

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

**4T1 VE 4THMpc FARE MEME KANSER HÜCRE HATLARINDA  
ANTIANGİOGENİK ANTİTÜMORAL İLAÇ OLAN  
TALİDOMİT'İN  
TEK BAŞINA VE RADYOTERAPİ İLE KOMBİNE OLARAK  
ANGİOGENİK FAKTÖRLERDEN P MADDESİ İLE P MADDESİNİ  
PARÇALAYAN NEPRİLİZİN VE ADAM-10 ENZİMLERİ ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Ece ŞİMŞEK ÖZ**

**DOKTORA TEZİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**2010**

**4T1 VE 4THM<sub>pc</sub> FARE MEME KANSER HÜCRE HATLARINDA  
ANTIANGİOGENİK ANTİTÜMORAL İLAÇ OLAN  
TALİDOMİT'İN  
TEK BAŞINA VE RADYOTERAPİ İLE KOMBİNE OLARAK  
ANGİOGENİK FAKTÖRLERDEN P MADDESİ İLE P MADDESİNİ  
PARÇALAYAN NEPRİLİZİN VE ADAM-10 ENZİMLERİ ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Ece ŞİMŞEK ÖZ**

**DOKTORA TEZİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**2010**

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

**4T1 VE 4THMpc FARE MEME KANSER HÜCRE HATLARINDA  
ANTIANGİJENİK ANTİTÜMORAL İLAÇ OLAN  
TALİDOMİT'İN  
TEK BAŞINA VE RADYOTERAPİ İLE KOMBİNE OLARAK  
ANGİJENİK FAKTÖRLERDEN P MADDESİ İLE P MADDESİNİ  
PARÇALAYAN NEPRİLİZİN VE ADAM-10 ENZİMLERİ ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Ece ŞİMŞEK ÖZ**

**DOKTORA TEZİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından  
107T204 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**2010**

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

**4T1 VE 4THM<sub>pc</sub> FARE MEME KANSER HÜCRE HATLARINDA  
ANTIANGİOGENİK ANTİTÜMORAL İLAÇ OLAN  
TALİDOMİT'İN  
TEK BAŞINA VE RADYOTERAPİ İLE KOMBİNE OLARAK  
ANGİOGENİK FAKTÖRLERDEN P MADDESİ İLE P MADDESİNİ  
PARÇALAYAN NEPRİLİZİN VE ADAM-10 ENZİMLERİ ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Ece ŞİMŞEK ÖZ**

**DOKTORA TEZİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez 01/06/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.**

**Prof.Dr. Kayahan FIŞKIN (Danışman)**

**Prof. Dr. Zafer EREN**

**Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU**

**Prof.Dr. Bülent KAYA**

**Doç.Dr. Aylin Fidan KORCUM**

## ÖZET

# 4T1 ve 4THMpc FARE MEME KANSER HÜCRE HATLARINDA, ANTI-ANJİOGENİK ANTİTÜMORAL İLAÇ OLAN TALİDOMİT'İN TEK BAŞINA ve RADYOTERAPİ ile KOMBİNE OLARAK, ANJİOGENİK FAKTÖRLERDEN P MADDESİ ile P MADDESİNİ PARÇALAYAN NEPRİLİZİN ve ADAM-10 ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ece ŞİMŞEK ÖZ

**Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN**

**Haziran 2010, 121 Sayfa**

Bu çalışmada amacımız, anti-anjiogenik ve anti-tümoral özellikteki Talidomit adlı ilacın, fare meme kanseri hücre hatlarında, anjiogeneizde rol oynadığı bilinen iki enzim ve bu iki enzimin substratı olan P maddesi üzerine etkilerinin incelenmesidir. Yapılan dört farklı sitotoksikite testinin sonuçlarına göre, 40 µg/ml'lik Talidomit dozu, tek başına ve 45 Gy radyoterapi ile kombine olarak, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, 4T1 ve 4THMpc fare meme kanseri hücre hatları üzerine sitotoksik etki göstermiştir. Belirlenen dozlarda Talidomit ve radyoterapinin birlikte, kaspaz-3'ü aktive ettiği, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği, ADAM 10 ve Neprilizin enzim aktivitelerindeki artışa bağlı olarak, P maddesi seviyelerinin kontrol gruplarına oranla düşmesine yol açtığı *in vitro* bir çalışmada ilk kez gösterilmiştir.

Sonuç olarak, talidomit ve radyoterapi kombinasyonu 4T1 ve 4THMpc fare meme kanser hücre hatlarında tedavilerin tek başına denendiğinde yarattığından daha fazla sitotoksik etkiler yaratmıştır. Elde ettiğimiz veriler, tumor hücrelerinde her iki tedavinin de etkinliğini artırmayı hedef alan yeni kombinasyon stratejileri için zemin oluşturabilir.

**ANAHTAR KELİMELER:** 4T1, 4THMpc, ADAM-10, Talidomit, Neprilizin

**JÜRİ:** Prof.Dr. Kayahan FIŞKIN (Danışman)

Prof.Dr. Zafer EREN

Prof.Dr. Atila YANIKOĞLU

Prof.Dr. Bülent KAYA

Doç.Dr. Aylin Fidan KORCUM

## ABSTRACT

**THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF  
THALIDOMIDE  
AN ANTIANGIOGENIC AND ANTITUMORAL DRUG, ALONE AND IN  
COMBINATION WITH RADIOTHERAPY ON SUBSTANCE P LEVEL AS WELL  
AS SUBSTANCE P DEGRADING ENZYMES; ADAM-10 AND NEPRILYSIN IN  
4T1 AND 4THMpc MOUSE BREAST CANCER CELL LINES  
Ece SİMSEK OZ**

**Ph.D. Thesis in Biology**

**Supervisor: Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN**

**June 2010, 121 Pages**

In this study, our aim was to investigate the effect of Thalidomide, known as antiangiogenic and antitumoral drug, alone or in combination with radiotherapy, on the amount of substance-P, an angiogenic factor, and on the substance-P degrading ADAM-10 and Neprilysin Enzyme Activities in 4T1 and 4THMpc mouse breast cancer cell lines. According to four different cytotoxicity test results, at the end of the 72 hour, 40 µg/ml thalidomide and 45 Gy Co<sup>60</sup> irradiation alone showed significant cytotoxic effects on 4T1 and 4THMpc mouse breast cancer cell line. We demonstrate for the first time that at specified doses, thalidomide and irradiation together activates caspase-3, inhibits *in vitro* proliferation of 4T1 and 4THMpc breast cancer cells directly, potentiates the activity of ADAM 10 and Neprilysin enzymes. Moreover, as the result of changes in ADAM 10 and Neprilysin activity, measured SP levels were decreased when compared to the relative controls. We suggest that thalidomide and radiation together, lead hydrolysis of SP to its bioactive fragments and thus induce apoptosis. These data may provide the basis for strategies, in which it is possible to use thalidomide and irradiation together to enhance the apoptosis of tumor cells for improving the efficiency of each independent therapy.

**KEY WORDS:** 4T1, 4THMpc, Thalidomide, Substance P, ADAM-10, Neprilysin

**COMMITTEE:** Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN (Advisor)

Prof. Dr. Zafer EREN

Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU

Prof. Dr. Bülent KAYA

Assoc. Prof. Dr. Aylin Fidan KORCUM

## ÖNSÖZ

Kanser, sık görülmesi ve ölüm oranının çok yüksek olması nedeniyle yüzyılın en korkulan, en tehlikeli hastalıklarından birisidir. Kısaca, hücrelerdeki DNA'nın mutasyona uğraması ve bu hücrelerin kontrolsüz şekilde bölünüp çoğalması sonucu oluşan kanserin moleküler temeli aydınlatıldıkça, tedavisi ile ilgili umutlar artmaktadır. Günümüzde sağlık alanındaki çalışmaların büyük bir kısmı kanserin önlenmesi ve tedavisi üzerine yoğunlaşmaktadır.

Kanserin tedavisi ile ilgili en yeni yaklaşımlardan birisi de kanserli hücreye metastaz yolunu açan anjiogenez mekanizmasının bloke edilmesidir. Kanser hücresinin primer yerinden, kan ve/veya lenf dolaşımına katılma yolu ile sekonder bir alana göç etmesi olarak tanımlanan metastaz kanser tedavisinde oldukça önemli dönüm noktalarından birisidir. Kanser nedeniyle meydana gelen ölümlerin asıl nedeninin farklı organlarda meydana gelen sekonder tümörler olduğu gerçeği göz önüne alındığında anjiogenezin bloke edilmesi, kanserle mücadelenin temel hedeflerinden en önemlisi haline gelmiştir.

Önceden var olan küçük kan damarlarından yenilerinin oluşması anlamına gelen anjiogenez, embriyogenez ve yara iyileşmesinin yanı sıra, diabetik retinopati, artrit gibi yeni damar oluşumuyla seyreden pek çok hastalıkta olduğu gibi, tümör büyümesi için de önem taşımaktadır. VEGF: damar endoteli büyüme faktörü, FGF: fibroblast büyüme faktörü, TGF-beta: transforme edici büyüme faktörü gibi bazı uyarıcılar anjiogenezi tetiklemektedir. Anjiogenezin baskılanmasına yol açan endojen faktörlerden en önemlileri ise interferonlar, bazı interlökinler, proteaz inhibitörleri ve angiostatin, endostatin gibi endojen bazı peptitlerdir. Bu bağlamda anjiogenez inhibitörleri olarak adlandırılan pek çok ilacın prelinik ve klinik aşamada çalışmaları devam etmektedir. Talidomit de antianjiogenik özelliği nedeniyle tedavide kullanılan fakat etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamış ilaçlardan bir tanesidir.

Bu bilgilerin yanı sıra, fizyolojik stres durumu ile ilişkili olarak malignansinin gelişiminde merkezi sinir sisteminin de potansiyel bir rolü olabileceği düşünülmektedir. Özellikle stres ile tetiklenmiş nöroendokrin ve immün fonksiyonların kansere bağlı ölümlere katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Kanserle ilişkilendirilen en önemli nöropeptitlerden bir tanesi de P maddesidir. P maddesi ile kanser arasındaki ilişki henüz

netlik kazanmasa da aralarında bir ilişkinin olduğu yadsınamaz bir gerçektir. Tüm bu gerçeklerin ışığında, biz de tez kapsamında Talidomit'in antianjiogenik özelliğini P maddesi ve onu parçalama yeteneğindeki iki enzim üzerinden gösterip göstermediğini test etmek istedik. Elde ettiğimiz verilerin kanser tedavisinde bilim insanlarını bir adım daha ileriye götüreceğini umut etmekteyiz.

Öncelikle, tez çalışmamı, 107T204 no'lu araştırma projesiyle destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkür ediyorum.

Akademik hayatımın devamını sağlayan, Doktora öğrencisi olabilme onurunu ömrümün sonuna kadar büyük bir şerefle taşıyacağım, attığım her adımda destek olan, düştüğümde elimden tutup kaldıran ve bana bu konuda çalışma olanağı veren danışmanım Sayın Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN'a, proje kapsamındaki çalışmaların büyük kısmını yürüttüğümüz Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma Uygulama Merkezi çalışanlarına ve Doç. Dr. Nuray ERİN'e, sevgili meslektaşım, partnerim, kardeşim Arş. Gör. Esra AYDEMİR ve ailesine, meslektaşım, canım arkadaşım, kardeşim Dr. Elif ODABAŞ KÖSE ve ailesine, 1996 yılında başladığım Biyoloji eğitimim boyunca bilgileri ve ilgileri ile üzerimde emeği olan tüm Bölüm Hocalarıma ve Asistan arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Hayatımın anlamı, en değerli hazinem, sevgili ailem, annem Bedihe ŞİMŞEK, babam Elhem ŞİMŞEK ve kardeşim Ata Fırat ŞİMŞEK'e, can yoldaşım, hayat arkadaşım, sevgili eşim Öner ÖZ'e ve bebeğime sonsuz şükran ve sevgilerimi sunuyor ve DOKTORA TEZİ'ni AİLEME ithaf ediyorum.



## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI.....	4
2.1 Kanser.....	4
2.1.1. Meme kanseri.....	6
2.2 Apoptoz.....	7
2.3 Anjiogenez.....	11
2.3.1. Anjiogenez ve kanser.....	12
2.3.2. Anjiogenez rol oynayan enzimler .....	14
2.3.2.1. Matriks metallo proteazlar (MMP).....	14
2.3.2.2. Disintegrin ve metalloproteazlar (ADAM'lar).....	17
2.3.3. Anjiogenez modülatörleri.....	19
2.3.4. Antianjiogenik terapi .....	21
2.3.4.1. Talidomit .....	22
2.3.5. Klasik kanser tedavileri .....	24
2.3.6. Cerrahi müdahale ile tümörün uzaklaştırılması .....	24
2.3.7. Kemoterapi .....	25
2.3.8. Radyoterapi .....	26
2.3.9. Kombine kanser tedavileri .....	27
2.3.10. Anti-anjiogenik terapi kombinasyonları.....	28
2.3.11. P maddesi .....	32
2.3.11.1. P maddesini parçayan neprilizin .....	34
3. MATERYAL ve METOT .....	37
3.1 Hücre Kültürü Şartlarının Belirlenmesi.....	37

3.2 Radyoterapi Dozunun Belirlenmesi .....	37
3.3 Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi.....	38
3.3.1.Talidomit dozlarının optimizasyonu ve standardizasyonu.....	38
3.3.2. MTT hücre canlılık testi .....	38
3.3.3. Live-Dead canlılık/sitotoksisite testi .....	39
3.3.4. <i>Tripan mavisi</i> testi .....	40
3.3.5. Kaspaz-3 enzim aktivitesi .....	40
3.4 Talidomit'in P Maddesi Üzerine Etkileri .....	41
3.4.1. P maddesi ölçümleri için optimizasyon.....	41
3.4.2. P maddesi ölçümleri için besi yerinin ve hücrelerin hazırlanması.....	42
3.4.2.1. Oasis protein ekstraksiyon protokolü.....	42
3.4.2.2. Hücre içerisinde bulunan P maddesi miktarının saptanması...	43
3.4.3. P maddesi ölçüm protokolü .....	43
3.4.4. P maddesi miktarının tespiti.....	43
3.5 ADAM-10 ve Neprilizin Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerin Belirlenmesi.	44
3.5.1. ADAM-10 enzim aktivitesinin belirlenmesi .....	44
3.5.2. Neprilizin enzim aktivitesinin belirlenmesi .....	45
3.6 Western-Blot Yöntemi ile Enzim Aktivitelerinin Gösterilmesi.....	46
3.6.1. Western-blot deneylerinde kullanılan solüsyonların içerikleri.....	46
3.6.2. 4T1 ve 4THMpc hücrelerinin western-blot için hazırlanması .....	48
3.6.3. Jellerin hazırlanması .....	48
3.6.4. Örneklerin jele yüklenmesi ve SDS-PAGE .....	49
3.6.5. Antikorlarla işaretleme .....	49
3.6.6. Membranın görüntülenmesi .....	50
3.7 İstatistiksel Analiz.....	50
4. BULGULAR .....	51
4.1 Radyoterapinin 4T1 ve 4THMpc Hücre Hatları Üzerine Etkisi .....	51
4.1.1. Radyoterapinin 4T1 hücre hattı üzerine etkisi .....	51
4.1.1.1. Farklı dozlarda radyoterapi uygulamasının 4T1 hücre hattı üzerine etkisi.....	51

4.1.2. Radyoterapinin 4THMpc hücre hattı üzerine etkisi.....	55
4.1.2.1. Farklı dozlarda radyoterapi uygulamasının 4THMpc hücre hattı üzerine etkisi.....	55
4.2 Talidomit'in Sitotoksik Etkileri.....	58
4.2.1. MTT test sonuçları .....	58
4.2.2. Live/Dead test sonuçları .....	73
4.2.3. <i>Tripán Mavisí</i> test sonuçları .....	80
4.2.4. Kaspaz-3 enzim aktivitesi test sonuçları .....	81
4.3 Talidomit'in ADAM-10 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	83
4.4 Talidomit'in Neprilizin enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	85
4.5 Talidomit'in P Maddesi Miktarları Üzerine Etkileri.....	86
4.5.1. 4T1 hücre hattında Talidomit'in P Maddesi Miktarları Üzerine Etkileri..	86
4.5.2.4THM hücre hattında Talidomit'in P Maddesi Miktarları Üzerine Etkileri	87
4.6 Talidomit'in Western blot sonuçları.....	88
4.6.1. Talidomit'in ADAM 10 enzimi Western blot sonuçları .....	88
4.6.2. Talidomit'in Neprilizin enzimi Western blot sonuçları .....	88
5. TARTIŞMA.....	89
5.1 Radyoterapinin 4T1 ve 4THMpc Hücre Hattı Üzerine Etkisi.....	89
5.2 Talidomit'in Sitotoksik etkileri.....	90
5.3 Talidomit'in ADAM-10 ve Neprilizin Enzim Aktiviteleri ile P maddesi Üzerine Etkileri.....	97
6. SONUÇ .....	104
7. KAYNAKLAR.....	106
8. ÖZGEÇMİŞ	

## **SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ**

### **Simgeler**

%	Yüzde
°C	Santigrad Derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
ml	Mililitre
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

### **Kısaltmalar**

4THMpc:	4T1 Heart Metastases Post Capsaicin
<sup>60</sup> Co:	Kobalt 60
ACE:	Angiotensin Dönüştürücü Enzim
ADAM:	A Disintegrin and A metalloproteaz
ANP:	Atrial Natriüretik Peptit
APP:	Amiloyid Öncül Protein
APS:	Amonyum per Sülfat
Arg:	Arjinin
Asp:	Aspartik asit
Aβ:	Amiloyid Beta
bFGF:	Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
BSA:	Bovin-Serum-Albumin
CAM:	Koryoallantoik Membran
DAG:	Dansil-D-Ala-Gly
DAGPNG:	Dansil-D-Ala-Gly-p-nitro-Phe-Gly
ddH <sub>2</sub> O:	Çift Distile Su

DMSO:	Dimetilsülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
ECM:	Ekstraselüler Matriks
EDTA:	EtilenDiamin Tetra Asetik Asit
EIA:	Eliza-Immün-Assay
FGF:	Fibroblast Büyüme Faktörü
Gln:	Glisin
Gy:	Gray
HIF 1- $\alpha$ :	Hipoksi İndükleyici Faktör 1- alfa
IL-6:	İnterlökin 6
kDa:	Kilo Dalton
Leu:	Lösin
Lys:	Lizin
MAPK:	Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinaz
MDR:	Çoklu İlaç Direnci
Met:	Metiyonin
MMP:	Matriks Metallo Proteaz
mRNA:	Mesajcı Ribonükleik Asit
MTT:	3-(4,5)-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NaCl:	Sodyum Klorür
NEP:	Neprilizin
NEP:	Neprilizin Enzimi
NF- $\kappa$ B:	Nüklear faktör Kappa-B
NK-1R:	Nörokinin-1 Reseptörü
PAGE:	Poliakrilamid Jel Elektroföresi
PBS:	Fosfat-Tuz- Tamponu
PD-ECGF:	Platelet-Kökenli Endotel Hücre Büyüme Faktörü
pH:	Bir Solüsyonun Asitlik yada Bazlık Değeri
Phe:	Fenil alanin
PPT-A:	PreProTakikinin-A
Pro:	Prolin
PVDF:	Poliviniliden Florid

rpm:	Dakikadaki Devir Sayısı
RT:	Radyoterapi
sAPP:	Salınabilir form APP
SDS:	Sodyum Dodesil Sülfat
TACE:	TNF- $\alpha$ Dönüştürücü Enzim
TAL:	Talidomit
TAPI:	Tace İnhibitörü
TBS:	Tris-Tuz-Tamponu
TBST:	TBS+ Tween 20
TEMED:	Tetra Etil MetilenDiamid
TFA:	TriFloroAsetik Asit
TGF- $\beta$ :	Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta
TIMP:	Metallo Proteazların Doku İnhibitörü
TNF- $\alpha$ :	Tümör Nekroz Faktör- alfa
Val:	Valin
VEGF:	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
VIP:	Vasoaktif İntestinal peptit

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Tezin Amacı.....	3
Şekil 2.1. Kanser gelişiminin genetik, epigenetik ve fenotipik gelişimi .....	5
Şekil 2.2 Kanser hücrelerinde saptanan altı genetik özellik .....	6
Şekil 2.3. Apoptoz yolları.....	9
Şekil 2.4. Anjiogenezin şematik resmi .....	12
Şekil 2.5. Metastazın şematik olarak gösterilmesi .....	13
Şekil 2.6. MMP' lerin yapısal bölgeleri.....	15
Şekil 2.7. ADAM'lardaki yapısal bölgeler ve fonksiyonlar.....	17
Şekil 4.1. 5 Gray Radyoterapinin 4T1 hücreleri üzerine etkisi.....	53
Şekil 4.2. 10 Gray Radyoterapinin 4T1 hücreleri üzerine etkisi.....	53
Şekil 4.3. 20 Gray Radyoterapinin 4T1 hücreleri üzerine etkisi.....	54
Şekil 4.4. 45 Gray radyoterapinin 4T1 hücreleri üzerine etkisi.....	54
Şekil 4.5. 5 Gray Radyoterapinin 4THMpc hücreleri üzerine etkisi.....	56
Şekil 4.6. 10 Gray Radyoterapinin 4THMpc hücreleri üzerine etkisi.....	56
Şekil 4.7. 20 Gray Radyoterapinin 4THMpc hücreleri üzerine etkisi.....	57
Şekil 4.8. 45 Gray radyoterapinin 4THMpc hücreleri üzerine etkisi.....	57
Şekil 4.9. DMSO'nun sitotoksik etkisi, 4T1, 1000 hücre.....	58
Şekil 4.10. DMSO'nun sitotoksik etkisi, 4T1, 3000 hücre.....	59
Şekil 4.11. DMSO'nun sitotoksik etkisi, 4T1, 5000 hücre.....	59
Şekil 4.12. DMSO'nun sitotoksik etkisi, 4THMpc, 1000 hücre.....	60
Şekil 4.13. DMSO'nun sitotoksik etkisi, 4THMpc, 3000 hücre.....	60
Şekil 4.14. DMSO'nun sitotoksik etkisi, 4THMpc, 5000 hücre.....	61
Şekil 4.15. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan Talidomit grubu 24 saat deney sonuçları .....	62
Şekil 4.16. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan radyoterapi grubu 24 saat deney sonuçları .....	62
Şekil 4.17. 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan Talidomit grubu 24 saat deney sonuçları .....	63
Şekil 4.18. 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan radyoterapi grubu 24 saat deney sonuçları .....	63
Şekil 4.19. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan	

24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu deney sonuçları. ....	64
Şekil 4.20. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu deney sonuçları. ....	64
Şekil 4.21. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu deney sonuçları. ....	65
Şekil 4.22. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu deney sonuçları. ....	65
Şekil 4.23. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu deney sonuçları. ....	66
Şekil 4.24. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu deney sonuçları. ....	66
Şekil 4.25. 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu deney sonuçları. ....	67
Şekil 4.26. 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu deney sonuçları. ....	67
Şekil 4.27. 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu deney sonuçları. ....	68
Şekil 4.28. 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu deney sonuçları. ....	68
Şekil 4.29. 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu deney sonuçları. ....	69



Şekil 4.30. 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu deney sonuçları. ....	69
Şekil 4.31. 4T1 hücrelerinde (5000 hücre) tek başına radyoterapinin 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda gözlenen etkisi.....	70
Şekil 4.32. 4T1 hücrelerinde (5000 hücre) tek başına radyoterapinin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda gözlenen etkisi.....	70
Şekil 4.33. 4T1 hücrelerinde (5000 hücre) tek başına radyoterapinin 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda gözlenen etkisi.....	71
Şekil 4.34. 4THmpc hücrelerinde (5000 hücre) tek başına radyoterapinin 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda gözlenen etkisi.....	71
Şekil 4.35. 4THMpc hücrelerinde (5000 hücre) tek başına radyoterapinin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda gözlenen etkisi.....	72
Şekil 4.36. 4THMpc hücrelerinde (5000 hücre) tek başına radyoterapinin 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda gözlenen etkisi.....	72
Şekil 4.37. Kombine tedavinin 4T1 ve 4THMpc hücre hatları üzerine etkisi ve gruplar arasındaki farklılıklar.....	73
Şekil 4.38. 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu % canlı ve ölü hücre oranları.....	74
Şekil 4.39. 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu % canlı ve ölü hücre oranları.....	74
Şekil 4.40. 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu % canlı ve ölü hücre oranları.....	75
Şekil 4.41. 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu % canlı ve ölü hücre oranları.....	75
Şekil 4.42. 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu % canlı ve	

ölü hücre oranları.....	76
Şekil 4.43. 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu % canlı ve ölü hücre oranları.....	76
Şekil 4.44. 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu % canlı ve ölü hücre oranları.....	77
Şekil 4.45. 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu % canlı ve ölü hücre oranları.....	77
Şekil 4.46. 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu % canlı ve ölü hücre oranları.....	78
Şekil 4.47. 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu % canlı ve ölü hücre oranları.....	78
Şekil 4.48. 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu % canlı ve ölü hücre oranları.....	79
Şekil 4.49. 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu % canlı ve ölü hücre oranları.....	79
Şekil 4.50. Tripan mavisi test sonuçlarına göre hücre canlılık oranlarında gruplar arası farklılıklar.....	80
Şekil 4.51. Talidomit, 4THMpc hücreleri ( $1 \times 10^6$ ) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan deneylerde, 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası Kaspaz-3 enzim aktivitesindeki artış.....	81
Şekil 4.52. Talidomit, 4T1 hücreleri ( $1 \times 10^6$ ) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan deneylerde, 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası Kaspaz-3 enzim aktivitesindeki artış.....	83

Şekil 4.53. Talidomit'in 4T1 hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda ADAM-10 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	84
Şekil 4.54. Talidomit'in 4THMpc hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda ADAM-10 enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	84
Şekil 4.55. Talidomit'in 4T1 hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda Neprilizin enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	85
Şekil 4.56. Talidomit'in 4THMpc hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda Neprilizin enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	85
Şekil 4.57. Talidomit'in 4T1 hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre içindeki ve besi yerine salınan P maddesi üzerine etkileri.....	86
Şekil 4.58. Talidomit'in 4THMpc hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre içindeki ve besi yerine salınan P maddesi üzerine etkileri.....	87
Şekil 4.59. Talidomit'in tek başına ve radyoterapi ile kombine olarak ADAM-10 enzim aktivitesi üzerine etkilerinin western-blot ile gösterilmesi.....	88
Şekil 4.60. Talidomit'in tek başına ve radyoterapi ile kombine olarak Neprilizin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin western-blot ile gösterilmesi.....	88

## **ÇİZELGELER DİZİNİ**

Çizelge 4.1. 4T1 ve 4THMpc hücreleri üzerine etki göstermeyen radyoterapi dozları...	52
Çizelge 4.2. 4T1 ve 4THM hücre hatlarının Farklı Talidomit Dozları ve İnkübasyon Sürelerindeki Canlılık Oranları.....	79

## 1. GİRİŞ

Ölüme neden olan hastalıklar arasında, kalp ve damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alan kanser, yüzyılın en büyük bütçeli araştırma projelerinin ana hedefi haline gelmiştir. Önlenmesi, teşhisi ve tedavisi için dünyanın hemen her ülkesinde pek çok bilim adamı çalışmalarını hızla sürdürmektedir. Bu çalışmalar sayesinde ve kanserin moleküler temeli aydınlatıldıkça tedavisine dair umutlar artmaktadır.

Klinik aşamada kanserin tedavisinde kullanılan üç ana yöntem bunmaktadır. Sitotoksik etkiye sahip etken maddelerin ve öldürücü etkiye sahip radyasyonun kullanılmasıyla primer tümör hücrelerinin öldürülmesini hedefleyen kemoterapi ve radyoterapi en çok tercih edilen yöntemlerin başında yer almaktadır. Bu yöntemlerin çaresiz kaldığı durumlarda ise bazı kanser türleri için kesin çözüm olma özelliğine sahip cerrahi müdahale yöntemi kullanılmaktadır. Bu üç yöntem, tek başına tedavi amaçlı kullanılsa da, pek çok kanser tipinde başarı sağlanamadığı için ikili ya da üçlü kombinasyonların kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (Weinberg 1996).

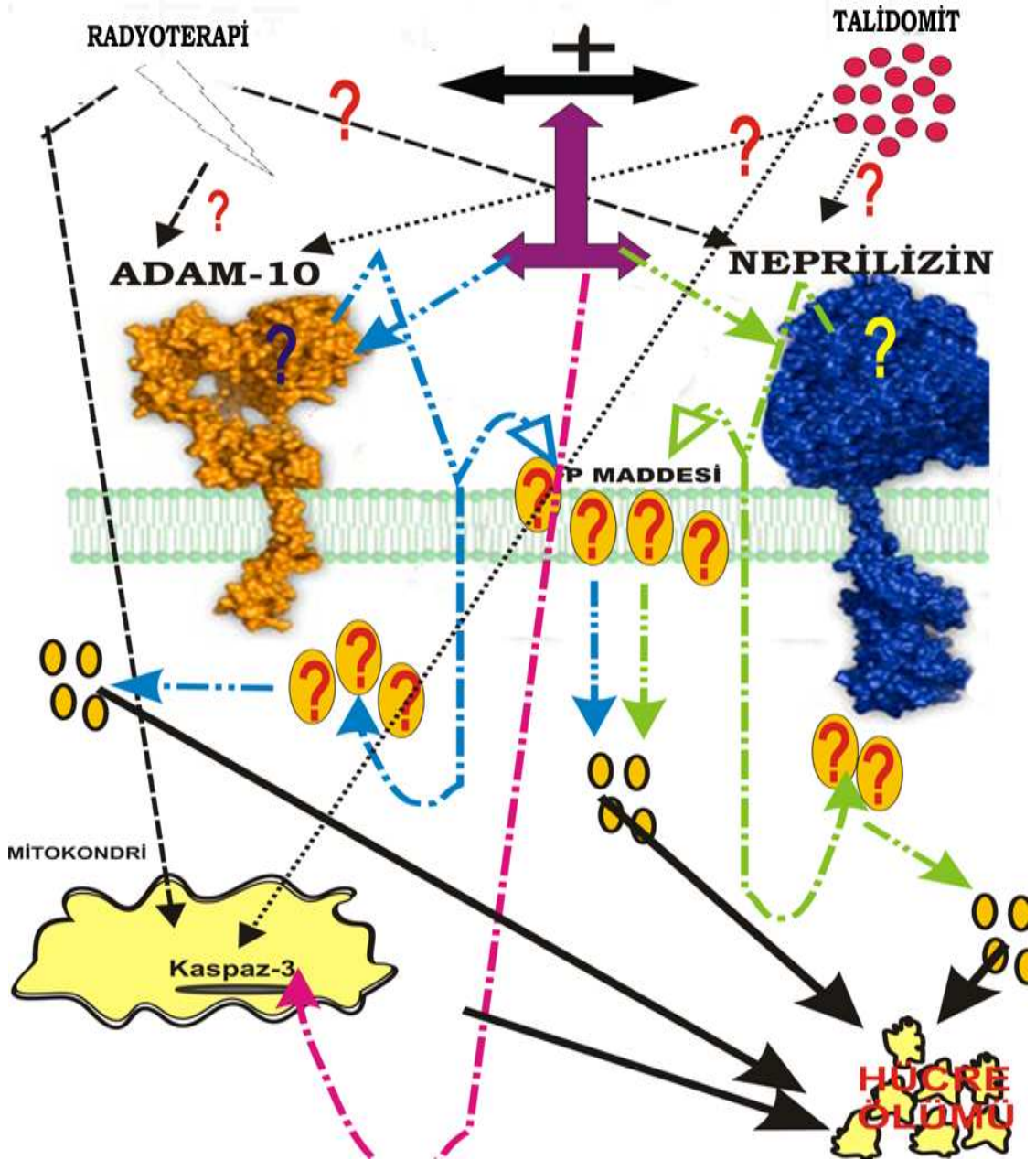
Kanser tedavisinde başarı sağlanamamasının temel nedenlerinden biri de, kansere bağlı ölümlerin primer tümörden çok, uzak organlardaki sekonder tümörlerden kaynaklanıyor olmasıdır. Bu gerçeğin gün ışığına çıkmasıyla birlikte kanser hastaları için yeni umutlar da filizlenmektedir. Primer tümörle mücadele ederken, diğer yandan sekonder tümör oluşumunun engellenmesi tedavi başarısını artıracaktır. Yani tedavideki yeni hedeflerden bir tanesi, kanser hücrelerinin buldukları dokudan kan ve/veya lenf dolaşımını geçerek sekonder doku ve organları işgal etmesi anlamına gelen metastazın bloke edilmesidir (Mareel ve Leroy 2003).

Bir tümör hücresinin, karmaşık ve çok basamaklı bir süreç olan metastazı başarabilmesi için aşması gereken pek çok bariyer vardır. Bu bariyerlerden ilki tümörden bir kanser hücresinin ayrılmasıdır. Bağımsız hale gelen kanser hücresi daha sonra stromadan geçerek kan ya da lenf dolaşımına katılmalı, bu sayede farklı organların kapiller kan damarları ağına geçebilmeli ve ulaştığı organın parankim

dokusunu işgal ederek orada çoğalabilmelidir (Erenpreisa ve Cragg 2007). Bu noktada kanser tedavisi için temel hedeflerden biri daha gün yüzüne çıkmıştır. Tümör mikroçevresinde bulunan epitel, endotel ve immün hücreler tarafından salgılanan bir takım mitojenik faktörler aracılığıyla var olan kan damarlarından yenilerinin oluşması süreci olan anjiogenez tetiklenmektedir. Tümöre büyümesi için gerekli olan besin ve oksijenin taşınmasından sorumlu yeni damarlar anjiogenez sürecinde oluşmaktadır. Anjiogenezin, kanser tedavisindeki temel hedefler içerisinde yer almasındaki ana prensip ise anjiogenezin metastazı kolaylaştırmasıdır. Bu bağlamda, anjiogenezin bloke edilmesi de kanser tedavisindeki popüler tedavi yaklaşımlarından biridir (Ingber 2008).

Tez kapsamında etken madde olarak seçilen Talidomit adlı ilaç, hali hazırda hem sitotoksik hem de antianjiogenik özellikleri nedeniyle kanser tedavisinde sıkça kullanılan ilaçlardan birisidir. Ancak, sahip olduğu bu sitotoksik ve antianjiogenik özellikleri hangi yolaklar üzerinden gerçekleştirdiği henüz netlik kazanmamıştır. Bu nedenle biz de Talidomit'in *in vitro* koşullarda antianjiogenik etkisini kanserle en sık ilişkilendirilen nöropeptitlerden biri olan P maddesi ve P maddesini parçalayan ADAM 10 ve Neprilizin enzimleri üzerinden gösterip göstermediğini test etmek istedik. Bununla birlikte son dönemde yine oldukça revaçta olan kemoterapi ve radyoterapi kombine tedavisinin, bu yolak üzerinde bir etki yaratıp yaratmayacağını ortaya koymayı amaçladık (Şekil 1.1).

Var olan ilaçların etki mekanizmalarının aydınlatılmasıyla, ilaçların daha etkili şekilde kullanılması ve tedavide başarı sağlanması hedeflenmektedir. Bu nedenle, elde ettiğimiz bulguların başarılı bir tedaviye uzanan karanlık basamaklardan birine daha ışık tutacağını umut etmekteyiz.



Şekil 1.1. Tezin Amacı

## 2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

### 2.1. Kanser

Kanser günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biridir. Kalp ve damar hastalıklarından sonra ölüme neden olan hastalıklar arasında ikinci sırada yer alan kanser, kısaca genomda meydana gelen değişiklikler sonucu oluşan bir hastalıktır. Bu gün bilinen 100'den fazla kanser çeşidi vardır. Kansereleşme süreci, karmaşık, çok basamaklı bir süreçtir ve her bir kanser tipinin farklı biyolojik özellikleri vardır. Ancak, bu kadar farklı tipte kanser olsa da, temelde tüm kanser tipleri için iki önemli ortak özellik bulunmaktadır. Bu özelliklerden ilki, kanserin tipi ne olursa olsun, hücresel genlerin ekspresyonlarında yâda baz dizilimlerinde değişmelerin olmasıdır. İkinci ortak özellik ise, mutasyona uğramış ve kansereleşmiş hücrelerin sınırsız çoğalma potansiyeline sahip olmalarıdır (Ponder 2001).

Genlerde meydana gelen mutasyonlar hücrede iki temel olaya neden olur:

a) kanserin meydana gelmesi ve b) kanserin ilerlemesi. Ayrıca, bir hücrenin kansereleşmesi için iki grup gende mutasyon olmalıdır. Bu genler ise proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdir. Bu bağlamda proto-onkogenleri onkogene dönüştüren mutasyonlar fonksiyon kazanımı mutasyonları, tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar ise fonksiyon kaybettirici mutasyonlar olarak tanımlanır (Weir vd 2004). Bu mutasyonlar hemen her kanser tipinde ortak olduğu için kansereleşmenin birinci basamağı olarak kabul edilmektedirler (Mareel ve Leroy 2003) (Şekil 2.1.).

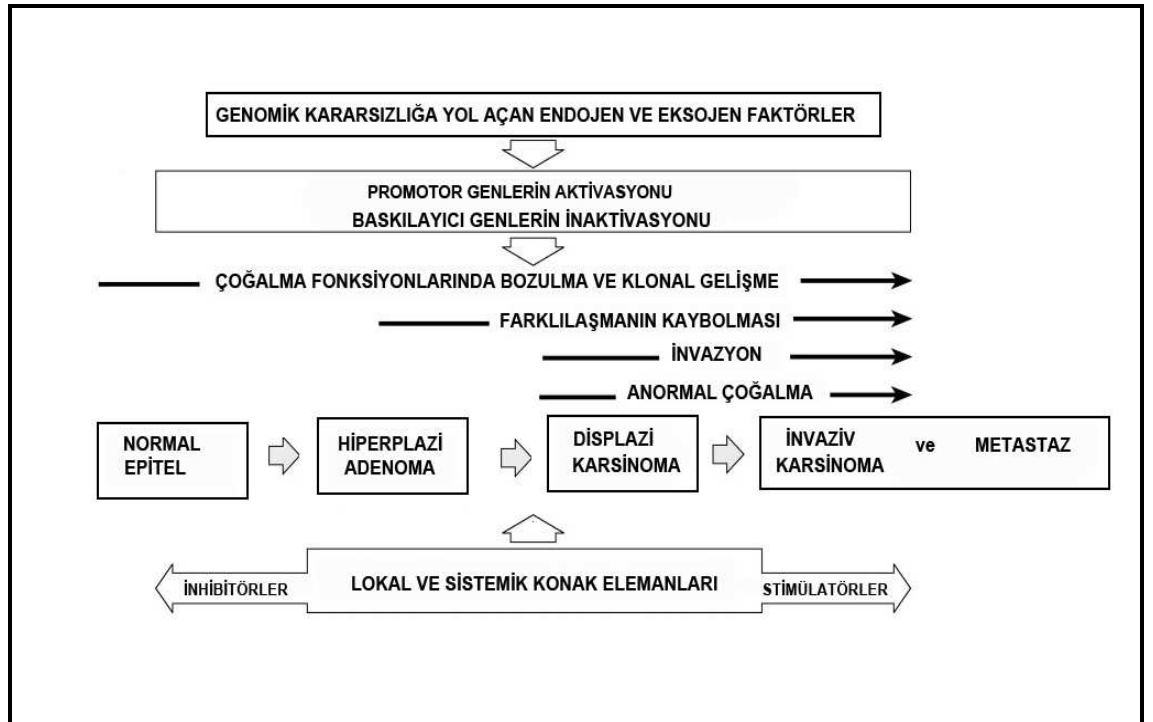
Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, kanser hücrelerinden yüzden fazla onkogene, otuzdan fazla tümör baskılayıcı gende mutasyon olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, hücrede DNA hasarının onarılmasından sorumlu genlerde de mutasyonlara rastlandığı bildirilmiştir. DNA'da meydana gelen hasar, DNA'nın tamirinden sorumlu genlerde meydana gelen mutasyon sonucu tamir edilemezse, bir sonraki kuşak hücrelerinde

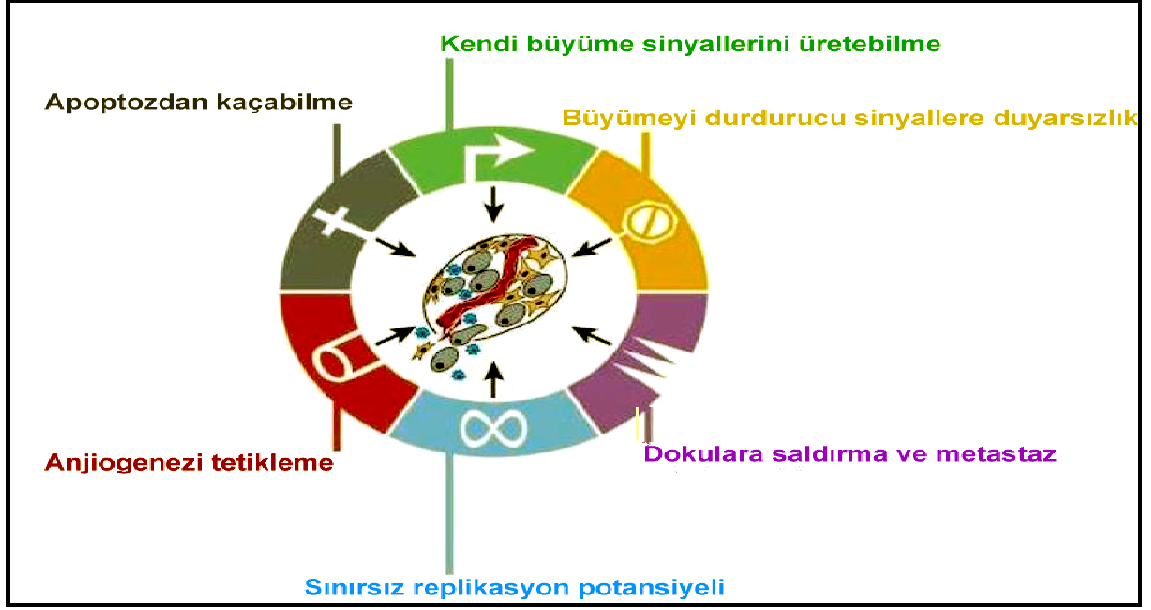


mutasyon oranının artmasına neden olacağı için kanser hücresine mutator bir fenotip kazandırmaktadır (Fearon 1997).

Bir kanser hücresinin malignant özellik kazanmasını sağlayan altı farklı özellik vardır. Bunlar:

- 1- Büyüme sinyalleri bakımından kendi kendilerine yetebilme
- 2-Büyüme durdurucu sinyallere karşı duyarsız olma
- 3-Apoptozdan kaçabilme
- 4-Sınırsız üreme potansiyeline sahip olma
- 5-Anjiogenezi tetikleyebilme
- 6-Dokulara saldırma ve metastaz yeteneğidir (Şekil 2.2.).





Şekil 2.2. Kanser hücrelerinde saptanan altı genetik özellik (Hanahan ve Weinberg 2000'den alınmıştır)

### 2.1.1. Meme kanseri

Batı ülkelerinde, kadınlar arasında kanserle ilişkili ölümlerin birinci nedeni olmaya devam eden meme kanserinin, tıpkı diğer kanserlerde olduğu gibi, kesin bir tedavisi yoktur. Meme kanseri, meme dokusundaki süt bezleri ve süt kanallarını döşeyen hücrelerin kanserleşmesi sonucu oluşur ve dört evresi vardır. Dördüncü evre meme kanseri artık metastaz yapmış durumdadır. Meme kanserinin en çok metastaz yaptığı bölgeler ise; lenf nodülleri, kemik dokusu, akciğer, karaciğer, beyin ve böbrek üstü bezleridir (Hortobagyi ve Buzdar 1995).

Her kanser tipinde görülen onkogen amplifikasyonları ya da tümör baskılayıcı gen delesyonları meme kanserinde de görülmektedir. Bunun yanı sıra, ekstraselüler matriks (ECM)'e ya da hücre membranına bağlı büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınımı ve aktivasyonu, ayrıca karsinomla ilişkili fibroblast, inflamatuvar ve immün hücreler gibi ECM'nin hücresel bileşenleri meme stromasının tümörjenik potansiyeli üzerinde oldukça önemlidir (Wiseman ve Werb 2002, Fata vd 2004, Hojilla vd 2008).

Tez çalışması kapsamında kullanılan 4T1 hücreleri, Balb/c farelerde kendiliğinden oluşan meme kanserinden elde edilmiştir. 4THMpc hücreleri ise kapsaisin verilmiş

farelerde oluşan kalp metastazlarından elde edilmiş ve adlandırılmıştır (**4T1 Heart Metastases Post Capsaicin**). 4THMpc hücrelerinde 4T1 hücreleri ile karşılaştırıldığında, sıkı bağlantı ve yapışma bağlantı komplekslerinde görevli küçük bir grup gen değişmiştir. Özellikle, sıkı bağlantı kompleksi proteinlerinden Klaudin 4 ve 7 ile yapışma bölgesi proteinlerinden gama-katenin proteininin genleri downregüle olmuştur. Bu üç genin downregüle olması kanser hücresinin daha agresif olmasına neden olur. Bu nedenle, 4THMpc hücreleri 4T1 hücrelerine kıyasla daha agresiftir. 4T1 hücreleri ile karşılaştırıldığında, 4THMpc hücrelerinde 9 genin upregüle, 245 genin ise down regüle olduğu gösterilmiştir (Erin vd 2009).

## 2.2 Apoptoz

1920 yılında ışık mikroskopunun keşfi ile birlikte hücre ölümü kavramı ilk kez kullanılmıştır. 1970'li yıllarda ise sitotoksik ajanlar, yüksek sıcaklık, radyasyon gibi faktörlerin tümör hücrelerini apoptoza yönlendirdiği keşfedilmiştir. Apoptoz mekanizmasının aydınlatılmasıyla birlikte ortaya çıkan her basamak apoptoz-hedefli terapilerin temelini oluşturmuş ve kanser tedavisi açısından değerlendirilmiştir (Zornig vd 2001).

*Caenorhabditis elegans*'tan insana kadar tüm çok hücreli canlılarda görülen, evrimsel olarak çok iyi korunmuş programlı hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoz, gereksiz, zararlı ya da hasarlı somatik hücrelerin bağlantılı ve düzenli şekilde ölmesini sağlayan bir mekanizmadır (Cummings vd 2004, Heemst vd 2007).

Genel olarak apoptoza uğrayan bir hücrede, plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulmasına bağlı olarak hücre hacminin 1/3'ü kaybedilir. Bunu takiben, plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, sitoplazma ile çevrili kromatin parçalarından ibaret olan apoptotik cisimciklere parçalanır (Öktem vd 2001). Apoptoz hücrede özellikle de nükleusda önemli morfolojik değişiklikler yaratması ile karakterize edilir. Tipik apoptotik değişiklikler; hücrelerde büzüşme, kabarcıklaşma ve kromatin kondensasyonudur. Apoptotik hücrelerdeki nüklear DNA, endonükleaz ile oldukça özgül bir biçimde kesilerek internükleozomal

bölgelerden 180–200 baz çifti büyüklüğünde fragmentlere ayrılır (Chinnaiyan vd 1996, Narula vd 1997).

Apoptoz sırasında hücre membranı asimetrisini kaybeder ve fosfatidilserin hücre yüzeyinden salınmaya başlar. Bu, makrofajlara gönderilen “beni ye!” sinyalidir. Oluşan apoptotik cisimlerdeki fosfatidil serin, fagositik hücrelerde bulunan vitronektin, lektin yapıdaki reseptörlere tutunur ve fagositik hücrelerce yok edilir. Bu nedenle çevre dokularda inflamasyona yol açmaz (Cohen 1998, Fadok vd 2000).

Apoptozun fizyolojik rolleri arasında, embriyogenez sırasında bazı canlılarda parmaklar arasındaki perdenin ve damak gelişimi sonrası epitel hücre kalıntılarının ortadan kaldırılması, organ gelişimi sırasında fazla üretilen hücrelerin ortadan kaldırılması, metamorfoza uğramış veya yaşlanmış ve bu yüzden fonksiyonlarını kaybetmiş hücrelerin ortadan kaldırılması, hormona bağımlı bir şekilde görülen organ gerilemeleri, sürekli bölünen dokularda hücre sayısının azaltılması ve immün hücrelerin yok edilmesi yer almaktadır (Wyllie 1986, Gavrieli vd 1992, Carson ve Ribeiro 1993, Soini vd 1998).

Memeli hücrelerde apoptoz, hücre içi ve hücre dışı birçok sinyal tarafından kontrol edilen intrinsik (mitokondriyel) ya da ekstrinsik (ölüm reseptörleri) yollardan biri ile aktive edilir (Şekil 2.3.). Ekstrinsik yolak dışarıdan gelen sinyaller sonucunda başlar ve membranda bulunan Fas gibi ölüm reseptörlerini aktive eder. Aktive olan ölüm reseptörü kaspaz 8'i, kaspaz 8 ise kaspaz 3'ü aktive eder ve tBid'in parçalanması sonucunda mitokondriden sitokrom C salınımı gerçekleşir. Sitokrom C'nin salınımı sadece mitokondri membranının parçalanmasına değil, bu aşamadan sonra kaspazların peş peşe aktive olmasına da yol açar.



Şekil 2.3. Apoptoz yolakları (Heemst vd 2007'den alınmıştır)

Apoptoz mekanizması içerisinde kaspazlar (sistein aspartil spesifik proteazlar) olarak adlandırılan proteaz enzimlerinin anahtar rolleri vardır. Bu intraselüler proteaz enzim grubu substratlarını aspartik asit (Asp) uçlarından keser. Öncelikle inaktif zimojenler halinde sentezlenirler ve daha sonra hepsinde korunmuş olan Asp bölgelerinden proteolitik olarak kesilerek aktifleşirler. Buradan da anlaşılacağı kaspazlar birbirlerini aktive edebilirler. Apoptoz sürecinde, pek çok hücre protein kaspazlar tarafından parçalanır. Parçalanmış proteinler aktin ve laminler gibi yapısal proteinler olabileceği gibi bazı sinyal proteinler de olabilir. Bu proteinlerin parçalanması sonucunda apoptoz belirteçleri olarak değerlendirilen DNA'nın fragmentasyonu, hücre çekirdeğinin parçalanması ve sitoplazma membranının kabarcıklaşması gibi temel olaylar gerçekleşmektedir. DNA'nın fragmentasyonunu sağlayan DNaz enzimi de kaspazlar tarafından kesilerek aktifleştirilir (Zheng vd 1998).

Kaspaz ailesinin bilinen 14 üyesi vardır. Biyolojik fonksiyonları göz önüne alınarak üç sınıfa ayrılırlar:

- 1- Sitokin aktivatörleri: Kaspaz-1,-4,-5,-11,-12,13 ve -14
- 2- Apoptoz başlatıcıları: Kaspaz-2,-8,-9 ve -10
- 3- Apoptoz cellatları: Kaspaz-3, -6 ve -7

Apoptoz kanser hücrelerinin aşması gereken en önemli bariyerdir. Ancak, tümör hücreleri apoptoz mekanizmasına direnç geliştirmeyi sağlayacak pek çok strateji geliştirmiştir. Örneğin, anti-apoptotik moleküllerin sentezi artarken pro-apoptotik moleküllerin sentezlenmesi baskılanmış ya da ölüm reseptör yolağındaki proteinlerin miktarı azalmış olabilir. Apoptoz mekanizmasında oluşacak hatalar, tümörün patogenezi açısından oldukça önemlidir. Çünkü bu hatalar sonucunda kanserleşmeye başlayan hücreler tasarlanan yaşam sürelerinden daha uzun süre canlı kalacaklar, dışarıdan alınması gereken büyüme faktörlerine olan ihtiyaçları ortadan kalkacak ve böylece hipoksiden (oksijen miktarında azalma) ve de oksidatif stresten korunabileceklerdir. Sonuç olarak tümör hacmi artmaya başlarken, hücre çoğalması için gereken büyüme sinyallerinde oluşacak bozukluklar, anjiogenezin tetiklenmesi, hücrenin hareket özgürlüğünde ve saldırganlığında artış gibi gerekli genetik değişikliklerin olması için yeterli zaman sağlanacaktır (Reed 1999).

Apoptozun bozulması, epitel hücrelerin ekstraselüler matrikse bağlı olmadan serbest hareket edebilmelerine yol açacağından metastazın da gelişimini destekler (Frisch ve Sreaton 2001). Sonuç olarak apoptozda meydana gelecek hatalar, uygulanacak tedavilere dirençli (kemoterapiye ve radyoterapiye) klonları yaratacak ve tümör hücrelerini öldürmek için daha yüksek dozların kullanılmasına yol açacaktır (Makin ve Hickman 2000). Bu nedenle kanser hücrelerinde bozulmuş olan apoptoz mekanizması üzerinde yapılacak araştırmalar, kanser biyolojisi açısından temel bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir.

Eğer kanser hücreleri cerrahi müdahale ile tamamen yok edilemiyorsa tüm yollar apoptoz ile onları yok etmeye işaret etmektedir. Günümüzde klinikte kullanılan tüm sitotoksik anti-kanser ajanları malignan hücrelerde apoptoz mekanizmasını tetiklemektedir. Kanser tedavisinde mikrotübüllere bağlanan ilaçlar ve DNA'da hasar yaratan ajanlar önemli silahlardır ancak apoptoz mekanizmasının moleküler temeli anlaşıldıkça, daha hedefli ve başarılı ilaçların yaratılması uzun zaman almayacaktır (Reed 2003).

### 2.3 Anjiogenez

1700'lü yılların başında Leonardo da Vinci'nin kan dolaşım sisteminin kalpten merkez olarak geliştiğini ileri sürmesini takiben bilim adamlarının ilgisi kan damarları üzerine odaklanmıştır (Risau 1997).

Anjiogenez terimini ilk kez 1787 yılında John Hunter kullanmıştır. O günden bu güne, anjiogenez terimi sıkça kullanılsa da mekanizması hakkında hala bilinmeyen ve aydınlatılmayı bekleyen pek çok nokta vardır (Folkman 1971). Başka bir deyişle anjiogenez yüzyıllardır kafaları karıştıran bir mekanizmadır.

Embriyoda damar gelişimi vaskulogenez, anjiogenez ve arteriogenez olmak üzere üç basamaktan oluşur (Calfa vd 2006, Carmeliet 2000). Bu terimlerden ilki, vaskulogenez, endotel hücre öncülleri tarafından kan damarlarının oluşumu olarak tanımlanır (Carmeliet 2003). Vaskulogenezde ilk olarak endotel hücreler primer vaskular ağı oluşturmak için bir araya gelirler. Daha sonra düz kas hücreleri ve perisitler ile iş birliği yaparak kan damarlarını oluştururlar. Anjiogenez ise var olan damarlardan yeni kan damarlarının filizlenmesi demektir. Hem vaskulogenezde hem de anjiogenezde endotel hücreler ve düz kas hücreleri birlikte iş görür. Arteriogenezde ise vaskular ağ daha büyük kolleteral arterlerin oluşumu için yeniden şekillenir. Bu süreçte damar boyunca gerçekleşen hücre göçleri, yeni filizlerin oluşumu ve hücrelerin çoğalmaları gözlenir (Calfa vd 2006).

Anjiogenez çözülebilir faktörler, ECM bileşenleri ve hücreler arasında gerçekleşen karmaşık bir mekanizmadır ve dört temel basamak içerir. Bunlar sırasıyla;

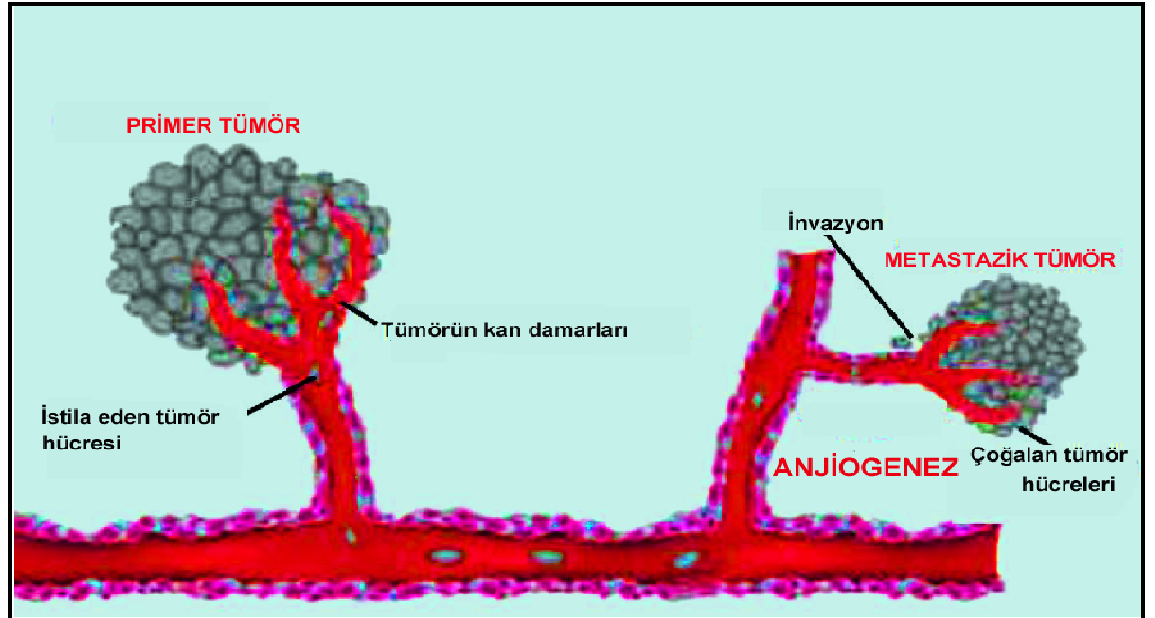
- 1-Proteazlar tarafından bazal membranın yıkılması
- 2-Hücreler arası boşluğa endotel hücrelerin göçü ve yayılmaları
- 3-Göç bölgesindeki endotel hücrelerin çoğalması
- 4-Çoğalan endotellerin yan yana dizilerek lümen oluşturması, yeni bazal membranın perisitler yardımı ile yapılması, anastomozların oluşumu ve en sonunda eski bir damara tutunmak şartı ile kan akışının sağlanması olarak sıralanabilir (Bussolino vd 1997).

Embriyonik gelişim, yara iyileşmesi, organ hipertrofisi, menstural dönemin kontrolü gibi hayati öneme sahip bazı olayları düzenleyen anjiogenezin mekanizmasının fizyolojik ve patolojik olmak üzere iki tipi vardır (Carmeliet 2003).

Kanser, anjiogeneze bağlı olarak gelişen hastalıklar arasında en dikkat çekenidir. Judah Folkman'ın 1971 yılında tümör büyümesinin anjiogeneze bağlı olduğunu ileri süren hipotezinden sonra pek çok bilim adamı kanser ve anjiogenez arasındaki ilişkiyi araştırmaya yönelmiştir (Folkman 1971).

### 2.3.1. Anjiogenez ve kanser

Bir hücrenin kanser hücresine dönüşümü için gerekli olan onkogenik mutasyonlar sonrasında, hücrede hangi biyolojik özellik değişirse değişsin, besin ve oksijene olan ihtiyaç ve atık maddelerin uzaklaştırılması gerekliliği asla değişmez. Başka bir ifade ile pek çok özellikleri bakımından normal hücrelerden ayrılan kanser hücreleri, tıpkı normal hücreler gibi büyümek ve farklılaşmak için oksijene ve besine gereksinim duymaktadır. Tümör hücresinin bu temel ihtiyaçlarını karşılayabilmesi için yeni ve kendine özgü damarlar oluşturması (anjiogenez) gerekmektedir (Şekil 2.4.).

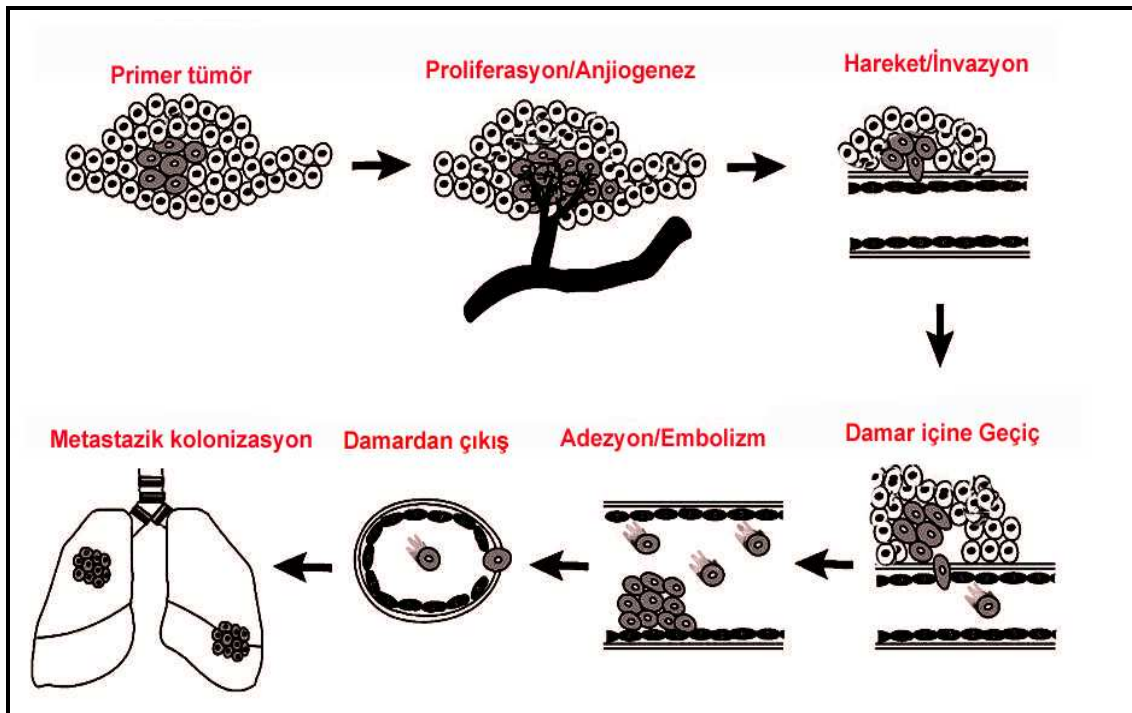


Şekil 2.4. Anjiogenezin şematik resmi (Pandya vd 2006'dan alınmıştır)



Eğer tümör, anjiogenez sayesinde yeni kan damarları oluşturmayı başarır ise bu damarlar kısa sürede tümörü kuşatarak çevreler. Bu sayede ihtiyacı olan besin ve oksijeni sağlayan tümör hızla büyümeye başlar (Folkman ve Ingber 1992, Bamiyas ve Dimopoulos 2003, Neal ve Berry 2006).

Tümör hücrelerinde hücre-hücre ve hücre-matriks arasındaki uyumun bozulması sonucunda proteaz enzimleri salınmakta ve ekstraselüler matriks ya da kan damarlarının duvarları gibi kendi çevresindeki dokuların yapısı bozulmaktadır. Bu sayede serbest hareket edebilme yeteneği kazanan primer tümör hücreleri kan veya lenf dolaşımı ile uzak noktalara taşınabilmektedir. Metastaz olarak adlandırılan bu olay, kanser mekanizması içerisindeki en önemli basamaklardan birisidir. Metastazın gerçekleşebilmesi için kanser hücreleri mutlak suretle kan damarlarına geçebilmeli ve bu sayede dolaşım sistemi ile uzak noktalara taşınabilmelidir (Şekil 2.5). Bu bağlamda anjiogenez mekanizması tümörün büyümesi ve metastazı için çok kritik önem taşımaktadır (Folkman 1990, Kerbel ve Folkman 2002).



Şekil 2.5. Metastazın şematik olarak gösterilmesi (Liizumi vd 2008'den alınmıştır)

### 2.3.2. Anjiogenezde rol oynayan enzimler

Anjiogenezin ilk basamağında; göçü ve komşu dokuları istilayı kolaylaştırmak için ECM'nin üç bariyeri yeniden şekillendirilmelidir (Johnson vd 1994).

- 1) Endotel ile düz kas hücreleri ya da perisitler arasındaki bazal membran,
- 2) Fibrinojenden oluşmuş fibrin jel,
- 3) Hedef dokudaki matriks.

ECM hakkındaki ilk görüşler doku ve organlardaki hücrelerin tutunabilmesi için mekaniksel bir destek oluşturduğu yönündeydi. Günümüzde de bu rolün ECM'nin en büyük rolü olduğu hala kabul edilmektedir. ECM ve hücreler arasında önemli bir sinyal iletimi mevcuttur. Bütün besinler, hormonlar ve sitokinler damardan hücreye ECM'yi aşarak ulaşırlar. Dahası, hücreler hareket edebilmek için mutlaka ECM ile bağlantılarını kesmek ve ECM'yi parçalamak zorundadır. Hücreler bunu başarabilmek için, büyüme faktörleri salgılamaları ve hareket etmeleri için, plazmin sistem, lizozomal enzimler ve özellikle de matriks metalloproteazları (MMP)'da içeren pek çok proteolitik enzimi salgılamak zorundadır (Roy vd 2006). Bu enzimler;

- 1) Matriks metalloproteazlar (MMP)
- 2) Disintegrin ve metalloproteazlar (ADAM)
- 3) Trombospondin motifli disintegrin ve metalloproteazlar (ADAMT)
- 4) Serin proteazlar ve
- 5) Katepsin proteazlar'dır (Vandeputte-Rutten ve Gros 2002).

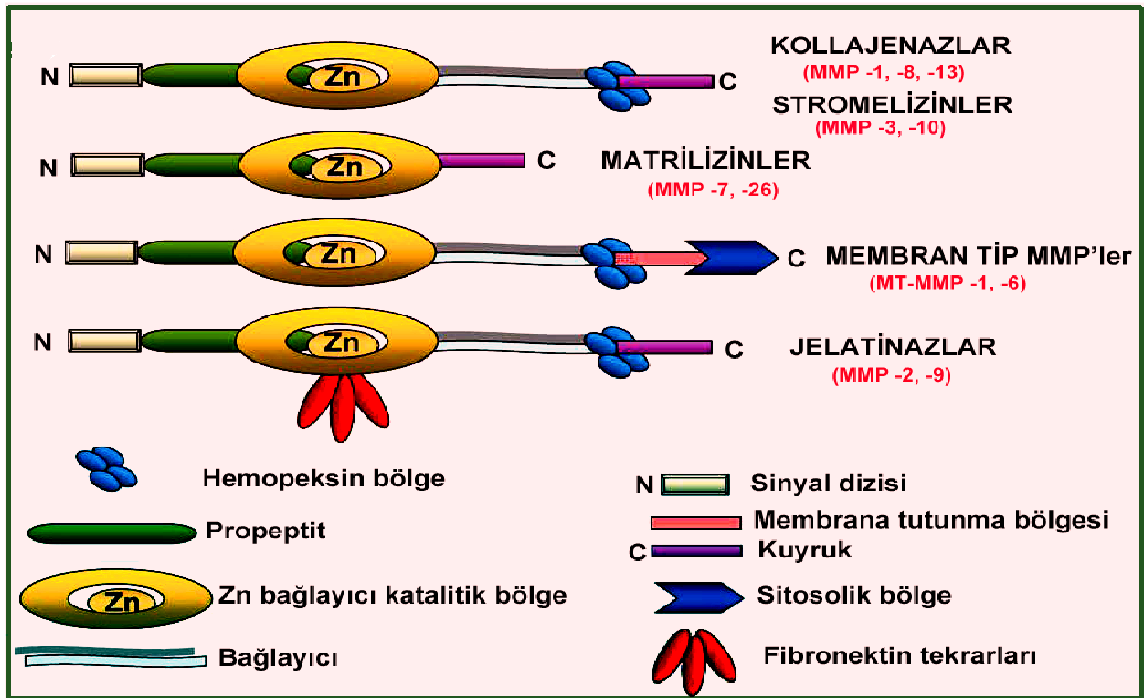
#### 2.3.2.1. Matriks metallo proteazlar (MMP)

Matriks metalloproteazlar (MMP), Matriksinler, omurgalı kollejenazlar ve matriks metalloproteinazlar olarak da adlandırılan çinko bağımlı endopeptidazların çok genli bir ailesidir ve ekstraselüler matriks (ECM) parçalanmasındaki hız sınırlayıcı basamakta aktivite göstermektedirler. MMP'ler, ECM, bazal lamina ve endotel hücrelerdeki sıkı bağlantı bölgelerine saldırarak kan-beyin bariyeri geçirgenliğini artırır ve bu yolla, akut nöroinflamasyona neden olurlar (Rosenberg 2009). Bu proteolitik enzimler benzer

yapılara sahiptirler ve ECM'nin bilinen tüm bileşenlerini parçalayabilme yeteneğindedirler. MMP aktivitesi transkripsiyonel seviyede ya da metalloproteazların doku inhibitörleri (TIMP) olarak bilinen bir grup endojen inhibitör tarafından da düzenlenebilirler (Moses 1997; Ala-Aho ve Kahari 2005).

MMP'lerin genel yapıları aşağıdaki bölgeleri içerir (Şekil 2.6.):

- Sentez boyunca enzimin gönüllü olarak endoplasmik retikulum'a girmesine rehberlik eden bir **sinyal peptit** kısmı,
- Uzaklaştırılıncaya ya da yıkılıncaya kadar enzimin korunmasını sağlayan **propeptit bölgesi**,
- Oldukça iyi korunmuş ve enzimin aktivitesi için gerekli **çinko bağlama bölgesi**,
- MMP'lerin substrat spesifikliğini belirleyen **hemopeksin bölgesi**,
- Hemopeksin bölgesinin, katalitik bölgenin aktif merkezine substratı sunmasını sağlayan **küçük menteşe (tutunma) bölgesi** (Roy vd 2006).



**Şekil 2.6.** MMP'lerin yapısal bölgeleri. Tüm MMP'lerde benzer şekilde bir organizasyon görülür. N-terminal bölgeleri bir sinyal peptittir (pro-peptit). Katalitik bölgelerinde korunmuş bir Zn bağlama bölgesi bulunur. Jelatinazlarda jelatine bağlanabilmek için 3 adet fibronektin tekrarı bulunur. Farklı uzunlukta olan bağlayıcı kısım N-terminal bölgeyi hemopeksinin C-terminaline bağlar (bu durum MMP7 de yoktur). MMP'ler membrana, membran bağlanma bölgesinin C-terminalinden tutunur (Sela vd 2009'dan alınmıştır)

MMP'ler tümör gelişiminde rol oynamaktadırlar. ECM'nin MMP'ler tarafından parçalanması, tümör ve endotel hücrelerin göçünü kolaylaştırdığı gibi, ECM'de depolanan, VEGF ve bFGF (bazik Fibroblast büyüme faktörü) gibi anjiogenik faktörlerin salınımını sağlayarak da anjiogenezi kolaylaştırır. MMP'lerin aktivitesi lehine proteolitik dengedeki değişimler normal ve patolojik durumlarda anjiogenezin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu yüzden doğal ya da sentetik MMP inhibitörlerinin anjiogenezdeki önemi oldukça fazladır (Van Wart ve Birkedal Hansen1990).

Bu güne kadar 24 tane MMP keşfedilmiştir ve bunlardan 23 tanesi insanda bulunmaktadır. Her bir MMP keşfedildiği sırayla isimlendirilmiştir ve aşağıda gösterildiği gibi altı büyük gruba ayrılırlar:

- 1) Kollejenazlar: MMP-1, 8, 13
- 2) Jelatinazlar: MMP-2, 9
- 3) Stromelisinler: MMP-3, 10,11
- 4) Matrilisinler: MMP-7, 26
- 5) Membran tip MMP'ler: MMP-14, 15, 16, 17, 24, 26 ve
- 6) Diğer MMP'ler: MMP-12, 19, 20, 23, 27, 28'dir (Egeblad ve Werb 2002).

MMP'ler, zimojen olarak üretilirler ve immün hücreler, inflamasyon hücreleri, fibroblastlar, stromal hücreler ile epitel hücrelerden salgılanırlar (Wiseman ve Werb 2002). MMP'lerin pek çoğu ekstraselüler proteolitik yıkımla aktive edilir. Enzimlerin yapısındaki korunmuş sistein aminoasidi, enzimin aktif bölgesindeki katalitik çinko atomu ile kovalent olarak etkileşir. Böylece, aktif merkezin bir su molekülü ile etkileşimi önlenmiş olur. İster propeptidin proteazlar tarafından kesilmesiyle, isterse sistein aminoasidinin SH grubunun kimyasal modifikasyonu ile olsun, çinko atomu-sistein etkileşiminin kesilmesi, katalitik çinko atomunun su molekülü ile etkileşimine neden olur. MMP'ler bu moleküller arası reaksiyonla aktive edilirler (Nagase 1997).

Bir kez aktive edildikten sonra, MMP'lerin aktiviteleri TIMP olarak bilinen endojen inhibitörler tarafından düzenlenir. TIMP'ler, MMP'leri spesifik olarak ve geri-

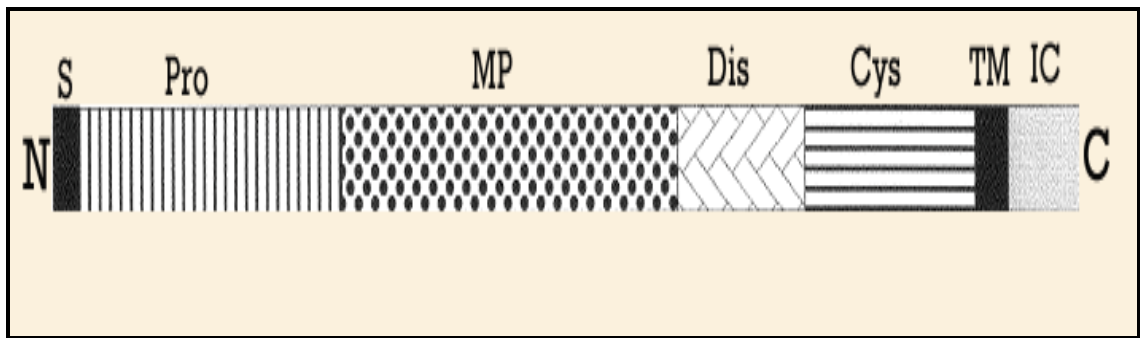
dönüşümlü inhibe ederler. Bu güne kadar 4 tip TIMP tanımlanmıştır. TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4 (Murphy ve Willenbrock 1995, Woessner 2001).

MMP'lerin rol oynadıkları olaylar; üreme, embriyonik gelişim, organ morfogenezi, yara iyileşmesi, anjiogenez, kemik yapılanması, sinir büyümesi, inflamasyon ve apoptozdur. Normal fizyolojik durumların dışında; Kanser, artrit, deri hastalıkları, kronik yara iyileşmesi, karaciğer fibrosisi, kardiovasküler hastalıklar, böbrek hastalıkları, periodontitis ve gastrik ülser gibi pek çok hastalık ile de ilişkilidirler. MMP'ler ayrıca anjiogenez ve nörojenez aktive ederek doku tamirinde de önemli rol oynarlar. (Folgueras vd 2004, Ala-Aho ve Kahari 2005).

### 2.3.2.2. Disintegrin ve metalloproteazlar (ADAM'lar)

ADAM'lar disintegrin ve metalloproteaz bölgelerine sahip, çok domainli, salgılanan, tip-1 membran gluko-proteinleridir ve yılan zehiri metalloproteazlar ve MMP'ler ile ilişkilidir. ADAM'lar endoplasmik retikulum'da sentezlenir ve golginin trans bölgesinin son kısmında olgunlaşır. Proteinin katlanması ve disülfid bağlarının oluşumu, proteinin şaperon özelliği gösteren N-terminal propeptiti tarafından gerçekleştirilir. Translasyon sonrası geniş çaplı glikolizasyon gerçekleşir (Murphy ve Willenbrock 1995).

ADAM'lar genel olarak beş bölgeye sahiptir (Şekil 2.7.).



**Şekil 2.7.** ADAM'lardaki yapısal bölgeler ve fonksiyonları. S, sinyal dizi; Pro, probölge; MP, metalloproteaz bölgesi (proteolizi gerçekleştirir); Dis, disintegrin bölgesi (adezyonu gerçekleştirir); Cys; sisteince zengin bölge (füzyonu sağlar); TM, transmembran bölgesi; IC, intraselular bölge (sinyal iletimini sağlar). Her bölgenin uzunluğu o bölgede bulunan aminoasit sayısını yansıtmaktadır (Fahrenhoiz vd 2000'den alınmıştır)

Bu bölgeler;

- 1) Propeptit
- 2) Metalloproteaz
- 3) Disintegrin benzeri bölge
- 4) Sisteince zengin bölge
- 5) Epidermal büyüme faktörü benzeri bölgelerdir.

ADAM'lar disintegrin bölgeleriyle integrinlere bağlanırken, sisteince zengin bölgeleri aracılığıyla proteoglikanlarla etkileşirler. ADAM'ların katalitik bölgesi ECM'ye ya da hücre membranına bağlı proteinlerin salınmasını sağlar. Membrana bağlı ADAM'lar transmembran ve sitoplazmik bölgelere de sahiptir. Bu güne kadar insanda ADAM ailesinin 29 üyesi tanımlanmıştır. Bu üyelerden bazıları çoğunlukla testislerde eksprese edilir ve üreme ile ilgili fonksiyonlara sahiptir. Ailenin diğer üyeleri ise çoğunlukla memeli dokularında eksprese edilmektedir (Seals ve Courtneidge 2003, Rosenberg 2009).

ADAM'lar mayoz bölünme, üreme ve nörogenez gibi normal gelişim boyunca ve alzheimer, artrit, kanser ve kardiyak hipertrofisi gibi bazı patolojik durumlarda, ayrıca hücre yüzeyinin yeniden şekillenmesinde, dış bölgelerin yenilenmesinde, büyüme faktörü salınmasında ve hücre-hücre ile hücre-matriks etkileşimlerinde farklı roller sergilemektedirler (Chubinskaya vd 2001). MMP'lerin aksine ADAM'ların gelişimsel ve patolojik anjiogenezdeki rolleri yeni çalışılmaya başlanmıştır (Apte 2004).

ADAM-10, TNF-alfa değiştirici enzim (TACE) ile oldukça anlamlı sekans homolojisine sahiptir ve ADAM ailesinin bir üyesidir (Yamazaki vd 1997). Her ikisi de  $\alpha$ -sekretaz aktivitesine sahip olan ADAM-10 ve TACE, amiloyid öncül protein (APP)'den salınabilir form APP'nin (sAPP) oluşturulmasında ve hücrel prion proteinin parçalanmasında görevli iki enzimdir. ADAM-10'un  $\alpha$ -sekretaz aktivitesine sahip olduğu, bu aktivitenin enzimin prodomain bölgesinden kaynaklandığı ve aşırı ekspresyonunun sAPP miktarını artırdığı gösterilmiştir (Lammich vd 1999, Colciaghi vd 2002). ADAM-10 mRNA'sının böbrek, dalak, lenf nodu, timus, karaciğer, kemik iliği ve beyinde eksprese edildiği gösterilmiştir (Rosendhall vd 1997, Millichip vd

1998). ADAM-10 ekspresyonunun pek çok kanser tipinde özellikle de meme kanserinde arttığı gösterilmiştir (Mochizuki ve Okada 2007). Ayrıca, memelilerde Notch sinyal yolağında, aksonal iletimde, başka bir ifade ile sinirsel gelişimde ve beyindeki fizyolojik bazı olaylarda rol aldığı bilinmektedir. Ayrıca birikimi sonrasında Alzheimer hastalığını yaratan amiloid öncül proteinleri de parçaladığı gösterilmiştir.

ADAM-10 enziminin tümörigenezde, invazyonda ve metastazda rol oynadığı pek çok tümör hücresi üzerinde gösterilmiştir. Pek çok hücrel sinyal iletim yollarında görev alan ADAM üyeleri membran proteinlerini parçalayarak çözülebilir olgun formlara dönüştürürler. ADAM-10'un biyolojik substratları arasında epidermal büyüme faktörü, betasellulin, Notch ve amiloid öncül protein bulunmaktadır (Hall ve Erickson 2003).

### **2.3.3. Anjiogenez modülatörleri**

Anjiogenez bir “şalter” ile kontrol altında tutulur. Bu şalterin “açılması” ya da “kapanması” bazı özgül moleküller tarafından kontrol edilmektedir. Anjiogenez şalterini açarak anjiogenezin tetiklenmesini sağlayan moleküllere anjiogenik ya da proanjiogenik ajanlar, bunun aksine şalteri kapatmak koşulu ile anjiogenezi inhibe eden moleküllere ise antianjiogenik ajanlar ya da anjiogenez inhibitörleri adı verilir. Eğer proanjiogenik ajanlar herhangi bir nedenle antianjiogenik ajanlardan daha fazla üretilmiş ise şalter açılır ve hızla yeni kan damarları oluşur (Pandya vd 2006). Bu şalterin açılması veya kapanması tümör büyümesini doğrudan etkiler. Hipoksi (yetersiz oksijen), hipoglisemi, mekanik stres ve buna benzer uyarılara karşı tümör hücresi anjiogenik faktörler salgılar. Tümör hücresi anjiogenik faktör salgılamasının yanı sıra herhangi bir anjiogenik faktörün ekstraselüler matriksten harekete geçmesine, kendi anjiogenik faktörlerini salgıladıkları bilinen makrofaj gibi bazı hücrelerin bir araya gelmesine ya da hepsinin birden gerçekleşmesine de neden olabilir (Rosen 2002, Bamias ve Dimopoulos 2003, Gupta ve Ren-Yi 2003).

Anjiogenik uyarımın gerçekleşmesini sağlayan pro-anjiogenik faktörler 1980'lerin başında tanımlanmaya başlanmıştır. O zamandan bu yana kabul edilen en önemli anjiogenik faktörler; vaskular endotelyal büyüme faktörü (VEGF), asidik ya da bazik

fibroblast büyüme faktörü (aFGF, bFGF), Platelet kökenli endotel hücre büyüme faktörüdür (PD-ECGF) (Gupta ve Ren-Yi 2003, Papaiakovou vd 2004).

Birçok deneysel çalışma primer tümörün uzakta bulunan sekonder bir tümörün büyümesini baskılayabildiğini göstermiştir. Bu sonuca dayanarak primer tümörden salınan bazı faktörlerin metastazı inhibe ettiği söylenebilir. O halde tümör hücreleri pro-angiogenik faktörlerin yanı sıra antiangiogenik faktörler de salar (Prehn 1993). Tümör hücresinin angiogenik olabilmesi için sadece angiogenik faktörlerin salınımının artması yeterli değildir, aynı zamanda antiangiogenik faktörlerin salınımı baskılanmalıdır. Çünkü antiangiogenik faktörlerin farklı hedefler ile angiogenezi inhibe edecek bazı mekanizmaları tetiklediği bilinmektedir. Antiangiogenik faktörlerin bilinen hedefleri arasında;

- 1- Endotel hücrelerin çoğalmasını teşvik eden büyüme faktörlerini inhibe etmek,
- 2- Endotel hücrelerin bazal membranı geçmesini sağlayan proteazları inhibe etmek,
- 3- Hücre içi sinyal transdüksiyon yolağını bozmak,
- 4- Endotel hücrelerin apoptoza yönelmesini sağlamak ya da onları hücre döngüsünde hapsedmek
- 5- Endotelleri oluşturan kemik iliği öncüllerini inhibe etmek,
- 6- Yeni damar oluşumu sırasında endotellerin ekstraselüler matrikse tutunmasını sağlayan  $\alpha\beta3$ -integrin-vitronekt etkileşimini ortadan kaldırmak yer almaktadır (Eckhardt 1999, Oehler ve Bicknell 2000).

Angiogenезin baskılanmasına yol açan endojen antiangiogenik faktörlerden en önemlileri; interferonlar, bazı interlekinler, proteaz inhibitörleri ve angiostatin, endostatin gibi endojen bazı peptitlerdir (Friesel vd 1987, Singh vd 1995, Fernandez vd 1999, Strieter vd 1995).

Gerçekleştirdikleri fonksiyonlar göz önüne alındığında angiogenез inhibitörleri dört gruba ayrılır (Gupta ve Ren-Yi 2003 ):

1-Angiogenik büyüme faktörlerini inhibe eden endojen ve ekzojen antiangiogenik faktörler,



- 2- Endotel hücrelerin canlılığını veya büyümesini etkileyen anti-anjiogenik faktörler,
- 3-Bazal membranı ve ekstraselüler matriksi hedef alan antianjiogenik faktörler,
- 4-Anjiogenik sinyal yolağını bozan antianjiogenik faktörler.

Antianjiogenik ajanlar etki ettikleri hücre tipine bağlı olarak üç farklı sınıfa ayrılır:

- 1- Doğrudan etki gösterenler: Endotel hücrelerini ve onların anjiogenezdaki rollerini hedef alırlar,
- 2- Dolaylı etki gösterenler: Tümör hücrelerinin ve çevresindeki hücrelerin anjiogenik faktörler üretmelerine engel olurlar ve/veya ekstraselüler mekanizma ile ilgili rol oynarlar,
- 3- Karışık etki gösterenler: Hem endotel hem de kanser hücrelerine etki ederler.

#### **2.3.4. Antianjiogenik terapi**

Antianjiogenik ajanların anjiogenezi önemli derecede baskıladığının ortaya çıkması bu ajanları kullanarak kansere alternatif bir tedavi yaratma fikrini doğurmuştur. Bu amaçla günümüze kadar pek çok çalışma yapılmıştır. Antianjiogenik ajanlar kullanılarak dizayn edilen terapiler doğrudan kanseri hedef alır çünkü her ne kadar heterojen yapıda olsalar da tüm kanser hücreleri anjiogenezi mutlak suretle tetiklemek zorundadır. Bu bağlamda antianjiogenik terapiler, anjiogenezi inhibe ettiği için, kanser tedavisi için önemli avantajlar sağlar:

- 1- Tek bir damarın binlerce tümör hücresi için gerekli besin ve oksijeni sağladığı düşünülürse, bu damarın baskılanması tümör hücrelerinin besin ve oksijensiz kalmasına dolayısıyla ya ölmelerine ya da dormant hale geçmelerine neden olur,
- 2- Bu terapi ile kan pıhtılaşmasının lokal başlangıç şeklinin değişimi sağlanabilir,
- 3- Endotel hücreler normal diploit hücrelerdir ve genetik mutasyonlara açık değildir dolayısıyla oldukça dayanıklıdırlar. Bu nedenle sitotoksik ilaçlara karşı kısa sürede direnç geliştirirler,
- 4- Biyolojik aktiviteyi gösteren en önemli özellik olan kan akışı klinikte ölçülebilir bir kriterdir,

- 5- Damarların fonksiyonlarında geçici de olsa meydana getirilebilen etkiler endotellerin ölümüne neden olur.

Anti-anjiogenik ajanlar henüz tümörün damara ihtiyacı yokken uygulanacak olursa, tümörün büyümesini engelleyen aşılarda gibi rol oynar. Anti-anjiogenik terapilerde temel olan anjiogenezi bloklamaktır. Anti-anjiogenik terapiler tümör oluşumunu değil tümörün büyümesini ve metastazını baskılamayı ya da inhibe etmeyi hedeflemelidir. Günümüzde klinik denemelerde kullanılan pek çok anti-anjiogenik ajan bulunmaktadır ancak etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmadığından hala anti-anjiogenik ve anti-tümöral özellikleri hızla araştırılan Talidomit bu ajanların en dikkat çekici olanlarından biridir.

#### **2.3.4.1. Talidomit**

Kanser için anjiogenezin önemi net bir şekilde ortaya konmuş olsa da kanser tedavisinde antianjiogenik ajanların kullanılmasıyla ilgili henüz çok fazla çalışma yoktur. Bununla birlikte kanser hastalarının yaşam sürelerini uzatmak için antianjiogenik terapinin geleneksel sitotoksik kemoterapi ve radyoterapi ile kombine edilmesi ile ilgili çalışmalar son dönemlerde oldukça önem kazanmıştır.

1954'te CIBA adlı farmosötik bir şirket tarafından sentezlenmiş ve sakinleştirici, bulantı önleyici ve uykusuzluğa karşı etkili bir ilaç olarak tanımlanmış olan Talidomit'in 1950'li yılların başında sakinleştirici özelliği nedeniyle özellikle hamilelik döneminde kullanımı yaygınlaşmıştır. Dünya çapında 37 farklı isimle piyasaya sürülmüştür. Talidomit bir glutamik asit türevidir ve kimyasal olarak barbituratlara benzer (Combe 2001).

Ekstremitelerde eksikliği ile dünyaya gelen bebeklerin sayısındaki artış dikkat çekici boyutlara ulaştığında, hamilelikte Talidomit kullanımının teratojenik etkiye neden olduğu açığa çıkmıştır. Özellikle hamileliğin 3-8. haftası arasında kullanımı oldukça risklidir. Dünya çapında yaklaşık 10 000 bebek hamilelik döneminde Talidomit kullanımına

bağlı olarak sakat doğmuştur ve ürün 1961'de Avrupa, 1962 yılında Kanada pazarlarından geri çekilmiştir (Okafor 2003).

Talidomit ( $\alpha$ -(N-ftalimido) glutarimid) kiral bir bileşiktir ve S(-) enantiomeri güçlü teratojenik ve antianjiogenik etki gösterir. Talidomit başlangıçta hamile bayanlarda kusmayı engellemek ve sedatif etki sağlamak için kullanılmakta idi. 1965 yılında ilacın bazı inflamatuvar ve oto immün hastalıkların tedavisinde başarılı sonuçlar verdiği gösterildi. Ancak fetal malformasyonlara neden olduğu saptanınca, 1961 yılında bu amaçla kullanımı yasaklanmıştır (Tseng vd 1996).

Antianjiogenik özelliği hakkında ilk bilgi D'Amato ve arkadaşlarının, tavşan korneasında yaptıkları çalışma sonucu ortaya çıkmıştır. Talidomit, bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ile indüklenen anjiogenezi tavşan korneasında baskılamayı başarmıştır (D'amato vd 1994). Talidomit'in anjiogenezi inhibe etme fonksiyonunun mekanizması henüz aydınlatılmamış olsa da bazı yolaklar üzerindeki etkisi belirlenmiştir:

- 1- VCAM-1 (CD106) ve E-selektin gibi bazı adhezyon moleküllerinin ekspresyonlarını inhibe eder (Geitz vd 1996),
- 2- VEGF reseptörleri üzerinde seramid aracılığı ile etki gösterir ve VEGF salınımını baskılar (Yabu vd 2005),
- 3- bFGF ve interlökin-10 (IL-10) gibi önemli proanjiogenik proteinlerin ekspresyonlarını baskılar (Bamias ve Dimopoulos 2003),
- 4- Tümör nekroz faktör-alfa (TNF $\alpha$ )'yı inhibe eder,
- 5- Sitokinlerin salınımını baskılar,
- 6- İmmün sistem üzerinde etki yaratır,
- 7- Hücre yüzey reseptörlerinden bazıları üzerinde değişik etkiler sergiler (Brock ve Lee 2002).

Talidomit'in solid tümörler üzerine gösterdiği etki pek çok bilim adamı tarafından çalışılmıştır. Bazı miyeloma ve glioma hastalarından, Talidomit uygulaması sonrasında olumlu yanıtlar elde edilmiştir. Kaposi sarkomalı ve prostat kanserli hastalarda ise tam anlamıyla pozitif olarak kabul edilemese de umut verici sonuçlar saptanmıştır.

Talidomit'in bilinen toksisitesini ve antitümör etkisini birlikte değerlendirmek için düzenlenen bir çalışma, melanomalı hastalar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Talidomit tek başına kullanılmış, hastalarda önemli bir toksisite sergilerken ortaya çıkarmayı başardığı antitümoral etkinin oldukça az olduğu saptanmıştır. Renal kanserlerde ise ancak yüksek dozlarda antianjiyogenik etki sergilemiştir. Ancak bu dozlarda toksisite sergilemesi beklendiği için bu tip tümörlerin tedavisinde denemesi önerilmez. Metastazik meme kanserli hastalarda Talidomit uygulaması, hiçbir pozitif etki yaratmamıştır (Quesada 2006). Başta teratojenite olmak üzere, mide bulantısı, nötropeni, ciltte oluşan döküntüler, geri dönüşümlü sensorik nöropati, baş dönmesi ve doza bağlı olarak ortaya çıkan uyku hali, Talidomit'in oluşturduğu en ciddi yan etkiler arasında yer almaktadır (Brock ve Lee 2002).

Son yıllarda Talidomit klasik antikanser tedavileri ile kombine edilerek, faz II ve faz III çalışmalarında denenmektedir (Quesada 2006). Talidomit, deksametazon ile birlikte uygulandığında etkisinde bir miktar artış saptanmıştır (Bamias ve Dimopoulos 2003). Talidomit'in tek başına antikanser etkisi oldukça zayıfken, kemoterapi ile birlikte uygulandığında gliomalarda, metastazik melanomalarda ve hormon salgılayıcı prostat karsinomlarında daha etkili olduğu saptanmıştır (Combe 2001).

### **2.3.5. Klasik kanser tedavileri**

Klasik kanser tedavileri olarak cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyoterapi 40 yılı aşkın süredir uygulanmaktadır (Kvols 2005).

### **2.3.6. Cerrahi müdahale ile tümörün uzaklaştırılması**

Kanser için bilinen en eski tedavilerden birisi cerrahi müdahale ile tümörün uzaklaştırılmasıdır. Tümörün tamamı alınarak başarılı bir sonuç elde edilebilir. Ancak primer tümörden ayrılan hücreler kana ya da lenfe geçmiş ise primer tümör alındıktan sonra da vücudun herhangi bir bölgesinde tümör gelişimi gözlenebilir. Bu nedenle cerrahi müdahale yapılacaksa genellikle kanserin henüz yayılmamış olması tercih edilir.

Bunun dışında, araştırmalar göstermektedir ki primer tümörün alınması, tümör hücreleri kalmışsa, ikinci bir kanser gelişiminin hızlanmasına neden olmaktadır çünkü tümörün uzaklaştırılması neoplastik hücrelerin proliferasyon, apoptoz ve metastaz gibi biyolojik özelliklerinin değişmesine neden olmaktadır. Bu gibi değişiklikler tümör oluşum sürecini hızlandırmaktadır. Primer tümör uzaklaştırıldıktan sonra, vücutta kalan kanser hücrelerinde apoptozun azaldığı ve proliferasyonun arttığı saptanmıştır. Farklı araştırmacılar ise primer tümörün uzaklaştırılmasının, hem primer hem de metastazik tümör hücrelerinde DNA sentezini artırdığını göstermişlerdir. Primer tümör uzaklaştırıldıktan sonra, TNF- alfa, İnterlökin-6 (IL-6) ve VEGF gibi bazı faktörlerin salınımı hızlanmaktadır. Bu durum tümörün büyümesine katkı sağlamaktadır. Eğer kanser çok fazla yayılmışsa cerrahi müdahale tedavide etkisiz olabilir (Coffey vd 2003).

### **2.3.7. Kemoterapi**

Kemoterapi, özellikle çoğalan hücrelere karşı seçici öldürücü etkileri olan, doğal veya sentetik kimyasal, biyolojik ajanlar ve hormonlarla yapılan tedavi şeklidir. 1960'lı yıllardan bu yana kullanıldığı bilinmektedir. Kemoterapide kullanılan ajanlar sitostatik ya da sitotoksik olabilir. Sitostatik ajanlar, hücre gelişimini hücre döngüsünün spesifik fazında durdurmak için kullanılırlar. Sitotoksik ajanlar ise hücreleri öldürürler.

Kemoterapi etkili bir tedavi olsa da bazı olumsuz sonuçlar doğurmaktadır. Kemoterapide kullanılan ilaçlara karşı, kanser hücrelerinde direnç gelişimi söz konusu olabilir. Bu direncin iç direnç (intrinsic resistance) veya kazanılmış direnç (acquired resistance) olabileceği düşünülmüştür. Bu direnç mekanizması hücre membranında yer alan ve bir protein olan 'P glikoproteini'nin ekspresyonuna bağlı olarak gelişir. P glikoproteini tıpkı bir pompa gibi çalışarak hücre içerisinden kemoterapötik ajanları hızla dışarı atmaktadır. Çoklu ilaç direnci (multiple drug resistance-MDR) olan hücrelerde MDR geninin çoğalmış olması P glikoproteininin bu hücrelerde fazlaca eksprese edildiğini işaret etmektedir. Bazı ajanların bu proteine daha fazla duyarlı olduğu bilinmektedir. Bunlar içerisinde antitümör ilaçlar, antibiyotikler, epipodofilotoksinler, doksorubisin, bleomisin ve vinka alkaloidleri yer almaktadır.

Kemoteröpatik ajanların seçici olmayan etkileşimlerinden tümör hücreleri kadar normal hücrelerde etkilenebilir ve toksisite gözlenebilir. Oluşan toksik yanıtlar sıklıkla ilaçlarda kullanılacak dozu sınırlar, bazı durumlarda hasta yaşamını tehdit edebilir ya da yaşam kalitesini bozabilir. Klinik uygulamalarda en sık gözlenen toksik yanıtlar; kemik iliğinde baskılanmaya bağlı lökopeni, trombositopeni, gastrointestinal sistemde mukozit, stomatit, bulantı, kusma, diyare ya da saç dökülmesidir (Akyol 2004).

### **2.3.8. Radyoterapi**

Fotonlar elektromanyetik dalgalardır. Normal dokular ile etkileşime girdiklerinde birçok biyolojik etki yaratan elektronlar açığa çıkar; elektronlar hücrede bulunan su ile birleşir ve sonuçta hidroksil radikali başta olmak üzere birçok radikal oluşur. Bilindiği gibi radikaller DNA üzerinde tek ve çift iplik kırıkları yaratarak hücrenin ölmesine (apoptoza) neden olur. Apoptozun tetiklenmesi tümör baskılayıcı bir genin (p53) ekspresyonundaki artışa bağlıdır. Ayrıca radyasyon hücre membranı ile de etkileşebilir. İyonize radyasyonun transforme edici büyüme faktörünün (TGF- $\beta$ ) salınımını tetiklediği de bilinmektedir (Nguyen vd 2002).

1895 yılında Roentgen tarafından X-ray tanımlanmış hemen ardından 1898 yılında Marie ve Pierre Curie radyumu keşfetmişlerdir. Bu tarihten sonra iyonize radyasyon etkileri hızla araştırılmaya başlanmış ve pek çok fizikçi cerrahi müdahaleye alternatif bir yol yaratabilmek ve bu yeni teknolojiyi kanser tedavisine adapte etmek için çalışmıştır. Radyasyon tedavileri ilk zamanlarda tek ve yüksek doz şeklinde uygulanmış ancak tümörlerde beklenen inhibisyon sağlanamamıştır. Ardından çalışmalar hızlanmış ve modern ışın radyoterapi tekniği geliştirilmiştir. 20.yy'ın başlarında Claude Regaud, tekrarlanan küçük dozlar şeklinde uyguladığı radyoterapinin deride hasar yaratmadan etki gösterdiğini bildirmiştir. Birçok araştırmacı tümörleri yok etmek için radyoterapiyi küçük fraksiyonlar halinde uygulamıştır (Connell vd 2004).

Radyoterapi, palyatif ve küratif olmak üzere iki şekilde uygulanır. Palyatif tedavi tümörün yol açtığı hasarları azaltmak ya da ortadan kaldırmak amacı ile uygulanmaktadır. Bunun için düşük radyasyon dozları (tipik olarak 30 Gray (Gy), en az

2 hafta) yeterlidir ve normal dokulara zarar verme riski oldukça azdır. Küratif tedavide tümörün yok edilmesi amaçlanır ve bu nedenle daha yüksek dozlar kullanılır (66–75 Gy ve 6–8 hafta). Dozdaki artış normal dokularda hasar meydana gelme riskini de beraberinde artırmaktadır. Komplikasyonlar; uygulanan fraksiyonun büyüklüğüne, radyasyon uygulanan doku tipine, toplamda uygulanan doza ve organın hangi kısmına uygulandığına bağlı olarak gelişir. Radyoterapinin yol açtığı yan etkiler, bazen hemen bazen ise uzun bir süre sonra ortaya çıkabilir (Emami vd 1991).

Normal hücreler, belirli zaman aralıkları ile tekrarlanarak uygulanan düşük dozdaki radyasyonu daha iyi tolere edebilmektedir. Bu nedenle radyoterapide standart olarak kullanılan uygulama şekli haftada beş kez düşük dozlar kullanılarak (1.2–3 Gy) yapılmaktadır. Ancak, bu dozların tümör hücrelerini yok etmek için yeterli olmadığı da bilinmektedir. Normal hücrelerde hasar yaratma riski %5'in altında tutulmaya çalışıldığı için bu dozlar ve süre standardize edilmiştir (Connell vd 2004).

Radyoterapi sonrası oluşan hipoksik koşullar, tümörlerde hipoksi indükleyici faktör (HIF-1 $\alpha$ ) ve buna bağlı olarak VEGF ekspresyonunu artırmaktadır (Semenza 2001). Radyoterapi sonrasında VEGF'nin miktarındaki artış hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak gösterilmiştir (Ellis vd 1998, Gidley vd 1998). Radyoterapi sonrasında tümörde gözlenen büyüme anjiogenezin tetiklenmesi sonucu ortaya çıkmış olabilir.

### **2.3.9. Kombine kanser tedavileri**

Uzun yıllardır klasik kanser tedavileri çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, her birinin yarattığı yan etkiler ve /veya beklenmedik sonuçlar göz önüne alındığında tedavilerin geliştirilerek daha etkili hale getirilmesi gerektiği de yadsınmayacak bir gerçektir. Bu nedenle bilim adamları bu tedavileri birlikte uygulayarak etkilerini artırmaya yönelik çalışmalar yapmaktadırlar.

Bu amaçla ilk kez Heidelberg yaptığı prelinik çalışmada, radyasyon terapisini takiben kemoterapik ilaçlar uygulamış ve radyoterapinin tek başına sağladığı etkinin, ilaçla birlikte uygulandıktan sonra arttığını saptayarak kombine tedavilerin uygulanması

için ilk umut verici sonucu bilim dünyasına açıklamıştır. 1960'lı yıllarda Mayo klinikte Moertel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada radyoterapi ve kemoterapi birlikte kullanılmış, mide ve pankreas kanserlerinden hastaların kurtulma oranında önemli bir artış elde edilmiştir (Mcelwain 1973). 1974 yılında nigro 5-florourasil ve mitomisin C kombinasyonunu radyasyon ile birlikte uygulamış ve elde ettiği sonuçlar hem medikal hem de radyasyon onkologlarının dikkatini çekmiştir (Kvols 2005). Bu tarihten sonra, baş ve boyun, özafagus, akciğer, mide, pankreas, anal kanal ve rahim kanseri gibi pek çok kanser üzerinde kombine tedavilerin etkileri araştırılmıştır (Herskovic vd 1992, Adelstein 1998, Cooper vd 1999, Furuse vd 1999, Thomas 1999, Ryan vd 2000, Evans vd 2001, Macdonald vd 2001, Cooper vd 2004, Penberthy vd 2001).

### **2.3.10. Anti-anjiogenik terapi kombinasyonları**

Klasik kanser tedavilerinde amaç tümör hücrelerini öldürmektir. Buna alternatif bir yaklaşım olan antianjiogenik terapilerdeki hedef ise, tümör yatağında toplanan ve bölünmekte olan endotelleri yok etmek ve bu sayede tümörü anjiogenezden yoksun bırakmaktır. Bazı tübülün bağlayıcı ajanlar, combrestatin A-4 gibi, *in vitro*'da çoğaltılan hücrelerde seçici bir toksisiteye yol açarken, *in vivo* tümör modellerinde apoptozu indükleyerek damarsal bir tahribata yol açmış ve bu sayede daha fazla sayıda tümör hücresinin ölmesine neden olmuştur. Buradan da anlaşılacağı gibi doğru tasarlanmış bir antianjiogenik terapi gastrointestinal septomlar ya da miyelosüpresyonlar gibi toksisite kaynaklı yan etkiler yaratmaz.

Kemoterapi ve radyoterapi gibi klasik kanser tedavilerinin yarattığı yan etkiler göz önüne alındığında antianjiogenik terapinin, kanser tedavilerine sağlayacağı avantaj göz ardı edilemez. Antianjiogenik terapide kullanılan ajanın tümör hücresine girme ya da kan beyin bariyerini geçme gibi bir zorunluluğu yoktur. Bu nedenle düşük dozlarda kullanılabilir. Düşük dozlar kullanmak, uygulama süresinin kısa aralıklarla sık sık olmasına olanak tanır. Oysa kemoterapik ajanlar tümöre ulaşma zorunluluğu nedeni ile maksimum tolere edilebilen dozda kullanılmalıdır. Bir kez yüksek dozda kemoterapik ajan uygulandığında ikinci uygulama için bu dozun yarattığı yan etkilerin ortadan kalkmasını sağlayacak kadar sürenin geçmesi beklenmelidir. Bu da, tedavi başarısını



azaltan bir etmendir çünkü arada geçen süre, hasar yaratılan tümör hücresinin kendini düzeltmesine imkan tanımaya yetecek kadardır. Pek çok kemoterapik ajan aynı zamanda antianjiogenik özelliğe de sahip olabilir. Eğer bir ilaç, sitotoksik etki yarattığı dozdan daha düşük konsantrasyonlarda damar üzerine etki yaratıyorsa antianjiogenik özelliğe sahiptir denebilir (Bamias ve Dimopoulos 2003, Miller vd 2001). Maksimum anjiogenik etki sağlamak için ajan düşük konsantrasyonlarda uzun süre uygulanmalıdır.

Bu nedenle kronik-düşük doz kemoterapinin (metronomik terapi) güçlü antianjiogenik etkiler sergilemesi şaşırtıcı değildir. Metronomik terapiler bir antianjiogenik ajanla kombine olarak uygulandığında, ortaya çıkan antikanser potansiyelin önemli ölçüde arttığı saptanmıştır (Browder vd 2000). Antianjiogenik ve kemoterapik ajanlar birbirlerinin etkilerini artırmaya yönelik sinerjizm yaratırlar. Son yıllarda gerçekleştirilen farklı çalışmalar sık sık ve düşük dozlarda uygulanan kemoterapiye, endotel hücrelerini hedef alan bir antianjiogenik tedavi eklendiğinde ortaya çıkan antikanser etkinin, sitotoksik ajanın tek başına gösterdiğinden daha fazla olduğu dikkat çekmektedir (Bamias ve Dimopoulos 2003, Teicher vd 1992, Klement vd 2000). Bu sinerjizmin mekanizması henüz tam bir netlik kazanmamış olsa da mekanizma ile ilgili en güçlü hipotez şudur; “anti-anjiogenik ajan kan akışını normalize eder ve bu sayede hem dokulara giden oksijen miktarı hem de sitotoksin ajanın dağılımı artar” (Jain 2001).

Antianjiogenik ajan tümör hücresini hedef almadığı için tümörler arasında gözlenen heterojenlik başarıyı etkilemez. Başka bir deyişle tümörün büyümesini, tipine bağlı olmaksızın, inhibe eder. Oysa klasik tedaviler her tümör hücresi üzerinde farklı sonuçlar yaratmaktadır. Tümör hücresini öldürmeyi hedeflemediği için, antianjiogenik terapilerin hücrede sitostatik etki yarattığını söylemek doğru olur. Bu güne kadar gerçekleştirilen pre-klinik (*in vitro* ve *in vivo*) çalışmalardan bazılarında tümör hücrelerinin, mutasyonlara bağlı olarak değişen genetik yapıları yüzünden, anti anjiogenik ilaçlara karşı düşük de olsa direnç geliştirme olasılığının bulunduğu gösterilmiştir (Marx vd 2002).

Anti-anjiogenik ilaçları tek başına ve geleneksel tedaviler ile kombine ederek kullanmak ne gibi avantajlar ya da dezavantajlar yaratır? Günümüzde kombine tedavilerden elde edilen antikanser potansiyeli pek çok kapsamlı çalışma ile araştırılmaktadır. Kombine tedavilerde sadece DNA sentezi ve hücre bölünmesi değil tümör hücrelerinin pek çok biyolojik davranışı da hedef alınır. Tümör hücreleri kan damarları tarafından beslenseler de kendilerine oldukça güvenirlir. Bu nedenle mutlak başarı ile sonuçlanması umut edilen tedaviler, hem tümörü hem de kan damarlarını tehdit edebilir nitelikte olmalıdır. Tümörün kendisini hedef alan kemoterapi ve radyoterapi ile kan damarlarını tehdit eden antianjiogenik terapi birlikte kullanıldığında elde edilmesi umulan başarının artması kaçınılmazdır. Yumurtalık, pankreas, prostat, kolon kanser modellerinde rekombinant anti-anjiogenik proteinler, standart kemoterapi ile kombine bir şekilde kullanılmış ve kombine tedavi etkiyi bir derece daha arttırmıştır.

Teicher ve arkadaşları 1995 yılında yaptıkları çalışmalarında ilk kez anti-anjiogenik bir ajanı düşük-tek doz radyoterapi ile birlikte uygulamışlar ve radyoterapinin etkisinin arttığını göstermişlerdir (Teicher vd 1995). Daha sonraki yıllarda bu kombinasyon pek çok araştırmacı tarafından uygulanmış ve anti-anjiogenik ajanın, tümörün radyasyona karşı verdiği yanıtta artış sağladığı saptanmıştır (Murata vd 1997, Gorski vd 1999, Lee vd 2000, Lund vd 2000, Hess vd 2001, Kozin vd 2001, Griffin vd 2002, Huang vd 2002). Ancak elde edilen bulguları karşılaştırmak ve kombine tedavinin etkisini tam olarak ortaya çıkarmak zordur çünkü yapılan çalışmalarda kullanılan tümör modeli, başlangıçtaki tümör boyutu, ölçülen final tümör boyutu, uygulanan doz ve uygulama şekli gibi pek çok faktör değişkendir. Tahmin edilebileceği gibi farklı tümörler antianjiogenik tedaviye farklı yanıtlar verir. Tümörlerde saptanan bu farklılık değişken anjiogenik büyüme faktörlerinin seviyesine ve tümör büyümesi, anjiogeneze etki eden birçok anjiogenik faktöre bağlıdır (Wachsberger vd 2003).

Radyoterapi tümörün merkezindeki hücrelerin öldürülmesini hedef alır ve uzun yıllardır klinikte etkili bir antikanser terapisi olarak kullanılır. Ancak radyoterapide kullanılan radyoaktif madde hipoksi yaratır ve bu sayede başta VEGF olmak üzere birçok anjiogenik faktör tetiklenir. Radyoterapi ile kombine edilerek uygulanan antianjiogenik ajanların kullanıldığı denemelerden pozitif yanıtlar alınmıştır.

Tüm bu avantajlar göz önüne alındığında kanser tedavisi için antianjiogenik uygulamaların oldukça önemli olduğu düşünülmektedir. Ancak, antianjiogenik terapinin kanser tedavisi için kullanılmasını sınırlandırılan etmenler olduğu da bir gerçektir (Bamias ve Dimopoulos 2003).

- 1- Klasik anti-kanser tedavilerindeki en büyük sorun olan hücre heterojenitesi burada da söz konusu olabilir. Anti-anjiogenik terapide hedef endotellerdir ve farklı öncüllerden köken aldıkları düşünüldüğünde endoteller arasında bir heterojenitenin olması kaçınılmazdır. Bu durumda ajan hücrelerin farklılığına bağlı olarak farklı etkilerin ortaya çıkmasına neden olabilir.
- 2- Metastazik tümörlerde bulunan hücreler birbirlerinden oldukça farklıdır ve bu nedenle salgıladıkları pro-anjiogenik ajanların hem yapıları hem de miktarları arasında bazı değişiklikler gözlenebilir. Bu tip değişiklikler verilen anti-anjiogenik ajana karşı farklı bir klonun direnç geliştirmesine neden olabilir. (Kim vd 2001, Durand ve Raleigh 1998).
- 3- Tümörün mikro çevresinin, anjiogeneze karşı oluşturulacak yanıtı doğrudan etkilediği son yıllarda bazı çalışmalarla gösterilmiştir. Tümör mikro çevresi endotelial kompartmanları korur, bazı yaşamsal sinyallerin endotellere iletiminde rol oynar. Tümör büyümesi için kritik bir önem taşıyan diğer faktör ise ekstraselüler matriksin bütünlüğünün korunmasıdır. Birçok pro ve antianjiogenik ajan ekstraselüler matrikste depolanır ve parçalanması ile salınır. Ekstraselüler matriksin ve depoladığı modülatörlerin içeriği tümöre bağlı olarak değişir. Bu nedenle her tümör tek bir ajana aynı yanıtı vermez. (Sood vd 2001, Thomas vd 2003, Miller vd 2001).

Antianjiogenik ajanlar kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* ve *in vivo* deneylerden elde edilen umut verici sonuçlar bu ajanların klinik çalışmalarda da denenmesini sağlamıştır. Yeni terapilerin dizayn edilmesi, bu ajanların kendi fonksiyonlarının ve etkiledikleri mekanizmaların aydınlatılması, benzer özellik gösteren yeni antianjiogenik ajanların tanımlanması ile mümkün olacaktır.

### 2.3.11. P maddesi

Periferel dokularda ve merkezi sinir sisteminde nörojenik inflamasyon ve immun yanıtın oluşumunda P maddesi rol oynamaktadır ve ağrının algılanmasında da önemli görevler üstlenmektedir. Pek çok periferel dokuda, P maddesinin damar genişletici özelliği olduğu bilinmektedir. P maddesi içeren sinir uçları genellikle kan damarları yakınında lokalize olmuştur ve bu uçlardan P maddesi salınımı, akut inflamasyonda görülen pek çok fizyolojik olayın başlamasına neden olur. P maddesi sadece sinir hücresi kaynaklı değildir. Eozonofil ve makrofajlar gibi sinirsel olmayan hücrelerde de P maddesi bulunmaktadır. G-protein bağlı reseptörüne bağlanınca aktive olan P maddesi mitojenle aktive edilmiş protein kinazları aktive ederek apoptoza neden olur. Ayrıca ras onkogenini aktive ettiği ve reseptöre bağlandığında TAPI-duyarlı matriks metalloproteazları özellikle de TACE'i aktive ederek membrana bağlı TGF- $\alpha$ 'nın aktif formda salınmasına neden olur. TGF- $\alpha$  MAPK yolağını aktive ederek kolon epitel hücrelerinin ve astrostoma hücre proliferasyonunu artırır (Palma vd 1999, Friess vd 2003, Munoz vd 2004, Singh vd 2000).

P maddesi kanserle en fazla ilişkilendirilen nöropeptittir. P maddesinin kanser gelişimindeki rolü ile ilgili çalışmaların sonuçları birbirleriyle çelişkili bulunmuştur. Çalışmaların bir kısmı, P maddesinin tümör gelişimini hızlandırdığını, yeni damar oluşumunu arttırdığını ve bu yolla metastazı kolaylaştırdığını göstermektedir. Diğer yandan P maddesi geninin kaybı, kolon kanserinin gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Benzer şekilde farelerin P maddesi ile önceden tedavi edilmesinin, tümöre karşı immün yanıtı artırarak, melanoma gelişimini yavaşlattığı gösterilmiştir. Sonuçlar ne kadar çelişkili olursa olsun bu bulgular duyuşal sınırlardan salınan nöropeptitlerin kanser gelişimini etkileyeceğini göstermektedir. P maddesi ilk defa geçen yüzyılın ilk yarısında at beyni ve bağırsağından toz olarak elde edilmiştir.

Daha sonraki çalışmalarda P maddesinin tansiyon düşürücü özelliğinin olduğu ve düz kas hücrelerinin kasılmasına yol açtığı belirtilmiştir. Goddum ve Schild bu yeni maddeyi "P maddesi" olarak tanımlamışlardır. "P" harfi maddenin ekstraksiyon protokolü sonucu toz (Powder) olarak elde edilmesine itafen verilmiştir. Lembeck bu

maddenin omuriliğin dorsal kökünde çok miktarda bulunduğunu tespit etmiş ve ağrı iletimi ile ilgili bir fonksiyonu olabileceğini öne sürmüştür. P maddesinin rolü ile ilgili daha geniş bilgiler Otsuka ve Konishi'nin çalışmalarından elde edilmiştir (Otsuka ve Konishi 1976). 1971'de Chang ve arkadaşları P maddesinin aminoasit yapısını "H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>" olarak belirlemişlerdir. P maddesinin moleküler ağırlığı 1347,6 kDa'dur (Harrison ve Gepetti 2001). 1981 yılında P maddesi nörokinin A ve B ile birlikte takikinin ailesinin bir üyesi olarak tanıtılmıştır. Her üçü de aynı karboksil terminal diziyeye sahiptir: "Phe-X-gly-Leu-Met- NH<sub>2</sub>" (X; Phe veya Val olabilir). P maddesinin konformasyonu tamamen kullanılan çözücüye ve içinde bulunduğu lipid çevresine bağlıdır. Örneğin, P maddesi metanolde beta-dönüş konformasyonuna sahipken suda düz zincir şeklinde bir yapısı vardır (Sumner vd 1990).

Yeni doğan ratlara elektrik akımı verildikten sonra omuriliklerinde P maddesinin immün reaktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Buna bağlı olarak da P maddesi ekspresyonu merkezi sinir sistemi ve periferel sinir sistemi ile ilişkilendirilmiştir. Bugün çok iyi bilinmektedir ki P maddesi primer afferent nöronların merkezi ve periferel uçlarından salgılanan bir nörotransmitterdir. Memelilerdeki P maddesi preprotakikinin A (PPT-A) geninden eksprese edilir. PPT-A yaygın atasal bir genin duplikasyonundan orijinlenir ve aynı zamanda nörokinin A, nöropeptit K ve nöropeptit-gama'yı da kodlar. PPT-A geninin mRNA modifikasyonları sonucu alfa, beta ve gama olmak üzere üç adet P maddesi öncülü kodlanır. P maddesi, öncül moleküllerinden konvertazlar olarak adlandırılan proteazlar tarafından kopartılır (Carter ve Krause 1990). Deneysel olarak duyuşal sinirlerin inaktive edilmesi, var olan P maddesinin ancak %50'sinin azalmasına yol açmıştır. Bu sonuca dayanarak, P maddesinin yalnız duyuşal nöronlardan değil monositler, makrofajlar ve tümör hücreleri gibi farklı hücre tiplerinden de salındığı ileri sürülmüştür. Bu hücrelerde PTT-A geninin ve bu genin mRNA'sının varlığı gösterilerek hipotez doğrulanmıştır. Yapılan farklı çalışmalarda, hangi hücreden sentezlendiğine bağlı olarak, P maddesinin kanser ve anjiogenez üzerinde farklı roller üstlendiği gösterilmiştir (Erin vd 2008).

P maddesi metabolizmasında rol oynayan pek çok enzim vardır. Ancak bunlardan en önemlileri neprilizin (NEP) ve angiotensin dönüştürücü enzim (ACE) dir. Neprilizin

beyinde, omurilikte ve periferik dokularda, ACE ise plazmada P maddesini parçalar. Hem NEP hem de ACE P maddesini Phe<sup>8</sup>-Gly<sup>9</sup> ya da Gly<sup>9</sup>-Leu<sup>10</sup> bağları arasından keser (Harrison ve Blackwell 2001). NEP enziminin diğer bir substratı da β-amiloid peptittir. Bu peptiti parçalayabilen diğer bir enzim ise ADAM-10 dur (Iwata vd 2004). β-amiloid peptidi benzer şekilde parçaladıkları için ADAM-10'un P maddesini de parçalama potansiyeline sahip olabileceği düşünülmüş ve yapılan çalışmalar sonucunda ADAM-10 enziminin P maddesini Neprilizin ile aynı bölgelerden kestiği gösterilmiştir (Erin vd 2006). P maddesinin hidrolizi sonucu oluşan fragmentlerin tümör hücrelerinin büyümesini azalttığı gösterilmiştir (Heasley 2001). P maddesi ve diğer takikininlerin kapsaisine duyarlı duyuşal nöronların periferik uçlarından salınması nörojenik inflamasyona işaret eder. Duyusal nöropeptitler genellikle damar sistemi üzerine etkilidir ve arterlerin genişlemesine neden olur (Harrison ve Blackwell 2001).

Fizyolojik stres durumu ile ilişkili olarak, malignansinin gelişiminde merkezi sinir sisteminin potansiyel bir rolü olabileceği düşünülmektedir. Özellikle stres ile tetiklenmiş nöroendokrin ve immün fonksiyonların kansere bağlı ölümlere katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

Duyusal nöropatilere sahip hastalarda farklı tipte kanserlerin görülme sıklığının arttığı da bilinen bir gerçektir. Stres sonucunda salgılanan nöropeptitlerin damar üzerine yaptıkları etkiler göze alındığında, bu peptitlerin anjiogenez mekanizması üzerinde de etkili olabileceğine inanılmaktadır (Erin vd 2004). Daha sonra yapılan çalışmalar nöropeptitlerin, *in vitro* koşullarda fibroblast ve endotel hücrelerinin çoğalmasını, *in vivo* koşullarda ise anjiogenezi uyardığını göstermektedir (Salo vd 2007).

#### **2.3.11.1. P maddesini parçalayan neprilizin**

Nötral endopeptidaz 24.11 (Neprilizin, NEP, CALLA, Enkefalinaz, CD-10) çok geniş dağılım gösteren, membran bağımlı çinko metalloendopeptidazdır ve pek çok farklı peptidin metabolik regülasyonunda rol oynamaktadır. Örneğin, kolitis-ilişkili inflamasyonu, P-maddesini parçalayarak modüle eder. Ancak, beyindeki NEP'in fizyolojik fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. İlk defa tavşan böbreğinin fırça

şekilli membranlarından izole edilmiş ve bu membranlardaki major antijen olarak tanımlanmıştır (Turner ve Hooper 2002). NEP enzimi, insülinin b zincirini hidroliz ettiği saptanan ilk enzimdir. 30 yılı aşkın bir süredir aktivitesi detaylı bir şekilde araştırılmaktadır. Saflaştırılmasının ardından tip II integral membran proteini olduğu saptanmıştır. NEP, hücre yüzeyine lokalize olmuş bir enzimdir. Streptomyces'den elde edilen fosforamidon ile inhibe edilmektedir. NEP'in tanımlanan ilk substratları arasında enkefalinler ve P maddesi yer almaktadır. NEP için tanımlanan fizyolojik birçok substrat bulunmaktadır ancak en dikkat çekicileri P maddesi ve vazodilatör bir bileşik olan atrial natriüretik peptit (ANP)'dir. NEP, çinko bağlanma motifine sahip tipik bir metallopeptidazdır, M13 peptidaz ailesi içinde, glusizinler olarak bilinen gruba aittir. NEP'in kovalent olmayan etkileşimlerle bir arada tutulan homodimer yapısında olduğu gösterilmişse de, tavşanlarda monomer olarak bulunmaktadır.

Bu gün bilinenlere göre, NEP-enzimi eksik olan farelerde, beyinde biriktiği bilinen tek peptit Amiloyid beta'dır. Bu durumda NEP'in A $\beta$  degradasyonundaki en önemli enzim olduğu söylenebilir (Fukami vd 2002). NEP'in benign prostatik hiperplazi patogenezi ile ilişkili olduğu ve inflamasyonun regülasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca yara iyileşmesi ve immün sistem aktivasyonunda da yer aldığı tahmin edilmektedir. Farklı gruplar NEP'in APP'yi parçaladığını göstermiştir. Son çalışmalara göre, NEP inhibisyonunun, kardiovasküler hastalıkların tedavisi içinde yeni stratejilerden biri olabileceği ileri sürülmüştür. Klinik uygulamalarda kullanılmak üzere NEP'in yeni inhibitörlerinin keşfi oldukça ilgi çekmektedir (Oefner vd 2000).

Günümüzde özellikle takikinin ailesine ait nöropeptitlerin metabolizmasında da görev aldığı bilinmektedir. ADAM-10 enzimine benzer şekilde beyinde biriken nörotoksik amiloid peptitleri hidroliz eder. Enzimatik olarak NEP, P-maddesi, bombesin, kalsitonin-gen ilişkili peptit, bradikinin ve nörotensin gibi nöropeptitleri parçalar ve bunların hedef hücre üzerindeki spesifik etkilerini ortadan kaldırır. NEP 50 aminoasit uzunluğa kadar olan oligopeptitleri, hidrofobik aminoasitlerin amino ucundan hidroliz eder. Tipik substratı, lösin-enkefalindir. Nöropeptitler duyuşal sinirlerden salınırlar ve mast hücreleri ile makrofajların fonksiyonlarını modüle ederler. NEP, nöropeptitleri

parçalama özelliğinin yanı sıra, inflamasyonun regulasyonunda da önemli bir role sahiptir (Albrecht vd 2004).

NEP, nöroiletimde, inflamasyon, ağrı fizyolojisi, kan basıncı, hücre büyümesi gibi biyolojik olaylarda ve Alzheimer, kardiovaskular, neoplastik hastalıklarda rol oynamaktadır. NEP'in bombesin ya da endotelin benzeri peptitlerden gelen mitojenik uyarıyı değiştirip değiştirmediği pek çok araştırmacı tarafından araştırılmaktadır. NEP enziminin miktarı sigara dumanı ile azaltılmış ve sonuçta akciğerlerde küçük hücreli akciğer karsinomlarının oluştuğu saptanmıştır. NEP ekspresyonu bazı prostat kanserlerinde azalmıştır çünkü mitojenik peptitler androjen bağımsız tümör gelişimini tetiklemektedir.



### **3. MATERİYAL ve METOT**

Tez kapsamında yapılan çalışmalar; Talidomit için, hücre kültürü şartlarının belirlenmesi, radyoterapi dozunun belirlenmesi, ilaçların sitotoksik etki gösterdiği dozun saptanması, sitotoksik etki gösteren dozlarda P maddesi ile ADAM 10 ve Neprilizin enzim aktiviteleri üzerine gösterdikleri etkinin belirlenmesi ve son olarak enzim miktarındaki değişimin Western blot tekniği ile kullanılarak gösterilmesi üzere altı ana başlık altında toplanabilir.

#### **3.1 Hücre Kültürü Şartlarının Belirlenmesi**

Çalışmada kullanılan 4T1 ve 4THMpc fare meme kanser hücre hatları Doç. Dr. Nuray Erin'den (Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi) temin edildi. Hücreler % 5 FBS (fetal bovin serum), 0.02 mM esensial olmayan amino asid karışımı, 1 mM sodyum-pruvat, 4 mM L-glutamin ve 80 mg gentamisin ilave edilmiş DMEM-F12 besi yeri kullanılarak 37 °C' de % 5 CO<sub>2</sub>'li etüvde kültüre edildi. Hücreler petrinin % 80-90'nını doldurduğunda, steril petrilere deney için optimize edilen sayılarda bölündü.

#### **3.2 Radyoterapi Dozunun belirlenmesi**

4T1 ve 4THMpc hücreleri farklı sayılarda 96 kuyucuklu platelere % 5 serumlu besi yeri ile bölündü. 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında hücrelerin üzerindeki besi yerleri uzaklaştırıldı ve yerine % 1 serum içeren besi yeri eklendi. 4 saat sonra 2 cm kalınlığındaki plate'ler Kobalt 60 (<sup>60</sup>Co) teleterapi cihazı kullanılarak 100 cm uzaklıktan 5, 10, 20 ve 45 Gy ile ışınlandı. Plate'ler, homojen bir etki sağlanabilmesi için suya eşdeğer özellikte bir dolgu maddesi ile hazırlanan 0,5 cm kalınlığındaki kalıplar içerisine yerleştirilerek ışınlandı. Deneysel 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonrasında sonlandırıldı. Hücrelerin canlılığı aşağıda anlatılan MTT testi ile belirlendi. Deneysel 5 kez tekrarlandı.

### 3.3 Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

#### 3.3.1. Talidomit dozlarının optimizasyonu ve standardizasyonu

Tez kapsamında satın alınan Talidomit literatüre uygun şekilde 14.08 mM'lık Dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek 100 mM'lık stok çözelti hazırlandı ve ependorflara bölünerek -20 °C'de saklandı. Talidomit dozları literatüre göre 100 µM, 10 µM, 1 µM, 10<sup>-1</sup> µM, 10<sup>-2</sup> µM, 10<sup>-3</sup> µM, 10<sup>-4</sup> µM, 10<sup>-5</sup> µM, 10<sup>-6</sup> µM, 10<sup>-7</sup> µM ve 10<sup>-8</sup> µM olarak belirlendi. 1.4 µM DMSO (uygulanan en yüksek Talidomit dozunun içerdiği DMSO miktarı) kontrol olarak uygulandı. Ancak, DMSO her iki hücre hattında da bu konsantrasyonda oldukça sitotoksik etki gösterdi. Bu nedenle, suda çözünebilir Talidomit satın alınarak deneyler tekrarlandı.

Daha önceki denemelerde kullanılan Talidomit dozlarının (100 µM, 10 µM, 1 µM, 10<sup>-1</sup> µM, 10<sup>-2</sup> µM, 10<sup>-3</sup> µM) bu iki hücre hattında sitotoksik etki gösterdiği bağımsız deneylerle tekrarlanamadı. Bu nedenle, Talidomit'in diğer çalışmalarda kullanılan dozlarıyla ilgili tekrar literatür taraması yapıldı. Bu tarama sonucunda, bizim çalışmada kullandığımız µM konsantrasyondaki dozların diğer çalışmalara kıyasla oldukça düşük olduğu saptandı. Talidomit'in *in vivo* (100-400 mg/ml) ve *in vitro* (1-50 µg/ml) çalışmalarda belirlenen sitotoksik dozlarının farklı hücre tiplerinde değiştiği göz önünde tutularak (Teo 2005) ilacın yeni dozları 40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml olarak belirlendi.

#### 3.3.2. MTT hücre canlılık testi

Tez çalışmasının başlangıcında, 4T1 ve 4THMpc hücrelerin 5000 hücre/kuyucuk olarak bölünmesi ve sitotoksitenin bu hücre sayısı üzerinden incelenmesi planlanmıştı. Hücreler, 1000, 2500, 3000, 5000 ve 10 000 hücre/kuyucuk olacak şekilde bölünerek deneyler tekrarlandı. Hücrelerin 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde bölünmesiyle yapılan deneylerde tutarlı sonuçlar alındığı için sitotoksitenin testlerinde bu sayının standardize edilmesine karar verildi.

Besi yeri içerisine eklenen serumun ilaçlarla etkileşime girebileceği düşünüldüğü için deneylerde öncelikle serumsuz besi yerinin kullanılması planlanmıştı. Ancak inkübasyon sürelerine bağlı olarak, serumsuz besi yerinde hücrelerin uzun süre canlı kalmaları sağlanamadı. Bu yüzden tüm deneylerde % 1 serumlu besi yeri kullanılmasına karar verildi.

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonrasında hücreler  $5 \times 10^3$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plate'lere bölündü. 24 saatlik inkübasyon sonrasında besi yerleri uzaklaştırılarak optimizasyon sonrasında karar verilen 40, 20, 10, 5 ve 2,5 µg/ml Talidomit içeren 200 µl %1 serumlu besi yerleri uygulandı. Kontrol grubu olarak kullanılacak kuyucuklara yalnızca %1 serumlu besi yeri uygulandı. Tedaviden 4 saat sonra radyoterapi grubu olarak etiketlenen plate'ler 45 Gy  $^{60}\text{Co}$  ile ışınladı. Deneyler 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda sonlandırıldı ve besi yerleri uzaklaştırıldı. Kuyucuklara 180 µl serumsuz besi yeri ve *Promega Cell Titer* kiti içindeki MTT solüsyonundan 20 µl eklenerek 37°C de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda 96 kuyucuklu-plate'ler spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda okundu.

### 3.3.3. Live-Dead canlılık/sitotoksosite testi

Daha önceki dozlarla yapılan deneylerde sitotoksik etki görülmediği için Live-Dead testi yapılmadı. Yeni belirlenen dozlarla yapılan MTT hücre canlılık testi sonucunda sitotoksik etki saptandı. Bu bulguyu desteklemek amacı ile aynı dozların hücreler üzerindeki etkisi Live-Dead testi ile de değerlendirildi.

Hücreler  $1 \times 10^5$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 12 kuyucuklu plate'lere bölündü. 24 saatlik inkübasyon sonrasında besi yerleri uzaklaştırılarak 40, 20, 10, 5 ve 2,5 µg/ml Talidomit içeren 1 ml %1 serumlu besi yerleri uygulandı. Kontrol grubu olarak kullanılacak kuyucuklara yalnızca %1 serumlu besi yeri uygulandı. Tedaviden 4 saat sonra radyoterapi grubu olarak etiketlenen plate'ler 45 Gy  $^{60}\text{C}$  ile ışınladı. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda deneyler sonlandırıldı. Örnekler *Molecular Probes Live-Dead Viability/cytotoxicity Kit* protokolü izlenerek çalışıldı.

### 3.3.4. *Tripan mavisi testi*

Yukarıda belirtilen test sonuçlarını desteklemek amacı ile tripan mavisi testinin de yapılmasına karar verildi. Hücreler  $1 \times 10^5$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 12 kuyucuklu platelere bölündü. 24 saatlik inkübasyon sonrasında besi yerleri uzaklaştırılarak 40, 20, 10, 5 ve 2,5  $\mu\text{g/ml}$  Talidomit içeren 1 ml %1 serumlu besi yerleri uygulandı. Kontrol grubu olarak kullanılacak kuyucuklara yalnızca %1 serumlu besi yeri uygulandı. Tedaviden 4 saat sonra radyoterapi grubu olarak etiketlenen plate'ler 45 Gy  $^{60}\text{Co}$  ile ışınıldı. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda deneyler sonlandırıldı. Kuyucukların üzerine 500 $\mu\text{l}$  EDTA-Versen eklenerek hücreler kaldırıldı. 1500 rpm'de 2 dakika döndürülerek çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı ve üzerlerine 300 $\mu\text{l}$  Hanks-tuz solüsyonu eklenerek pelletler çözüldü. Örnekler buz içerisine alındı. Ölü hücreleri tespit edebilmek için, % 4'lük tripan mavisi ve örnekler 3:1 oranında sulandırılarak canlı ve ölü hücre sayıları mikroskop altında belirlendi. Mavi renkte görülen hücreler ölü, şeffaf renkte görülenler ise canlı olarak değerlendirildi.

### 3.3.5. **Kaspaz-3 enzim aktivitesi**

Kaspaz-3 enzim aktivitesinin belirlenebilmesi için hücreler, 6 kuyucuklu-plate'lere  $1 \times 10^5$  hücre/kuyucuk olacak şekilde bölündü. 24 saat sonra besi yerleri uzaklaştırıldı. Kontrol grubu olarak kullanılacak olan kuyucuklara 2 ml serumsuz taze besi yeri ve diğer kuyucuklara sitotoksikite denemelerinde kullanılan en yüksek dozlarda ilaç içeren (10  $\mu\text{M}$  Talidomit) 2 ml besi yeri eklendi ve 48 saat sonra deneyler sonlandırıldı. Ancak bu denemelerde elde edilen sonuçlar, kaspaz-3 enzim aktivitesinin belirlenebilmesi için hücre sayısının oldukça az olduğunu gösterdi. Ayrıca, MTT deneyleri sonucunda 48 saatlik inkübasyon süresinde, her iki ilaç için de sitotoksik etki saptanamadı.

Bu nedenle hücreler,  $1 \times 10^6$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu plate'lere bölündü. 24 saatlik inkübasyon sonrasında besi yerleri uzaklaştırılarak sitotoksikite testlerinde etkili olduğu saptanan 40  $\mu\text{g/ml}$  Talidomit içeren 2 ml % 1 serumlu besiyerleri uygulandı. Kontrol grubu olarak kullanılacak kuyucuklara yalnızca 2 ml % 1 serumlu besi yeri uygulandı. Tedaviden 4 saat sonra radyoterapi grubu olarak

etiketlenen plateler 45 Gy <sup>60</sup>Co kaynağı ile ışınılandı. Diğer testlerde en çok etkinin gözlemlendiği 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda deneyler sonlandırıldı. Besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine 500 µl EDTA-Versen eklenerek hücreler kaldırıldı. Toplanan hücreler 1500 rpm’de 2 dakika döndürülerek çöktürüldü. Süpernatant atıldı ve pelet üzerine 500 µl PBS eklendi ve hücreler tekrar 5000 rpm’de 5 dakika döndürülerek çöktürüldü. Süpernatant atıldı ve pelet üzerine 100 µl kit içerisinde bulunan 1X liziz tamponu eklendi. Optimizasyon çalışmaları sırasında hücreler sonifikasyon metodu kullanılarak parçalanmıştı ancak bu tekniğin enzim aktivitesini değiştirebileceği düşünüldüğü için kullanılmamasına, bunun yerine kit protokolü içerisinde önerilen etanol-kuru buz tekniğinin kullanılmasına karar verildi. Hücreler üç kez etanol-kuru buz banyosunda 5 dakika süre ile bekletilip oda ısısında çözündürüldü ve 5000 rpm’de 5 dakika döndürülerek çöktürüldü. Enzim aktivitesi tayini için süpernatantlardaki toplam protein miktarı, Biorad BSA (Bovine Serum Albumin) kiti kullanılarak Bradford yöntemiyle belirlendi. Her kuyucuğa tüm örneklerden 100 µg eklendi. Örnekler *Molecular Probes EnzChek Caspase-3 Assay Kit* protokolü izlenerek çalışıldı.

### **3.4. Talidomit’in P Maddesi Üzerine Etkileri**

#### **3.4.1. P maddesi ölçümleri için optimizasyon**

Besi yerlerine salınan ve hücre içinde bulunan P maddesi miktarlarının ölçülmesi için hücreler 6-kuyucuklu-plate’lere  $1 \times 10^5$  hücre/kuyucuk olacak şekilde bölündü. Yapılan denemelerde, P maddesinin miktarı belirlenemediği için hücre sayısının artırılarak deneylerin tekrarlanmasına karar verildi. Bunun için hücreler 100x20 mm ebatındaki steril petrilere  $1 \times 10^6$  hücre/ petri olacak şekilde bölündü. 24 saat sonra besi yerleri uzaklaştırıldı. Kontrol grubu olarak kullanılacak olan kuyucuklara 1 ml serumsuz taze besi yeri ve diğer kuyucuklara sitotoksikite denemelerinde kullanılan en yüksek dozda (10 µM Talidomit) ilaç içeren 1 ml serumsuz besi yeri eklendi. 6 saat sonra besi yerininler toplandı ve hücrelerin üzerine 500 µl PBS (Fosfat-tuz tamponu) eklenerek hücre kazıyıcı yardımıyla hücreler kaldırıldı. P maddesi miktarı yapılan farklı denemelerde benzer şekilde saptanamadığı için hücre sayısı ve inkübasyon süresinin değiştirilerek deneylerin tekrarlanmasına karar verildi.

P maddesinin hangi zaman aralığında ölçülebileceğini belirlemek için hücreler  $3 \times 10^6$  hücre/ 10 ml olacak şekilde % 5'lik serumlu besi yeri ile 10 ayrı steril küçük petri kabına bölündü. Hücrelerin petri kabına yapışıp yayılmaları beklendi (ortalama 5-6 saat). Hücrelerde yapışma ve yayılma süresince, tespit edilebilecek düzeyde P maddesi olup olmadığını belirlemek amacıyla, yayılma süresi biter bitmez birinci petri kabındaki besi yerleri alındı ve hücreler 1 ml fosfat-tuz tamponu (PBS) ile kazınarak toplandı. Hücreler 1500 rpm'de 2 dakika döndürülerek çöktürüldü ve üzerlerindeki PBS uzaklaştırıldı. Bu petri kabı sıfırıncı zaman örneği olarak adlandırıldı. Bunu takiben diğer dokuz petri kabındaki örnekler altışar saat ara ile aynı şekilde toplandı.

Yapılan ön denemelerde P maddesi ölçümü için besi yerlerinin Oasis-ekstraksiyon (ayırma) kolunundan geçirilip konsantre edilmesi gerektiği saptanmıştı. Bu nedenle besi yerleri ve hücreler aşağıda verilen protokoller izlenerek P maddesi miktarı ölçümü için hazırlandı. Bu aşamaya getirilen örnekler hemen çalışılmayacaksa sıvı azotta dondurularak çalışılincaya kadar  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

### **3.4.2. P maddesi ölçümleri için besi yeri ve hücrelerin hazırlanması**

#### **3.4.2.1. Oasis protein ekstraksiyon protokolü**

1 ml'lik kolonlar ekstraksiyon aletine yerleştirildi. 1 ml metanol hızlı bir şekilde kolondan geçirildi. 1 ml steril ddH<sub>2</sub>O (iki kere distile edilmiş su) hızlı bir şekilde kolondan geçirildi. Besi yeri örneklerinden 500 µl alınıp 500 µl asetik asitle karıştırılarak hazırlanan ve toplam hacmi 1 ml olan örnekler, kolondan yavaş bir şekilde geçirildi. 1 ml steril ddH<sub>2</sub>O (çift distile edilmiş su) hızlı bir şekilde kolondan geçirildi. Örneklerin toplanması için ekstraksiyon aletine temiz ependorf tüpleri yerleştirildi ve kolondan 1 ml elüsyon solusyonu (6 ml Asetonitril + 4 ml ddH<sub>2</sub>O + 40 µl TFA (Trifloro asetik asit) geçirilerek kolona bağlı proteinlerin çözünmesi sağlandı. Toplanan örneklerden TFA ve asetonitrilin uzaklaştırılması için örnekler speed-vac (hızlı kurutma) cihazında kurutuldu. Sıvı kısım uçurularak proteinlerin toz halde ependorf

tüplerinin dip kısmına çökmesi sağlandı. Örnekler P maddesi EIA kiti içerisinde bulunan 100 µl 1X EIA tamponu içerisinde çözülerek 1 gece +4 ° C’de bekletildi.

#### **3.4.2.2. Hücre içerisinde bulunan P maddesi miktarının saptanması**

Yukarıda anlatıldığı şekilde PBS (fosfat tamponu) ile toplanan hücreleri parçalamak amacı ile üzerlerine 500 µl %2’lik asetik asit koyularak Thermo Block cihazında +95 °C’de 1 saat bekletildi. Örnekler 7000 rpm’de 2 dakika döndürülerek çöktürüldü. Süpernatantlar ependorf tüplere aktarıldı ve speed-vac (hızlı kurutma) cihazında kurutuldu. Örnekler P maddesi EIA kiti içerisinde bulunan 100 µl 1X EIA (Eliza İmmun assay) tamponu içerisinde çözülerek 1 gece +4 ° C’de bekletildi. Her örnekten 50 µl alınarak Cayman Marka P maddesi EIA kiti ile çalışıldı.

#### **3.4.3. P maddesi ölçüm protokolü**

P maddesi ölçümleri için kolondan geçirilen her örnekten 50 µl alınarak *Cayman Marka P maddesi EIA* kiti ile çalışıldı. Kit protokolüne göre; kit içerisinde bulunan özel antikor kaplı 96 kuyucuklu plate’lere her örnekten 50 µl eklendi. Örneklerin üzerine 50 µl belirteç ve 50 µl antiserum eklenerek plate’in üzeri kapatıldı ve +4 ° C’de 1 gece inkübe edildi. Bütün kuyucuklar kit içindeki yıkama tamponu ile 4 kez yıkandıktan sonra her kuyucuğun üzerine, kit içerisindeki Elman solusyonundan 200 µl eklenerek plate’in üzeri kapatıldı ve 2 saat inkübe edildi. 412 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Kalan örnekler 50’şer µl olacak şekilde ependorf tüplere aktarılarak ayrıldı ve – 80° C’de saklandı.

#### **3.4.4. P maddesi miktarlarının tespiti**

Talidomit’in tek başına ve radyoterapi ile kombine olarak besi yerine salınan ve hücre içinde bulunan P maddesi miktarları üzerine etkisinin ölçülmesi için, hücreler steril küçük petrilere  $3 \times 10^6$  hücre/ 10 ml olacak şekilde % 5’lik serumlu besi yeri ile bölündü. Hücrelerin yapışmalarını ve yayılmalarını takiben, kontrol olarak kullanılacak petri kaplarına sadece %1 serumlu besi yeri diğer petri kaplarına ise 40 µg/ml Talidomit

içeren % 1 serumlu besi yerleri uygulandı. Optimizasyon çalışmalarında, P maddesi 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda tespit edilebildiği için, bu süre sonunda deneyler sonlandırıldı ve örnekler optimizasyon başlığı altında açıklanan protokollere uygun şekilde *Cayman Marka P maddesi EIA* kiti ile çalışıldı.

### 3.5. ADAM 10 ve Neprilizin Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

#### 3.5.1. ADAM 10 enzim aktivitesinin belirlenmesi

Önce 4T1 ve 4THMpc hücreleri 6 kuyucuklu-plate'lere 100 000 hücre/kuyucuk ve 500 000 hücre/kuyucuk olacak şekilde bölündü. 1 µg/ml Talidomit uygulamasını takiben ADAM 10 enzim aktivitesi ölçülebilir düzeyde bulunmuştu.

Ancak, aynı hücre sayısında P maddesi miktarı tespit edilemedi. ADAM-10 enzim aktivitesi P maddesi miktarı ile ilişkili olduğu için, P maddesi optimizasyon deneylerinde tespit edilen hücre sayısı ( $3 \times 10^6$  hücre/ 10 ml %1 serumlu besi yeri) doz (40 µg/ml Talidomit) ve inkübasyon süresinde (24 saat) enzim aktivitesinin belirlenmesine karar verildi. Hücreler  $3 \times 10^6$  hücre/ 10 ml %1 serumlu besi yeri olacak şekilde steril küçük petri kaplarına bölündü. Yapışma ve yayılmalarını takiben, besi yerleri uzaklaştırıldı ve kontrol grubu olarak kullanılacak petri kaplarına 1,5 ml %1 serumlu taze besi yeri ve diğer petri kaplarına 40 µg/ml Talidomit içeren 1,5 ml % 1 serumlu besi yeri eklendi. İlaç uygulamalarından 4 saat sonra radyoterapi olarak etiketlenen petri kapları 45 Gy  $^{60}\text{C}$  ile ışınlandı. Hücreler 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda besi yerleri uzaklaştırılarak üzerlerine 1 ml PBS eklenerek kaldırılan hücreler 1500 rpm'de 2 dakika döndürülerek çöktürüldü. PBS uzaklaştırıldı.

Daha önce yapılan denemelerde *R&D System Alfa-Sekretaz* kiti kullanılarak ADAM 10 enziminin aktivitesi belirlenmişti. Ancak bu kit içerisinde ADAM-10 enziminin pozitif kontrolü veya inhibitörü bulunmamaktadır. Kullanılacak inhibitör deney sonucunda alınan aktivitenin  $\alpha$ -sekretaz olduğunu işaret edecektir. Bu nedenle içerisinde  $\alpha$ -sekretaz inhibitörü (TAPI) bulunan *AnaSpec Sensolyte  $\alpha$ -sekretaz Aktivite Kiti* kullanılmasına karar verildi.



Pelet üzerine 200 µl % 0,1 triton X-100 içeren kit içerisindeki liziz tamponu eklendi. Hücreler +4 °C'de 10 dakika bekletildi. Süre sonunda örnekler 5000 rpm'de 10 dakika döndürülerek çöktürüldü. Süpernatantları ependorf tüplere aktarıldı. Örneklerdeki protein miktarları **Biorad BSA** (Bovin Serum Albumin) kiti kullanılarak Bradford yöntemiyle belirlendi. Tüm örnekler için, 100 µg/ml protein içeren hacim hesaplandı. Hemen çalışılmayacaksa örnekler 50 µl olacak şekilde ependorflara bölünerek -80 °C'de saklandı. Her örnekten, 100 µg/ml protein içerdiği saptanan hacim kadar alınıp reaksiyon tamponu eklenerek 50 µl'ye tamamlandı ve siyah opak 96 kuyucuklu-plate'lere pipetlendi. Kit protokolü gereğince, üzerlerine kit içerisinde bulunan reaksiyon tamponundan 50 µl (seçilen bazı kuyucuklara 10 µl 10 µM inhibitör içeren reaksiyon tamponundan 50 µl) eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Süre sonunda üzerlerine 50 µl substrat eklenerek karanlıkta 30 ile 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 50 µl reaksiyon durdurma solüsyonu eklenerek 495 eksitasyon 510 emisyon dalga boylarında florimetrik okuma yapıldı.

### 3.5.2. Neprilizin enzim aktivitesinin belirlenmesi

Önce 4T1 ve 4THMpc hücreleri 6 kuyucuklu-plate'lere 100 000 hücre/kuyucuk ve 500 000 hücre/kuyucuk olacak şekilde bölündü. 1 µg/ml Talidomit uygulamasını takiben Neprilizin enzim aktivitesi ölçülebilir düzeyde bulunmuştu.

Ancak, ADAM-10 enzim aktivite çalışmalarında olduğu gibi, aynı hücre sayısında P maddesi miktarı tespit edilemedi. Neprilizin enzim aktivitesi de tıpkı ADAM-10 enzim aktivitesinde olduğu gibi P maddesi miktarı ile ilişkili olduğu için, P maddesi optimizasyon deneylerinde tespit edilen hücre sayısı ( $3 \times 10^6$  hücre/ 10 ml %1 serumlu besi yeri) doz (40 µg/ml Talidomit) ve inkübasyon süresinde (24 saat) Neprilizin enzim aktivitesinin belirlenmesine karar verildi. Hücreler  $3 \times 10^6$  hücre/10 ml %1 serumlu besi yeri olacak şekilde steril küçük petri kaplarına bölündü. Yapışma ve yayılmalarını takiben, besi yerleri uzaklaştırıldı ve kontrol grubu olarak kullanılacak petri kaplarına 1,5 ml %1 serumlu taze besi yeri ve diğer petri kaplarına 40 µg/ml Talidomit içeren 1,5 ml % 1 serumlu besi yeri eklendi. İlaç uygulamalarından 4 saat sonra radyoterapi olarak

etiketlenen petri kapları 45 Gy <sup>60</sup>Co ile ışınladı. Hücreler 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda besi yerleri uzaklaştırılarak üzerlerine 1 ml PBS eklenerek kaldırılan hücreler ependorf tüplere alınarak, 1500 rpm'de 2 dakika döndürülerek çöktürüldü. PBS uzaklaştırıldı. Süpernatantlar ependorf tüplere aktarıldı. Örneklerdeki protein miktarları Biorad BSA (Bovine Serum Albumin) kiti kullanılarak Bradford yöntemiyle belirlendi. Tüm örnekler için, 100 µg/ml protein içeren hacim hesaplandı. Hemen çalışılmayacaksa örnekler 50 µl olacak şekilde ependorflara bölünerek -80 °C'de saklandı.

100 µg/ml protein içerecek kadar hacimde her örnekten alınıp ependorf tüplere aktarıldı. Tüplerin üzerine 250 µl, 50 mM Tris-HCl (pH:7.4) eklendi. Örnekler sonifikasyon yöntemi ile parçalandı ve 4°C'de 14 000 rpm'de 10 dakika döndürülerek çöktürüldü. Fosforamidon adlı inhibitör içeren ve içermeyen iki farklı substrat solüsyonu hazırlandı.

**Solüsyon 1:** 1 mM N-Dansyl-D-Ala-Gly-p-nitro-Phe-Gly (DAGPNG) 'den Dansyl-D-Ala-Gly (DAG) + 10 µM enalapril + 50 mM Tris-Hcl

**Solüsyon 2:** 1 mM DAGPNG + 10 µM enalapril + 50 mM Tris-Hcl+ 10 mM fosforamidon).

Hazırlanan substrat solüsyonları 37 °C' de 10 dakika bekletildi. 50 µl süpernatant + 100 µl substrat solüsyonları ayrı ayrı ependorflara pipetlendi ve 37 °C' de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüpler 90 °C su banyosunda kaynatılarak reaksiyon sonlandırıldı. Her bir örnek 1:10 oranında Tris-HCl ile sulandırıldı. 10 000 rpm'de 5 dakika çevrildi. Süpernatantlar'dan 100 µl alınarak okumanın yapılacağı plate'lere pipetlendi. Örneklerin floresan değerleri eksitasyon 342 nm, emisyon 562 nm dalga boylarında ölçüldü.

### **3.6. Western-Blot Yöntemi ile Enzim Aktivitelerinin Gösterilmesi**

#### **3.6.1. Western-blot deneylerinde kullanılan solüsyonların içerikleri**

Western blot deneylerin kullanılan tüm kimyasallar için Sigma markası tercih edilmiştir.

**i) Liziz tampon**

150 mM NaCl, %1 lik Triton-X, 50 mM Tris baz ve 2µl/ml proteaz inhibitör kokteyli pH:8 olacak şekilde istenilen hacimde hazırlandı.

**ii) 10 X Tris baz solüsyonu (TBS)**

24.2 gr tris baz ve 80 gr NaCl 800 ml distile suda çözülür, pH 7.6'ya ayarlanır ve hacim distile su ile 1 l'ye tamamlandı.

**iii) Tris baz solüsyonu-tween 20 (TBST)**

50 ml 10X TBS, 450 ml distile su, 500 µl Tween 20 karıştırılarak hazırlandı.

**iv) 2X Sodyum dodesil sülfat (SDS) yükleme tamponu**

%10 gliserol,%5 merkaptotanol, %3 SDS ve% 0.02 bromfenolmavisi pH: 6.8 olan 62,5 mM tris baz solüsyonu ile karıştırıldı. 1 ml ependorf tüplere bölünerek -20°C' de saklandı.

**v) 4X Alt jel hazırlama tamponu**

18.7 gr tris baz, 80 ml distile su ile karıştırıldı. % 20'lik SDS solüsyonundan 2 ml eklendi, pH:8.8 olacak şekilde ayarlandı ve hacim distile su ile 100 ml ye tamamlandı.

**v) 4X Üst jel hazırlama tamponu**

6 gr tris baz, 65 ml distile su ile karıştırıldı. % 20'lik SDS solüsyonundan 2 ml eklendi, pH: 6,8 olacak şekilde ayarlandı ve hacim distile su ile 100 ml ye tamamlandı.

**vi) 10X yürütme tamponu**

30 gr tris baz, 144 gr glisin 600 ml distile suda çözüldü ve hacim yine distile su ile 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan bu solüsyon stok olarak saklandı. Kullanılırken stok solüsyon 10 kez seyreltilerek içerisine 5 ml % 20'lik SDS eklendi.

**vii) Transfer tamponu**

2.1 gr tris-baz, 10.08 gr glisin, 0.7 gr SDS, 140 ml metanol karıştırıldı. 500 ml distile su ile çözülerek hacim 700 ml'ye tamamlandı.

**viii) %5'lik süt tozu**

5 gr yağsız süt tozu 100 ml 1X TBS'de çözüldü.

**ix) %10'luk Amonyum per sülfat (APS)**

10 gr APS 100 ml distile suda çözüldü.

### 3.6.2. 4T1 ve 4THMpc hücrelerinin western-blot için hazırlanması

4T1 ve 4THMpc hücreleri  $3 \times 10^6$  hücre/ 10 ml %1 serumlu besi yeri olacak şekilde steril küçük petri kaplarına bölündü. Yapışma ve yayılmalarını takiben, besi yerleri uzaklaştırıldı ve kontrol grubu olarak kullanılacak petri kaplarına 1,5 ml %1 serumlu taze besi yeri ve diğer petri kaplarına 1 µg/ml Talidomit içeren 1,5 ml % 1 serumlu besi yeri eklendi. İlaç uygulamalarından 4 saat sonra radyoterapi olarak etiketlenen petri kapları 45 Gy  $^{60}\text{Co}$  ile ışınıldı. Hücreler 24 saat inkübe edildi.

Her iki enzimde membrana bağlı enzimler olduğu için, inkübasyon süresi sonunda hücreler üzerine, enzimlerin çözülebilir hale gelmelerini sağlayacak triton X-100 içeren liziz tamponundan 300 µl eklenerek hücreler kaldırıldı. Ependorflara alınan hücreler buz içerisinde yarım saat inkübe edildi. Daha sonra örnekler 12 000 rpm'de 20 dakika döndürülerek çöktürüldü. Örneklerdeki protein miktarları Biorad BSA (Bovin Serum Albumin) kiti kullanılarak Bradford yöntemiyle belirlendi. Western-blot deneylerinden elde edilecek bantların karşılaştırılabilmesi için jel kuyucuklarına yüklenen örneklerin eşit miktarda protein içermesi gerekmektedir. Bu nedenle, örneklerden her birinin 25 µg protein içeren miktarları hesaplanarak son hacimleri 20 µl olacak şekilde 2X SDS örnek yükleme tamponlarıyla karıştırıldı ve örnekler 95 °C'de 5 dakika kaynatıldı. Jele yüklemeye hazır hale getirildi.

### 3.6.3. Jellerin hazırlanması

Jellerin döküleceği camlar alkol ile silinerek temizlendi ve jel dökme aparatına yerleştirildi. Her iki enzim içinde % 4'lük ayırma jeli (üst jel) ve % 10'luk yürütme jeli (alt jel) kullanıldı.

i) % 10'luk Alt jelin hazırlanması

2.5 ml distile su, 1.25 ml 4X Alt jel hazırlama tamponu, 1.25 ml %40 akrilamid-bisakrilamid, 30 µl %10'luk APS, 5 µl Tetraetilmetilendiamid (TEMED) karıştırıldı.

ii) %4'lük Üst jelin hazırlanması

1,625 ml distile su, 625 µl 4X Üst jel hazırlama tamponu, 250 µl %40 akrilamid-bisakrilamid, 15 µl %10'luk APS, 5 µl Tetraetilmetilendiamid (TEMED) karıştırıldı.

Jeller 15 ml'lik falkonlardan hazırlandı ve ilk önce alt jel içerisine temed dökülür dökülmez, camlar arasına pipetlendi. Üst yüzeyin düzgün olması için jelin üst kısmına sula doyurulmuş bütanol eklendi. Alt jel polimerize olmadan üst jelin içerisine TEMED eklenmedi. Alt jel polimerize olduktan hemen sonra, bütanol uzaklaştırıldı ve üst jele TEMED eklenerek alt jelin üzerine pipetlendi ve polimerize olması beklendi.

### **3.6.4 Örneklerin jele yüklenmesi ve SDS-PAGE**

Jeller polimerize olduktan sonra toplam hacmi 20 µl olan 2xSDS yükleme tamponuyla karıştırılan örnekler ve 15 µl Moleküler ağırlık standartları (161-0324 BioRad, Kaleidoscope standartları) jel kuyucuklarına yüklendi. Elektroforez tankına jeller yerleştirildi ve tank 1 X Yürütme tamponuyla doldurularak sistem 20 mA'de çalıştırıldı. Örnekler alt jele geçer geçmez akım 40 mA'e yükseltildi. Yükleme tamponu jelin en altına ulaştığında sistem kapatıldı.

SDS-PAGE devam ederken membrana transfer için uygun boyutlarda kesilmiş PVDF membranlar, transferde kullanılacak watman kâğıtları ve süngerler Transfer tamponunda ıslatıldı. Sistem kapatıldıktan sonra jeller kurutma kâğıtları yardımıyla camlardan ayrıldı. Islatılmış süngerlerden biri transfer aparatına yerleştirildi. Üzerine kuru watman kâğıdı yardımıyla alınmış jel (jelin üst yüzü yukarı bakacak şekilde) yerleştirildi. Üzerine sırasıyla ıslatılmış membran, ıslatılmış watman ve ıslatılmış sünger koyularak aparat kapatıldı. Transfer tamponuyla doldurulan tank içerisine yerleştirilerek 40 V'da 2 saat elektroforez uygulanarak membrana transfer gerçekleştirildi. Transfer işlemi bitince, sistem kapatıldı ve membran %5'lik süt tozuna alınarak +4° C'de bir gece bekletildi.

### **3.6.5. Antikorlarla işaretleme**

Süt tozundan alınan membranlar TBST ile 15 dk 4 sefer yıkandı. Bu arada primer antikor solüsyonları hazırlandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra membranlar primer antikor (ADAM 10 için Milipor AB19026 katalog numaralı tavşan poliklonal Anti-ADAM 10.C bölgesi 1:1000 ve Neprilizin için Milipor AB5458 katalog numaralı

tavşan poliklonal Anti-neprilizin 1:2000 oranında seyreltilerek) ile bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda membranlar TBST ile 15 dakika aralıklarla 4 kez yıkandı. Yıkama sonunda membran ADAM 10 için 1:10000 ve neprilizin için 1:20000 oranında seyreltilerek hazırlanan sekonder antikor (SANTA CRUZ, hrp –bağlı immünoglobulin G) ile 1 saat süresince inkübe edildi. İnkübasyon sonunda membranlar son kez TBST ile 15 şer dakika aralıklar ile 4 kez yıkandı.

### **3.6.6. Membranın görüntülenmesi**

Membranlar ECL plus western blot görüntüleme kiti (Amersham, Bioscience RPN2132) ile görünür hale getirilip, Sigma C4729-1EA katalog numaralı Kodak 20.3x25.4 8x10 inc. biomax kaset ve Sigma Z363006-50 katalog numaralı Kodak 20.3x25.4 8x10 inc. biomax bilimsel görüntüleme filmi kullanılarak fotoğraflandı.

### **3.7 İstatistiksel Analiz**

Sitotoksosite testlerinden elde edilen deney sonuçlarındaki kontrol ve diğer gruplar arasındaki farklılık Graph-pad InStat istatistik programında, tek yönlü Anova testi ve Dunnet çoklu karşılaştırma testi kullanılarak değerlendirildi. Enzim aktiviteleri ve P maddesi miktarları ile ilgili deneylerden elde edilen veriler ise Graph-pad InStat istatistik programında, tek yönlü Anova testi ve Mann-Whitney testi kullanılarak değerlendirildi. Tüm veriler ortalama±SEM değerleri halinde Sigma Plot 10.0 programı kullanılarak grafik haline getirildi.

## **4. BULGULAR**

### **4.1 Radyoterapinin 4T1 ve 4THMpc Hücre Hatları Üzerine Etkisi**

Talidomit'in radyoterapi ile kombine etkisinin araştırılabilmesi için, öncelikle radyoterapinin etkili dozu saptandı.

#### **4.1.1. Radyoterapinin 4T1 hücre hattı üzerine etkisi**

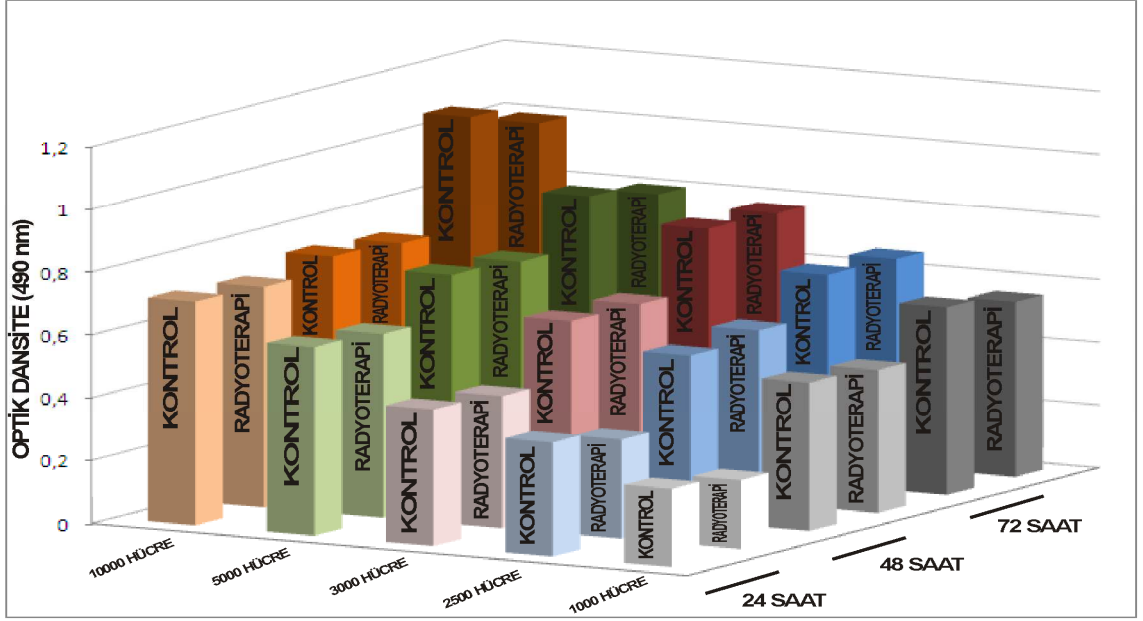
##### **4.1.1.1. Farklı dozlarda radyoterapi uygulamasının 4T1 hücre hattı üzerine etkisi**

Farklı hücre sayılarıyla (1000, 2500, 3000, 5000 ve 10 000) yapılan deneylerde, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 5, 10 ve 20 Gy radyoterapi uygulamalarının 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonrasında, 4T1 hücrelerinin canlılıkları üzerine istatistiksel anlamda önemli kabul edilebilecek bir etki göstermediği saptandı. Elde edilen veriler aşağıdaki çizelge ve şekillerde sunulmuştur (çizelge 4.1, Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).

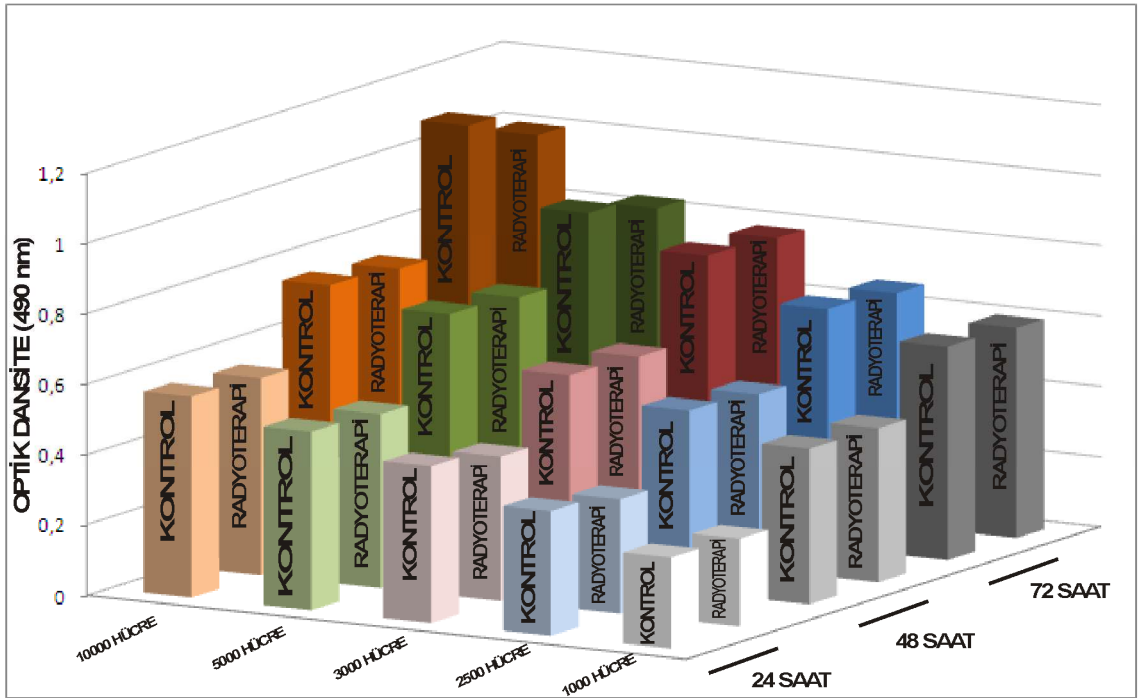
Farklı hücre sayılarıyla yapılan deneylerde, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 45 Gy Radyoterapi uygulaması ise, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonrasında, 4T1 hücrelerinin canlılıkları üzerine istatistiksel anlamda önemli kabul edilebilecek (\*;  $p<0.05$ , \*\*;  $p<0.01$ ) bir etki gösterdi. İnkübasyon süreleri sonunda, kontrol gruplarındaki hücre sayılarının artışı, görülen etkinin radyoterapiden kaynaklandığını doğrulamaktadır. Her üç inkübasyon süresinde de 45 Gy radyoterapi uygulamasının etkisi hücre sayısına bağlı olarak değişmektedir ve en çok etkiyi 5000 hücre ve 10000 hücre üzerinde göstermiştir. Yapılan tüm tekrarlarında, 45 Gy radyoterapi uygulaması anlamlı derecede etkili bulunduğu için, tez kapsamında gerçekleştirilen tüm deneylerde, 45 Gy radyoterapi uygulamasının kullanılmasına karar verildi. Elde edilen veriler aşağıdaki grafiklerde sunulmuştur (Şekil 4.4).



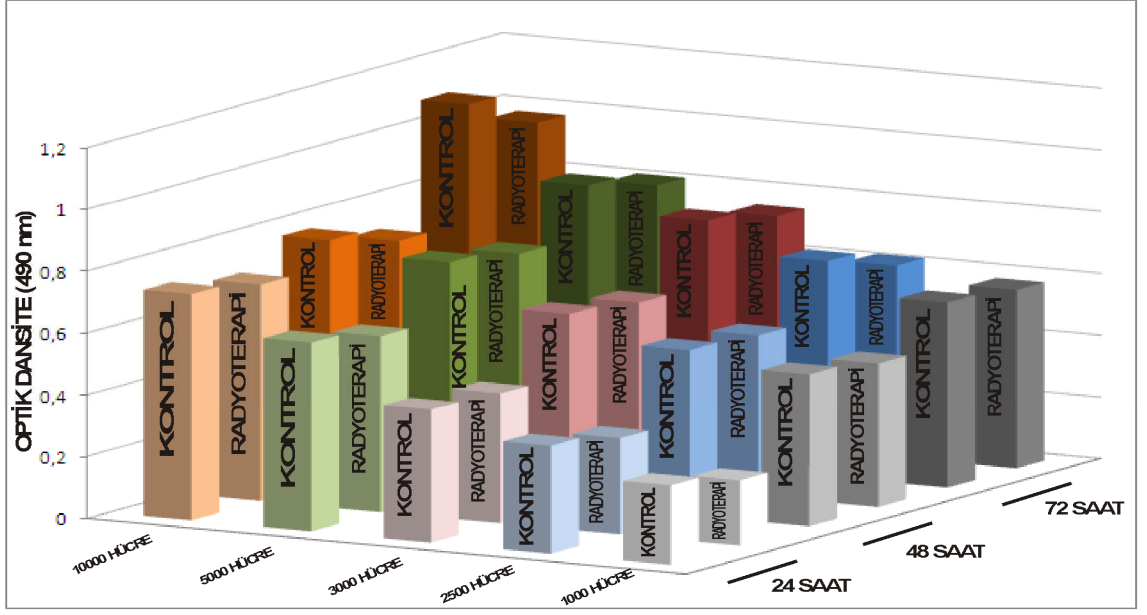




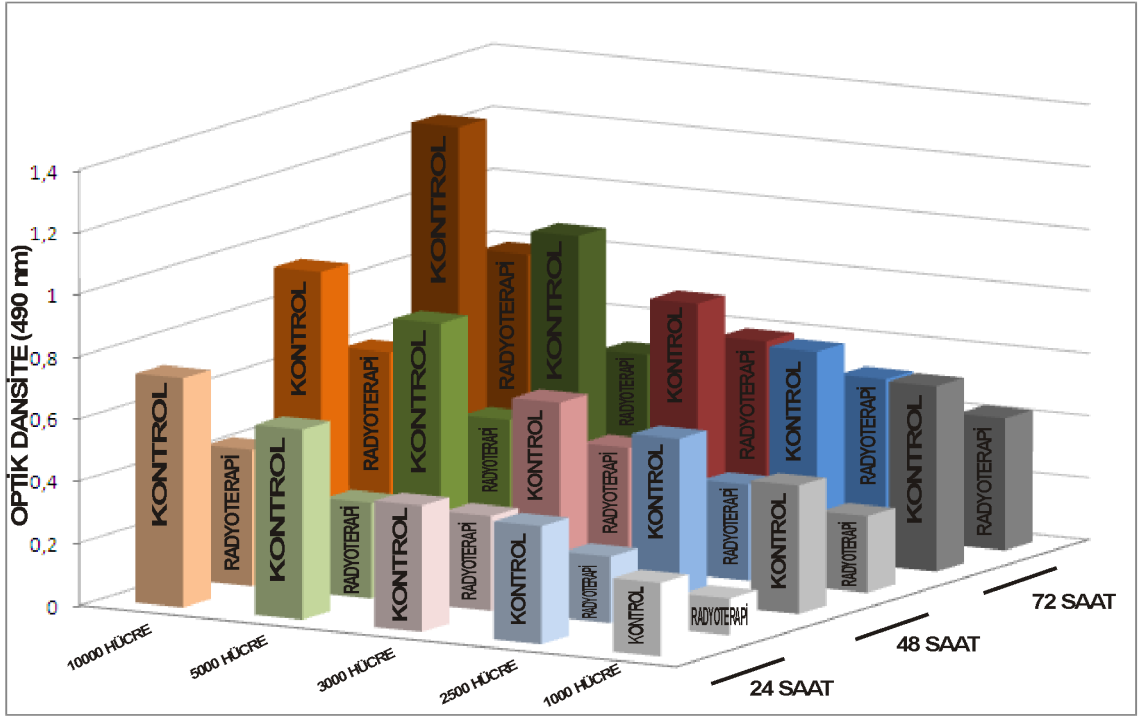
Şekil 4.1. 5 Gray radyoterapinin 4T1 hücreleri üzerine etkisi



Şekil 4.2. 10 Gray radyoterapinin 4T1 hücreleri üzerine etkisi



Şekil 4.3. 20 Gray radyoterapinin 4T1 hücreleri üzerine etkisi



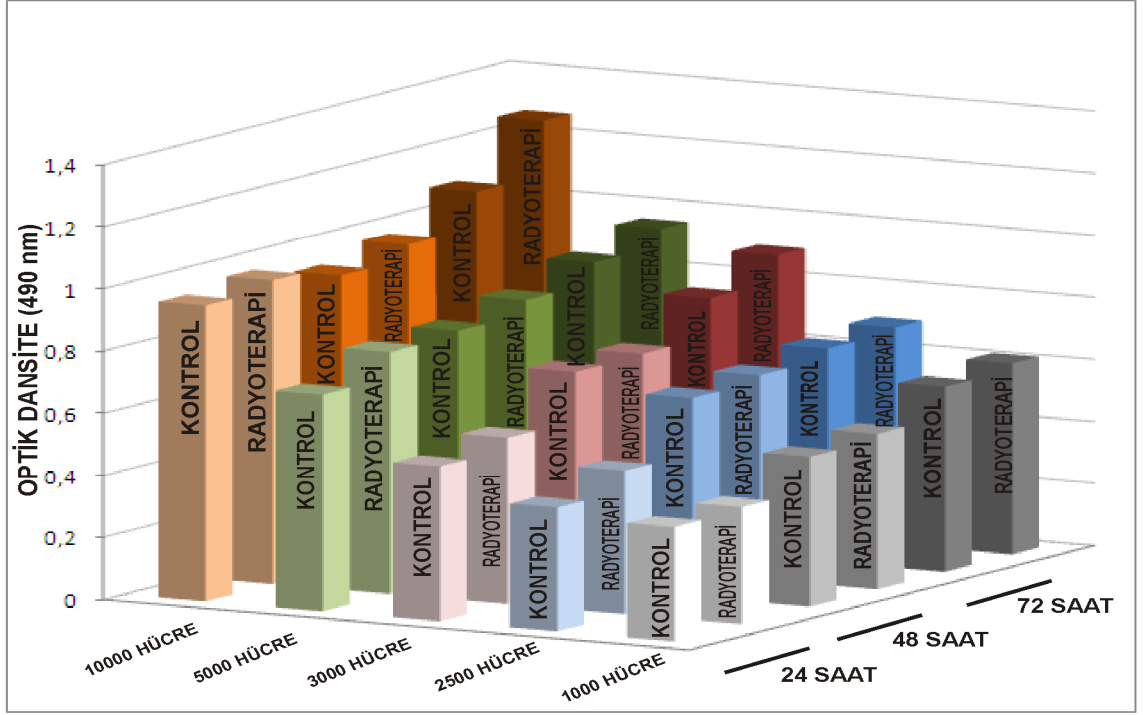
Şekil 4.4. 45 Gray radyoterapinin 4T1 hücre hattı üzerine gösterdiği etki

## **4.1.2. Radyoterapinin 4THMpc Hücre Hattı Üzerine Etkisi**

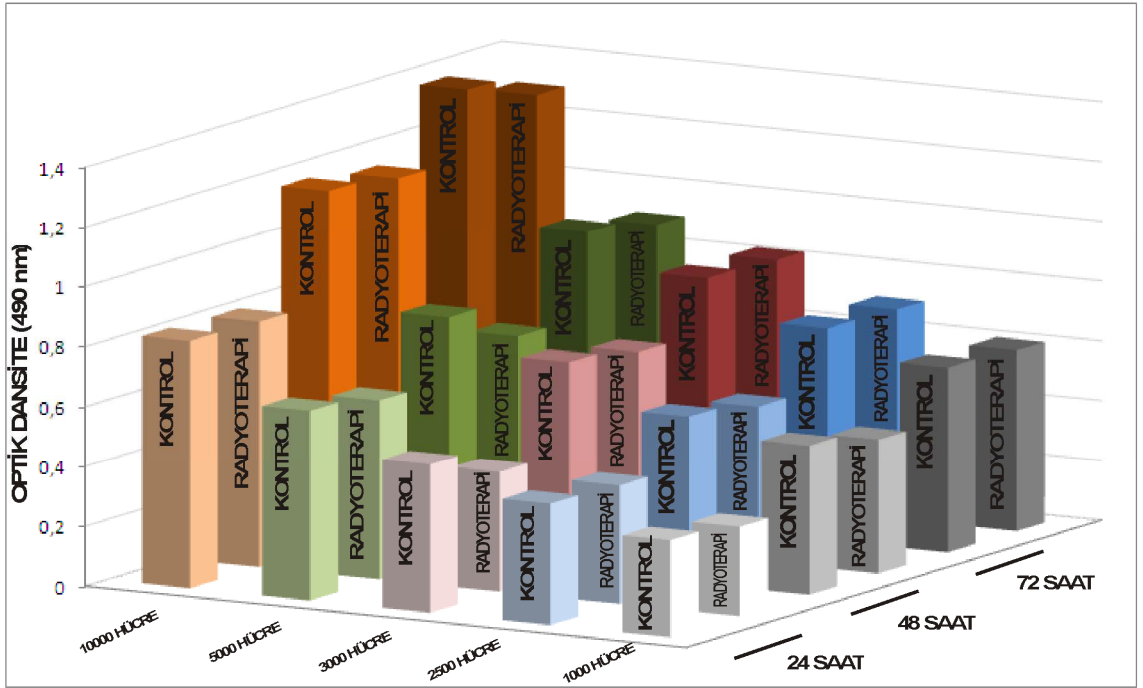
### **4.1.2.1. Farklı dozlarda radyoterapi uygulamasının 4THMpc hücre hattı üzerine etkisi**

Farklı hücre sayılarıyla (1000, 2500, 3000, 5000 ve 10 000) yapılan deneylerde, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 5, 10 ve 20 Gy radyoterapi uygulamalarının 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonrasında, 4THMpc hücrelerinin canlılıkları üzerine istatistiksel anlamda önemli kabul edilebilecek bir etki göstermediği saptandı. Elde edilen veriler çizelge 4.1 ve Şekil 4.5 Şekil 4.6 ile Şekil 4.7’de sunulmuştur.

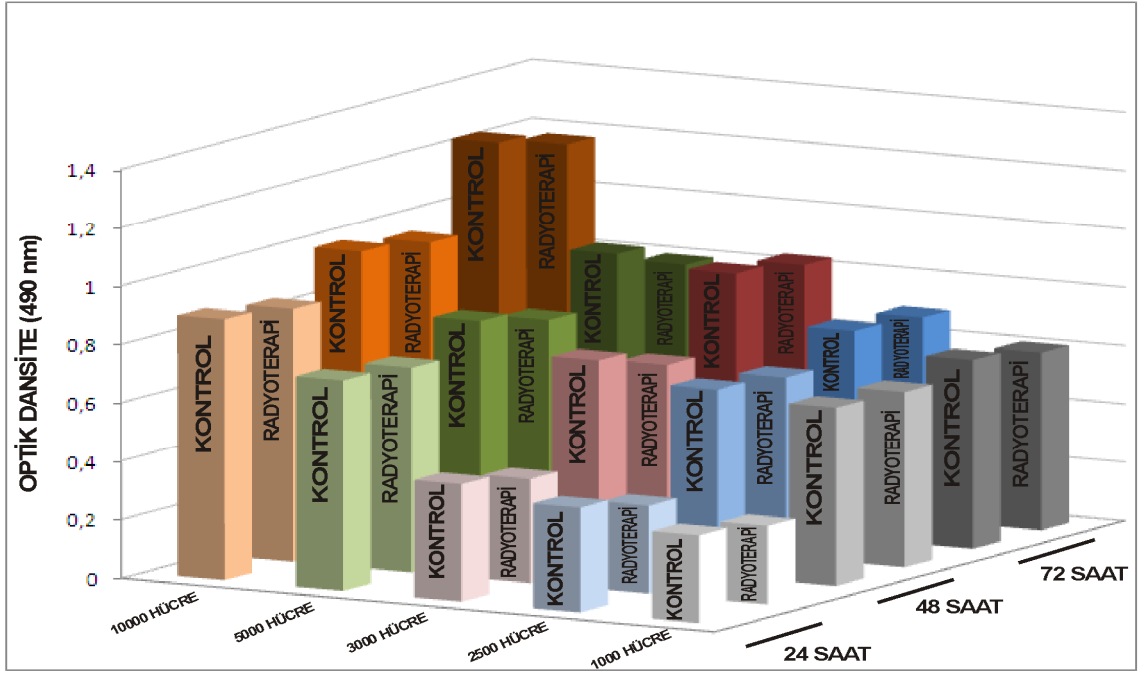
Farklı hücre sayılarıyla yapılan deneylerde, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 45 Gy Radyoterapi uygulaması ise, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonrasında, 4THMpc hücrelerinin canlılıkları üzerine istatistiksel anlamda önemli kabul edilebilecek (\*;  $p<0.05$ , \*\*;  $p<0.01$ ) bir etki gösterdi. İnkübasyon süreleri sonunda, kontrol gruplarındaki hücre sayılarının artışı, görülen etkinin radyoterapiden kaynaklandığını doğrulamaktadır. Her üç inkübasyon süresinde de 45 Gy radyoterapi uygulamasının etkisi hücre sayısına bağlı olarak değişmektedir ve en çok etkiyi 5000 hücre ve 10000 hücre üzerinde göstermiştir. Yapılan tüm tekraralarda, 45 Gy radyoterapi uygulaması anlamlı derecede etkili bulunduğu için, tez kapsamında gerçekleştirilen tüm deneylerde, 45 Gy radyoterapi uygulamasının kullanılmasına karar verildi. Elde edilen veriler aşağıdaki grafiklerde sunulmuştur (Şekil 4.8).



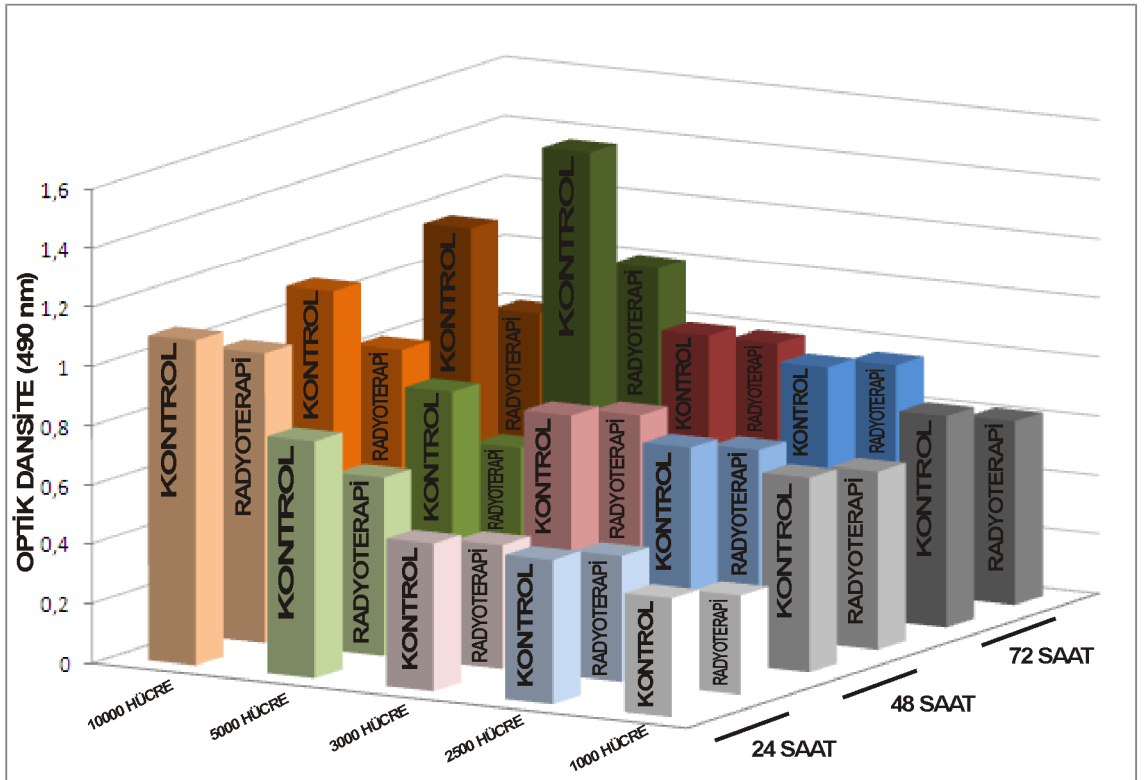
Şekil 4.5. 5 Gray radyoterapinin 4THMpc hücreleri üzerine etkisi



Şekil 4.6. 10 Gray radyoterapinin 4THMpc hücreleri üzerine etkisi



Şekil 4.7. 20 Gray radyoterapinin 4THMpc hücreleri üzerine etkisi

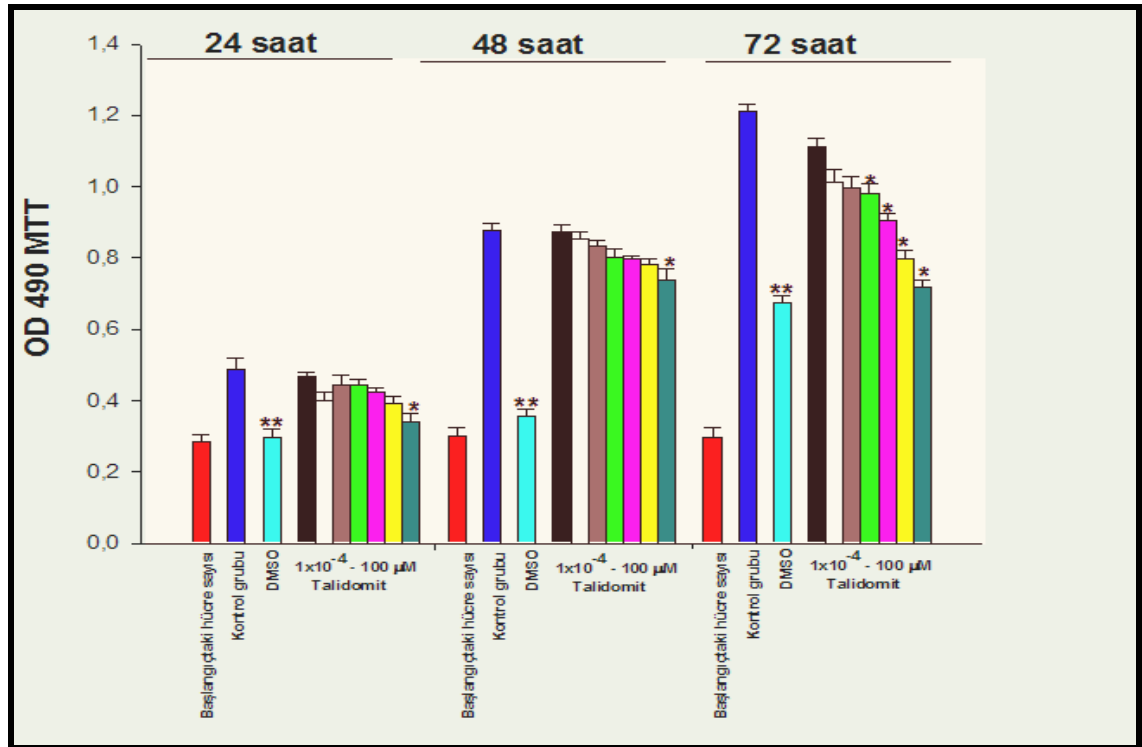


Şekil 4.8. 45 Gray radyoterapinin 4THMpc hücre hattı üzerine gösterdiği etki

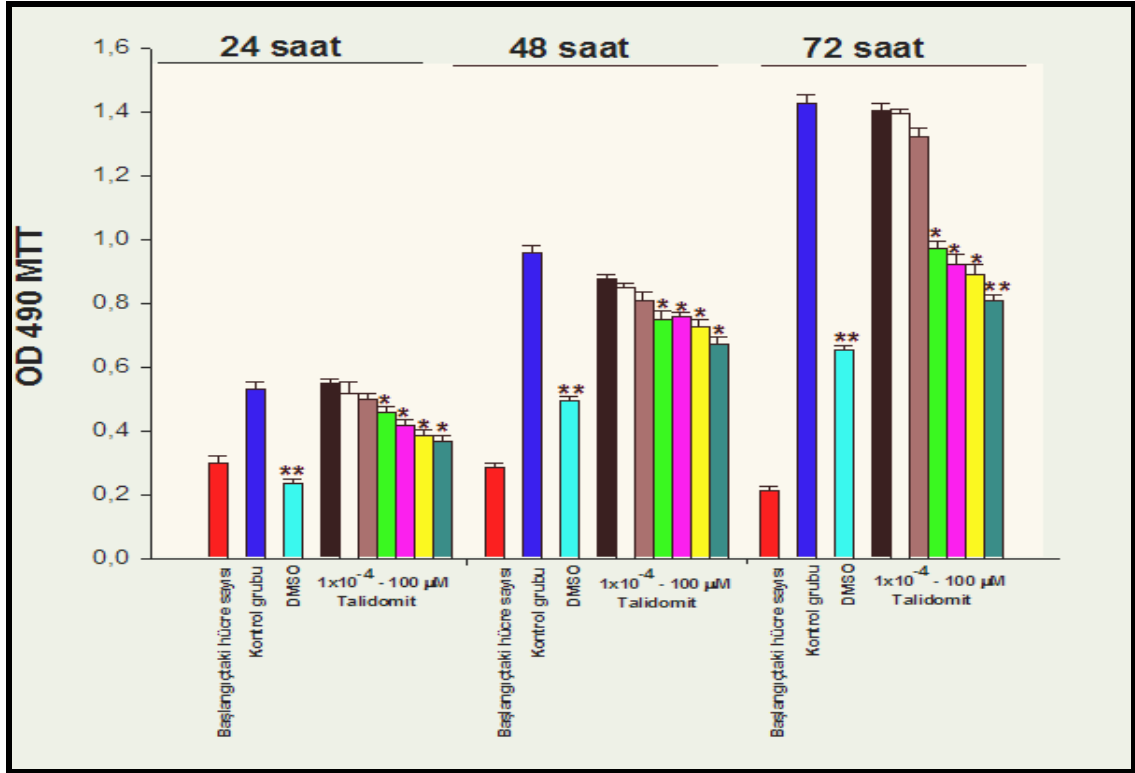
## 4.2. Talidomit'in Tek Başına ve Radyoterapi ile Kombine Olarak 4T1 ve 4THMpc Hücre Hatları Üzerine Gösterdiği Sitotoksik Etkiler

### 4.2.1. MTT test sonuçları

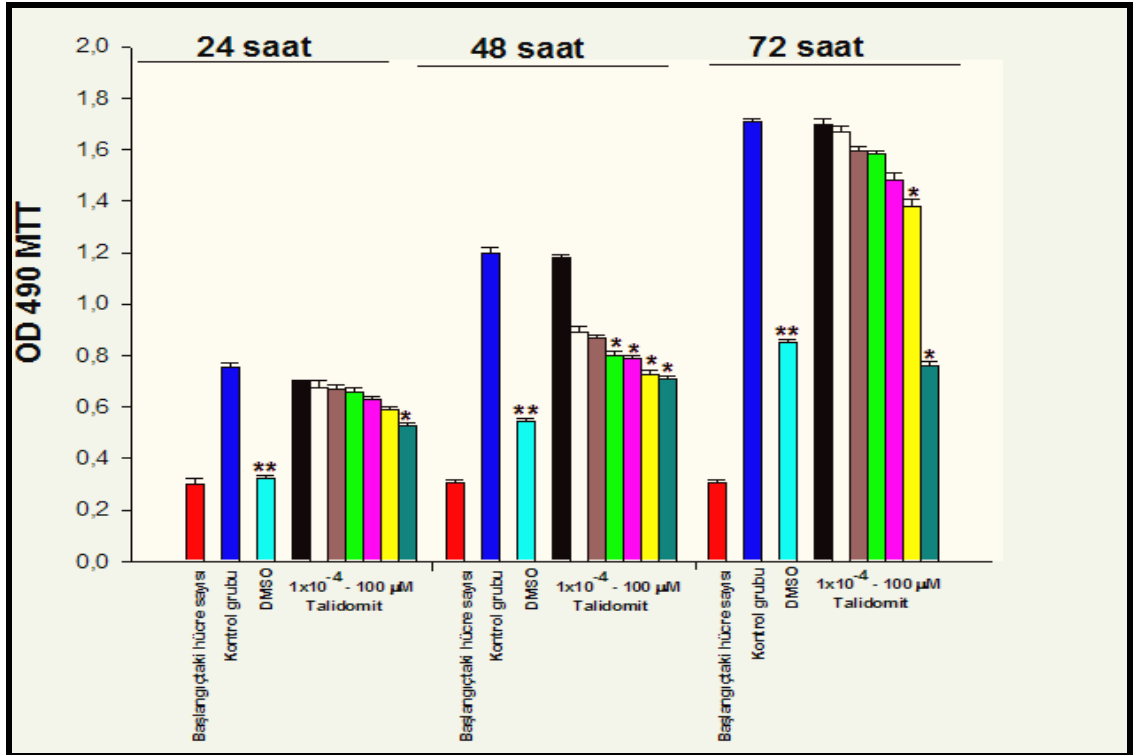
İlk denemelerde, Talidomit hücelere DMSO içerisinde çözülerek uygulandı. Ancak, farklı hücre sayıları (1000, 3000 ve 5000) ile yapılan deneylerde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, DMSO'nun 4T1 (Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9) ve 4THMpc (Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12) hücre hatları üzerinde istatistiksel anlamda önemli derece (\*\* p< 0.01, \* p< 0.05) sitotoksik etki gösterdiği belirlendi.



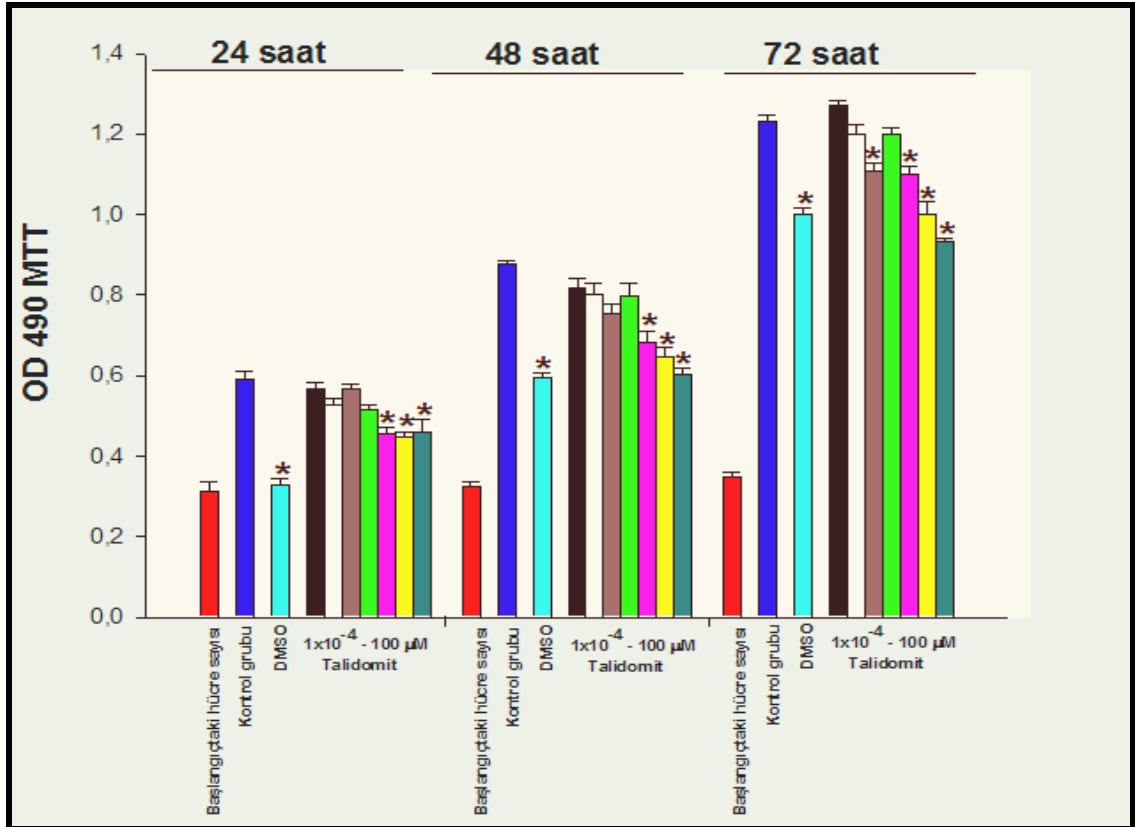
Şekil 4.9. DMSO'nun sitotoksik etkisi, 4T1 hücrelerinde (1000 hücre) %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan Talidomit grubu deney sonuçları



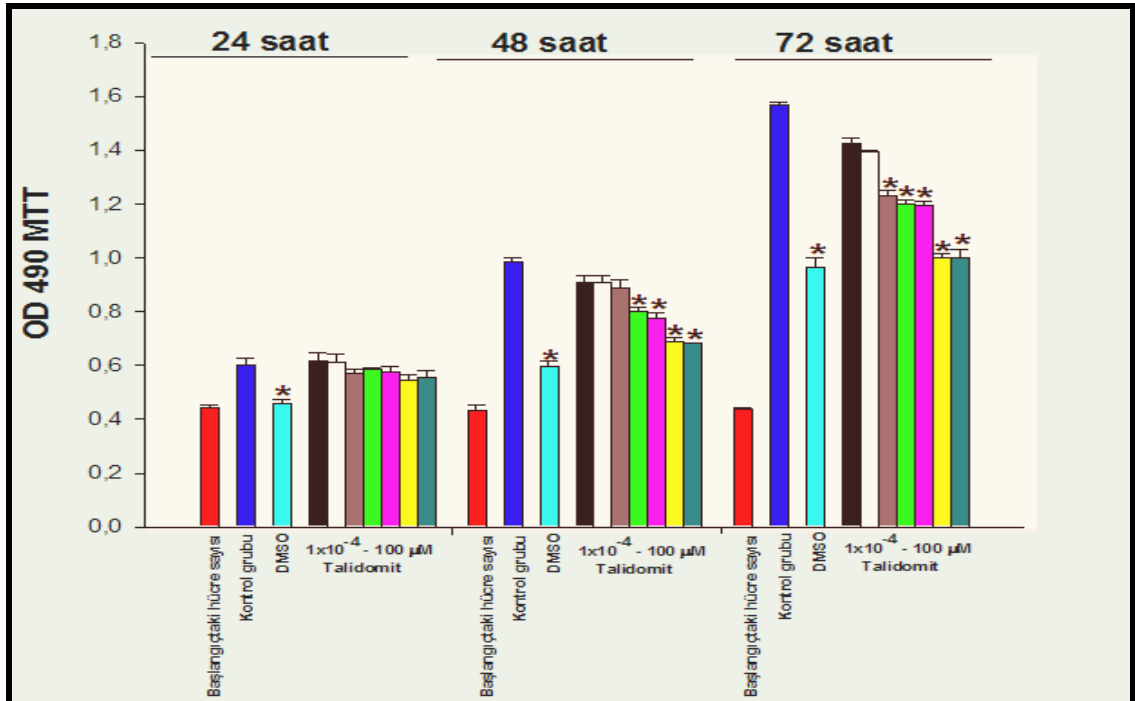
Şekil 4.10. DMSO'nun sitotoksik etkisi, 4T1 hücrelerinde (3000 hücre) %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan Talidomit grubu deney sonuçları



Şekil 4.11. DMSO'nun sitotoksik etkisi, 4T1 hücrelerinde (3000 hücre) %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan Talidomit grubu deney sonuçları

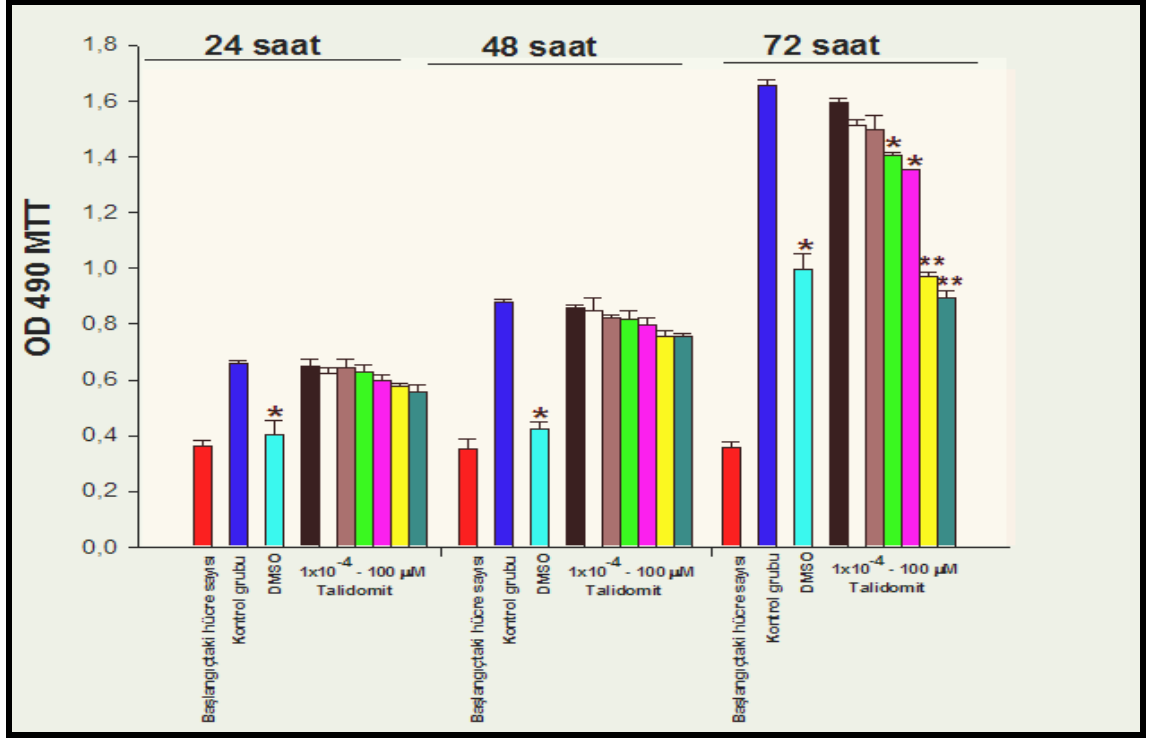


Şekil 4.12. DMSO'nun sitotoksik etkisi, 4THMpc hücrelerinde (1000 hücre) %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan Talidomit grubu deney sonuçları



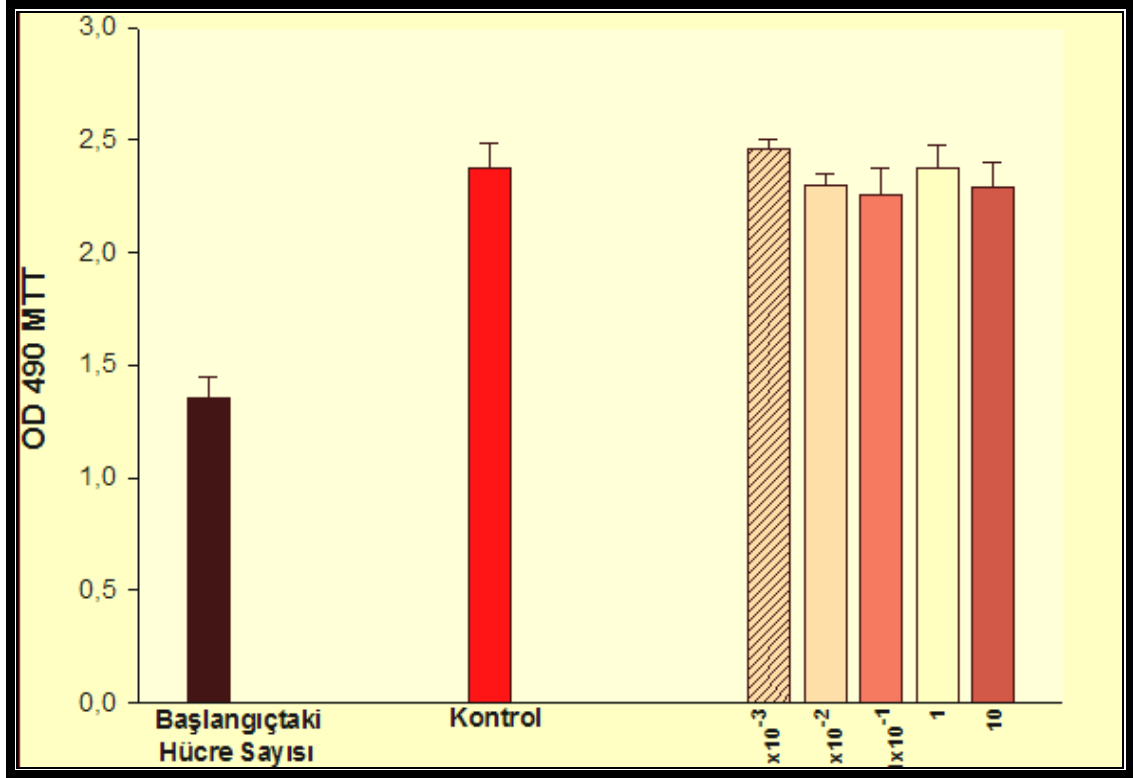
Şekil 4.13. DMSO'nun sitotoksik etkisi, 4THMpc hücrelerinde (3000 hücre) %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan Talidomit grubu deney sonuçları



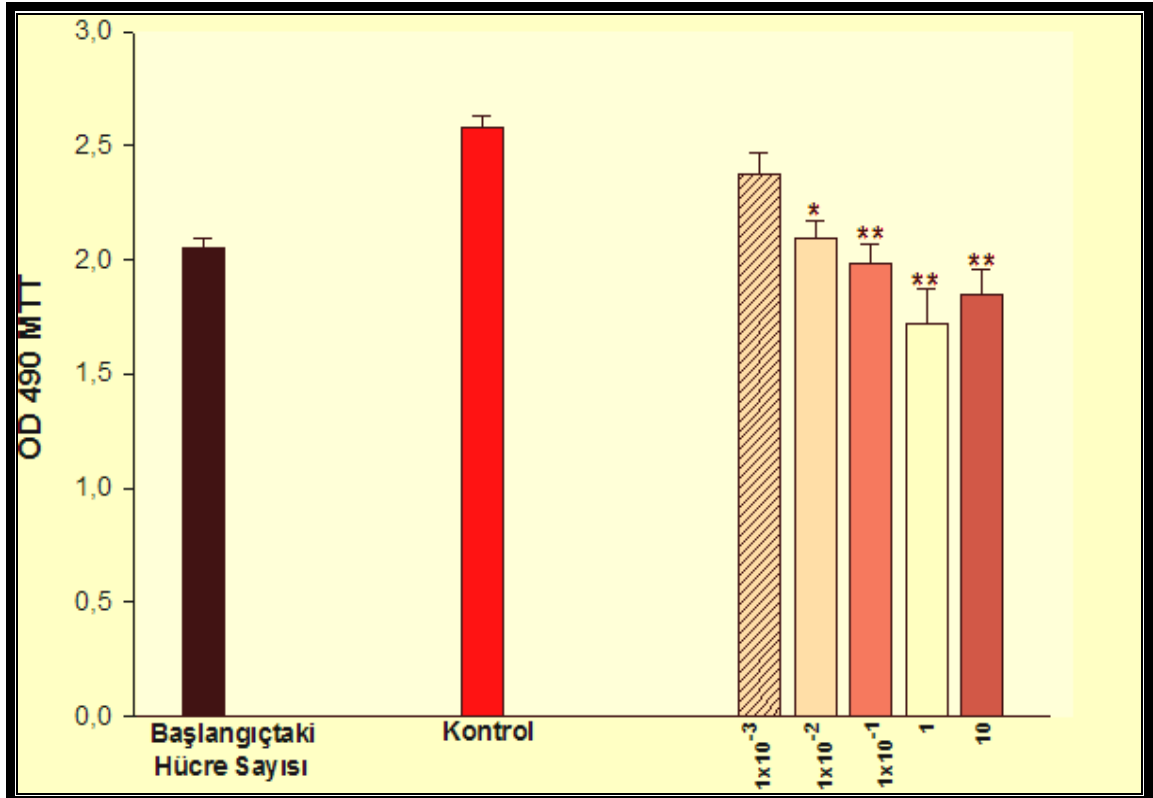


Şekil 4.14 DMSO'nun sitotoksik etkisi, 4THMpc hücrelerinde (5000 hücre) %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan Talidomit grubu deney sonuçları

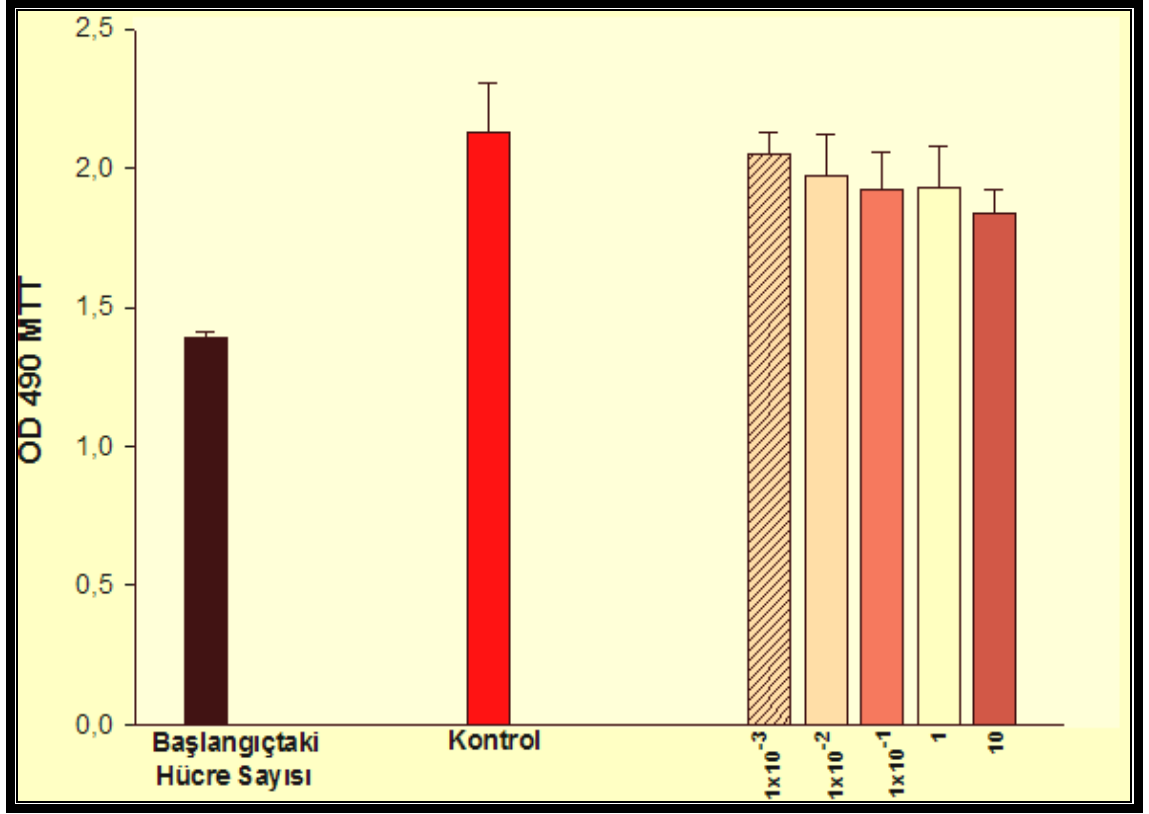
Yukarıdaki grafiklerden açıkça görüldüğü gibi, DMSO, farklı sayılarda 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde oldukça anlamlı sitotoksik etki gösterdi. Her iki hücre hattında da, DMSO tek başına sitotoksik olduğu için, bu deneylerde radyoterapi ile kombine tedavi yeniden denenmedi. DMSO'dan kaynaklanan sitotoksik etki nedeniyle, deneyler suda çözülebilen Talidomit için yeni dozlar belirlenerek ve standardize edilen %1 serumlu besi yeri kullanılarak tekrarlandı. Sonuçlar aşağıdaki grafiklerde sunulmuştur (Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18).



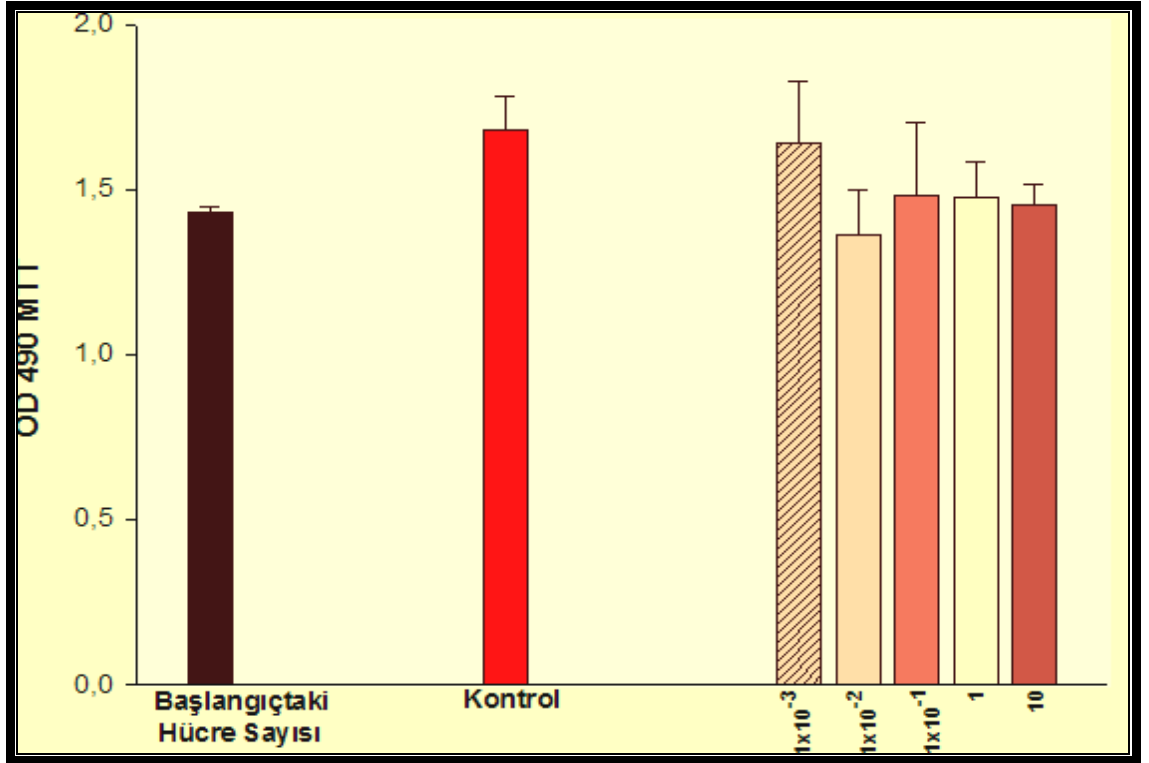
Şekil 4.15. 4T1 hücreleri (5000 hücre) Talidomit grubu 24 saat deney sonuçları



Şekil 4.16. 4T1 hücreleri (5000 hücre) radyoterapi grubu 24 saat deney sonuçları

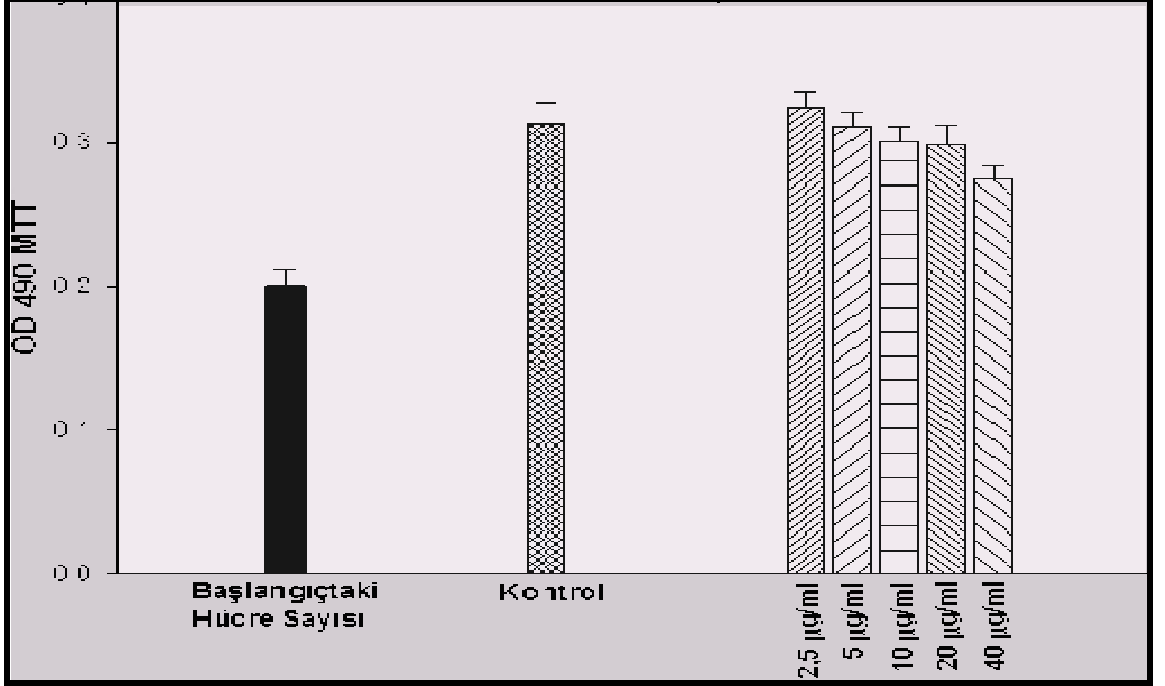


Şekil 4.17. 4THMpc hücreleri (5000 hücre) Talidomit grubu 24 saat deney sonuçları

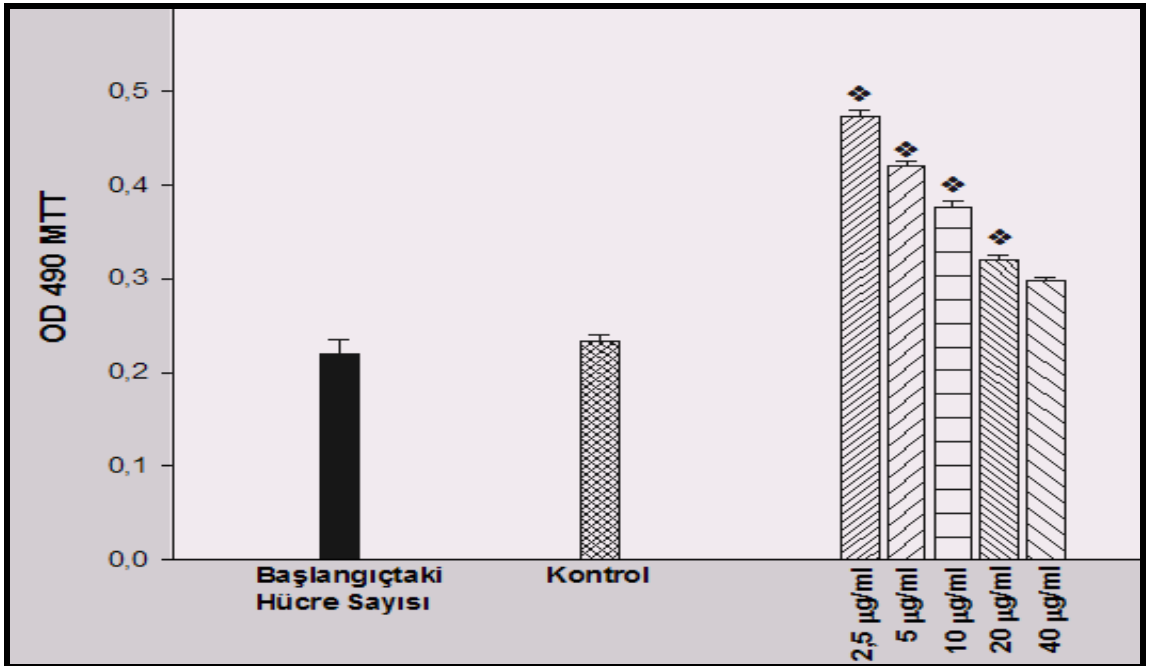


Şekil 4.18. 4THMpc hücreleri (5000 hücre) radyoterapi grubu 24 saat deney sonuçları

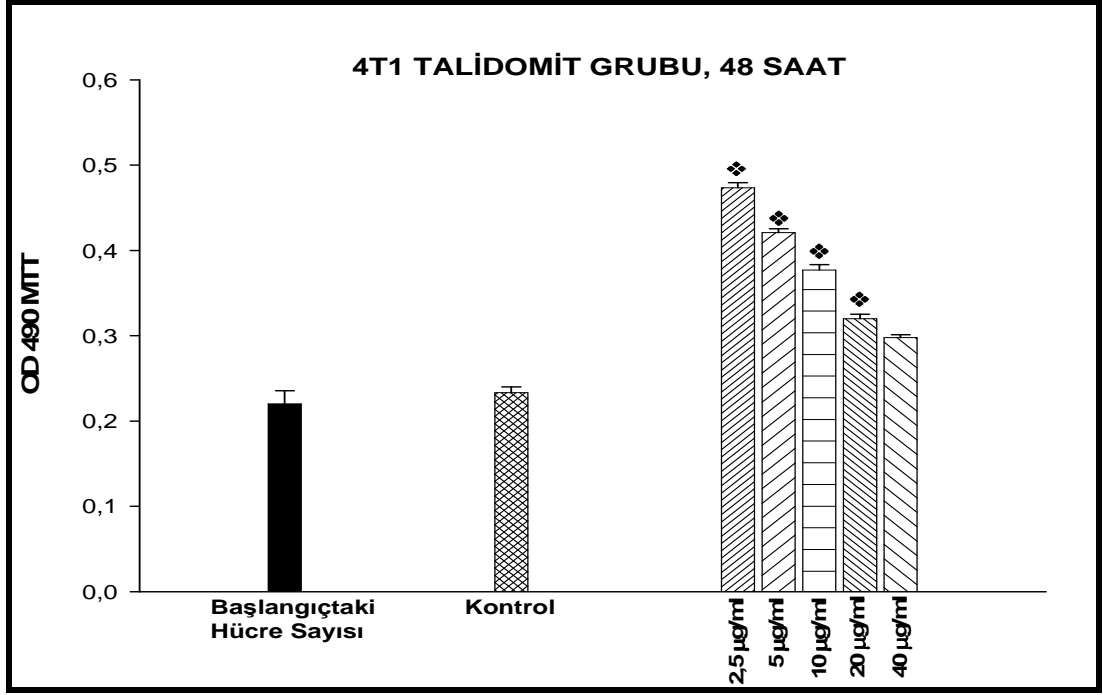
Yapılan deneylerde suda çözülen Talidomit 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde beklenen sitotoksik etkiyi yaratmadığı için Talidomit konsantrasyonları artırılarak deneyler 4 kez tekrarlandı ve elde edilen veriler aşağıdaki grafiklerde sunuldu (4T1:Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24 4THMpc: Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29, Şekil 4.30).



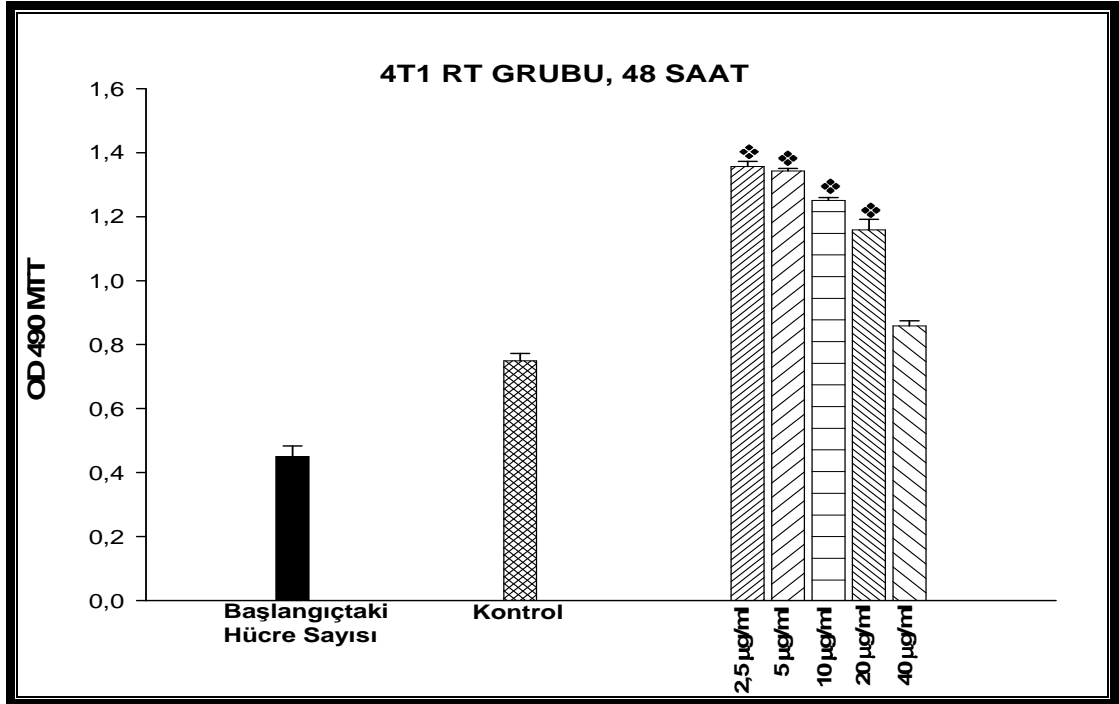
Şekil 4.19. 4T1 hücreleri (5000 hücre) 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu deney sonuçları



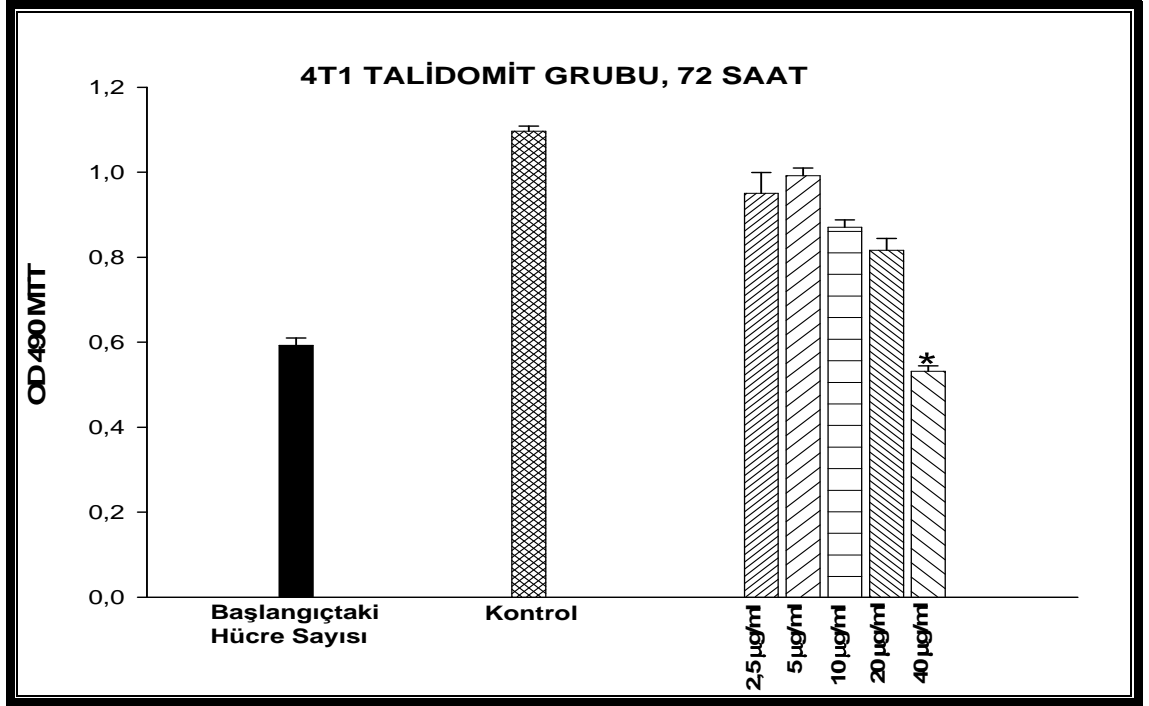
Şekil 4.20. 4T1 hücreleri (5000 hücre) 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu deney sonuçları



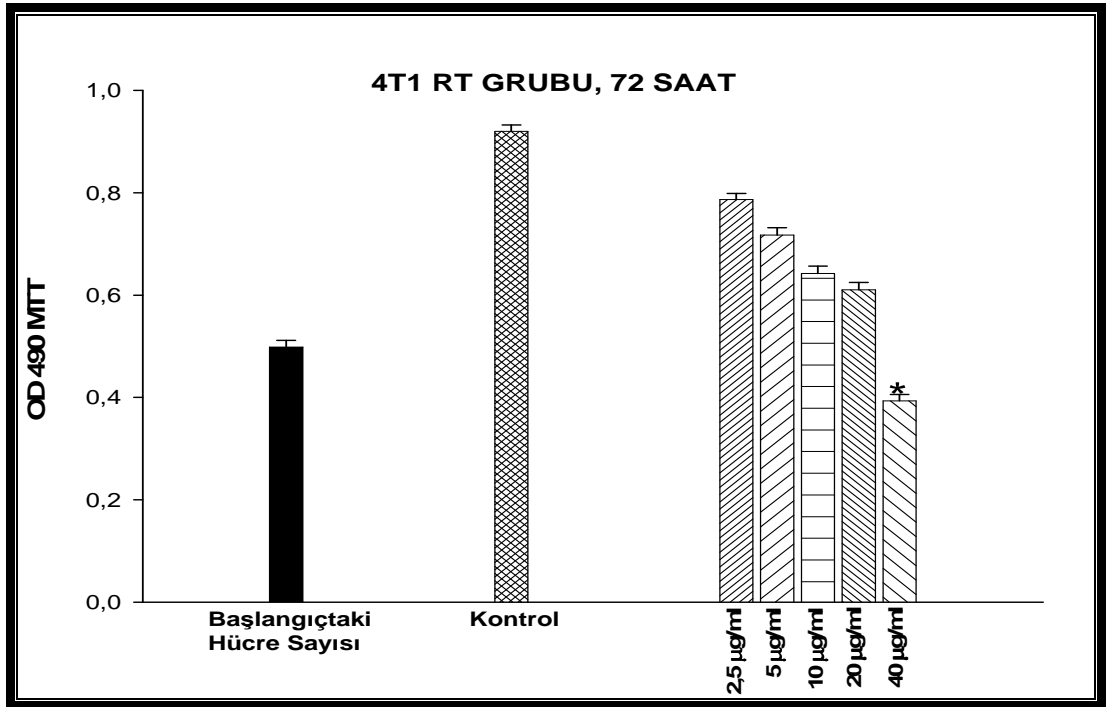
Şekil 4.21. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu deney sonuçları



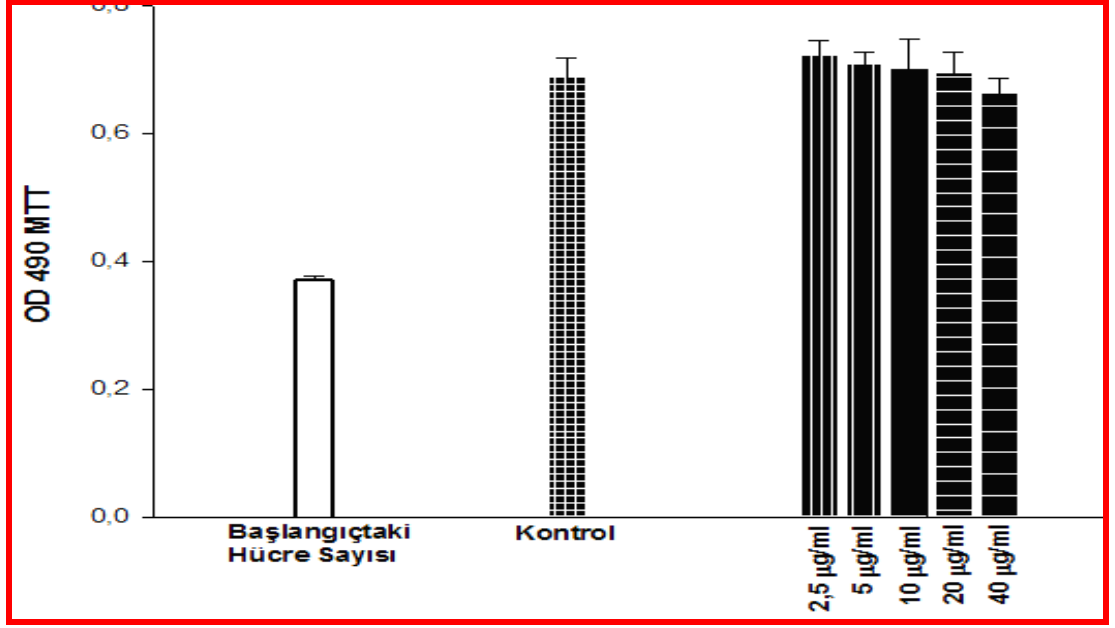
Şekil 4.22. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu deney sonuçları



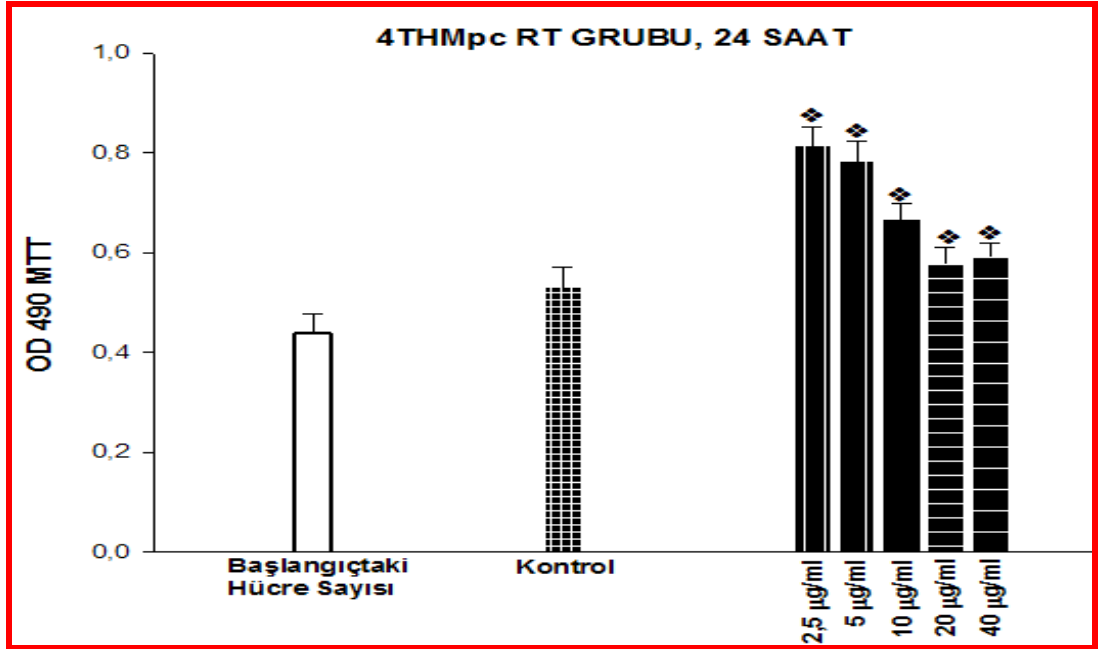
Şekil 4.23. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu deney sonuçları



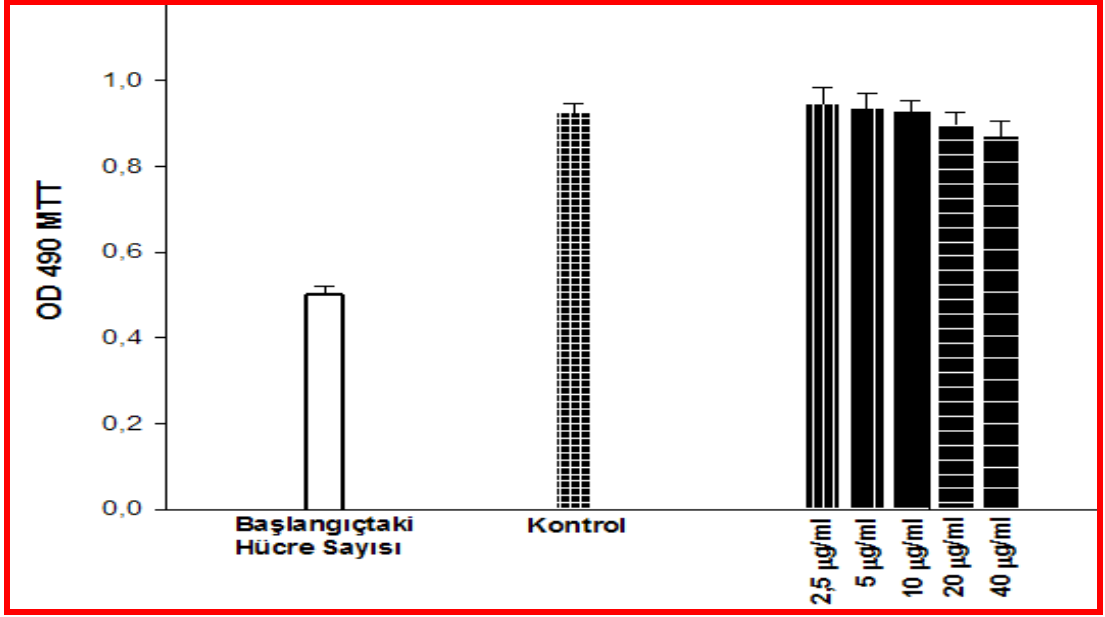
Şekil 4.24. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu deney sonuçları



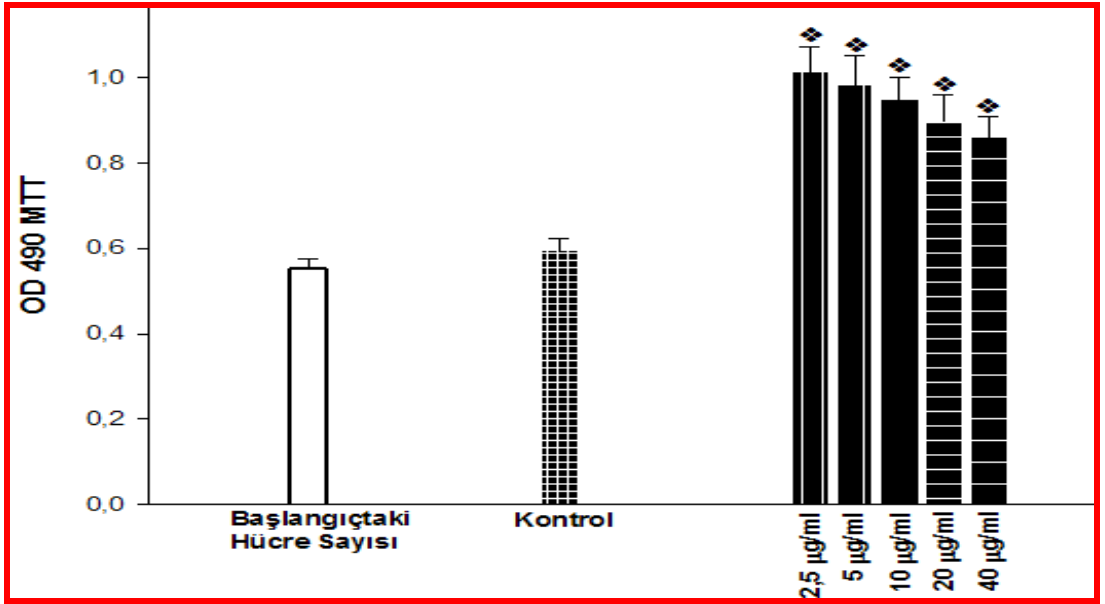
Şekil 4.25. 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu deney sonuçları



Şekil 4.26. 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu deney sonuçları

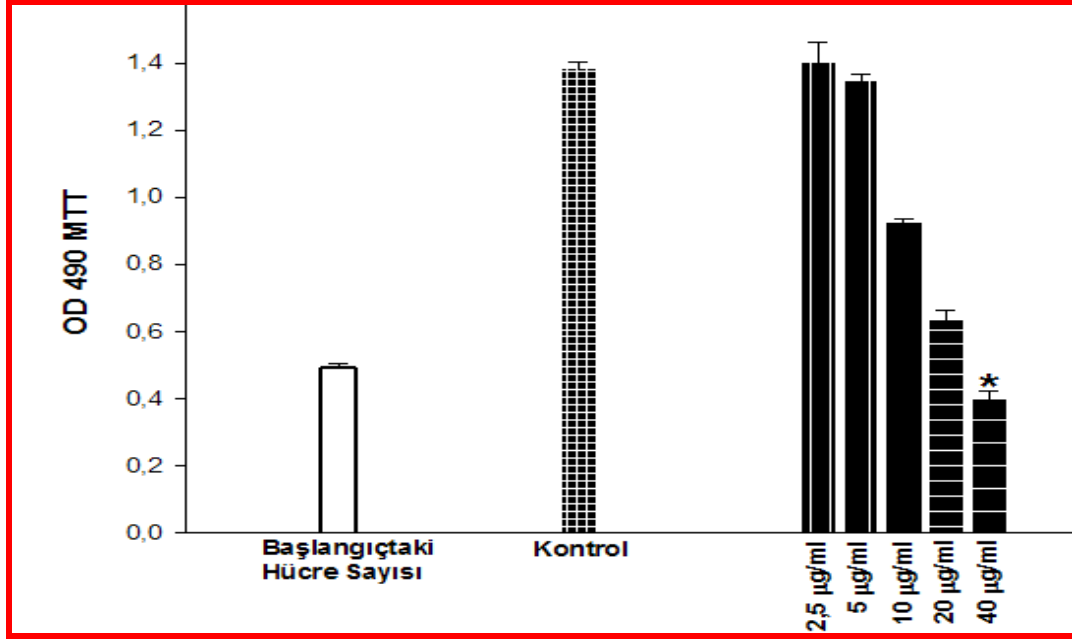


Şekil 4.27. Talidomit, 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu deney sonuçları

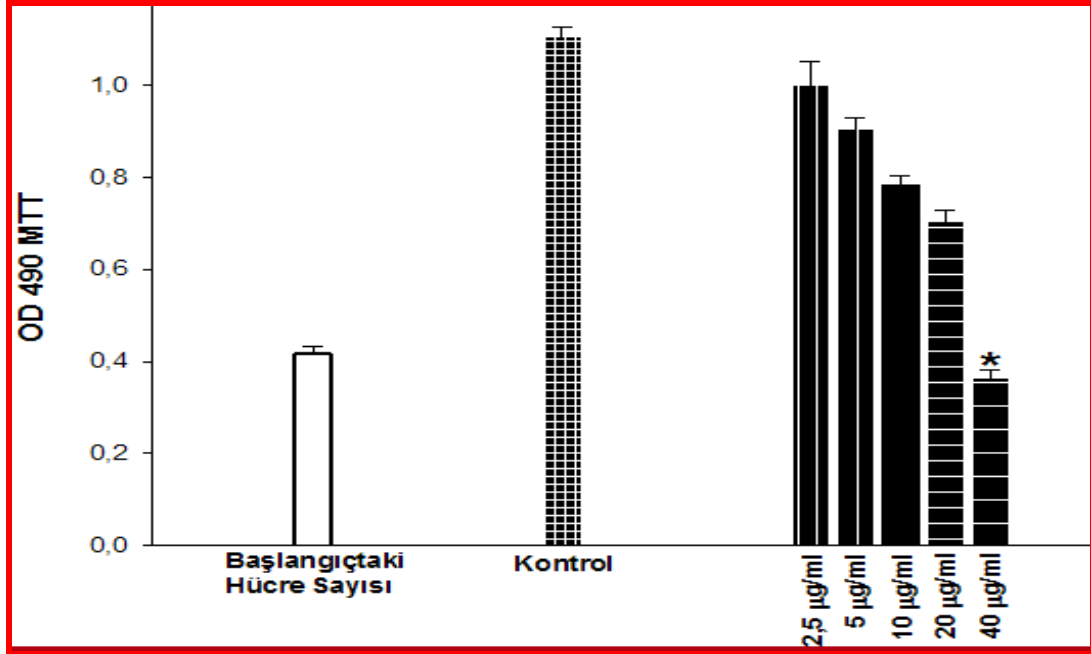


Şekil 4.28. Talidomit, 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu deney sonuçları





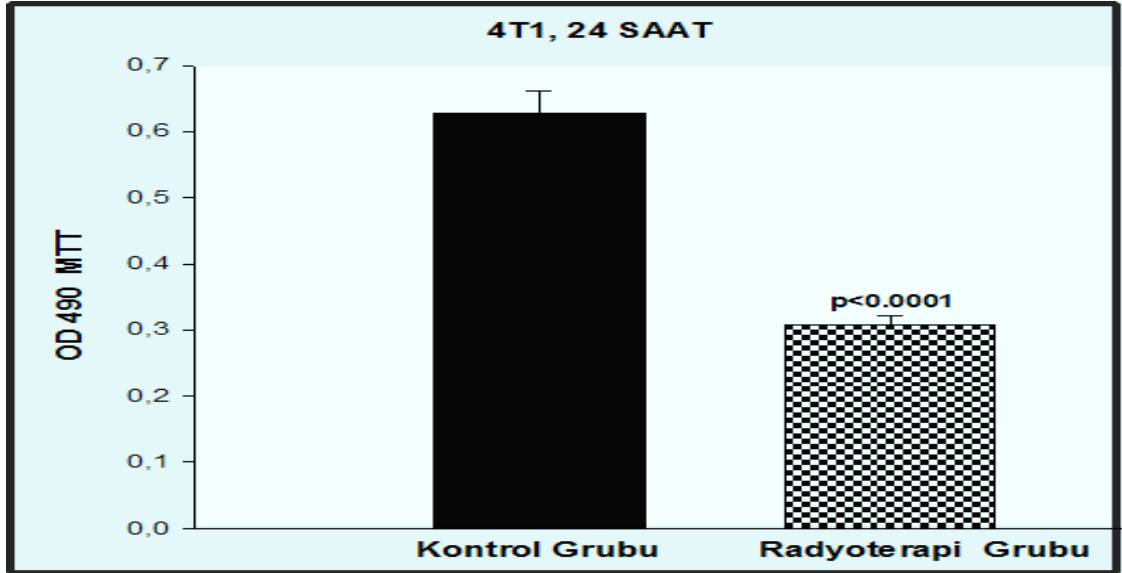
Şekil 4.29. Talidomit, 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu deney sonuçları



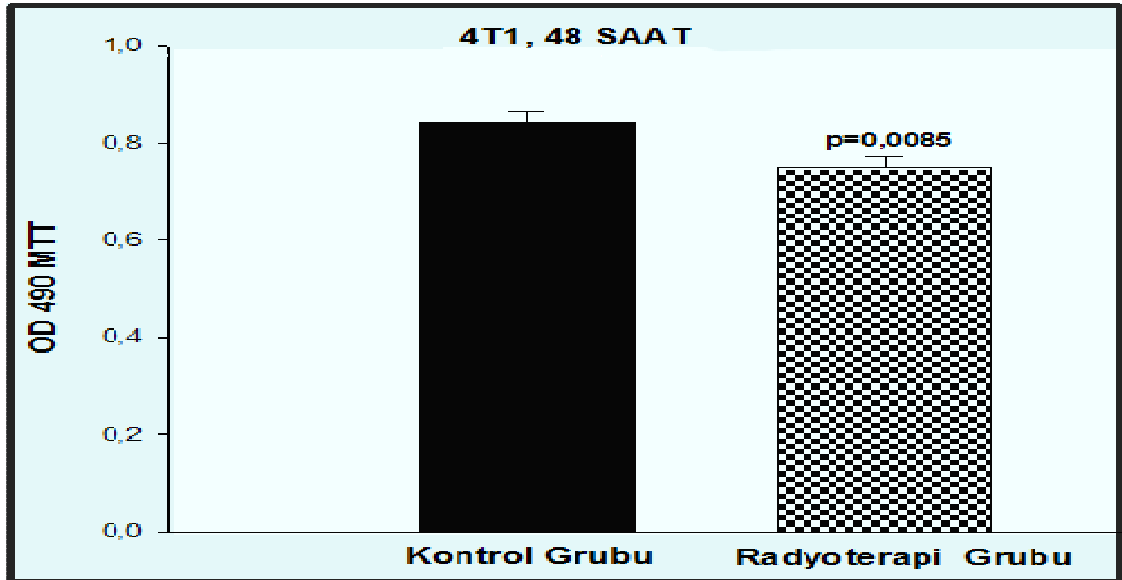
Şekil 4.30. Talidomit, 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu deney sonuçları

Yukarıdaki grafiklerden de görüldüğü gibi, 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonunda tek başına Talidomit uygulamasının, kontrol grubuna oranla hücrelerde sitotoksik bir etki göstermediği bulunmuştur. Bu bağlamda, kombine tedavi kontrol grubuna oranla

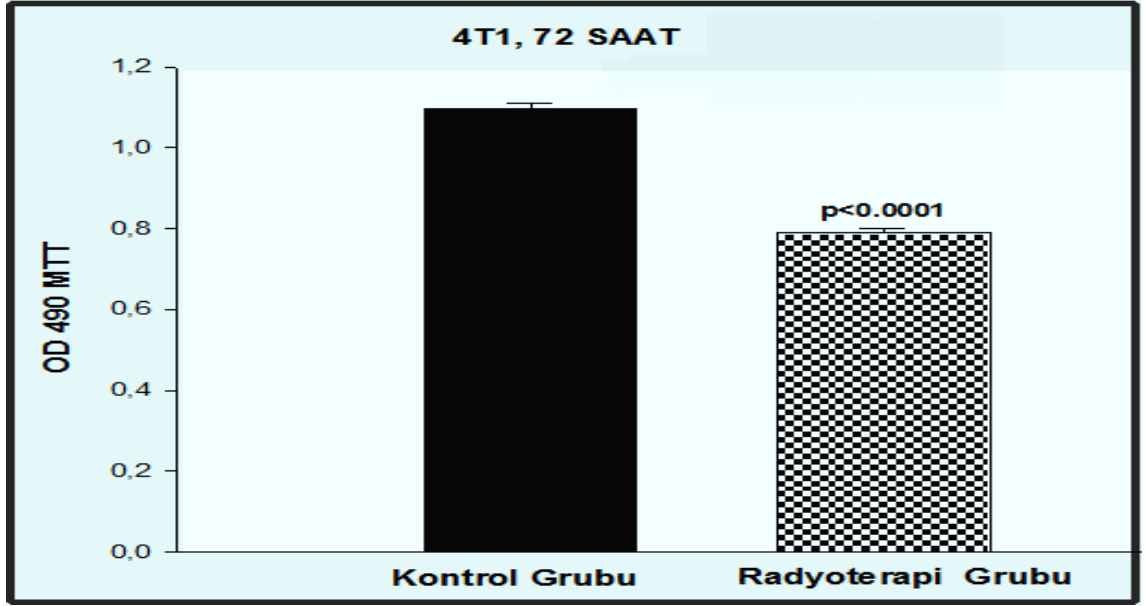
hücre sayısını artırmıştır (❖:  $p < 0,001$ ). Bu etki, radyoterapi ile Talidomit'in etkileşimi sonucudur. Tek başına radyoterapi uygulaması ise, kontrol grubundaki hücre canlılığını 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde azaltmıştır (Mann-Whitney testi  $p < 0,0001$ ). Bu etkiler aşağıdaki grafiklerde gösterildi (Şekil 4.31, Şekil 4.32, Şekil 4.33, Şekil 4.34, Şekil 4.35, Şekil 4.36).



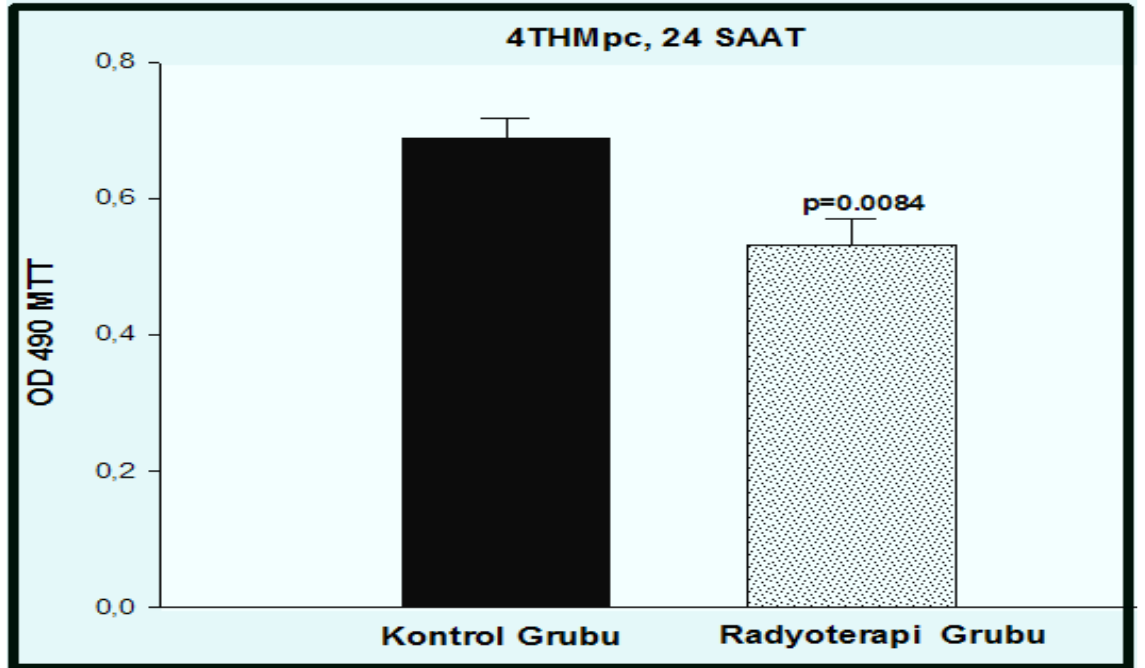
Şekil 4.31. 4T1 hücrelerinde (5000 hücre) tek başına radyoterapinin 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda gözlenen etkisi



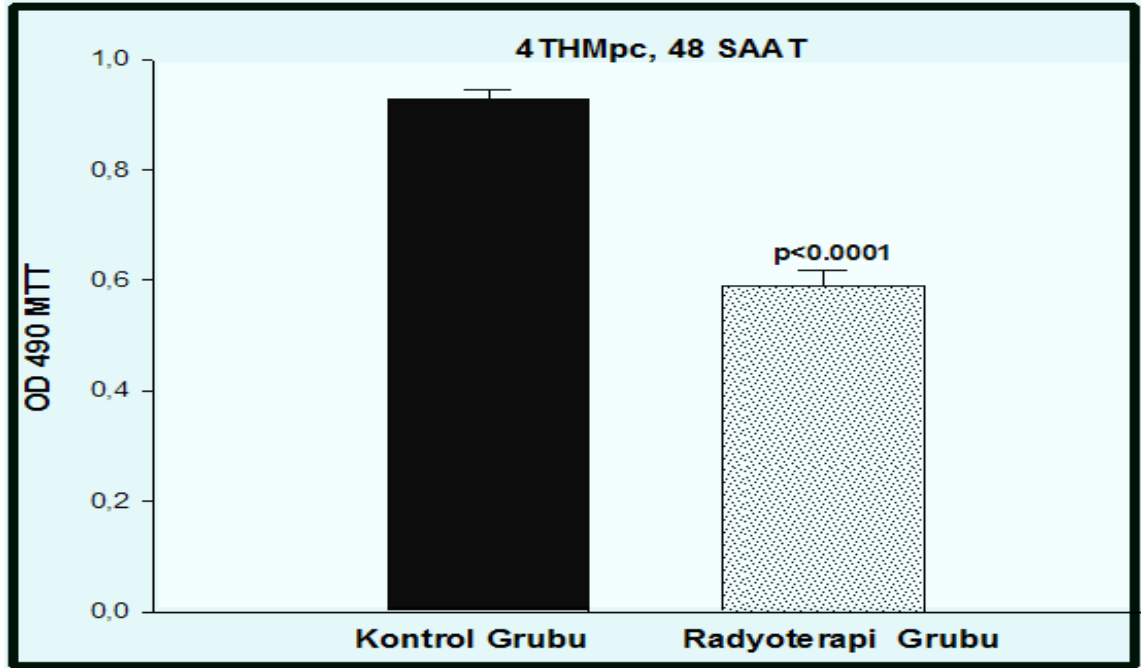
Şekil 4.32. 4T1 hücrelerinde (5000 hücre) tek başına radyoterapinin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda gözlenen etkisi



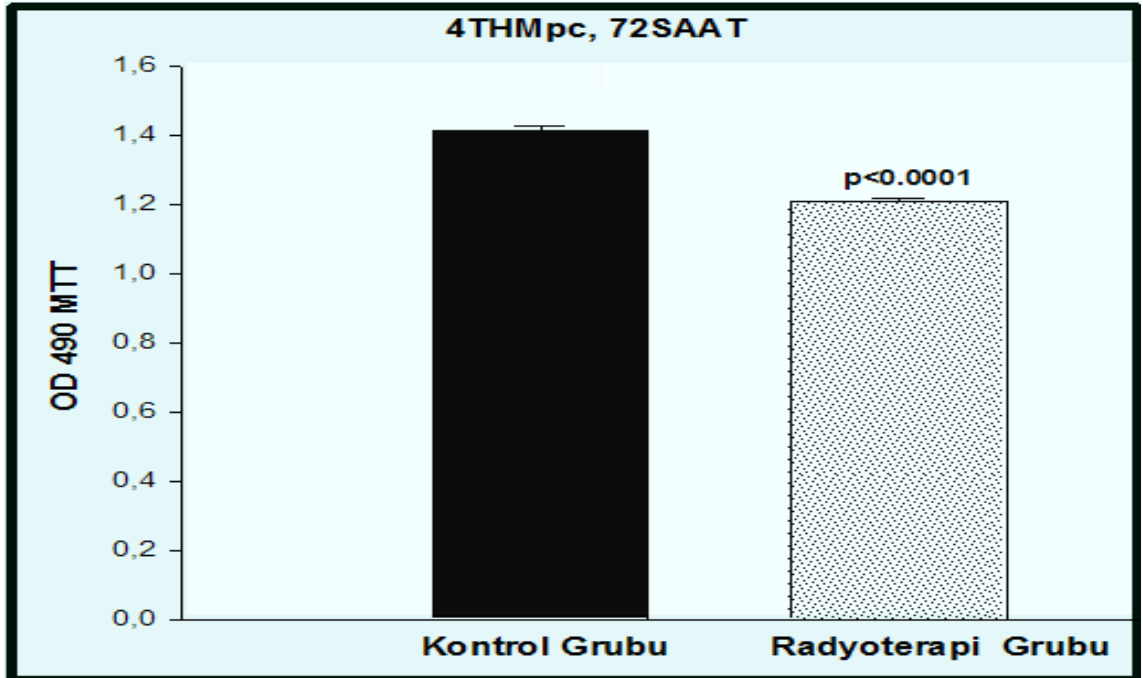
Şekil 4.33. 4T1 hücrelerinde (5000 hücre) tek başına radyoterapinin 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda gözlenen etkisi



Şekil 4.34. Talidomit, 4THMpc hücrelerinde (5000 hücre) tek başına radyoterapinin 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda gözlenen etkisi

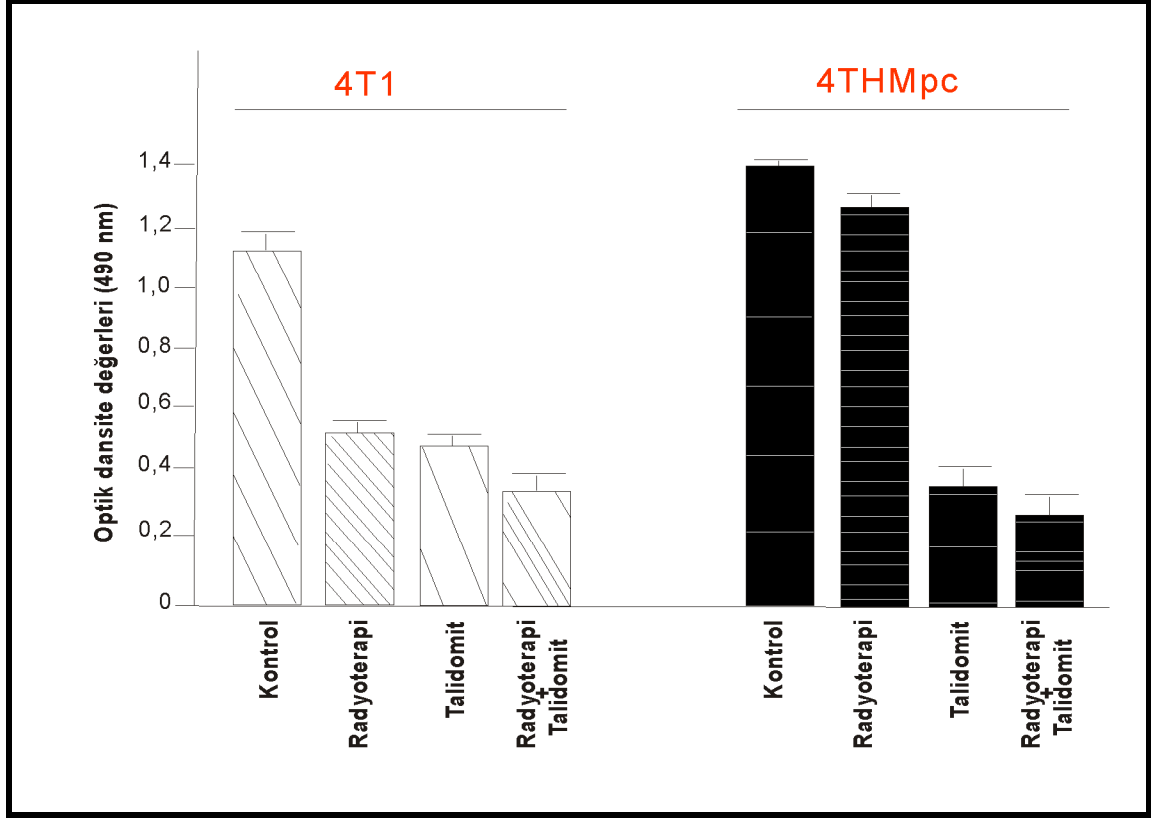


Şekil 4.35. Talidomit, 4THMpc hücrelerinde (5000 hücre) tek başına radyoterapinin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda gözlenen etkisi



Şekil 4.36. Talidomit, 4THMpc hücrelerinde (5000 hücre) tek başına radyoterapinin 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda gözlenen etkisi

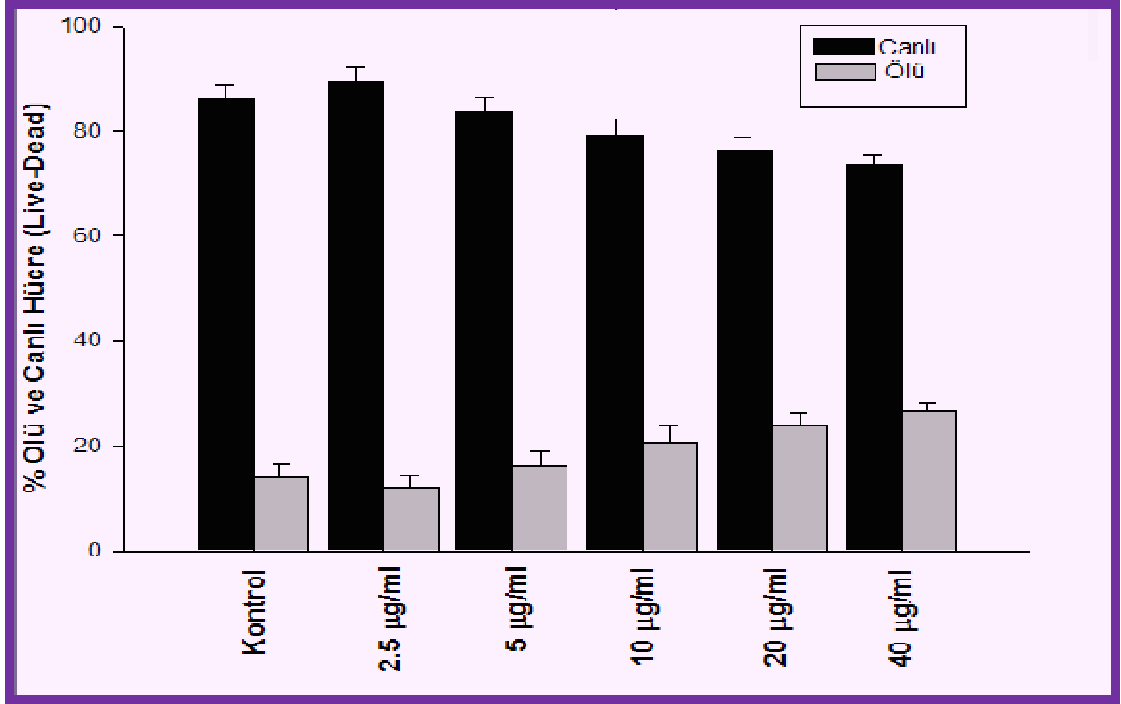
Kombine tedavinin 4T1 ve 4THMpc hücre hatları üzerine etkisi ve gruplar arasındaki farklılıklar aşağıdaki grafikte sunulmuştur (Şekil 4.37).



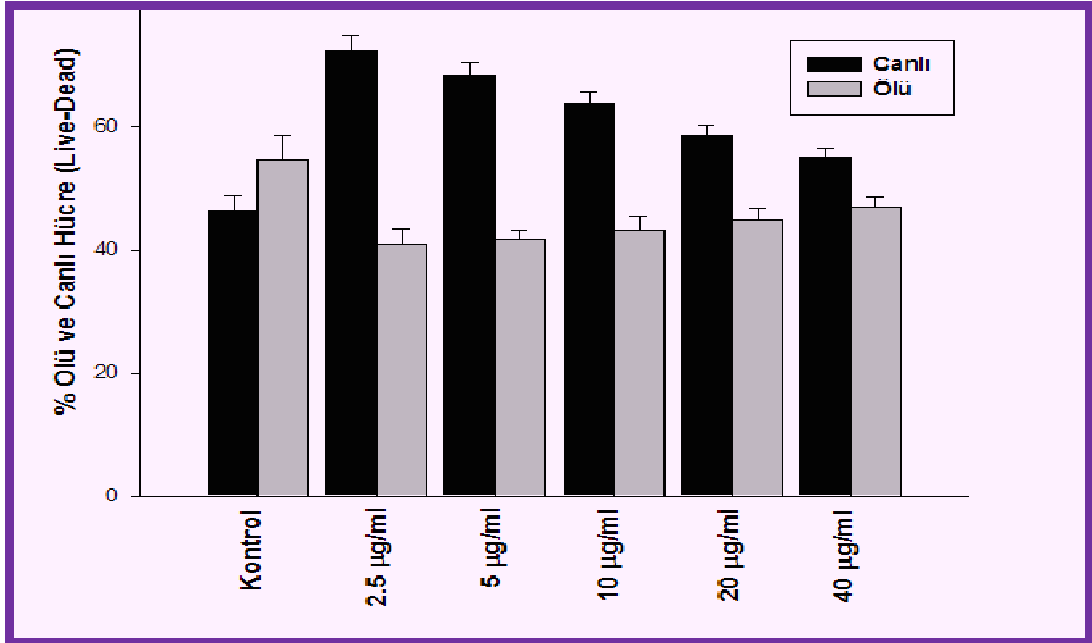
Şekil 4.37. Kombine tedavinin 4T1 ve 4THMpc hücre hatları üzerine etkisi ve gruplar arasındaki farklılıklar

#### 4.2.2. Live/Dead test sonuçları

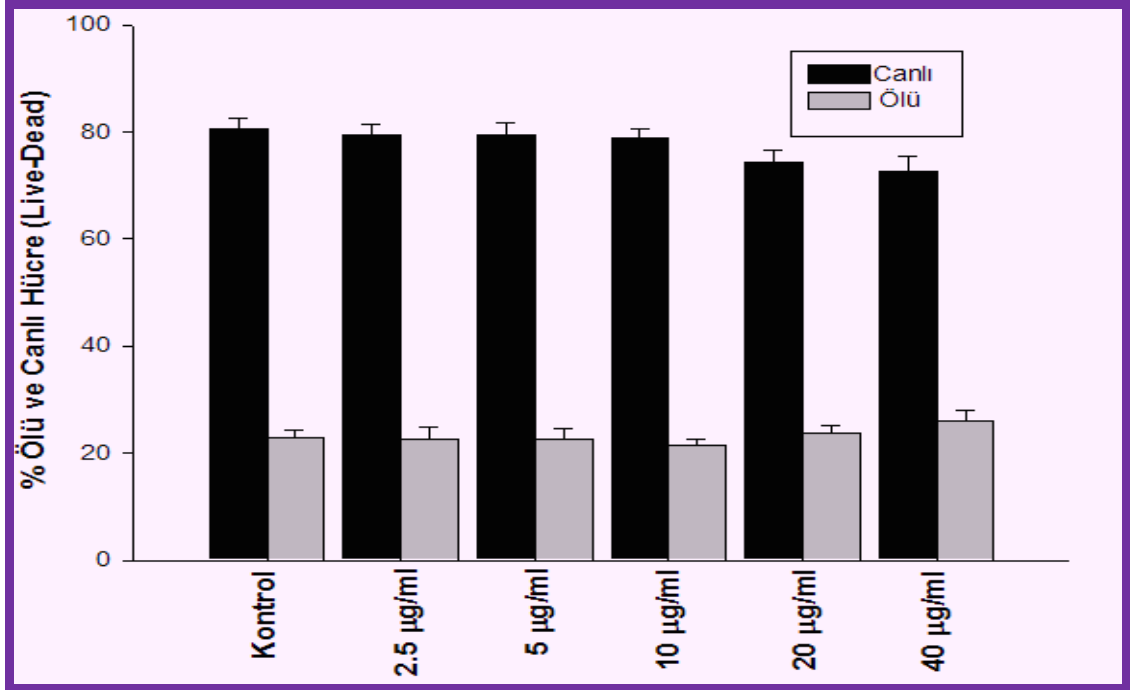
Daha önceki dozlarla yapılan deneylerde sitotoksik etki görülmediği için Live-Dead testi yapılmadı. Yeni belirlenen dozlarla yapılan MTT hücre canlılık testi sonucunda sitotoksik etki saptandı. Bu bulguyu desteklemek amacı ile aynı dozların hücreler üzerindeki etkisi Live-Dead testi ile de değerlendirildi. Dört bağımsız deneyden elde edilen veriler aşağıdaki grafiklerde sunuldu (4T1: Şekil 4.38, Şekil 4.39, Şekil 4.40, Şekil 4.41, Şekil 4.42, Şekil 4.43; 4THMpc: Şekil 4.44, Şekil 4.45 Şekil 4.46, Şekil 4.47, Şekil 4.48, Şekil 4.49).



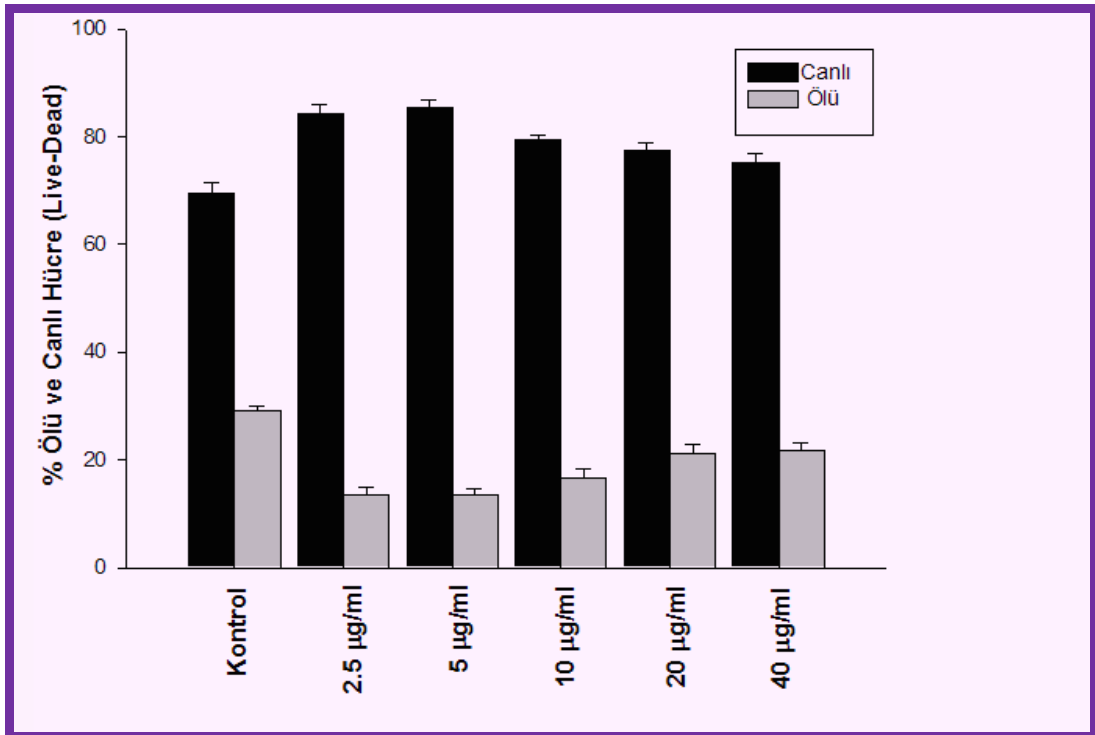
Şekil 4.38. 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu % canlı ve ölü hücre oranları



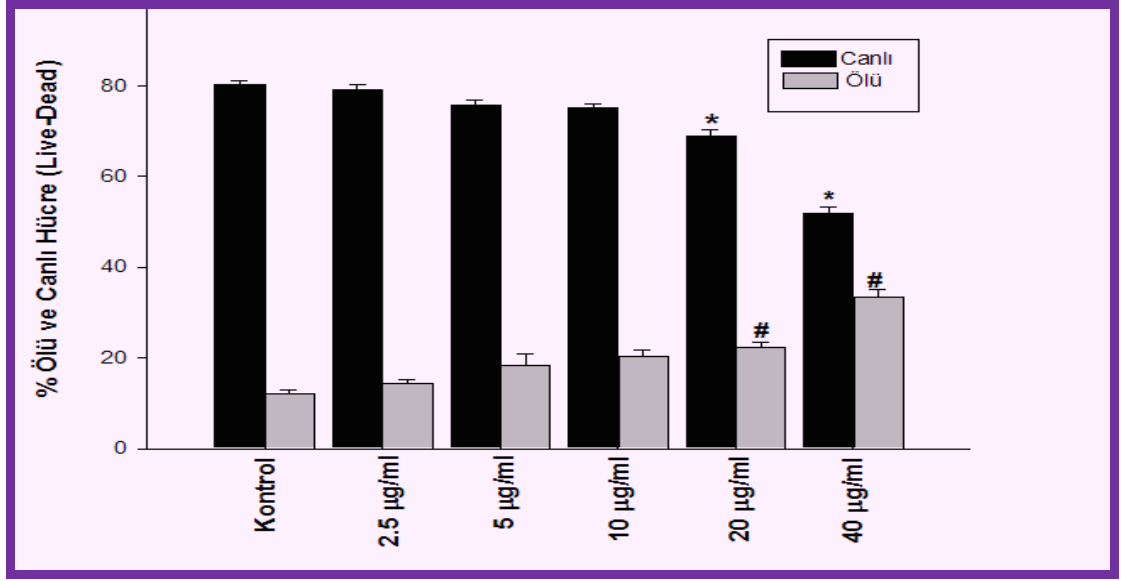
Şekil 4.39. 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu % canlı ve ölü hücre oranları



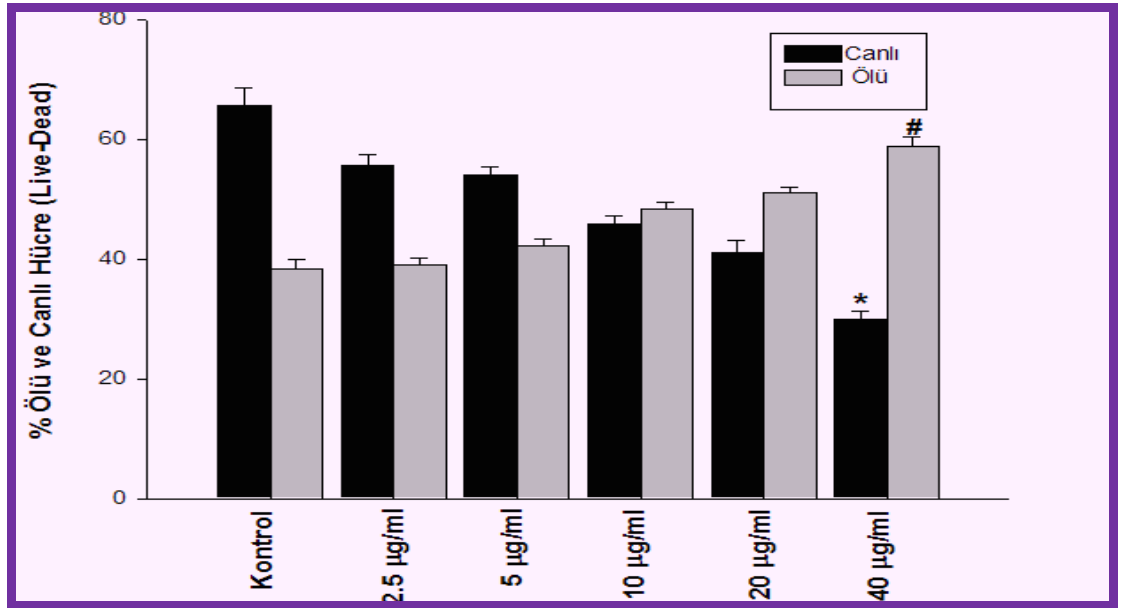
Şekil 4.40. 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu % canlı ve ölü hücre oranları



Şekil 4.41. 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu % canlı ve ölü hücre oranları



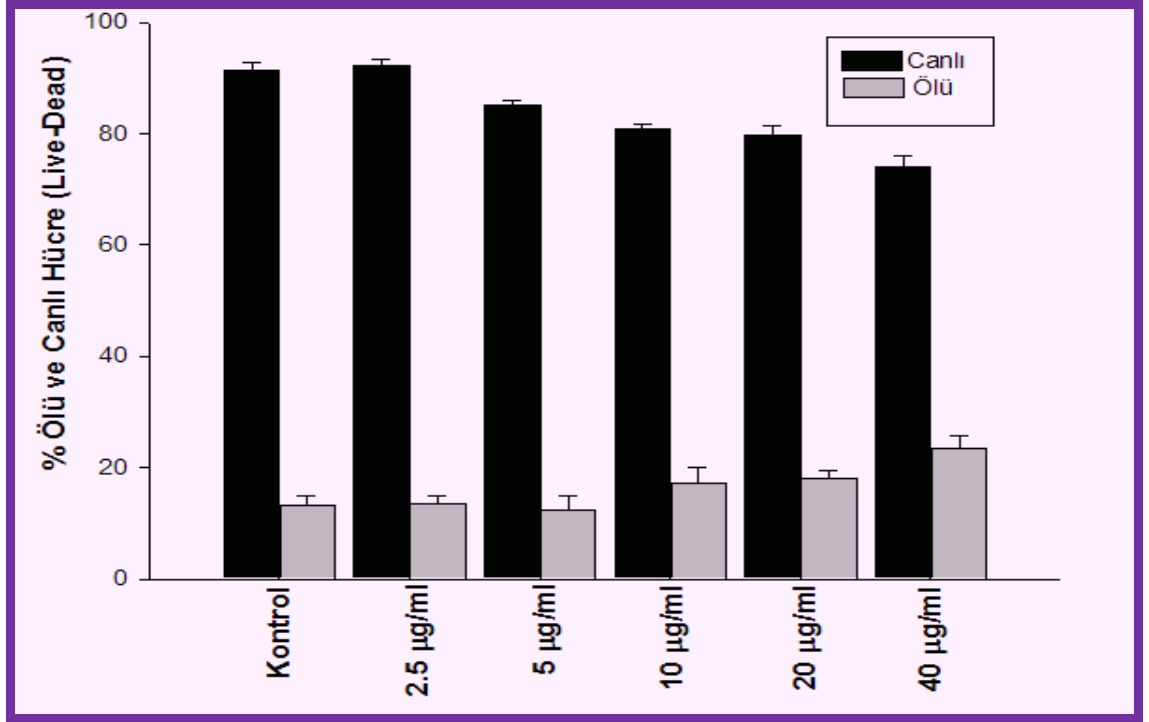
Şekil 4.42. 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu % canlı ve ölü hücre oranları



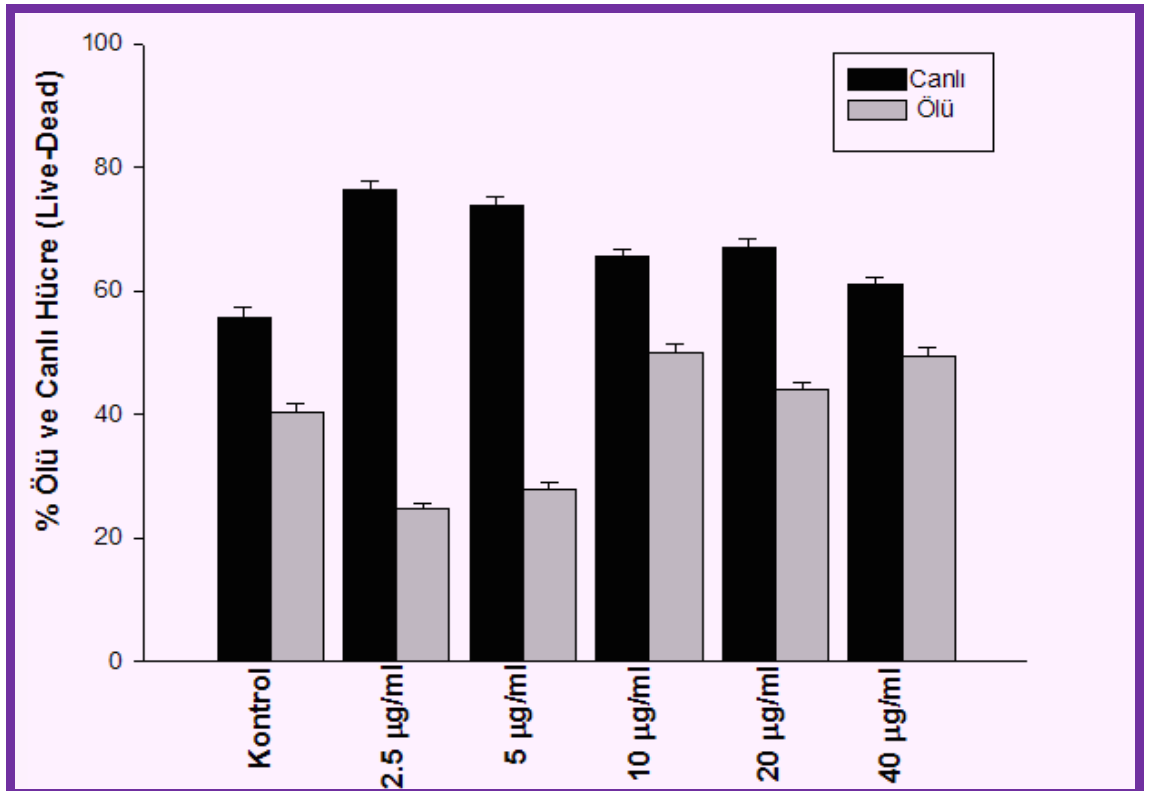
Şekil 4.43. 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu % canlı ve ölü hücre oranları

4T1 hücre hattında, grafiklerden de anlaşılacağı gibi Talidomit'in en yüksek dozu hariç diğer dozlarının hiçbirinde sitotoksik etki saptanamadı. Sadece 72 saatlik inkübasyon sonucunda hem kontrol hem de radyoterapi grubunda istatistiksel anlamda 40 µg/ml lik doz sitotoksik etki gösterdi (canlı hücre için, \*:  $p < 0,05$  ve ölü hücre için #:  $p < 0,05$ ). Bu bulgu MTT test sonuçlarını desteklemektedir.

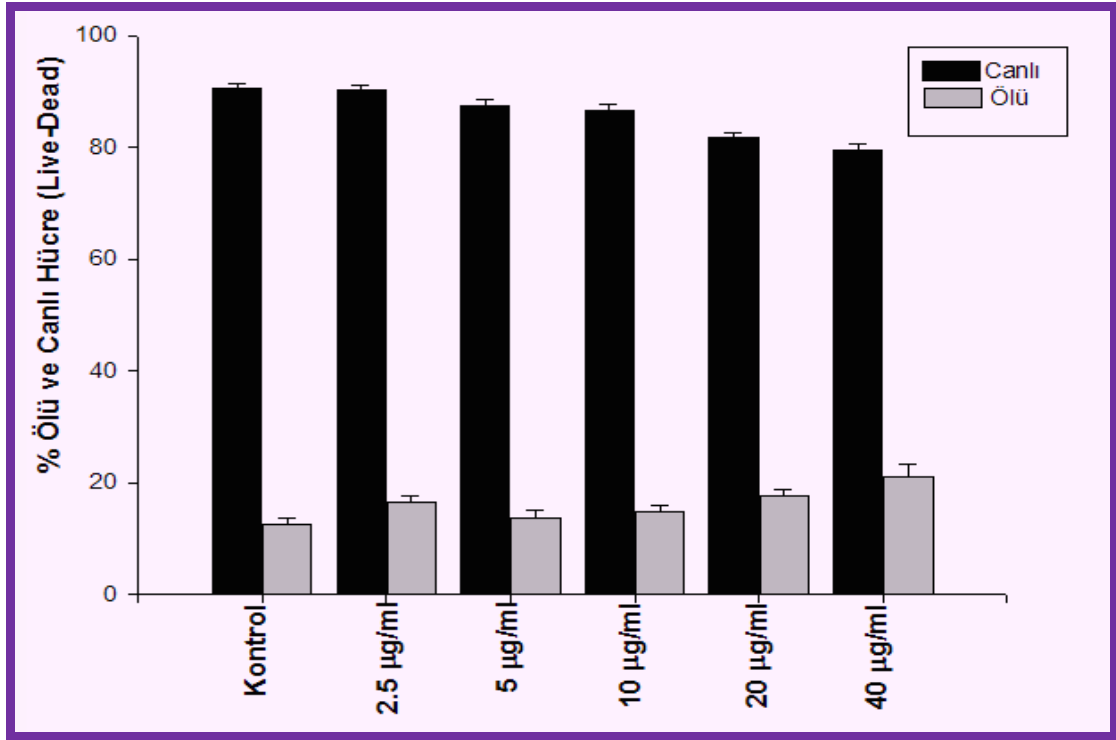




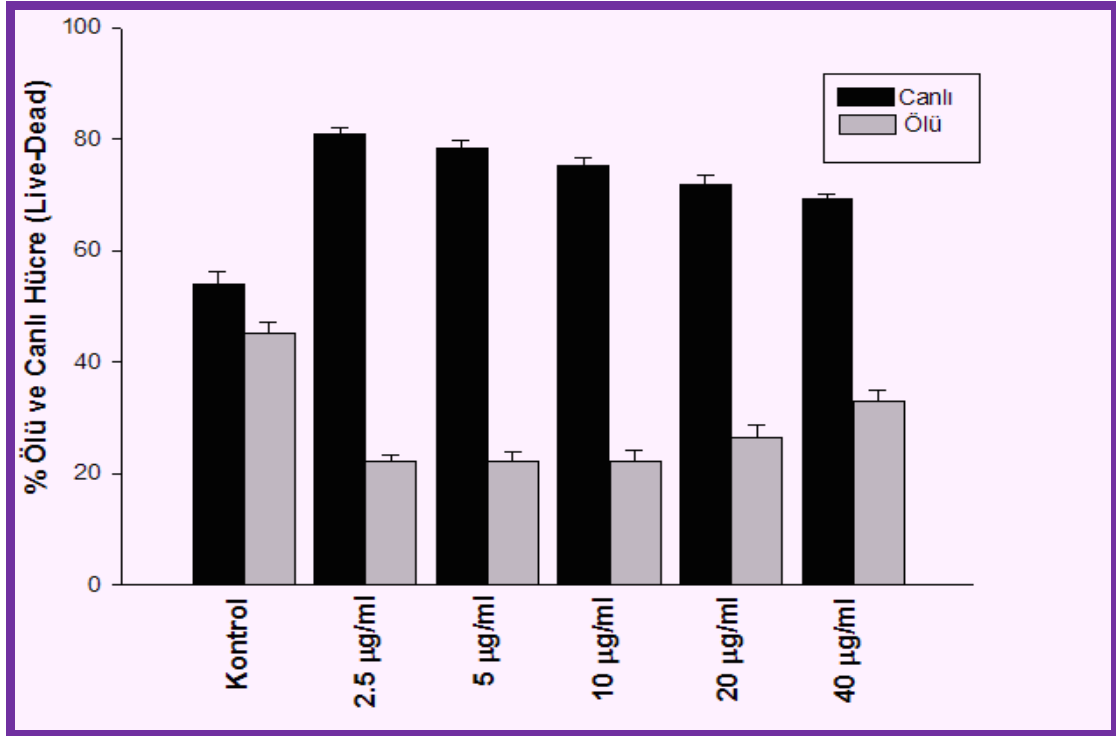
Şekil 4.44. 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu % canlı ve ölü hücre oranları



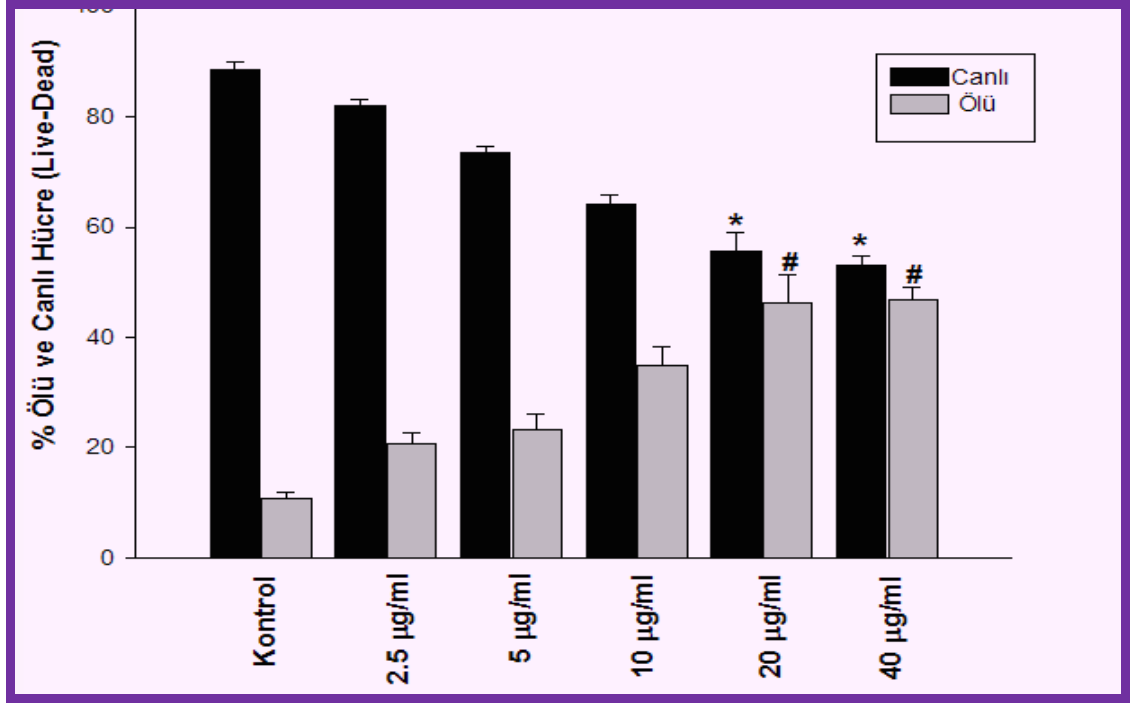
Şekil 4.45. 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu % canlı ve ölü hücre oranları



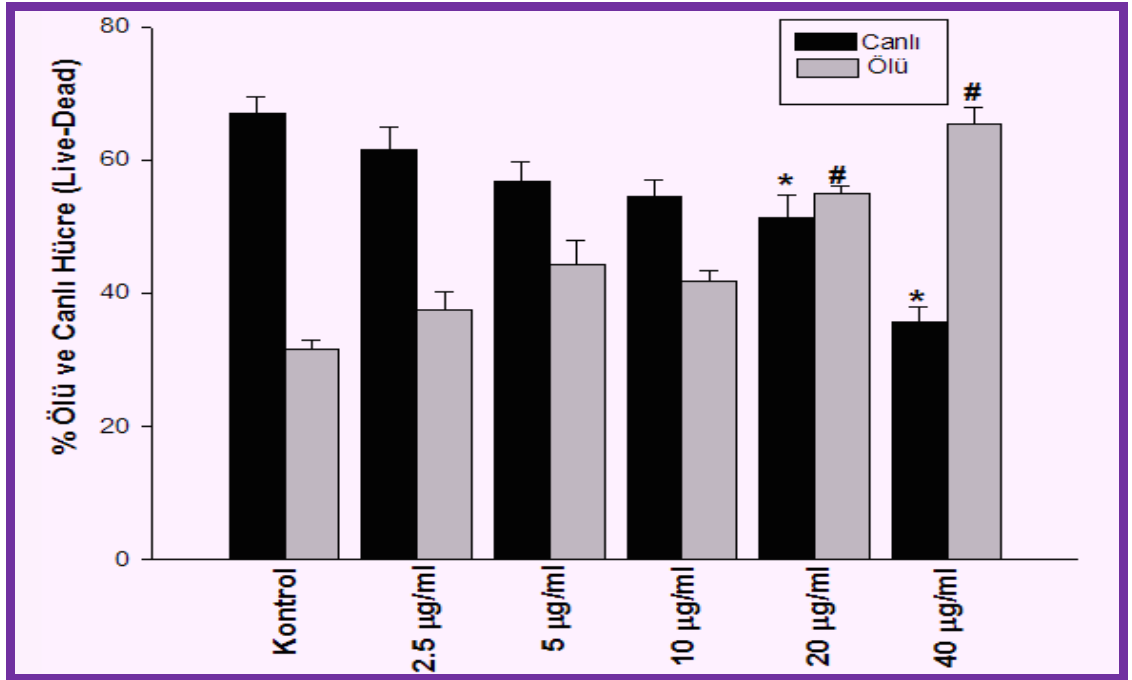
Şekil 4.46. 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu % canlı ve ölü hücre oranları



Şekil 4.47. 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu % canlı ve ölü hücre oranları



Şekil 4.48. 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Talidomit grubu % canlı ve ölü hücre oranları.



Şekil 4.49. 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu % canlı ve ölü hücre oranları

4THM hücre hattında, 4T1 hücrelerinde görülen etkiye benzer olarak 24 ve 48 saatlik inkübasyonda, Talidomit dozlarının hiçbirinde sitotoksik etki saptanamadı. Ancak, 4T1

hücrelerinden farklı olarak, 72 saatlik inkübasyon sonucunda hem kontrol hem de radyoterapi grubunda istatistiksel anlamda 20 ve 40 µg/ml lik dozlar sitotoksik etki gösterdi. MTT test sonuçlarından farklı olarak bu hücre hattında 20 µg/ml'lik doz da etkili bulundu (canlı hücre için, \*: p< 0,05 ve ölü hücre için #: p< 0,05).

#### 4.2.3. Tripın mavisı test sonuçları

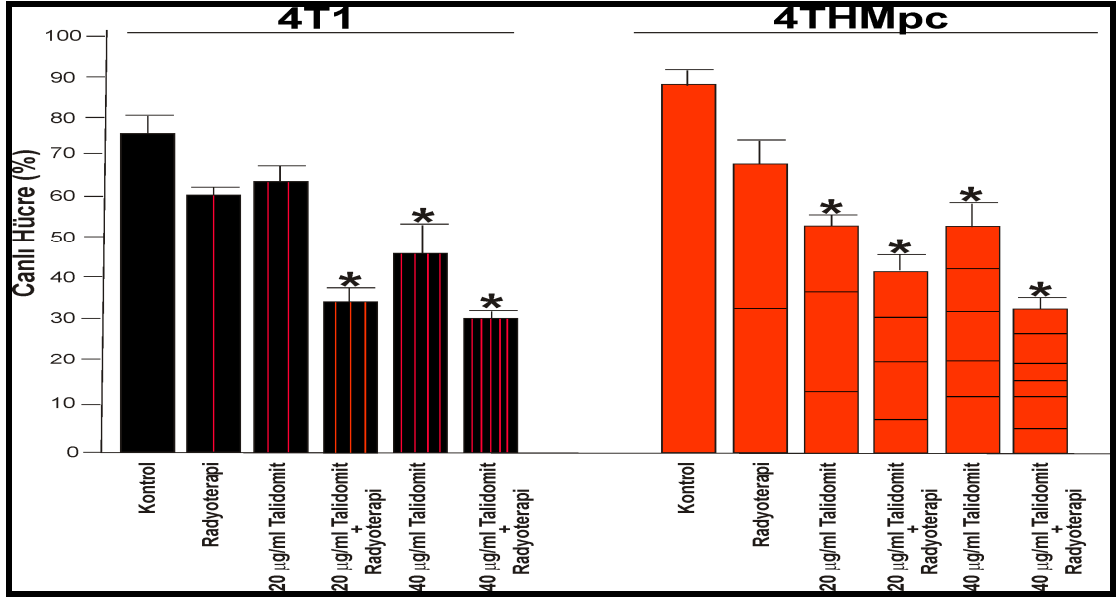
Dört bağımsız deneyden elde edilen veriler aşağıda Çizelge 4.2' de tablo halinde sunuldu. Gruplar arasındaki farklılıklar ise Şekil 4.50'de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. 4T1 ve 4THM hücre hatlarının Farklı Talidomit Dozları ve İnkübasyon Sürelerindeki Canlılık Oranları

	Doz (µg/ml)	4T1			4THM		
		24 saat	48 saat	72 saat	24 saat	48 saat	72 saat
Talidomit Grubu	Kontrol	82.5±3.41	78.± 2.431	75.5±2.503	94.5±1.751	90±2.146	89±2.375
	2.5	83.75±4.19	76.25± 1.302	72±2.754	90.75±2.338	87.25±3.572	83.25±1.54
	5	84±5.292	75.75± 2.025	70.25±1.406	85±3.011	89.5±1.493	75.5±1.286
	10	80.5±2.380	73.± 2.204	70.75±3.071	78.25±2.724	85.25±1.068	61±5.380
	20	80.25±3.49	68.5± 2,743	63.5±2.138	75±2.676	83±1.382	56.75±1.15*
	40	77.5±1.292	67± 1.0159	49.75±3.125*	71.25±3.807	80.75±2.454	53.25±2.85*
Radyoterapi Grubu	Kontrol	69.5±2.082	62±1.914	61±1.762	63±3.412	57.5±2.295	68.25±2.42
	2.5	70.75±2.75	79,25±2.206	49.25±5.234	81.25±1.208	78±5.213	62.75±3.62
	5	71.5.5±2.64	81.25±2.362	45.5±2.607	75.5±2.323	74.75±1.749	53±1.582
	10	67.75±1.70	74.5±3.512	39.75±3,610*	70.25±5.579	72±3.642	47.75±1.75*
	20	62.25±2.75	70±2.733	35±2.355*	68.75±1.274	70.25±1.583	44.25±2.36*
	40	56.75±5.56	67.75±2.311	31.75.±1.028*	65.25±2.355	67±1.382	33.75±1.29*

4 farklı deneyden elde edilen verilerin ortalamaları ve ortalamalarının standart hataları (ort±SD)(\*: p<0.05)

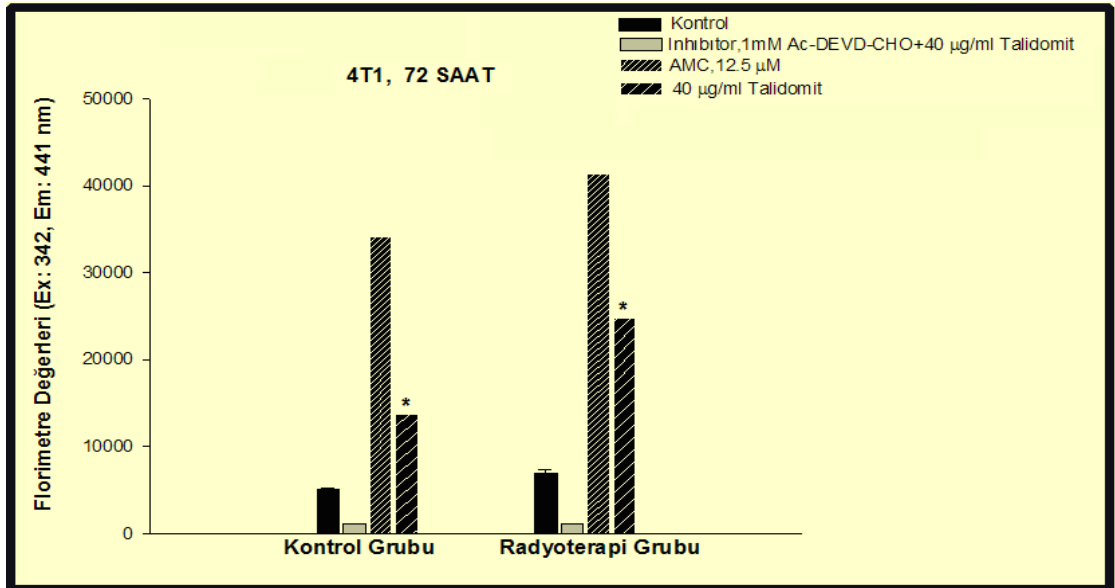
Her iki hücre hattı içinde tripın mavisı ile canlılık belirleme testi sonucunda diğer sitotoksik testleri ile elde edilen bulgulara çok benzer bulgular saptandı. 24 ve 48 saatlik inkübasyonlarda etkili bir doz saptanamadı. 72 saatlik inkübasyon süresinde ise 40 µg/ml'lik doz sitotoksik olarak belirlendi.



Şekil 4.50. Tripan mavisi test sonuçlarına göre hücre canlılık oranlarında gruplar arası farklılıklar

#### 4.2.4. Kaspaz-3 enzim aktivitesi test sonuçları

4T1 ve 4THM hücreleri için, sitotoksikite testleri sonucunda 24 ve 48 saatte etkili bir doz saptanamadı. 72 saatlik inkübasyon sonunda ise her iki hücre hattında 40 µg/ml'lik Talidomit dozu sitotoksik bulundu. Bu nedenle Kaspaz-3 Enzim aktivite testinin bu dozda ve bu inkübasyon süresi sonunda yapılmasına karar verildi. Elde edilen bulgular aşağıdaki grafiklerde sunulmuştur (Şekil 4.51, Şekil 4. 52).

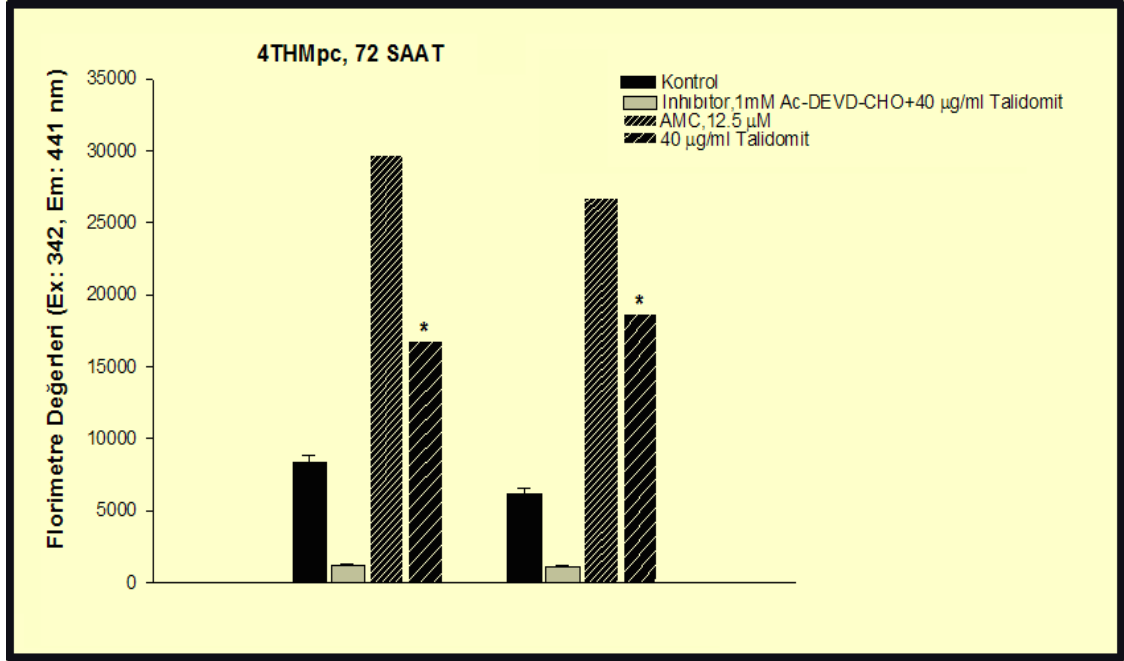


Şekil 4.51. Talidomit, 4T1 hücreleri ( $1 \times 10^6$ ) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan deneylerde, 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası Kaspaz-3 enzim aktivitesindeki artış

4T1 Hücree hattında, 40 µg/ml Talidomit uygulamasının 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, kaspaz 3 enzim aktivitesinde kontrol grubuna oranla bir artış saptanmadı. Bu bulgu diğer tüm sitotoksisite testlerinden elde edilen sonuçlarla oldukça uyumludur. 72 saatlik inkübasyon sonunda kontrol grubunda 40 µg/ml Talidomit uygulanan hücrelerde hiç ilaç uygulanmayan kontrol hücrelerine oranla, kaspaz 3 enzim aktivitesinin 2,647 kat artırdığı saptandı (\*: p< 0.01).

Radyoterapi grubunda ise, 72 saatlik inkübasyon sonunda 40 µg/ml Talidomit uygulanan hücrelerde hiç ilaç uygulanmayan kontrol hücrelerine oranla, kaspaz 3 enzim aktivitesinin 3,475 kat artırdığı saptandı (\*: p< 0.01).

4THMpc hücre hattında, 40 µg/ml Talidomit uygulamasının 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, kaspaz 3 enzim aktivitesinde kontrol grubuna oranla bir artış saptanmadı. Bu bulgu diğer tüm sitotoksisite testlerinden elde edilen sonuçlarla oldukça uyumludur. 72 saatlik inkübasyon sonunda kontrol grubunda 40 µg/ml Talidomit uygulanan hücrelerde hiç ilaç uygulanmayan kontrol hücrelerine oranla, kaspaz 3 enzim aktivitesinin 2,01 kat artırdığı saptandı (\*: p< 0.01). Radyoterapi grubunda ise, 72 saatlik inkübasyon sonunda 40 µg/ml Talidomit uygulanan hücrelerde hiç ilaç uygulanmayan kontrol hücrelerine oranla, kaspaz 3 enzim aktivitesinin 3,02 kat artırdığı saptandı (\*: p< 0.01).

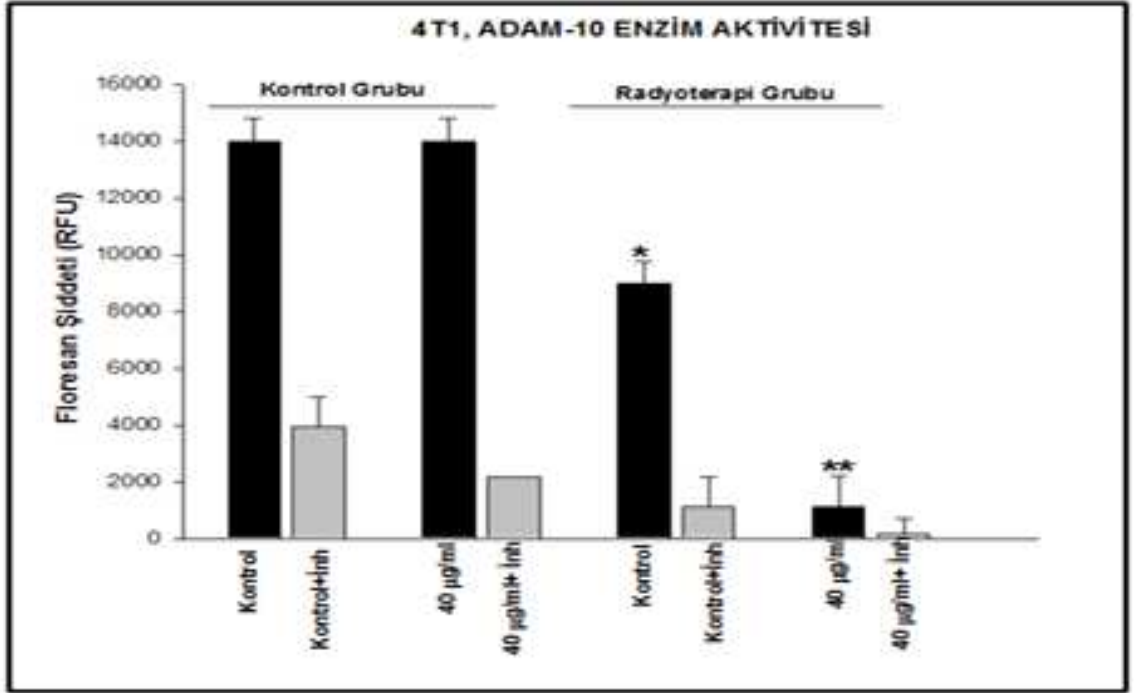


Şekil 4.52. 4THMpc hücreleri ( $1 \times 10^6$ ) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan deneylerde, 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası Kaspaz-3 enzim aktivitesindeki artış

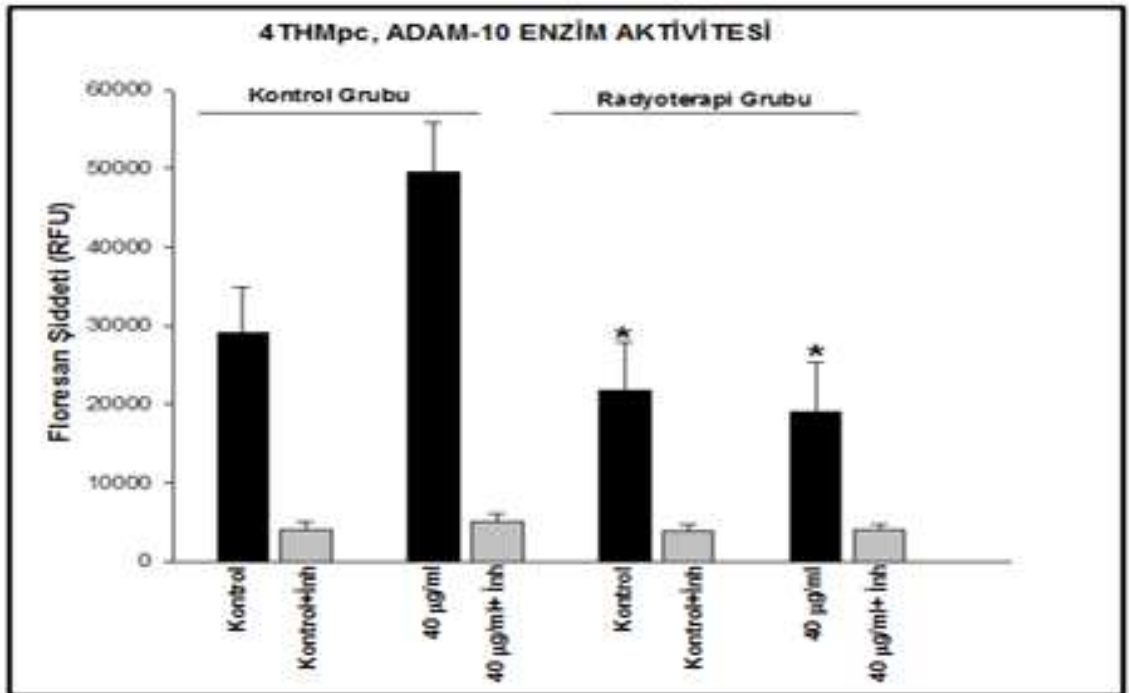
### 4.3. Talidomit'in ADAM-10 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Talidomit tek başına, 4T1 hücrelerinde bazal seviyede bulunan ADAM-10 enzim miktarını kontrol grubunda değiştirmedir. Buna karşılık, 45 Gy radyoterapi uygulaması sonucu, tek başına radyoterapi ADAM-10 enzim aktivitesini istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde azaltırken, bu etki Talidomit-Radyoterapi kombine tedavi uygulanmasıyla net bir biçimde ve istatistiksel anlamda oldukça önemli derecede ( $p < 0,001$ ) azaldı. Ölçülen floresan şiddetlerinin inhibitör ilavesi ile belirgin derecede azalması da ölçülen değerlerin ADAM-10 enzim aktivitesine ait olduğunu doğruladı.

Bununla birlikte, 4T1 hücrelerinin kalp metastazı olan agresif 4THMpc hücrelerinde, 4T1 hücrelerine oranla bazal seviyede daha yüksek olan ADAM-10 enzim aktivitesini tek başına Talidomit uygulaması artırırken, 45 Gy radyoterapi uygulaması tek başına ve Talidomit-radyoterapi kombine uygulamasıyla birlikte ADAM-10 enzim aktivitesini bazal seviyenin altına indirdi. Sonuçlar aşağıdaki grafiklerde sunuldu (Şekil 4.50, Şekil 4.51).



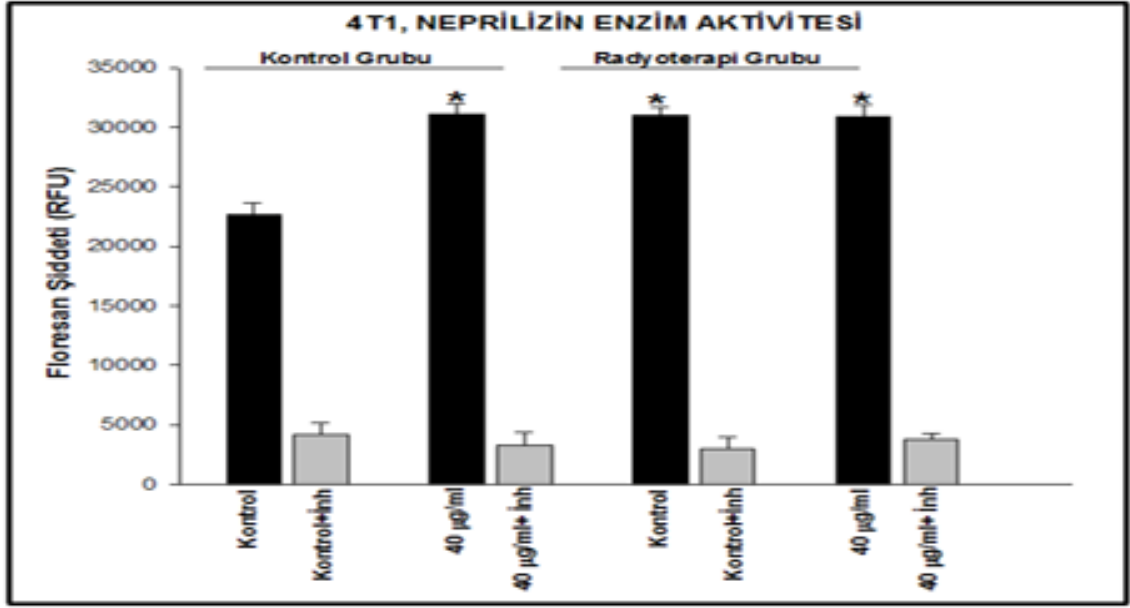
Şekil 4.53. Talidomit'in 4T1 hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda ADAM-10 enzim aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 4.54. Talidomit'in 4THMpc hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda ADAM-10 enzim aktivitesi üzerine etkisi

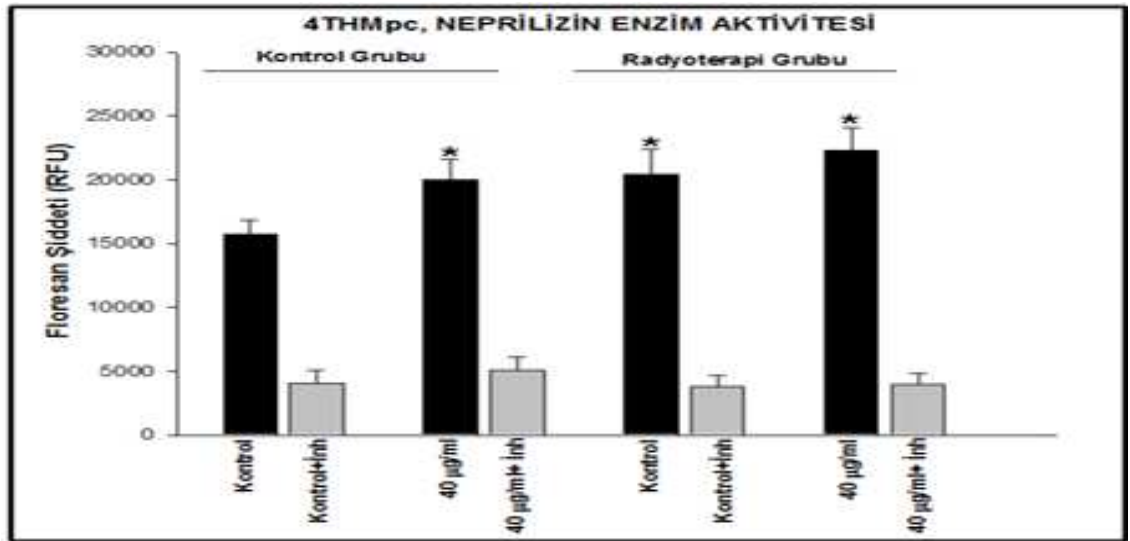


#### 4.4. Talidomit'in Neprilizin enzim aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 4.55. Talidomit'in 4T1 hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda Neprilizin enzim aktivitesi üzerine etkisi

Yukarıdaki grafikten de görüldüğü gibi, Talidomit tek başına ve radyoterapi ile kombine olarak uygulandığında 4T1 hücrelerindeki Neprilizin enzim aktivitesini artırdı. Aynı şekilde tek başına 45 Gy radyoterapi uygulamasının da Neprilizin enzim aktivitesini artırdığı belirlendi (Şekil 4.52, Şekil 4.53)

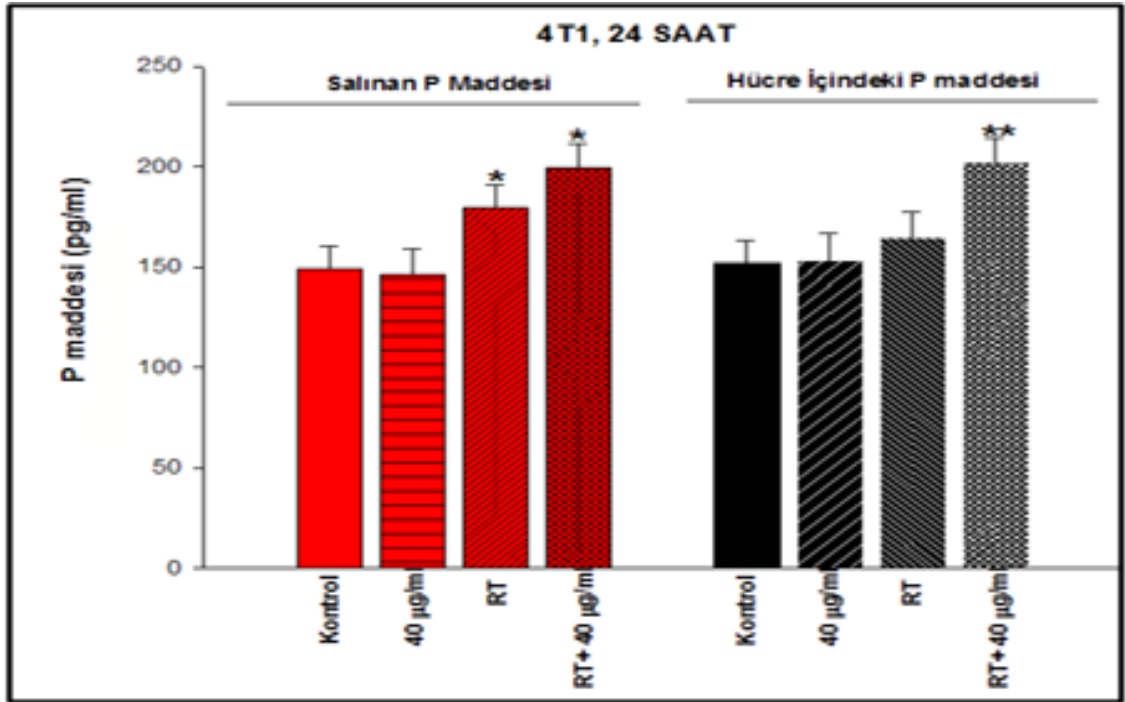


Şekil 4.56. Talidomit'in 4THMpc hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda Neprilizin enzim aktivitesi üzerine etkisi

## 4.5. Talidomit'in P maddesi miktarları üzerine etkileri

### 4.5.1. 4T1 hücre hattında Talidomit'in P maddesi miktarları üzerine etkileri

4T1 hücre hattında Talidomit'in tek başına ve radyoterapi ile kombine olarak hücre içinde bulunan ve besi yerine salınan P maddesi miktarları üzerine etkileri aşağıdaki grafikte gösterildi (Şekil 4.57).

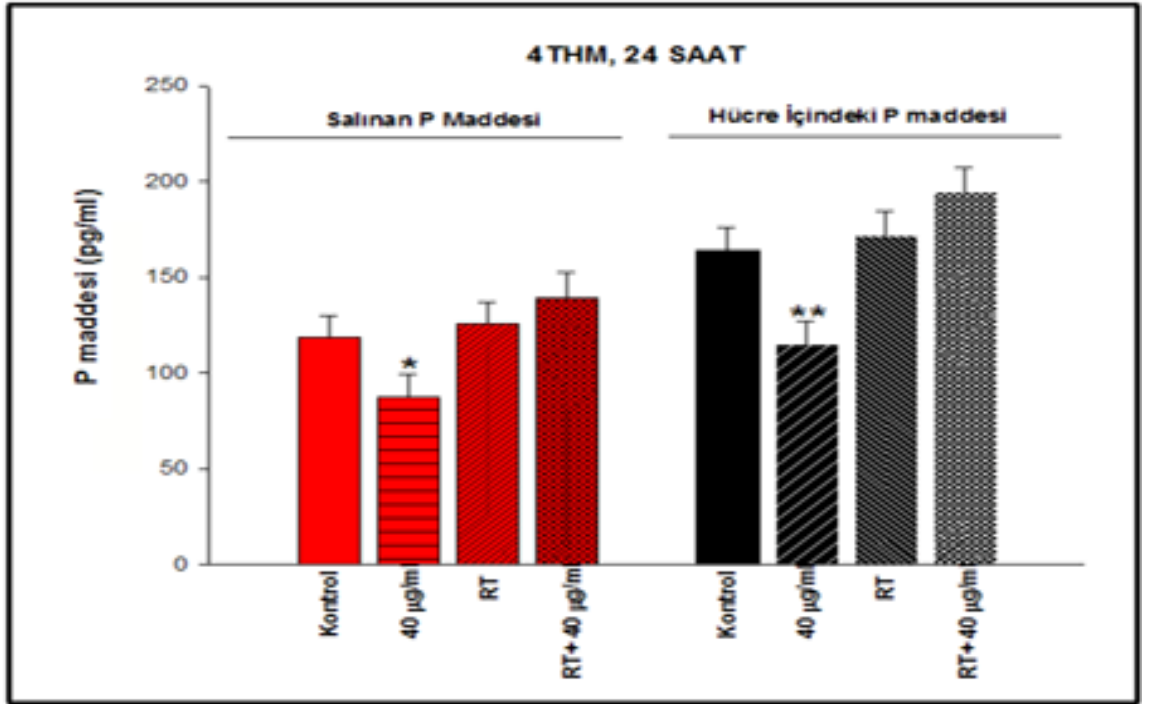


Şekil 4.57. Talidomit'in 4T1 hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre içindeki ve besi yerine salınan P maddesi miktarları üzerine etkisi

Yukarıdaki grafikten de anlaşılacağı gibi, Talidomit 4T1 hücre hattında besi yerine salınan P maddesi üzerine tek başına etki göstermedi. 45 Gy radyoterapi uygulaması ise P maddesi miktarını kontrole oranla anlamlı bir şekilde artırdı ( $p < 0,05$ ). Talidomit ve radyoterapi kombine tedavi ise tek başına radyoterapiden daha etkili bir şekilde besi yerine salınan P maddesi miktarını artırdı. Hücre içindeki P maddesi ise besi yerine salınan P maddesine benzer şekilde Talidomit ve radyoterapi ile kombine tedavi de arttı.

#### 4.5.2. 4THMpc hücre hattında Talidomit'in P maddesi miktarları üzerine etkileri

4THMpc hücre hattında Talidomit'in tek başına ve radyoterapi ile kombine olarak hücre içinde bulunan ve besi yerine salınan P maddesi miktarları üzerine etkileri aşağıdaki grafikte gösterildi (Şekil 4.58).

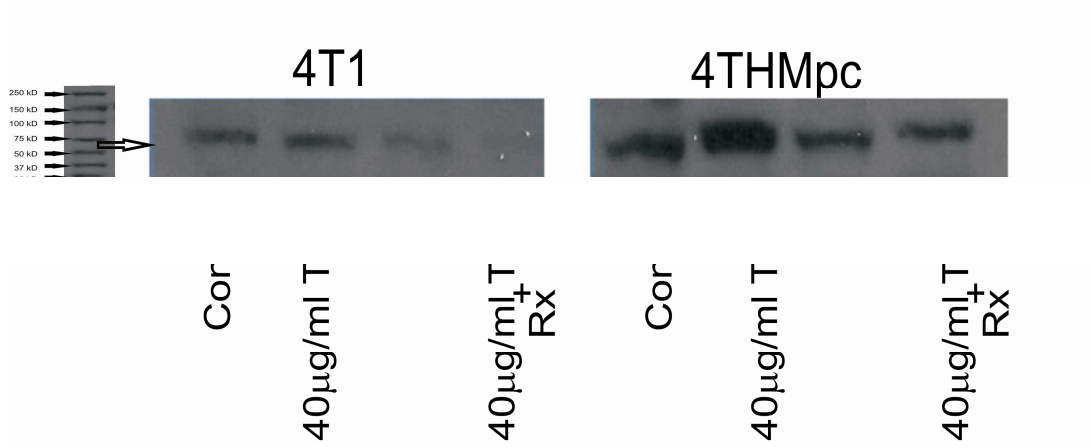


Şekil 4.58. Talidomit'in 4THMpc hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre içindeki ve besi yerine salınan P maddesi miktarları üzerine etkisi

Grafikten de anlaşılabilceği gibi, 40 µg/ml Talidomit 4T1 hücre hattında besi yerine salınan P maddesi miktarını anlamlı derecede azalttı ( $p < 0,05$ ). 45 Gy radyoterapi uygulaması ise tek başına ve Talidomit ile kombine olarak besi yerine salınan P maddesi miktarını üzerine anlamlı bir etki göstermedi. Hücre içindeki P maddesi miktarı benzer şekilde sadece tek başına Talidomit uygulaması ile anlamlı bir şekilde azalırken radyoterapinin tek başına ya da Talidomit ile kombine olarak hücre içi P maddesi miktarı üzerine anlamlı bir etkisi olmadı.

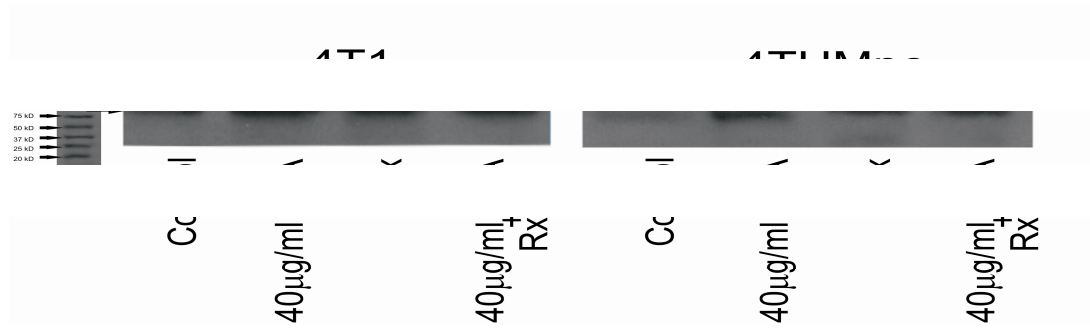
## 4.6. Talidomit'in Western-Blot Sonuçları

### 4.6.1. Talidomit'in ADAM 10 enzimi Western blot sonuçları



**Şekil 4.59.** Talidomit'in tek başına ve radyoterapi ile kombine olarak ADAM-10 enzim aktivitesi üzerine etkilerinin western-blot ile gösterilmesi

### 4.6.2. Talidomit'in Neprilizin enzimi Western blot sonuçları



**Şekil 4.60.** Talidomit'in tek başına ve radyoterapi ile kombine olarak Neprilizin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin western-blot ile gösterilmesi

## 5. TARTIŞMA

### 5.1 Radyoterapinin 4T1 ve 4THMpc Hücre Hatları Üzerine Etkisi

Radyoterapi klasik kanser tedavilerinde sıklıkla tercih elden yöntemlerden birisidir. Günümüzde kanser tanısı konan hastaların %70'i radyoterapiyi tek başına ya da farklı tedaviler ile kombine halde kullanmışlardır. Buna rağmen radyoterapiden hiçbir pozitif sonuç alınmadığı, hatta bazı durumlarda radyoterapinin istenmeyen sonuçlar yarattığı da bilinmektedir. Bunun nedeni, radyoterapi uygulamasının lokal olarak yapılması ya da radyoterapinin tümör hücrelerinin dolaşımına etki etmemesi olabilir (Zheng vd 2005).

Radyoterapi tümörün yok edilmesi amacı ile kullanılıyor ise, küçük fraksiyonlarda ve sık aralıklarla uygulanmalıdır (Connell vd 2004). Bu bağlamda, çalışmamızda 4T1 ve 4THMpc hücre hatları üzerine düşük fraksiyonlu (5, 10 ve 20 Gy) ışınlamalar uygulanmıştır. 4T1 fare meme kanser hücreleri oldukça metastazik özelliğe sahiptir ve bu nedenle düşük fraksiyonlu radyoterapi uygulamasına bu hücreler direnç göstermiş olabilir. 4T1 hücrelerinin kalp metastazı olan 4THMpc hücreleri ise 4T1 hücrelerine oranla çok daha agresif hücrelerdir. Bu nedenle 4T1 hücrelerinin direnç gösterdiği bu düşük fraksiyonlara 4THMpc hücreleri de doğal olarak direnç göstermiştir. Tümör hücresinin tipine bağlı olarak, pek çok faktör hücrelerin radyoterapiye karşı hassaslığını engellemektedir.

Yapılan uygulamalar sonunda, düşük fraksiyonlu <sup>60</sup>Cobalt ışınlamasının hücre hatları üzerinde öldürücü etki yaratmadığı saptanmıştır. Bu nedenle radyoterapi uygulamalarında tümör hücreleri üzerinde etkili olduğu belirlenen 45 Gy fraksiyon uygulanmıştır. 5000 canlı hücre üzerine tek başına 45 Gy radyoterapi uygulaması 24 saat, 48 saat ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda 4T1 hücre hattının canlı hücre sayısında sırasıyla % 50, % 46 ve % 46,7'lik bir azalmaya neden olmuştur. 4THMpc hücre hattında ise aynı uygulama, benzer olarak canlı hücre sayısında sırasıyla % 23,80 , % 32,3 ve % 31,57'lik bir azalmaya neden olmuştur. Bu sonuçlardan anlaşılacağı gibi, yukarıda bahsettiğimiz 4THMpc hücrelerinin 4T1 hücrelerine oranla radyoterapiye daha

dirençli olduğu görülmektedir. Radyoterapinin küratif tedavi tipinde, tümörün yok edilmesi amaçlanır ve bu nedenle 66-75 Gy ışınlama 6-8 hafta boyunca yapılır (Emami vd 1991). İlk bakışta, 45 Gy ışınlamanın yüksek olduğu düşünülse de yukarıda belirtilen standartlarla kıyaslandığında, normal hücrelerde hasar yaratmayacak bir doz olduğu görülebilir.

## **5.2 Talidomit'in Sitotoksik Etkileri**

Hamilelik döneminde kullanımına bağlı olarak meydana gelen teratojenik etkinin fark edilmesiyle birlikte, Talidomitin, fetusun gelişimi sırasında kan damarlarının oluşumunu bozduğu ortaya çıkarılmıştır. Kan damarları üzerine bu etkisinden dolayı Talidomit anti-anjiogenik özelliğe sahip ilaçlar sınıfına dahil edilmiştir ve Talidomitin potansiyel anti-anjiogenik özelliği ile anti tümör aktivitesi hayvan modellerinde gösterilmiştir (Kaicker vd 2003).

Günümüzde, Talidomit multiple myeloma, prostat ve böbrek kanserlerinin tedavisinde başarıyla kullanılmakta ve diğer malignant hastalıkların tedavisinde kullanılmak amacı ile denenmektedir (Downs Jr 2005).

Talidomit ileri düzeyde metastazik meme kanserinin tedavisinde tek başına etkili değildir. Kemoterapide kullanılan sitotoksik özellikteki bir ilaçla ya da başka tedaviler ile mutlaka kombine edilmelidir (Papaiakovou vd 2004). Bu nedenle proje kapsamında Talidomit'in fare meme kanseri hücre hattı 4T1 ve onun kalp metastazı olan 4THMpc hücre hatları üzerine radyoterapi ile etkileşimi araştırılmıştır.

Talidomit'in yüksek dozlarda kullanıldığında farklı toksik yanıtların oluşumuna neden olduğu bilinen bir gerçektir. Bu nedenle Talidomit'in tek başına ve radyoterapi ile kombine olarak hücreler üzerindeki olası etkisi öncelikle düşük dozlar ( $10^{-3}$  - $10 \mu\text{M}$ ) kullanılarak araştırılmıştır. 4T1 hücre hattında, 5000 hücre sayısında hem kontrol hem de radyoterapi grubunda hiçbir doz istatistiksel anlamda önemli kabul edilebilecek sitotoksik bir etki göstermemiştir. 10 000 hücrede, hem kontrol hemde radyoterapi grubunda en yüksek dört doz istatistiksel açıdan önemli derecede sitotoksik etki

göstermiştir. 4THMpc hücre hattında ise 3000 hücre sayısında kontrol grubunda düşük dozlarda etki görülürken radyoterapi grubunda istatistiksel anlamda hiçbir anlamlı sitotoksik etki görülmemiştir. Bu sonuçlar bağımsız deneylerle tekrar edilemediği için, dozlar 2,5-40 µg/ml aralığına yükseltilmiştir.

4T1 hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonucunda Talidomit tek başına hiçbir sitotoksik etki göstermezken radyoterapi ile kombinasyonu canlı hücre sayısında istatistiksel anlamda önemli bir artışa neden olmuştur. İnkübasyon süresinin artışına bağlı olarak, 48 saat sonra, benzer şekilde Talidomit hiçbir etki göstermezken, radyoterapi uygulaması canlı hücre sayısını önemli ölçüde artırmıştır. 72 saatlik inkübasyon sonrasında ise, beklenenin aksine kontrol grubunda 40 µg Talidomit tek başına canlı hücre sayısını % 10,31 azaltmışken, radyoterapi tek başına canlı hücre sayısını kontrole oranla % 15,91 azaltmıştır. 40 µg Talidomit radyoterapi ile kombine edildiğinde canlı hücre sayısında % 33,5 oranında bir azalmaya neden olmuştur. Bu sonuçlara göre, Talidomit ve radyoterapi sinerjistik bir etkileşime girmiştir.

4THMpc hücrelerinde, 4T1 hücrelerine benzer şekilde 24 saatlik inkübasyon sonucunda Talidomit tek başına hiçbir sitotoksik etki göstermezken radyoterapi ile kombinasyonu canlı hücre sayısında istatistiksel anlamda önemli bir artışa neden olmuştur. İnkübasyon süresinin artışına bağlı olarak, 48 saat sonra, Talidomit kontrol grubunda hiçbir etki göstermezken, radyoterapi uygulaması canlı hücre sayısını önemli ölçüde artırmıştır. 72 saatlik inkübasyon sonrasında ise, beklenenin aksine kontrol grubunda 40 µg Talidomit tek başına canlı hücre sayısını % 29 azaltmışken, radyoterapi tek başına canlı hücre sayısını kontrole oranla % 17 azaltmıştır. 40 µg Talidomit radyoterapi ile kombine edildiğinde canlı hücre sayısında % 42.4 oranında bir azalmaya neden olmuştur. Bu sonuçlara göre, Talidomit ve radyoterapi sinerjistik bir etkileşime girmiştir.

İnkübasyon süresinin artışına bağlı olarak gözlenen etkinin değişmesi, Talidomit radyoterapi kombinasyonunda inkübasyon süresinin önemini vurgulamaktadır. İlk 48 saatte 40 µg Talidomit tek başına canlı hücre sayısının artmasına neden olurken

radoterpi ile kombine halde 72 saatte istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilebilecek sitotoksik bir etki göstermiştir.

Live dead test sonuçlarına göre, 4T1 hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda kontrol grubunda canlılık oranı % 86 iken Talidomit'in en yüksek dozu hücre canlılığını % 73,5'e kadar indirmiştir. Radyoterapi tek başına canlılığı % 39,75 oranında hücre canlılığını azaltırken, Talidomit'in en yüksek dozu ile kombine tedavi de canlılık % 55'e artmıştır. 48 saatlik inkübasyon sonrasında kontrol grubunda % 85 olan canlılık tek başına Talidomit canlılığı % 72.75'e indirmiştir. Radyoterapi tek başına canlılığı % 69,5 oranına indirmişken kombine tedavide canlılık oranı % 75.25 olarak saptanmıştır. 72 saat inkübasyon sonrasında tek başına Talidomit en yüksek dozda % 80 olan canlılık oranını % 52'ye indirmiştir. Tek başına radyoterapi canlılığı % 65.5'e indirirken Taliomit radyoterapi kombinasyonu canlılığı % 65.5 den % 30'a indirmiştir. Buradan saptanan sonuç diğer sonucu destekler nitelikte olup radyoterapi ve Talidomit kombinasyonu 24 ve 48 saatlik inkübasyon periyotlarında canlılığı azaltıcı etki yaratmamıştır.

4THMpc hücre hattında, Live dead test sonuçlarına göre, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda kontrol grubunda canlılık oranı % 85,2 iken Talidomit'in en yüksek dozu hücre canlılığını % 78,9'e kadar indirmiştir. Radyoterapi tek başına hücre canlılığını % 59,2 oranında azaltırken, Talidomit'in en yüksek dozu ile kombine tedavi de canlılık % 63,1'e artmıştır. 48 saatlik inkübasyon sonrasında kontrol grubunda % 84 olan canlılık tek başına Talidomit canlılığı % 81'e indirmiştir. Radyoterapi tek başına canlılığı % 57 oranına indirmişken kombine tedavide canlılık oranı % 66 olarak saptanmıştır. 72 saat inkübasyon sonrasında tek başına Talidomit en yüksek dozda % 83 olan canlılık oranını % 67'ye indirmiştir. Tek başına radyoterapi canlılığı % 63'e indirirken Taliomit radyoterapi kombinasyonu canlılığı % 38'e indirmiştir. Buradan saptanan sonuç diğer sonucu destekler nitelikte olup radyoterapi ve Talidomit kombinasyonu 24 ve 48 saatlik inkübasyon periyotlarında canlılığı azaltıcı etki yaratmamıştır.



Talidomit'in kanser hücreleri üzerine gösterdiği sitotoksosite ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle elde edilen bulguların doğruluğunu kanıtlamak için tripan mavisi testi ile Talidomit'in sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir.

4T1 hücre hattına 24 saatlik inkübasyon süresinde 40 µg/ml'lik dozdaki Talidomit tek başına canlılık oranını % 82.5'den % 77.5'e, radyoterapi tek başına % 69.5'e ve kombine tedavi ise % 56.5'e indirmiştir. Benzer şekilde 48 saatlik inkübasyon sonrasında tek başına 40 µg/ml Talidomit uygulaması canlılık oranını % 78'den % 67'ye, radyoterapi tek başına % 62'ye ve kombine tedavi ise % 67.75'e indirmiştir. 72 saatlik inkübasyon sonrasında ise diğer sitotoksosite testlerinde de olduğu gibi tek başına 40 µg/ml Talidomit uygulaması canlılık oranını % 75.5'den % 49.75'e, radyoterapi tek başına % 61'e ve kombine tedavi ise % 31.75'e indirmiştir.

4THMpc hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresinde 40 µg/ml lik dozdaki Talidomit tek başına canlılık oranını % 94,5'den % 71'e, radyoterapi tek başına % 63'e ve kombine tedavi ise % 68'e indirmiştir. Benzer şekilde 48 saatlik inkübasyon sonrasında tek başına 40 µg/ml Talidomit uygulaması canlılık oranını % 90'dan % 80,75'e, radyoterapi tek başına % 57,5'e ve kombine tedavi ise % 70,25'e indirmiştir. 72 saatlik inkübasyon sonrasında ise diğer sitotoksosite testlerinde de olduğu gibi tek başına 40 µg/ml Talidomit uygulaması canlılık oranını % 89'dan % 53'e, radyoterapi tek başına % 68'e ve kombine tedavi ise % 44'e indirmiştir.

Tüm sitotoksosite testleri sonrasında elde edilen veriler ışığında 40 µg/ml'lik dozda Talidomit ve 45 Gy radyoterapi kombinasyonu, tedavilerin birbirleri üzerinde yarattıkları sinerjistik etki nedeniyle 4T1 ve 4THMpc hücre hatları üzerinde daha önemli sitotoksik bir etkinin saptanmasını sağlamıştır.

Talidomit antianjiogenik özelliği nedeniyle doğrudan tümör hücrelerini hedef alan bir ajan değildir. Bu bağlamda Talidomit'in kanser hücrelerinde *in vitro* sitotoksik etkisini araştıran çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Ansiaux ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, 100 µM Talidomit 20 ve Gy radyoterapi kombine tedavisinin,

fibrosarkoma tümör hücrelerinde sitotoksik etkiye neden olduğu çalışmamızda kullanılan tripan mavisi tekniği ile gösterilmiştir (Ansiaux vd 2005).

Talidomit'in mekanizmasına ait farklı hipotezler ileri sürülmüştür. Bunlardan bazıları geçerliliğini kaybetmiş olsa da şu an Talidomit'in, B vitamini, piteroilglutamik asit, IGF-1 ve IGF-2 antagonisti olduğu, glutamik asit metabolizması, nükleik asit sentezi ve DNA'nın kelasyonu, hücre-hücre etkileşimi, alt ve üst ekstremitelerde arter degradesyonu, kondrifikasyon ve kalsifikasyonda hata, anjiogenez inhibisyonu, bazı integrinlerin downregülasyonu ve oksidatif DNA hasarı, hücre ölümü gibi durumlarda rol oynadığı bilinmektedir (Ng vd 2002).

Programlı hücre ölümü, apoptoz, sitotoksik etkinin belirlenebilmesi için kullanılan en önemli basamaklardan birisidir. Bu nedenle tez kapsamında, Talidomit'in kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla, kaspaz-3 enzim aktivitesindeki değişiklik de incelenmiştir. 4T1 ve 4THMpc hücre hatlarında 40 µg/ml Talidomit'in tek başına ya da radyoterapi ile kombine olarak kaspaz-3 enzim miktarını artırması, doğrudan Talidomit'in sitotoksik etkisiyle ilişkilendirilebilir.

Çalışmamızın bulgularında olduğu gibi, Warfel ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, hem H157 küçük olmayan akciğer kanseri hücre hattında hem de endotel hücre hattında Talidomit'in bir analogu CPS49 (100 µmol/L) adı geçen hücreleri apoptoza yönlendirmiştir (Warfel vd 2006). Bir diğer çalışmada ise Talidomit monosit hücrelerini 50 µg/ml'lik dozda, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda kaspaz-3 enzimini aktive ederek apoptoza yönlendirmiştir (Gockel vd 2004). İnsan kolon kanseri modelinde Talidomit Paklitaksel ile kombine edilerek kullanılmış ve tümör büyümesi ve anjiogenezi inhibe etmiştir ve de apoptozu tetiklemiştir. Bu sonuca göre, Talidomit geleneksel sitotoksik kemoterapi ajanlarıyla kombine edilirse daha etkili olabilir (Fujii vd 2003). Son çalışmalardan birinde, Talidomit endotel hücrelerde denenmiş ve anti-anjiogenik özellik gösterdiği ve apoptozu teşvik ettiği bulunmuştur (Kaicker vd 2003).

Talidomit K-562 eritrolösemik hücrelerde 15, 30, 50 ve 100 µM olarak uygulanmış ve sadece 15 ve 30 µM'lık dozda, hücrelerin sırasıyla % 26- % 30'unda apoptoza neden

olduğu bulunmuştur. Ayrıca, Talidomit astrosit hücrelerinde 20, 50 ve 250 µg/ml'lik dozlarda TNF-α miktarını doza bağlı şekilde azaltarak apoptoza neden olmuştur (Ergun vd 2003). 10 µg/ml'lik Talidomit, mononükleer plazma hücrelerinde, lovastatin ile kombine edildiğinde 72 saatlik inkübasyon sonucu apoptoza neden olmuştur (Dmoszynska vd 2006).

Talidomit, antianjiogenezden bağımsız olarak COX-2'yi parçalamasına bağlı olarak HL-60 hücrelerinin büyümesini doza bağımlı olarak, Talidomit'in bir analogu ise yine HL-60 hücrelerinin proliferasyonunu doza ve zamana bağlı olarak inhibe eder. Nükleer faktör kappa B (NF-κB) sinyal yolağının normal fonksiyonu apoptozun inhibe edilmesi ve kanser hücrelerinin proliferasyonunun teşvik edilmesidir. Bu yüzden NF-κB sinyal yolağının inhibisyonu, kanser tedavisindeki önemli yaklaşımlardan birisidir. Talidomit de NF-κB sinyal yolağının güçlü inhibitörlerinden birisidir ve tümör hücrelerinde apoptozu teşvik eder (Lu vd 2009).

Kemoterapide en sık kullanılan ajanlardan olan sis-platin ve doksorubisin, ovaryum kanser hücre hatlarında (222, A224, A364, A547, A2780/AD10, Caov-3, A2780/CP70, OVCAR-3, OVCA-429, UCI 101, ve UCI 107) kaspaz-3 enzimini aktive ederek sitotoksik etki göstermektedirler. Mitokondriden sitokrom c salınımı yoluyla tetiklenen kaspaz 8 ve 9, kaspaz 3'ün aktive olmasına ve bu yolla hücrelerin apoptoza yönelmesine neden olur. Böylece kontrol grubuna oranla kanser hücre hatlarında, hücreler % 80'in üzerinde apoptoza uğrar (Cuello vd 2001).

Talidomit de sitotoksik özellikte bir kemoterapatik ajan olduğu için, proje kapsamında yapılan sitotoksisite testlerinden elde edilen veriler doğrultusunda, Talidomit'in 4T1 ve 4THMpc hücre hatları üzerinde göstermiş olduğu sitotoksik etkiyi kaspaz-3 aktivasyonunun artışına bağlı olarak hücrelerin apoptoza yönelmesine bağlayabiliriz.

Talidomit'in oral yoldan tek doz uygulaması 200 mg/kg/gün'dür. Bu değerın plazma konsantrasyonu ise 6 µM (1,5 µg/ml)'a denk gelmektedir. Talidomit ayrıca 1200 mg/kg/gün olacak şekilde yüksek dozda da kullanılmaktadır. Bu değerın plazma

konsantrasyonu ise 36  $\mu$ M (9  $\mu$ g/ml)'dir. Talidomit'in letal dozu ise 333,3  $\mu$ M (83,325  $\mu$ g/ml)'dir. Deneylerde kullandığımız 40  $\mu$ g/ml letal dozun yarısı kadardır. MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattında 100  $\mu$ g/ml Talidomit kullanılmış ve koryoallantoyik membran yönteminde angiogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir (Marx vd 2002).

Talidomit antianjiogenik özelliğinin yanı sıra tümör büyümesini de inhibe etmektedir ve hücre yapışma moleküllerinin ekspresyonlarını değiştirir (Geitz vd 1996), tümör nekroz faktör- $\alpha$  üretimini baskılar, interlökin-10 üretimini artırır (Corral vd 1996) ve doğrudan T hücrelerinin uyarımını sağlayarak hücre aracılı immüneyi artırır (Mchugh vd 1995).

Talidomit piyasadan toplatıldıktan sonra, hamilelik döneminde Talidomit kullanılması sonucu meydana gelen malformasyonlu bebek doğumlarının nedeni araştırıldığında, tam mekanizması net olarak bilinmese de D'amato ve arkadaşları, Talidomit'in anlamlı şekilde bazik-fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve VEGF ile tetiklenmiş damar oluşumunu önemli derecede inhibe ettiğini göstermişlerdir (D'amato vd 1994). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, Talidomit'in nörofilin-1 ve Flk-1 gibi VEGF reseptörlerini ortadan kaldırdığını ve buna bağlı olarak anjiogenezi inhibe ettiğini ortaya koymuştur. Bu özelliği ile günümüzde kanser tedavisinde oldukça yaygın kullanılan bir ilaçtır. Talidomit'in bu etkisi, parçalanması sonucu açığa çıkan hidroksillenmiş metabolitlerinden kaynaklanmaktadır (Franks vd 2004).

Talidomit'in etki mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir. Ancak tek başına uygulandığında anjiogenezi inhibe etmediği bununla birlikte mikrozomal enzimlerle birlikte verildiğinde anjiogenezi önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu sonuca göre de Talidomit'in etkisinin kendisinden çok metabolitlerinden kaynaklanabileceği düşünülebilir (Fujita vd 2004). Bununla birlikte mikrozomal enzimler olmaksızın Talidomit, *in vitro* olarak, monositlerde apoptozu tetiklemiş ve küçük olmayan akciğer kanseri hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmiştir (Haura 2001). Lu ve arkadaşları Talidomit'in fare, tavşan ve insan karaciğer mikrozomal enzimleriyle muamelesi sonucu hidroksillenmiş metabolitlerin oluştuğunu göstermişler ve Talidomitin aktivitesini de bu hidroksillenmiş metabolitlere bağlamışlardır (Lu vd 2004).

Talidomit'in güçlü bir anjiogenez inhibitörü olduğu tavşan kornea mikrocep testi ile gösterilmiş ancak bu antianjiogenik etki TNF- $\alpha$  inhibisyonu ile ilişkilendirilememiştir. Gösterdiği antianjiogenik etkinin Talidomit'in parçalanma ürünleri ile ilişkili olabileceği ve bu ürünlerin belirlenmesi ile antianjiogenik etki gösterecek yeni ilaçların sentezlenmesinin mümkün olabileceği ileri sürülmüştür (D'amato vd 1994).

### **5.3. Talidomit'in ADAM-10 ve Neprilizin Enzim Aktivileri ile P Maddesi Miktarı Üzerine Gösterdiği Etkiler**

Talidomit için 40  $\mu\text{g/ml}$  sitotoksik doz olarak belirlendikten sonra, bu dozda ADAM-10 ve Neprilizin enzim aktiviteleri ile P maddesi miktarı üzerine gösterdiği etkiler incelenmiştir.

Anjiogenez tümör hücrelerinin kendine olan güvenlerini en aza indiren oldukça karmaşık ve pek çok faktör tarafından etkilenen bir mekanizmadır. Bu mekanizma içerisinde her iki ilaç farklı yollar üzerinden aktivite göstermektedir. Antianjiogenik ajanlar tümör büyümesini kontrol etmek üzere belirli bazı biyolojik olayları hedef alırlar. Bu hedeflerin en başında kanser hücresinden salınan proteazları inhibe etmek gelmektedir.

Proteazlar ve proteolitik enzimler endo ve ekzo peptitazlardan oluşur. Bu enzimler proteinleri hidroliz ederek peptit ve amino asitlerin oluşmasını sağlar. Metastazik tümör hücrelerinin etrafında bağ doku oluşturan ekstraselular matriks, tümör hücrelerin geçmesi için bir bariyerdir. Tümör hücreleri, hareketlerini kolaylaştırmak için bazı proteazlar salarak ekstraselular matriksin protein bileşenlerini hidrolizler. Metastaz sürecinde ise ekstraselular matriksin parçalanması kontrolsüz bir şekilde gerçekleşmektedir. Kanser hücrelerinin kendi proteazlarını salarak mı yoksa diğer hücrelerden proteaz salınmasını tetikleyerek mi ya da her ikisini de gerçekleştirerek mi metastaz yeteneğini elde ettikleri henüz tam anlamı ile açıklığa kavuşmamıştır (Duffy 1992).

Proteazlar, invazyon ve metastazda çok önemli rol oynarlar. Hücreden salınan proteaz miktarındaki artışın, metastazdaki artış ile doğru orantılı olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Proteazların inhibe edilmesi tümör hücrelerinin invazyon ve metastazını engellediği kadar, endotel hücrelerinin çevre doku ile ilişkisini bozarak migrasyonunu önlemekte ve sonuçta anjiogenezi de inhibe etmektedir. Sitotoksik ilaçlar ile kıyaslandığında proteaz inhibitörleri, tıpkı antianjiogenik bileşikler gibi, toksik etki yaratmadığından kanser tedavisinde kullanılmaları mümkündür (Vandeputte-rutten ve Gros 2002).

Proteazların en geniş üyeli ailesi olan matriks metalloproteazların fazla salınması ve tümör gelişimi arasındaki bağlantı anlaşıldığından bu yana, bu enzimlerin proteolitik aktivitelerini inhibe etmek amacıyla pek çok strateji geliştirilmiştir. Ancak MMP'lerin inhibitörleri pek çok klinik çalışmada hayal kırıklığı yaratmıştır.

ADAM'lar protozoalardan memelilere kadar pek çok canlıda bulunmaktadır. Metalloproteazların metsizin alt ailesine ait olan ADAM'lar, pek çok hücrel sinyal iletim yollarında görev alır. ADAM üyeleri membran proteinlerini parçalayarak çözülebilir olgun formlara dönüştürürler. ADAM ailesinin bütün üyeleri proteolitik özelliğe sahip değildir çünkü katalitik aktivite için esas olan aminoasitleri içermezler. ADAM ailesine ait en önemli üye ADAM-10'dur (Chubinskaya vd 2001). Prostat, lösemi, meme ve skuamöz kanser hücrelerinde ADAM-10 ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Ancak ADAM'ların kanser mekanizması üzerindeki etkisi tam olarak aydınlatılamamıştır ADAM-10'un biyokimyasal ve biyolojik özelliklerinin detaylı bir şekilde araştırılması, bu enzimin kanser tedavilerinde kullanılmasını sağlayabilir (Mochizuki Ve Okada 2007). Talidomit'in ADAM-10 ve Neprilizin enzimleri üzerine olan etkisinin belirlenmesi ile bu proteazların olası anti-kanser etkileri daha detaylı bir şekilde tartışılabilir.

Bu çalışmada, ADAM-10 enziminin hem 4T1 hem de 4THMPc hücre hatlarında bazal seviyede ekspre edildiği saptanmış ve ilacın enzim üzerindeki etkisi araştırılmıştır. 4T1 hücrelerinde, tek başına 40 µg/ml Talidomit uygulamasının, ADAM-10 enzim aktivitesi üzerine herhangi bir etkisi olmamıştır. Radyoterapi tek başına enzim

aktivitesinde % 42'lik bir inhibisyona neden olurken, 40 µg/ml Talidomit radyoterapi ile kombine edildiğinde enzim miktarında % 89'luk bir inhibisyon olmuştur. 4THMpc hücre hattında ise tek başına Talidomit uygulaması sonucu enzim miktarı % 66,6 oranında artmıştır. Tek başına radyoterapi uygulaması enzim miktarını % 33,3 oranında inhibe ederken, Talidomit ve radyoterapi kombine tedavi uygulaması sonrasında enzim miktarı % 40 oranında inhibe olmuştur. Sonuçlar değerlendirildiğinde; Talidomit'in 40 µg/ml lik dozunun antianjiogenik bir ajandan beklenildiği gibi, bir proteaz olan ADAM-10 miktarını azaltmadığı ancak kombine tedavi sonrasında radyoterapi ile bu aktiviteyi gerçekleştirmeyi başardığı ortaya çıkmaktadır.

Talidomit ve radyoterapi kombinasyonu, her iki hücre hattında da ADAM-10 enzim aktivitesinde inhibisyona neden olmuştur. Bu sonuçlar, bizlere metastazik tümörlerde radyoterapiye hassaslığı arttırmak amaçlı yapılan kombine tedaviler öncesinde, kombinasyonun öncelikle *in vitro* etkisinin araştırılması gerektiğini bir kez daha hatırlatmaktadır.

Tez kapsamında aktivitesi araştırılan bir diğer enzim ise, Neprilizindir (NEP). Tavşan böbreğinde fırça kenarlı membrandan izole edilen NEP (nötral endopeptidaz, NEP, Ec 3.4.24.11) enzimi insülinin B zincirini hidroliz ettiği saptanan ilk enzimdir. 30 yılı aşkın bir süredir aktivitesi detaylı bir şekilde araştırılmaktadır. Saflaştırılmasının ardından tip II integral membran proteini olduğu saptanmıştır. NEP çinko bağlanma motifine sahip tipik bir metallopeptidazdır ve M13 peptidaz ailesi içinde glusizinler olarak bilinen gruba aittir. *Streptomyces*'den elde edilen fosforamidon adlı bileşik ile güçlü bir şekilde inhibe edilmektedir (Shipp vd 1996, Turner ve Hooper 2002).

Memelilerde en fazla böbrekte eksprese edilir ve fizyolojik olarak enkefalinleri parçaladığı için enkefelinaz olarak da adlandırılır. Bilinen en eski görevi beyin metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynamaktır. Özellikle takikinin ailesine ait nöropeptitlerin metabolizmasında da görev aldığı saptandıktan sonra, NEP daha detaylı bir şekilde araştırılmaya başlanmıştır. Yapılan farklı çalışmalar sonrasında NEP'in bombesin, bradikinin, kalsitonin, endotelin-1, nörotensin ve vasoaktif intestinal peptit

(VIP) gibi mitojenik peptitleri inaktive ederek özellikle akciğer ve prostat kanserinde, tümör büyümesinin kontrolünde rol oynadığını ortaya çıkarmıştır (Shipp vd 1996).

4T1 hücrelerinde, kontrol grubunda, 40 µg/ml Talidomit uygulamasının NEP aktivitesinde % 40,9 oranında bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Tek başına radyoterapi uygulaması enzim aktivitesinde % 40,7'lik bir artışa neden olurken, Talidomit'in radyoterapi ile kombinasyonu da 4T1 hücrelerinde % 40,7 oranında bir artış meydana getirmiştir.

4T1 hücrelerine göre daha agresif olan 4THMpc hücre hattında ise, tek başına 40 µg/ml Talidomit uygulamasının NEP aktivitesinde % 26,6 oranında bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Tek başına radyoterapi uygulaması enzim aktivitesinde % 33,3'lük bir artışa neden olurken, Talidomit'in radyoterapi ile kombinasyonu da 4THMpc hücrelerinde % 37 oranında bir artış meydana getirmiştir.

Tek başına Talidomit uygulaması 4T1 hücrelerinde NEP aktivitesinde artış sağlarken radyoterapi ile birlikte uygulandığında, enzim aktivitesinde bir değişim gözlenmemiştir. Ne Talidomit ne de radyoterapi birbirleri üzerine sinerjistik ya da antagonistik etki yaratmamıştır.

Talidomit aynı dozda ADAM-10 enzim aktivitesinde bir değişim yaratmamışken NEP aktivitesinde artış saptanması ilacın etki mekanizmasının aydınlatılabilmesi için önemli bir ipucu sağlamaktadır. 4THMpc hücre hattında ise Talidomit 4T1'e oranla enzim aktivitesinde daha fazla artışa neden olmuş ve radyoterapi ile bu sonuç değişmemiştir. Aynı hücre hattında ise ADAM-10 aktivitesini NEP'e oranla daha fazla artırmıştır. Birçok farklı fonksiyonu doza bağlı olarak farklı şekilde yürüttüğü bilinen Talidomit, daha metastazik bir karakterdeki 4THMpc hücrelerinde ADAM-10 miktarını NEP'e oranla daha fazla artırmaktadır. Talidomit'in bu etkisi şaşırtıcıdır çünkü ADAM-10 enziminin metastaz üzerindeki etkisi NEP'e oranla daha belirgindir. Antianjiogenik bir ajan olduğu bilinen Talidomit'in, metastaz kapasitesi yüksek olan hücre hattının daha agresif özellik kazanmasına neden olabilecek bir enzimin aktivitesini artırması, sahip olduğu özellik ile çelişkili bulunmuştur. Mekanizma üzerinde daha ayrıntılı



çalışmalar yapıldığında Talidomit'in ADAM-10 enzimi üzerindeki etkisi aydınlatılabilir.

Tez kapsamında, araştırılan her iki enziminde ortak noktalarından bir tanesi P maddesini parçalama özellikleridir. Nörobiyolojide son yıllardaki gelişmeler, kanser hastalarına umut vermeye başlamıştır. Yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular, P maddesi ve onun reseptörü nörokinin-1 reseptörünün (NK-1R) mitogenez, anjiogenez, hücre göçü ve metastaz ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Gonzalez Moles vd 2009). G-protein bağlı bir reseptör olan NK-1R'ye ligandın bağlanması, fosfoinositid hidrolizi, kalsiyum hareketi ve mitojenle-aktive edilmiş protein kinaz aktivasyonuna neden olmaktadır. İnflamasyon ve kanser arasındaki ilişkinin merkezinde de P maddesi yer almaktadır. 1931 yılında keşfedilen P maddesinin fonksiyonları hakkında 1950'li yıllara kadar kesin bir şey bilinmiyordu. 1950'li yıllarda P maddesi ağrıyı ileten bir nörotransmitter olarak tanımlandı. Bu gün bilinmektedir ki P maddesi fizyolojik stres durumunda merkezi sinir sisteminde önemli bir role sahiptir (Luo vd 1996, Defea vd 2000).

Periferal dokularda ve merkezi sinir sisteminde nörojenik inflamasyon ve immun yanıtın oluşumunda P maddesi rol oynamaktadır ve ağrının algılanmasında da önemli görevler üstlenmektedir. Pek çok periferal dokuda P maddesinin damar genişletici özelliği olduğu bilinmektedir. P maddesi içeren sinir uçları genellikle kan damarları yakınında lokalize olmuştur ve bu uçlardan P maddesi salınımıyla, akut inflamasyonda görülen pek çok fizyolojik olayın başlamasına neden olur. P maddesi sadece sinir hücresi kaynaklı değildir. Eozonofil ve makrofajlar gibi sinirsel olmayan hücrelerde de P maddesi bulunmaktadır. G-protein bağlı reseptörüne bağlanınca aktive olan P maddesi mitojenle aktive edilmiş protein kinazları aktive ederek apoptoza neden olur. Ayrıca *ras* onkogenini aktive ettiği ve reseptöre bağlandığında TAPI-duyarlı matriks metalloproteazları özellikle de TACE'i aktive ederek membrana bağlı TGF- $\alpha$ 'nın aktif formda salınmasına neden olur. TGF- $\alpha$  MAPK yolağını aktive ederek kolon epitel hücrelerinin ve astrostoma hücre proliferasyonunu artırır (Palma vd 1999, Friess vd 2003, Munoz vd 2004, Singh vd 2000).

Son olarak, P maddesi ve reseptörü arasındaki etkileşimin pankreas kanseri, glioma meme kanseri, kolon displazi ve karsinomlarında tümör büyümesinin ilerleyişi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. P maddesi, pek çok normal ve neoplastik hücrede NK1 reseptörlerini aktive ederek mitogenezi artırmaktadır. P maddesi ve reseptörünün kanser hücrelerinde de varlığı, immünohistokimya çalışmalarıyla gösterilmiştir. Bütün tümörlerin besin ihtiyacını karşılamak için yeni kan damarları oluşturmaya ihtiyacı vardır fikrinden yola çıkarak, P maddesi ve reseptörü aracılığıyla kan damar oluşumunun tetiklenmesi kanser hücreleri için tercih edilebilecek en kısa yollardan bir tanesidir (Esteban vd 2006). P maddesi, metastazik insan nöroblastoma hücrelerinin neredeyse % 90'ında, melanoma ve retinoblastoma hücrelerinde de eksprese edilmektedir. Bununla birlikte P maddesi reseptörü ise NK-1, nöroblastoma, retinoblastoma, insan glioma hücre hatları ve pankreatik karsinoma hücre hatlarında eksprese edilmektedir. Ayrıca NK-1'in meme kanseri ve metastazda aşırı ifade edildiği de bilinmektedir (Munoz vd 2004).

Bu bağlamda, kanserle ilişkilendirilen en önemli nöromodulatör olan P maddesinin 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde de sentezlendiği ve besi yerine salındığı da bu çalışma ile birlikte ilk defa gösterilmiştir.

4T1 hücrelerinde, kontrolde besi yerine salınan P maddesi miktarı 150 pg/ml iken, tek başına Talidomit, P maddesi miktarına etki etmemiştir. Radyoterapi besi yerine salınan P maddesini % 13,3 oranında artırırken, Talidomit ile kombine edildiğinde besi yerine salınan P maddesi miktarı % 26,5 oranında artmıştır. Hücre içi P maddesi miktarı 4T1 hücrelerinde kontrol grubunda 151 pg/ml iken, tek başına Talidomit hücre içi P maddesi miktarı üzerine yine etki göstermemiştir. Radyoterapi tek başına hücre içi P maddesi miktarını % 8,2 artırırken, Talidomit radyoterapi kombine tedavisinde hücre içi P maddesi % 28 oranında artmıştır.

4THMpc hücrelerinde, kontrolde besi yerine salınan P maddesi miktarı 115 pg/ml iken, tek başına Talidomit P maddesi miktarını % 10 azaltmıştır. Radyoterapi besi yerine salınan P maddesini % 2 oranında arttırırken, Talidomit ile kombine edildiğinde besi yerine salınan P maddesi miktarı % 5 oranında artmıştır. Hücre içi P maddesi miktarı

4T1 hücrelerinde kontrol grubunda 160 pg/ml iken tek başına Talidomit hücre içi P maddesi miktarını % 37,5 oranında azaltmıştır. Radyoterapi tek başına hücre içi P maddesi miktarını % 1,7 artırırken, Talidomit radyoterapi kombine tedavisinde hücre içi P maddesi % 11,1 oranında artmıştır.

Bu sonuçlara göre, ilk defa, 4T1 ve 4THMpc hücre hatlarında hücre içerisinde ve besi yerine salınan P maddesi miktarları saptanmıştır. Tüm bu bilgilerle birlikte, tez kapsamında gerçekleştirilen sitotoksikite test sonuçlarına göre Talidomit 4T1 ve 4THMpc hücre hatlarında 40 µg/ml'lik dozda ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda sitotoksik etki göstermiştir.

## 6. SONUÇ

Tüm bu verilerle birlikte;

**1-** Tez kapsamında gerçekleştirilen bütün sitotoksikite test sonuçlarına göre; 4T1 ve 4THMpc hücre hatlarında Talidomit 40 µg/ml'lik dozda 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda sitotoksik etki göstermiştir. 4T1 hücre hattına 24 saatlik inkübasyon süresinde 40 µg/ml'lik dozdaki Talidomit tek başına canlılık oranını % 82.5'den % 77.5'e, radyoterapi tek başına % 69.5'e ve kombine tedavi ise % 56.5'e indirmiştir. Benzer şekilde 48 saatlik inkübasyon sonrasında tek başına 40 µg/ml Talidomit uygulaması canlılık oranını % 78'den % 67'ye, radyoterapi tek başına % 62'ye ve kombine tedavi ise % 67.75'e indirmiştir. 72 saatlik inkübasyon sonrasında ise diğer sitotoksikite testlerinde de olduğu gibi tek başına 40 µg/ml Talidomit uygulaması canlılık oranını % 75.5'den % 49.75'e, radyoterapi tek başına % 61'e ve kombine tedavi ise % 31.75'e indirmiştir. 4THMpc hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresinde 40 µg/ml lik dozdaki Talidomit tek başına canlılık oranını % 94,5'den % 71'e, radyoterapi tek başına % 63'e ve kombine tedavi ise % 68'e indirmiştir. Benzer şekilde 48 saatlik inkübasyon sonrasında tek başına 40 µg/ml Talidomit uygulaması canlılık oranını % 90'dan % 80,75'e, radyoterapi tek başına % 57,5'e ve kombine tedavi ise % 70,25'e indirmiştir.

**2-** İlk defa, 4T1 ve 4THMpc hücre hatlarında hücre içerisinde bulunan ve besi yerine salınan P maddesi miktarları tespit edilmiştir. Talidomit 4T1 hücre hattında tek başına hücre içindeki ve besiyerine salınan P maddesi miktarını değiştirmezken RT ve kombine tedavi de hem hücre içindeki hem de besiyerine salınan P maddesi miktarını artırmıştır. 4THMpc hücre hattında ise talidomit tek başına hem hücre içindeki hem de besiyerine salınan P maddesi miktarını azaltmıştır. RT ve kombine tedavi hem hücre içindeki hemde besiyerine salınan P miktarında çok az bir artışa neden olmuştur.

**3-** Talidomit'in 40 µg/ml'lik dozda 4T1 ve 4THMpc hücre hatlarında, ADAM-10 ve Nephilizin enzim aktiviteleri üzerine farklı etkilere neden olduğu ve bu etkilerin radyoterapi ile kombine edildiğinde değiştiği gösterilmiştir. RT ve kombine tedavi 4T1 hücrelerinde adam 10 enzim aktivitesini azaltmıştır. 4THMpc hücrelerinde ise tek başına talidomit enzim aktivitesini artırmışken RT ve Kombine tedavi enzim aktivitesini azaltmıştır.

Neprilizin enzim aktivitesi 4T1 ve 4THMpc hücre hatlarında benzer olarak hem tek başına talidomit hem tek başına radyoterapi hem de kombine tedavide kontrol grubuna oranla artmıştır.

Elde edilen bu sonuçlar göz önüne alındığında bu çalışmanın devamında, antianjiogenik özellikteki Talidomit'in damar endotel hücreleri üzerinde gösterecekleri etkiler araştırılabilir. Kanser tedavisinde kombine tedaviler oldukça önemli olduğu için, antianjiogenik özellikteki Talidomit'in doksorubisin gibi sitotoksik etki gösteren farklı ilaçlarla ve/veya birbirleri ile kombinasyonunun radyoterapi ile tekrar kombine edilerek, endotel hücreler üzerine etkileri araştırılabilir. Talidomit'in ADAM-10 ve Neprilizin enzim aktiviteleri üzerine etkileri, siRNA ve RT-PCR teknikleri ile çalışılabilir ve moleküler mekanizmaları aydınlatılabilir. Ayrıca P maddesinin parçalanması sonucu ortaya çıkan peptit fragmanlarının varlığı ve miktarları HPLC yöntemi ile belirlenebilir. Bu çalışmalardan elde edilecek sonuçlara göre P maddesi fragmanlarından hangilerinin tümör ve endotel hücreler üzerine daha yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenebilir. Talidomit P maddesini parçalama etkisine sahip olduğu için ve antianjiogenik etkilerini P maddesinin parçalanmasına bağlı olarak gösterebileceği belirlenebileceği için, P maddesinin parçalanması sonucu açığa çıkan ve ticari olarak satılan peptit fragmanlarını ile kombine edildiğinde Talidomit'in endotel hücreleri üzerine göstereceği etkiler araştırılabilir. Son olarak, antianjiogenik özellikteki ilaçların damarlaşma üzerine etkilerinin araştırıldığı Koryoallantoik membran (CAM) yöntemi gibi spesifik testlerle, her iki ilacın ve kombinasyonlarının etkileri desteklenebilir ve anjiogenez çok basamaklı karmaşık bir süreç olduğu için, Talidomit'in etki mekanizmasının belirlenebilmesi amacı ile de rol oynayan pek çok yolak test edilebilir ayrıca *in vitro* çalışılacak etkiler *in vivo* olarak da denenebilir.

Tez çalışmamız kapsamında elde ettiğimiz veriler ve bu verilerin yarattığı soru işaretleri açıkça görüldüğü gibi pek çok çalışmaya ışık tutmaktadır. Bu bağlamda yaptığımız çalışmanın bilim dünyasına ufak bir katkı sağlayacak olması, bizleri son derece mutlu etmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

- ADELSTEIN, D.J. 1998. Recent Advances of Chemoradiation in the Management of Locally Advanced Head and Neck Cancer. *Current Opinion Oncology*, 10: 213–218.
- AKYOL, H. 2004. Kemoterapinin Temel İlkeleri. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Hemşire Programı, Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı.
- ALA-AHO, R. and KAHARI, V.M. 2005. Collagenases in Cancer. *Biochimie*, 87: 273-286.
- ALBRECHT, M., DOROSZEWICZ, J., GILLEN, S., GOMES, I., WILHELM, B., STIEF, T. and AUMULLER, G. 2004. Proliferation of Prostate Cancer Cells and Activity of Neutral Endopeptidase is Regulated by Bombesin and IL-1 $\beta$  Acting as a Modulator of Cellular Differentiation. *The Prostate*, 58: 82-94.
- ANSIAUX, R., BAUDELET, C., JORDAN B.F., BEGHEIN, N., SONVEAUX, P., WEVER, J.D., MARTINIVE, J., GREGOIRE, V., FERON, O. and GALLEZ, B. 2005. Thalidomide Radiosensitizes Tumors through Early Changes in the Tumor Microenvironment. *Clinical Cancer Research*, 11: 743–750.
- APTE, S.S. 2004. A Disintegrin-Like and Metalloprotease (reprolysin type) with Thrombospondin type-1 motifs: the ADAMTS family. *International Journal of Biochemistry and Cell*, 36: 981-985.
- BAMIAS, A. and DIMOPOULOS, M.A. 2003. Angiogenesis in Human Cancer: Implications in Cancer Therapy. *European Journal of Internal Medicine*, 14: 459-469.
- BROCK, C.S. and LEE, S.M. 2002. Anti-Angiogenic Strategies and Vascular Targeting in the Treatment of Lung Cancer. *European Respiratory Journal*, 19: 557-570.
- BROWDER, T., BUTTERFIELD, C.E., KRALING, B.M., SHI, B., MARSHALL, B., O'REILLY, M.S. and FOLKMAN, J. 2000. Antiangiogenic Scheduling of Chemotherapy Improves Efficacy Against Experimental Drug-Resistant Cancer. *Cancer Research*, 60: 1878-1886.
- BUSSOLINO, F., MANTOVANI, A. and PERSICO, G. 1997. Molecular Mechanisms of Blood Vessel Formation. *Trends Biochemical Sciences*, 22: 251-256.
- CALFA, C.I., ROSENBLATT, J.D., CHO, H.M., WEBSTER, K. and SHIN, S.U. 2006. Antibodies and Antibody-Fusion as Anti-Angiogenic, Anti-Tumor Agents. *Update on Cancer Therapeutics*, 1: 159-173.

- CARMELIET, P. 2000. Mechanisms of Angiogenesis and Arteriogenesis, *Nature Medicine*, 6: 89-395.
- CARMELIET, P. 2003. Angiogenesis in Health and Disease. *Nature Medicine*, 9: 653-660.
- CARSON, D.A. and RIBEIRO, J.M. 1993. Apoptosis and Disease. *The Lancet*, 341:1251-1254.
- CARTER, M.S. and KRAUSE, J.E. 1990. Structure, Expression and Some Regulatory Mechanisms of the Rat Preprotachykinin Gene Encoding Substance P, Neurokinin A, Neuropeptide K, and Neuropeptide Gamma. *Journal of Neurosciencst*, 10: 2203-2214.
- CHINNAIYAN, A.M., ORTH, K., O'ROURKE, K., DUAN, H., POIRIER, G.G. and DIXIT, V.M. 1996. Molecular Ordering Of The Cell Death Pathway Bcl-2 And Bcl-Xl Function Upstream Of The Ced-3-Like Apoptotic Proteases. *The Journal Of Biological Chemistry*, 271: 4573–4576.
- CHUBINSKAYA, S., MIKHAIL, R. and DEUTSCH, A. 2001. ADAM-10 Protein is Present in Human Articular Cartilage Primarily in the Membrane-bound form and is Upregulated in Osteoarthritis and in Response to IL-1 alpha in Bovine Nasal Cartilage. *Journal of Histochemistry Cytochemistry*, 49: 1165-1176.
- COFFEY, J.C., WANG, J.H., SMITH, M.J.F., HAYES, D.B., COTTER, T.G. and REDMOND, H.P. 2003. Excisional Surgery for Cancer Cure: Therapy at a Cost. *Lancet Oncology*, 4: 760–768.
- COHEN, J.J. 1998. Apoptosis. To be or not to be. *Postgraduate Syllabus*, 1: 1-19.
- COLCIAGHI, F., BORRONI, B., PASTORINO, L., MARCELLO, E., ZIMMERMANN, M., CATTABENI, F., PADOVANI, A. and LUCA, M. 2002.  $\alpha$ -Secretase ADAM10 as well as  $\alpha$ APPs is Reduced in Platelets and CSF of Alzheimer Disease Patients. *Molecular Medicine*, 8: 67-74.
- COMBE, B. 2001. Thalidomide: New Indications?. *Joint Bone Spine*, 68: 582-587.
- CONNELL, P.P., KRONB, S.J. and WEICHSELBAUM, R.R. 2004. Relevance and Irrelevance of DNA Damage Response to Radiotherapy. *DNA Repair*, 3: 1245–1251.
- COOPER, J.S., GUO, M.D., HERSKOVIC, A., MACDONALD, J.S., MARTENSON, J.A., AL-SARRAF, M., BYHARDT, R., RUSSELL, A.H., BEITLER, J.J., SPENCER, S., ASBELL, S.O., GRAHAM, M.V. and LEICHMAN, L.L. 1999. Chemoradiotherapy of Locally Advanced Esophageal Cancer: Long-Term Follow-up of a Prospective Randomized Trial (RTOG85-01). *The Journal of the American Medical Association*, 281: 1623–1627.

- COOPER, J.S., PAJAK, T.F., FORASTIERE, A.A., JACOBS, J., CAMPBELL, B.H., SAXMAN, S.B., KISH, J.A., KIM, H.E., CMELAK, A.J., ROTMAN, M.M., ENSLEY, J.F., CHAO, K.S.C., SCHULTZ, C.J., LEE, N. and FU, K.K. 2004. Postoperative Radiotherapy and Chemotherapy for High-Risk Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *The New England Journal of Medicine*, 350: 1937–1944.
- CORRAL, L.G., MULLER, G.W. and MOREIRA, A.L. 1996. Selection of Novel Analogs of Thalidomide with Enhanced Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Inhibitory Activity. *Molecular Medicine*, 2: 506-515.
- CUELLO, M., ETTEBERG, S.A., NAU, M.M. and LIPKOWITZ, S. 2001. Synergistic Induction of Apoptosis by the Combination of TRAIL and Chemotherapy in Chemoresistant Ovarian Cancer Cells. *Gynecologic Oncology*, 81: 380–390.
- CUMMINGS, J., WARD, T.H., RANSON, M. and DIVE, C. 2004. Apoptosis Pathway-Targeted Drugs—From the Bench to The Clinic. *Reviews on Cancer*, 1705: 53-66.
- D'AMATO, R.J., LOUGHMAN, M.S., FLYNN, E. and FOLKMAN, J. 1994. Thalidomide is An Inhibitor of Angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91: 4082-4085.
- DEFEA, K.A., ZALEVSKY, J., THOMA, M.S., DERY, O., MULLINS, R.D. and BUNNETT, N.W. 2000. Beta Arrestin-Dependent Endocytosis of Proteinase-Activated Receptor 2 is Required for Intracellular Targeting of Activated Receptor 2 is Required for Intracellular Targeting of Activated ERK1/2. *Journal Of Cell Biology*, 148: 1267-1281.
- D MOSZYNSKA, A., PODHORECHA, M., KLIMEK, P. and GRZASKO, N. 2006. Lovastatin and Thalidomide Have a Combined Effect on The Rate of Multiple Myeloma Cell Apoptosis in Short Term Cell Cultures. *European Journal of Pharmacology*, 62: 325-329.
- DOWNS, J.L.S. 2005. Thalidomide and Angiostatin Inhibit Tumor Growth in a Murine Xenograft Model of Human Cervical Cancer. *Gynecologic Oncology*, 98: 203-210.
- DURAND, R.E. and RALEIGH, J.A. 1998. Identification of Nonproliferating but Viable Hypoxic Tumor Cells in Vivo. *Cancer Research*, 58: 3547-3550.
- DUFFY, M.J., MCGOWAN, P.M. and GALLAGHER, W.M. 2008. Cancer Invasion and Metastasis: Changing Views. *Journal of Pathology*, 214: 283–293.
- ECKHARDT, S.G. 1999. Angiogenesis Inhibitors as Cancer Therapy. *Hospital Practice*, 34: 63-84.



- EGBLAD, M. and WERB, Z. 2002. New Functions for The Matrix Metalloproteinases in Cancer Progression. *Nat. Rev. Cancer*, 2: 161-174.
- ELLIS, L.M., STALEY, C.A., LIU, W., FLEMING, R.Y.D., PARIKH, N.U., BUCANA, C.D. and GALLICK, G.E. 1998. Down-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor in a Human Colon Carcinoma Cell Line Transfected with Antisense Expression Vector Specific for c-src. *Journal of Biological Chemistry*, 375: 577-581.
- EMAMI, B., LYMAN, J., BROWN, A., COIA, L., GOITEIN, M., MUNZENRIDER, J.E., SHANK, B., SOLIN, L.J. and WESSON M. 1991. Tolerance of Normal Tissue to Therapeutic Irradiation. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 21: 109-122.
- ERENPREISA, J. and CRAGG, M.S. 2007. Cancer: A matter of Life Cycle. *Cell Biology International*, 31: 1507-1510.
- ERGUN, M.A., KONAC, E., ERBAS, D. and EKMEKCI, A. 2004. Apoptosis and Nitric Oxide Release Induced by Thalidomide, Gossypol and Dexamethasone in Cultured Human Chronic Myelogenous Leukemic K-562 cells. *Cell Biology International*, 28: 237-242.
- ERIN, N., BOYER, P.J., BONNEAU, R.H., CLAWSON, G.A. and WELCH, D.R. 2004. Capsaicin-Mediated Denervation of Sensory Neurons Promotes Mammary Tumor Metastasis to Lung and Heart. *Anticancer Research*, 24: 1003-1010.
- ERIN, N., ZHAO, W., BYLANDER, J., CHASE, G. and CLAWSON, G.A. 2006. Capsaicin-Induced Inactivation of Sensor Neurons Promotes a More Aggressive Gene Expression Phenotype in Breast Cancer Cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 99: 351-364.
- ERIN, N. and ULUSOY, O. 2008. Differentiation of Neuronal from Non-Neuronal Substance P doi:10.1016/j.regpep.2008.10.006, Article in pres.
- ERIN, N., WANG, N., XIN, P., BUI, V., WEISZ, J., BARKAN, G.A., ZHAO, S.D. and CLAWSON, G.A. 2009. Altered Gene Expression in Breast Cancer Liver Metastases. *The International Journal of Cancer*, 124: 1503-1516.
- ESTEBAN, F., NOZ, M.M., MOLES, M.A.G. and ROSSO, M. 2006. A Role for Substance P in Cancer Promotion and Progression: A Mechanism to Counteract Intracellular Death Signals Following Oncogene Activation or DNA Damage. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25: 137-145.
- EVANS, D.B., WOLFF, R.A. and CRANE, C.H. 2001. Neoadjuvant Strategies for Pancreatic Cancer. *Oncology (Williston Park)*, 15: 727-747.

- FAHRENHOIZ, F., GILBERT, S., KORJO, E., LAMMICH, S. and POSTINA, R. 2000. Alpha-Secretase Activity Metalloprotease ADAM10, Influences of Domain Structure. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 920: 215-222.
- FADOK, V.A., BRATTON, D.L., ROSE, D.M., PEARSON, A., EZEKEWITZ, R.A. and HENSON, P.M. 2000. A Receptor for Phosphatidylserine-Specific Clearance of Apoptotic Cells. *Nature*, 405: 85–90.
- FATA, J.E., WERB, Z. and BISSEL, M.J. 2004. Regulation of Mammary Gland Branching Morphogenesis by the Extracellular Matrix and its Remodeling Enzymes. *Breast Cancer Research*, 6: 1-11.
- FEARON, E.R. 1997. Human Cancer Syndromes: Clues to the Origin and Nature of Cancer. *Science*, 278: 1043-1050.
- FERNANDEZ, H.A., KALLENBACH, K., SEGHEZZI, G., GROSSI, E., COLVIN S., SCHNEIDER, R., MIGNATTI, P. and GALLOWAY, A. 1999. Inhibition of Endothelial Cell Migration by Gene Transfer of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1. *Journal of Surgeon Research*, 82: 156-162.
- FOLGUERAS, A.R., PENDAS, A.M., SANCHEZ, L.M. and LOPEZ-OTIN, C. 2004. Matrix Metalloproteases in Cancer: From New Functions to Improved Inhibition Strategies. *International Journal of Developmental Biology*, 48: 411-424.
- FOLKMAN, J. 1971. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *The New England Journal of Medicine*, 285: 1182-1186.
- FOLKMAN, J. 1990. What is the Evidence That Tumors Are Angiogenesis Dependent. *Journal of the National Cancer Institute*, 82: 4-6.
- FOLKMAN, J. and INGBER, D. 1992. Inhibition of Angiogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 3: 89-96.
- FRANKS, M.E., MACPHERSON, G.R. and FIGG, W.D. 2004. Thalidomide. *Lancet*, 363: 1802-1811.
- FRIESEL, R. KOMORIYA, A. MACIAG, T. 1987. Inhibition of endothelial cell proliferation by gamma-interferon. *The Journal of Cell Biology*, 104: 689-696.
- FRIESS, H., ZHU, Z., LIARD V., SHI, X., SHRINKHANDE, S.V., WANG, L., LIEB, K., KORC, M., PALMA, C., ZIMMERMANN, A., REUBI, J.C. and BUCHLER, M.W. 2003. Neurokinin-1 Receptor Expression and Its Potential Effects on Tumor Growth in Human Pancreatic Cancer. *Laboratory Investigation*, 83: 731–742.

- FRISCH, S.M. and SCREATON, R.A. 2001. Anoikis Mechanisms. *Current Opinion Cell Biology*, 13: 555–562.
- FUJII, T., TACHIBANA, M., DHAR, D.K., UDEA, S., KINUGASA, S. and YOSHIMURA, H. 2003. Combination Therapy with Paclitaxel and Thalidomide Inhibits Angiogenesis and Growth of Human Colon Cancer Xenograft in Mice. *Anti-Cancer Research*, 23: 2405-2411.
- FUJITA, K. ASAMI, Y. TANAKA, K. AKITA, M. MERKER, H.J. 2004. Anti-angiogenic effects of thalidomide: expression of apoptosis-inducible active caspase-3 in a three-dimensional collagen gel culture of aorta. *Histochemical Cell Biology*, 122: 27-33.
- FUKAMI, S., WATANABE, K., IWATA, N., HARAOKA, J., LU, B., GERARD, N.P., GERARD, C., FRASER, P., WESTAWAY, D., GEORGE-HYSLOP, P. and SAIDO, T.C. 2002. A $\beta$ -Degrading Endopeptidase, Neprilysin, in Mouse Brain: Synaptic and Axonal Localization Inversely Correlating with A $\beta$  Pathology. *Neuroscience Research*, 43: 39-56.
- FURUSE, K., FUKUOKA, M.K., NISHIKAWA, H., TAKADA, Y., KUDOH, S., KATAGAMI, N. and ARIYOSHI, Y. 1999. A Phase III Study of Concurrent Versus Sequential Thoracic Radiotherapy in Combination with Mitomycin, Vindesine, and Cisplatin in Unresectable Stage III non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 17: 2692–2699.
- GAVRIELI, Y., SHERMAN, Y. and SASSON, S.A.B. 1992. Identification of Programmed Cell Death in Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. *The Journal of Cell Biology*, 119: 493-501.
- GEITZ, H., HANDT, S. and ZWINGENBERGER, K. 1996. Thalidomide Selectively Modulates The Density of Cell Surface Molecules, Involved in The Adhesion Cascade. *Immunopharmacology*, 31: 213-221.
- GIDLEY, D.S., LOREDO, L.N., SLATER J.D., ARCHAMBEAU, J.O., BEDROS, A.A., ANDRES, M.L. and SLATER, J.M. 1998. Pilot Evaluation of Cytokine Levels in Patients Undergoing Radiotherapy for Brain Tumor. *Cancer detection and prevention*, 22: 20-29.
- GOCKEL, H.R., LU, A., HEIDEMANN, J., SCHMIDT, M., DOMSCHKE, W., KUCHARZIK, T. and LU, N. 2004. Thalidomide Induces Apoptosis in Human Monocytes by Using a Cytochrome c-Dependent Pathway. *The Journal of Immunology*, 172: 5103–5109.
- GONZALEZ MOLES, M.A., ESTEBAN, F., RUIZ-AVILA, I., GIL MONTOYA, J.A., BRENER, S. A., BASCONES-MARTINEZ, A. and MUNOZ, M. 2009. A Role For The Substance P/ NK-1 Receptor Complex in Cell Proliferation and Apoptosis in Oral Lichen Planus, *Oral Diseases*, 15: 162–169.

- GORSKI, D.H., BECKETT, M.A., JASKOWIAK, N.T., CALVIN, D.P., MAUCERI, H.J., SALLOUM, R.M., SEETHARAM, S., KOONS, A., HARI, D.M., KUFE, D.W. and WEICHSELBAUM, R.R. 1999. Blockage of the Vascular Endothelial Growth Factor Stress Response Increases the Antitumor Effects of Ionizing Radiation. *Cancer Research*, 59: 3374–3378.
- GRIFFIN, R.J., WILLIAMS, B.W., WILD, R., CHERRINGTON, J.M., PARK, H. and SONG, C.W. 2002. Simultaneous Inhibition of The Receptor Kinase Activity of Vascular Endothelial, Fibroblast, and Platelet-Derived Growth Factors Suppresses Tumor Growth and Enhances Tumor Radiation Response. *Cancer Research*, 62: 1702–1706.
- GUPTA, M.K. and Ren-Yi, Q. 2003. Mechanism and Its Regulations of Tumor-Induced Angiogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 9: 1144-1155.
- HALL, R.J. and ERICKSON, C.A. 2003. ADAM 10: An Active Metalloprotease Expressed During Avian Epithelial Morphogenesis. *Developmental Biology*, 256: 146-159.
- HAURA, E.B. 2001. Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Review of Current Randomized Clinical Trials and an Examination of Emerging Therapies. *Cancer Control*, 8: 4-6.
- HANAHAN, D. and WEINBERG, R.A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100: 57-70.
- HARRISON, L. and Blackwell K. 2001. Hypoxia and Anemia: Factors in Decreased Sensitivity to Radiation Therapy and Chemotherapy?, *The Oncologist*, 9: 31-40.
- HEASLEY, L.E. 2001. Autocrine and Paracrine Signaling Through Neuropeptide Receptors in Human Cancer. *Oncogene*, 20: 1563-1569.
- HERRISON, S. and GEPPETTI, P. 2001. Substance P. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33: 556-576.
- HERSKOVIĆ, A., MARTZ, K., AL-SARRAF, M., LEICHMAN, L., BRINDLE, J., VAITKEVICIUS, V., COOPER, J., BYHARDT, R., DAVIS, L. And EMAMI, B. 1992. Combined Chemotherapy and Radiotherapy Compared with Radiotherapy Alone in Patients with Cancer of the Esophagus. *The New England Journal of Medicine*, 326: 1593–1598.
- HEEMST, D.V., REIJER, P.M. and WESTENDORP, R.G.J. 2007. Ageing or Cancer: A Review on The Role of Caretakers and Gatekeepers. *European Journal of Cancer*, 43: 2144–2152.

- HESS, C., VUONG, V., HEGYI, I., RIESTERER, O., WOOD, J., FABBRO, D., GLANZMAN, C., BODIS, S. and PRUSCHY, M. 2001. Effect of VEGF Receptor Inhibitor PTK787/ZK222584 [correction of ZK222548] Combined with Ionizing Radiation on Endothelial Cells and Tumour Growth. *British journal of cancer*, 85: 2010–2016.
- HOJILLA, C.V., WOOD, G.A. and KHOKHA, R. 2008. Metalloproteinases as Common Effectors of Inflammation and Extracellular Matrix Breakdown in Breast Cancer. *Breast Cancer Research*, 10: 205.
- HORTOBAGYI, G.N. and BUZDAR, A.U. 1995. Current Status of Adjuvant Systemic Therapy for Primary Breast Cancer: Progress and Controversy CA. *A Cancer Journal for Clinicians*, 45: 199-226.
- HUANG, S.M., LI, J., ARMSTRONG, E.A. and HARARI, P.M. 2002. Modulation of Radiation Response and Tumor-Induced Angiogenesis After Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition by ZD1839 (Iressa). *Cancer Research*, 62: 4300–4306.
- INGBER, D.E. 2008. Can cancer be reversed by engineering the tumor microenvironment. *Seminars in Cancer Biology*, 18: 356–364.
- IWATA, N., MIZUMAKI, H., SHIROTANI, K., TAKAKI, Y., MURAMATSU, S.I., LU, B., GERARD, N.P., GERARD, C., OZAWAKA, K. and SAIDO, T.C. 2004. Presynaptic Localization of Neprilysin Contributes to Efficient Clearance of Amyloid- $\beta$  Peptide in Mouse Brain. *The Journal of Neuroscience*, 24: 998-991.
- JAIN, R.K. 2001. Normalizing Tumor Vasculature with Anti-Angiogenic Therapy: A New Paradigm for Combination Therapy. *Nature Medicine*, 7: 987-989.
- JOHNSON, M.D., KIM, H.R. and CHESLER, L. 1994. Inhibition of Angiogenesis by Tissue Inhibitor of Metalloproteinase. *Journal of Cellular Physiology*, 160: 194-202.
- KAICKER, S., MCCRUDDEN, K.W., BEEK, L., NEW, T., HUANG, J. and FRISCHER, J.S. 2003. Thalidomide is Anti-angiogenic in A Xenograft Model of Neuroblastoma. *International Journal of Oncology*, 22: 1651-1655.
- KERBEL, R. and FOLKMAN J. 2002. Clinical Translation of Angiogenesis Inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, 2: 727-739.
- KIM, E., MOORE, J., HUANG, J., SOFFER, S., MANLEY, C.A., OTOOLE, K., MIDDLESWORTH, W., STOLAR, C.J., KANDEL, J.J. and YAMASHIRO, D.J. 2001. All Angiogenesis is Not The Same: Distinct Patterns of Response to Antiangiogenic Therapy in Experimental

Neuroblastoma and Wilms' Tumor. *Journal of Pediatric Surgery*, 36: 287-290.

- KLEMENT, G., BARUCHEL, S., RAK, J., MAN, S., CLARK, K., HICKLIN, D.J., BOHLEN, P. and KERBEL, R.S. 2000. Continuous Low-Dose Therapy with Vinblastine and VEGF Receptor-2 Antibody Induces Sustained Tumor Regression Without Overt Toxicity. *The Journal of Clinical Investigation*, 105: 105-115.
- KOZIN, S.V., BOUCHER, Y., HICKLIN, D.J., BOHLEN, P., JAIN, R.K. and SUIT, H.D. 2001. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2-Blocking Antibody Potentiates Radiation-Induced Long-Term Control of Human Tumor Xenografts. *Cancer Research*, 61: 39-44.
- KVOLS, K.L. 2005. Radiation Sensitizers: A Selective Review of Molecules Targeting DNA and non-DNA Targets. *The Journal Of Nuclear Medicine*, 46: 187-190.
- LAMMICH, S., KOJRO, E., POSTINA, R., GILBERT, S., PFEIFFER, M., JASIONOWSKI, H.C. and FAHRENHOLZ, F. 1999. Constitutive and Regulated Alpha-secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by a Disintegrin Metalloprotease. *Proceedings of the National Academy of Science*, 96: 3922-3927.
- LEE, C.G., HEIJN, M., DI TOMASSO, E., GRIFFON-ETIENNE, G., ANCIUKIEWICZ, M., KOIKE, C., PARK, K.R., FERRARA, N., JAIN, R.K., SUIT, H.D. and BOUCHER, Y. 2000. Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment Augments Tumor Radiation Response Under Normoxic or Hypoxic Conditions. *Cancer Research*, 60: 5565-5570.
- LIIZUMI, M., LIU, W., PAI, S.K., FURUTA, E. and WATABE, K. 2008. Drug Development Against Metastasis-Related Genes and Their Pathways: A Rationale for Cancer Therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1786: 87-104.
- LU, J., HELSBY, N., PALMER, B.D., TINGLE, M., BAUGLEY, B.C. and KESTELL, P. 2004. Metabolism of Thalidomide in Liver Microsomes of Mice, Rabbits and Humans. *Journal of Pharmacological Experimental Therapy*, 310: 571-577.
- LUO, W., SHARIF, T.R. and SHARIF, M. 1996. Substance P-Induced Mitogenesis in Human Astrocytoma Cells Correlates With Activation of The Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Pathway. *Cancer Research*, 56: 4983-4991.
- LUND, E.L., BASTHOLM, L. and KRISTJANSEN, P.E. 2000. Therapeutic Synergy of TNP-470 and Ionizing Radiation: Effects on Tumor Growth, Vessel

Morphology, and Angiogenesis in Human Glioblastoma Multiforme Xenografts. *Clinical Cancer Research*, 6: 971–978.

- MACDONALD, J.S., SMALLEY, S.R., BENEDETTI, J., HUNDAHL, S.A., ESTES, N.C., STEMMERMANN, G.N., HALLER, D.G., AJANI, J.A., GUNDERSON, L.L., JESSUP, J.M. and MARTENSON, J. A. 2001. Chemoradiotherapy After Surgery Compared with Surgery Alone for Adenocarcinoma of the Stomach or Gastroesophageal Junction. *The New England Journal of Medicine*, 345: 725–730.
- MAKIN, G. and HICKMAN, J.A. 2000. Apoptosis and Cancer Chemotherapy. *Cell Tissue Research*, 301: 143–152.
- MAREEL, M. and LEROY, A. 2003. Clinical, Cellular, and Molecular Aspects of Cancer Invasion. *Physiological Review*, 83: 337–376.
- MARX, M.G., SHI, J., FRY, M.O., XIAO Z., TRZYNA, M., POKALA, V., IHNAT, M.A. and LI, P.K. 2002. Effects of Putative Hydroxylated Thalidomide Metabolites on Blood Vessel Density in the Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay and on Tumor and Endothelial Cell Proliferation. *Biological Pharmacology Bulletin*, 25: 597-604.
- MCELWAIN, T. J. 1973. Chemotherapy in Colorectal Cancer. *Proc R Soc Med.*, 66: 1187–1189.
- MCHUGH, S.M., RIFKIN, I.R., DEIGHTON, J., WILSON, A.B., LACHMANN, P.J. and LOCKWOOD, C.M. 1995. The Immunosuppressive Drug Thalidomide Induces T Hepler Cell Type 2 (Th2) and Concomitantly Inhibits Th1 Cytokine Production in Mitogen- and Antigen-Stimulated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell Cultures. *Clinical Experimental Immunology*, 99: 160-167.
- MILLER, K., SWEENEY, C. And SLEDGE, G. 2001. Redefining the Target: Chemotherapeutics as Antiangiogenics. *Journal of Clinical Oncology*, 19: 1195–1206.
- MILLICHIP, M.I., DALLAS, D.J., WU, E., DALE, S. and MCKIE, N. 1998. The Metallo-Disintegrin ADAM10 (MADM) From Bovine Kidney has Type IV Collagenase Activity in Vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 245: 594-598.
- MOCHIZUKI, S. and OKADA, Y. 2007. ADAMs in Cancer Cell Proliferation and Progression. *Cancer Sciences*, 98: 621-628.
- MOSES, M.A. 1997. The Regulation of Nevascularization of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors. *Stem Cells*, 15: 180-189.

- MUNOZ, M., PEREZ, A., COVENAS, R., ROSSO, M. and CASTRO, E. 2004. Antitumoural Action of L-733,060 on Neuroblastoma and Glioma Cell Lines. *Archives Italiennes de Biologie Arch*, 142: 105–112.
- MURATA, R., NISHUMURA, Y. and HIRAOKA, M. 1997. An Antiangiogenic Agent (TNP-470) Inhibited Reoxygenation During Fractionated Radiotherapy of Murine Mammary Carcinoma. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 37: 1107–1113.
- MURPHY, G. and WILLENBROCK, F. 1995. Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases. *Methods Enzymology*, 248: 496-510.
- NAGASE, H. 1997. Activation Mechanisms of Matrix Metalloproteinases. *Biological Chemistry*, 378: 151-160.
- NARULA, J., KHARBANDA, S. and KHAW, B.A. 1997. Apoptosis and the Heart. *Chest*, 112: 1358-1362.
- NEAL, C.P. and BERRY, D.P. 2006. Basic Principles of the Molecular Biology of Cancer II: Angiogenesis, Invasion and Metastasis. *Surgery*, 24: 120-125.
- NG, S.S.W., BROWN, M. and FIGG, W.D. 2002. Thalidomide, an Antiangiogenic Agent With Clinical Activity in Cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56: 194-199.
- NGUYEN, N.P., ANTOINE, J.E., DUTTA, S., KARLSSON, U. and SALAH, S. 2002. Current Concepts in Radiation Enteritis and Implications for Future Clinical Trials. *Cancer*, 95: 1151-1163.
- OEFNER, C., DARCY, A., HENNING, M., WINKLER, F.K. and DALE, G.E. 2000. Structure of Human Neutral Endopeptidase (Nepriylsin) Complexed with Phosphoramidon. *Journal of Molecular Biology*, 296: 341-349.
- OEHLER, M.K. and BICKNELL, R. 2000. The Promise of Anti-Angiogenic Cancer Therapy. *British Journal of Cancer*, 82: 749-752,
- OKAFOR, M.C. 2003. Thalidomide for Erythema Nodosum Leprosum and Other Applications. *Pharmacotherapy*, 23: 481-493.
- OTSUKA, M. and KONISHI, S. 1976. Release of Substance P-Like Immunoreactivity from Isolated Cord of Newborn Rat. *Nature*, 262: 83-84.
- ÖKTEM, S., ÖZHAN, M.H. ve ÖZOL, D. 2001. Apoptozisin Önemi. *Toraks Dergisi*, 2: 91-95.
- PALMA, C., NARDELLI, F., MANZINI, S. and MAGGI, C.A. 1999. Substance P Activates Responses Correlated With Tumour Growth in Human Glioma



- Cells Line Bearing Ttachykinin NK1 Receptors. *British Journal of Cancer*, 79: 236–243.
- PANDYA, N.M., DHALLA, N.S. and SANTANI, D.D. 2006. Angiogenesis-A New Target For Future Therapy. *Vascular Pharmacology*, 44: 265-274.
- PAPAIKOVOU, V.E., BAMIAS, A. and DIMOPOULOS, M.A. 2004. Thalidomide in Cancer Medicine. *Annals of Oncology*, 15: 1151–1160.
- PENBERTHY, D.R., RICH, T.A. and SHELTON C.H. 2001. A Pilot Study of Chronomodulated Infusional 5-Fluorouracil Chemoradiation for Pancreatic Cancer. *Annals Oncology*, 12: 681– 684.
- PREHN, R.T. 1993. Two Competing Influences that May Explain Concomitant Tumor Resistance. *Cancer Research*, 53: 3266-3269.
- PONDER, B.A.J. 2001. Cancer genetics. *Nature*, 411: 336-341.
- QESADA, A.R., MUMOS-CHAPULI, R. and MEDINA, M.A. 2006. Anti-Angiogenic Drugs: from Bench to Clinical Trials. *Medicinal Research Reviews*, 26: 483-530.
- REED, J. 1999. Dysregulation of Apoptosis in Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 17: 2941–2953.
- REED, J.C. 2003. Apoptosis-Targeted Therapies for Cancer. *Cancer Cell*, 3: 17-22.
- RISAU, W. 1997. Mechanisms of Angiogenesis. *Nature*, 386: 671-674.
- ROSEN, L.S. 2002. Clinical Experience With Angiogenesis Signaling Inhibitors: Focus on Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Blockers. *Cancer Control*, 9: 36-44.
- ROSENBERG, G.A. 2009. Matrix Metalloproteinases and Their Multiple Roles in Neurodegenerative Diseases. *Lancet Neurology*, 8: 205-216.
- ROSENDHALL, M.S., KO, S.C., LONG, M.T., BREWER, B., ROSENZWEIG, E., HEDL, L., ANADERSON, S.M., PYLE, J., MORELAND, M.A., MEYERS, T., KOHNO, T., LYONS, D. and LICHENSTEIN H.S. 1997. Identification and Characterization of a Pro-Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Processing Enzyme from the ADAM Family of Zinc Metalloproteases. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 24588-24593.
- ROY, R., ZHANG, B. and MOSES, M.A. 2006. Making the Cut: Protease-Mediated Regulation of Angiogenesis. *Experimental Cell Research*, 312: 608-622.

- RYAN, D.P., COMPTON, C.C. and MAYER, R.J. 2000. Medical Progress: Carcinoma of the Anal Canal. *The New England Journal of Medicine*, 342: 792–800.
- SALO, P., BRAY, R., SEERATTAN, R., RENO C., MCDUGALL, J. and HART, D.A. 2007. Neuropeptides Regulate Expression of Matrix Molecule, Growth Factor and Inflammatory Mediator mRNA in Explants of Normal and Healing Medial Collateral Ligament. *Regulatory Peptides*, 142: 1-6.
- SEALS, D.F. and COURTNEIDGE, S.A. 2003. The ADAMs Family of Metalloproteinases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes & Development*, 17: 7-30.
- SELA, N., ROSENBLUM, G., SHOHAM, T. and SAGI, I. 2009. Structural and Functional Bases for Allosteric Control of MMP activities: Can it pave the path for selective inhibition. *Biochimica et Bioophysica Acta*, Article In Press.
- SEMENZA, G.L. 2001. Regulation of Hypoxia-Induced Angiogenesis: A Chaperone Escorts VEGF to the Dance. *Journal of Clinical Investigation*, 108: 39–40.
- SHIPP, M.A., RICHARDSON, N.E., SAYRE, P.H., BROWN, N.R., MASTELLER, E.L., CLAYTON, L.K., RITZ, J. and REINHERZ, E.L. 1996. Molecular Cloning of the Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen (CALLA) Identifies a Type II Integral Membrane Protein. *Proceedings of the National Academy of Science*, 85: 4819-4823.
- SINGH, R.K., GUTMAN, M., BUCANA, C.D., SANCHEZ, R., LLANSA, N. and FIDLER, I.J. 1995. Interferons Alpha and Beta Down-Regulate The Expression of Basic Fibroblast Growth Factor in Human Carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 4562-4566.
- SINGH, D., JOSHI, D.D., HAMEED, M., QIAN, J., GASCON, P., MALOOF, P.B., MOSENTHAL, A. and RAMESHWAR, P. 2000. Increased Expression of Preprotachykinin-I and Neurokinin Receptors in Human Breast Cancer Cells: Implications for Bone Marrow Metastasis. *Proceedings of the National Academy of Science*, 97: 388–393.
- SOINI, Y., PAAKKO, P. and LEHTO, V.P. 1998. Histopathological Evaluation of Apoptosis in Cancer. *American Journal of Pathology*, 153: 1043-1049.
- SOOD, A.K., SEFTOR, E.A., FLETCHER, M.S., GARDNER, L.M.G., HEIDGER, P.M., BULLER, R.E., SEFTOR, R.E.B. and HENDRIX, M.J.C. 2001. Molecular Determinants of Ovarian Cancer Plasticity. *American Society for Investigative Pathology*, 158: 1279-1288.

- STRIETER, R.M., POLVERINI, P.J., KUNKEL, S.L., ARENBERG, D.A., BURDICK, M.D., KASPER, J., DZUIBA, J., VAN DAMME, J., WALZ, A. and MARRIOT, D. 1995. The Functional Role of the ELR Motif in CXC Chemokine-Mediated Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 27348-27357.
- SUMNER, S.C., GALLAGHER, K.S., DAVIS, D.G., COVELL, R.L., JERNIGAN, R.L. and FERETTI, J.A. 1990. Conformational Analysis of the Tachykinins in Solution: Substance P and Physalaemin. *The Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 8: 687-707.
- TEICHER, B.A., SOTOMAYOR, E.A. and HUANG, Z.D. 1992. Antiangiogenic Agents Potentiate Cytotoxic Cancer Therapies Against Primary and Metastatic Disease. *Cancer Research*, 52: 6702-6704.
- TEICHER, B.A., HOLDEN, S.A., ARA, G., DUPUIS, N.P., LIU, F., YUAN, J., IKEBE, M. and KAKEJI, Y. 1995. Influence of An Anti-Angiogenic Treatment on 9L Gliosarcoma: Oxygenation and Response to Cytotoxic Therapy. *International Journal of Cancer*, 61: 732-737.
- TEO, S.K. 2005. Properties of Thalidomide and its Analogues: Implications for Anticancer Therapy. *The AAPS Journal*; 7: 1-8.
- THOMAS, G.M. 1999. Improved Treatment for Cervical Cancer: Concurrent Chemotherapy and Radiotherapy. *The New England Journal of Medicine*, 340: 1198-1200.
- THOMAS, J.P., ARZOOMANIAN, R.Z., ALBERTI, D., MARNOCCHA, R., LEE, F., FRIEDL, A., TUTSCH, K., DRESEN, A., GEIGER, P., PLUDA, J., FOGLER, W., SCHILLER, J.H. and WILDING, G. 2003. Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of Recombinant Human Endostatin in Patients With Advanced Solid Tumors. [\*Journal of Clinical Oncology\*](#), 21: 223-231.
- TSENG, S., PAK, G., WASHENIK, K., POMERANZ, M.K. and SHUPACK, J.L. 1996. Rediscovering Thalidomide: A Review of Its Mechanism of Action, Side Effects, and Potential Uses. *J.Am. Acad. Dermatol*, 35: 969-979.
- TURNER, A.J. and HOOPER, N.M. 2002. The Angiotensin-Converting Enzyme Gene Family: Genomics and Pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23: 177-183.
- VANDEPUTTE-RUTTEN, and L. GROS, P. 2002. Novel Proteases: Common Themes and Surprising Features. *Current Opinion in Structural Biology*, 12: 704-708.

- VAN WART, H.E. and BIRKEDAL-HANSEN, H. 1990. The Cysteine Switch: A Principle of Regulation of Metalloproteinase Activity With Potential Applicability to The Entire Matrix Metalloproteinase Gene Family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87: 5578-5582.
- WACHSBERGER, P., BURD, R. and DICKER, A.P. 2003. Tumor Response to Ionizing Radiation Combined with Antiangiogenesis or Vascular Targeting Agents: Exploring Mechanisms of Interaction. *Clinical Cancer Research*, 9: 1957-1971.
- WARFEL, N.A., LEPPER, E.R., ZHANG, C., FIGG, W.D. and DENNIS, A.P. 2006. Importance of The Stress Kinase p38A in Mediating the Direct Cytotoxic Effects of the Thalidomide Analogue, CPS49, in Cancer Cells and Endothelial Cells. *Clinical Cancer Research*, 12: 3502-3509.
- WEINBERG, R.A. 1996. How Cancer Arises. *Scientific American Magazine*, 70: 62-70.
- WEIR, B., ZHAO, X. and MEYERSON, M. 2004. Somatic Alterations in The Human Cancer Genome. *Cancer Cell*, 6(5):433-438.
- WISEMAN, B.S. and WERB, Z. 2002. Stromal Effects on Mammary Gland Development and Breast Cancer. *Sciences*, 296: 1046-1049.
- WOESSNER, J.F. 2001. That Impish TIMP: The Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-3. *Journal of Clinical Investigations*, 108: 799-800.
- WYLLIE, A.H. 1986. What is apoptosis?. *Histopathology*, 10: 995-998.
- YABU, T., TOMIMOTO, H., TAGUCHI, Y., YAMAOKA, S., IGARASHI, Y. and OKAZAKI, T. 2005. Thalidomide-Induced Anti-Angiogenicaction is Mediated by Ceramide Through Depletion of VEGF Receptors, and Antagonized by Sphingosine-1-Phosphate. *Blood*, 106: 125-134.
- YAMAZAKI, K., MIZUI, Y. and TANAKA, I. 1997. Radiation Hybrid Mapping of Human ADAM10 Gene to Chromosome 15. *Genomics*, 45: 457-459.
- ZHENG, A.Q., SONG, X.R., YU, J.M., WEI, L. and WANG, X.W. 2005. Liposome Transfected to Plasmid-Encoding Endostatin Gene Combined with Radiotherapy Inhibits Liver Cancer Growth in Nude Mice. *World Journal Of Gastroenterology*, 11(28): 4439-4442.
- ZHENG, T.S., SCHLOSSER, S.F., DAO, T., HINGORANI, R., CRIPSE, I.N., BOYER, J.L. and FLAVELL, R.A. 1998. Caspase-3 Controls Both Cytoplasmic and Nuclear Events Associated with Fas-Mediated Apoptosis in Vivo. *Cell Biology*, 95: 13618-13623.

ZORNIG, M., HUEBER, A.O., BAUM, W. and EVAN, G. 2001. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1551: 1-37.

## ÖZGEÇMİŞ

Ece ŞİMŞEK ÖZ, 1978 yılında Adana’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini İstanbul’da tamamladıktan sonra 1995 yılında Yozgat Anadolu Lisesinden mezun oldu. 1996 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde başladığı lisans öğrenimini, 2001 yılında tamamladı. Aynı yıl Yüksek lisans öğrenimine başladığı Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı’na Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2004 yılında başladığı Doktora öğrenimine devam eden Ece ŞİMŞEK ÖZ, halen Araştırma Görevlisi olarak görevini sürdürmektedir.