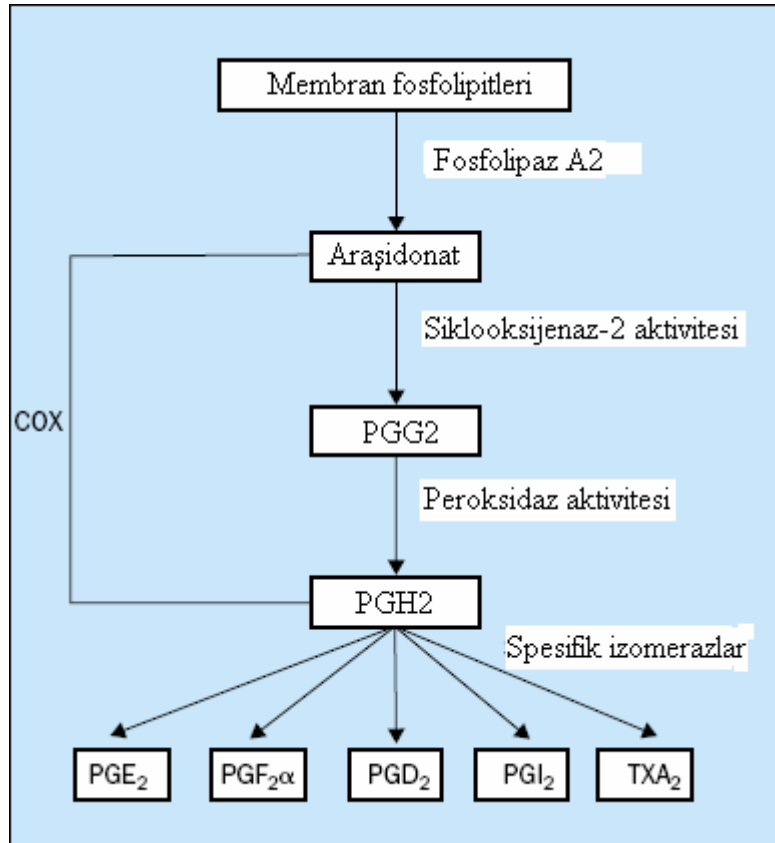


Şekil 13. Cox-1 ve cox-2 enzimlerinin farklı etki mekanizmaları (Baek vd., 2006).

Şekil 13’de görüldüğü gibi cox enzimleri özellikle cox-2 araşidonik asit metabolizmasında rol alarak bu asitin özellikle tümöral hücre gelişimi ve çoğalımında etkili bir faktör olan prostaglandinlere dönüşümünü katalizlemektedir. Bu enzim için uygun inhibitörler kullanıldığında ise enzim inaktif hale gelmekte ve mekanizma durmaktadır ve böylece kanser hücre gelişimi yavaşlamaktadır (Baek vd., 2006).

2.6.1. Siklooksijenaz-2 (Cox-2) Enziminin Etki Mekanizması

Araşidonik asit 20 karbonlu, çoklu doymamış bir yağ asiti olup prostaglandin öncülüdür ve bir ester olarak membran fosfolipitlerinin 2. pozisyonunda bulunmaktadır (Dannenber vd., 2001). Hücre zarında bulunan araşidonik asit metabolizması fosfolipaz A₂ enzimi tarafından katalizlenmektedir (Tuynman, 2004).



Şekil 14. Araşidonik asit metabolizması (Dannenber, 2001).

Bu mekanizmada (şekil 14), ilk olarak fosfolipitlerin fosfolipaz A₂ ile hidrolizi sonucu araşidonik asit oluşmaktadır, sonra cox-2 enzimi katalizörlüğünde moleküler oksijen araşidonik asite aktarılarak kararsız bir bileşik olan prostaglandin G₂ (PGG₂) oluşmakta, bu da hemen cox-2 enziminin peroksidaz aktivitesi katalizörlüğünde PGH₂'ye dönüşmekte ve spesifik izomerazlar da PGH₂'yi farklı prostaglandinlere dönüştürmektedir (Dannenber vd., 2001).

Bu bilgiler ışığında özellikle bu doktora tez çalışmasında, ratlara azoksimetan verilerek kolon kanseri oluşumu takip edilmiş ve diyetle likopen kaynağı olarak ilave edilen domates tozunun, kolon kanseri üzerine özellikle cox-2 enziminin ve kaspaz-3, kaspaz-9,

bax, bcl-2, p53 proteinlerinin ekspresyonuna ve DNA hasarına etkisi araştırılmıştır. Buna bağlı olarak daha önceden farklı kanser türleri üzerinde likopen ile yapılan çalışmalarda olduğu gibi bu tez çalışmasında da domates tozunun kolon kanserini özellikle de cox-2 enziminin ekspresyon düzeyini azaltarak yavaşlatabileceği beklenmektedir.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Hayvansal dokulardan DNA izolasyon kiti Promega (Wizard® Genomic DNA Purification Kit Kat. No: A1120, USA)'dan temin edilmiştir.

Western Blot aşamasında kullanılan primer antikorlar (anti-kaspaz-3 sc-7148, anti kaspaz-9 sc-81650, anti bax sc-526, anti bcl-2 sc-7382, anti p53 sc-55476, anti cox-2 sc-7951) Santa Cruz Biotechnology (Germany)' den temin edilmiştir. Sekonder antikor (ab 6789) ise Abcam (UK)'dan temin edilmiştir.

Deneysel çalışmalarda kullanılan diğer bütün kimyasallar; BDH (VWR's Science Education division, USA), Sigma-Aldrich (Germany), Bio-Rad (USA) ve Merck (USA)'ten temin edilmiştir. Deneysel çalışmada kullanılan azoksimetan Sigma-Aldrich (A 2853, St. Louis, MO, USA)'den temin edilmiştir.

3.1.2. Likopen Kaynağı ve Diyet

Ratların yemleri, Elazığ yem fabrikasından pelet yem olarak temin edilmiştir. Yemin bileşimi; %24 ham protein, %12 su, %1 tuz, %7 selüloz, %8 ham kül, %0,9 fosfor, %0,5-0,7 Na (FÜDAM teknik şartname verilerine göre) likopen kaynağı olarak güneşte kurutulmuş ve çekilmiş domates tozu (DT) %5 oranında Elazığ yem fabrikasında rat yemine katılarak pelet yem olarak hazırlanmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Hayvan Materyali ve Araştırma Grupları

Araştırmada 60 adet Wistar Albino (n=15, 8 haftalık) rat kullanılmıştır. Araştırma, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezinde (FÜDAM) yürütülmüştür (12.02.2009 Etik kurul karar no: 15). Ratlara günlük 12 saat aydınlık; 12 saat karanlık olacak şekilde bir aydınlatma periyodu uygulanmıştır. Ratlar canlı ağırlıkları (CA) birbirine yakın olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır. Gruplar: (i) Negatif Kontrol: Standart diyet ile beslenen, DT ve azoksimetan (AOM) verilmeyen grup; (ii) Pozitif Kontrol: Standart diyet

ile beslenen, AOM verilmeyen fakat DT verilen grup; (iii) AOM Grubu: Standart diyet ile beslenen ve AOM verilen grup; (15 mg/kg CA) (iv) Azoksimetan + DT Grubu: AOM ve DT verilen grup. Likopen kaynağı olarak kurutulmuş domates tozu kullanılmış ve diyete %5 oranında katılmıştır. Hayvanların başlangıç CA'ları eşit olacak şekilde ayarlanıp gruplar oluşturulmuş ve CA'lar çalışma boyunca haftalık olarak kaydedilmiştir.

Tablo 3. Araştırma grupları (n=15)

Gruplar	Uygulama	Deneme Süresi
Negatif Kontrol	Standart diyet ile beslenen, domates tozu (DT), ve azoksimetan (AOM) verilmeyen grup	20 hafta
Pozitif Kontrol (DT)	Standart diyet ile beslenen, AOM verilmeyen fakat DT verilen grup	20 hafta
Azoksimetan Grubu	Standart diyet ile beslenen ve AOM verilen grup	20 hafta
Azoksimetan + DT Grubu	AOM ve DT verilen grup	20 hafta

Ratların normal yemle beslendiği bir haftalık alışma döneminden sonra, önceden belirtildiği gibi ağırlık ortalamaları eşit olacak şekilde seçilip gruplara ayrılmıştır. Yem ve su, çalışma süresince ad libitum olarak verilmiş, AOM veya serum fizyolojinin ikinci enjeksiyonundan 1 hafta sonra ve hayvanlar kesilmeden 1 hafta önce 1 günlük (24 saat) yem tüketimi belirlenmiştir. Çalışma bitiminde ratlar dekapite edilerek kolorektal dokular alınmış ve analizler yapılmaya kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Azoksimetan Uygulaması ve Tümör Tiplendirmesi

Kontrol grubu hayvanlarına eşit miktarlarda olacak şekilde çalışmanın 2. 3. ve 4. haftasında serum fizyolojik, deneme grubu hayvanlarına ise Azoksimetan enjeksiyonu 3 defa (haftada bir kez) sub kutan (deri altı) yapılmıştır. AOM, ratlara 15 mg/kg CA (canlı ağırlığı) dozunda enjekte edilmiştir (Thirupurasundari vd., 2009). Araştırma 20 hafta sürmüştür. Araştırma sonunda hayvanlar anestezi altında dekapite edilerek kolorektal dokular alınmış ve dokulardan kesitler ve bloklar hazırlanmış, tümörün insidansı, hacmi ve

yayımlı histopatolojik olarak incelenmiştir. Makroskopik tümörler alınıp % 4'lük paraformaldehit solüsyonunda fikse edilerek ışık mikroskopunda incelenmiştir. Tümörler önceden belirtildiği gibi adenom veya adenokarsinom şeklinde sınıflandırılmıştır. Kolorektal dokuda adı geçen proteinlerin ekspresyonları belirlenmiştir (Thirupurasundari vd., 2009; Fraser vd., 2010).

3.2.3. Domates Tozunun Hazırlanışı ve Uygulanması

Likopen kaynağı olarak domates tozu kullanılmıştır. Hazır güneşte kurutulmuş domates öğütülüp diyetle %5 oranında ilave edilmiş ve diyet izokalorik ve izonitrojenik olarak ayarlanmıştır. Daha önce analizi yapılan güneşte kurutulmuş domates tozunun 1 g da %11 protein, %4,5 yağ, 0.8 mg likopen, 0.13 mg β -karoten, 1.73 mg vitamin C, ve 0.07 mg α -tokoferol bulunmaktadır (Sahin vd., 2008b).

3.2.4. Doku Homojenizasyonu

Kolon doku örnekleri soğukta (0 °C) PBS ile yıkandı, sonra küçük parçalara bölünerek mekanik homojenizatörde lizis tamponu [pH: 7,4 1M Tris, EDTA, β -Merkaptoetanol, Soybean tripsin inhibitör, Fenil metil sülfonil florid (PMSF)] içerisinde parçalandı, parçalanmış doku örnekleri 15000 rpm'de 60 dk. santrifüjlendi, süpernatant alınarak kullanıncaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi. Bu metotta, Sahin ve ark.'nın yaptığı homojenizasyon esas alınarak bazı değişiklikler yapılmıştır (Sahin vd., 2010c).

3.2.5. DNA Hasarının Analizi

Apoptoziste endonükleaz enziminin aktivasyonu ile DNA'da kırıklar oluşmaktadır. Enzim DNA'yı 200 baz çiftlik parçalara ayırarak kırılmalar oluşturmakta ve DNA agaroz jel elektroforezinde (Thermo EC, mini cell, EC 320) merdiven görüntüsünün oluşmasına sebep olmaktadır. Apoptoziste önemli bir belirteç olan bu oluşum da DNA-agaroz jel elektroforezi ile tespit edilebilmektedir. Dokularda promega Genomik DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır (Promega, Wizard® Genomic DNA Purification Kit, A 1120). Sonrasında DNA Tris-EDTA solüsyonunda çözülerek DNA agaroz jel elektroforezi yöntemi ile %2'lik agaroz jelde analiz edilmiştir (Wang vd., 2003; Baydaş vd., 2005) ve devamında DNA bantlarının görüntüsü alınmış, bu görüntülere bakarak da gruplar arasındaki benzerlik ve farklılıklar tespit edilmiştir.

3.2.5.1. Kolon Dokusundan DNA İzolasyonu

Dokularda Promega Genomik DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA izolasyonu şu şekilde yapılmıştır (Promega, Wizard® Genomic DNA Purification Kit, A 1120):

- 1- 100 mg kolon doku örnekleri kesilerek 1,5 ml lik tüplere alınır 120 µl EDTA (pH:8.0) ve 500 µl nüklei lizis solüsyonu eklenir ve buzda soğutulur.
- 2- Tüplere 600 µl EDTA/ Nüklei lizis solüsyonu tekrar ilave edilir.
- 3- 17.5µl of 20mg/ml Proteinaz K ilave edilir.
- 4- 55°C' de bir gece inkübe edilerek dokular eritilir.
- 5- 3µl of RNAaz solüsyonu ilave edilerek karıştırılır 37°C' de 15-30 dk. bekletilir, sonrasında örnekler oda ısısında 5dk. bekletilir.
- 6- 13000 rpm de 4 dk. santrifüj edilir, altta beyaz pelet oluşur.
- 7- İçerisinde DNA bulunan süpernatant dikkatli bir şekilde temiz bir 1,5ml lik tüpe alınarak 600 µl izopropanol ilave edilir.
- 8- Beyaz renkte DNA kitlesi görülünceye kadar yavaşça karıştırılır.
- 9- 13000 rpm de 1dk. santrifüj edilir, dikkatli bir şekilde süpernatant atılır.
- 10- 600 µl %70 lik ethanol ilave edilerek DNA yavaşça birkaç defa karıştırılarak yıkanır ve 13000 rpm de 1dk. santrifüj edilir.
- 11- Dikkatli bir şekilde ethanol ayrılarak tüp 10-15 dk. oda ısısında kurutulur.
- 12- 100µl of DNA Rehydration Solution ilave edilerek 65°C' de 1 saat inkübe edilir, ara sıra yavaş bir şekilde tüp birkaç defa karıştırılır.
- 13- Elde edilen DNA örneği 2-4°C' de muhafaza edilir.

3.2.6. SDS-PAGE ve Western Blotlama Tekniği ile Proteinlerin Analizi

SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) tekniği ile dokulara ait protein örnekleri %12'lik jelde yürütülmüş, daha sonra bu proteinler Western blotlama tekniği ile nitroselüloz membrana aktarılarak ekspresyon düzeylerine bakılmış (Laemmli, 1970) ve sonrasında protein düzeyleri yoğunluk belirleyici analiz sistemi ile ölçülmüştür. (Image J; National Institute of Health, Bethesda, USA).

3.2.6.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

SDS-PAGE, BIO-RAD Mini-PROTEAN® 3 Cell jel elektrofrez sistemi kullanılarak yapılmıştır. Proteinleri ayırmak için kullanılan jel aşağıdaki gibi hazırlanmıştır (Laemmli, 1970).

Ayırma Jeli (separating)'nin Hazırlanışı (% 12)

dH ₂ O	3,35 ml
1,5 M Tris HCl (pH: 8.8)	2,5 ml
% 10 SDS	100 µl
% 30 Akrilamid/Bis	4 ml
% 10 Amonyum Persülfat	75 µl
TEMED	15 µl

Yükleme Jeli (stacking)'nin Hazırlanışı (% 4)

dH ₂ O	6,1 ml
0,5 M Tris HCl (pH: 6.8)	2,5 ml
% 10 SDS	100 µl
% 30 Akrilamid/Bis	1,3 ml
% 10 Amonyum Persülfat	60 µl
TEMED	12 µl

Örnekler kuyulara yüklenmeden önce eşit miktarda SDS-PAGE SAB boyası ilave edilerek 5 dakika kaynatılır. Elektrofrez için 1 x tank tamponu kullanılır ve proteinlerin jeldeki hareketinin izlenmesini sağlayan boyaya (bromofenol mavisi) ait mavi bant, jelin sonuna gelinceye kadar 20 mA akım uygulanır. Elektrofrez sonrası jel, oda sıcaklığında yarım saat süreyle Coommasie mavisi ile boyanır ve sonrasında jeldeki protein bantları görünür hale gelinceye kadar boya uzaklaştırıcı solüsyon ile yıkanır. Jeller, fotoğrafları alındıktan sonra jel kurutma sistemi ile kurutularak saklanır (Laemmli, 1970).

3.2.6.2. Western Blotlama ile Protein Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Stok Solüsyonlar ve Tamponlar

Azoksimetan Solüsyonu

Azoksimetan 100 mg

Serum Fizyolojik 35 ml

100 mg azoksimetan 35 ml % 9'luk izotonik serum fizyolojik içerisinde çözülerek hazırlandı.

Agaroz jel için SAB (Sample Amplification Buffer)

Promega kitine ait tampon kullanıldı.

SDS-PAGE İçin 5x Tank (yürütme) Tamponu (5x Running Buffer)

0,025 M Trizma Base 15 g/ml

0,192 M Glisin 72 g/ml

%0.1 SDS 5 g/l

dH₂O ile 1x Running buffer'a seyreltilerek çalışma solüsyonu hazırlandı.

SDS-PAGE İçin Örnek Uygulama Tamponu (SAB: Sample Amplification Buffer)

% 10 SDS 1 g/10 ml

0,5 M Tris HCl (pH: 6.8) 0,6 g/10 ml

% 5 Gliserol 0,5 ml/10 ml

% 25 2-Merkaptoetanol 0,25 ml/10 ml

% 0,05 Bromofenol Mavisi 0,005 g/10 ml

dH₂O ile 10 ml'ye tamamlandı.

SDS-PAGE Sonrası Protein Boyama Solüsyonu

% 0,1 Coomassie Brilliant Mavisi 0,1 g/100 ml

% 40 Metanol 40 ml/100 ml

%10 Glasiyal Asetik Asit 10 ml/100 ml

dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı.

SDS-PAGE Sonrası Boya Giderici (Destaining) Solüsyon

% 5 Metanol 5 ml/100 ml

% 7 Asetik Asit 7 ml/100 ml

dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı.

Western Blot Transfer Tamponu 5X

Glisin 4,3 g/300 ml

Trizma Base 5,81 g/300 ml

Metanol 75 ml/300 ml

dH₂O ile 300 ml'ye tamamlandı.

PBS (Phosphate Buffered Saline) 9X

1,45 M NaCl 84,74 gr/l

0,075 M Na₂HPO₄.12 H₂O 26,8 gr/l

0,025 M NaH₂PO₄.12 H₂O 3,9 gr/l

PBS Triton-X 100

PBS 1000 ml

Triton-x 100 2 ml

Bovin serum Albumin

Bloklama solüsyonu olarak % 1'lik bovin serum albumin kullanıldı.

Western Blotlama Sonrasında Nitroselüloz Membranda Protein Görüntüleme Solüsyonu

1 M Tris (pH: 6,8) 4ml/120 ml

3,3'-Diaminobenzidin (DAB) tablet 3 tablet (Merc)

%3 H₂O₂ 1ml/120ml

dH₂O ile 120 ml'ye tamamlandı.

Western blotlama BIO-RAD Mini-PROTEAN[®] 3 Cell jel elektroforez sistemi kullanılarak yapılmıştır. Blotlama öncesinde SDS-PAGE ile Bölüm 3.2.6.1'de anlatıldığı gibi proteinlerin jelde ayrılması sağlanır. BIO-RAD Immobilon-P transfer membranı jel

büyükliğünde kesilir. Filtre kağıtları ile birlikte transfer tamponu içerisinde bekletilir. Elektroforez sonrasında jel de transfer tamponu içerisinde bekletildikten sonra western blota özgü kasetin kapağı açılır, alt tarafına filtre kağıdı ve onun üzerine de jel yerleştirilir. Hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek nitroselüloz membran ve tekrar bir filtre kağıdı yerleştirilir. Kasetin kapağı kapatılır ve elektroforez tankına yerleştirilir. Tanka buz ünitesi yerleştirildikten sonra transfer tamponu doldurulur ve güç kaynağına bağlanarak 250 mA'de 90dk. akım verilir. Blotlama manyetik karıştırıcı üzerinde yapılarak ısının düzenli dağılması sağlanır. Blotlama sonrası membran, PBS Triton-X 100'de (PBS çalışma solüsyonu) 15 dakika yıkanır. BSA (bovin serum albumin) içerisinde 4°C'de bir gece bloklama yapılır. Bloklamadan sonra 30 dk. Oda ısısında bekletilir, sonra 60 dk, 37°C' de etüvde, ve sonrasında 30 dk oda ısısında bekletilir, 1/1000 oranında seyreltilmiş primer antikor ilave edilir. 30dk. Oda ısısında bekletilir, sonra 60 dk, 37°C' de etüvde ve sonrasında 30 dk oda ısısında bekletilir, 15 dakika PBS çalışma solüsyonu ile yıkama yapılır. 1/1000-2000 oranında seyreltilmiş sekonder antikor ilave edilir. 30 dk oda ısısında bekletilir, sonra 60 dk, 37°C' de etüvde ve sonrasında 30 dk oda ısısında bekletilir. Yine aynı şekilde PBS çalışma solüsyonu ile 15dk yıkama yapılır. Yıkama sonrasında 3 tablet (30 mg) 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Sigma-Aldrich), 116 ml PBS, %3'lük 1ml H₂O₂ içerisinde 1M Tris (pH: 6,8) bantlar belirinceye kadar bekletilir. Daha sonra dH₂O içerisine alınarak reaksiyon durdurulur, bu metotta Sahin ve ark.'nın çalışması esas alınarak bazı değişiklikler yapılmıştır (Sahin vd., 2010c).

3.2.7. Siklooksijenaz-2 (Cox-2) Ekspresyonunun Kontrolü

Azoksimetan uygulanarak kolon kanseri oluşturulmuş gruplarda cox-2 enziminin ekspresyon düzeyi bu enzime spesifik antikorlar kullanılarak tespit edilmiştir. Ayrıca kolon kanseri oluşturulmamış gruplarda da bu enzimin ekspresyon düzeyi SDS-PAGE ve Western blotlama tekniği ile belirlenerek sonuçta tümörlü doku ile normal doku arasında bu proteinin ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır. Aynı zamanda DT verilmiş kanserli dokuların da protein analizi yapılarak cox-2 enziminin, kolorektal/tümör dokudaki ekspresyon düzeyleri bir bütün olarak değerlendirilmiştir.

3.2.8. Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2 p53 Proteinlerinin Analizi (Apoptotik Markerlar)

Apoptoziste önemli bir belirteç olan bu proteinlerin dokulardaki sentez oranları önem arz etmektedir. Bu tez çalışmasında kaspaz-3, kaspaz-9, bax- bcl-2, gibi apoptotik (markerların) proteinlerin kanserli ve normal dokudaki ekspresyon düzeyleri spesifik antikorlar kullanılarak SDS-PAGE ve Western blotlama tekniği ile belirlenmiştir.

3.2.9. İstatistiksel Analizler

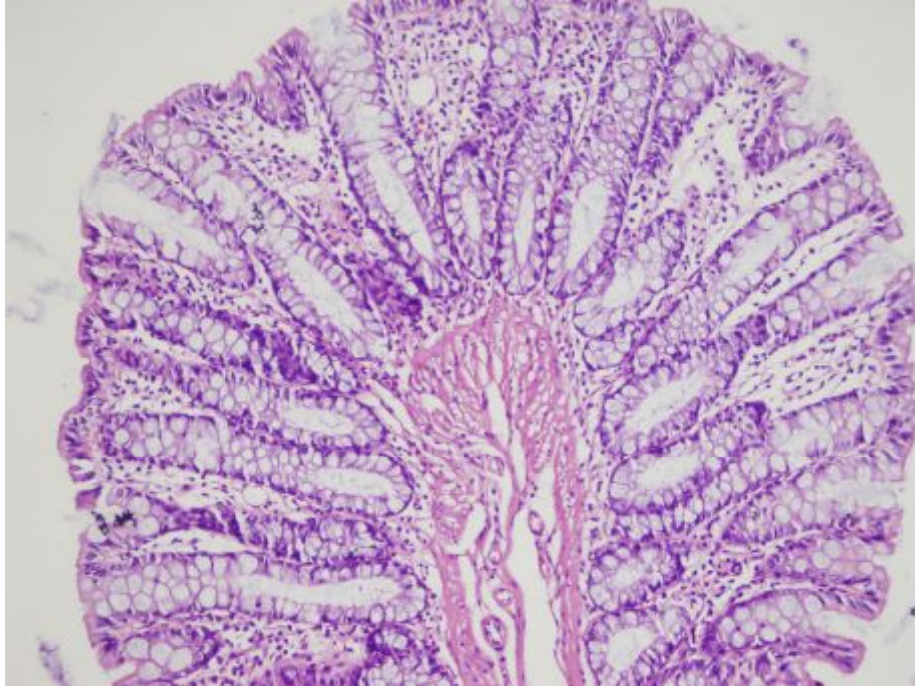
Bütün veriler SAS (1999) paket programında Varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Grup içi farklılıkları belirlemek için Duncan testi uygulanmış ve tümör insidans verileri X^2 testi ile analiz edilerek, tümör tespit edilen ratların sayısı yüzde (%) olarak belirtilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

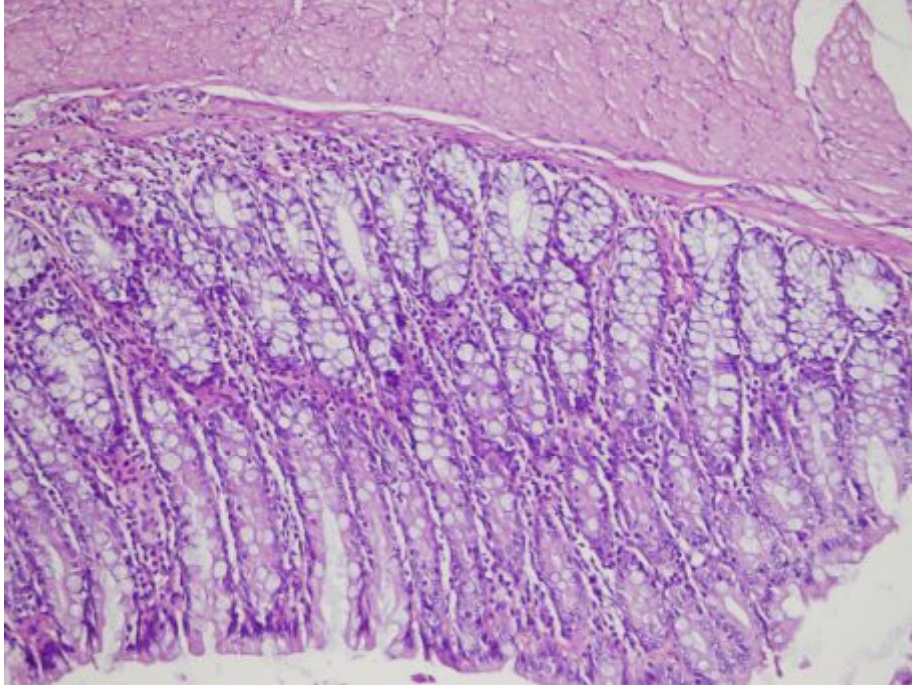
4.1. BULGULAR

4.1.1. Histopatolojik Görüntüler

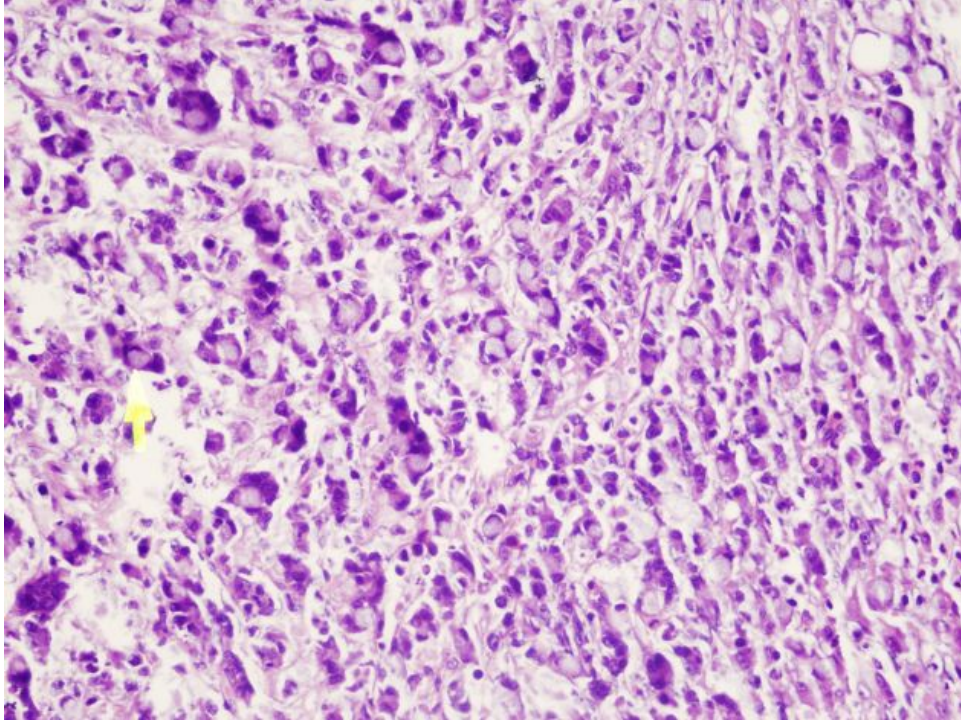
Çalışmanın sonlandırılması ile birlikte örnek kolon dokularından 2'şer cm ara ile kesitler alınıp hematoksilin-eosin boya solüsyonunun da örnekler hazırlanarak mikroskopta incelenmiştir.



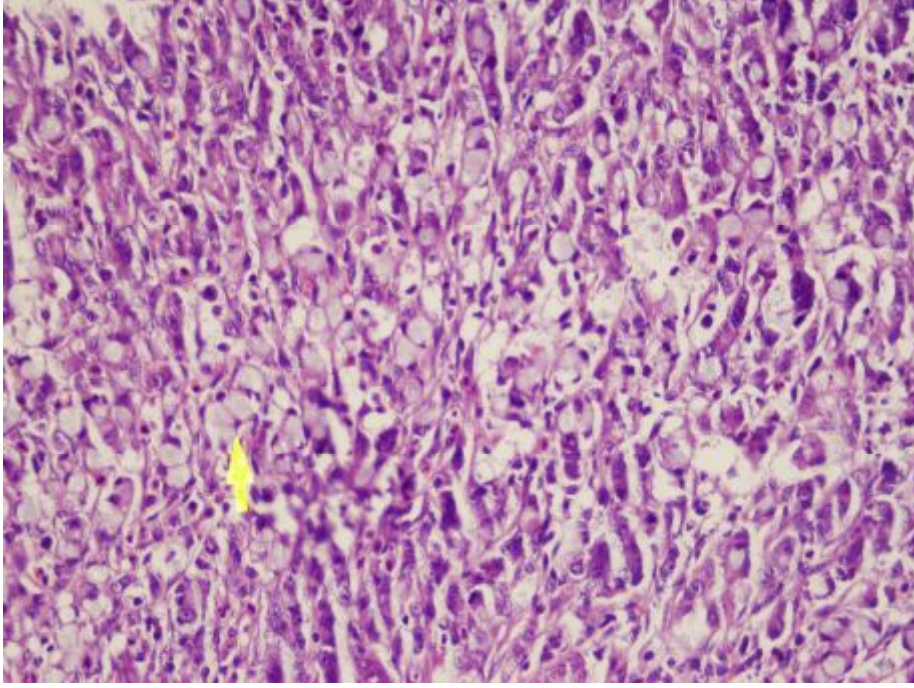
Şekil 15. Kontrol grubuna ait histolojik görüntü (HE x 400)



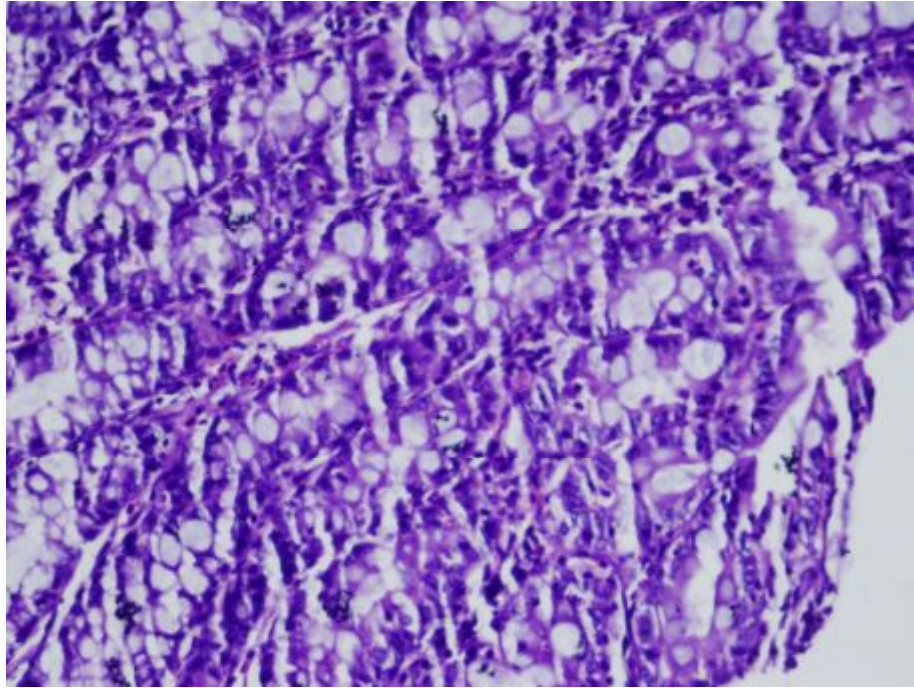
Şekil 16. DT grubuna (pozitif kontrol) ait hücre görüntüsü (HE x 400)



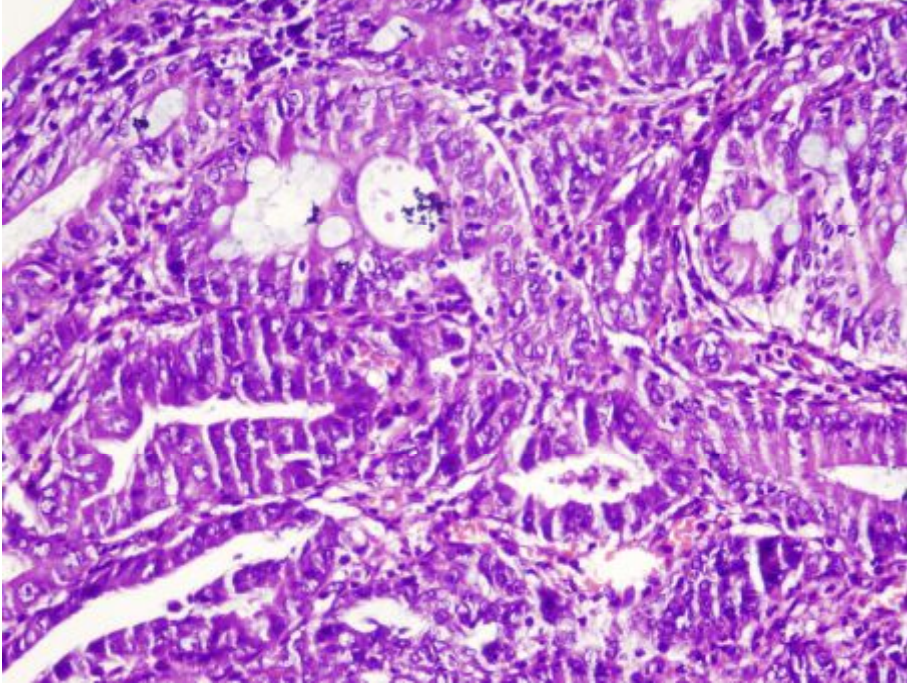
Şekil 17. Azoksimetan verilen gruba ait adenokarsinomda taşlı yüzük hücre görüntüsü (HE x 200)



Şekil 18. Azoksimetan verilen gruba ait adenokarsinomda taşlı yüzük hücre görüntüsü (HE x 200)



Şekil 19. Azoksimetan + DT verilen grupta orta şiddette displazi hücre görüntüsü (HE x 400)



Şekil 20. Azoksimetan + DT verilen grupta şiddetli displazi hücre görüntüsü (HE x 400)

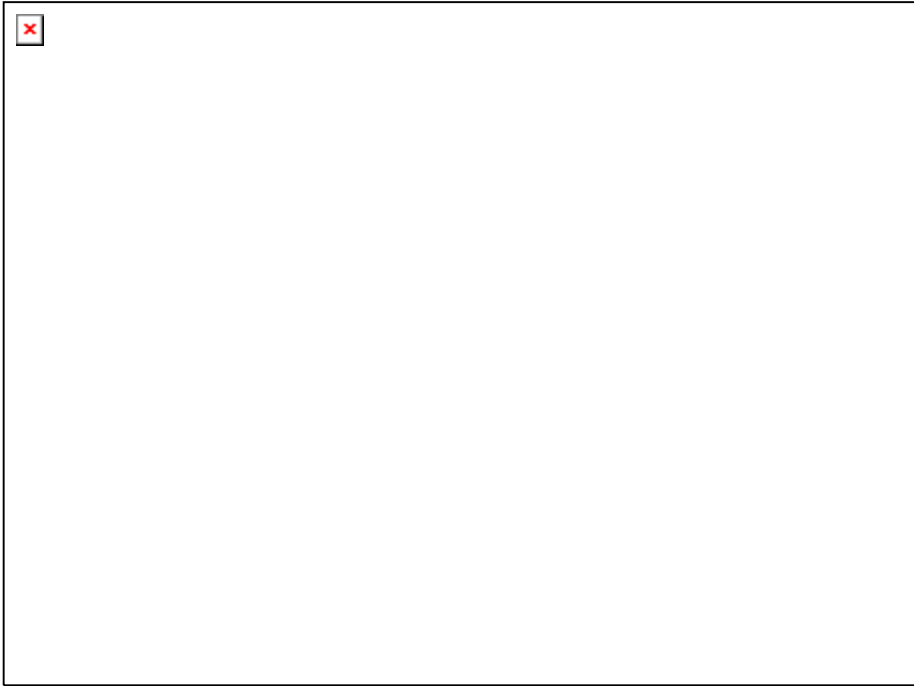
4.1.2. Dekapite Edilmiş Ratların Kolon Doku Makroskobik Görüntüleri



Şekil 21. Dekapite edilmiş kontrol grubu kolon doku makroskobik görüntüsü (Canon Power Shot S5 IS, 8 megapiksel 1/2.5'' (5.8 x 4.3 mm))



Şekil 22. Dekapite edilmiş DT (pozitif kontrol) grubu kolon doku makroskobik görüntüsü (Canon Power Shot S5 IS, 8 megapiksel 1/2.5'' (5.8 x 4.3 mm))



Şekil 23. Dekapite edilmiş azoksimetan grubu kolon doku makroskobik görüntüsü (Canon Power Shot S5 IS, 8 megapiksel 1/2.5'' (5.8 x 4.3 mm))



Şekil 24. Dekapite edilmiş DT + azoksimetan grubu kolon doku makroskobik görüntüsü (Canon Power Shot S5 IS, 8 megapiksel 1/2.5'' (5.8 x 4.3 mm))

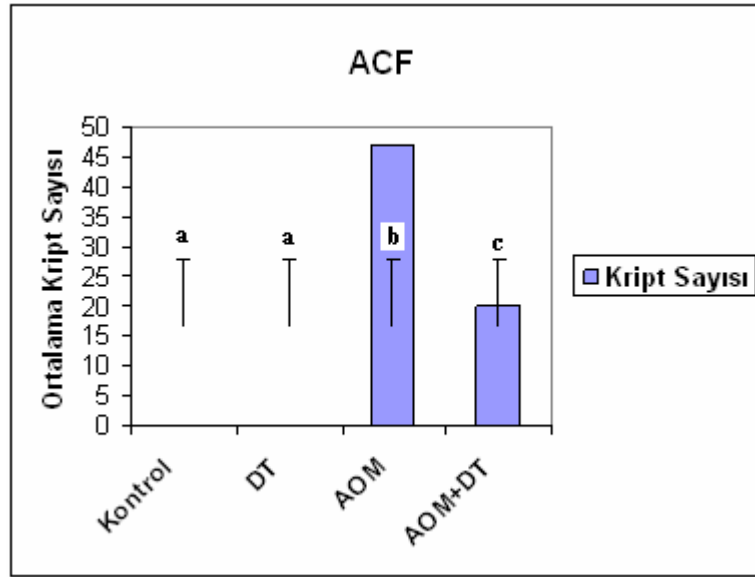
4.1.3. Kanserde Anormal Hücre Gelişimi (ACF)

Azoksimetan grubunda kanserli hayvanlarda ortalama 47 kript sayılmış, azoksimetan ve DT verilen grupta ise kanserli hayvanlarda ortalama 20 kript sayılmıştır (tablo 4).

Tablo 4. Gruplarda görülen ACF oranları

Gruplar	Kript sayısı
Kontrol	0
DT	0
AOM	47
AOM + DT	20

Tablo 4'e bakıldığında kanserli dokuda ve DT verilen kanserli gruplarda ACF oranları farklı bulunmuştur. Kanserli grupta fazla oranda ACF tespit edilmişken DT verilen kanserli grupta bu oran daha düşük bulunmuştur (şekil 25) ($p < 0.05$). Dolayısı ile buna bağlı olarak, likopenin tümör gelişimini ve oluşumunu önleyebileceğini ve tümöral hücre başlangıcı olarak kabul edilen ACF oranını azaltabileceğini söyleyebiliriz.



Şekil 25. Gruplarda görülen kript sayıları

a-c: Farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p < 0.05$).
Gruplar arası fark ONE-WAY ANOVA testi ile belirlenmiştir.

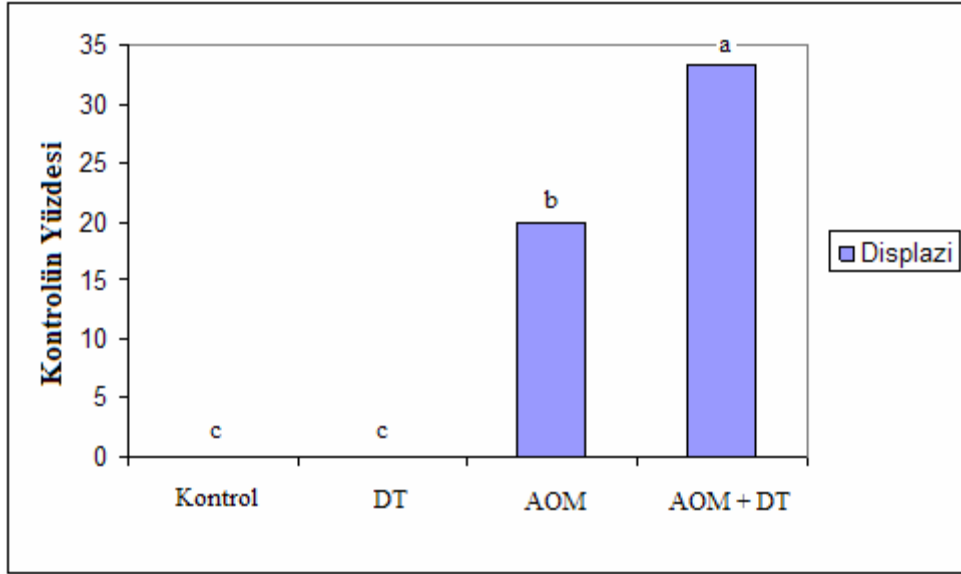
4.1.4. Tümör Tiplendirmesi

Tablo 5. Azoksimetan verilen ratlarda DT'nun displazi ve adenokarsinom üzerine etkileri *

Gruplar	Displazi (%)	Adenokarsinom (%)	n
Kontrol	0 ^c	0 ^b	15
DT	0 ^c	0 ^b	15
AOM	20.0 ^b	53.3 ^a	15
AOM + DT	33.3 ^a	13.3 ^b	15
P	0.016	0.000	
X²	10.385	14.196	

a-c: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p < 0.05$).

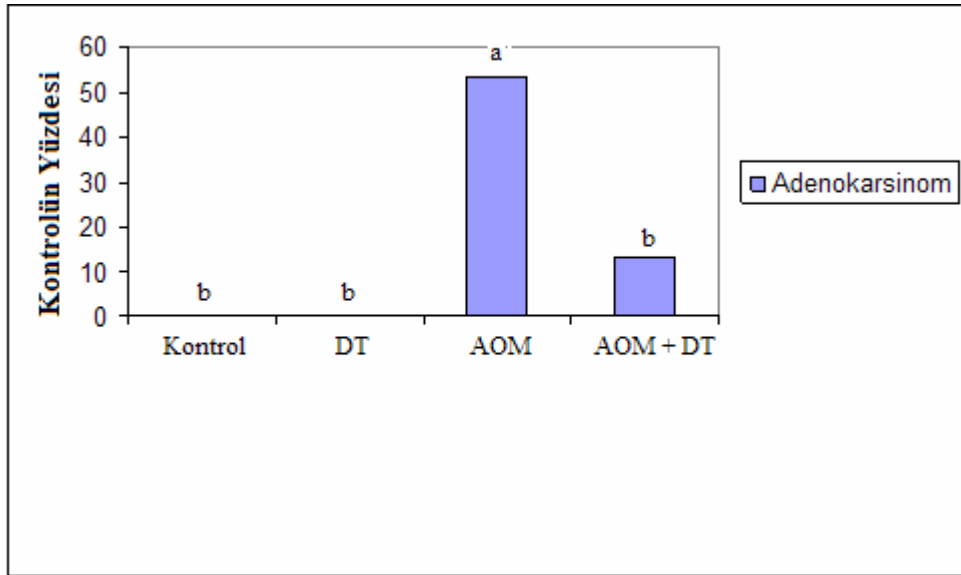
* Gruplar arası fark X² testi ile belirlenmiştir.



Şekil 26. Gruplarda görülen displazi oranları

a-c: Farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p < 0.05$).

* Gruplar arası fark X^2 testi ile belirlenmiştir.



Şekil 27. Gruplarda görülen adenokarsinom oranları

a-b: Farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p < 0.05$).

* Gruplar arası fark X^2 testi ile belirlenmiştir.

Azoksimetan verilen kanser grubunda 15 hayvandan 8'inde adenokarsinom tespit edilmiş, 3 tanesinde de orta derecede displazi gelişmiştir. Azoksimetan ve DT verilen grupta; 15 hayvandan 2 tanesinde adenokarsinom, 2 tanesinde ağır şiddetli displazi, 3 tanesinde de orta derecede displazi görülmüştür. Tespit edilen tümörlerin boyutu yaklaşık

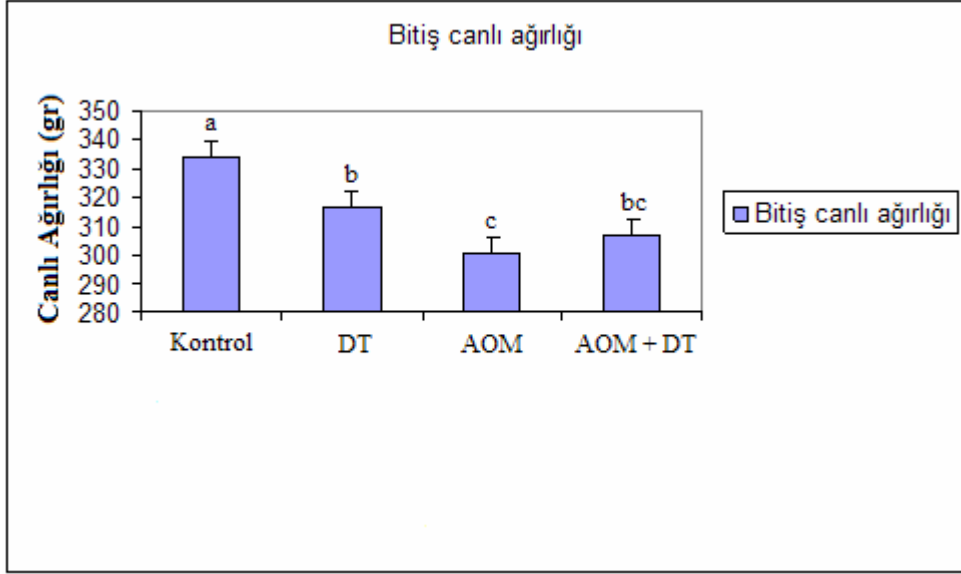
0.1-0.8 cm olarak ölçülmüş, tümör bölgesi çoğunlukla kolonun proksimal bölgesinde yoğunlaşmıştır. Tablo 5'deki istatistiksel değerlere bakıldığında, gruplar arasındaki fark önemlidir ($p<0.05$). Hem displazi hem de adenokarsinom açısından bakıldığında azoksimetan grubu ve DT verilen azoksimetan grubu arasında belirgin bir fark vardır ($p<0.05$). Histolojik görüntülere bakarak değerlendirme yapılırsa, azoksimetan verilen grupta kontrollere göre, belirgin oranda adenokarsinom tümör oluşumu görülmektedir (şekil 17 ve şekil 18). AOM + DT verilen gruba bakıldığında şiddetli ve orta şiddetli displaziler görülmektedir (şekil 19 ve şekil 20). Buna bağlı olarak şu yorumlar yapılabilir, şekillerde de görüldüğü gibi, DT verilen kanserli grupta şiddetli ve orta şiddetli displazi geliştiği görülmüştür, dolayısı ile kontrollere göre kıyaslandığında likopenin kanserli gruplarda adenokarsinom gelişimini azaltabileceğini söyleyebiliriz.

4.1.5. Canlı Ağırlık Değişimi ve Yem Tüketimi

Tablo 6. Azoksimetan verilen ratlarda DT'nun yem tüketimi ve canlı ağırlık üzerine etkileri

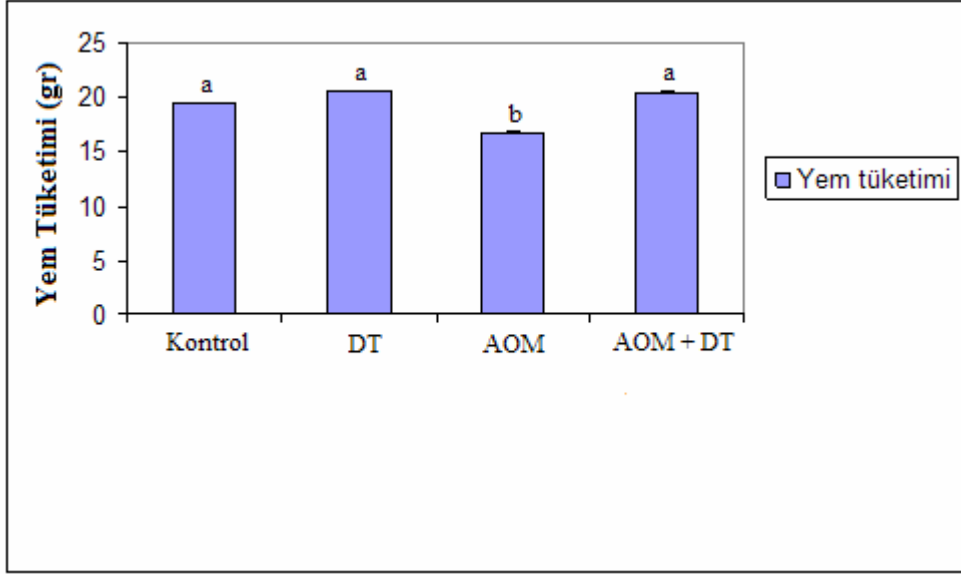
Gruplar	Yem tüketimi, gr	Başlangıç canlı ağırlık, gr	Bitiş canlı ağırlık, gr
Kontrol	19.41±0.41 ^a	218.07±4.74	334.80±5.67 ^a
DT	20.55±0.70 ^a	216.46±7.40	317.80±4.5 ^b
AOM	16.75±0.52 ^b	217.53±5.70	301.67±5.02 ^c
AOM + DT	20.44±0.10 ^a	217.20±7.17	307.80±5.28 ^{bc}

a-c: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p<0.05$). ANOVA *Post hoc* Duncan Testi



Şekil 28. Gruplarda görülen bitiş canlı ağırlık oranları

a-c: Farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p < 0.05$).
ANOVA *Post hoc* Duncan Testi



Şekil 29. Gruplara göre günlük yem tüketim oranları

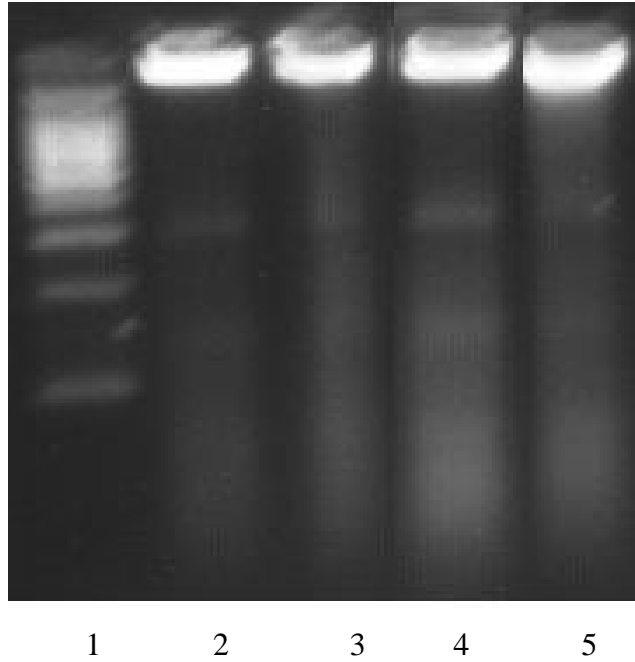
a-c: Farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p < 0.05$).
ANOVA *Post hoc* Duncan Testi

Tablo 6'daki istatistiksel değerlere yem tüketimi açısından bakıldığında gruplar arasındaki farklar önemlidir ($p < 0.05$). Bu sonuçlara göre azoksimetan grubu ve DT verilen azoksimetan grubu arasında istatistiksel açıdan fark olduğu için ($p < 0.05$) verilen DT'nun

kısmende olsa tümör gelişimine negatif yönde etkide bulunarak iyileşme gösterebileceği söylenebilir.

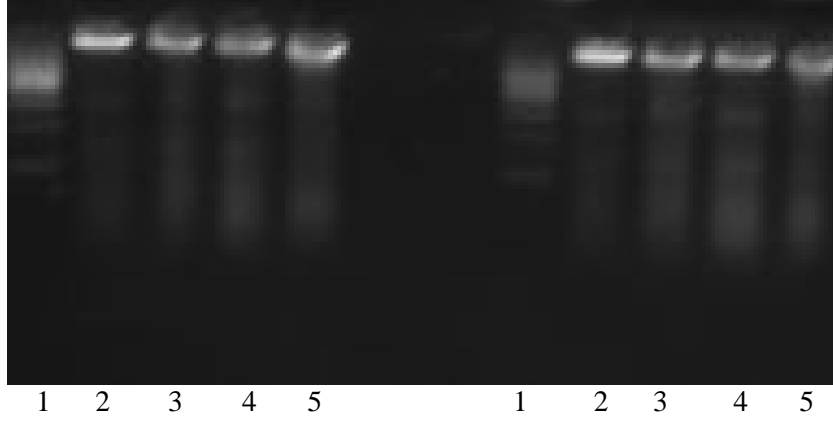
Başlangıç canlı ağırlıklarına bakıldığında gruplar arasında istatistiksel açıdan bir fark yoktur ($p>0.05$). Bitiş canlı ağırlıklarına bakıldığında azoksimetan grubu ve DT verilen azoksimetan grubu arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark yoktur ($p>0.05$).

4.1.6. DNA Hasarı

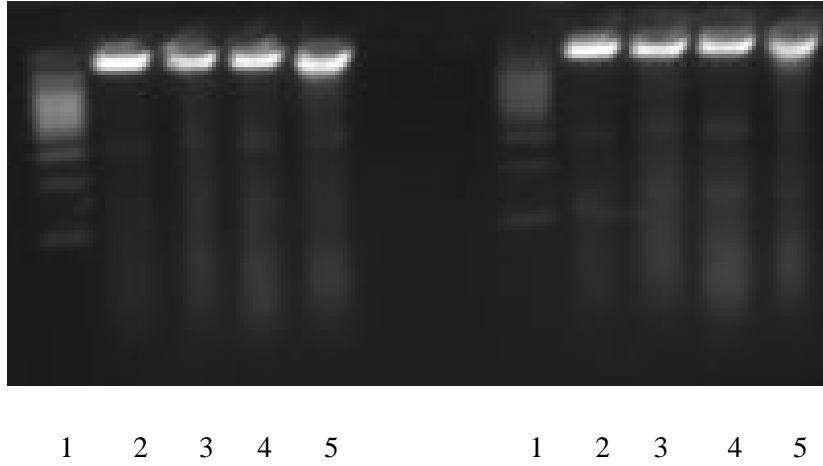


Şekil 30. Kontrol grubu ve deney grubu ratlarda hücresel DNA hasarı görüntüsü.
Hatlar: (1) marker; (2) Kontrol; (3) , DT; (4) AOM; (5) AOM + DT

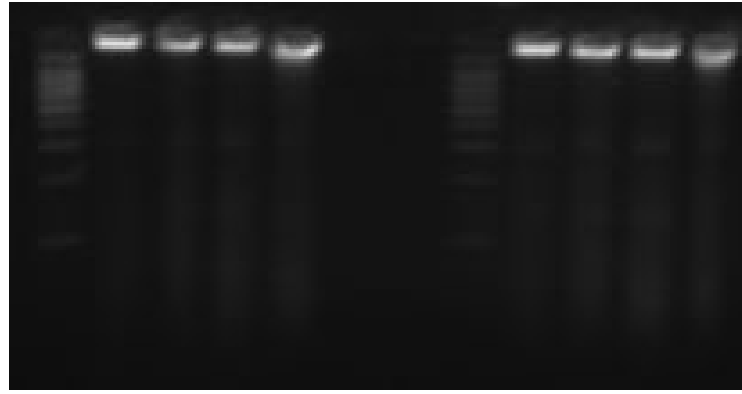
Şekil 30' da ki DNA agaroz jel görüntüsüne bakıldığında azoksimetan grubunda kontrollere göre DNA da meydana gelen kırılmalar (merdiven görüntüsü) daha fazla görülmektedir. AOM + DT verilen grupta ise DNA daki kırılmalar kanser grubuna göre kısmen daha azdır. Bu sonuçlara göre de şu yorumu yapabiliriz; DT verilen kanserli gruplarda DNA daki hasar oranı, DT verilmeyen kanser grubuna göre daha azdır ve buna bağlı olarak da domates tozu içerisinde bulunan likopenin kolon kanseri sürecinde kısmen de olsa DNA hasarını azaltabileceğini söyleyebiliriz (Sahin vd., 2007; Seren vd., 2008).



Şekil 31. Farklı sürelerde jelde yürütülmüş ve farklı miktarlarda DNA örneği yüklenmiş agaroz DNA jel görüntüleri, kontrol grubu ve deney grubu ratlarda hücresel DNA hasarı görüntüsü.
Hatlar: (1) marker; (2) Kontrol; (3) DT, pozitif kontrol; (4) AOM; (5) AOM + DT.



Şekil 32. Farklı sürelerde jelde yürütülmüş ve farklı miktarlarda DNA örneği yüklenmiş agaroz DNA jel görüntüleri, kontrol grubu ve deney grubu ratlarda hücresel DNA hasarı görüntüsü.
Hatlar: (1) marker; (2) Kontrol; (3) DT, pozitif kontrol; (4) AOM; (5) AOM + DT.

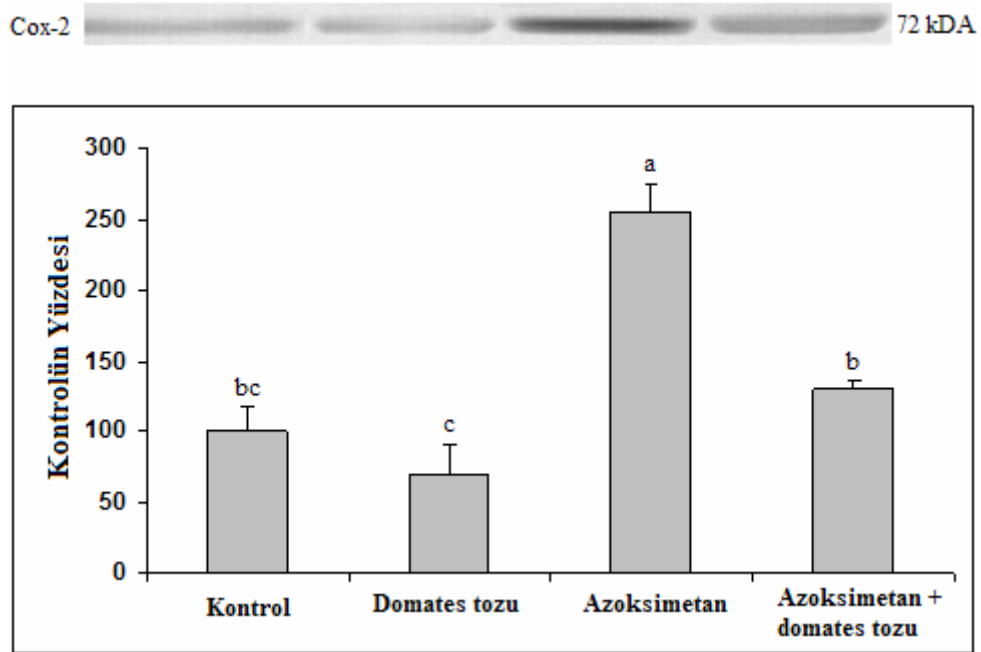


1 2 3 4 5 1 2 3 4 5

Şekil 33. Farklı sürelerde jelde yürütülmüş ve farklı miktarlarda DNA örneği yüklenmiş agaroz DNA jel görüntüleri, kontrol grubu ve deney grubu ratlarda hücresel DNA hasarı görüntüsü.
Hatlar: (1) marker; (2) Kontrol; (3) DT, pozitif kontrol; (4) AOM; (5) AOM + DT.

Farklı sürelerde yürütülen ve farklı miktarlarda DNA örneği yüklenmiş şekil 31, 32, ve 33'de görülen resimlerdeki amaç, farklı süre ve miktarın agaroz jeldeki görüntü durumlarını nasıl etkilediğini tespit etmektir.

4.1.7. Cox-2 Enzim Ekspresyon Düzeyleri

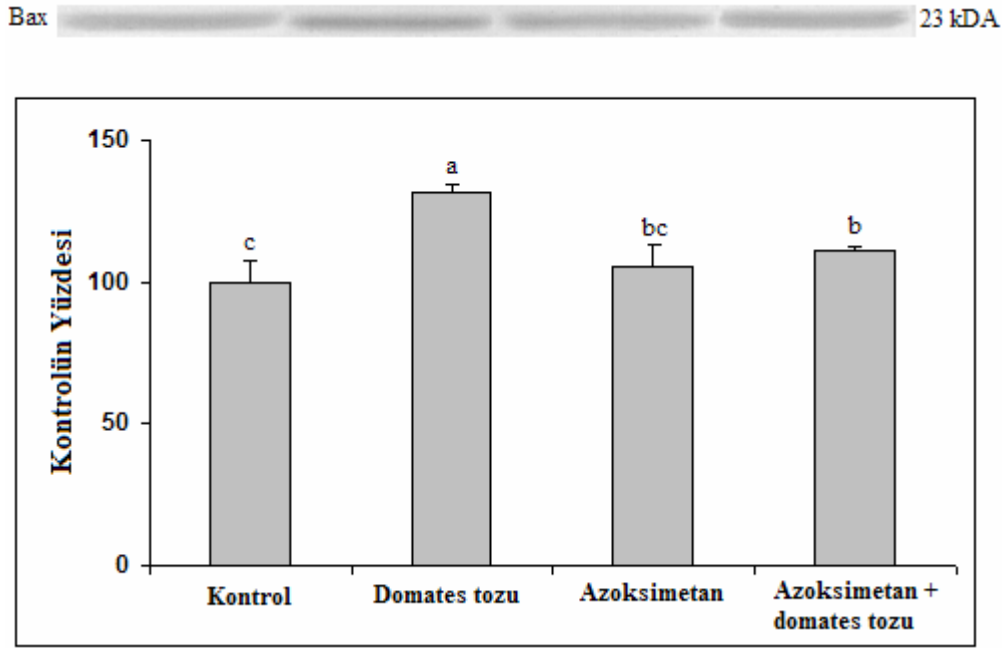


Şekil 34. Gruplara göre cox-2 enzim ekspresyon düzeyleri

a-c: Farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p < 0.05$).
ANOVA *Post hoc* Duncan Testi

Yaptığımız Western blotlama tekniği sonucunda şekil 34'e bakıldığında azoksimetan grubu ve DT verilen azoksimetan grubu arasında cox-2 enzim ekspresyon düzeyi bakımından istatistiksel açıdan önemli bir fark vardır ($p<0.05$). DT verilen kanserli grupta cox-2 enzim ekspresyon düzeyi, DT verilmeyen kanserli gruba göre daha düşük bulunmuştur. Bu da bize likopenin özellikle cox-2 enzim inhibitörlerini harekete geçirerek kanserli hücrelerin gelişimi ve yayılmasında etkili olan cox-2 enziminin aktivitesini azaltabileceğini göstermektedir. Bu enzimin aktivitesinin azalması da kolorektal kanser hücrelerinin gelişimini ve yayılımını da böylece yavaşlatabilmektedir (Strillacci vd., 2008).

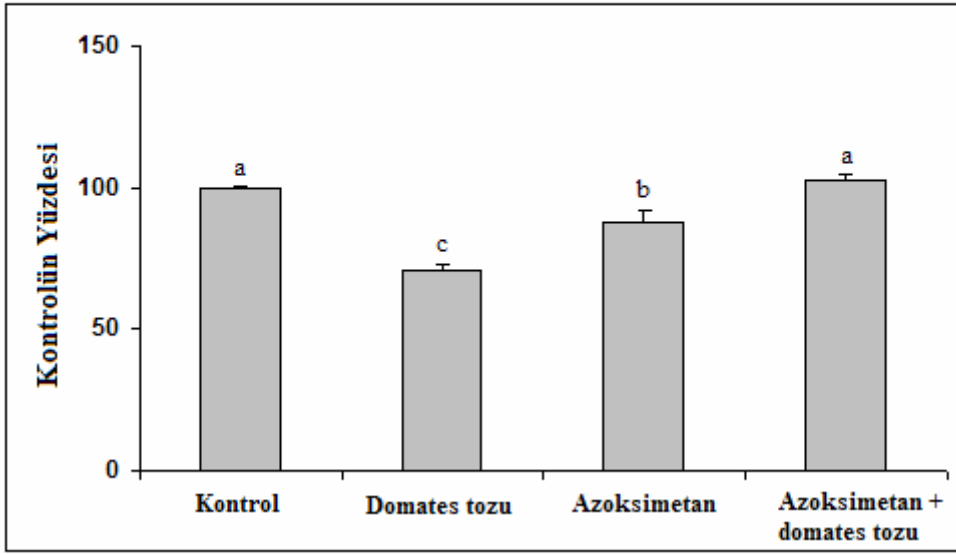
4.1.8. Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2, p53 Proteinlerinin Ekspresyon Düzeyleri (Apoptotik Markerlar)



Şekil 35. Gruplara göre bax protein ekspresyon düzeyleri

a-c: Farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p<0.05$).
ANOVA *Post hoc* Duncan Testi

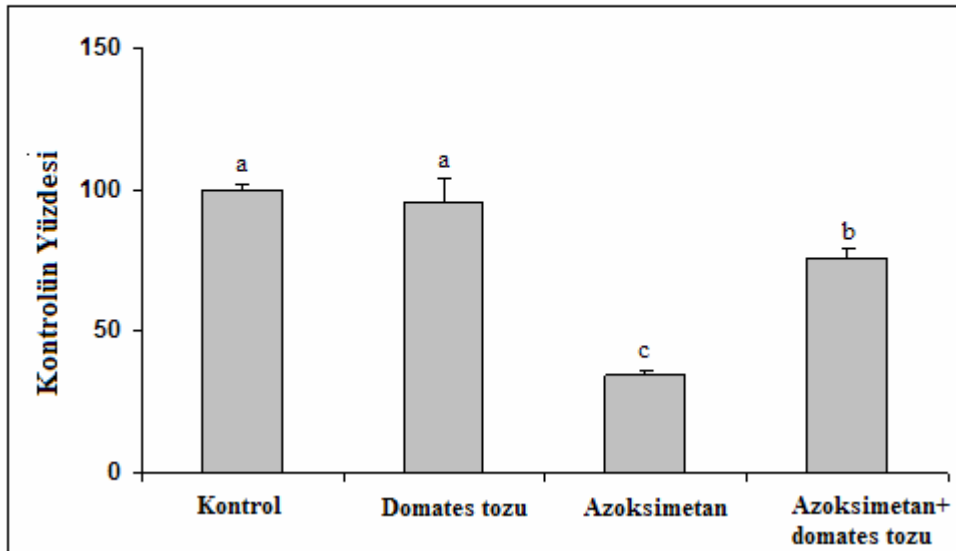
Bcl-2 28 kDA



Şekil 36. Gruplara göre bcl-2 protein ekspresyon düzeyleri

a-c: Farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p < 0.05$).
ANOVA *Post hoc* Duncan Testi

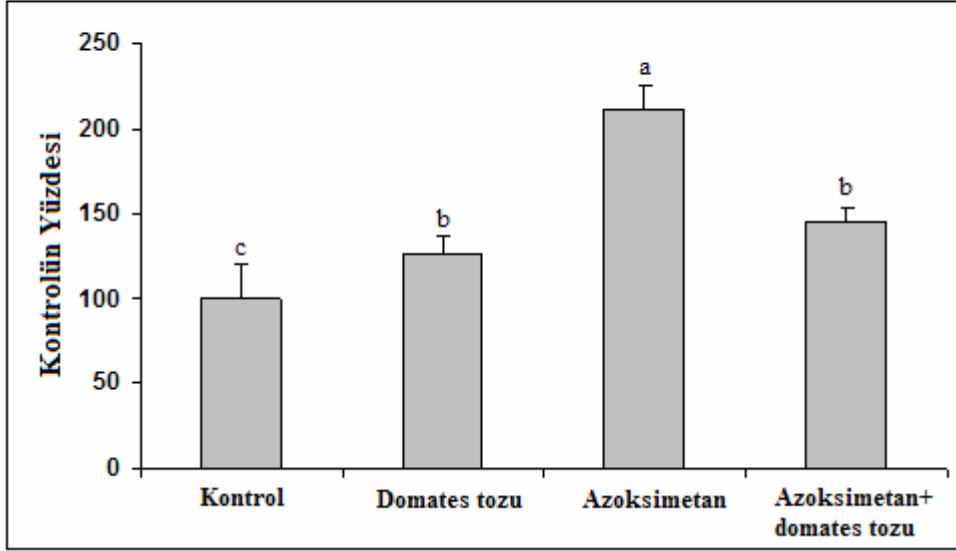
Kaspaz-3 32 kDA



Şekil 37. Gruplara göre kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyleri

a-c: Farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p < 0.05$).
ANOVA *Post hoc* Duncan Testi

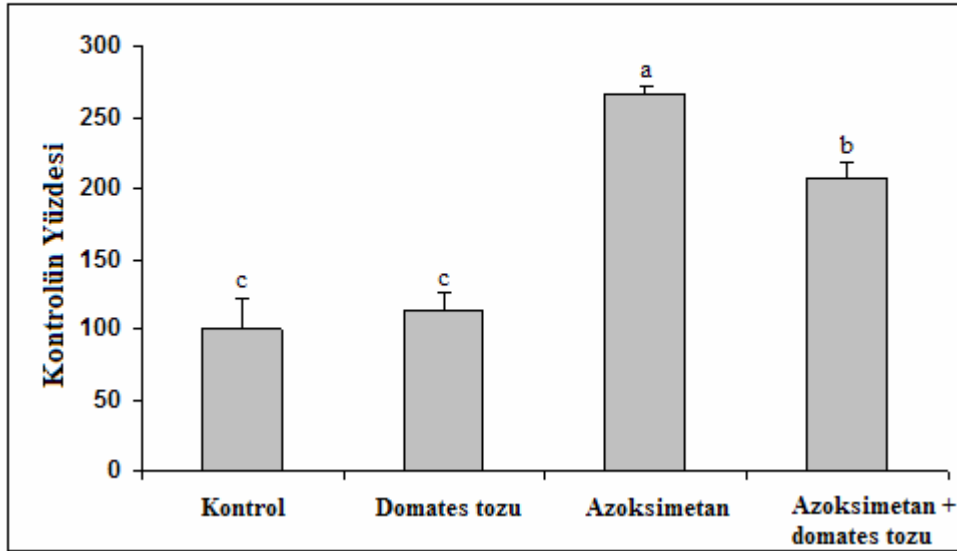
Kaspaz-9  36 kDA



Şekil 38. Gruplara göre kaspaz-9 protein ekspresyon düzeyleri

a-c: Farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p < 0.05$).
ANOVA *Post hoc* Duncan Testi

p53  53 kDA



Şekil 39. Gruplara göre p53 protein ekspresyon düzeyleri

a-c: Farklı harfi taşıyan gruplar arası fark önemlidir ($p < 0.05$).
ANOVA *Post hoc* Duncan Testi

Bölüm 4.1.8 de, hücre ölüm mekanizması basamaklarında yer alan proteinlerin ekspresyon düzeyleri görülmektedir. Şekil 35'e bakıldığında, Bax proteininin ekspresyon düzeyi, azoksimetan kanser grubu ve DT verilen kanserli grup arasında istatistiksel açıdan bir fark göstermemiştir ($p>0.05$). Fakat DT ve kontrol grubu arasında ise fark görülmüştür ($p<0.05$). Özellikle DT verilen normal grupta ekspresyon düzeyi daha yüksek bulunmuştur. Şekil 36'ya bakıldığında özellikle kanserli dokularda antiapoptotik etki gösteren bcl-2 protein ekspresyon düzeyi, azoksimetan grubu ve DT verilen azoksimetan grubu arasında istatistiksel açıdan fark göstermiştir ($p<0.05$). DT verilen kanserli gruptaki bcl-2 protein ekspresyon düzeyi, kanser grubuna göre fazladır, normalde bcl-2 ekspresyonunun azoksimetan verilen grupta fazla olması beklenmekteydi. Şekil 37'ye bakıldığında apoptotik bir protein olan kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyi azoksimetan grubu ve DT verilen azoksimetan grubu arasında istatistiksel açıdan fark göstermiştir ($p<0.05$). Azoksimetan grubuna göre bu protein, DT verilen azoksimetan grubunda daha fazla miktarda bulunmuştur. Buna bağlı olarak bu proteinin DT verilen azoksimetan grubunda yüksek bulunması likopenin, bu proteinlerin sentezini arttırıcı yönde etki gösterdiğini söyleyebiliriz.

Şekil 38'e bakıldığında, apoptotik bir protein olan kaspaz-9 ekspresyon düzeyi azoksimetan grubu ve DT verilen azoksimetan grubu arasında istatistiksel açıdan fark göstermiştir ($p<0.05$), fakat bu defa azoksimetan grubunda DT verilen azoksimetan grubuna göre ekspresyon düzeyi daha fazla bulunmuştur. DT verilen azoksimetan grubunda ise bu proteinin ekspresyon düzeyi normal kontrol grubuna göre daha fazla bulunmuştur. Şekil 39'a bakıldığında tümör baskılayıcı gen olarak bilinen p53 gen ürünü olan p53 protein ekspresyon düzeyi kontrol grubu ve DT verilen azoksimetan grubu arasında istatistiksel açıdan fark göstermiştir ($p<0.05$). Ekspresyon düzeyi kontrole göre bu grupta daha fazladır. Azoksimetan grubu ve DT verilen azoksimetan grubu arasında p53 protein ekspresyon düzeyi istatistiksel açıdan fark göstermiştir ($p<0.05$), fakat azoksimetan grubunda bu değer DT verilen azoksimetan grubuna göre daha fazla bulunmuştur.

4.2. TARTIŞMA

Yapılan çalışmalarda, karotenoidlerin, vitaminlerin (vitamin E, C) antioksidan olarak hastalıklar üzerinde oldukça etkili oldukları, özellikle kalp hastalıklarında, karaciğer, akciğer, beyin ve kolon kanseri üzerinde koruyucu etkilerinin olduğu belirtilmiştir (Seren vd., 2008; Du vd., 2009; Murillo vd., 2010; Sahin vd., 2010b).

Sahin ve ark.'na göre, likopen, oksidatif strese karşı DNA hasarını azaltmakta, reaktif oksijen türlerine karşı cisplatin-DNA etkileşimini önlemektedir (Sahin vd., 2010b).

Ferreira ve ark.'ı, doksorubisin ile ratlarda oluşturdukları oksidatif stres durumunda, domates ve oleoresin karışımının rat kalp hücrelerinde DNA hasar oranını düşürdüğünü tespit etmişlerdir (Ferreira vd., 2007). Moreira ve ark.'ı diyeteye ilave edilen domates tozunun ratlarda oksidatif hasarı düşürdüğünü belirtmişlerdir (Moreira vd., 2005).

Ferreira ve ark.'ı, provitamin A karotenoidlerinden örneğin β -karoten, provitamin A olmayan karotenoidlerden örneğin, kantaksantin, astaksantin (AST) ve likopenin, neoplastik transformasyonları (değişimleri) önlediğini, likopen ve diğer oksidatif metabolitlerin kültüre edilmiş insan prostat kanser hücrelerinin çoğalmasını yavaşlattığını belirtmişler, bunun aksine likopen ve metabolitlerinin insan foreskin fibroblast Hs68 hücrelerinde ise oksidatif DNA hasarını arttırabileceğini vurgulamışlardır, fakat hangi dozlarda bu etkinin gerçekleşeceği yeterince açıklanmamıştır (Ferreira vd., 2004). Bizim bulgularımıza göre, ratlara azoksimetan verilerek oluşturulan kolorektal kanserde, domates tozu (DT) verilen kanserli grupta DT verilmeyen kanserli gruba göre, DNA agaroz jel elektroforezi görüntülerimize bakıldığında (şekil 30), iki grup arasında DNA da kırıklar oluşması yönünden bir fark olduğu görüldü. Özellikle DT verilen kanserli grupta DNA kırıkları normal kanserli gruba göre daha azdır, bu farklılık da, domates tozunda bulunan likopenin, kanserli hücrelerdeki DNA hasarını kısmen de olsa önleyebileceğini düşündürmektedir.

Tang ve ark.'ı, likopen ile verilen eikosa pentaenoik asit (EPA)'nın insan kolon kanseri hücrelerinin ilerlemesini ve çoğalmasını azalttığını belirtmişlerdir (Tang vd., 2009).

Salman ve ark.'ı, likopenin insan kolon kanseri, myeloid lösemi, lenfoma hücrelerinin çoğalmasını azalttığını belirtmişlerdir (Salman, 2007).

İtalya'da 1225 kolon kanserli ve 728 rektum kanserli hasta üzerinde yapılan çalışmalarda domates tüketiminin kolorektal kanser sürecinde bir azalma trendi başlattığı belirtilmiştir (Franceschi vd., 1997).

Almanya'da yapılan bir çalışmada, plazmada 70µg/l likopen konsantrasyonunda kolorektal kanser sürecinde adenokarsinom polip sayısında bölgesel gerileme olduğu belirtilmiştir (Erhardt vd., 2003).

Bizim bulgularımızda, azoksimetan verilen kanser grubunda 15 hayvandan 8'inde adenokarsinom tespit edilmiş, 3 tanesinde de orta derecede displazi gelişmiştir. Azoksimetan ve DT verilen grupta; 15 hayvandan 2 tanesinde adenokarsinom, 2 tanesinde ağır şiddetli displazi, 3 tanesinde de orta derecede displazi görüldü. Bu bağlamda displazi açısından değerlendirme yaptığımızda bu veriler de göstermektedir ki, DT verilen kanserli grupta kanserli gruba göre, displazi oranı fazla iken, adenokarsinom oranı düşüktür ($p<0.05$). Dolayısı ile DT'nda bulunan likopenin tamamen tümörleşecek hücrelerin mekanizmasını önleyerek displazi aşamasında kalarak daha ileri aşamaya gitmesini önleyebileceğini söyleyebiliriz.

Dias ve ark.'ı, azoksimetan verilen kolon kanser grubunda likopenin önemli ölçüde kontrole göre ACF oranını düşürdüğünü belirtmişlerdir (Dias vd., 2010). Bizim bulgularımıza göre, kanserli dokuda ve likopen verilen kanserli gruplarda ACF oranları farklı bulunmuştur ($p<0.05$). Kanserli grupta fazla oranda ACF tespit edilmişken likopen verilen kanserli grupta bu oran daha düşük bulunmuştur (şekil 25). Dolayısı ile buna bağlı olarak, likopenin tümör gelişimini ve oluşumunu önleyebileceğini ve tümöral hücre başlangıcı olarak kabul edilen ACF oranını azaltabileceğini söyleyebiliriz.

Yapılan başka bir çalışmada erkek fischer 344 ratlarda azoksimetanla oluşturulan kolorektal kanserde karotenoidlerle tedavinin erken evrede ACF oluşumunu önlediği, fakat ileri evrede çok fazla etkili olmadığı bildirilmiştir (Wargovich vd., 2000; Dias vd., 2010).

Kim ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, ileri evrede likopen ile tedavinin, erkek B6C3F1 farelerde dimetilhidrazin ile oluşturulmuş kolorektal kanserde, ACF oranını azaltmada diğer karotenoidlere nazaran daha zayıf olduğu belirtilmiştir (Kim vd., 1998). Bunun tersine dişi Sprague Dawley ratlarda likopen ile tedavinin geç evrede ACF gelişimini azalttığı belirtilmiştir (Dias vd., 2010). Yapılan başka bir çalışmada, diyetle alınan likopenin (300mg/kg) erken evrede erkek Wistar ratlarda ACF gelişimini azalttığı bildirilmiştir (Wargovich vd., 2000; Erhardt vd., 2003; Dias vd., 2010).

Sengupta ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, erkek Sprague Dawley ratlarda, diyetle alınan likopenin, kolorektal kanserli dokularda ACF oranını düşürdüğü belirtilmiştir (Sengupta vd., 2004).

Yapılan *in vitro* çalışmalarda karotenoidler ve likopenin büyük oranda serbest radikal temizleyicisi olduğu belirtilmiştir (Sahin, 2010b). Ayrıca likopenin, DNA demetilasyonu ile gen ekspresyonu üzerinde de etkili olduğu vurgulanmıştır (Batoon vd., 2008; Dias vd., 2010). Bu nedenle likopen, gen tamir mekanizması ile anti mutajenik etki ve serbest radikal temizleyici olarak da farklı işlevler üstlenmektedir (Dias vd., 2010).

Palozza ve ark.'nın yaptığı çalışmada, kolon kanserli hücrelerde domates verilen grupta kanserli gruba göre bir antiapoptotik protein olan bcl-2 ekspresyon düzeyi düşük bulunmuştur, fakat bax protein ekspresyonunda önemli bir değişiklik olmamıştır. Bu araştırmacılara göre, proapoptotik bir protein olan bcl-2 sentezi domates tüketimine bağlı olarak düşüş göstermiş ve kanserli hücrelerde apoptozis gerçekleşmiştir (Palozza vd., 2009).

Palozza ve ark.'ı, 72 saat likopen ve tütün ile muamale edilen insan fibroplast hücrelerinde apoptozis üzerinde, bax, ekspresyonunun kontrole göre arttığını, bcl-2 ekspresyonunun ise düşüş gösterdiğini tespit etmişlerdir (Palozza, 2005). Fakat bizim bulgularımızda DT verilen kanserli grup ile kanserli grup arasında bax protein oranında bir değişiklik gözlenmemiştir.

Talvas ve ark.'ı, domates tüketiminin prostat kanserli hücrelerde, bax ekspresyonunu arttırdığı, bcl-2 ekspresyonunu ise azalttığını belirtmişlerdir (Talvas vd., 2010).

Kim ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, kolon kanserli hücrelerde resvaratrol ve kaspaisin verilen gruplarda kontrole göre bcl-2 protein sentezinin azaldığı, bax protein sentezinde önemli bir değişiklik olmadığı belirtilmiştir (Kim vd., 2009). Fakat bizim bulgularımızda, DT verilen kanserli grupta bcl-2 oranı kanserli gruba göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Kolorektal kanserlerde likopen-bcl-2 ekspresyonu ilişkisi ile ilgili az sayıda kaynağa ulaşılmıştır, bakılan literatürlerde de özellikle likopene bağlı olarak kolorektal kanserli grupta bcl-2 sentezinin azaldığı belirtilmiştir (Palozza vd., 2009). Aksine bizim bulgularımızda DT verilen kanserli grupta bcl-2 sentez oranı kanserli gruba göre fazla bulunmuştur ($p<0.05$). Palozza ve ark.'ı, β -karotenin, hücre gelişim oranını arttırdığını, kaspaz-3 aktivitesinin de karoten verilen grupta arttığını vurgulamışlardır (Palozza vd., 2009).

Liu ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada Çin'de antikanser etkisi olan Tian Xian Liquid (TXL) ilacının, kolon kanseri hücreleri üzerinde etkisi araştırılırken; bu ilacın, kontrole göre apoptozisi indükleyerek, bcl-2/bax oranını düşürdüğü, sitokrom c nin mitokondri membranından serbest hale gelmesini sağlayarak kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün aktivitesini arttırdığı belirtilmiştir (Liu vd., 2010).

Liu ve ark.'ı, ratlarda akciğerli kanserli dokularda likopenin kontrole göre belirgin oranda kaspaz-3 ekspresyonunu arttırdığını belirtmişlerdir (Liu vd., 2003). Zhang ve ark.'ı insan lösemi HL-60 hücrelerinde, likopen ile muamele edilen kültür hücrelerinde kontrole göre kanserli hücrelerde kaspaz-9 ekspresyonunun arttığını, bax ekspresyonunda ise kontrole göre önemli bir değişiklik olmadığı, bcl-2 ekspresyonunun kontrole göre kanserli hücrelerde düşüş gösterdiğini vurgulamışlardır (Zhang vd., 2003). Bizim bulgularımızda, DT verilen kolorektal dokularda kanserli dokulara göre beklenenin aksine kaspaz-9 ekspresyon düzeyi daha düşük bulunmuştur.

Sengupta ve ark.'ı, erkek Sprague Dawley ratlarda, azoksimetan verilerek oluşturulan kolorektal kanserde, domates verilen kolorektal rat kolon dokusunda, domates verilmeyen kolorektal kanserli dokulara göre, cox-2 ekspresyon düzeyinin belirgin oranlarda azaldığını belirtmişlerdir. Domates verilmeyen kolorektal dokularda, cox-2 artışına bağlı olarak da PGE₂ düzeyi artmakta ve böylece tümoral hücre gelişimi, bu dokularda büyük oranda teşvik edilmektedir (Sengupta vd., 2004).

Chan ve ark.'ı, insan prostat kanserinde likopenin, kanserli dokularda cox-2 ekspresyonunu büyük oranda düşürdüğünü belirtmişlerdir (Chan vd., 2011).

Nagendraprabhu ve Sudhandiran'ın yaptığı bir çalışmada astaksantin maddesinin verildiği kanserli grupta, kanserli kontrol grubuna göre cox-2 enziminin ekspresyon düzeyinin azaldığı görülmüştür. cox-2 enzimi herhangi bir yangı durumunda indüklenerek kolorektal adenom karsinomda büyük oranda sentezlenmektedir. Bu enzimin etki mekanizmalarından olan prostaglandinler, hücre büyümesini, anjiyogenesisi, apoptozisi vb. basamakları değiştirerek kansere neden olmaktadır. Yapılan bu çalışmada dimetilhidrazin verilerek oluşturulan kolorektal kanserde cox-2 enziminin, büyük oranda sentezinin arttığı görülmüştür. Böylece hücreler arası serbest araşidonik asit miktarı düşmüştür ve apoptozis önlenerek kanser gelişim sürecinin hızlandığı görülmüştür. AST verilen kanserli grupta ise kontrole göre, cox-2 enzim ekspresyon düzeyi büyük oranda önlenmiştir, böylece hücrelerdeki serbest araşidonik asit miktarı artmıştır ve kanser gelişimi baskılanmıştır (Nagendraprabhu ve Sudhandiran, 2011).

Bonvissuto ve ark.'ı, rat prostat kanserli hücrelerinde likopenin, cox-2 ekspresyonunu düşürdüğünü belirtmişlerdir (Bonvissuto vd., 2011).

Rafi ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, nitrik oksit ile muamele edilmiş ratların makrofaj hücrelerinde, 2,5-10µM likopen oranlarının cox-2 ekspresyonu üzerinde bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir (Rafi vd., 2007).

Shimizu ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, EGCG (epigallokateşin-3-gallat) verilen kolorektal kanserli dokularda kanserli gruba göre belirgin oranda cox-2 enzim ekspresyon düzeyinin düşük olduğu görülmüştür (Shimizu vd., 2008).

Talvas ve ark.'ı, diyetle alınan domateste bulunan likopenin insan prostat kanserli hücrelerde p53 ekspresyonunu düşürdüğünü belirtmişlerdir (Talvas vd., 2010).

Dias ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, ratlarda diyetle alınan likopenin, kolorektal kanserli hücrelerde kontrole göre p53 ekspresyonunu azalttığını bildirmişlerdir (Dias vd., 2010).

Palozza ve ark.'ı, likopenin, fibroplast hücrelerde apoptozisi tetiklediğini belirtmişlerdir, likopenin özellikle tütün bitkisi ile alındığında p53 ekspresyonunu kontrole göre düşürdüğünü vurgulamışlardır (Palozza, 2005). Bizim bulgularımızda da literatürlere paralel olarak DT verilen kanserli grupta p53 ekspresyon düzeyi, kanserli gruba göre daha düşük bulunmuştur. Cox-2 enzim ekspresyon düzeyinin ise, DT verilen kolorektal kanserli dokularda kanserli gruba göre belirgin oranda düşük olduğu görülmüştür. Bu da bize likopenin, cox-2 enzim inhibitörlerini harekete geçirerek kanserli hücrelerin gelişimi ve yayılmasında etkili olan cox-2 enzim aktivitesini azaltabileceğini göstermektedir.

Thakur ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada kolon kanserli dokularda EGCG verilen grupta p53 protein ekspresyon düzeyinin kanserli gruba göre arttığı gözlenmiştir (Thakur vd., 2010).

Park ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada yeşil çay ile muamele edilen kolon kanseri hücrelerinde kontrole göre cox-2 enzim sentezinin azaldığı görülmüş, bu çalışmada yeşil çay verilen kanserli grupta kanserli gruba göre p53 protein ekspresyon düzeyinin arttığı görülmüştür (Park vd., 2009).

Bölüm 4.2.'de ifade edilen çalışmalarda görüldüğü gibi özellikle kolorektal tümörlü dokularda cox-2 enzimi ve antiapoptotik bcl-2 protein miktarı artış göstermektedir. DT verilen kanserli gruplarda ise apoptotik proteinlerden, kaspaz-3, kaspaz-9, bax ekspresyonları kontrole göre artış gösterirken, p53 ekspresyonu DT verilen gruplarda azalış göstermektedir. Fakat bizim bulgularımızda kolorektal kanserli grupta, kaspaz-9

proteini DT verilen kanserli gruba göre aksine daha fazla bulundu. Bcl-2 protein miktarı ise DT verilen kanserli grupta, kanserli gruba göre aksine daha yüksek bulundu ($p<0.05$).

Bu tez çalışmasında elde ettiğimiz bulgular literatürlerle çoğunlukla paralellik göstermektedir. Azoksimetan vererek oluşturduğumuz kolorektal kanserli dokularda cox-2 enzim ekspresyonu, DT verilen kanserli gruplarda DT verilmeyen kanserli gruba göre azalmıştır, bcl-2 protein ekspresyon düzeyi, DT verilen kanserli grupta DT verilmeyen kanser grubuna göre fazla bulunmuştur ($p<0.05$). Kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyi, DT verilen kanserli grupta DT verilmeyen kanserli gruba göre fazla bulunmuştur ($p<0.05$). P53, kaspaz-9, protein ekspresyon düzeyleri, DT verilen kanserli grupta DT verilmeyen kanserli gruba göre düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Bax protein ekspresyon düzeyi, DT verilen kanserli grupta ve DT verilmeyen kanserli grup arasında fark göstermemiştir ($p>0.05$). DNA hasarı açısından, DT verilen kolorektal kanserli grupta, kanserli gruba göre DNA da daha az kırıkların oluştuğu görülmüştür. Buna bağlı olarak da domates tozunda bulunan likopenin kolorektal kanserli hücrelerde DNA hasarını azaltabileceği kanısına varıldı. Ayrıca DT verilen kanserli grupta, kanserli gruba göre daha az oranda ACF oluşumu tespit edilmiş, DT verilen kanserli grupta, kanserli gruba göre adenokarsinom sayısı daha az görülmüştür ($p<0.05$). Bu sonuçlar da göstermektedir ki kolorektal karsinomda likopen alınması, kanser hücre gelişim oranını azaltabilmekte, hücrelerin yayılımını yavaşlatabilmekte ve hücrelerin daha ileri aşamalara kadar ilerlemesini kısıtlayarak belli bir safhada kalmasını sağlayabilmektedir. Apoptotik süreçte önemli olan markerların sentez oranları da kanserli dokularda apoptozis sürecinin değerlendirilmesinde bir fikir kaynağı olmaktadır. Bulgularımız da göstermektedir ki, domates tozu, apoptozis sürecinin başlamasında ilgili proteinlerin sentezini teşvik ederek kolorektal kanserli hücrelerde apoptozisin büyük oranda gerçekleşmesine katkıda bulunmaktadır.

5. SONUÇ

Analiz sonuçlarımıza göre, domates tozunda bulunan likopen, özellikle kanser sürecinde kolorektal kanserli dokularda tümör aktivitesini azaltabilmekte, tümöral hücrelerin yayılımını yavaşlatabilmekte ve bu hücrelerin daha ileriki aşamalara kadar giderek tamamen tümöre dönüşme mekanizmasını kısmen de olsa önleyebilmektedir (Sahin vd., 2007; Seren, 2008). Hücrelerde oluşan DNA hasarını yine belirli oranlarda düşürebilmektedir (Campbell vd., 2007; Sahin vd., 2008a; Seren vd., 2008). Apoptozisten sorumlu proteinlerin sentezini tetikleyerek bu sürecin başlamasında itici gücü oluşturmakta, böylece kolorektal kanserli hücrelerin apoptozise uğrayarak yok olmalarına büyük oranda katkıda bulunmaktadır (Palozza vd., 2009). Kanserli dokularda adenokarsinom oluşumunu önleyerek, displazi sayısının artışı sağlanmakta böylece hücrenin, adenokarsinom safhasına geçişini engelleyerek displazi aşamasında kalmasını teşvik etmektedir. Özellikle kolorektal kanserli dokularda kanserin oluştuğunun bir işareti olan ACF oranını da büyük oranda azaltarak kanserli dokularda kanserleşme sürecinde bir yavaşlama trendine katkıda bulunmaktadır (Dias vd., 2010).

Kolorektal kanserli dokularda kanserli hücrelerin gelişimi ve yayılım (metastaz) potansiyellerinde önemli bir enzim olan cox-2 ekspresyon düzeylerine bakıldığında (Baek, 2006; Sade vd., 2011) domates tozundaki likopene bağlı olarak DT verilen kanserli grupta, kanser grubuna göre cox-2 ekspresyonu düşüş göstermiştir ($p < 0.05$). Bu enzimin düşüş göstermesi de diyetle alınan domates tozundaki likopene bağlı olarak kolorektal kanserde bir gerileme trendinin olabileceğinin bir göstergesidir. Elde ettiğimiz bu bulguların, bu bilgiler ışığında değerlendirilerek özellikle kolorektal kanserden korunmanın alternatifleri arasında likopence zengin domates ve domates ürünleri, ayrıca likopen içerikli gıdaların sürekli ve düzenli bir şekilde tüketilmesi gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abedin, M.J., Wang, D., McDonnell, M.A., Lehmann, U., Kelekar, A.,** 2007, Autophagy Delays Apoptotic Death in Breast Cancer Cells Following DNA Damage, *Cell Death and Differentiation*, **14**, 500-510.
- Alshatwi, A.A., Obaaid, M.A.A., Al Sedairy, S.A., Al-Assaf, A.H., Zhang, J.J., Lei, K.Y.,** 2010, Tomato Powder is More Protective Than Lycopene Supplement Against Lipid Peroxidation in Rats, *Nutrition Research*, **30**, 66-73.
- American Cancer Society.,** Cancer Facts and Figs, 2008, Atlanta: American Cancer Society.
- Anthon, G.E., Strange, M.L., Barrett, D.M.,** 2011, Changes in Ph, Acids, Sugars and Other Quality Parameters During Extended Vine Holding of Ripe Processing Tomatoes, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **91**, 1175-1181.
- Baek, S.J., Eling, T.E.,** 2006, Changes in Gene Expression Contribute to Cancer Prevention by Cox Inhibitors, *Progress in Lipid Research*, **45**, 1-16.
- Batoon, A.K., Leszczynska, J.M., Klein, C.B.,** 2008, Modulation of Gene Methylation by Genistein or Lycopene in Breast Cancer Cells, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **49**, 36-45.
- Baydas, G., Reiter, R.J., Akbulut, M., Tuzcu, M., Tamer, S.,** 2005, Melatonin Inhibits Neural Apoptosis Induced by Homocysteine in Hippocampus of Rats via Inhibition of Cytochrome C Translocation and Caspase-3 Activation and by Regulating Pro- and Anti-Apoptotic Protein Levels, *Neuroscience*, **135**, 879-886.
- Benherlal, P.S., Arumughan, C.,** 2008, Studies on Modulation of DNA Integrity in Fenton's System by Phytochemicals, *Mutation Research*, **648**, 1-8.
- Bertram, J.S., Pung, A., Churley. M.,** 1991, Diverse Carotenoids Protect Against Chemically Induced Neoplastic Transformation, *Carcinogenesis*, **12**, 671-678.
- Bertram, J.S.,** 1999, Carotenoids and Gene Regulation, *Nutrition Review.*, **57**, 182-191.
- Bhuvaneshwaria, V., Velmurugana, B., Balasenthila, S., Ramachandranb, C.R., Naginia, S.,** 2001, Chemopreventive Efficacy of Lycopene on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-Induced Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis, *Fitoterapia*, **72**, 865-874.

- Bissahoyo, A., Pearsall, R.S., Hanlon, K., Amann, V., Hicks, D., Godfrey, V.L., Threadgill, D.V.,** 2005, Azoxymethane Is a Genetic Background-Dependent Colorectal Tumor Initiator and Promoter in Mice: Effects of Dose, Route, and Diet, *Toxicological Sciences*, **88**, 340-345.
- Boateng, J., Verghese, M., Chawan, C.B., Shackelford, L., Walker, L.T., Khatiwada, J., Williams, D.S.,** 2006, Red Palm Oil Suppresses The Formation of Azoxymethane (AOM) Induced Aberrant Crypt Foci (ACF) in Fisher 344 Male Rats, *Food and Chemical Toxicology*, **44**, 1667-1673.
- Bonvissuto, G., Minutoli, L., Morgia, G., Bitto, A., Polito, F., Irrera, N., Marini, H., Squadrito, F., Altavilla, D.,** 2011, Effect of *Serenoa Repens*, Lycopene, and Selenium on Proinflammatory Phenotype Activation: An *in vitro* and *in vivo* Comparison Study, *Urology*, **77**, 248.e9-248.e16.
- Borinstein, S.C., Conerly, M., Dzieciatkowski, S., Biswas, S., Washington, M.K., Trobridge, P., Henikoff, S., Grady, W.M,** 2010, Aberrant DNA Methylation Occurs in Colon Neoplasms Arising in the Azoxymethane Colon Cancer Model, *Molecular Carcinogenesis*, **49**, 94-103.
- Bramley, P.M.,** 2000, Is Lycopene Beneficial to Human Health?, *Phytochemistry*, **54**, 233-236.
- Breemen, R.B., Pajkovic, N.,** 2008, Multitargeted Therapy of Cancer by Lycopene, *Cancer Letters*, **269**, 339-351.
- Campbell, J.K., Engelmann, N.J., Lila, M.A., John W. Erdman, J.V.,** 2007, Phytoene, Phytofluene, and Lycopene from Tomato Powder Differentially Accumulate in Tissues of Male Fisher 344 Rats, *Nutrition Research*, **27**, 794-801.
- Chan, J.M., Weinberg, V., Magbanua, M.J., Sosa, E., Simko, J., Shinohara, K., Federman, S., Mattie, M., Fulford, M.H., Haqq, C., Carroll, P.R.,** 2011, Nutritional Supplements, Cox-2 and IGF-1 Expression in Men on Active Surveillance for Prostate Cancer, *Cancer Causes Control*, **22**, 141-150.
- Charoensiri, R., Kongkachuichai, R., Suknicom, S., Sungpuag, P.,** 2009, Beta-carotene, Lycopene, and Alpha-tocopherol Contents of Selected Thai fruits, *Food Chemistry*, **113**, 202-207.
- Chen, S.C., Pelletier, D.B., Peng, A.,** 1995, Connexin43 Reverses The Phenotype of Transformed Cells and Alters Their Expression of Cyclin/Cyclin-Dependent Kinases, *Cell Growth Differentiation*, **6**, 681-690.

- Chew, B.P., Park, J.S.**, 2004, Carotenoid Action on The Immune Response., *The Journal of Nutrition*, **134**, 257-261.
- Dannenber, A.J., Altorki, N.K., Boyle, J.O., Dang, C., Howe, L.R., Weksler, B.B., Subbaramaiah, K.**, 2001, Cyclo-Oxygenase 2: A Pharmacological Target for The Prevention of Cancer, *The Lancet Oncology*, **2**, 544-551.
- Delker, D.A., Wang, Q.S., Papanikolaou, A., Whiteley, H.E., Rosenberg, D.W.**, 1999, Quantitative Assessment of Azoxymethane-Induced Aberrant Crypt Foci in Inbred Mice, *Experimental and Molecular Pathology*, **65**, 141-149.
- Değertekin, H., Sarı, Y., Arslan, A., Akgül, Y., Büyükbayram, H.**, 1999, Age and Sex Distribution of Colorectal Carcinoma in The Southeast of Turkey, *The Turkish Journal of Gastroenterology*, **10**, 153-156.
- Dias, M.C., Vieiralves, N.F.L., Gomes, M.I.F.V., Salvadori, D.M.F., Rodrigues, M.A.M., Luis F. Barbisan, L.F.**, 2010, Effects of Lycopene, Synbiotic and Their Association on Early Biomarkers of Rat Colon Carcinogenesis, *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 772-780.
- Dilsiz, N.**, 2004, Moleküler Biyoloji, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Dogukan, A., Tuzcu, M., Agca, C.A., Gencoglu, H., Sahin, N., Onderci, M., Ozercan, İ.H., İlhan, N., Kucuk, O., Sahin, K.**, 2011, A Tomato Lycopene Complex Protects the Kidney from Cisplatin-Induced Injury via Affecting Oxidative Stress as well as Bax, Bcl-2 and HSPs Expression, *Nutrition and Cancer*, (Epub ahead of print).
- Du, G., Li, M., Ma, F., Liang, D.**, 2009, Antioxidant Capacity and The Relationship with Polyphenol and Vitamin C in Actinidia fruits, *Food Chemistry*, **113**, 557-562.
- Elumalai, P., Krishnamoorthy, G., Selvakumar, K., Arunkumar, R., Venkataraman, P., Arunakaran, J.**, 2008, Studies on The Protective Role of Lycopene Against Polychlorinated Biphenyls (Aroclor 1254)-Induced Changes in Star Protein and Cytochrome P450 Scc Enzyme Expression on Leydig Cells of Adult Rats, *Reproductive Toxicology*, **27**, 41-45.
- Erhardt, J.G., Meisner, C., Bode, J.C.**, 2003, Lycopene, Beta-Carotene and Colorectal Adenomas, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **78**, 1219-1224.
- Ferreira, A.L.A., Yeum, K.J., Russell, R.M., krinsky, N.I., Tang, G.**, 2004, Enzymatic and Oxidative Metabolites of Lycopene, *Journal of Nutritional Biochemistry*, **15**, 493-502.

- Ferreira, A.L.A., Salvadori, D.M.F., Nascimento, M.C.M.O., Rocha, N.S., Correa, C.R., Pereira, E.J., Matsubara, L.S., Matsubara, B.B., Ladeira, M.S.P.,** 2007, Tomato-Oleoresin Supplement Prevents Doxorubicin-Induced Cardiac Myocyte Oxidative DNA Damage in Rats, *Mutation Research*, **631**, 26-35.
- Franceschi, S., Favero, A., La Vecchia C.,** 1997, Food Groups and Risk of Colorectal Cancer in Italy, *International Journal of Cancer*, **72**, 56-61.
- Fraser, A., Haines, S.R., Stuart, E.C., Scandlyn, M.J., Alexander, A., Somers-Edgar, T.J., Rosengren, R.J.,** 2010, Deer Velvet Supplementation Decreases The Grade and Metastasis of Azoxymethane-Induced Colon Cancer in The Male Rat, *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 1288-1292.
- Giovannucci, E.,** 2002, A Review of Epidemiologic Studies of Tomatoes, Lycopene and Prostate Cancer, *Experimental Biology and Medicine*, **227**, 852-859.
- Gius, D., Botero, A., Shah, S.,** 1999, A. Intracellular Oxidation/Reduction Status in The Regulation of Transcription Factors NF-Kappa B and AP-1, *Toxicology Letters.*, **106**, 93-106.
- Guessous, I., Dash, C., Lapin, P., Doroshenk, M., Smith, R.A., Klabunde, C.N.,** 2010, Colorectal Cancer Screening Barriers and Facilitators in Older Persons, *Preventive Medicine*, **50**, 3-10.
- Halpern, M.T., Pavluck, A.L., Ko, C.Y., Ward, E.M.,** 2009, Factors Associated with Colon Cancer Stage at Diagnosis, *Digestive Diseases and Sciences*, **54**, 2680-2693.
- Hazai, E., Bikadi, Z., Zsila, S.,** 2006, Molecular Modeling of The Non-Covalent Binding of The Dietary Tomato Carotenoids Lycopene and Lycophyl, and Selected Oxidative Metabolites with 5-Lipoxygenase, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **14**, 6859-6867.
- Jewell, C., Brien O.N.,** 1999, Effect of Dietary Supplementation with Carotenoids on Xenobiotic Metabolizing Enzymes in The Liver, Lung, Kidney and Small Intestine of The Rat, *The British Journal of Nutrition*, **81**, 235-242.
- Karadas, F., Surai, P., Grammenidis, E., Sparks, N.H.C., Acamovic, T.,** 2006, Supplementation of The Maternal Diet With Tomato Powder and Marigold Extract: Effects on The Antioxidant System of The Developing Quail, *British Poultry Science*, **47**, 200-208.

- Karas, M., Amir, H., Fishman, D.,** 2000, Lycopene Interferes with Cell Cycle Progression and Insulin-like Growth Factor I Signaling in Mammary Cancer Cells, *Nutrition and Cancer*, **36**, 101-111.
- Kim, M.Y., Trudel, L.J., Wogan, G.N.,** 2009, Apoptosis Induced by Capsaicin and Resveratrol in Colon Carcinoma Cells Requires Nitric Oxide Production and Caspase Activation, *Anticancer Research*, **29**, 3733-3740.
- Kim, J.M., Araki, S., Kim, D.J., Park, C.B., Takasuka, N., Baba-Toriyama, H., Ota, T., Nir, Z., Khachik, F., Shimidzu, N., Tanaka, Y., Osawa, T., Uraji, T., Murakoshi, M., Nishino, H., Tsuda, H.,** 1998, Chemopreventive Effects of Carotenoids and Curcumins on Mouse Colon Carcinogenesis after 1,2-Dimethylhydrazine Initiation, *Carcinogenesis*, **19**, 81-85.
- Kucuk, O., Sarkar, F.H., Djuric, Z., Sakr, W., Pollak, M.N., Khachik, F., Banerjee, M., Bertram, J.S., Wood, D.P. Jr.,** 2002, Effects of Lycopene Supplementation in Patients with Localized Prostate Cancer, *Experimental Biology and Medicine*, **227**, 881-885.
- Laemmli, U.K.,** 1970, Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of The Head of Bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
- Leon, M.P., Gregorio, C.D.,** 2001, Pathology of Colorectal Cancer, *Digestive and Liver Disease*, **33**, 372-388.
- Levy, J., Bosin, E., Feldman, B.,** 1995, Lycopene is a More Potent Inhibitor of Human Cancer Cell Proliferation than Either Alpha-carotene or Beta-carotene, *Nutrition and Cancer*, **24**, 257-266.
- Liu, A.G., Volker, S.E., Jeffery, E.H., Erdman, J.W.Jr.,** 2009, Feeding Tomato and Broccoli Powders Enriched with Bioactives Improves Bioactivity Markers in Rats, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 7304-7310.
- Liu, C., Lian, F., Smith, D.E.,** 2003, Lycopene Supplementation Inhibits Lung Squamous Metaplasia and Induces Apoptosis via Up-Regulating Insulin-like Growth Factor-binding Protein 3 in Cigarette Smoke-exposed Ferrets, *Cancer Research*, **63**, 3138-3144.
- Liu, F., Cao, X., Wang, H., Liao, X.,** 2010, Changes of Tomato Powder Qualities During Storage, *Powder Technology*, **204**, 159-166.
- Lüleyap, H.Ü.,** 2008, Moleküler Genetiğin Esasları, Nobel Kitabevi, Ankara.

- Matos, H.R., Mascio, P.D., Medeiros, M.H.G.,** 2000, Protective Effect of Lycopene on Lipid Peroxidation and Oxidative DNA Damage in Cell Culture, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **383**, 56-90.
- Matsushima-Nishiwaki, R., Shidoji, Y., Nishiwaki, S.,** 1995, Suppression by Carotenoids of Microcystin-Induced Morphological Changes in Mouse Hepatocytes, *Lipids*, **30**, 1029-1034.
- Mayne, S.T.,** 1996, Beta-carotene, Carotenoids, and Disease Prevention in Humans, *The Federation of American Societies for Experimental Biology*, **10**, 690-701.
- Mehta, P.P., Bertram, J.S., Loewenstein, W.R.,** 1989, The Actions of Retinoids on Cellular Growth Correlate with Their Actions on Gap Junctional Communication, *The Journal of Cell Biology*, **108**, 1053-1065.
- Millau, J.F., Mai, S., Bastien, N., Drouin, R.,** 2010, P53 Functions and Cell Lines: Have We Learned The Lessons From The Past? *Bioessays*, **32**, 392-400.
- Moreira, E.A.M., Fagundes, R.L.M., Filho, D.W., Neves, D., Sell, F., Bellisle, F., Kupek, E.,** 2005, Effects of Diet Energy Level and Tomato Powder Consumption on Antioxidant Status in Rats, *Clinical Nutrition*, **24**, 1038-1046.
- Mousavia, S.H., Afshari, J.T., Brook, A., Anarkooli, I.J.,** 2009, Role of Caspases and Bax Protein in Saffron-Induced Apoptosis in MCF-7 Cells, *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 1909-1913.
- Munteanu, C.R., Magalhaes, A.L., Uriarte, E., Diaz, H.G.,** 2009, Multi-Target QPDR Classification Model for Human Breast and Colon Cancer-Related Proteins Using Star Graph Topological Indices, *Journal of Theoretical Biology*, **257**, 303-311.
- Murillo, G., Nagpal, V., Tiwari, N., Benya, R.V., Mehta, R.G.,** 2010, Actions of Vitamin D are Mediated by The TLR4 Pathway in Inflammation-Induced Colon Cancer, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **121**, 403-407.
- Nagendraprabhu, P., Sudhandiran, G.,** 2011, Astaxanthin Inhibits Tumor Invasion by Decreasing Extracellular Matrix Production and Induces Apoptosis in Experimental Rat Colon Carcinogenesis by Modulating the Expressions of ERK-2, NFkB and Cox-2, *Investigational New Drugs*, **29**, 207-224.
- Nakao, M., Kawauchi, S., Furuya, T., Uchiyama, T., Adachi, J., Okada, T., Ikemoto, K., Oga, A., Sasaki, K.,** 2009, Identification of DNA Copy Number Aberrations Associated with Metastases of Colorectal Cancer Using Array CGH Profiles, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **188**, 70-76.

- Nehls, O., Okech, T., Hsieh, C.J., Enzinger, T., Sarbia, M., Borchard, F., Gruenagel, H.H., Gaco, V., Hass, H.G., Arkenau, H.T., Hartmann, J.T., Porschen, R., Gregor, M., Klump, B.,** 2007, Studies on P53, Bax and Bcl-2 Protein Expression and Microsatellite Instability in Stage III (UICC) Colon Cancer Treated by Adjuvant Chemotherapy: Major Prognostic Impact of Proapoptotic Bax, *British Journal of Cancer*, **96**, 1409-1418.
- Öner, C.,** 2003, Genetik, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Palozza, P., Sheriff, A., Serini, S., Boninsegna, A., Maggiano, N., Ranelletti, F.O., Calviello, G., Cittadini, A.,** 2005, Lycopene Induces Apoptosis in Immortalized Fibroblasts Exposed to Tobacco Smoke Condensate Through Arresting Cell Cycle and Down-Regulating Cyclin D1, Pakt and Pbad, *Apoptosis*, **10**, 1445-1456.
- Palozza, P., Serini, S., Boninsegna, A., Bellovino, D., Lucarini, M., Monastra, G., Gaetani, S.,** 2007, The Growth-Inhibitory Effects of Tomatoes Digested *in vitro* in Colon Adenocarcinoma Cells Occur Through Down Regulation of Cyclin D1, Bcl-2 and Bcl-Xl, *British Journal of Nutrition*, **98**, 789-795.
- Palozza, P., Bellovino, D., Simone, R., Boninsegna, A., Celini, F., Monastra, G., Gaetani, S.,** 2009, Effect of B-Carotene-Rich Tomato Lycopene B-Cyclase (Tlcy-B) on Cell Growth Inhibition in HT-29 Colon Adenocarcinoma Cells, *British Journal of Nutrition*, **102**, 207-214.
- Park, C.K., Ishimi, Y., Ohmura, M.,** 1997, Vitamin A and Carotenoids Stimulate Differentiation of Mouse Osteoblastic Cells, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **43**, 281-296.
- Park, I.J., Lee, Y.K., Hwang, J.T., Kwon, D.Y., Ha, J., Park, O.J.,** 2009, Green Tea Catechin Controls Apoptosis in Colon Cancer Cells by Attenuation of H₂O₂-Stimulated Cox-2 Expression via the AMPK Signaling Pathway at Low-Dose H₂O₂, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1171**, 538-544.
- Perse, M., Cerar, A.,** 2011, Morphological and Molecular Alterations in 1,2 Dimethylhydrazine and Azoxymethane Induced Colon Carcinogenesis in Rats, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (Epub ahead of print).
- Plati, J., Bucur, O., Khosravi, F.R.,** 2011, Apoptotic Cell Signaling in Cancer Progression and Therapy, *Integrative Biology*, **3**, 279-296.
- Pogribny, I.P.,** 2010, Epigenetic Events in Tumorigenesis: Putting The Pieces Together, *Experimental Oncology*, **32**, 132-136.

- Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit**, Cat. No: 1120, Germany, 19p.
- Rafi, M.M., Yadav, P.N., Reyes, A.**, 2007, Lycopene Inhibits LPS-Induced Proinflammatory Mediator Inducible Nitric Oxide Synthase in Mouse Macrophage Cells, *Journal of Food Science*, 72, S069-74.
- Rajah, R., Khare, A., Lee, P.D.**, 1999, Insulin-like Growth Factor-binding Protein-3 is Partially Responsible for Highserum- induced Apoptosis in PC-3 Prostate Cancer Cells, *The Journal of Endocrinology*, **163**, 487-494.
- Rao, A.V., Fleshner, N., Agarwal, S.**, 1999, Serum and Tissue Lycopene and Biomarkers of Oxidation in Prostate Cancer Patients: a Case-control Study, *Nutrition and Cancer*, **33**, 159-164.
- Rao, A.V.**, 2007, Tomatoes, Lycopene & Human Health Preventing Chronic Diseases, University of Toronto.
- Rao, B., Gao, Y., Huang, J., Gao, X., Fu, X., Huang, M., Yao, J., Wang, j., Li, W., Zhang, J., Liu, H., Wang, L., Wang, J.**, 2011, Mutations of P53 and K-Ras Correlate TF Expression in Human Colorectal Carcinomas: TF Downregulation as A Marker of Poor Prognosis, *International Journal of Colorectal Disease* (Epub ahead of print).
- Ricchi, P., Zarrilli, R., Palma, A., Acquaviva, A.M.**, 2003, Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Colorectal Cancer: From Prevention to Therapy, *British Journal of Cancer*, **88**, 803-807.
- Riso, P., Pinder, A., Santangelo, A.**, 1999, Does Tomato Consumption Effectively Increase The Resistance of Lymphocyte DNA to Oxidative Damage? *The American Journal of Clinical Nutrition*, **69**, 712-718.
- Sade, A., Tunçay, S., Çimen, İ., Severcan, F., Banerjee, S.**, 2011, Celecoxib Reduces Fluidity and Decreases Metastatic Potential of Colon Cancer Cell Lines Irrespective of Cox-2 Expression, *Bioscience Reports Immediate Publication* (Epub ahead of print).
- Sahin, K., Ozercan, R., Onderci, M., Sahin, N., Gursu, M.F., Khachik, F., Sarkar, F.H., Munkarah, A., Fehmi, R.A., Kmak, D., Kucuk, O.**, 2004, Lycopene Supplementation Prevents the Development of Spontaneous Smooth Muscle Tumors of the Oviduct in Japanese Quail, *Nutrition and Cancer*, **50**, 181-189.
- Sahin, K., Onderci, M., Sahin, N., Gursu, M.F., Khachik, F., Kucuk, O.**, 2006, Effects of Lycopene Supplementation on Antioxidant Status, Oxidative Stress,

- Performance and Carcass Characteristics in Heat-Stressed Japanese Quail, *Journal of Thermal Biology*, **31**, 307-312.
- Sahin, K., Ozercan, R., Onderci, M., Sahin, N., Khachik, F., Seren, S., Kucuk, O.**, 2007, Dietary Tomato Powder Supplementation in The Prevention of Leiomyoma of The Oviduct in The Japanese Quail, *Nutrition and Cancer*, **59**, 70-75.
- Sahin, K., Tuzcu, M., Sahin, N., Ali, S., Kucuk, O.**, 2010a, Nrf2/HO-1 Signaling Pathway May be the Prime Target for Chemoprevention of Cisplatin-Induced Nephrotoxicity by Lycopene, *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 2670-2674.
- Sahin, K., Sahin, N., Kucuk, O.**, 2010b, Lycopene and Chemotherapy Toxicity, *Nutrition and Cancer*, **62**, 988-995.
- Sahin, K., Tuzcu, M., Gencoglu, H., Dogukan, A., Timurkan, M., Sahin, N., Aslan, A., Kucuk, O.**, 2010c, Epigallocatechin-3-Gallate Activates Nrf2/HO-1 Signaling Pathway in Cisplatin-induced Nephrotoxicity in Rats, *Life Sciences*, **87**, 240-245.
- Sahin, N., Akdemir, F., Orhan, C., Kucuk, O., Hayirli, A., Sahin, K.**, 2008a, Lycopene-Enriched Quail Egg as Functional Food for Humans, *Food Research International*, **41**, 295-300.
- Sahin, N., Orhan, C., Tuzcu, M., Sahin, K., Kucuk, O.**, 2008b, The Effects of Tomato Powder Supplementation on Performance and Lipid Peroxidation in Quail, *Poultry Science*, **87**, 276-283.
- Salman, H., Bergman, M., Djaldetti, M., Besler, H.**, 2007, Lycopene Affects Proliferation and Apoptosis of Four Malignant Cell Lines, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **61**, 366-369.
- Sawada, M., Nakashima, S., Banno, Y., Yamakawa, H., Hayashi, K., Takenaka, K., Nishimura, Y., Sakai, N., Nozawa, Y.**, 2000, Ordering of Ceramide Formation, Caspase Activation, and Bax/Bcl-2 Expression During Etoposide-Induced Apoptosis in C6 Glioma Cells, *Cell Death and Differentiation*, **7**, 761-772.
- Sengupta, A., Ghosh, S., Das, S.**, 2004, Modulatory Influence of Garlic and Tomato on Cyclooxygenase-2 Activity, Cell Proliferation and Apoptosis During Azoxymethane Induced Colon Carcinogenesis in Rat, *Cancer Letters*, **208**, 127-136.
- Seren, S., Lieberman, R., Bayrakdar, U.D., Heath, E., Sahin, K., Andic, F., Kucuk, O.**, 2008, Lycopene in Cancer Prevention and Treatment, *American Journal of Therapeutics*, **15**, 66-81.

- Shimizu, M., Shirakami, Y., Sakai, H., Adachi, S., Hata, K., Hirose, Y., Tsurumi, H., Tanaka, T., Moriwaki, H.,** 2008, (-)-Epigallocatechin Gallate Suppresses Azoxymethane-Induced Colonic Premalignant Lesions in Male C57BL/KsJ-db/db Mice, *Cancer Prevention Research*, **1**, 298-304.
- Siler, U., Barella, L., Spitzer, V.,** 2004, Lycopene and Vitamin E Interfere with Autocrine/Paracrine Loops in The Dunning Prostate Cancer Model, *The Federation of American Societies for Experimental Biology*, **18**, 1019-1021.
- Strillacci, A., Griffoni, C., Sansone, P., Paterini, P., Piazzini, G., Lazzarini, G., Spisni, E., Pantaleo, M.A., Biasco, G., Tomasi, V.,** 2008, MiR-101 Downregulation is Involved in Cyclooxygenase-2 Over Expression in Human Colon Cancer Cells, *Experimental Cell Research*, **315**, 1439-1447.
- Sigma-Aldrich,** 2011.
- Talvas, J., Caris-Veyrat, C., Guy, L., Rambeau, M., Lyan, B., Minet-Quinard, R., Lobaccaro, J.M., Vasson, M.P., George, S., Mazur, A., Rock, E.,** 2010, Differential Effects of Lycopene Consumed in Tomato Paste and Lycopene in The Form of A Purified Extract on Target Genes of Cancer Prostatic Cells, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **91**, 1716-1724.
- Tan, S.L., Gerber, J.P., Cosgrove, L.J., Lockett, T.J., Clarke, J.M., Williams, D.B., Head, R.J.,** 2011, Is the Tissue Persistence of O⁶-Methyl-2-deoxyguanosine an Indicator of Tumour Formation in the Gastrointestinal Tract?, *Mutation Research*, **721**, 119-126.
- Tang, F.Y., Cho, H.J., Pai, M.H., Chen, Y.H.,** 2009, Concomitant Supplementation of Lycopene and Eicosapentaenoic Acid Inhibits The Proliferation of Human Colon Cancer Cells, *Journal of Nutritional Biochemistry*, **20**, 426-434.
- Thakur, V.S., Ruhul Amin, A.R.M., Paul, R.K., Gupta, K., Hatsak, K., Agarwal, M.K., Jackson, M.W., Wald, D.N., Mukhtar, H., Agarwal, M.L.,** 2010, p53-Dependent p21-Mediated Growth Arrest Pre-Empts and Protects HCT116 Cells from PUMA-Mediated Apoptosis Induced by EGCG, *Cancer Letters*, **296**, 225-232.
- Thirupurasundari, C.J., Padmini, R., Devaraj, S.N.,** 2009, Effect of Berberine on The Antioxidant Status, Ultrastructural Modifications and Protein Bound Carbohydrates in Azoxymethane-Induced Colon Cancer in Rats, *Chemico-Biological Interactions*, **177**, 190-195.

- Tian, Y., Ye, Y., Gao, W., Chen, H., Song, T., Wang, D., Mao, X., Ren, C.,** 2011, Aspirin Promotes Apoptosis in A Murine Model of Colorectal Cancer by Mechanisms Involving Downregulation of IL-6–STAT3 Signaling Pathway, *International Journal of Colorectal Disease*, **26**, 13-22.
- Tuynman, J.B., Peppelenbosch, M.P., Richel,D.J.,** 2004, Cox-2 İnhibition as a Tool to Treat and Prevent Colorectal Cancer, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **52**, 81-101.
- van Breda, S.G.J., de Kok, T.M.C.M., van Delft, J.H.M.,** 2008, Mechanisms of Colorectal and Lung Cancer Prevention by Vegetables: A Genomic Approach, *Journal of Nutritional Biochemistry*, **19**, 139-157.
- Wang, J.Y., Shum, A.Y., Ho, Y.J, Wang, J.Y.,** 2003, Oxidative Neurotoxicity in Rat Cerebral Cortex Neurons: Synergistic Effects of H₂O₂ and NO on Apoptosis İnvolving Activation of p38 Mitogen-activated Protein Kinase and Caspase-3, *Journal of Neuroscience Research*, **72**, 508–519.
- Wargovich, M.J., Jimenez, A., McKee, K., Steele, V.E., Velasco, M., Woods, J., Price, R., Gray, K., Kelloff, G.J.,** 2000, Efficacy of Potential Chemopreventive Agents on Rat Colon Aberrant Crypt Formation and Progression, *Carcinogenesis*, **21**, 1149-1155.
- Wendum, D., Masliah, J., Trugnan, G., Flejou, J.F.,** 2004, Cyclooxygenase-2 and its Role in Colorectal Cancer Development, *Virchows Archiv*, **445**, 327-333.
- Yu, S.H., Yang, P.M., Peng, C.W., Yu, Y.C., Chiu, S.J.,** 2011, Securin Depletion Sensitizes Human Colon Cancer Cells to Fisetin-İnduced Apoptosis, *Cancer Letters*, **300**, 96-104.
- Zhang, H., Nara, E.K., Ono, H., Nagao, A.,** 2003, A Novel Cleavage Product Formed by Autoxidation of Lycopene Induces Apoptosis in HI-60 Cells, *Free Radical Biology and Medicine*, **35**, 1653-1663.
- WHO, Cancer,** 2008. World Health Organization, Fact sheet N°297.
 URL1,http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=A2853|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC, 10 Aralık, 2010.
 URL-2, <http://biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis.pdf>, 10 Aralık, 2010.
 URL-3, http://www.tkd.org.tr/TKD_DATA/Image/dergi/2008-2-30.jpg, 10 Aralık, 2010.
 URL-4, <http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/apoptosis.pdf>,10 Aralık, 2010.
 URL-5, http://dergi.ztb.gov.tr/index.php?option=com_content&view=article&id=82&Itemid= ,10 Aralık, 2010.

7. ÖZGEÇMİŞ

Abdullah ASLAN

Doğum Yeri: Elazığ

Doğum Tarihi: 22.07.1982

Görevi: Araştırma Görevlisi

İş Adresi: Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji A.B.D.,
Elazığ

Tel: 0 424 237 00 00/ 3827

Fax: 0 424 233 00 62

e-posta: aaslan@firat.edu.tr

abdullahaslan1@gmail.com

2003-2006: Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans Eğitimi

Yüksek Lisans Tez Konusu: *Plasmodium vivax*'ın Laktat Dehidrogenaz Enzimini Kodlayan Genin İfade Edilerek İlgili Proteinin Safılaştırılması ve Analizlerinin Yapılması

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Dilek Turgut-Balık

2006-: Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim dalında Doktora Eğitimi.

Doktora Tez Konusu: Ratlarda Azoksimetan Uygulanarak Oluşturulan Kolorektal Kanserde Likopenin Siklooksijenaz-2 (Cox-2), Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2, P53 Proteinlerinin Ekspresyonu ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU

1999-2003: Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünde Lisans Eğitimi

1992-1998: Orta ve Lise Eğitimi

1987-1992: İlkokul Eğitimi