

HEPATOSELLÜLER KARSİNOM HÜCRELERİNDE KARMOFURUN SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİ

CYTOTOXIC AND APOPTOTIC FUNCTION OF CARMOFUR IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA.

Gökhan KUŞ¹

¹Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi, Sağlık Programları Bölümü

ÖZ

Bedende istenmeyen ve potansiyel olarak tehlike arzeden hücrelerin ölümünü sağlayan apoptotik hücre ölümü genetik olarak kontrol edilir ve bu yolla bedendeki hücrelerin sayısı kontrol altında tutulur. Apoptoz ölüm yolağındaki yetersizlik otoimmün sistem hastalıklarından kansere kadar birçok hastalığa yol açabilir. Her türlü tedavi şekline rağmen hepatosellüler kanserler, karaciğer kanserlerine bağlı ölümlerin başında gelmektedir. Kanser tedavisindeki temel amaç kanserli hücrelerin çoğalmasını önlemek ve bu hücrelerin apoptozlarını uyarmaktır. Son zamanlarda kanserin önlenmesi yönünde yapılan birçok çalışmada kanser oluşumu ile sfingolipidler arasındaki ilişkinin önemi ortaya konmuştur. Çalışmamızda, 5-flourasil türevi ve bir seramidaz enzim baskılayıcısı olan karmofurun kanserli insan karaciğer hücre hattındaki (HepG2) hücrelerinin yaşam oranların ve apoptoz uyarım üzerine etkilerini araştırdık. Karmofurun hücre yaşam oranlarına etkisi MTT yöntemiyle, apoptoz uyarım etkisi flow sitometri yöntemiyle, hücrelerdeki morfolojik değişiklikler ise konfokal mikroskobuyla incelendi. Karmofurun çeşitli konsantrasyonlarının (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ve 60 µM) 24 saat uygulanması sonucunda kontrol grubuna göre (% 100) hücrelerdeki yaşam oranları sırasıyla % 100, 77, 65, 64, 46, 38, 34, 30, 26, 20, 14 ve 9 olarak tespit edildi. Karmofurun 24 µM (IC50) dozunun 24 saat uygulanması sonucunda bu hücre popülasyonundaki apoptotik hücrelerin yüzdesinin kontrol grubuna göre arttığı belirlendi. Kontrol grubu (yaklaşık % 1) ile karşılaştırıldığında karmofurun 24 saat uygulanması sonucunda kanserli karaciğer hücrelerinde flow sitometrik olarak ölçülen toplam ölüm oranı % 28 dir. Hücrelerdeki bu apoptotik değişimler konfokal mikroskobuyla kromatin yoğunlaşması, hücrelerin büzülmesi, hücre iskeletinin bozulması ve DNA'nın parçalanması, hücre zarlarının şekil değişikliği şeklinde tespit edildi. Bu çalışma sonucunda karmofurun HepG2 hücrelerinin çoğalmasını baskıladığı ve apoptozunu uyardığı gösterildi.

ANAHTAR KELİMELER: Karmofur, Apoptotik, Antiproliferatif, Hepatoma.

ABSTRACT

Apoptosis is a fundamental genetically controlled cell death process that controls cell number by removal of unwanted and potentially dangerous cells. Failure of apoptosis can cause severe anomalies, ranging from autoimmune disease to cancer. Despite of clinical treatments, hepatocellular carcinoma is one of the most common causes of liver cancer death. The main purposes of cancer treatment are to inhibit the proliferation and to induce the apoptosis of cancer cells. Recent studies regarding the relationship between sphingolipids and carcinogenesis are revealing novel molecular targets for cancer chemoprevention. We tested whether carmofur, a ceramidase inhibitor and a derivate of 5-fluorouracil, changes the survival rate and induces apoptosis in a human hepatoma cell line (HepG2). We determined in vitro survival rate with MTT, apoptosis with flow cytometry and morphological changes with confocal microscopy. After treatment of hepatoma cells with carmofur (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ve 60 µM) for 24 h, cell survival rate was determined as 100, 77, 65, 64, 46, 38, 34, 30, 26, 20, 14 ve 9 %, compared to control group (% 100), respectively.

Increased percentage of apoptotic cells after treatment of cells in this population with 24 µM carmofur (the half maximal inhibitory concentration) for 24 h was determined. The total death rate of control group (1 %) of hepatoma cells was increased up to (28 %) after 24 hr carmofur treatment. The morphological changes as apoptotic markers were observed by confocal microscopy (chromatin condensation, cell shrinkage, fragmented DNA and cytoskeleton and cell membrane misconfigurations). This study revealed that carmofur possesses antiproliferative and apoptotic properties on hepatoma cells.

KEYWORDS: Carmofur, Apoptotic, Antiproliferative, Hepatoma.

GİRİŞ

Karaciğer kanserleri içinde en yaygın olanı hepatosellüler karsinomdur (HCC). Hepatositlerden kaynaklanan HCC kanser türleri arasında en sık görülen altıncı kanser türüdür. Hepatosellüler karsinomda en fazla tercih edilen tedavi şekli cerrahi müdahalelerdir (1). Cerrahinin uygun olmadığı durumlarda ise kemoterapi, radyoterapi, ablasyon gibi diğer tedavi şekilleri tercih edilmektedir. HCC'li hastaların çoğunda antikanser ilaçlara karşı bir direnç görüldüğünden HCC tedavisinde yeni yöntemler araştırılmaktadır (2). Günümüzde hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmalarını sağlayan yolların aktive olmasının ve apoptoz yoluyla ölmesi gereken hücrelerin ölümlerinin engellenmesinin kansere yol açtığı belirtilmektedir (3). Bu süreçte yer alan birçok hücre içi ve dışı yolak bulunmaktadır. Kanser ile ilgili araştırmalarda sfingolipid metabolizması üzerine yapılan çalışmalar da ön plana çıkmaktadır. Hücre zarında yoğun olarak bulunan sfingomiyelinin uzun zamandır sadece yapısal görevleri olduğu düşünülmüşse de yapılan çalışmalarda hücre hasarı ve hücre ölüm olaylarında da önemli görevler üstlendikleri ortaya konmuştur (4). Sfingolipidler, hücrelerde önemli sinyal yollarını uyan ya da baskılayan yapısal bileşiklerdendir. Sfingolipidlerden oluşan ve hücrelerde ikinci haberci olarak görev yapan seramid, seramid-1 fosfat (C1P), sfingozin ve sfingozin-1 fosfatın (S1P) hücre çoğalması, apoptoz, inflamasyon ve hücre döngüsü üzerine etkileri ortaya konmuştur (5,6). Sfingolipidlerin tümör oluşumunda, kanserin ilerlemesinde ve kanser tedavi etkinliğindeki rolü giderek önem kazanmaktadır. Sfingolipid türleri arasındaki dengenin bozulması kanserin ilerlemesine ya da kanserin baskılanmasına yol açmaktadır. Bu sfingolipidler arasında özellikle seramid ve S1P'in hücre çoğalmasındaki genleri düzenlediği bilinmektedir (7). Hücrelerde seramid düzeyi ile S1P düzeyi arasında bir denge bulunmaktadır. Bu dengenin seramid yönüne kayması hücrenin çoğalmasının engellenmesine, hücrenin apoptozuna ve ölümüne yol açarken; dengenin S1P yönüne kayması hücrenin çoğalmasına ve apoptozdan kaçmasına yol açmaktadır (8). Yapılan birçok çalışmada da tümör nekroz faktör (TNF), oksidatif stres, büyüme faktörlerinin baskılanması, antikanser ilaçlar, radyasyon ve UV

ışını gibi stres faktörlerinin hücrelerde seramid yapımını uyardığı ve hücrelerin ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Büyüme faktörleri ise seramidaz ve sfingozin kinaz enzimlerini aktive ederek, seramid düzeyini düşürür ve S1P'nin yapımını arttırarak hücrelerin çoğalmasına ve seramid uyarımlı apoptozun baskılanmasına neden olur (9). Bu nedenle klinik ya da deneysel çalışmalarda hücre içerisinde seramid düzeyini arttıran ilaçlar hücrelerin çoğalmasını engellemek ve apoptozunu uyarmak için; seramid düzeyini azaltan ya da S1P düzeyini arttıran ilaçlar hücrelerin apoptozunu baskılamak ya da çoğalmasını uyarmak için kullanılmaktadır (10). Hücrelerde seramid miktarını azaltan enzimlerden bir tanesi de seramidaz enzimidir. Kanser tedavisine yönelik olarak değerlendirildiğinde ise, kanser hücrelerinde artan seramidaz enzim aktivasyonu hücrelerde seramid düzeyini azaltırken, S1P düzeyini arttırmakta, hücrelerin çoğalmasını uyarırken apoptozunu baskılamaktadır. Bu nedenle, hücre içi seramidaz enzim düzeyi seramid, sfingozin ve S1P dengesinin korunmasında oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Bu denge bir hücrenin ölüme direncini, ölümünü veya çoğalmasını düzenlemektedir (11,12). Birçok kanser hücresinde normal hücrelere göre seramidaz düzeyinin yüksek olduğu bulunmuştur. Bu nedenle seramidaz enzim aktivitesinin baskılanmasının kanser tedavisinde önemli olduğunu düşünmekteyiz. Bu nedenle çalışmamızda seramidaz baskılayıcı bir ajan olarak bilinen karmofurun (1-hexycarbamoly-5-fluorouracil) kanserli karaciğer hücrelerinin çoğalmasına ve apoptoz uyarımına etkisini in vitro ortamda araştırdık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda hayvan deneyleri yapılmadığı için etik kurul onayı alınmamıştır. Karmofur (1-hexycarbamoly-5-fluorouracil, Sigma) dimeilsülfoksit (DMSO, Sigma) içerisinde çözüldükten sonra besiyeri içinde dilüe edilerek (RPMI-1640, Gibco) karmofurun 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ve 60 µM dozları hazırlandı. HepG2 hücreleri (American Type Culture Collection, ATCC, USA) içerisinde % 10 fetal dana serumu (FCS, Sigma) ve % 1 penisilin-streptomisin (Sigma) bulunan RPMI-1640 besiyeri içerisinde 37 °C'de, % 95 O₂ ve % 5 CO₂ içereren etüv-

de flask içerisinde çoğaltıldı. Flask tabanı en az % 95 oranında hücreyle kaplanınca hücreler deneye alındı. Hücrelerin yüzeyden sökülmesi işleminde % 0,25 tripsin-EDTA (Sigma) çözeltisi kullanıldı.

MTT ölçümleri

Flask tabanından çözülen hücreler 96 kuyucuklu kaplara ortalama 1000 hücre olacak şekilde ekildikten sonra karmofurun 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ve 60 μM dozları hücrelere 24 saat boyunca uygulandı. 24 saat sonra her bir kuyucuğa 20 μL MTT çözeltisi eklendi. 2-4 saat inkübasyonda bekletilen 96 kuyucuklu kapların her birindeki MTT çözeltisi çekildikten sonra her bir kuyucuğa 100 μL DMSO konuldu. 96 kuyucuklu kap karanlık ortamda oda sıcaklığında hafifçe karıştırılarak en az 10 dakika bekletildikten sonra kaplar ELISA okuyucusunda (EL \times 808, BioTek, USA) 540 nm'de okutuldu (n=3). ELISA okuyucusundan elde edilen optik yoğunluk verileri kontrol grubundaki yaşayan hücrelerin yüzdesi her bir kutucuktaki ilaç verilen hücre absorbansı yüz sayısı ile çarpıldıktan sonra kontrol hücrelerinin ortalama absorbansına bölünerek hesaplandı.

Apoptoz ölçümleri

Karmofurun apoptotik etkisi floresan izotiyosianat (FITC) Anneksin V (Invitrogen, Camarillo, CA) boyama yöntemi ile flow sitometrik olarak belirlendi. Anneksin V ölçüm tekniğinin prensibi, apoptoz uyarısı alan hücrenin zarının iç yüzeyinde bulunan lipit sırasındaki fosfatidilserinin hücre zarının dış lipit tabakasına geçişinin tespiti esasına dayanır. Bu yer değiştirme apoptozun erken döneminde gerçekleşir. Anneksin V fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, bu protein floresan bir madde FITC ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilir. Bu bağlanma oranı da flow sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerde de anneksin bağlanması görülebileceği için ayrıca vital bir boya olan propidiyum iyodür (PI) boyaması da yapılır. Canlı hücreler zarları sağlam olduğu için PI boyası ile boyanmazlar. Canlı hücreler FITC (-) / PI (-), erken apoptotik hücreler FITC (+) / PI (-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler FITC (+) / PI (+) olarak ayırt edilir (13,14). MTT

yöntemi ile hücrelerdeki yüzde elli ölüme yol açan doz (24 μM) tespit edildikten sonra hücrelerdeki ölüm tipini (apoptoz/nekroz) ortaya koyabilmek amacıyla bu dozla flow sitometrik ölçümlere geçildi. Flow sitometrik ölçümler için 1×10^6 hücre her kuyuda olacak şekilde 6 kuyulu plakalara ekim yapılmıştır. Kuyulardan üçü karmofurun % 50 ölüme yol açan dozu 24 μM ile 24 saat inkübe edilmiştir. Diğer üç kuyudaki hücrelere karmofur uygulanmamış ve kontrol olarak bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra her kuyudaki hücreler ayrı ayrı endorf tüplere kazanarak kaldırılmış ve Muse Anneksin V kitindeki protokole uygun olarak 100 μL 'de hücre olacak şekilde ayarlama yapılarak hücreler 15 dakika karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekleme süresinden sonra hücreler Muse Cell Analyser (Merck, Millipore) cihazında okularak analiz edilmiştir.

Konfokal mikroskop analizleri

Hücreler 24 saat 24 μM karmofur ile muamele edildikten sonra besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve fosfat tampon solüsyonu (PBS, Invitrogen) ile yıkandı. Hücreler % 2 glutaralaldehit ile 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra Alexa-Fluor-488 phalloidin ve akrinin orange boyası ile boyandı. Boyama işlemi sonrasında hücrelerin morfolojik değişimleri Leica ICS-SP5 konfokal mikroskopunda gözlemlendi.

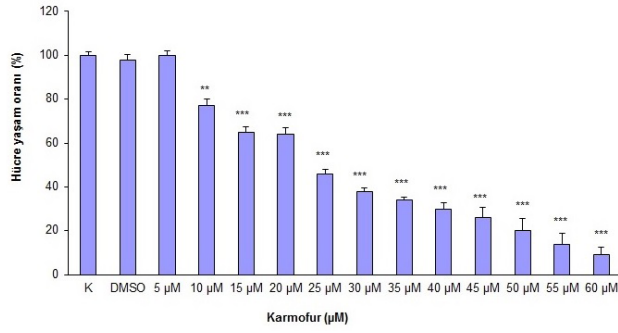
İstatiksel analizler

Elde edilen veriler kontrolün ortalama % fraksiyonu \pm standart hata şeklinde ifade edildi. İstatistiksel değerlendirme SPSS paket programında tek yönlü varyans analizi ve ardından Tukey'in çok yönlü karşılaştırma testi ile gerçekleştirildi. Flow sitometrik değerler % olarak ifade edildi. Her bir deney en az 3 kez tekrar edildi. Kontrol grubuna göre anlamlılık değerleri * : p < 0.05, ** : p < 0.01, ***: p < 0.001 dir.

BULGULAR

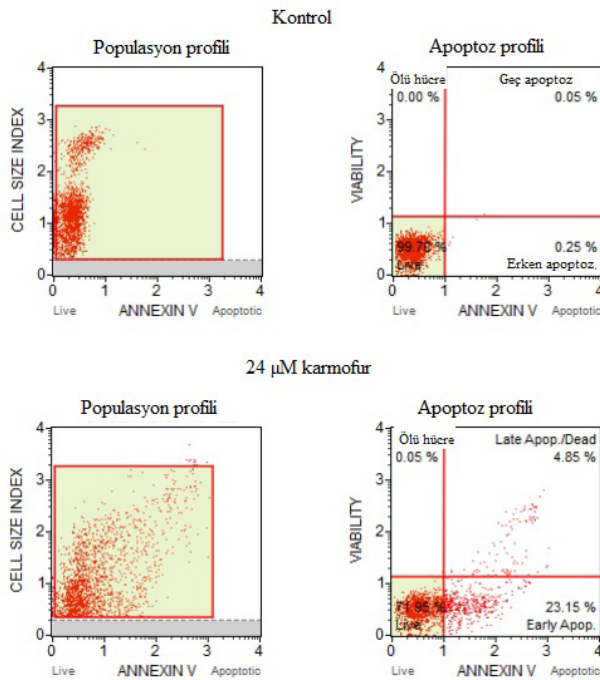
Karmofurun hücre canlılığına ve apoptoz uyarımına etkisi

HepG2 hücrelerinin 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ve 60 μM karmofur ile 24 saat muamelesi sonucunda kontrol (% 100, besiyeri or-

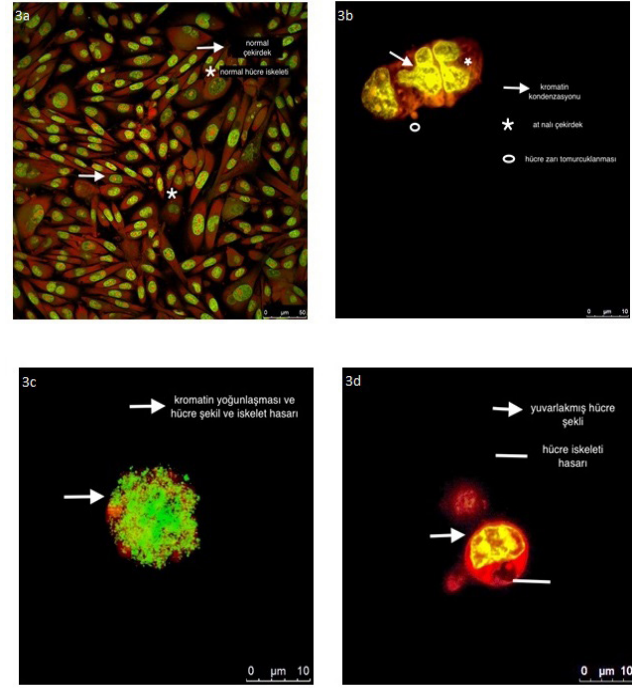


ŞEKİL 1: HepG2 hücrelerine 5-60 mikromolar karmofurun 24 saat boyunca uygulanması sonucunda elde edilen hücre yaşam oranları

tamı) grubuna göre hücrelerdeki yaşam oranları sırasıyla % 100, 77 ($p < 0.01$), 65, 64, 46, 38, 34, 30, 26, 20, 14 ve 9 ($p < 0.001$) olarak tespit edildi. Karmofurun IC50 dozu 24 mikromolar olarak hesaplandı (Şekil 1). En yüksek dozdaki DMSO konsantrasyonunda (% 0.01) hücrelerin yaşam oranlarında bir değişiklik olmadı. Kanserli HepG2 hücrelerinin 24 µM karmofur ile 24 saat boyunca muamelesi sonucunda kontrol grubuna göre apoptotik ölüm sürecinin erken evreleri değerinin % 0.25'den % 23.15'e çıktığı tespit edilmiştir. Bu dozdaki karmofurun hücreler üzerindeki toplam ölüm oranı da % 28 olarak hesaplanmıştır (Şekil 2).



ŞEKİL 2: 24 saat boyunca karmofurun HepG2 hücrelerinin % 50'sini öldüren dozunun (24 mikromolar) uygulanması sonucunda kontrol grubuna (sadece besiyeri uygulanan) göre (% 0,25) hücrelerde erken apoptoz değerinin % 23 değerine çıktığı tespit edildi.



ŞEKİL 3: ilaç uygulanmayan kontrol grubundaki HepG2 hücreleri (3a) ile 24 saat boyunca karmofur uygulanan HepG2 hücrelerinde (3 b,c,d) gözlemlenen konfokal analizleri. 3a: Sadece besiyeri uygulanan kontrol grubunda yapılan konfokal analizler sonucunda hücrelerde gözlemlenen normal çekirdek ve hücre iskeleti görünümü. 3b: 24 mikromolar karmofurun 24 saat boyunca uygulanması sonucunda hücrelerde gözlenen kromatin kondenzasyonu, hücre zarında tomurcuklanma ve at nalı şeklinde çekirdek yapısı. 3c: Hücrelerin % 50'sini öldüren karmofur dozunun 24 saat uygulanması sonucunda hücrelerde gözlemlenen kromatin yoğunlaşması, hücre şeklinde ve iskelet yapısında gözlemlenen hasarlar. 3d: 24 mikromolar karmofurun hücreler üzerinde oluşturmuş olduğu şekil bozukluğu ve hücre iskeleti hasarı görüntüsü.

Konfokal mikroskopik ve ince yapısal analizler

Karmofurun 24 µM dozu ile 24 saat inkübe edilen hücrelerin konfokal mikroskopuyla yapılan incelemesinde hücrelerde çekirdek fragmentasyonu ve kromatin yoğunlaşması gibi apoptotik özellikler taşıdığı gözlemlendi (Şekil 3).

TARTIŞMA

Kanserin önlenmesine ve tedavisine yönelik yapılan araştırmalar her geçen gün artmaktadır. Bu araştırmalardan elde edilen sonuçlarda birçok kritik nokta tespit edilmiştir. Bunlardan en önemlisi kanseri oluşmadan önleyebilmektir. Diğer bir unsur da sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanserli hücrelerin çoğalmasını önlemek ya da kanserli hücreleri öldürmektir. Kanserli hücreler basitçe kontrolsüz çoğalan hücrelerdir. Kontrolsüz çoğalmanın hücresel düzeyde birçok yolağı olabilmektedir. Bunlardan bir tanesi

sflngolipid yolağıdır. Bu yolağın temel bileşeni olan sflngomiyelin hücre zarının yapısal bir bileşenidir. Aynı zamanda hücre çoğalmasında, kemoterapatik ilaçlara yanıt oluşumunda ve kanser oluşumunda/engellenmesinde görev alan birçok bioaktif lipidin sentezine de öncülük eder. Sflngolipidler, hücrelerde önemli sinyal yolaklarını uyararak ya da baskılayan yapısal bileşiklerdendir. Sflngolipidlerden oluşan ve hücrelerde ikinci haberci olarak görev yapan seramid, seramid-1 fosfat (C1P), sflngoizin ve sflngoizin-1 fosfatın (S1P) hücre çoğalması, apoptoz, inflamasyon ve hücre döngüsü üzerine etkileri ortaya konmuştur (5,6). Bu sflngolipidlerin içerisinde yer alan seramid hücrelerin yaşamlarını ya da ölümlerini belirleyen araçlardan birisidir (15). Tümör nekroz faktör, oksidatif stres, büyüme faktörlerinin baskılanması, antikanser ilaçlar, radyasyon ve UV ışını gibi stres faktörleri hücrelerde özellikle sflngomiyelinaz enzimini aktive eder, seramid yapımını uyarır ve hücrelerin ölümüne neden olur. Büyüme faktörleri ise seramidaz ve sflngoizin kinaz enzimlerini aktive ederek, seramid düzeyini düşürür ve S1P'nin yapımını arttırarak hücrelerin çoğalmasına ve seramid uyarımlı apoptozun baskılanmasına neden olur (5,9). Bu nedenle klinik ya da deneysel çalışmalarda hücre içerisinde seramid düzeyini arttıran ilaçlar hücrelerin çoğalmasını engellemek ve apoptozunu uyararak için; seramid düzeyini azaltan ya da S1P düzeyini arttıran ilaçlar hücrelerin apoptozunu baskılamak ya da çoğalmasını uyararak için kullanılmaktadır (10). Birçok kanser türünde hücrelerde seramid miktarının azaldığı ve bu azalmaya bağlı olarak da hücrelerin apoptozdan yani ölümden kaçtığı gösterilmiştir. Antikanser ilaçların seramid oluşumunu uyararak kanserli hücrelerde ölüme yol açtığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Seramidaz enzimi, seramid molekülündeki yağ asidi ile sflngoizin molekülü arasındaki N-asil bağına parçalayarak sflngoizin ve serbest yağ asidinin oluşumuna neden olur (16). Sonuçta seramidaz hücrelerdeki seramid düzeyini azaltırken S1P düzeyinin artmasına yol açar. Kanserli prostat hücrelerinde (DU145, LnCaP ve PC3), baş ve boyun ile melanoma hücrelerinde seramidaz enzim düzeylerinin kontrol gruplarına göre yüksek olduğu gösterilmiştir (6,17,18). Kanserli prostat hücrelerinde radyasyon terapisi sırasında seramidaz enzim düzeyinin arttığı ve bu artışın ilaç-

la tedaviye ve radyasyon terapisine karşı direnç oluşturduğu tespit edilmiştir (12,18). Seramidaz enziminin baskılanmasının kanserli prostat hücrelerinde apoptozu uyardığı ve kanser büyümesini engellediği gösterilmiştir (19,20). Kanserli karaciğer hücrelerinde de benzer şekilde seramidaz enzim aktivitesinin baskılanmasının kanser ilaçlarına olan direnci azalttığı tespit edilmiştir (21). Tüm bu literatürler değerlendirildiğinde, kanserli hücrelerde tek başına seramid düzeyini arttırmadan ziyade seramidaz enzim aktivitesinin baskılanmasının ya da bu etkileri birlikte ortaya koyan tedavi seçeneklerinin daha etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenle biz çalışmamızda bir seramidaz enzim baskılayıcı ilaç olan karmofurun kanserli hepatosellüler hücrelerde hücre çoğalmasını ve apoptoz uyarıcı etkisini araştırdık. 10 µM dozdan itibaren karmofur bu hücrelerin canlılığını kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azalttı. En yüksek doz olarak kullandığımız 60 µM karmofur kontrol grubuna göre hücrelerin % 90'ını öldürdüğü tespit edildi. Başka bir deyişle, kanserli karaciğer hücrelerinin 24 saat boyunca 60 µM karmofurla muamelesi sonucunda kontrol grubuna göre hücrelerin yaşam oranları % 10'lara kadar düştü. Çalışmamızı destekler şekilde karmofurun kanserli bağırsak, (SW403) ve böbrek (LNCaP) hücrelerinde seramidaz enzimini baskıladığı, insan embriyonik böbrek hücrelerinde de hücre çoğalmasını azalttığı gösterilmiştir (15). Benzer şekilde kanserli insan meme, fibrosarkoma, nöroblastoma, melanoma ve sıçan glioma hücrelerinde de çoğalmayı azaltıcı etkiler ortaya konmuştur (22). MTT sonuçları sonucunda karmofurun HepG2 hücrelerindeki IC50 dozu 24 µM olarak belirlenmiştir. Bu doz ile yapılan flow sitometrik analizler sonucunda da karmofurun hücrelerin apoptotik ölüm sürecinin erken evrelerini kontrol grubuna göre arttırdığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara destek olarak da yapılan konfokal mikroskopik analizlerde karmofurla muamele sonucunda hücrelerde apoptotik belirteçlerin olduğu ortaya konulmuştur. Kontrolsüz çoğalan kanser hücrelerine birçok kaynakta ölümsüz hücreler de denmektedir. Normalde ölmesi gereken bir hücrenin ölmemesi ve bu hücrenin çoğalması kanseri başlatır. Kanserli hücrelerin ölümden kaçmasının yani programlanmış ölüm sürecinden (apoptoz) bir anlamda kurtulmasının altında birçok hücrenel yolak yatmaktadır.

Kanser tedavisindeki amaç kanserli hücrelerin apoptozunu uyarmaktır. Bunu gerçekleştirebilmek için de kanserli hücrelerde hangi hücreyel yolağın değişimini/bozulduğunu tespit etmek gerekir. Bu yollardan birisi olan sfingolipid yolağında artmış seramidaz aktivitesi hücrelerdeki seramid düzeyini azaltırken S1P düzeyinin artmasına yol açar. S1P düzeyinin artması da hücrelerin apoptozdan kaçmasına ve ölmesi gerekirken yaşamasına yol açar. Çalışmamızda bir seramidaz baskılayıcı olan karmofurun HepG2 hücrelerinde, hücrelerin yaşam oranlarını anlamlı şekilde azalttığını tespit ettik. Karmofurun bu etkiyi apoptoz uyarım aracılığıyla yaptığını da ortaya koyduk. Bir seramidaz baskılayıcı ilaç olan karmofurun bu etkisinin özellikle kanser tedavisine ve kanser araştırmalarına ışık tutabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Günay Y, Güler N, Akyıldız M ve ark. Hepatosellüler karsinoma ve canlı vericili karaciğer nakli:kanser nüksü ve hasta sağkalımını etkileyen faktörler. Tek merkez deneyimi. *Gaziantep Tıp Dergisi* 2013;19(3):173-9.
2. Pathil A, Armeanu S, Venturelli S, et al. HDAC inhibiton treatment of hepatoma cells induces both TRAIL-independent apoptosis and restoration of sensitivity to TRAIL. *Hepatology* 2006;43(3):425-34.
3. Balkan BM, Sel T. Vitamin C'nin HepG2 hücrelerinde apoptozis üzerine etkileri. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2014;61:237-41.
4. Reynolds CP, Maurera, BJ, Kolesnick RN. Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy. *Cancer Lett* 2004;206:169-80.
5. Albi E and Mgni MV. Sphingolipid metabolism inhibitors and cell function. *The Open Enzyme Inhibition Journal* 2008;1,72-9.
6. Beckham TH, Elojeimy S, Cheng JC, et al. Targeting sphingolipid metabolism in head and neck cancer: rational therapeutic potentials. *Expert Opin Ther Targets*. 2010;14:529-39.
7. Chalfant CE, Rathman K, Pinkerman RL and et al. De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *J Biol Chem* 2002;277,12587-95.
8. Mao C, Obeid LM. Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta* 2008;1781:424-34.
9. Strelow A, Bernardo K, Klages SA, et al. Overexpression of acid ceramidase protects from tumor necrosis factor induced cell death. *J Exp Med* 2000;192:601-11.
10. Kolesnick R. The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway, *J Clin Invest* 2000;110:3-8.
11. Liu X, Cheng JC, Turner LS, et al. Acid ceramidase upregulation in prostate cancer: role in tumor development and implications for therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2009;13:1449-1458.
12. Mahdy AEM, Cheng JC, Li Jun. Acid ceramidase upregulation in prostate cancer cells confers resistance to radiation: AC inhibition, a potential radiosensitizer. *Mol Ther* 2009;17:430-8.
13. Huerta S, Gaulet EJ, Huerta-Yepe S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res* 2007;139:143-56
14. Engedal N, Saatcioglu F. Ceramide-induced cell death in the prostate cancer cell line LNCaP has both necrotic and apoptotic features. *Prostate* 2001;46:289-97
15. Realini N, Solorzano C, Pagliuca C, et al. Discovery of highly potent acid ceramidase inhibitors with in vitro tumor chemosensitizing activity. *Scientific Reports* 2013;3:1-7.
16. Hu W, Xu R, Sun W, et al. Alkaline ceramidase 3 hydrolyzes unsaturated long chain ceramides and its down regulation inhibits both cell proliferation and apoptosis. *J Biol Chem* 2010;285:7964-76.
17. Zweelan Ratnan S, Quian C, Yokomiza, A, et al. Human acid ceramidase is overexpressed but not mutated in prostate cancer, *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2000;29:137-46.
18. Proksch D, Klein JJ, Arenz C, et al. Potent inhibition of acid ceramidase by novel B-13 analogues. *J Lipids* 2011;971618:1-8.
19. Holman DH, Turner LS. Lysosomotropic acid ceramidase inhibitor induces apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Chem Pharm* 2008; 61:231-42.
20. Saad AF, Meacham WD, Bai A, et al.. The functional effects of acid ceramidase overexpression in prostate cancer progression and resistance to chemotherapy. *Cancer Biol Ther* 2007;9:1455-60.
21. Morales A, Paris R, Villanueva A, et al. Pharmacological inhibition or small interfering RNA targeting acid ceramidase sensitizes hepatoma cells to chemotherapy and reduces tumor growth in vivo. *Oncogene* 2006; 26:905-16.
22. Domracheva I, Muhamadejev R, Petrova M, et al. 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) increases Carmofur stability and in vitro antiproliferative effect. *Toxicology report* 2015; 2, 377-383.