

**KUÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER
KANSERİ HÜCRE HATTINDA (A549) YENİ
BİR TIROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRÜ OLAN
PAZOPANİBİN (GW786034)
ANTIANGİYOJENİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Bio. Buket Demirtaş

Yüksek Lisans Tezi

**KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER
KANSERİ HÜCRE HATTINDA (A549)
YENİ BİR TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRÜ
OLAN PAZOPANİBİN (GW786034)
ANTİANJİYOJENİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Bio. Buket Demirtaş

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji Anabilim Dalı

Eskişehir, Haziran 2013

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Miriş DİKMEN

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No. 1207S119).

Jüri ve Enstitü Onayı

Buket Demirtaş'ın ‘‘Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Hücre Hattında (A549) Yeni Bir Tirozin Kinaz İnhibitörü Olan Pazopanibin (GW786034) Antianjiyojenik Etkilerinin Araştırılması’’başlıklı, Farmakoloji Anabilim Dalı'ndaki Yüksek Lisans tezi, 27.06.2013 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Doç. Dr. Miriş DİKMEN Anadolu Üniversitesi
Üye	Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK Anadolu Üniversitesi
Üye	Prof. Dr. Kevser EROL Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Buket Demirtaş
Doğum Tarihi ve yeri : 10.05.1988, Gölcük
Uyruğu : T.C.
Medeni Durumu : Bekar
İletişim Adresi : Vişnelik Mah. Hacer Hanım Apt. No:195
Kat:5 Daire: 21 ESKİŞEHİR
Telefon : +90533 3849020
e-Posta : buketdemirtas@anadolu.edu.tr

Eğitim Durumu

İlköğretim : Yahya Kaptan İlköğretim Okulu-
Kocaeli, 2002
Lise : Atılım Lisesi, Kocaeli, 2005
Lisans : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen
Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2010
Yabancı Dil : İngilizce

Yayımlar

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1. Dikmen M., **Demirtaş B.**, Engür S. Cytotoxic Effect of Angiogenesis Inhibitor Fumagillin on C6 Glioma Cells. 2nd International Congress on Neurobiology, Psychopharmacology and Treatment Guidance, Thessaloniki Greece, pp 173-174, November 24-27, 2011.
2. **B. Demirtaş**, M. Dikmen. Evaluated of Anti-Cancerogenic Effects of Pazopanib, A New Tyrosine Kinase Inhibitor, on A549 Lung Cancer Cell Line. 1st International Congress on Controversies in Personalized Oncology (CONPO) Breast, Colon, Lung and Melanoma, Barcelona, Spain, March 7-10, 2013.
3. M. Dikmen, S. Engür, **B. Demirtaş**, Z. Cantürk, Y. Öztürk. The Cytotoxic Effects of Griseofulvin on Colon Adenocarcinoma Cell Line (Caco-2) Using MTT Assay and Xcelligence Technology.1st International Congress on Controversies in Personalized Oncology (CONPO) Breast, Colon, Lung and Melanoma, Barcelona, Spain, March 7-10, 2013.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1. Miriş Dikmen, Selin Engür, **Buket Demirtaş**, Yusuf Öztürk. “Antidepresan Bir İlaç Olan Essitalopram’ın MCF7 İnsan Meme Kanseri Hücrelerinde Antikanserijenik Etkileri” Türk Farmakoloji Derneđi 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi, p74, Eskişehir, Türkiye 19-22 Ekim, 2011.

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Kulübü

Türkiye Biyologlar Derneđi

Moleküler Kanseri Araştırma Derneđi (MOKAD)

The European Association for Cancer Research (EACR)

PROJELER

‘Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Hücre Hattında (A549) Yeni Bir Tirozin Kinaz İnhibiyörü Olan Pazopanibin (GW786034) Antianjiyojenik Etkilerinin Araştırılması’ Yüksek Lisans Tez Projesi (Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi)

Katılan kurslar ve eğitim programları

1. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi (23-27 Haziran 2008), TRABZON
2. 1.Ulusal Biyoteknoloji Öğrenci Kongresi (8-10 Mayıs 2009), İSTANBUL
3. Türk Farmakoloji Derneđi 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi (19-22 Ekim 2011), ESKİŞEHİR
4. 2nd International Congress on Neurobiology, Psychopharmacology and Treatment Guidance (24-27 November 2011), Thessaloniki, GREECE
5. DNA ve RNA Tabanlı Moleküler Yöntemler Çalıştayı (25-26 Nisan 2012), EDİRNE
6. Yaşam Bilimlerinde Multidisipliner AR-GE ve İnovasyon Sempozyumu (15-17 Haziran 2012), İSTANBUL
7. 1.Öngörüşel ve Bireye Özgü Tedavinin Günümüz Modern Tıp ve Eczacılık Pratiđinde Uygulamaları Sertifika Programı (P4) (13-16 Eylül 2012), ESKİŞEHİR
8. Sıfırın Altında Marketing’12 (22-23 Aralık 2012), ESKİŞEHİR
9. 1st International Congress on Controversies in Personalized Oncology (CONPO) Breast, Colon, Lung and Melanoma, (7-10 March 2013) Barcelona, SPAIN

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her türlü çalışma olanağını sağlayarak hücre kültürünü bana sevdiren ve bilimsel olarak kattığı yardımların dışında, hayatımda çok önemli bir yeri olan ve fikirlerine her zaman ihtiyaç duyacağım değerli hocam Sayın Doç. Dr. Miriş DİKMEN'e;

Farmakoloji'yi bana öğreten ve lisansüstü eğitimim boyunca bana destek olan Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK'e ve Farmakoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Süleyman AYDIN, Yard. Doç. Dr. Özgür Devrim CAN, Yard. Doç. Dr. Rana ARSLAN, Yard. Doç. Dr. Nurcan Bektaş TÜRKMEN ve Yard. Doç. Dr. Ümide DEMİR ÖZKAY'a;

Tecrübelerini, bilgisini benimle paylaşan ve her aşamada önerileriyle bana yol gösteren Farmasötik Mikrobiyoloji ABD Öğretim Görevlisi sevgili hocam Zerrin KAHRAMAN CANTÜRK'e;

Eskişehir'e adım attığım ilk günden beri yanımda olan, 7 yıl boyunca gerek birlikte güzel adımlar attığımız gerekse zorlukların üstesinden beraber geldiğimiz dostum Biyolog Selin ENGÜR'e;

Eczacılık Fakültesinde geçirdiğim süre boyunca birlikte olduğum ve yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Nazım ÇALIŞKAN, Kemal Can DEMİRKILINÇ, Umut İrfan ÜÇEL, Mehmet Emre ÖZDEMİRHAN, Şafak ULUSOY, Sema KOYUTÜRK, Murat KOZANLI, Elif KAYA ve Ar. Gör. Ayça ÇAKMAK'a;

Bu tez çalışmama yapmış olduğu finansal destek için Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na,

Özellikle zor anlarımda benden yardımlarını esirgemeyen kuzenim Gizem BENER ve ev arkadaşım Nazlı TAŞKAN'a;

Beni daima anlayışla karşılayan ve destek olan, en zor zamanlarda bile gülümsetmeyi başaran, sevgili nişanlım Onur YALMAN'a;

Eğitimim boyunca her aşamayı benimle beraber atlatan, sonsuz ve koşulsuz sevgilerini, emeklerini, sabırlarını, desteklerini ve tüm imkanlarını bana sunan, huzurlu ve sevgi dolu bir hayat sürmemi sağlayan babam Orhan DEMİRTAŞ'a, annem Sevil DEMİRTAŞ'a ve kardeşim Ata DEMİRTAŞ'a;

Sonsuz teşekkür ederim...

Buket DEMİRTAŞ

Haziran, 2013

KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTINDA (A549) YENİ BİR TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRÜ OLAN PAZOPANİBİN (GW786034) ANTİANJİYOJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Akciğer kanseri, yirminci yüzyılın başlarında ender olmasına karşın, günümüzde görülme sıklığı artan, önemli bir sağlık problemidir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) akciğer kanserinin agresif bir türüdür. Günümüzde yeni ve daha etkili ajanların kullanılmasıyla, kanser tedavisinde yeni çalışmalar yapılmaktadır. Anjiyojenik ve antianjiyojenik faktörlerin dengesinin bilinmesi gelecekte akciğer kanseri gibi tümörlerde yeni bir tedavi seçeneği gündeme getirecektir. Kanser gelişmesinde; hücre çoğalması, tümör yayılımı, metastazı gibi süreçler aktive olmuş tirozin kinaz reseptörünün tetiklediği sinyal yolları tarafından yönetilir. Pazopanib (GW786034), VEGFR-1,-2,-3, PDGFR ve c-Kit reseptörlerine karşı aktivite gösteren çok hedefli bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Son zamanlarda ilerlemiş renal hücreli karsinom (RCC) tedavisi için FDA tarafından pazopanibin klinik kullanımını onaylanmıştır.

Bu tez çalışmasında, bir tirozin kinaz inhibitörü olan pazopanibin, antianjiyojenik etkileri insan akciğer kanseri (A549) ve insan umbilikal ven endotel hücre (HUVEC) hattında *in vitro* yöntemler ile araştırılmıştır. Pazopanib konsantrasyonlarının (2.5, 25, 50, 100, 200 μ M) sitotoksik etkileri, mitokondriyal aktivite düzeylerinde MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) yöntemi ile belirlenmiştir. Antiproliferatif etkiler, Gerçek Zamanlı Hücre Analiz (RTCA DP) Sistemi kullanılarak hücre indeks değerlerindeki değişikliklere göre değerlendirilmiştir. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) miktarları ELİZA ve VEGF mRNA ekspresyonlarında real-time PCR yöntemi ile araştırılmıştır.

Çalışmanın sonucunda, zamana ve konsantrasyona bağlı olarak pazopanib, A549 ve HUVEC hücrelerinde hücre proliferasyonunda, invazyon ve migrasyonu ile VEGF miktarlarında önemli düzeyde azalma yapmıştır. RTCA DP Sisteminde A549 hücreleri üzerinde pazopanibin IC₅₀ değeri 24. saatte 51.6 μ M olarak analiz edilmiştir.

Bu çalışmanın sonucunda, pazopanibin A549 hücreleri üzerinde önemli antiproliferatif ve antianjiyojenik etkilere sahip olduğunu HUVEC hücreleri ile karşılaştırmalı olarak belirledik. Bir tirozin kinaz inhibitörü olan pazopanibin akciğer kanser kemoterapisi için potansiyel bir ajan olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: anjiyojenez, VEGF, tirozin kinaz, pazopanib, A549

INVESTIGATION OF A NEW TYROSINE KINASE INHIBITOR OF PAZOPANIB (GW786034) ANTI-ANGIOGENIC EFFECTS ON NON-SMALL CELL LUNG CANCER CELL LINE (A549)

ABSTRACT

Lung cancer, although rare in the early twentieth century, today it's a major health problem that is rising in number of incidence. Non-small cell lung cancer (NSCLC) is a particularly aggressive type of cancer. Thanks to new and more efficient agents, new researches have been done nowadays. Balance of angiogenic and anti-angiogenic factors will bring new treatment ways to tumors like lung cancer. Activated tyrosine kinase receptor is responsible of signal transduction in cancer development that is composed of cell proliferation, tumor invasion and metastasis respectively. Pazopanib (GW786034) is inhibitor of tyrosine kinase receptors that are VEGFR-1,-2,-3, PDGFR and c-Kit. Recently, FDA clinically has approved usage of pazopanib against renal cell carcinoma (RCC).

In this study, anti-angiogenic effects of tyrosine kinase inhibitor pazopanib were evaluated *in vitro* in human lung cancer cell line (A549) and human umbilical ven endothelial cell line (HUVEC). Cytotoxic effects of different pazopanib concentrations (2.5, 25, 50, 100, 200 μM) were determined by MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) method. Antiproliferative effects were evaluated by real time cell analysis (RTCA DP) system according to changing in cell index values. ELISA was used to measured vascular endothelial growth factor (VEGF) and real-time PCR method was used to determined VEGF mRNA expression.

Our results show that pazopanib depending on time and concentration decreases the amount of VEGF and cell proliferation due to invasion and migration in A549 and HUVEC cells. RTCA DP system results show that IC_{50} values of pazopanib at 24 hours was analyzed as 51.6 μM in A549 cells.

As a result of our studies, pazopanib has important antiproliferative and anti-angiogenic effects on A549 cells according to results of HUVEC cells. It shows that pazopanib as a tyrosine kinase receptor inhibitor might be potential agent for lung cancer chemotherapy.

Key Words: angiogenesis, VEGF, tyrosine kinase, pazopanib, A549

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	2
Kanser Hücrelerinin Özellikleri	2
<i>Bölünme sinyallerinin üretimi</i>	3
<i>Kontakt inhibisyonunun yokluğu</i>	3
<i>Sınırsız bölünme potansiyeli</i>	4
<i>Apoptozisten kaçış</i>	4
İnvazyon ve Metastaz	4
AKCİĞER KANSERİ	5
ANJİYOJENEZ	6
Yeni Kapiler Damar Oluşumu	7
<i>Bazal membranın proteolitik enzimler tarafından yıkılması</i>	7
<i>Endotel hücrelerde göç ve çoğalma</i>	8
<i>Kapiller oluşumu ve damar olgunlaşması</i>	8
Tümör Anjiyojenezi ve Metastaz	8
Anjiyojenezin Moleküler Mekanizması	9
TİROZİN KİNAZ RESEPTÖRLERİ	11
Tirozin Kinaz Reseptörlerinin Yapısı ve Aktivasyonu	11
<i>Ras/Raf/MEK/ERK sinyal iletim yolu</i>	13
VASKÜLER ENDOTEL BÜYÜME FAKTÖRÜ	15
VEGF RESEPTÖRLERİ	16
TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİ	17
Pazopanib	18
GEREÇLER	20

Kullanılan Kimyasal Maddeler	20
Kullanılan Malzemeler	20
Kullanılan Cihazlar	21
YÖNTEMLER	22
Deneylerde Kullanılan Hücreler	22
Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması	22
<i>Kullanılan malzemelerin steril edilmesi</i>	22
<i>Pazopanib konsantrasyonlarının hazırlanması</i>	22
Hücre Kültürü Çalışmaları	22
<i>Hücre sayımları</i>	23
MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi	23
<i>Metodun uygulanması</i>	24
Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) Kullanılarak Hücre Proliferasyonunun Elektriksel Empedans Tekniği ile Belirlenmesi	24
<i>Hücre proliferasyonunun belirlenmesi</i>	25
Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA DP) İnvazyon ve Migrasyonun Belirlenmesi	26
<i>İnvazyon çalışması</i>	26
<i>Migrasyon çalışması</i>	27
<i>İnvazyon ve migrasyon çalışmasının uygulanması</i>	27
Anjiyojenez İlişkili Olarak VEGF Miktarının Belirlenmesi	28
<i>VEGF ELİZA yönteminin uygulanması</i>	28
<i>İstatistiksel değerlendirmeler</i>	29
Real Time-PCR (Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yöntemi ile VEGF mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	29
<i>Metodun uygulanışı</i>	32
<i>Total RNA izolasyonu</i>	32
<i>cDNA sentezi</i>	32
<i>RT-PCR (Real time PCR) ile mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi</i>	32
BULGULAR ve TARTIŞMA	34

Pazopanibin A549 ve HUVEC Hücrelerinde Sitotoksik Etkilerinin MTT Yöntemi ile Değerlendirilmesi	34
Pazopanibin A549 ve HUVEC Hücrelerinde Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) Kullanılarak Belirlenmesi	36
Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde A549 ve HUVEC Hücrelerinin İnvazyon Çalışmaları	41
Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde A549 ve HUVEC Hücrelerinin Migrasyon Çalışmaları	43
A549 ve HUVEC Hücrelerinde Pazopanibin VEGF Üzerine Etkisinin ELİZA Yöntemi ile Belirlenmesi	45
Real Time PCR (RT-PCR) Analizi ile mRNA Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	49
SONUÇ ve ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA	
Şekil 1	Kanser İstatistik	6
Şekil 2	Antianjiyojenik Etki Mekanizması	9
Şekil 3	Normal Doku Onarımı ve Tümörlerde Anjiyojenezi Uyaran Ortak Yollar	10
Şekil 4	Reseptör Tirozin Kinazların Aktifleşme Mekanizması	12
Şekil 5	Tirozin Kinaz Reseptörünün Hücre İçi Etki Mekanizması	14
Şekil 6	VEGFA'nın İzofomları	15
Şekil 7	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü Tirozin Kinaz Reseptörlerinin Yapısı	17
Şekil 8	Pazopanib HCL'nin Kimyasal Formülü	19
Şekil 9	RTCA DP Cihazında E-plakalardaki Hücre Sayısının Artışına Bağlı Olarak Hücre İndeks (CI) Değerlerinin Gösterilmesi	25
Şekil 10	İnvazyon Çalışmasında Kullanılan CIM Plaka	26
Şekil 11	İnvazyon ve Migrasyon Çalışmalarında Kullanılan CIM Plakalar	27
Şekil 12	TaqMan Tekniğinin Aşamaları	31
Şekil 13	Pazopanib Konsantrasyonlarının, A549 Hücre Hattında MTT Sonuçlarına Göre 24. Ve 48. Saat % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	34
Şekil 14	Pazopanib Konsantrasyonlarının, HUVEC Hücre Hattında MTT Sonuçlarına Göre 24. ve 48. Saat % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	35
Şekil 15	Pazopanibin A549 Hücreleri Üzerinde Antiproliferatif Etkisinin RTCA DP'de İzlenmesi	37
Şekil 16	Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde Pazopanibin A549 Hücre Hattı Üzerinde 24. Ve 48. Saatteki IC ₅₀ Değerlerinin Analizi	38
Şekil 17	RTCA DP Sisteminde A549 Hücrelerinde Pazopanib Konsantrasyonlarının 24 Saat Sonraki Slope Değerleri	38

Şekil 18	RTCA DP Sisteminde A549 Hücrelerinde Pazopanib Konsantrasyonlarının 48 Saat Sonraki Slope Değerleri	39
Şekil 19	Pazopanibin HUVEC Hücreleri Üzerinde Antiproliferatif Etkisinin RTCA DP’de İzlenmesi	39
Şekil 20	Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde Pazopanibin HUVEC Hücre Hattı Üzerinde 24. ve 48. Saatteki IC ₅₀ Değerlerinin Analizi	40
Şekil 21	RTCA DP Sisteminde HUVEC Hücrelerinde Pazopanib Konsantrasyonlarının 24 Saat Sonraki Slope Değerleri	40
Şekil 22	RTCA DP Sisteminde HUVEC Hücrelerinde Pazopanib Konsantrasyonlarının 48 Saat Sonraki Slope Değerleri	41
Şekil 23	RTCA DP Sisteminde Pazopanib Konsantrasyonları Uygulanan A549 Hücrelerinin İnvazyon Grafiği	41
Şekil 24	RTCA DP Sisteminde Pazopanib Konsantrasyonları Uygulanan A549 Hücrelerinin İnvazyon Slope Grafiği	42
Şekil 25	RTCA DP Sisteminde Pazopanib Konsantrasyonları Uygulanan HUVEC Hücrelerinin İnvazyon Grafiği	42
Şekil 26	RTCA DP Sisteminde Pazopanib Konsantrasyonları Uygulanan HUVEC Hücrelerinin İnvazyon Slope Grafiği	43
Şekil 27	RTCA DP Sisteminde Pazopanib Konsantrasyonları Uygulanan A549 Hücrelerinin Migrasyon Grafiği	43
Şekil 28	RTCA DP Sisteminde Pazopanib Konsantrasyonları Uygulanan A549 Hücrelerinin Migrasyon Slope Grafiği	44
Şekil 29	RTCA DP Sisteminde Pazopanib Konsantrasyonları Uygulanan HUVEC Hücrelerinin Migrasyon Grafiği	44
Şekil 30	RTCA DP Sisteminde Pazopanib Konsantrasyonları Uygulanan HUVEC Hücrelerinin Migrasyon Slope Grafiği	45
Şekil 31	VEGF ve Standartlarının ELİZA’da Ölçülen Absorbans Değerlerine Göre VEGF Miktarları	46
Şekil 32	Pazopanibin 24. Saatte A549 Hücre Hattı Üzerinde VEGF Miktarına Etkisi	47
Şekil 33	Pazopanibin 48. Saatte A549 Hücre Hattı Üzerinde VEGF Miktarına Etkisi	47
Şekil 34	Pazopanibin 24. Saatte HUVEC Hücre Hattı Üzerinde VEGF Miktarına Etkisi	48

Şekil 35	Pazopanibin 48. Saatte HUVEC Hücre Hattı Üzerinde VEGF Miktarına Etkisi	49
Şekil 36	Pazopanib Konsantrasyonları ile (2.5 ve 50 µM) 24 Saat İnkübe Edilen A549 Hücrelerinde VEGFA ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi	50
Şekil 37	Pazopanib Konsantrasyonları ile (2.5 ve 50 µM) 48 Saat İnkübe Edilen A549 Hücrelerinde VEGFA ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi	50
Şekil 38	Pazopanib Konsantrasyonları ile (2.5 ve 50 µM) 24 Saat İnkübe Edilen HUVEC Hücrelerinde VEGFA ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi	51
Şekil 39	Pazopanib Konsantrasyonları ile (2.5 ve 50 µM) 48 Saat İnkübe Edilen HUVEC Hücrelerinde VEGFA ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi	52
Şekil 40	Pazopanib Konsantrasyonları ile 24 Saat İnkübe Edilmiş A549 Hücrelerinde VEGFA Genine Ait Hedef/Referans Oranları	53
Şekil 41	Pazopanib Konsantrasyonları ile 48 Saat İnkübe Edilmiş A549 Hücrelerinde VEGFA Genine Ait Hedef/Referans Oranları	53
Şekil 42	Pazopanib Konsantrasyonları ile 24 Saat İnkübe Edilmiş HUVEC Hücrelerinde VEGFA Genine Ait Hedef/Referans Oranları	54
Şekil 43	Pazopanib Konsantrasyonları ile 48 Saat İnkübe Edilmiş HUVEC Hücrelerinde VEGFA Genine Ait Hedef/Referans Oranları	55

TABLolar DİZİNİ

TABLO NO ve ADI	SAYFA
Tablo 1 VEGF Reseptörleri, Ligandları ve Etkileri	16
Tablo 2 Bazı Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Hedef Yolakları ve FDA Onayları	18
Tablo 3 VEGF Standart Değerleri	29
Tablo 4 MTT Sonuçlarına Göre Pazopanibin A549 Hücre Hattı Üzerindeki % İnhibisyon Değerleri	35
Tablo 5 MTT Sonuçlarına Göre Pazopanibin HUVEC Hücre Hattı Üzerindeki % İnhibisyon Değerleri	36
Tablo 6 Standart Konsantrasyonlarının Absorbans Değerleri	46
Tablo 7 Pazopanib Uygulanan A549 Hücreleri İçin Örnek ve Referans Genlerin RT-PCR Sonunda Elde Edilen Eşik Değerleri (CP)	52
Tablo 8 Pazopanib Uygulanan HUVEC Hücreleri İçin Örnek ve Referans Genlerin RT PCR Sonunda Elde Edilen Eşik Değerleri (CP)	52
Tablo 9 Pazopanib Konsantrasyonları ile İnkübe Edilmiş A549 Hücrelerinde RT-PCR Sonunda Hesaplanan VEGFA Genine Ait Hedef/Referans Oranları	54
Tablo 10 Pazopanib Konsantrasyonları ile İnkübe Edilmiş HUVEC Hücrelerinde RT-PCR Sonunda Hesaplanan VEGFA Genine Ait Hedef/Referans Oranları	55

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

ANOVA	: Varyans Analizi (Analysis of Variance)
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
CI	: Hücre İndeksi
COX-2	: Siklooksijenaz-2
DAG	: Diaçilgliserol
DMSO	: Dimetilsülfoksit
ECGF	: Endotel Hücre Büyüme Faktörü
ECM	: Ekstraselüler Matriks
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
ELİZA	: Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Yöntemi
FBS	: Fötal Sığır Serumumu
FDA	: Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
HIF	: Hipoksiya Bağımlı Transkripsiyon Faktörü
HUVEC	: İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücresi
kDa	: Kilo Dalton
KHDAK	: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
KML	: Kronik Miyeloid Lösemi
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
PA	: Plazminojen Aktivatör
PBS	: Fosfat Tuz Tampon Çözelitisi (Phosphate Buffer Saline)
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PGE2	: Prostaglandin E2
pH	: Hidrojen Konsantrasyonunun Eksi Logaritması
PKC	: Protein Kinaz C
RTCA DP	: Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz

SFM	: Serumsuz Medyum
SH2	: Src-homology-2
SM	: Serumlu Medyum
SPSS	: Sosyal Bilimler İçin İstatistik Programı (Statistical Package for Social Sciences)
TKI	: Tirozin Kinaz İnhibitörü
VEGF	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
VEGFR	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü Reseptörü
VPF	: Vasküler Permeabilite Faktörü

GİRİŞ ve AMAC

Bilim ve teknolojik gelişmelerin baş döndürücü hızla ilerlediği günümüzde hala bazı konularda aydınlatılmayan noktalar mevcuttur. Bunların başında ise büyük ölüm oranına sahip olan kanser hastalığı gelmektedir. Genel ölüm nedenleri arasında kalp hastalıklarından sonra ikinci sırayı alan akciğer kanseri, kanser ölümlerinin %28'ini oluşturmaktadır (Bozkurt ve ark., 2004).

Akciğer kanseri en sık görülen kanser türlerinden biridir ve her yıl bir milyondan fazla kişi akciğer kanserinden ölmektedir (Kloskowski ve ark., 2012). Akciğer kanserinin %80'i ise küçük hücreli olmayan akciğer kanseridir (KHDAK) (Barutca, 2006).

Kanser hücreleri aşırı miktarda vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF- β) gibi bazı büyüme faktörleri ve sitokinler salgılar. Bunların endotel hücreleri üzerindeki reseptörlere bağlanması, Raf/MEK/ERK yolaklarını aktive eder, bunun sonucunda da anjiyogenez görülür. (Goto ve ark., 2010; Hackel ve ark., 1999; Woodburn, 1999). Anjiyogenezin engellenmesi kanser tedavilerinde önemli bir rol oynadığı için son yıllarda anjiyogenez yol açan sinyal yollarının ortaya çıkarılması araştırmacıların ilgi alanı olmuştur (Durak ve ark., 2005).

Anjiyogenez, önceden var olan kan damarlarından, endotel hücrelerinin aktivasyonu, invazyonu, migrasyonu ve çoğalması gibi basamaklardan oluşan kompleks bir süreçtir (Paper, 1998; Ferrara, 2007). Kanser hücrelerinde, yüksek metabolik hızın yol açtığı düşük oksijenli ortam (hipoksiya) sonucu, hücreler dengeler bozulmaktadır (Durak ve ark., 2005). Artan tümör kitlesi ile birlikte gelişen hipoksi tümör hücrelerinden VEGF salgılanmasını arttırmakta ve anjiyogenez neden olmaktadır (Guidi ve ark., 1994). VEGF, antianjiyogenik tedavinin en önemli hedefidir (Cvetkovic ve ark., 2001). VEGF ailesinin etkilerini gösterebilmesi için, endotel hücreleri üzerinde bulunan özgün transmembran tirozin kinaz reseptörlerine bağlanması gerekir (Yazır, 2007).

VEGF yolağını hedef alarak geliştirilmekte olan çeşitli ilaçlar (tirozin kinaz inhibitörleri gibi) KHDAK tedavisinde geçerli bir hedefdir (Riely ve ark., 2007). Pazopanib (VotrientTM, GlaxoSmithKline), VEGFR-1, -2, -3, PDGFR ve c-Kit reseptörlerine karşı aktivitesi olan çoklu kinaz inhibitörüdür (Drabkin, 2010).

Biz de bu çalışmada, klinikte FDA (U.S. Food and Drug Administration) tarafından Ekim 2009' da renal hücre kanserinin önlenmesi amacıyla onaylanan ve bir tirozin kinaz inhibitörü olan pazopanibin (GW786034), insan akciğer kanseri (A549) ve insan umbilikal ven endotel hücre (HUVEC) hattındaki antianjiyogenik etkilerini araştırmayı amaçladık. Bu nedenle pazopanibin her iki hücre hattında hücre proliferasyonunu, invazyon ve migrasyonunu, hücresel VEGF miktarı ile VEGF mRNA ekspresyon düzeylerini belirledik.

KAYNAK BİLGİSİ

KANSER

Yaşamın ve canlılığın en temel birimi olan hücrenin, iç ve dış çevresiyle haberleşmesini sağlayan sinyalleşmeler, normal hücrelerde sınırlı ve kontrollü bölünmeyi sağlarken, kanser hücrelerinde kontrolsüz bölünme ve büyüme olarak algılanmaktadır. Bu özelliklerle, çok temel olarak açıklanmaya çalışılan kanser olgusu, biraz daha detaylandırılırsa; kanser hücrelerinin gelişimi, hızlı bölünme kapasitesi, canlı kalma süresi, ölüm sinyallerine duyarsızlık nedeniyle apoptoza girmeme, istila ve metastaz yeteneği ile hücreler için mutasyon ve seleksiyonu içeren çok basamaklı bir süreci kapsamakta olduğu görülür (Lüleyap, 2008).

İngiliz onkolog Willis'in kanser tanımı eksikler içermekle birlikte kabul görülen en yaygın tanımdır. Willis'e göre; Kanser anormal bir doku kitlesidir. Büyümesi normal hücrelerden hızlıdır ve onlarla eşgüdüm içinde değildir. Bu büyüme hızı onu başlatan uyarının ortadan kalkmasından sonra da aynı aşırı biçimde devam eder" (Ruacan, 2003).

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

Kanserde, malign hastalıklar klasik olarak kontrolsüz aşırı bir hücre proliferasyonunun olduğu hastalıklar olarak bilinir. Oysa aşırı proliferasyonun yanında azalmış apoptik hücre ölüm hızının da kanser gelişimine katkıda bulunduğu görülmüştür. Ölme zamanı gelmiş olmasına rağmen normal olarak apoptoza gidemeyen dolayısıyla beklenenden daha uzun süre yaşayan hücreler genomlarında biriktirdiği mutasyonların etkisiyle malign hücrelere dönüşme potansiyeli taşırlar (Lüleyap, 2008).

Epidemik boyutta ortaya çıkması ve gerek hastanın, gerekse yakın çevresinin morali ve davranışı üzerinde olumsuz yansımalar oluşturması nedeniyle kanser, çağımızın en önemli sağlık sorunlarından birisidir. Gelişmiş ülkelerin ölüm istatistiklerine göre kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sırada görülen ölüm nedenidir.

Kanser üzerine yapılan araştırmalardan elde edilen sonuçlar, kanserleşen hücrelerin, normal vücut hücrelerine göre birçok değişim geçirdiğini açıklamaktadır. Ancak bu değişimler her kanser tipinde aynı olmadığı gibi aynı kanser tipinin ilerleyen dönemlerinde de farklılık göstermektedir. Ayrıca aynı kanser tipi insandan insana da farklılık göstermektedir. Dolayısıyla bu durum hastalığın tedavisini oldukça güçleştirmektedir.

Kanser, genetik bir hastalıktır. Hücresel gelişimi kontrol eden genlerdeki bozukluklar kontrolsüz hücre büyümelerine yol açmaktadır. Bu genetik bozukluk birçok olguda kalıtsal değildir (Karp, 2005). Ancak, kanser olgularının %1'inde, eşey-kök hücrelerinin çeşitli genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonraki

nesillere aktarıldığında, yeni neslin kansere yatkınlığını oluşturur (Klug ve Cummings, 2002).

Kanserleşme sürecinde, hedef hücreye ait DNA'nın yapısında meydana gelen endojen (oksidatif stres, telomer kısalması) ve eksojen (UV, X-ışını, oksidatif stres ile diğer hasarlar) kaynaklı hasarlar, DNA hasarına duyarlı tamir mekanizmalarını uyararak hasarı tamir etmek için süre kazanmak amacıyla hücre döngüsünü durdururlar. Eğer hücre döngüsü kontrol noktasında regülatör rol olan p53, p16, retinoblastoma gibi proteinleri inaktive eden mutasyonlar var ise hasar tamir edilmeden ve hücre döngüsü durdurulmadan hücre bölünmeye devam eder ve kanserleşme oluşur. Eğer hasar fark edilir fakat tamir edilemez ise hücre apoptoza sürüklenir. Bu süreç apoptozis ya da programlı hücre ölümü olarak bilinmektedir. Bu süreç ile yaşlanmış hücreler ortadan kalkarken genç ve yeni hücreler ile organizma devamlılığını sağlar. Apoptozis hücrenin kendi kendini yok ettiği bir süreçtir. Bunların dışında hücre sürekli hasara maruz kalır ve meydana gelen spontan mutasyonlar hücrede birikirse de hücre yaşlanmasına neden olur. Kendileri direkt karsinojen olmayan bazı ilaçlar ve hormonlar mutasyona neden olmadan, sadece hücre bölünmesini uyarmaları nedeniyle de tümör promotörü olarak tanımlanırlar (Lüleyap, 2008).

Kanser Hücrelerinin Özellikleri

İnsan kanser hücrelerinin davranışları ile ilgili elde edilen bilgilerin çoğu, *in vitro* ortamda geliştirilmiş hücrelerle yapılan çalışmalardan elde edilmiştir (Karp, 2005).

Bölünme sinyallerinin üretimi

Kanser hücreleriyle normal hücreler arasındaki en önemli farklardan birisi, normal hücrelerin ortamda bulunan büyüme faktörlerinin belirlediği miktara ulaşana kadar bölünüp G₀ evresine girerek geçici olarak bölünme döngüsünden ayrılmalarıdır. Oysa kendi bölünmeleri için gerekli olan büyüme hormonlarını sentezleyebilme özelliği kazanmış olan (otokrin uyarım) kanser hücreleri için böyle bir sınırlama söz konusu olmadığından sürekli bölünürler.

Kontakt inhibisyon yokluğu

Kanser hücrelerinde, hücre yüzey adezyon genlerinin normal hücrelere göre daha az ifade edilmesinden kaynaklanan daha az hücre-hücre ve hücre-matrix etkileşimi bulunur. Kanser hücrelerinin, diğer doku elemanlarıyla ilişkisini etkileyen ve bu şekilde istila ve metastazda önemli rol oynayan iki özelliği bulunur. Bunlar;

- a) Malign hücreler genellikle extrasellüler matrix bileşenlerini sindiren proteaz, kollajenaz gibi enzimler salgılayarak kanser hücrelerinin kan damarlarına ulaşmasını ve bu yolla vücudun diğer bölgelerine yayılmasına (metastaz) neden olurlar.
- b) Kanser hücreleri hızlı bölünmelerinden kaynaklanan yüksek metabolik aktivitelerini karşılayabilme için ihtiyaç duydukları O₂ ve besin maddelerini karşılanabilme amacıyla yeni kan damarları (anjiyojenezis) oluşturmak için anjiyojeneze yönelik büyüme faktörlerini salgırlar.

Sınırsız bölünme potansiyeli

Hücre bölünmesinde çok önemli bir role sahip olan telomeraz aktivitesinin, tüm kök hücrelerde ve kanser hücrelerinde bulunduğu saptanmıştır.

Apoptozisten kaçış

Kanser hücrelerinin apoptoza karşı dirençli olmalarından dolayı da normal hücrelere göre artmış yaşam uzunluğu söz konusudur. Normal hücreler, DNA tamir ve tümör baskılayıcı gen aktivitelerine sahip olduklarından, tamiri mümkün olmayan DNA hasarlarının varlığında apoptosise giderler. Ancak aynı durum kanser hücreleri için geçerli değildir.

Kanserler ayrıca köken aldıkları hücre grubuna göre de; karsinom, sarkom ve lösemi/lenfoma olarak üç gruba ayrılırlar.

Karsinom: Tüm kanserlerin %90'ını oluştururlar. Yaşam boyu bölünme yeteneğinde olan epitel hücrelerden köken aldıkları ve epitel hücrelerinde üç embriyolojik tabakadan (ektoderm, mezoderm ve endoderm) oluşması nedeniyle, karsinomların yüzdesi yüksektir.

Sarkom: Tüm kanserlerin %3'ünü oluştururlar. Çok az sıklıkta görülen ve mezenşim kökenli; kas, kemik, kıkırdak ve fibröz bağ dokuların solid tümörleridir.

Lösemi-Lenfoma: Tüm kanserlerin %7'sini oluşturur. Kan ve immün sisteme dahil hücrelerin malignan türüdür (Lüleyap, 2008).

İnvazyon ve Metastaz

Normal hücreler vücuttaki yerlerini korurlar ve genellikle göç etmezler, kanser hücreleri ise vücudun diğer bölgelerine göç ederler. Mutasyonlar invazyon ile ilgili enzimlerin aktivitesini değiştirir ve hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler adezyon moleküllerini değiştirirler (Karaca, 2008).

Kanserden hastalanma ve ölüm nedenlerinin başında metastaz gelir. Metastaz, "hastalığın bir organdan diğer bir organa transferidir" şeklinde de tanımlanabilir. Tümörün yayılması, konakçı hücreler ile tümör hücreleri arasındaki etkileşim ile beş basamakta gerçekleşir;

1. Kanser hücrelerinin küçük lenf ve kan damarlarına geçerek kendisini çevreleyen konakçı dokuya invazyon ve infiltrasyon,
2. Dolaşıma kanser hücrelerinin tek tek veya grup halinde salınması,
3. Dolaşımda hayatta kalmaları,
4. Uzaktaki dokuda kapiller yatağa takılıp kalması,
5. Lenfatik veya kan damarından geldiği dokuya geçerek burada ikincil bir tümör oluşturmasıdır (Franks ve Teich, 1996).

Metastaz oluşumunun başlangıç aşaması olan invazyon ise üç basamakta gerçekleşir;

1. Mekanik baskı,
2. Litik enzimlerin salınması,
3. Tümör hücrelerinin hareketliliğinin artması.

Metastaz genel olarak kötü huylu tümör hücrelerinin (kanseri hücreler) salgıladığı enzimler nedeniyle etrafındaki kapsülü eriterek damarı geçmesi, dolaşıma katılması ve vücudun herhangi bir yerinde tekrar yerleşip çoğalabilmesi olayıdır ve tümör gelişiminin son basamağıdır (Liekens ve ark., 2001).

Metastazın önemli bir basamağı olan tümör invazyonu kompleks ve dinamik bir olaydır. Tümör hücre invazyonu, her bir aşamasında farklı moleküllerin görev aldığı çeşitli alt basamaklardan oluşur. İlk aşama kanser hücresinin primer tümörden ayrılmasıdır. İkinci aşama ise kanser hücrelerinin matrikse, endotel hücrelerine ve subendotel bazal membrana tutunma aşamasıdır.

İnvazyon ve metastazda bir diğer basamak bazal membran ve extrasellüler matriks komponentlerinin yıkımıdır. Bu işlemde birçok proteolitik enzim görev alır. Proteoliz için başlıca enzim grupları metalloproteinazlar, plazminojen aktivatörleri ve Cathepsin'lerdir. Matriksin ve bazal membranın yıkımından sorumlu bu enzimler içinde matriks metalloproteinazlar özel bir yere sahiptir. Tümör hücreleri ve endotel hücreleri için en önemli bariyer olan bazal membranın içerdiği tip-IV kollajeni yıkan MMP-2 ve MMP-9, malignitenin derecesiyle korele olarak birçok metastatik tümörde yüksek olarak bulunmuştur. Bu amaçla, proteolizi engelleyen gerek fizyolojik gerekse sentetik inhibitörlerin bulunması kanser tedavisinde yeni umutlar doğurmuştur (Güllü ve Akalın, 2005).

Endotel hücrelerin aktivasyonu, matriks metalloproteinazların (MMP) salınmasını, hücre bağlantı moleküllerinin ekspresyonunu dolayısıyla göç ve invazyonu artırır. Aktive olan endotel hücreler matriks metalloproteinazları üretirler. Daha sonra bu enzimler endotel hücrelerden çevre dokulara salınırlar. Matriks metalloproteinazlar hücre dışı matriksi parçalar. Parçalanmış matriks endotel hücrelerin göçüne izin verir (Bayramoğlu 2007).

Metastaz döngünün hem başında hem de sonunda anjiyojenez yer almaktadır. Anjiyojenez yani yeni damar oluşumları hücrelerin dolaşıma karışabilmeleri için gereklidir. Anjiyojenez tümörün metastaz potansiyelini artırır. Tümör metastaz yaptıktan sonra yaşayabilmesi için gittiği ikincil organda da damarlanma yapar. Anjiyojenezin olmadığı durumlarda tümör anaerob metabolizma yoluyla yaşamsal faaliyetlerini sürdürme yoluna da gidebilmektedir.

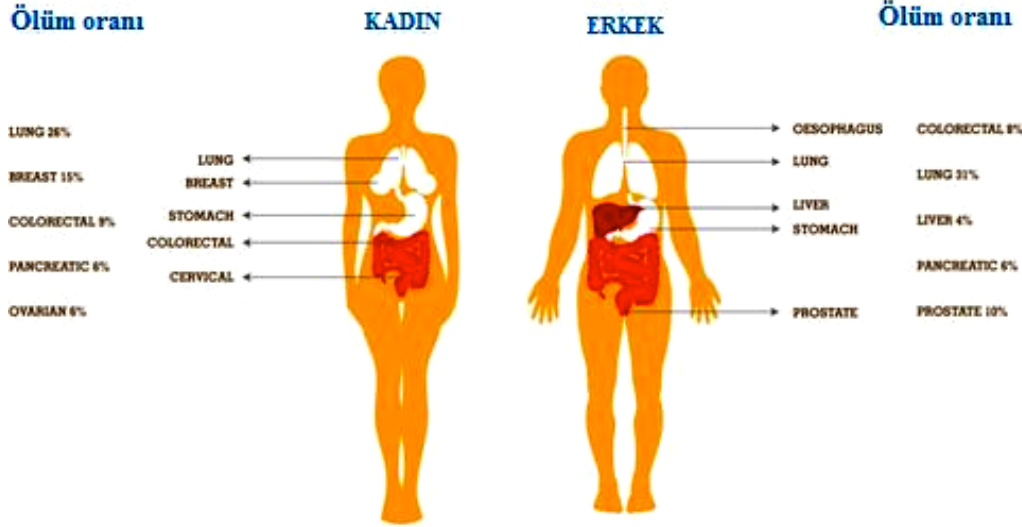
AKCİĞER KANSERİ

Akciğer kanseri, yirminci yüzyılın başlarında ender olmasına karşın günümüzde görülme sıklığı artan, önemli bir sağlık problemidir. Genel ölüm nedenleri arasında kalp hastalıklarından sonra ikinci sırayı alan akciğer kanseri, kanser ölümlerinin %28'ini oluşturmaktadır (Bozkurt ve ark., 2004). Akciğer kanseri, yapısal olarak akciğer hücrelerinin ihtiyaç ve kontrol dışı çoğalarak akciğer içinde bir kitle (tümör) oluşturmasıdır.

Akciğer kanseri, hücre tipine göre küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere 2 temel grupta ele alınır. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, skuamöz hücreli, adenokanser ve büyük hücreli akciğer kanseri alt gruplarından oluşur. KHDAK bu kanser türlerinin %80'ini oluşturmaktadır (Chang ve ark., 2004; Kuo ve ark., 2005). Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri agresif özellik taşır.



Dünya Çapında En Sık Görülen Kanserler



Şekil 1. Kanser İstatistik (http-1)

İki tip alveoler hücre vardır. Tip I alveollerin iç yüzeyinin %96'sını kaplamaktadır ve *in vitro* ortamda üretmek zordur. Tip II ise daha az yüzey kaplar. Tip I'e göre farklı ve birçok sayıda fonksiyonları vardır. Ayrıca tip II hücreler, tip I hücrelerinin ata hücreleridir. A549 hücreleri tip II hücre orijinlidir (Fang ve Aust, 1997; Shimizu ve ark., 2004). Sitokinlerin A549 hücrelerinden prostaglandin E2 (PGE2) ve siklooksijenaz-2 (COX-2)'nin yüksek miktarlarda sentezlenmesine neden olduğu gösterilmiştir. PGE2 ve COX-2'nin sentezlenmesi sonucu nitrik oksit ve indüklenebilen nitrik oksit sentaz enziminin de düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Banerjee ve ark., 2002; Tong ve Tai, 2005). İnflamasyona yol açabilen ajanların varlığında A549 hücrelerinden interlökin-6 ve interlökin-8 salgılanmaktadır (Garofalo ve ark., 1996; Jepsen ve ark., 2004).

KHDAK da hedeflenen en önemli tedavilerden biri VEGF yolağını amaçlayan ajanlardan oluşur. 1971 yılında, Judah Folkman çeşitli malignanların tedavisinde antianjiyojenik ajanları araştırmak için tümör büyümesinin anjiyojeneze bağlı olduğunu göstererek araştırmacılara öncülük etmiştir. (Podar ve ark., 2006).

ANJİYOJENEZ

Anjiyojenez terimi ilk olarak 17. yüzyılın sonunda İngiliz cerrah Dr. John Hunter tarafından "mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının oluşumu" olarak tanımlanmış olup 1935 yılında ise patolog Dr. Arthur T. Hertig hamile maymun plasentasında anjiyojenezi tarif etmiştir (Ribatti, 2009).

Anjiyojenez, vücutta fizyolojik ve patolojik olmak üzere iki şekilde gerçekleşir. Fizyolojik anjiyojenez, sağlıklı bir yetişkin vücudunda embriyogenezde yani plasenta oluşumunda, yara iyileşme sürecinde ve kadın üreme sisteminde örneğin korpus luteumun oluşması sırasında gözlenir. Patolojik anjiyojenez ise ateroskleroz, romatoid artrit, psöriyazis, kronik enflamasyon, enflamatuvar bağırsak hastalıklarında, tümör gelişimi ve metastazda (özellikle meme, mesane, kolon, akciğer, nöroblastom, melanom, böbrek, pankreas, rahim, serviks, glioblastom gibi çeşitli kanser türlerinde), diyabetik retinopati gibi göz ve kardiyovasküler hastalıklarda meydana gelir (Paper, 1998; Ataergin ve ark., 1999; Brower, 1999; Ribatti ve ark., 2000; Liekens ve ark., 2001; Konukoğlu ve Turhan, 2005; Sagar ve ark., 2006; Özgürtaş, 2009).

Anjiyojenez, önceden var olan kan damarlarından endotel hücrelerinin aktivasyonu, adezyonu, göçü ve çoğalması gibi basamaklardan oluşan kompleks bir süreçtir (Paper, 1998; Ferrara, 2005). Ekstraselüler matriks (ECM) ve matriksi çevreleyen hücrelerden salınan birçok büyüme faktörü, sitokinler ve reseptörleri anjiyojenezde temel rol oynar. Bu sürecin temel hücreleri olan endotel hücreleri kapiler damar duvarlarını oluşturur (Konukoğlu ve Turhan, 2005).

Yeni Kapiler Damar Oluşumu

Yeni kapiler damar oluşum süreci;

1. Bazal membranın proteolitik enzimlerle yıkılması,
2. Endotel hücrelerinin aktivasyonu, göçü ve çoğalması,
3. Kapiler oluşumu ve damar olgunlaşması basamaklarını kapsar.

Bazal membranın proteolitik enzimler tarafından yıkılması

Anjiyojenez süreci damar endotelini kaplayan bazal membranın proteolitik yıkımı ile başlar.

Endotel hücreleri göç etmek ve çoğalmak üzere uyarıldığında membran ve hücreler arasında bir bölünme meydana gelir. Normalde, endotel hücreleri yayılma etkisi göstermeyen tek bir tabaka oluştururlar. Ancak anjiyojenez sırasında çoğalıp yayılma gösterirler. Normal, hastalıklı ya da hasarlı dokularda üretilip salgılanan anjiyojenik büyüme faktörleri komşu dokulara difüzyon yolu ile geçer. Anjiyojenik büyüme faktörleri, yakınındaki önceden var olan kan damarlarının endotel hücrelerinde bulunan özgün reseptörlere bağlanırlar. Büyüme faktörleri tarafından aktive edilen proteolitik enzimler bazal membranın ve endotel hücrelerini döşeyen ekstraselüler matriks (ECM) bileşenlerinin yıkımına neden olur. ECM'nin enzimatik yıkılımını, endotel hücrelerinin uyarılması ve kapiller filizlenme izler. Endotel hücrelerinin invazyon ve göç süreçleri, plazminojen aktivatör (PA) ve matriks metaloproteinaz (MMP) sisteminin işbirliği içinde aktive olmasını gerektirir (Konukoğlu ve Turhan, 2005). MMP-2 ve MMP-9 hücre dışı matriks ve bileşenlerini ve bazal membranı yıkmadan sorumludurlar (Gigianelli ve Antonaci, 2002). Özellikle MMP-9 normal hücrelere göre melanoma, akciğer tümörü, meme adenokarsinoması ve gliomalarda daha fazla salgılanır (Shravan ve ark., 1999).

Endotel hücrelerde göç ve çoğalma

Anjiyojenik uyarı, proteolitik yıkım ile kısa bir süre sonra endotel hücreleri aktive eder. Endotel hücreleri ekstraselüler matrikse göç eder ve çoğalır. Bu süreçte etkili anjiyojenik faktör vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)'dür (Konukoğlu ve Turhan, 2005).

Kapiller oluşumu ve damar olgunlaşması

Endotel hücre çoğalmasından sonra ECM bileşenlerinin depolanması ve bir araya getirilmesi için ekstraselüler proteoliz mutlaka lokal olarak inhibe edilmelidir. Kapiller filizlenme oluştuğundan sonra yine bu filizlenmenin ucunda yeni oluşmuş ECM'de yıkılma ortaya çıkar ve bu sayede daha ileri yayılımı mümkün olur. Bazal membranın yıkılması endotel hücre göçüne ve filiz oluşumuna izin verir. Endotelin yol alması ve uzaması sırasında hücre içi ve hücreler arası boşlukta, sonunda kendilerinden damarların oluştuğu lümenler gelişir. Böylece, ekstraselüler matriks proteolizinin birbirini sırayla izleyen aktivasyon ve inhibisyonları sonucunda kapillerler oluşur. Proteolitik yıkılma ve endotel hücresi göçünden sonra yeni oluşan kapillerler, yeni bazal membranı oluştururlar. Bu nedenle, endotel hücrelerinin yeni kapiller yapılar oluşturabilmeleri için birbirlerine ve ECM'e tutunma gereksinimi vardır. Damar olgunlaştıktan ve uygun anjiyojenez ortaya çıktıktan sonra anjiyojenik faktörlerde azalma görülürken, anjiyojenez inhibitörlerinde artış gözlenir (Konukoğlu ve Turhan, 2005).

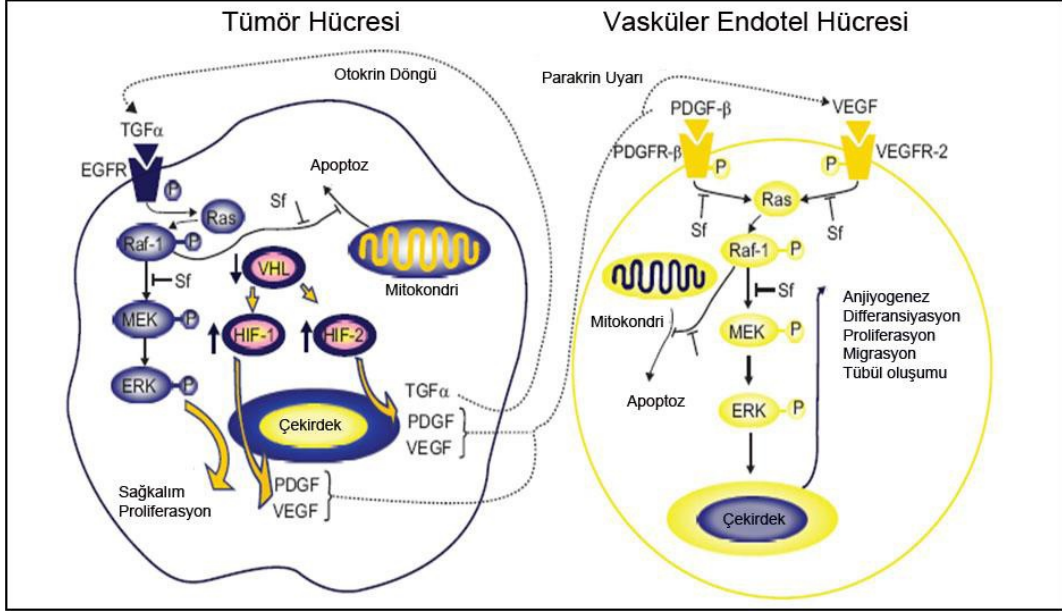
Tümör Anjiyojenezi ve Metastaz

Yaklaşık yüz yıl önce tümör içerisinde yeni damar gelişiminden bahsedilmiştir. Ancak o dönemde yeni damarların oluşmasının tümör metabolitlerine bağlı basit bir dilatasyon olduğu düşünülmüş ve tümör hiperemisi olarak adlandırılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda oluşan yeni damarların konakçı damarlardan köken aldığı yani anjiyojenez kaynaklı olduğu görülmüştür (Konukoğlu ve Turhan, 2005). 1971'de ise Judah Folkman; "Tümör gelişimi anjiyojeneze bağlıdır ve anjiyojenezin inhibisyonu terapötik olabilir" hipotezini ortaya atmıştır (Folkman, 1990; Ferrara ve Kerbel, 2005; Konukoğlu ve Turhan, 2005; Ribatti, 2008). Seksenli yılların ortalarında tüm deneysel bulgular tümör gelişiminin anjiyojeneze bağlı olduğunu kanıtlamıştır. Ayrıca anjiyojenezin metastazı kolaylaştırdığı varsayımı deneysel ve klinik kanıtlarla ortaya konmuştur (Konukoğlu ve Turhan, 2005).

Tümör hücreleri ancak metastaz yaparak gelişip yayılabilmektedir. Özetle anjiyojenez olmaksızın solid tümörler gelişemez ve primer tümörlerden metastatik tümörler oluşamaz yani tümör gelişimi ve metastazı anjiyojeneze bağlı bir olaydır. 0.5 mm³'den daha küçük tümörler oksijen ve besin gereksinimini difüzyonla karşılayabilirken, büyüklüğü 0.5 mm³'ün üzerine çıkınca anjiyojeneze bağımlı hale gelir (Konukoğlu ve Turhan, 2005). Tümörün neovaskülarizasyonu anjiyojenez oluşum basamaklarında gerçekleşir ve anjiyojenik düzenleyici faktörler arasındaki dengeyle kontrol edilir (Paper, 1998).

Anjiyojenezin Moleküler Mekanizması

Anjiyojenez oldukça karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşir. Ekstraselüler matriks ve matriksi çevreleyen hücrelerden salınan pek çok büyüme faktörü, sitokinler ve bunların reseptörleri anjiyojenezde temel rol oynar.



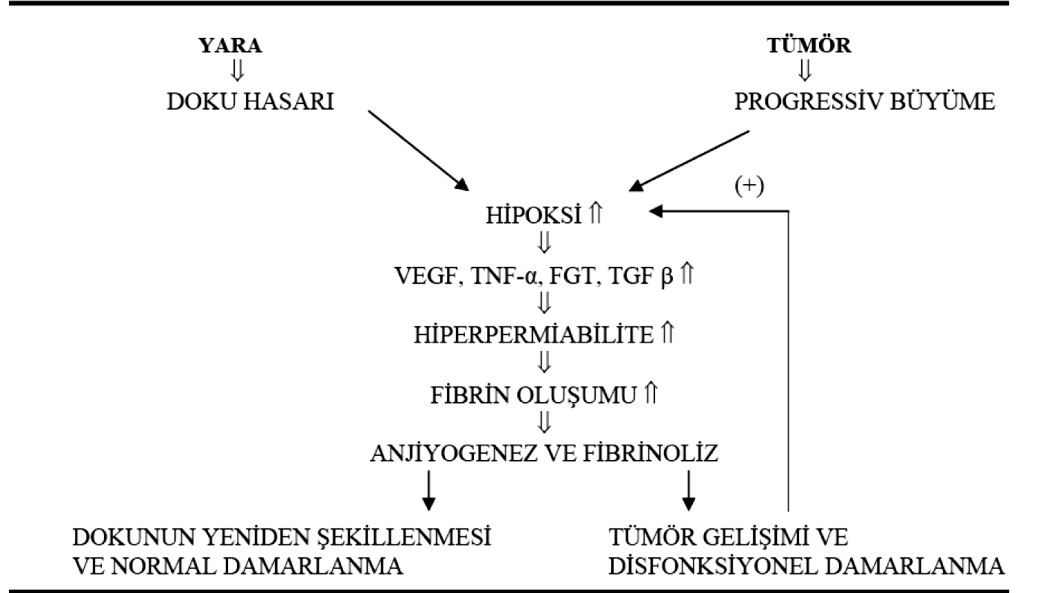
Şekil 2. Antianjiyojenik Etki Mekanizması (Sabancı, 2010)

Düşük oksijenli ortam tümör gelişiminin ilk safhalarından itibaren görülmektedir. Tümör büyümesi ve yayılmasına yol açan yeni damar oluşumlarından sonra da tümörün oksijen isteği yeterince karşılanamamakta, düşük oksijenli ortam oluşmaktadır. Bu sebeple tümör hücresinin düşük oksijenli ortama gösterdiği tepkinin önemli basamaklarını, genler üzerinde etkili hücre içi sinyal yollarını etkileyerek karşılamaktadır. Hipoksiye bağımlı transkripsiyon faktörü (HIF), anjiyojenez ile ilişkili sinyal iletiminde rol oynayan en önemli faktörlerden biridir (Durak ve ark., 2005). Hipoksi, tümör hücrelerini, enflamasyonda rol alan hücreleri ve bağ dokusu hücrelerini uyararak anjiyojenez özelliği taşıyan moleküllerin [(VEGF) vasküler endotel büyüme faktörü, (FGF) fibroblast büyüme faktörü, (PDGF) trombosit kaynaklı büyüme faktörü gibi] oluşumuna yol açarak, anjiyojenez başlatan en etkili uyarıların başında gelir. Artan tümör kitlesi ile birlikte gelişen hipoksi tümör hücrelerinden VEGF ekspresyonunu artırmakta ve anjiyojenezisi daha da ilerletmektedir (Guidi ve ark., 1994) (Şekil 2).

Anjiyojenezin düzenlenme evreleri pek çok büyüme faktörünün ve düzenleyici proteinin kontrolü altındadır. Bu düzenleyiciler; ECM ve ECM'yi çevreleyen hücrelerden salınan vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), interlökin-1 veya prostaglandin E2 (PGE2) gibi sitokinler ve bunların reseptörleri (Konukoğlu ve Turhan, 2005), düzenleyici proteinler ve hücre adhezyon molekülleridir (Paper, 1998).

Anjiyojenezde rol alan faktörler;

1. Vasküler endotelial büyüme faktörü ve reseptörleri
2. Fibroblast büyüme faktörleri
3. Anjiyopoietinler ve tie reseptörleri
4. Transforme edici büyüme faktörü- β
5. İnterlökin-8 ve matriks metalloproteinaz-2



Şekil 3. Normal Doku Onarımı ve Tümörlerde Anjiyojenezi Uyarıcı Ortak Yollar (Konuoğlu ve Turhan, 2005)

Anjiyojenez kontrol mekanizmalarının işleyişi metabolik stres (hipoglisemi, düşük pH, dokularda O_2 basıncının düşmesi yani hipoksi durumu), mekanik stres (çoğalan hücrelerin yaptığı basınç), immün/enflamatuvar cevap ve genetik mutasyon (onkogenlerin aktivasyonu veya anjiyojenez düzenleyicilerin üretimini kontrol eden tümör baskılayıcı genlerin delesyonu gibi) durumlarda hücreler sinyaller bozulduğunda anjiyojenez yanlış zamanda veya yanlış dokuda aktive olur (Carmeliet ve Jain, 2000).

Sağlıklı, yetişkin bir organizmada endotel hücrelerinin döngüsü ve anjiyojenezi çok yavaş (3 aydan 1 yıla kadar) seyredir. Ancak yara iyileşme süreci, embriyogenez veya korpus luteumun oluşumu gibi sadece belli koşullardaki anjiyojenez çok kısa bir sürede gerçekleşir (Paper, 1998).

Anjiyojenezin engellenmesi kanser tedavilerinde önemli bir rol oynadığı için son yıllarda anjiyojeneze yol açan sinyal yollarının ortaya çıkarılması araştırmacıların ilgi alanı olmuştur (Durak ve ark., 2005). Tümör büyümeye başladığında merkezdeki hücreleri hipoksik olurlar, tümör merkezine yaşamsal ihtiyaçlarının gidebilmesi için damarlanmaya başlar. Bu oluşum anjiyojenik faktörlerin (vasküler endotel büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü, trombosit kaynaklı büyüme faktörü gibi) salgılanması ve anjiyojenezi inhibe eden faktörlerin farklılaşması veya uzaklaştırılması ile olur (Fidler ve ark., 2001; İlyas ve ark., 1999; Liotta ve Kohn, 2000; Kenemans ve ark., 2004) (Şekil 3).

Sinyal yollarından VEGF inhibisyonu kanser tedavisi için en umut verici yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır. Son yıllarda hematopoetik ve solid tümörlerin tedavisinde kullanılan tirozin kinaz inhibitörleri etkinliği kanıtlanmış, antineoplastik ajanlardır.

TİROZİN KİNAZ RESEPTÖRLERİ

Kompleks organizmalarda hücreler hem dış çevreden hem de komşu hücrelerden gelen devamlı bilgi akışına maruz kalırlar. Bu sinyallerin bütünlüğü ve hücre tarafından doğru bir şekilde yorumlanması hücrenin ve organizmanın bulunduğu çevreye adaptasyonunu sağlar. Bu adaptasyonda membrana lokalize olmuş reseptörler önemli rol oynarlar. Bunlardan tirozin kinaz aktivitesine sahip reseptörler geniş bir aileyi oluşturmaktadır (Blume-Jensen ve Hunter, 2011; Holbro ve Hynes, 2004).

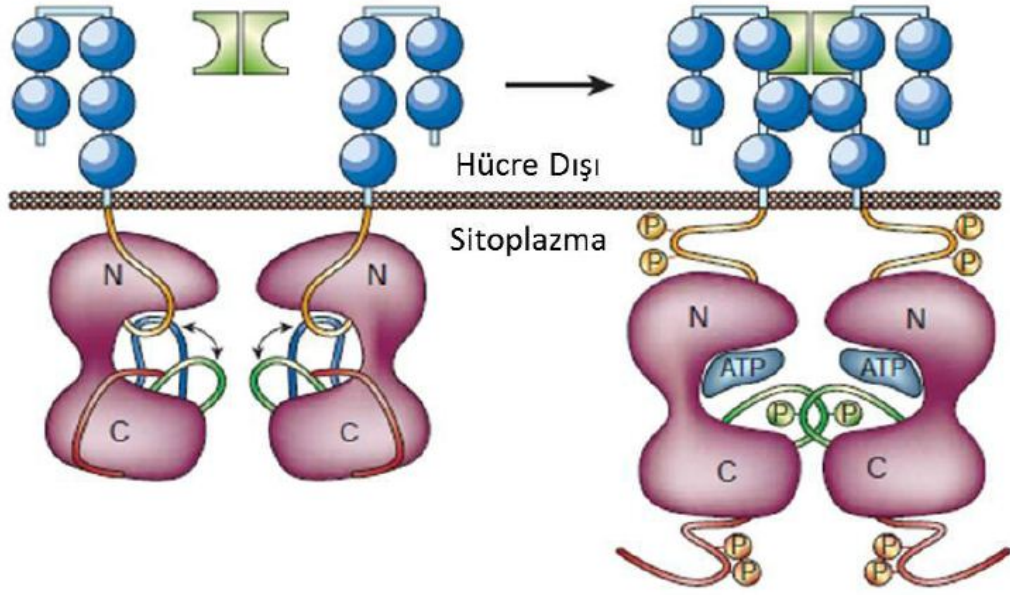
Protein kinazlar substrat özgünlüğüne göre serin/treonin kinazlar ve tirozin kinazlar olarak ikiye ayrılır. Membranda yerleşim gösteren proteinlere reseptör tirozin kinazlar (RTK) denilmektedir. RTK'lar, büyüme faktörleri ve hormonlar gibi birçok polipeptit için yüksek afiniteye sahip hücre yüzey reseptörleridir. İnsan genomunda bulunan 58 adet reseptör tirozin kinaz amino asit sekanslarındaki benzerlikler, yapıları ve biyolojik fonksiyonları dikkate alınarak 20 gruba ayrılmıştır. Bu ailenin üyeleri proliferasyon, farklılaşma, sağkalım, metabolizma, hücre göçü, anjiyojenez, invazyon, metastaz, apoptoz ve hücre döngüsünün kontrolü gibi önemli hücresel süreçlerde görev almaktadır (Lemmon ve Schlessinger, 2010; Bae ve Schlessinger, 2010).

Tirozin Kinaz Reseptörlerinin Yapısı ve Aktivasyonu

RTK'ların çoğu ortamda ligand olmadığı zaman hücre zarında monomerik ve inaktif halde bulunurlar. Her bir monomer hücre dışı ligand bağlanma bölgesi, transmembran bölgesi ve hücre içi kinaz aktivitesine sahip katalitik kısımdan oluşmaktadır (Lemmon ve Schlessinger,2010; Cloura ve Rebai, 2011). Büyüme faktörlerinin yokluğunda hücre yüzeyinde monomerik halde bulunan reseptör tirozin kinazlar, hücre dışında kalan kısımlarının ligand ile etkileşiminden sonra konformasyonel değişikliğe uğrarlar. Ligandla aktive edilince iki reseptör proteini birbirleriyle birleşerek dimer oluşturur. Bu olay üç aşamada meydana gelir. Birinci aşamada, reseptör ligandına bağlandığında, kinazın katalitik aktivitesi artar; ikinci aşamada, sitoplazmik sinyal moleküllerinin fosfotirozin içeren bağlanma bölgeleri ile etkileşir, üçüncü aşamada ise sinyal yollarındaki hedef moleküllerin aktivitesi en üst düzeye çıkar (Lemmon ve Schlessinger,2010; Blume-Jensen ve Hunter, 2011). Böylece hücre içi kinaz bölgelerinin aktivasyonu sağlanır (Lemmon ve Schlessinger, 2010; Blume-Jensen ve Hunter, 2011; Choura ve Rebai, 2011).

Bu reseptörler büyüme faktörleri ile bağlandıktan sonra aktif hale geçerler ve sitoplazmadaki hedef proteinleri ile etkileşerek sinyal iletimini gerçekleştirirler. RTK aktivasyonu, reseptörün kendi kendini fosforile etmesiyle başlar. İkinci aşamada ise, bu fosforlanan bölgelere çeşitli adaptör proteinler bağlanırlar ve uyarının hücre içine iletimini sağlarlar. Adaptör proteinlerin ortak yapısal özelliği SH2 (Src-homology-2) bölgeleri içermeleridir (Barutca, 2010). Bu proteinler,

SH2 bölgeleri aracılığıyla reseptöre bağlanarak, RTK ile doğrudan etkileşebilirler veya adaptör proteinlere bağlanarak dolaylı yoldan etkileşime girerler. Bu proteinler, proliferasyon, farklılaşma, sağkalım, hücre göçü, metabolizma, apoptoz gibi hücre fonksiyonlarında rol oynayan sinyal yollarını aktive ederler (Schlessinger ve Lemmon, 2003; Pawson, 2002). RTK aktivasyonunun sonlandırılmasından fosfataz grubu proteinler sorumludur. Buna göre, fizyolojik koşullarda sinyal iletimi tersinir özellik taşır ve RTK aracılı iletim kontrol altında tutulur. Karsinogenez sürecinde ise, sürekli ve kontrolsüz RTK aktivitesi söz konusudur (Doğan ve Güç, 2004).



Şekil 4. Reseptör Tirozin Kinazların Aktifleşme Mekanizması (Tunalı, 2012)

Kinazların aktivasyon halkasının N-terminali katalitik aktiviteyi sağlarken C-terminali substratın bağlanması için zemin hazırlar. Hücre dışı N-terminal bölgesi genellikle immüoglobulin benzeri veya EGF benzeri yapılar, fibronektin tip III tekrarları veya sistein amino asidi bakımından zengin olan bölgeler içerir. Bunlar RTK'ların her bir alt grubu için karakteristiktir. Transmembran bölgesi hidrofobik olup hücre zarına gömülü olarak bulunur. Bu bölge 25-38 amino asitten oluşan α -heliks yapısındadır. Hücre içi C-terminal bölgesi reseptörün tirozin kinaz aktivitesinden sorumludur. Bu bölge, çok sayıda tirozin rezidüsü içeren katalitik kısımdan ve ATP bağlanma bölgesinden meydana gelmektedir (Zwick ve ark., 2001) (**Şekil 4**).

Kanser hücreleri aşırı miktarda VEGF ve PDGF- β gibi bazı büyüme faktörleri ve sitokinler salgılar. Bunların endotel hücreleri üzerindeki reseptörlere bağlanması, Raf/MEK/ERK yollarını aktive eder, bunun sonucunda da anjiyogenez görülür. Ras kinazlar, VEGF ve PDGF- β tümör gelişmesinin ve anjiyogenezin engellenmesinde potansiyel moleküler tedavi hedefleridir. Tirozin kinaz reseptörleri kendi ligandları tarafından uyarılmadığı zaman, hormon, nörotransmitter ve lenfokinler tarafından uyarılırlar. VEGF ve tirozin kinaz

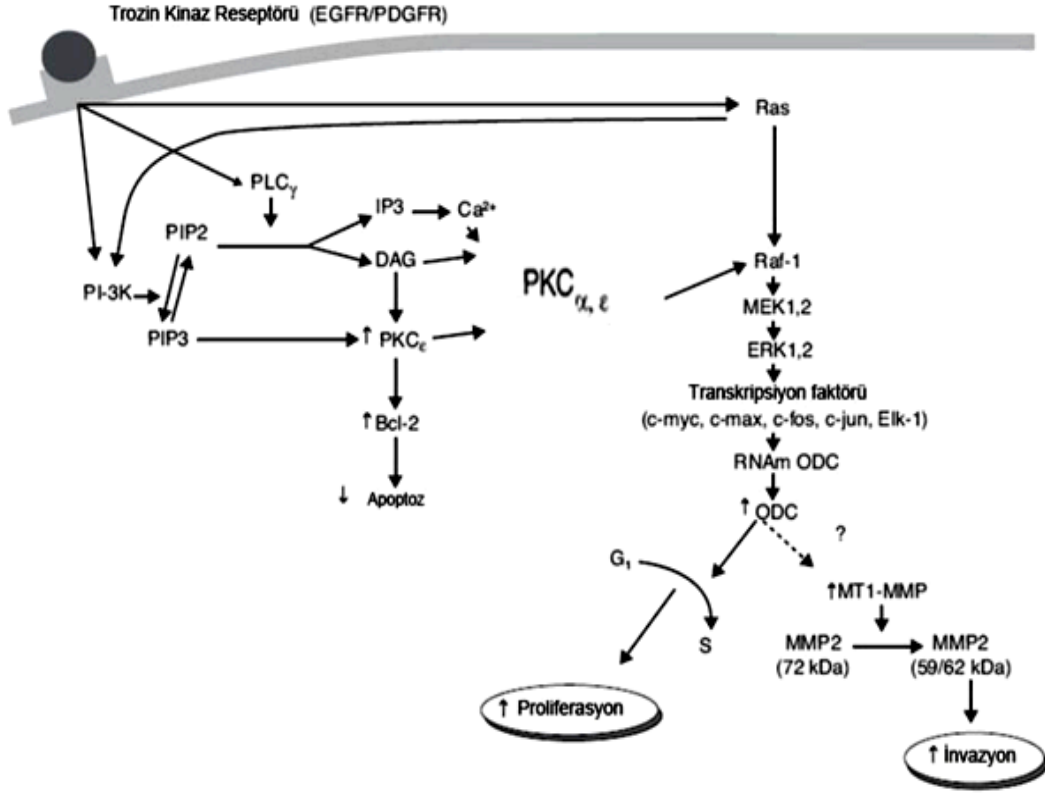
reseptörü anjiyogenezde çok önemli rol üstlenmektedir (Goto ve ark., 2010; Hackel ve ark., 1999; Woodburn, 1999).

Anjiyogenez sırasında birçok gen ve hücrel mekanizma rol oynamaktadır. VEGF reseptörlerinin aktivasyonu; fosfolipaz-C, fosfoinositol-3 kinaz ve *ras* GTPaz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon, ve diferansiyasyonunu sağlar (Cozzi ve Li, 2009; Kountouras ve ark., 2005; Güllü ve Akalın, 2005).

Ras/Raf/MEK/ERK sinyal iletim yolu

Hormonlar, büyüme faktörleri, diferansiyasyon faktörleri ve tümör promotör maddeler bu sinyal yolunu kullanırlar. Bu iletim yolu Ras aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla Raf, MEK ve ERK proteinleri ile kinaz kaskadı ilerler. Ras ve Raf protoonkogenlerdir. Protoonkogenler, hücrede önemli rol oynayan, genellikle hücrenin normal çoğalmasını denetleyen sinyal yollarında görev yapan genlerdir. Bu nedenle Ras sinyal yolağının aktivasyonu, insanda kanser gelişmesinde önemli bir mekanizmadır. Ras proteinlerinin aktif hale gelmesi için translasyon sonrası modifikasyondan sonra membrana yerleşmesi gerekir. İstirahat halindeki hücrelerde Ras proteinleri inaktif (Ras-GDP) halde bulunurlar. Hücrenin uyarılması ile GDP'nin yerine GTP bağlanarak aktif konformasyona dönüşüm (Ras-GTP) tetiklenir. Ras aktivasyonu tersinir bir süreçtir. Aktive olan Ras proteinleri Raf kinazlara yüksek afinite ile bağlanırlar ve Raf kinazların hücre membranına yerleşimini ve aktivasyonunu sağlarlar (Doğan ve Güç, 2004).

İnsan tümörlerinin %30'unda Ras/Raf/MEK/ERK yolunun aşırı aktivasyonu söz konusudur (Doğan ve Güç, 2004). Bu oran tümörlerdeki Ras mutasyonu sıklığı ile uyumludur. Mutant Ras proteinleri, aktif Ras-GTP formunda kalırlar; bu nedenle, hücrenin kontrolsüz uyarılmasından sorumlu tutulmaktadır.



Şekil 5. Tirozin Kinaz Reseptörünün Hücre İçi Etki Mekanizması (da Rocha ve ark., 2002)

Protein kinaz C (PKC), siklik adenosin monofosfat (cAMP) aktivasyonuna gerek duymaksızın membran fosfolipidleri, Ca^{2+} ve diaçilgliserol (DAG) ile aktive olarak, farklı proteinlerin fonksiyonunu serin ve treonin aminoasitlerinin hidroksil gruplarının fosforilasyonunu gerçekleştirerek kontrol eden bir enzim grubudur (Tepeköy, 2011).

Protein kinaz C (PKC), büyüme faktörü reseptörleri ile geri dönüşümlü olarak aktive olur. Sinyal yollarını işleterek Raf-1 ve bcl-2 kaskadı gibi sistemleri uyarabilir. Raf-1 kaskadı sitoplazmadaki sinyalleri çekirdeğe ileten ana sistemlerden biridir. Bu yüzden PKC'nin aşırı uyarılması hücre bölünmesi ve invazyonun artmasına yol açabilir (Risau, 1997).

PKC, DAG molekülünün birincil hedefidir. PKC, bir serin treonin kinaz ailesidir ve hücre içi pek çok biyokimyasal reaksiyonun (hücre zarından glukoz geçişi, sekresyon, egzositoz, düz kas kasılması, gen anlatımı, iyon geçirgenliğinin düzenlenmesi, hücre çoğalması, hücre dışı reseptörlerin duyarsızlaştırılması, vb..) kontrolünde önemli rolü vardır (Risau, 1997). Birden çok sinyal iletim yolunun kesişim noktasında olması sebebiyle sitoplazmadan nükleusa giden çok çeşitli sinyalin iletilmesinde hayati önem taşır (Şekil 5).

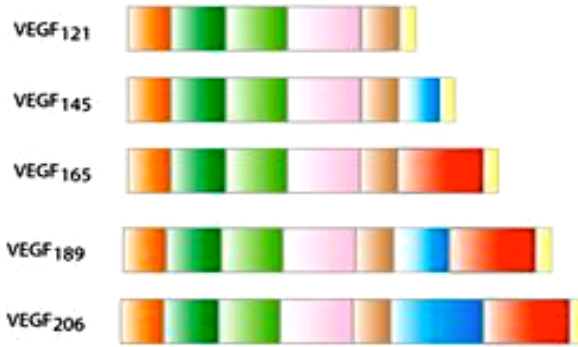
VASKÜLER ENDOTEL BÜYÜME FAKTÖRÜ

VEGF veya diğer adıyla vasküler permeabilite faktörü (VPF) heparin-bağlayıcı bir anjiyojenik büyüme faktörü olup çeşitli tümör tiplerinde yüksek derecede eksprese edilir. Anjiyojenezin en önemli uyarıcısı VEGF'dir ve insan tümörlerinin yaklaşık %60'ı tarafından salgılanır (Fayette ve ark., 2005). Endotel hücreleri için migrasyon özelliğinin yanı sıra VEGF; hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteinazlar ile urokinaz ve doku-tipi plazminojen aktivatörlerinin salınımını da uyarır. Böylelikle invazyon ve metastazı da kolaylaştırır (Risau, 1997).

VEGF, 46 kDa ağırlığında, homodimerik, heparin bağlı glikoprotein yapısında bir moleküldür (Claus, 2000). VEGFA, B, C, D, E, plasental büyüme faktörü (PGF) ve yakın zamanda yılan zehrinde bulunmuş VEGF-F adı verilen yedi üyeden oluşmaktadır (Takahashi, 2004; Houch ve ark., 1991; Rosenstein ve Krum, 2004).

En çok çalışılmış VEGF izoformu VEGFA'dır ve bu izoformun endotel hücrelerin migrasyon ve mitozunu artırarak anjiyojenezi sağladığı açıklanmıştır. Keşfedildiği dönemde vasküler permeabilite faktörü olarak adlandırılan faktör son zamanlarda VEGFA olarak adlandırılmaktadır. Granülosit ve makrofajlar için kemotaktiktir. VEGFA aynı zamanda mikrovasküler geçirgenliği artırır ve vazodilatasyon yapar. Hücre yüzeyinde bulunan tirozin kinaz reseptörlerine bağlanarak hücrel cevabı tetikler.

Şekil 6'da görüldüğü gibi VEGFA'nın beş farklı izoformu bulunmaktadır (Zachary, 1998). Bunlar; VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆ dir (Cook ve Figg, 2010). İzoformların hepsi heparine bağlanır fakat etki yerleri birbirinden farklıdır ve VEGF₁₂₁ hariç diğer izoformlar dimerik yapıya sahiptirler (Zachary, 1998).



Şekil 6. VEGFA'nın İzoformları

VEGF monomerleri paralel olmayan ve kovalent bağlı disülfid köprülerinden oluşmaktadır. VEGF₁₂₁ ve VEGF₁₆₅'de bulunmayan ekzon 6, amino asitçe zengin bir bölgedir. Bu izoformların biyolojik aktiviteleri ve reseptör bağlanma özellikleri birbirinden farklılık göstermektedir ve bu farklılıklar heparin sülfat proteoglikanlara olan farklı bağlanma kapasitelerinden kaynaklanmaktadır (Zachary, 1998).

Meme, akciğer, beyin, pankreas, over, böbrek kanserlerinde VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆ 'nın ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (Cvetkovic ve ark., 2001).

VEGF RESEPTÖRLERİ

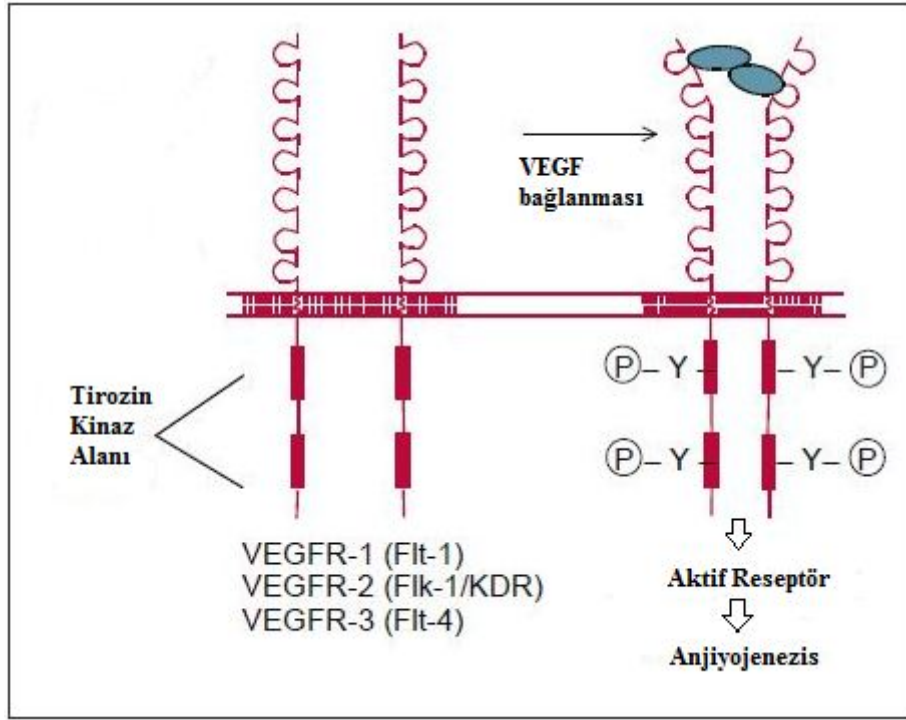
VEGF ailesinin etkilerini gösterebilmesi için, endotel hücreleri üzerinde bulunan özgün transmembran tirozin kinaz reseptörlerine bağlanması gerekir (Yazır, 2007). Bu reseptörler; VEGF reseptör-1 (VEGFR-1; Flt-1), VEGF reseptör-2 (KDR/Flk-1) ve VEGF reseptör-3 (VEGFR-3)'dür. VEGFA aktivitesini VEGFR-1 ve VEGFR-2 üzerinden göstermektedir (Ferrara ve ark., 2003). VEGFR-1 ve VEGFR-2, yetişkinlerde beyin damar endotel hücreleri hariç diğer damar endotel hücreleri tarafından eksprese edilmektedirler (Podar ve Anderson, 2005).

VEGF, endotel hücrelere spesifik bir mitojendir ve yüksek afiniteli reseptörlerine (Flt-1/VEGFR-1, Flk-1/KDR/VEGFR-2) bağlandığında inositolün hidrolizi yoluyla ikinci mesajcıların oluşumunu tetikler ve bu yüzden heparin benzeri moleküllerin varlığında reseptörlerin otofosforilasyonunu indükler, fosfatidilinositol metabolik sinyal iletim yollarını tetikler ve endotel hücrelerdeki MAP kinazları aktive eder. Sonuç olarak, VEGF mitojenik etkilerini endotel hücre proliferasyonunu artırarak gösterir (Ferrara, 2001).

Tablo 1. VEGF Reseptörleri, Ligandları ve Etkileri (Demir, 2008)

Reseptörler	Büyüme Faktörleri	Biyolojik Etkileri
VEGFR-1	VEGF-A,B,F ve PGF	Hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkisinin kontrolü
VEGFR-2	VEGF-A,C,D,E,F	Anjiyojenez, proliferasyon ve migrasyon
VEGFR-3	VEGF-C,D	Lenfanjiyojenez, lenfatik metastaz

Akciğer kanserinin tedavisinde çeşitli antikanserojen ilaçlar kullanılmaktadır. VEGF yolağını hedef alarak geliştirilmekte olan çeşitli ilaçlar (tirozin kinaz inhibitörleri gibi) küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) tedavisinde geçerli bir hedeftir (Riely ve Miller, 2007).



Şekil 7. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü Tirozin Kinaz Reseptörlerinin Yapısı (McMahon, 2000)

Şekilde 7’de gösterildiği gibi tirozin kinaz inhibitörleri sitoplazmik etkinliğe sahip tek geçişli bir transmembran reseptörleridir ve VEGF reseptörleri sitoplazmik alanda tirozin kinaz reseptörlerinin otofosforilasyonunu etkinleştirmek için dimer oluştururlar (McMahon, 2000).

TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİ

Tirozin kinaz inhibitörleri (TKI) esas olarak büyüme faktörleri ve diğer hücre dışı ligandlar için hücre yüzey reseptörlerinin bir sınıfını oluştururlar. VEGF gen ailesinin belki de en göze çarpan üyeleridir. Bu reseptörler sadece bir kez plazma zarına yayılan transmembran proteinleridir (Pawson, 2002).

TKI’nın bir avantajı da aynı anda birden fazla reseptör inhibe gerçeğini içerir böylece sinyal-ajan aktivitesi olasılığı daha yüksek potansiyel sağlar. Başka bir faydası da bu ajanların oral olarak mevcut olması hastalara kolaylık sunar (Das ve Wakelee, 2012).

Protein kinazların işlevlerindeki artışın kanser patogenezindeki rolünün ortaya konulması, bu işlevlerin bir şekilde baskılandığında hastalığın tedavi edilebileceğini de düşündürmüş ve çalışmalar bu yönde yoğunlaştırılmıştır. Bu araştırmalar sonucu etkinliği gösterilmiş ilk tirozin kinaz inhibitörü ajan imatinib mesilatıdır. İmatinib mesilatın kronik miyeloid lösemi (KML) hastalığının tedavisindeki başarısı hedefe yönelik tedaviler açısından bir ilktir ve bu konudaki araştırmaların artışında da öncü rol oynamıştır (Tablo 2). Tirozin kinaz inhibitörlerinin KML tedavisindeki başarısı bu ajanların, patogenezinde tirozin kinazların rol oynadığı diğer hastalıkların tedavisinde de kullanılabileceğini

düşündürmüştür (Yenerel, 2010). Çeşitli antianjiyojenik küçük molekül TKI mevcut klinik geliştirme aşamasındadır.

Tablo 2. Bazı Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Hedef Yolakları ve FDA Onayları

İlaç	Hedef	FDA Onayı
Sunitinib	VEGFR-1,-2, -3, PDGFR, c-Kit, FLT3, CSF-1R, RET	2006 (RCC ve GIST)
Sorafenib	VEGFR-2, -3, PDGFR, Raf, c-Kit	2005 (Kidney)
İmatinib	Bcr-Abl	2001(KML),2002 (GIST)
Lapatinib	ErbB1/ ErbB2	2007 (HER2+Breast)
Pazopanib	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR, c-Kit	2009 (RCC)
Crizotinib	ALK/Met	2011 (KHDAK)
Vemurafenib	BRAF	2011 (Melanoma)
Axitinib	VEGFR-1, -2, -3, PDGFR- β , c-Kit	2012 (RCC)

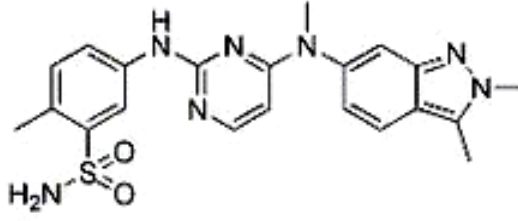
Pazopanib

Pazopanib HCl antitümör aktivitesi gösteren ve oral kullanılan çok hedefli bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Birçok tirozin kinaz reseptörünü inhibe eden antineoplastik bir ajandır. Pazopanib inhibisyonu, VEGFR-1, -2, ve -3, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGFR) ve c-Kit reseptörleri ile inhibe edilir ve tümör anjiyojenezinin inhibisyonu ile sonuçlanır (Pick ve Nystrom, 2012). İkinci jenerasyon oral çok hedefli tirozin kinaz reseptörü olan pazopanib, VEGF ve PDGF'yi hedefleyerek tümör büyümesi ve hayatta kalmak için gerek anahtar proteinlerden sorumludur.

Kimyasal ismi;

5-[[4-[(2,3-Dimethyl-2H-indazol-6-yl)methylamino]- 2-pyrimidinyl]amino]-2-methylbenzolsulfonamide

Kimyasal Formülü; C₂₁H₂₃N₇O₂S



Şekil 8. Pazopanib HCl'in Kimyasal Formülü (<http-2>)

Pazopanib HCl'in meme kanseri için ilaç geliştirme safhalarından faz I/II'nin yanında, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, jinekolojik kanser, nazofarengial kanser, pankreas kanseri, yumuşak doku sarkoması ve glioma hastalarında da faz II/III denemeleri yapılmaktadır. Pazopanib metastatik renal hücreli karsinomu olan hastaların iyileştirilmesinde etkinliği ve güvenilirliği açısından şu anda lisanslı olan çoklu tirozin kinaz inhibitörlerinden sorafenib ve sunitib den daha etkindir. İlaçla ilgili en sık karşılaşılan yan etkiler; hipertansiyon, bulantı, ishal ve saç depigmentasyonudur (Hurwitz ve ark., 2009).

Pazopanib, vasküler endotelyal büyüme faktör reseptörü 1, 2 ve 3 (VEGFR-1, -2,-3), Raf-1 dahil Raf kinazları ve trombosit kaynaklı büyüme faktör reseptörü (PDGFR) gibi tirozin kinaz reseptörlerini inhibe eder (Furuse, 2008).

VEGF yolağını hedef alarak geliştirilmekte olan çeşitli ilaçlar (tirozin kinaz inhibitörleri gibi) KHDAK tedavisinde geçerli bir hedeftir (Riely ve ark., 2007). Pazopanib (Votrient™, GlaxoSmithKline), VEGFR-1, -2, -3, PDGFR ve c-Kit reseptörlerine karşı aktivitesi olan çoklu kinaz inhibitörüdür (Drabkin, 2010).

Biz de bu çalışmada, klinikte FDA (U.S. Food and Drug Administration) tarafından Ekim 2009' da renal hücre kanserinin önlenmesi amacıyla onaylanan ve bir tirozin kinaz inhibitörü olan pazopanibin (GW786034), insan akciğer kanseri (A549) ve insan umbilikal ven endotel hücre (HUVEC) hattındaki antianjiyojenik etkilerini araştırmayı amaçladık. Bu nedenle pazopanibin her iki hücre hattında hücre proliferasyonunu, invazyon ve migrasyonunu, hücresel VEGF miktarı ile VEGF mRNA ekspresyon düzeylerini araştırmayı amaçladık.

GEREÇLER

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma–Aldrich, Almanya),
Endotel hücre büyüme faktörü (ECGF) (Sigma–Aldrich, Almanya),
F12- Kaighn’s Modification medyum (HyClone, Thermo Scientific),
Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Almanya),
Human VEGF ELISA Kit (Katalog no:#KHG0111,Invitrogen, Amerika),
L-glutamin (Sigma-Aldrich, Almanya),
Pazopanib HCl (Selleckchem- Katalog no:S1035, Amerika),
Penisilin-streptomisin (Gibco, Almanya),
Phosphate Buffer Saline (PBS) (Invitrogen, Almanya
RPMI-1640 medyum (1X) (HyClone, Thermo Scientific),
Sodyum pirüvat (Biochrom AG, Almanya),
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) (Sigma–Aldrich, Almanya),
Tripan mavisi (Roche, Almanya),
Tripsin-EDTA 10X (Pan, Biotch).

Kullanılan Malzemeler

0,2 ml’lik PCR tüpü (Greiner bio-one, Amerika),
10, 200, 1000 µl’lik mikropipet ucu (Greiner bio-one, Amerika),
10,100,1000 ve 5000 µl’lik otomatik pipet ucu (Eppendorf, Kanada),
12 kanallı otomatik pipet (Axygen, İngiltere),
15 ve 50 ml’lik santrifüj tüpleri (Isolab, Almanya),
25 cm²’lik hücre kültür flaskı (Greiner bio-one, Amerika),
2ml’lik Ependorf tüp (Greiner bio-one, Amerika),
5 ve 10 ml’lik steril enjektör (Ayset, Türkiye),
50,100 ve 200 ml’lik duran şişeler (Isolab, Almanya),
5-10 ve 25 ml’lik cam pipet (Isotherm, Türkiye),
6 kuyucuklu hücre kültür plakası (TPP, İsviçre),
75 cm²’lik hücre kültür flaskı (Greiner bio-one, Amerika),
96 kuyucuklu hücre kültür plakası (TPP, İsviçre),
Cedex smart Slide (Roche, Almanya),
CIM-plate 16 (Roche, Almanya),
E-plate 16 (Roche, Almanya),

Filtre (0,22 µM milipor) (Sartorius stedim, Almanya),
Kryotüp (2ml) (Greiner bio-one, Amerika),
Lamel (Isolab,Almanya),
Parafilm (Pechiney, Fransa),
pH indükator kağıdı (Macherey- Nagel, Almanya),
Şarjlı pipetör (Starlab, Almanya).

Kullanılan Cihazlar

Cedex (Innovatis),
Derin dondurucu buzdolabı (Altus),
DNA-RNA çalışma kabini HEPA/UV PCR (UVP),
Hassas terazi (Ohaus),
İnverted mikroskop (Leica),
Laminar Flow kabin (Heal Force),
Light Cyclers 480[®] (Roche),
MagNA Lyser (Roche),
MagNA Pure Compact (Roche),
Masaüstü soğutmalı santrifüj (Eppendorf),
Mikro santrifüj (Hettich),
Mikroplaka okuyucu (ELİSA cihazı) (BioTek),
NanoDrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Scientific),
Otoklav (Alp),
Otomatik pipetler (Eppendorf),
PCR Thermal Cyclers (Gradient PCR) (Takara),
Steril CO₂ inkübatörü (Thermo Scientific),
Sterilizatör (Nuve),
Su banyosu (Nuve),
Vorteks (Daihan),
xCELLigence (Roche).

YÖNTEMLER

DeneYlerde Kullanılan Hücreler

Çalışmamızda A549 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) ve HUVEC (insan umbilikal ven endotel hücresi) hücre hatları kullanılmıştır.

A549 hücre hattı 1972 yılında D.J. Giard ve ekibi tarafından 58 yaşındaki Orta Asya'lı bir erkeğin akciğer karsinomalı dokusundan eksplant kültür tekniği ile izole edilmiştir ve 1976 yılında, altmış sekizinci pasajı M.Lieber tarafından Amerika Hücre Bankası'nda (ATCC) stoklanmıştır. Çalışmamızda kullanacağımız adhere hücre özelliğine sahip A549 hücre hattı (ATCC, CCL-185™), daha önceden laboratuvarımızda mevcut stoklardan çoğaltılarak kullanılmıştır.

Kullanacağımız HUVEC hücre hattı ise (ATCC, CRL-1730™) Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Doç. Dr. Ayşe Tansu Koparal'dan temin edilmiştir.

Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması

Kullanılan malzemelerin steril edilmesi

Çalışmalarda kullanılacak cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılı olarak kuru sterilizatörde 180°C'de 2 saat, sıvı solüsyonlar ise 121°C, 1.5 atm/Hg'de otoklavda 20 dakika steril edilmiştir.

Pazopanib konsantrasyonlarının hazırlanması

Toz halindeki Pazopanib HCl (Selleckchem-S1035, Amerika) dimetilsülfoksit (DMSO; Sigma) içinde çözülerek 100 mM konsantrasyonda ana stoğu hazırlanmış ve -80°C'de saklanmıştır. Bu stok solüsyondanda, 2.5, 25, 50, 100 ve 200 µM pazopanib konsantrasyonları medyumla seyreltme işlemleri her deney öncesinden taze olarak hazırlanarak kullanılmıştır. Pazopanibin en yüksek konsantrasyonunda DMSO oranı % 0.1 oranında olduğu için kontrol grubuna da medyum içinde % 0.1 oranında DMSO uygulanmıştır.

Hücre Kültürü Çalışmaları

Stoktan çıkarılan A549 hücreleri, %10'luk fetal sığır serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren RPMI-1640 (% 1 L-glutamin, %1 sodyum pirüvat) besiyeri içinde, flasklarda %95 bağıl nem ve %5 CO₂'li gaz ortamında ve 37°C'deki inkübatörde kültüre edilmiştir. Çoğalan hücreler yeni 25 ve 75 cm²'lik flasklara pasajlanmış ve deneylerde kullanılmak üzere hücre stokları hazırlanmıştır.

Stoktan çıkarılan HUVEC hücreleri ise, %10'luk fetal sığır serumu, %1 penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin içeren F-12 Kaighn's modifiye medyum ile [%1 sodyum pirüvat ve 1:50 endotel hücre büyüme faktörü (ECGF) besiyeri içine eklenmiştir] %95 bağıl nem ve %5 CO₂'li gaz ortamında 37°C'de inkübatörde kültüre edilmiştir. Çoğalan hücreler flasklara pasajlanarak deneysel çalışmalar için kullanılmış ve bir kısmı ilerleyen deneylerde kullanılmak üzere stok yapılmıştır.

Hücre sayımları

Flasklarda bulunan A549 ve HUVEC hücreleri PBS ile yıkanmıştır. Kültür kabının büyüklüğüne ve hücrenin yoğunluğuna bağlı olarak, 250-450 µL 1X tripsin ilave edilmiştir, yaklaşık 3-5 dakika inkübatörde bekletilerek hücrelerin yapıştıkları flasktan kalkmaları sağlanmıştır. Tripsinin etkisini nötralize etmek için, kalkan hücrelerin üzerine hemen besiyeri ilave edilerek, besiyeri-hücre karışımı santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 1200 rpm' de 5 dakika santrifüjden sonra, pelet üzerine besiyeri eklenmiş ve pipetleme yapılmıştır. MTT, Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA DP) proliferasyon, invazyon ve migrasyonun belirlenmesi, ELİSA'da VEGF ölçümü ve Real-Time PCR yöntemleri uygulanmadan önce hücreler Tripkan mavisi solüsyonu ile boyanarak hücre sayıcı cihaz (Cedex) ile sayılmış ve deneylere uygun sayılarda hücre kullanılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

MTT ölçümü, *in vitro* koşullarda hücre metabolizmasını, canlılığı ve sitotoksitenin ölçmek için uygulanan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir (Er, 2010). Bu yöntem, canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesine dayanmaktadır. Canlılığı azaltan; fakat öldürmeyen özellikteki, sarı renkli, suda çözünebilir tetrazolium tuzu (MTT), hücrelere aktif olarak absorbe olur ve suda çözünmeyen koyu mavi renkli formazana indirgenir. Formazan miktarı, direkt olarak hücre hatlarındaki hücre sayısı ile orantılıdır. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği, hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterir (Mosmann, 1983; Freshney, 2005).

Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bir mitokondriyal enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Formazan kristaller DMSO, isopropanol veya diğer uygun çözücü ilavesiyle ürün çözünüp, serbest kalır ve kolorimetrik olarak tespit edilebilir hale gelir. Çözünen materyalin optik dansitesi, çözünmüş olan formazanın miktarının verdiği absorbansa göre spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği mitokondrinin sağlamlığı ve metabolik aktivitesinin tanımlanmasını sağlar. Bu da hücre canlılığının ölçüsü olarak alınır. Spektrofotometrik olarak ölçülen değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir. Bu yöntem daha çok hızlı çoğalan ve mitokondriyal aktivitesi yüksek olan hücre dizileri için uygundur (Mosmann, 1983; Barile, 1997; Denizot ve Lang, 1986; Horakova ve ark., 2001).

Metodun uygulanması

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) (Sigma) fosfat tamponu (PBS) içinde çözülmüştür. Her çalışmadan önce MTT tozundan solüsyon taze olarak hazırlanmıştır. A549 hücreleri RPMI besiyeri ortamında, HUVEC hücreleri F12 Kaighn's Modifiye besiyeri ortamında 37°C' de %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edilmiştir. Hücrelerin yeterince çoğalıp çoğalmadığının ve hücre canlılığın değerlendirilmesinde, sayım yapılarak 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta A549 hücreleri için 3.000 hücre, HUVEC hücreleri için 5.000 hücre olacak şekilde besiyeri ortamına ekilmiş ve yapışmaları için 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. DMSO'da çözümlenmiş olan pazopanibin 100 mM stok solüsyonundan hücre kültür besiyeri içinde gerekli seyreltmeler yapılarak uygun pazopanib konsantrasyonları (2.5, 25, 50, 100 ve 200 µM) hazırlanmıştır. Daha sonra plakaların içindeki eski besiyeri atılmış ve kuyucuklara taze olarak kültür besiyerinde hazırlanan pazopanib konsantrasyonları uygulanmıştır. Kontrol grubundaki hücrelere de % 0.1 oranında DMSO içeren besiyeri uygulanmıştır. Daha sonra plakalar 24 ve 48 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda plakanın içindeki besiyeri atılmış ve her bir 96'lık kuyucuktaki hücreler üzerine, 100 µL MTT solüsyonu ilave edilerek hücreler 3 saat inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her kuyucuğa 100 µL DMSO konulmuştur ve 540 nm dalga boyunda ELİZA cihazında absorbans değerleri, her bir grupta 8 kuyucuk olacak şekilde okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri, hücrelerin metabolik aktivitelerini verir ve bu değer de yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmiştir. Sonuçlar canlılık formülüne göre hesaplanıp % olarak belirlenmiştir.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Örneğin absorbans değeri}}{\text{Kontrolün absorbans değeri}} \times 100$$

Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) Kullanılarak Hücre Proliferasyonunun Elektriksel Empedans Tekniği ile Belirlenmesi

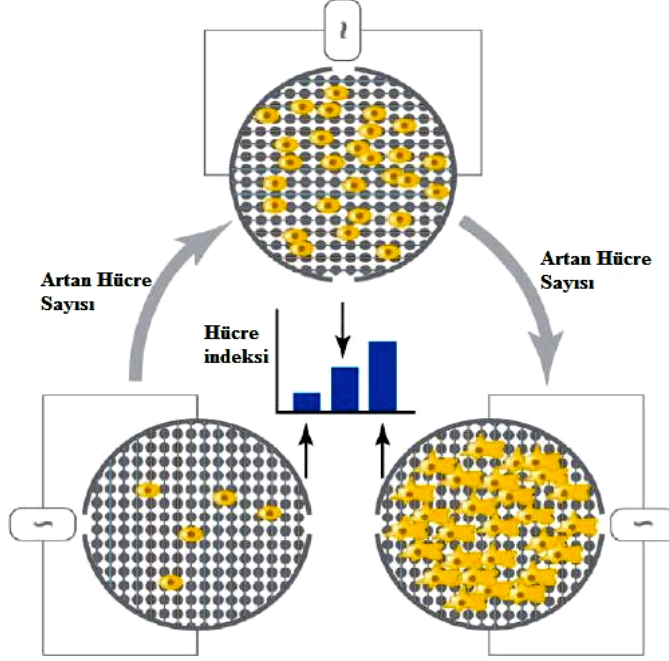
Gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde (RTCA DP) uygulanacak pazopanib konsantrasyonları, ön tarama testimiz olan MTT yöntemi ile belirlenmiş ve elde edilen sonuçlara göre pazopanibin belirli konsantrasyonları hücre hatları için RTCA DP cihazında uygulanmıştır.

RTCA DP, elektriksel empedans ölçerek hücre canlılığını tespit eder ve günlerce, istenilen aralıklarla bu ölçümü devam ettirerek gerçek zamanlı veriler oluşturur. Ölçümün gerçekleşmesi için, çalışılan hücrelerin hücre kültürü kabının (E-plaka) tabanına tutunabilmesi gerekmektedir. E-plakadan sistem tarafından alınan değerler, literatürde kabul edilen birimsiz 'cell index (CI)' (hücre indeksi) değeri olarak hesaplanır. Bu değer, hücreler E-plakanın tabanını kaplayıp çoğaldıkça verilen elektriksel yanıtla paralel olarak artar (**Şekil 9**) (Limame ve ark., 2012).

$$\text{Hücre indeksi (CI)} = \max_{i=1, \dots, N} + \left(\frac{R_{\text{hücre}}(fi)}{R_0(fi)} - 1 \right)$$

$R_{\text{hücre}}$ yada R_0 değerleri plakanın her bir gözünde bulunan hücreli yada hücresiz alanların verdiği direncin sıklığına göre ölçülür.

RTCA DP ile elde edilen hücre indeks değerlerine göre pazopanib için IC_{50} değerleri RTCA DP Software 1.2.1 programı kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 9. RTCA DP Cihazında E-plakalarda ki Hücre Sayısının Artışına Bağlı Olarak Hücre İndeks (CI) Değerlerinin Gösterilmesi (Limame ve ark., 2012)

Hücre proliferasyonunun belirlenmesi

Proliferasyon çalışmasında her bir hücre hattı için 3 adet 16 kuyucuklu altın elektrot kaplı E-plaka kullanılmıştır. Hücrelerin yeterince çoğalıp çoğalmadığının ve hücre canlılığının belirlenmesi için Cedex cihazında hücreler sayılmıştır ve her kuyucuğa 100 μ l besiyeri içinde 10.000 hücre ekilmiştir. Çalışmada kullanılacak E-plakalara 100 μ l hücreye ait besiyeri ekilmiştir ve cihazda ilk okuma alındıktan sonra E-plakalar cihazdan çıkarılıp 100 μ l besiyeri üzerine 100 μ l hücre ekilmiştir. 30 dakika steril kabinde bekletilen plakalar daha sonra cihaza yerleştirilmiş ve saatte 1 ölçüm alacak şekilde cihaz programlandıktan sonra deney başlatılmıştır. A549 ve HUVEC hücreleri belirli bir hücre indeks değerine ulaşınca (hücrelere ait proliferasyon değerleri RTCA DP’de yapılan proliferasyon çalışmalarıyla belirlenmiştir) cihaz durdurulmuş ve hücre-besiyeri karışımından 100 μ l çekilip atılmıştır. Taze hazırlanan pazopanib konsantrasyonları (2.5, 25, 50, 100 ve 200 μ M) E-plaka kuyucuklarına 100 μ l medyum içinde uygulanmıştır. E-plakalar steril kabinde yaklaşık 15 dakika bekletildikten sonra cihaza yerleştirilmiş ve program kaldığı yerden devam ettirilmiştir.

Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA DP) İnvazyon ve Migrasyonun Belirlenmesi

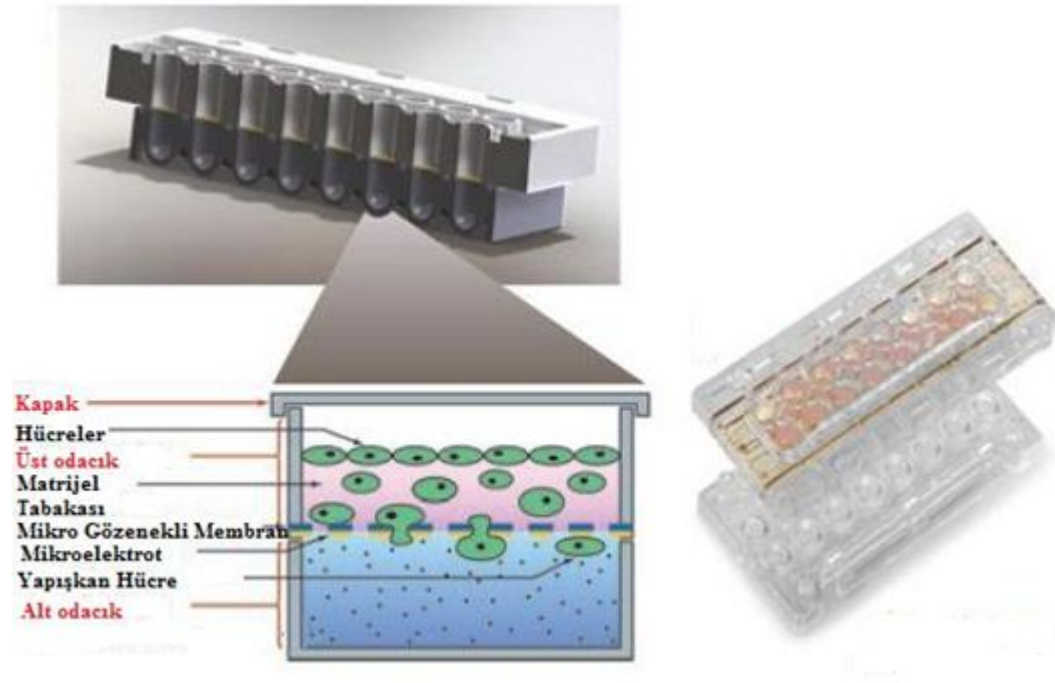
Bu sistem kullanılarak her iki hücre hattında pazopanibin hücre invazyon ve migrasyonuna etkileri gerçek zamanlı olarak kayıt altına alınmış ve bilgisayar bağlantılı sistemle eş zamanlı olarak izlenmiştir.

Bir gece önceden +4°C'ye konulması gereken malzemeler;

- İnvazyon için gereken üst odacık (Upper Chamber)
- Montajın yapıldığı düzenek (Assembly tool)
- 200 ve 1000 µl'lik pipet uçları
- Yaklaşık 10 adet ependorf
- Serumsuz Medyum (SFM)
- Aliquatlanan matrijel

İnvazyon çalışması

İnvazyon çalışmasında RTCA DP'de pazopanibin hücre invazyonuna etkisinin saptanması için matrijel ile kaplı CIM plakalar kullanılmıştır. CIM plakalar iki odalı bir sistem olup kanser hücrelerinin geçişine izin veren mikro gözenekli membrandan oluşmuştur. Hücreler matrijel kaplı üst odacığa serumsuz medyum ile ekilirler. Üst odacıktaki hücreler matrijel membranı geçerek alt odacıktaki serumlu medyuma doğru hareket ederler. Matrijelin görevi invaziv olmayan hücrelerin membranın diğer yüzeyine geçmesi engellemektir. Matrijel ile kaplı membranda diğer yüze ancak invaziv hücreler geçebilmektedir. Dolayısıyla matrijel membran, invaziv olan ve olmayan hücrelerin birbirinden ayırabilme imkanı sunmaktadır.



Şekil 10. İnvazyon Çalışmasında Kullanılan CIM Plaka (<http-3>)

Migrasyon çalışması

RTCA DP sistemi ile CIM plaka kullanılarak farklı pazopanib konsantrasyonlarının hücredeki migrasyonuna bakılmıştır. CIM plakalar iki odalı bir sistem olup kanser hücrelerinin geçişine izin veren mikro gözenekli membrandan oluşmuştur. Hücreler serumsuz medyum ile üst odacığa ekilirler. Üst odacıktaki hücreler porlu membranı geçerek alt odacıktaki serumlu medyuma doğru hareket ederler. Migrasyon özelliğine sahip hücreler serumsuz medyumun olduğu odacıktan serumlu medyumun olduğu alt odacığa geçme eğilimindedirler. Dolayısıyla migrasyonu hızlı olan hücreler daha çok alt odacığa geçerek çoğalırlar ve geçiş sırasında cihaz tarafından sinyal alınır. Migrasyona uğramayan hücreler ise üst odacığa kalırlar ve sinyal almı olmaz.

İnvazyon ve migrasyon çalışmasının uygulanması



Şekil 11. İnvazyon ve Migrasyon Çalışmalarında Kullanılan CIM Plakalar (http-4)

İnvazyon çalışması için %5 oranında matrijel hazırlanmıştır. Bu işlem soğuk serumsuz medyum (SFM) ve soğuk pipet uçlarıyla yapılmıştır. Bir gece önceden +4°C’de tutulan CIM plakanın üst odacığın 50 µL matrijel hızlı bir şekilde yüklenmiştir ve yüklenen matrijelin 30 µL’si geri çekilmiştir. Bu işlem üst odacığın zeminini kaplayan matrijelin kuyucuğun tabanında düz bir tabaka halinde kalması için yapılmıştır. Matrijel yüklemesi yapılan üst odacık montaj düzeneği ile minimum 4 maksimum 6 saat 37°C’de etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hem invazyon hem de migrasyon çalışması için CIM plakanın alt odacıklarına 160 µL serumlu medyum (SM) eklenmiş ve üst ile alt odacık bir hamlede birleştirilmiştir. Ardından invazyon ve migrasyon için üst odacıklara 20 µL SFM eklenmiştir. CIM plakalar 1 saat 37°C’de etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda cihazda ilk ölçüm alınmıştır. Ölçüm alındıktan sonra her kuyucuğa 2×10^4 hücre ekilmiştir ve hazırlanan pazopanib konsantrasyonları da uygulanmıştır. Daha sonra CIM plakalar cihaza yerleştirilmiş ve 24 saat boyunca 10 dakika da bir ölçüm alacak şekilde cihaz programlanmış ve deney başlatılmıştır.

Anjiyojenez İlişkili Olarak VEGF Miktarının Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında, A549 hücreleri pazopanibin belirli konsantrasyonları ile inkübe edilmiştir. HUVEC hücreleri ise VEGF uyarısı yapmadan bir gece önce %1 FBS içeren açlık medyumu ile inkübe edilmiştir. Daha sonra 4.30 saat VEGF uygulaması yapılmıştır ve sürenin sonunda %5 FBS içeren medyum ile pazopanib konsantrasyonları uygulanmıştır. İnkübasyon sonunda, her bir gruba ait hücre ekstraksiyonunun içermiş olduğu VEGF miktarları, insan VEGF ELİZA (Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Yöntemi) kit yöntemine göre ölçülmüştür. Bu yöntemde kit içerisinde yer alan insan VEGF proteinine özgü bir poliklonal antikor kaplanmış 96'lı plaka kuyucukları kullanılmıştır ve gruplara ait hücre içi VEGF miktarları kolorimetrik yöntemle ölçülmüş, standart verilerine göre VEGF miktarları pg/mL olarak hesaplanmıştır.

ELISA VEGF ölçümlerinde özel bir poliklonal antikor ile kaplanmış 96'lık plaka kullanılmıştır. Kit içerisinde bulunan VEGF miktarları belli olan standart konsantrasyonlar ve örnekler için VEGF miktarları belirlenecek hücre ekstraksiyon örnekleri aynı anda işleme konulmuştur. İlk inkübasyon sırasında insan VEGF antijeni antikor tarafından tutunur. Yıkamadan sonra, insan VEGF için spesifik olan biotinlenmiş monoklonal bir antikor eklenir, daha sonra Streptavidin-Peroxidaz (enzim) eklenir bu enzimde biyotinlenmiş antikora bağlanarak dört katlı sandviç tamamlanmış olur. Üçüncü inkübasyondan ve bağlanmamış enzimleri yıkadıktan sonra, renk üretebilmek için enzime bağlanmış bir substrat solüsyonu eklenir. Bu rengin yoğunluğu doğrudan ilk örnekte bulunan insan VEGF konsantrasyonu ile orantılıdır (Elisa Human VEGF Kit, 2013).

VEGF ELİZA yönteminin uygulanması

Kromojen için ayrılan kuyucuklar hariç 96 kuyucuklu plakanın bütün kuyucuklarına kit içeriğinde bulunan inkübasyon tamponundan 50 µL eklenmiştir. Kit içerisinde bulunan standartların uygulanacağı kuyucuklara, 100 µL standart seyreltme tamponu eklenmiştir. Her bir standartın 100 µL'si (standartlar kit prosedürüne göre sulandırılıp hazırlanmıştır) kendisine ayrılan standart kuyucuklara eklenmiştir. Örnek kuyucuklarına ise, 50 µL standart seyreltme tamponu ve 50 µL hücre ekstraksiyonu kuyucuklara eklenmiş ve hafifçe sallanarak karıştırılmıştır. Plakanın üzeri filmle kaplanarak 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda plaka ters çevrilerek içindeki sıvı kurutma kağıdına emdirilmiştir. Taze hazırlanan yıkama tamponuyla her kuyucuğa 200 µL konularak plaka 4 kez yıkanmıştır. Kromojen için boş bırakılan kuyucuklar haricindeki kuyucuklara ise 100 µL biyotinlenmiş Hu-VEGF (Biotin Konjugat) çözeltisi eklenmiştir. Yavaşça sarsarak iyice karışması sağlanmıştır. Plaka tekrar ince filmle kaplanarak 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda plaka ters çevrilerek içindeki sıvının emdirilmesi sağlanmıştır. Kuyucuklar 200 µL yıkama tamponuyla 4 kere yıkanmıştır. Sonra kromojen için ayrılan kuyucuklar haricindeki diğer kuyucuklara 100 µL Streptavidin-HRP çalışma çözeltisi eklenmiştir ve plaka kapatılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda plaka ters çevrilerek ve içindeki sıvının emdirilmesi sağlanmış ve tekrar yıkama tamponuyla 4 kez yıkanmıştır. Tüm kuyucuklara 100 µL stabilize kromojen eklenmiştir. Bu andan itibaren kuyucuklardaki sıvının

rengi maviye dönmeye başlar ve plaka kapalı olarak 30 dakika karanlıkta, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda bütün kuyucuklara 100 µL durdurma (stop) çözeltisi eklenmiş ve yavaşça karıştırılmıştır. Kuyucuklardaki rengin maviden sarıya dönmesi beklenir. Plaka kuyucuklarındaki sıvının absorbansı yarım saat içinde 450 nm dalga boyunda ELİZA cihazında okunmuştur.

Tablo 3. VEGF Standart Değerleri (Kit İçeriğine Göre)

Standart VEGF Miktarları (pg/mL)	450 nm Dalga Boyundaki Absorbans Değer Aralığı	
0	0.06	0.063
23.4	0.105	0.11
46.9	0.147	0.153
93.8	0.251	0.257
188	0.48	0.472
375	0.879	0.847
750	1.633	1.608
1500	2.617	2.634

İstatistiksel değerlendirmeler

İstatistiksel değerlendirmeler için SPSS Statistics 17.0 programı kullanılmıştır. Elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak analiz edilmiştir. Anlamlılık değerleri; $p>0.05$ fark yok, $p<0.05^*$ fark var, $p<0.01^{**}$ önemli derecede fark var, $p<0.001^{***}$ çok önemli derecede fark var olarak değerlendirilmiştir.

Real Time-PCR (Gerçek Zamanlı-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yöntemi ile VEGF mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

PCR, 1985 yılında Cetus şirketinden Kary Mulis tarafından ilk uygulaması yapılan bir teknik olup, belirli bir DNA parçasının kopyalanmasına ve çoğaltılmasına olanak sağlayan *in vitro* bir yöntemdir. PCR uygulamaları için ilgili gen bölgesine ait baz dizisinin (primer) bilinmesi gereklidir. Bu baz dizilerinin, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklıkta denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA bölgeleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle hibridizasyonu yapılmaktadır. Primerlerin hedef dizilere özgün bağlanması düşük

sıcaklıklarda gerçekleşmektedir. DNA polimeraz enziminin, uygun tampon ve deoksiribonükleozid trifosfat varlığında primerin 3' ucundan uzayarak yeni tamamlayıcı DNA ipliğini sentezlediği gösterilmiştir. PCR'ın bir döngüsünün, denatürasyon, annealing (yapışma) ve extension (uzama) olmak üzere üç aşamadan oluşur ve döngülerin defalarca tekrarlanmasıyla sonuç elde edilmektedir.

Amaca uygun olarak farklı PCR teknikleri kullanılmaktadır. Bunlar; Touchdown, Hot start, Multipleks, Nested, Kısmi Nested, Koloni, Arbitrary, Revers Transkriptaz, Real Time PCR gibi yöntemler içermektedir.

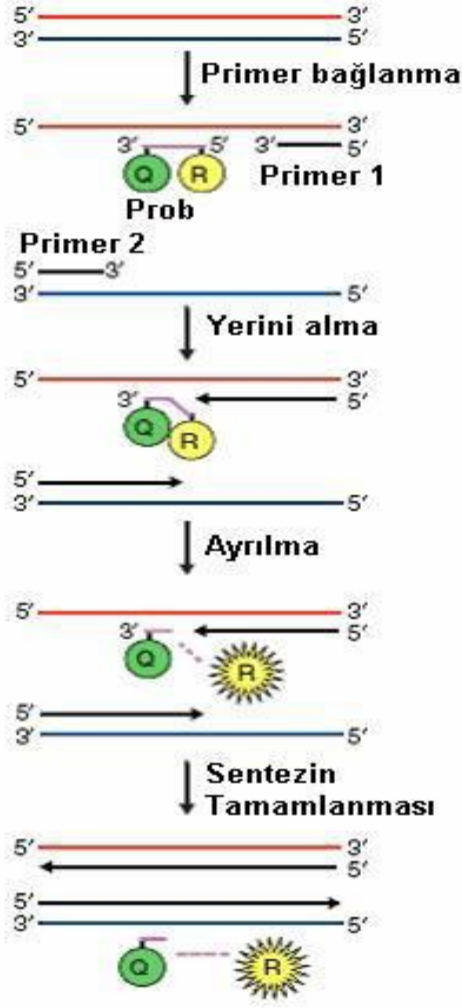
Real Time (gerçek zamanlı) PCR, hedef DNA parçasının hem amplifikasyonu hem de miktarının saptanması için kullanılan bir yöntemdir. Prosedür sırasında PCR protokolü kullanılırken DNA miktarının her amplifikasyon sonrası ölçülmesi, reaksiyona "Real Time" yaklaşımını kazandırmaktadır. DNA ölçümü sırasında çift sarmal DNA'ya yapışan floresan boyalar veya DNA ile birleştiğinde floresan veren modifiye oligonükleotitler kullanılmaktadır. Amplifikasyon sonucunda oluşan DNA molekülü (amplikon) ile doğru orantılı olarak floresan ışımaya meydana gelmektedir.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için sadece DNA örnekleri kullanılmaktadır. Ancak, hücrelerden elde edilen RNA'lar Polimeraz zincir reaksiyonunda doğrudan kullanılmadıklarından, önce revers transkriptaz (RT) ile komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilirler. Bu olaya revers transkripsiyon denir (Bustin, 2000).

Sekansa bağımlı ölçüm tekniklerinde sadece PCR sırasında oluşan ürünün sekansına özgü oligonükleotid hibridizasyon problemlerine bağlanan floroforlar kullanılır. Örneğin;

- Tek işaretli problemler (SimpleProb)
- Hibridizasyon problemler (HybProbe)
- Hidroliz problemler (TaqMan, Moleküler Beacons ve Scorpions)

TaqMan sistemi prob hidrolizi olarak da tanımlanmaktadır. Sistemde bir proba bağlı iki floresan boya kullanılmaktadır. Probun 5'-ucuna raportör (haber veren) ve 3'- ucuna baskılayıcı floresan boyalar ilave edilmiştir. Bu prob, ekspresyonuna bakılacak gen mRNA'sı için spesifiktir ve mRNA spesifik oligo primer bağlanma sekansının önünde yer alacak şekilde düzenlenmiştir. Ekspresyonuna bakılacak gen mRNA'sı için kullanılan oligo primerler, denatüre olmuş primer, spesifik cDNA sekansına bağlanır ve bunu takiben DNA polimeraz, oligo primeri kullanarak mRNA karşıt zincirini sentezlemeye başlar. Kullanılan DNA polimeraz enzimi 5' nükleaz aktivitesine sahiptir. Hazırlanan probun ucundaki boyalar mRNA sekansına bağlandıklarında herhangi bir ışımaya vermemektedir. mRNA sekans dizisini çoğaltan DNA polimeraz, prob ile karşılaştığında, probun 5' ucundaki boyanın hidrolize olmasına neden olur ve buna bağlı olarak da bir ışımaya meydana gelmektedir (**Şekil 10**) (Holland ve ark., 1991). Bu ışımamın miktarı ekspresyonuna bakılacak gen mRNA miktarı ile doğru orantılıdır.



Şekil 12. TaqMan Tekniğinin Aşamaları (Karabıyık, 2011)

Probun iki ucunda floresan raportör ve baskılayıcı boyalar bulunmaktadır. Bu boyalar birbirlerini baskırlar. Uzama esnasında prob kırılır ve boyaların birbiri üzerindeki baskısı kalkar ve ışımaya gözlenir (Karabıyık, 2011).

Niceliksel ölçümde miktarı belirlenmek istenen örnekler, içerdiği cDNA miktarı bilinen standartlarla PCR sonunda karşılaştırılmaktadır. Bu standartların amplifikasyonları, her dokuda aynı ifade edilen genlerle (housekeeping genler) gerçekleştirilir. Housekeeping genler; bir tür veya organizmanın her hücresi için her zaman sabit düzeylerde eksprese olan genlerdir. Kesişme noktası (Crossing point: CP) her döngüde eşit miktarda PCR ürününün oluştuğu noktayı ifade etmektedir. Bu standart örneklerin eşik değerine (CP) girdikleri döngü, PCR cihazı tarafından saptanmaktadır ve miktarı belirlenmek istenen esas örneklerle karşılaştırılmaktadır. Reaksiyon sonunda, standartların eşik değerleri belirlenerek bir eğri oluşturulur. Miktarları bilinmeyen örneklerin bu eğriyi kestiği döngüler belirlenerek miktar sayımı yapılabilmektedir. Göreceli (relative) sayıma göre çalışılacak her iki örnek için farklı karışım hazırlanır. Bu karışımlardan birinde housekeeping genlerine ait primerler bulunurken, diğerinde hedef genin primerleri

bulunmaktadır. PCR sonunda hedefgenin değeri, referans genin değerine oranlanarak ölçülür ve normalize edilir.

Metodun uygulanışı

Bu yöntemde total RNA'dan cDNA sentezi ve kalıp cDNA'dan da VEGFA geninin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Housekeeping gen olarak GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase) kullanılmıştır.

Total RNA izolasyonu

Pazopanib konsantrasyonları ile A549 ve HUVEC hücrelerinin inkübasyonundan sonra, total RNA izolasyon robotu MagNA Pure Compact (Roche) kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmıştır. Pazopanibin IC₅₀ konsantrasyon değerleri temel alınarak 2.5, 50 ve 200 µM konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat inkübe edilen A549 ve HUVEC hücrelerinden, total RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA verimi Nanodrop cihazı kullanılarak 260 nm ve 280 nm optik dansitede spektrofotometrik ölçüm yapılarak belirlenmiştir. Daha sonra cDNA sentezi için her bir örnekten eşit miktarda RNA (100 ng/örnek) PCR aşaması için kullanılmıştır.

cDNA sentezi

Genlerin mRNA ekspresyonlarına bakabilmek için ilk olarak elde edilen total RNA'ların komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilmesi gerekmektedir. RNA izolasyondan sonra 'Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit' Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak reverse transkripsiyon (RT) reaksiyonu ile cDNA eldesi sağlanmıştır. Bu işlem için tüm total RNA havuzundaki küçük poli(A) havuzuna spesifik primerler olan oligo (dT) primerler kullanılmıştır. Her bir PCR tüpüne örnek başına 100 ng total RNA, 1 µl Oligo (dT)₁₈ primeri (2.5 µM) konulmuş ve toplam hacim 11.4 µl'ye distile su ile tamamlanmıştır. Her bir örnek tüpü 10 dakika 65°C'de ısıtılarak kalıp-primer karışımı denature edilmiştir. Tüp içeriğine, 4 µl Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer (1X ve 8 mM MgCl₂ içerir), 0.5 µl RNase inhibitörü (20 U), 2 µl dNTP karışımı (her biri 10mM), 1 µl DTT (5mM), 1.1 µl Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase (10U) ilave edilerek toplam hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır. Daha sonra tüpler 55°C'de 30 dk, 85 °C'de 5dk PCR Thermal Cycler cihazında inkübe edilmiştir. Elde edilen cDNA'lar, Real Time-PCR'da amplifikasyon için kullanılmıştır.

RT-PCR (Real time PCR) ile mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi

RT-PCR ile A549 ve HUVEC hücre hatları üzerinde 2.5, 50 ve 200 µM pazopanib konsantrasyonlarında VEGFA mRNA ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. RT-PCR yöntemi, cihaza uygun kit ve primerler kullanılarak tek adımda uygulanmıştır. Elde edilen cDNA'lar, LightCycler® 480 RT-PCR cihazında, VEGF genine spesifik TaqMan'lı primer ve PCR kit kullanılarak kit

protokolüne göre her bir örnekten 3 tekrar olacak şekilde, cihazda optimize edilerek çoğaltılmıştır. Housekeeping gen olarak GAPDH kullanılmıştır.

Light Cycler PCR 480' e uyumlu 96'lık clear plakalara sırasıyla;

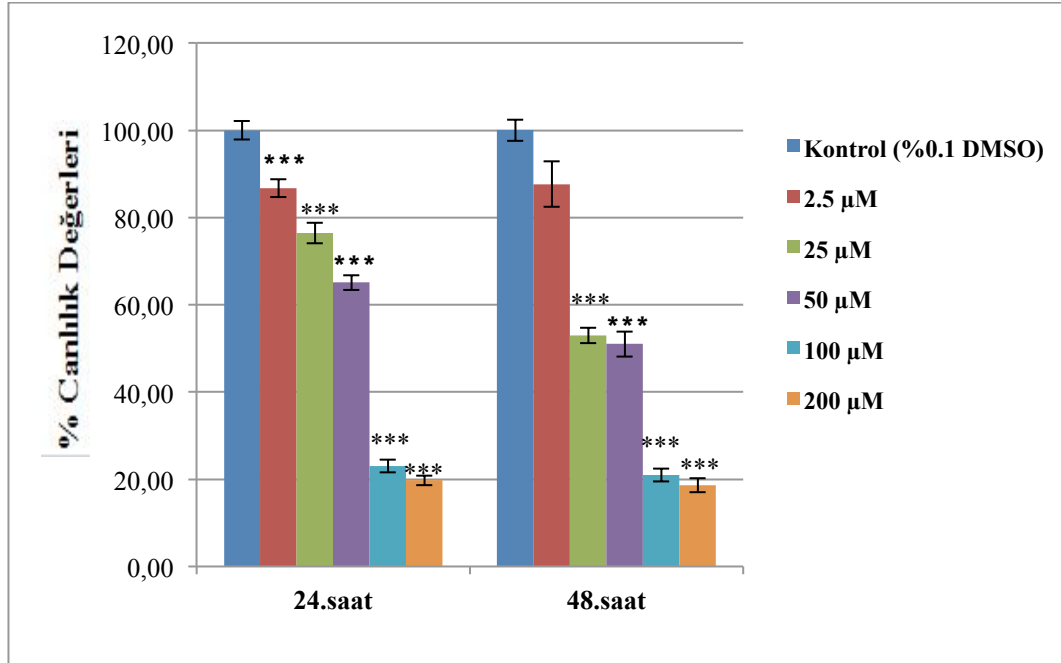
H₂O	4 µl
Prob Master	10 µl
Primer (Taqman'lı) (R Primer ve F Primer Karışımı)	1 µl
cDNA	5 µl

kimyasalları yüklenmiştir. Hazırlanan bu karışım 96'lık plakaya VEGFA ve GAPDH için ayrı ayrı yüklenmiştir. Yükleme işleminden sonra 96'lık plaka Light Cycler 480 cihazına yerleştirilip örneklerin niceliksel ölçüm miktarları belirlenmiştir. Sonuçlar 'Advanced Relative Quantification' programı kullanılarak, pazopanibin VEGFA ekspresyonu üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Pazopanibin A549 ve HUVEC Hücrelerinde Sitotoksik Etkilerinin MTT Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Pazopanib konsantrasyonlarının A549 ve HUVEC hücrelerinde, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak önemli sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Kontrol ve 2.5, 25, 50, 100, 200 µM pazopanib konsantrasyonlarına ait MTT sonuçları ELİZA cihazında 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Daha sonra her bir gruba ait 24 ve 48. saatlik % canlılık değerleri hesaplanmıştır. Renk oluşumuna göre alınan absorbans değerleri, hücre canlılığı ile direkt olarak ilişkilendirilmektedir. Gruplara ait % canlılık değerleri sonuçları Şekil 13 ve Şekil 14 ile Tablo 4 ve Tablo 5’de verilmiştir.



Şekil 13. Pazopanib Konsantrasyonlarının, A549 Hücre Hattında MTT Sonuçlarına Göre 24 ve 48. Saat % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi (n=8; ort±st.sapma)

MTT analizi sonucunda, Şekil 13’de görüldüğü gibi pazopanibin konsantrasyon ve zaman artışına paralel olarak % canlılık değerlerinde önemli derecede azalmalar görülmüştür ($p < 0.001$ ***).

A549 hücrelerinde 24 saatlik % canlılık değeri, kontrol grubuna göre 2.5, 25, 50, 100 ve 200 µM pazopanib konsantrasyonlarında sırasıyla % 86.71, 76.41, 65.11, 23.05 ve 19.73 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri, kontrol grubuna göre tüm pazopanib konsantrasyonlarında $p < 0.001$ *** olarak belirlenmiştir.

A549 hücrelerinde 48 saatlik % canlılık değeri ise, kontrol grubuna göre 2.5, 25, 50, 100 ve 200 µM pazopanib konsantrasyonlarında sırasıyla % 87.67, 52.97, 51.01, 20.94 ve 18.63 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri, kontrol

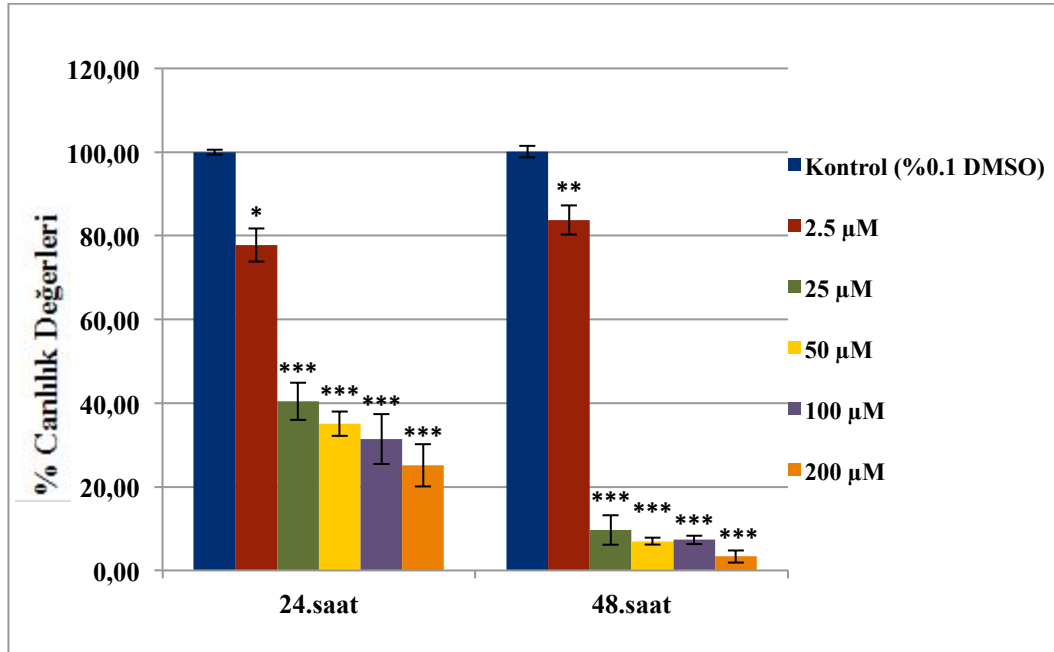
grubuna göre 25, 50, 100 ve 200 µM pazopanib konsantrasyonlarında $p < 0.001$ *** olarak belirlenmiştir.

Tablo 4' de A549 hücrelerinde pazopanib konsantrasyonlarının MTT sonuçlarına göre hesaplanan % inhibisyon değerleri verilmiştir.

Tablo 4. MTT Sonuçlarına Göre Pazopanibin A549 Hücre Hattı Üzerindeki % İnhibisyon Değerleri (Kontrol % İnhibisyonu 0'dır)

% İnhibisyon Değerleri (A549-pazopanib)		
Konsantrasyonlar (µM)	24.saat	48.saat
2.5	13.29	12.33
25	23.59	47.03
50	34.89	48.99
100	76.95	79.06
200	80.27	81.37

Tablo 4'deki sonuçlara göre; A549 hücre hattı üzerinde kontrole göre 24. saatte; 2.5 µM pazopanib konsantrasyonunda %13.29; 25 µM'da %23.59; 50 µM'da %34.89; 100 µM'da %76.95 ve 200 µM'da %80.27 oranında hücre proliferasyonunda azalma meydana gelmiştir. Bu sitotoksik etkinin kontrole göre 48. saatte; 2.5 µM konsantrasyonda %12.33; 25 µM'da %47.03; 50 µM'da %48.99; 100 µM'da %79.06 ve 200 µM'da %81.37 oranında olduğu belirlenmiştir.



Şekil 14. Pazopanib Konsantrasyonlarının, HUVEC Hücre Hattında MTT Sonuçlarına Göre 24 ve 48. Saat % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi (n=8; ort±st.sapma)

MTT analizi sonucunda, **Şekil 14**'de görüldüğü gibi HUVEC hücrelerinde pazopanibin konsantrasyon ve zaman artışına paralel olarak % canlılık değerlerinde önemli derecede azalmalar görülmektedir ($p < 0.001^{***}$).

24. saatteki % canlılık değeri HUVEC hücrelerinde, kontrol grubuna göre 2.5, 25, 50, 100 ve 200 μM pazopanib konsantrasyonlarında sırasıyla % 77.80, 40.40, 35.10, 31.41 ve 25.12 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri, kontrol grubuna göre 2.5 μM pazopanib konsantrasyonunda $p < 0.05^*$ iken 25, 50, 100 ve 200 μM konsantrasyonlarda da $p < 0.001^{***}$ olarak belirlenmiştir.

48. saatteki % canlılık değeri HUVEC hücrelerinde kontrol grubuna göre 2.5, 25, 50, 100 ve 200 μM pazopanib konsantrasyonlarında sırasıyla % 83.79, 9.63, 6.98, 7.34 ve 3.36 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri, kontrol grubuna göre 2.5 μM pazopanib konsantrasyonunda $p < 0.01^{**}$, 25, 50, 100 ve 200 μM pazopanib konsantrasyonlarda ise $p < 0.001^{***}$ olarak belirlenmiştir.

Tablo 5'de HUVEC hücrelerinde pazopanib konsantrasyonlarının MTT sonuçlarına göre hesaplanan % inhibisyon değerleri verilmiştir.

Tablo 5. MTT Sonuçlarına Göre Pazopanibin HUVEC Hücre Hattı Üzerindeki % İnhibisyon Değerleri (Kontrol % İnhibisyonu 0'dır)

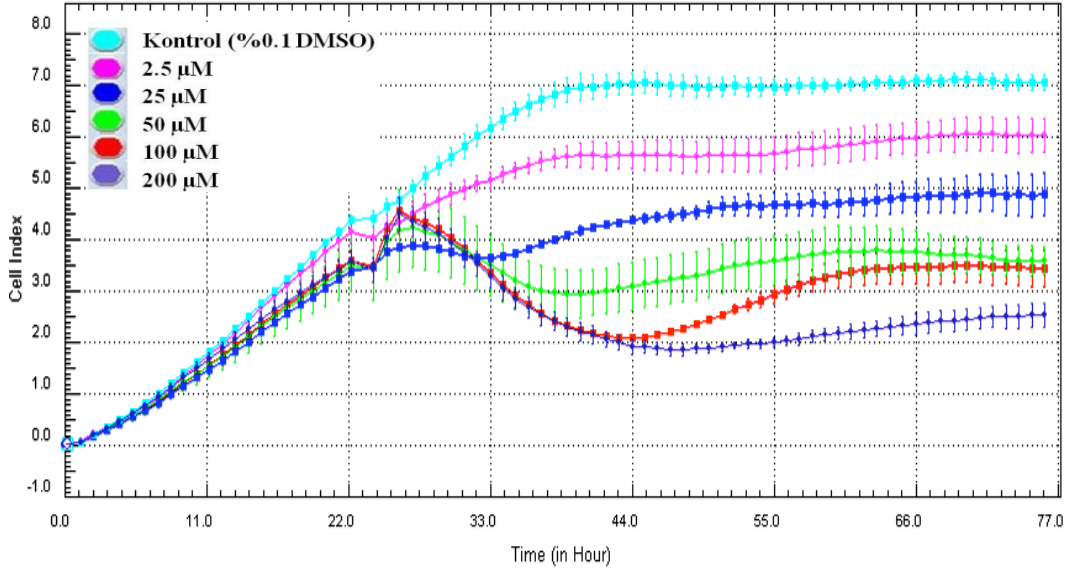
Konsantrasyonlar (μM)	% İnhibisyon Değerleri (HUVEC-pazopanib)	
	24.saat	48.saat
2.5	22.2	16.21
25	59.6	90.37
50	64.9	93.02
100	68.59	92.66
200	74.88	96.64

Tablo 5'deki sonuçlara göre; HUVEC hücre hattı üzerinde kontrole göre 24. saatte; 2.5 μM pazopanib konsantrasyonunda %22.2; 25 μM 'da %59.6; 50 μM 'da %64.9; 100 μM 'da %68.59 ve 200 μM 'da %74.88 oranında hücre proliferasyonunda azalma meydana gelmiştir. Bu sitotoksik etkinin kontrole göre 48. saatte; 2.5 μM konsantrasyonda %16.21; 25 μM 'da %90.37; 50 μM 'da %93.02; 100 μM 'da %92.66 ve 200 μM 'da %96.64 oranında olduğu belirlenmiştir.

Pazopanibin A549 ve HUVEC Hücrelerinde Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) Kullanılarak Belirlenmesi

Bu sistem kullanılarak 16'lık altın ve elektrot kaplı plakaların her bir kuyucuğuna 1×10^4 sayıda A549 ve HUVEC hücreleri ekilmiş ve hücrelerin büyüme ve çoğalma eğrileri belirlenmiştir. Daha sonra, log fazına girmiş hücrelere pazopanib konsantrasyonları uygulanmış ve sitotoksik etkileri, hücre büyümesi, çoğalması belirli zaman aralıklarında, gerçek zamanlı olarak, konsantrasyon ve hücre

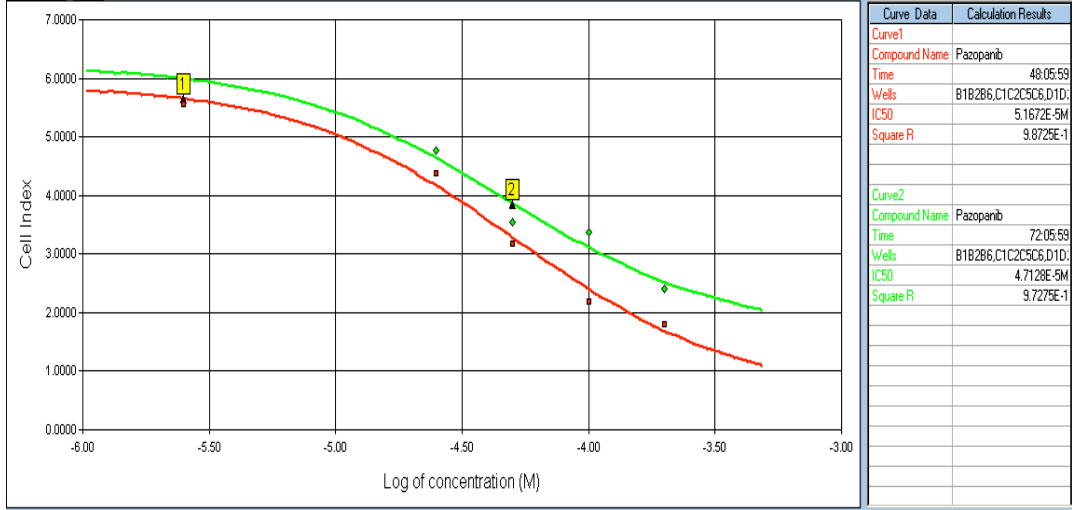
gruplarına göre, bilgisayar bağlantılı sistemle eş zamanlı olarak izlenmiştir. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA DP) pazopanibin 2.5, 25, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarının hücreler üzerinde zamana bağlı olarak hücre indeks grafiği ve IC₅₀ değerleri cihazın RTCA DP Software 1.2.1 programı kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 15. Pazopanibin A549 Hücreleri Üzerinde Antiproliferatif Etkisinin RTCA DP’de İzlenmesi (n=6; ort±st.sapma)

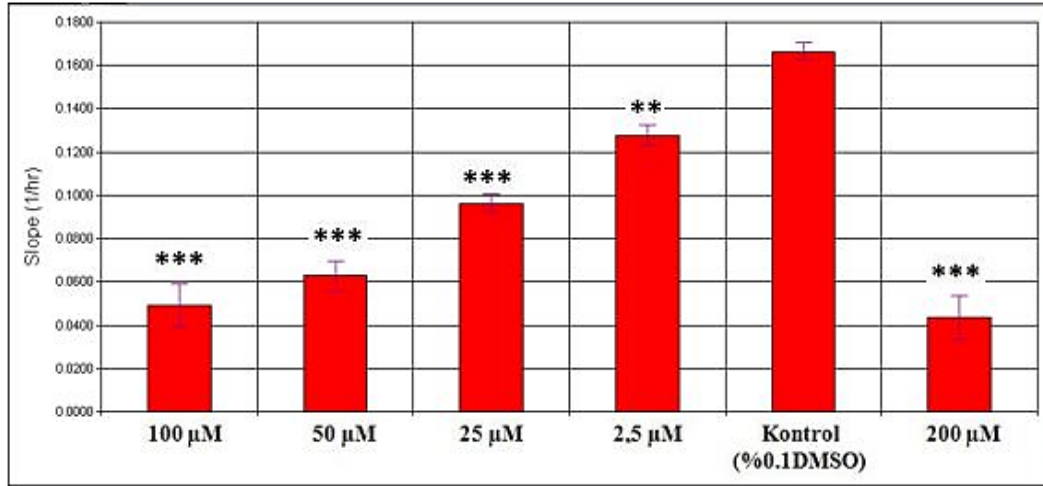
Şekil 15’de görüldüğü gibi pazopanib konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak antiproliferatif etkilerde artış gözlenmiştir. 25 µM pazopanib konsantrasyonu madde uygulanmasından hemen sonra etkisini göstermemiştir. 50, 100 ve 200 µM pazopanib konsantrasyonlarının uygulandıktan sonra 24. saatte hücre proliferasyonuna etkisi diğer konsantrasyonlara göre daha etkili olmuştur. Yüksek konsantrasyonların ilk etkisi ise birbirine benzerdir.

Büyüme ve çoğalma eğrilerinden sonra cihazın RTCA DP Software 1.2.1 programında IC₅₀ değerleri analiz edilmiştir. Analiz sisteminde variable slope (değişken eğim) ile hesaplanan IC₅₀ değerlerine göre pazopanib konsantrasyonu uygulanan A549 hücrelerinin 24 saat sonraki IC₅₀ değeri; 51,6 µM; 48 saat sonraki IC₅₀ değeride 47,1 µM olarak belirlenmiştir (Şekil 16).

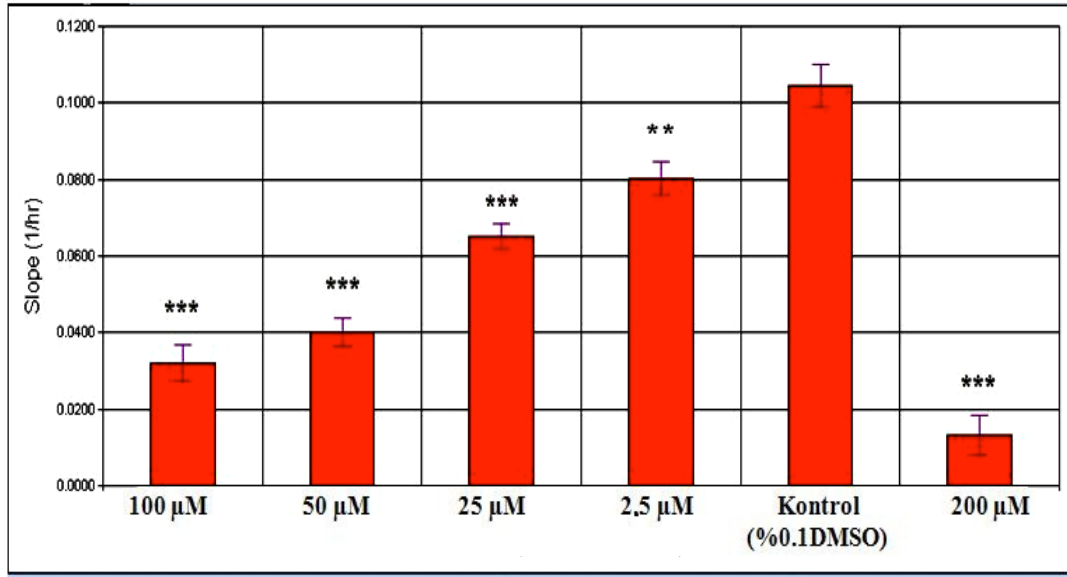


Şekil 16. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde Pazopanibin A549 Hücre Hattı Üzerinde 24 ve 48. Saatteki IC₅₀ Değerlerinin Analizi (n=6; ort±st.sapma)

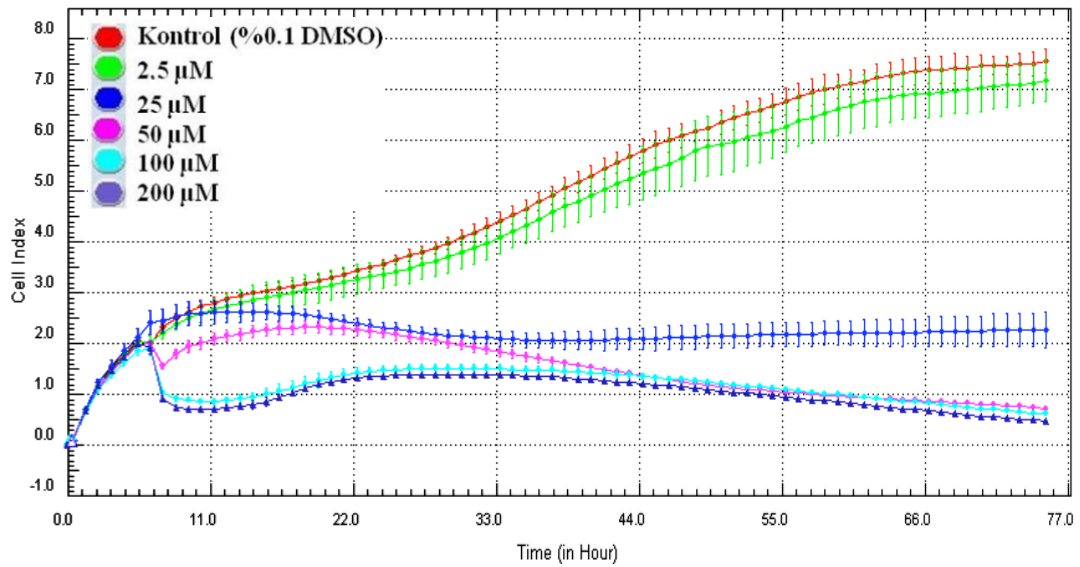
RTCA DP cihazı ile hesaplanan hücre indeks değerlerine göre slope (eğim) grafikleri Şekil 17 ve Şekil 18'de gösterilmiştir.



Şekil 17. RTCA DP Sisteminde A549 Hücrelerinde Pazopanib Konsantrasyonlarının 24 Saat Sonraki Slope Değerleri (n=6; ort±st.sapma)



Şekil 18. RTCA DP Sisteminde A549 Hücrelerinde Pazopanib Konsantrasyonlarının 48 Saat Sonraki Slope Değerleri (n=6; ort±st.sapma)

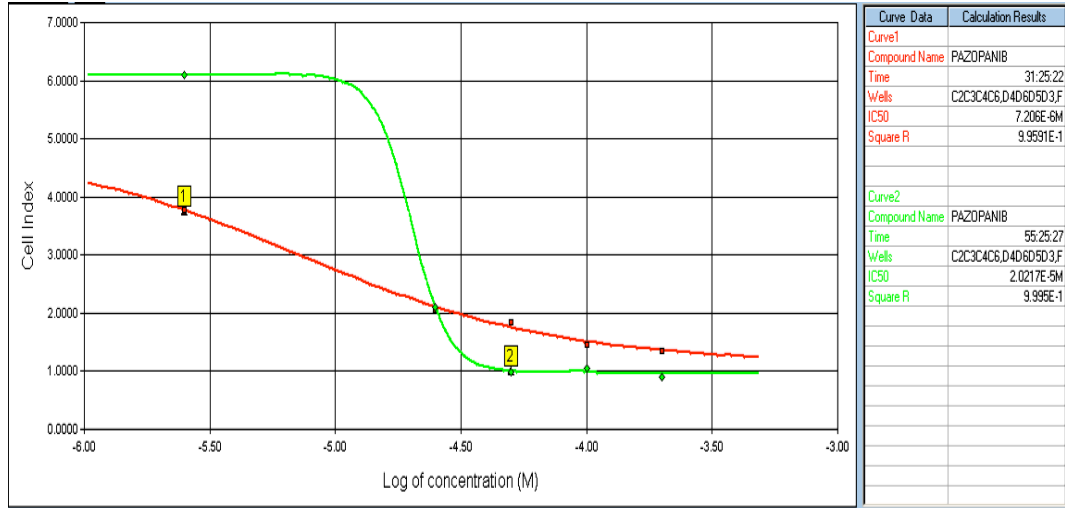


Şekil 19. Pazopanibin HUVEC Hücreleri Üzerinde Antiproliferatif Etkisinin RTCA DP'de İzlenmesi (n=6;ort±st.sapma)

HUVEC hücreleri üzerinde pazopanibin yüksek konsantrasyonlarında önemli antiproliferatif etki meydana gelmiştir. Şekil 19'da görüldüğü gibi 2.5 µM pazopanib konsantrasyonu HUVEC hücrelerinde önemli bir antiproliferatif etki göstermemiştir. Ancak 25, 50, 100 ve 200 µM pazopanib konsantrasyonları zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu önemli derecede azaltmıştır. En önemli antiproliferatif etkiler 50, 100 ve 200 µM pazopanib konsantrasyonlarında görülmüştür.

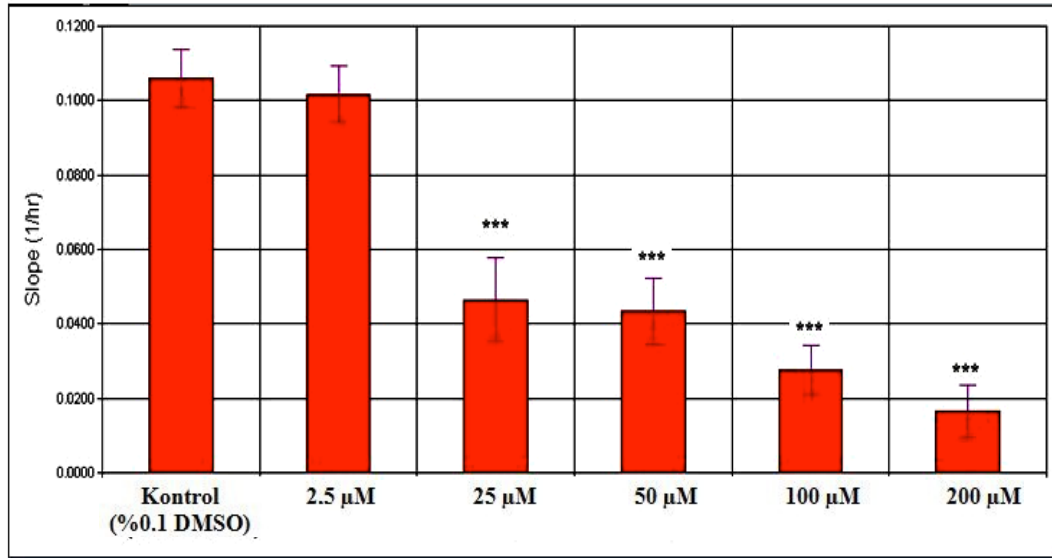
Büyüme ve çoğalma eğrilerinden sonra cihazın RTCA DP Software 1.2.1 programında IC₅₀ değerleri analiz edilmiştir. Analiz sisteminde variable slope ile hesaplanan IC₅₀ değerlerine göre pazopanib konsantrasyonu uygulanan HUVEC

hücrelerinin 24 saat sonraki IC₅₀ değeri; 72 µM; 48 saat sonraki IC₅₀ değeri 20,2 µM olarak belirlenmiştir (Şekil 20).

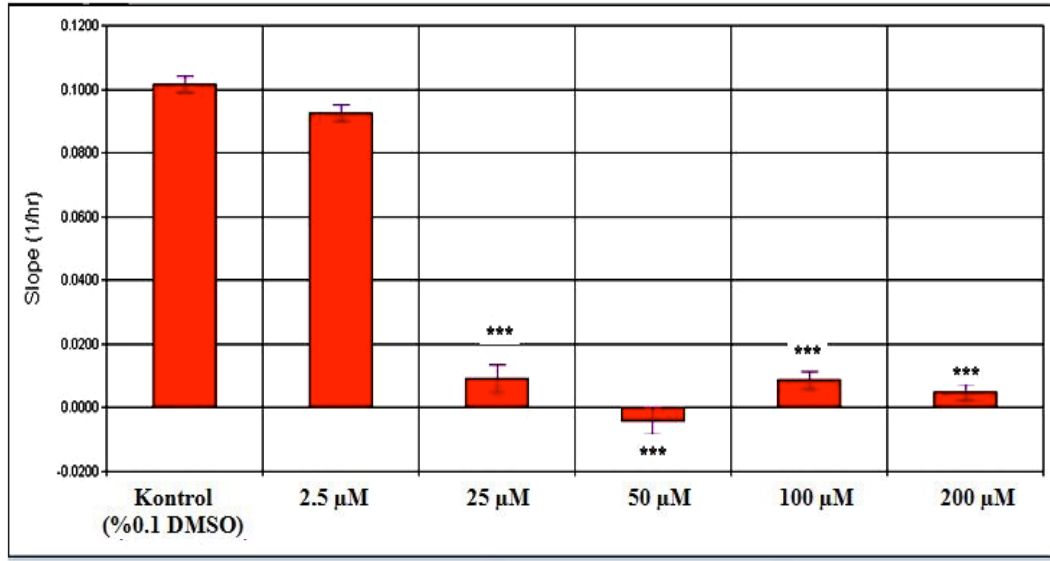


Şekil 20. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde Pazopanibin HUVEC Hücre Hattı Üzerinde 24 ve 48. Saatteki IC₅₀ Değerlerinin Analizi (n=6; ort±st.sapma)

RTCA-DP cihazı ile hesaplanan hücre indeks değerlerine göre slope grafikleri Şekil 21 ve Şekil 22' de gösterilmiştir.



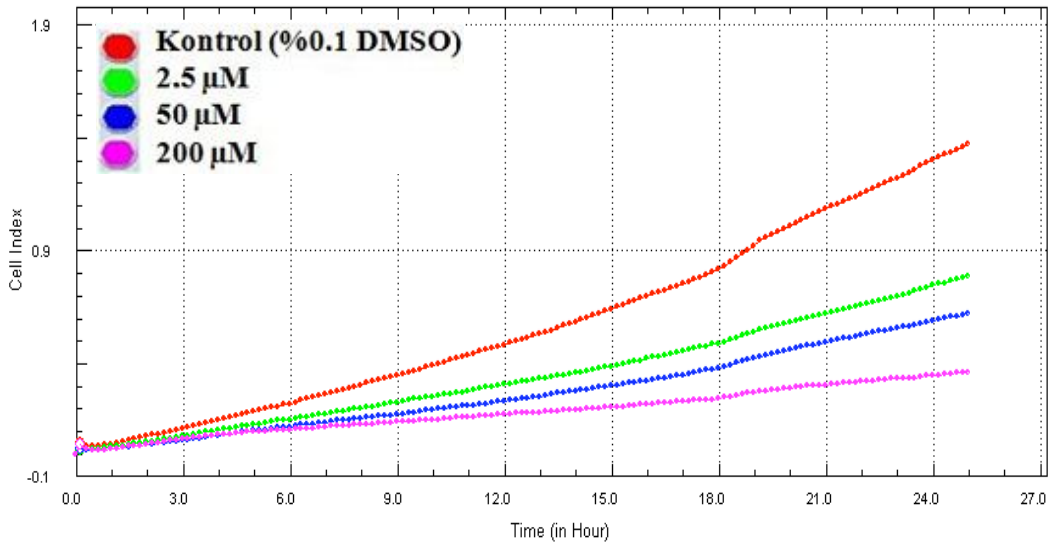
Şekil 21. RTCA DP Sisteminde HUVEC Hücrelerinde Pazopanib Konsantrasyonlarının 24 Saat Sonraki Slope Değerleri (n=6; ort±st.sapma)



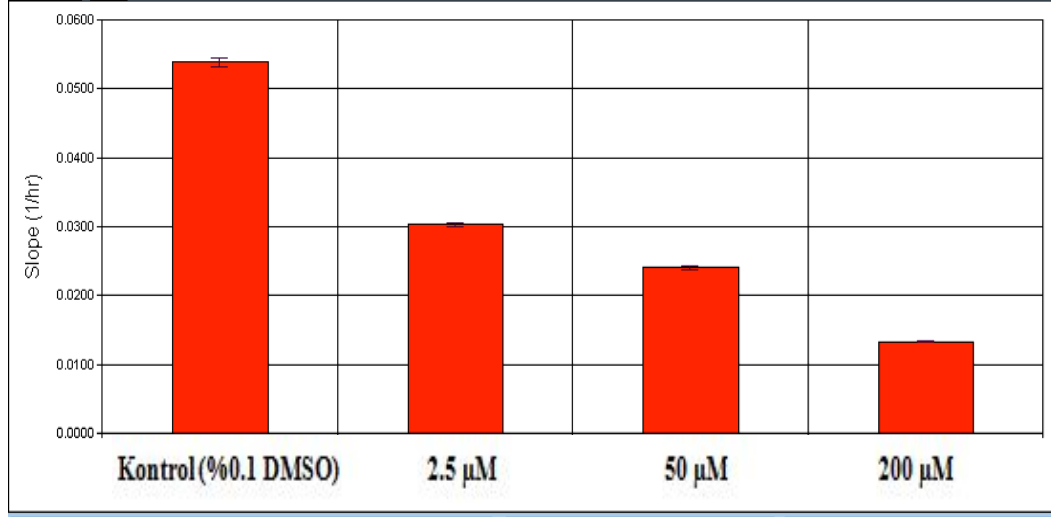
Şekil 22. RTCA DP Sisteminde HUVEC Hücrelerinde Pazopanib Konsantrasyonlarının 48 Saat Sonraki Slope Değerleri (n=6; ort±st.sapma)

Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde A549 ve HUVEC Hücrelerinin İnvazyon Çalışmaları

Bu invazyon çalışmasında, RTCA DP'de ki proliferasyon eğrilerine ve hücre indeks değerleri ile hesaplanan slope grafiklerine göre IC₅₀ değerimize en yakın olan 50 µM pazopanib konsantrasyonu ile en yüksek (200 µM) ve en düşük (2.5 µM) pazopanib konsantrasyonlarının hücre invazyonuna olan etkileri araştırılmıştır. İnvazyon çalışmasında CIM plakanın üst odacıkları %5 oranında matrijel ile kaplanmıştır ve her kuyucuğa 2x10⁴ hücre ekilmiştir.

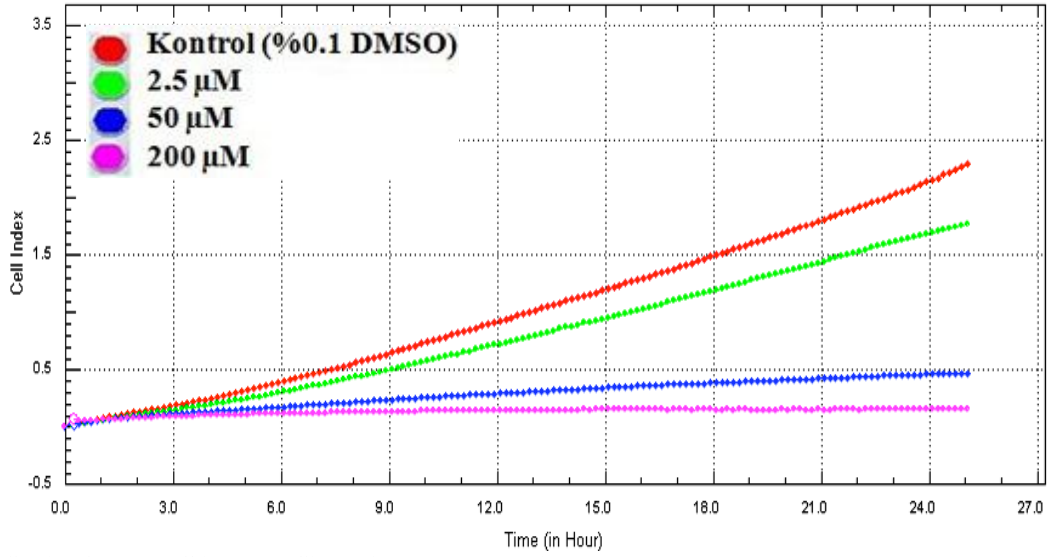


Şekil 23. RTCA DP Sisteminde Pazopanib Konsantrasyonları Uygulanan A549 Hücrelerinin İnvazyon Grafiği

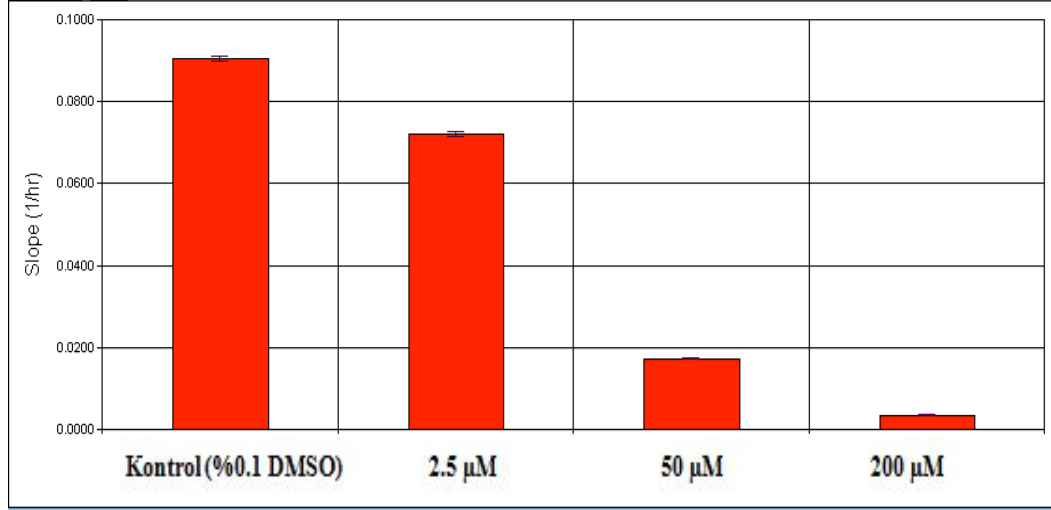


Şekil 24. RTCA DP Sisteminde Pazopanib Konansantrasyonları Uygulanan A549 Hücrelerinin İnvazyon Slope Grafiği

Şekil 23 ve Şekil 24’de görüldüğü gibi pazopanib konansantrasyonunun artışına bağılı olarak A549 hücrelerinin invazyonunda azalma görülmüştür. İnvazyon üzerine en fazla olumsuz etki 200 µM pazopanibkonansantrasyonunda olduğu belirlenmiştir.



Şekil 25. RTCA DP Sisteminde Pazopanib Konansantrasyonları Uygulanan HUVEC Hücrelerinin İnvazyon Grafiği

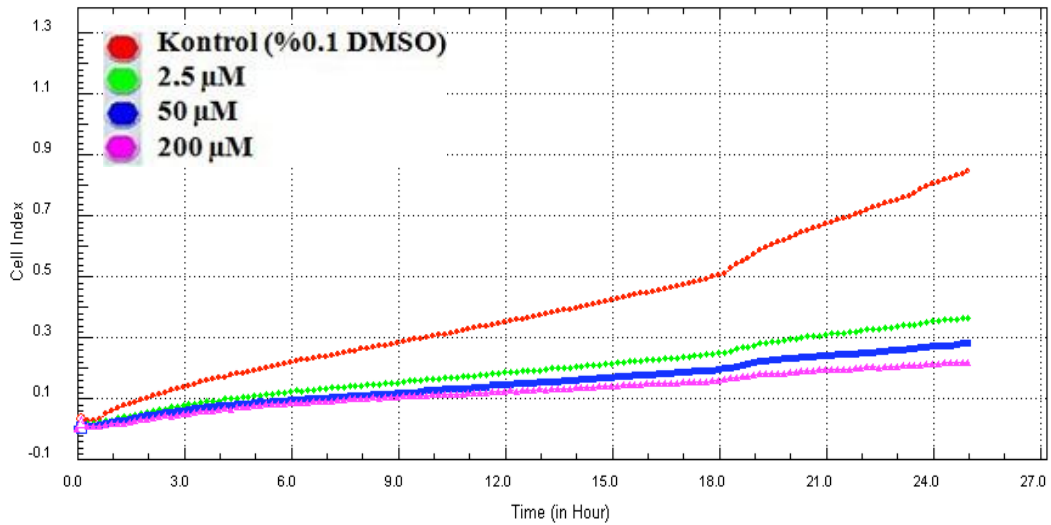


Şekil 26. RTCA DP Sisteminde Pazopanib Konansantrasyonları Uygulanan HUVEC Hücrelerinin İnvazyon Slope Grafiği

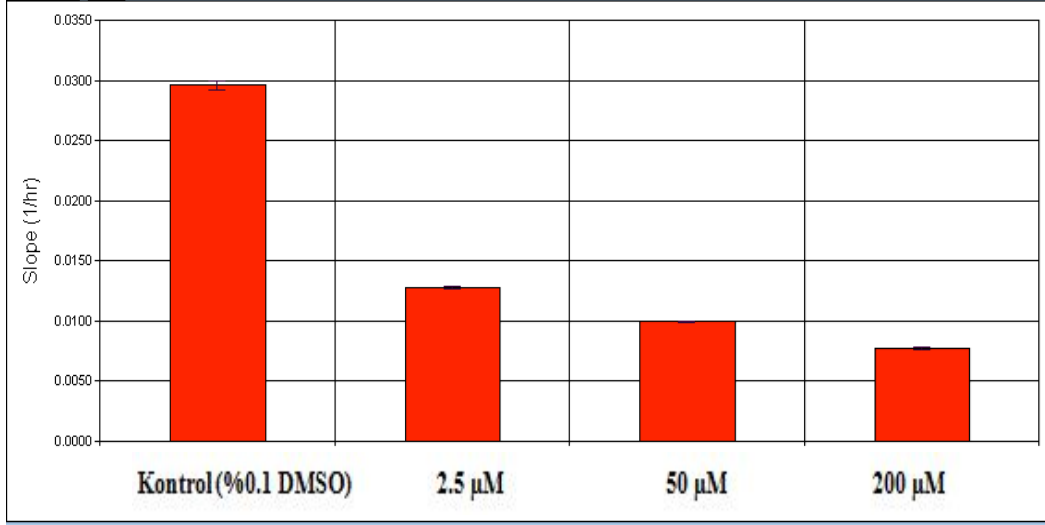
Şekil 25 ve Şekil 26’da görüldüğü gibi pazopanib konansantrasyonlarının artışına bağılı olarak HUVEC hücrelerinde hücre invazyonunda azalma görülmüştür. İnvazyon üzerine en fazla olumsuz etki 200 µM pazopanib konansantrasyonunda olduğı belirlenmiştir.

Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde A549 ve HUVEC Hücrelerinin Migrasyon Çalışmaları

Bu migrasyon çalışmasında, proliferasyon eğrilerine ve hücre indeksi ile hesaplanan slope grafiklerine göre IC₅₀ değerimize en yakın olan 50 µM pazopanib konansantrasyonu ile en yüksek (200 µM) ve en düşük (2.5 µM) pazopanib konansantrasyonlarının hücre migrasyonuna olan etkileri araştırılmıştır. İnvazyon çalışmasına paralel olarak migrasyon çalışmasında da pazopanibin 2.5, 50 ve 200 µM konansantrasyonları uygulanmış ve iki odacıklı bir sistem olan CIM plakanın üst odacığının her bir kuyucuğuna 2x10⁴ hücre ekilmiştir.

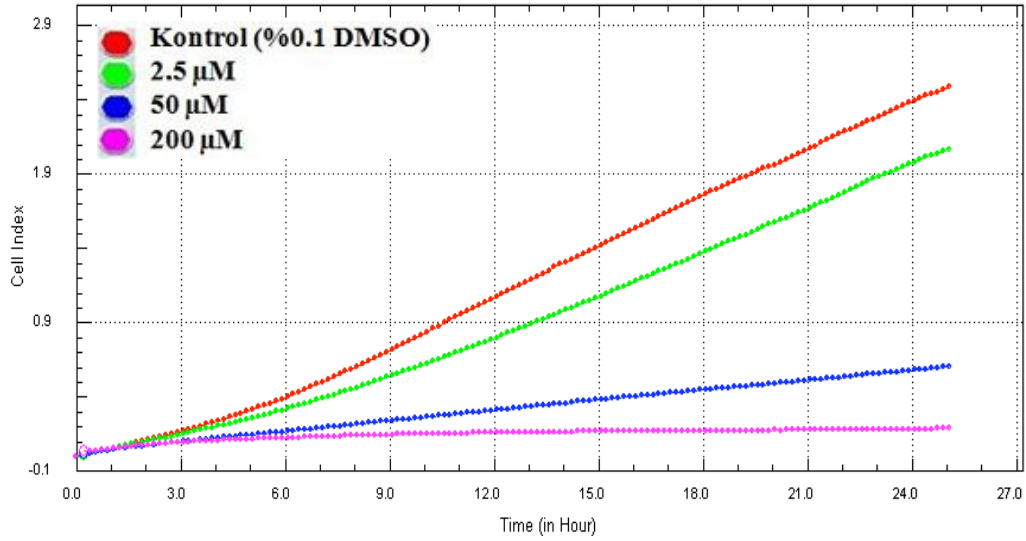


Şekil 27. RTCA DP Sisteminde Pazopanib Konansantrasyonları Uygulanan A549 Hücrelerinin Migrasyon Grafiği

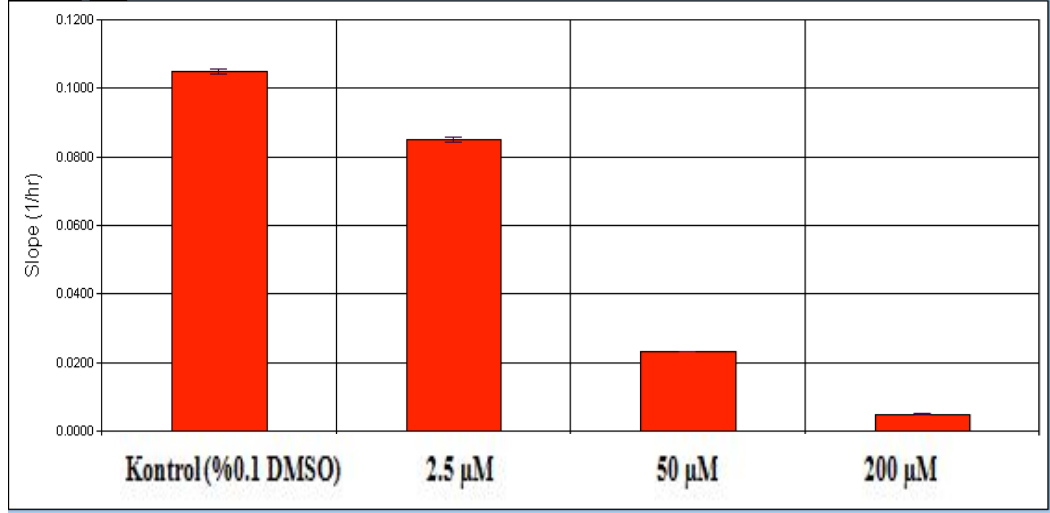


Şekil 28. RTCA DP Sisteminde Pazopanib Konansantrasyonları Uygulanan A549 Hücrelerinin Migrasyon Slope Grafiği

Şekil 27 ve Şekil 28’de görüldüğü gibi, A549 hücrelerine uygulanan pazopanib konansantrasyonlarının etkileri benzerdir ve kontrole göre migrasyonu azaltmışlardır.



Şekil 29. RTCA DP Sisteminde Pazopanib Konansantrasyonları Uygulanan HUVEC Hücrelerinin Migrasyon Grafiği



Şekil 30. RTCA DP Sisteminde Pazopanib Konsantrasyonları Uygulanan HUVEC Hücrelerinin Migrasyon Slope Grafiği

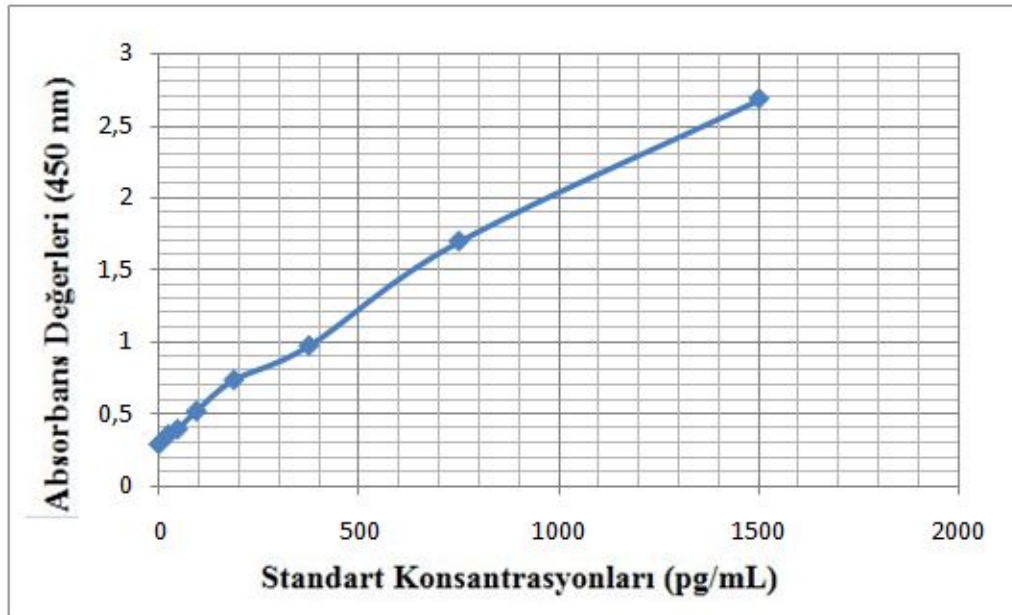
Şekil 29 ve Şekil 30’ da görüldüğü gibi 50 µM pazopanib konsantrasyonu migrasyonu önemli bir derecede azaltmıştır ve 200 µM pazopanib konsantrasyonunun migrasyona etkisi olmamıştır.

A549 ve HUVEC Hücrelerinde Pazopanibin VEGF Üzerine Etkisinin ELİZA Yöntemi ile Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında pazopanibin anjiyojenez ile ilişkisini araştırmak için farklı pazopanib konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edilen (2.5, 50 ve 200 µM konsantrasyonlar invazyon ve migrasyon çalışması ile paraleldir) A549 ve HUVEC hücre ekstraktlarındaki hücre içi VEGF miktarları ELİZA yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. VEGF miktarını belirlemek için önce belirli VEGF standartlarının ELİZA’da analizlerine göre bir standart eğri çizilmiştir (Şekil 31). Bu eğrinin hazırlanmasında kit içeriğinde yer alan ve VEGF miktarı bilinen standartlar kullanılmıştır. Çalışmamız sonucunda standartlara ait okuduğumuz absorbans sonuçları ile kit içeriğinde verilen standartlara ait absorbans sonuçları karşılaştırılarak, çalışmanın doğruluğu belirlenmiştir. Daha sonra VEGF miktarı bilinen standartlardan hazırlanan grafikten, pazopanib konsantrasyonları uygulanan A549 ve HUVEC hücre ekstraktlarına ait örneklerin absorbanslarına karşılık gelen hücre içi VEGF miktarları hesaplanmıştır.

Tablo 6. Standart Konsantrasyonlarının Absorbans Değerleri

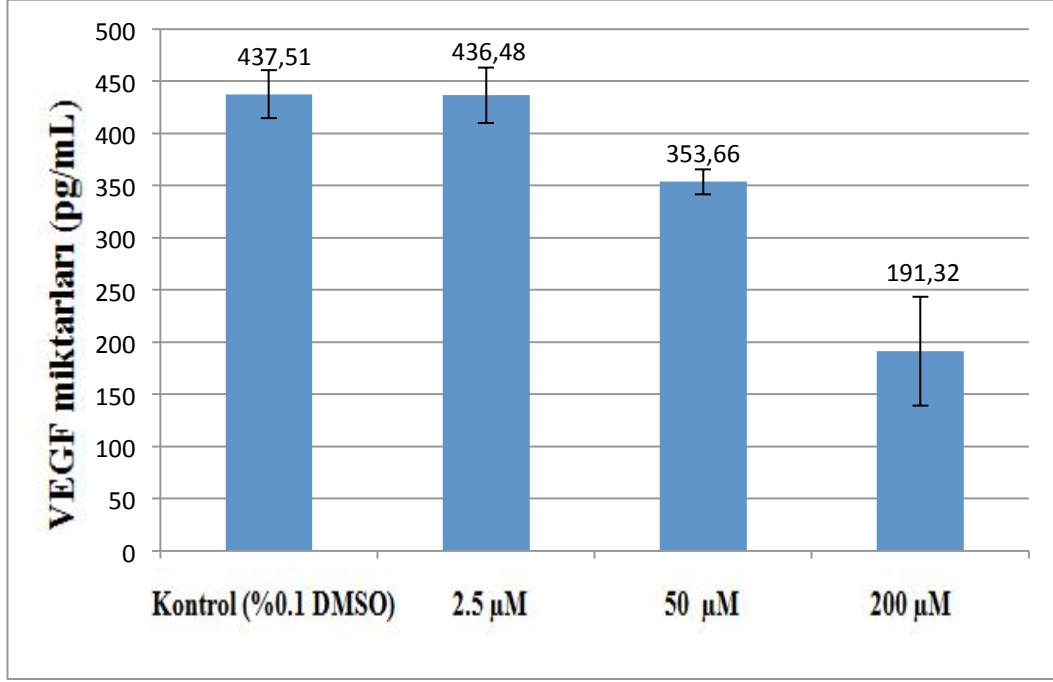
Standart Konsantrasyonları(pg/mL)	450 nm Dalga Boyundaki Absorbans Değer Aralığı
0	0.2865
23.4	0.3525
46.9	0.39
93.8	0.5155
188	0.7325
375	0.97
750	1.694
1500	2.6815



Şekil 31. VEGF Standartlarının ELİZA’da Ölçülen Absorbans Değerlerine Göre VEGF Miktarları (n=5; ort±st.sapma)

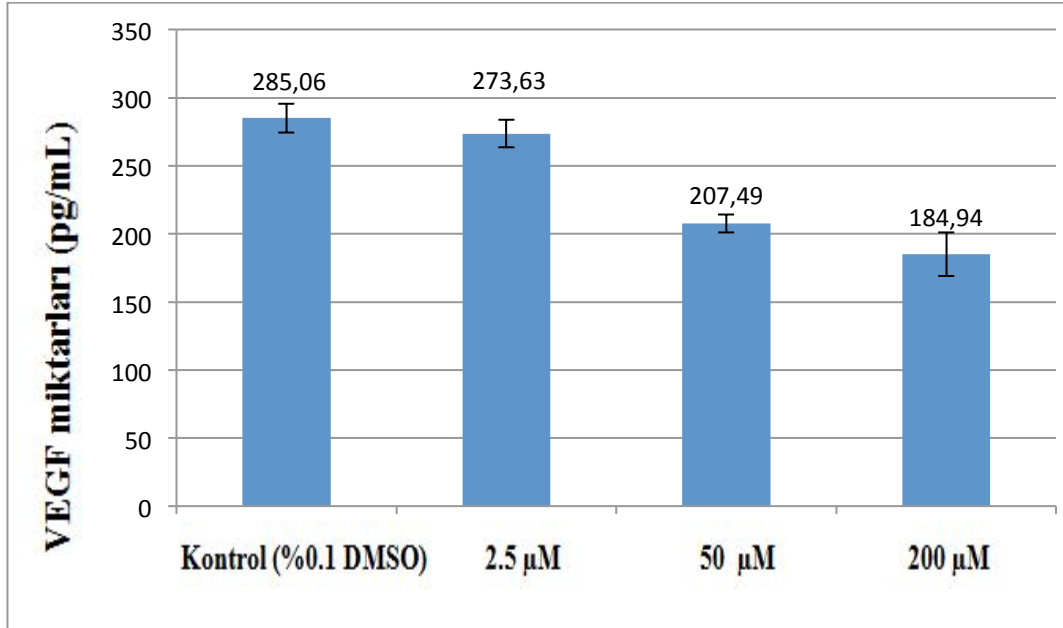
A549 hücrelerinde pazopanib konsantrasyonlarının 24 ve 48 saatlik inkübasyonu sonunda, konsantrasyon artışına bağlı olarak VEGF miktarında azalma meydana getirdiği belirlenmiştir.

A549 hücrelerinde ELİZA’da ölçülen absorbans değerlerine (450 nm) karşılık gelen VEGF miktarları (pg/mL) **Şekil 32** ve **Şekil 33**’de verilmiştir.



Şekil 32. Pazopanibin 24.Saatte A549 Hücre Hattı Üzerinde VEGF Miktarına Etkisi (n=5; ort±st.sapma)

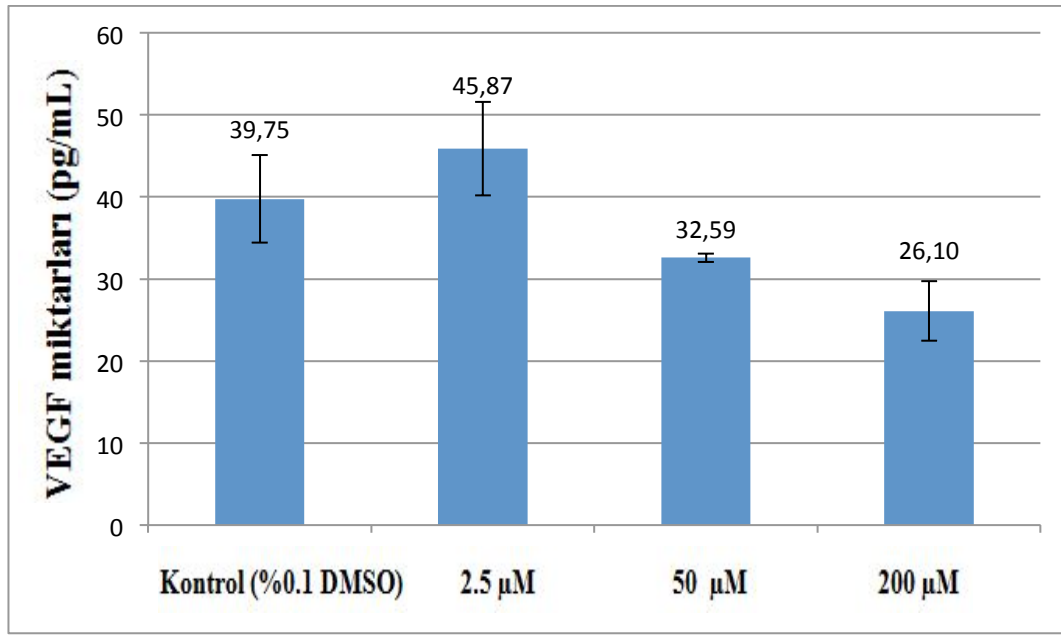
Pazopanib konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edilen A549 hücrelerinde VEGF miktarları, kontrol grubunda 437.51 pg/mL, pazopanib konsantrasyonlarında (2.5, 50 ve 200 µM) da sırasıyla 436.48, 353.66, ve 191.32 pg/mL olarak hesaplanmıştır. VEGF miktarları kontrole grubuna göre 200 µM pazopanib konsantrasyonunda önemli düzeyde azalma meydana getirmiştir ($p<0.05^*$).



Şekil 33. Pazopanibin 48.Saatte A549 Hücre Hattı Üzerinde VEGF Miktarına Etkisi (n=5; ort±st.sapma)

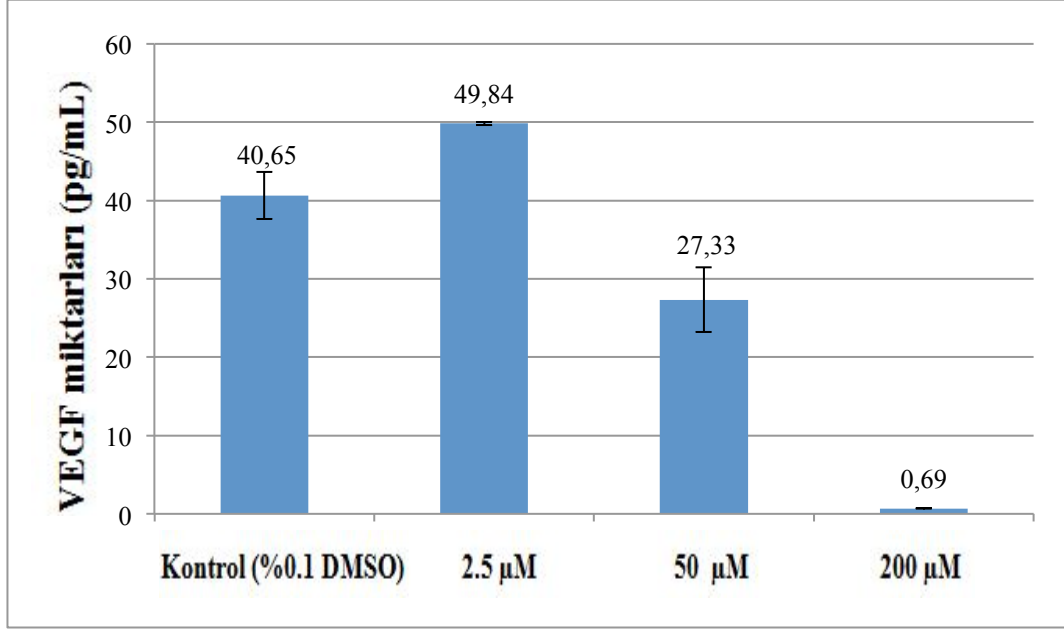
Pazopanib konsantrasyonları ile 48 saat inkübe edilen A549 hücrelerinde VEGF miktarları, kontrol grubunda 285.06 pg/mL, pazopanib konsantrasyonlarında (2.5, 50 ve 200 µM) da sırasıyla 273.63, 207.49, ve 184.94 pg/mL olarak hesaplanmıştır. VEGF miktarları kontrole grubuna göre 50 µM pazopanib konsantrasyonunda ($p<0.05^*$) ve 200 µM pazopanib konsantrasyonunda ($p<0.01^{**}$) önemli düzeyde azalma meydana getirmiştir (**Şekil 33**).

HUVEC hücrelerinde ELİZA'da ölçülen absorbands değerlerine (450 nm) karşılık gelen VEGF miktarları (pg/ml) **Şekil 34** ve **Şekil 35**'de verilmiştir.



Şekil 34. Pazopanibin 24.Saatte HUVEC Hücre Hattı Üzerinde VEGF Miktarına Etkisi (n=5; ort±st.sapma)

Pazopanib konsantrasyonu ile 24 saat inkübe edilen HUVEC hücrelerinde VEGF miktarları, kontrol grubunda 39.75 pg/mL, pazopanib konsantrasyonlarında (2.5, 50 ve 200 µM) da sırasıyla 45.87, 32.59, ve 26.10 pg/mL olarak hesaplanmıştır.



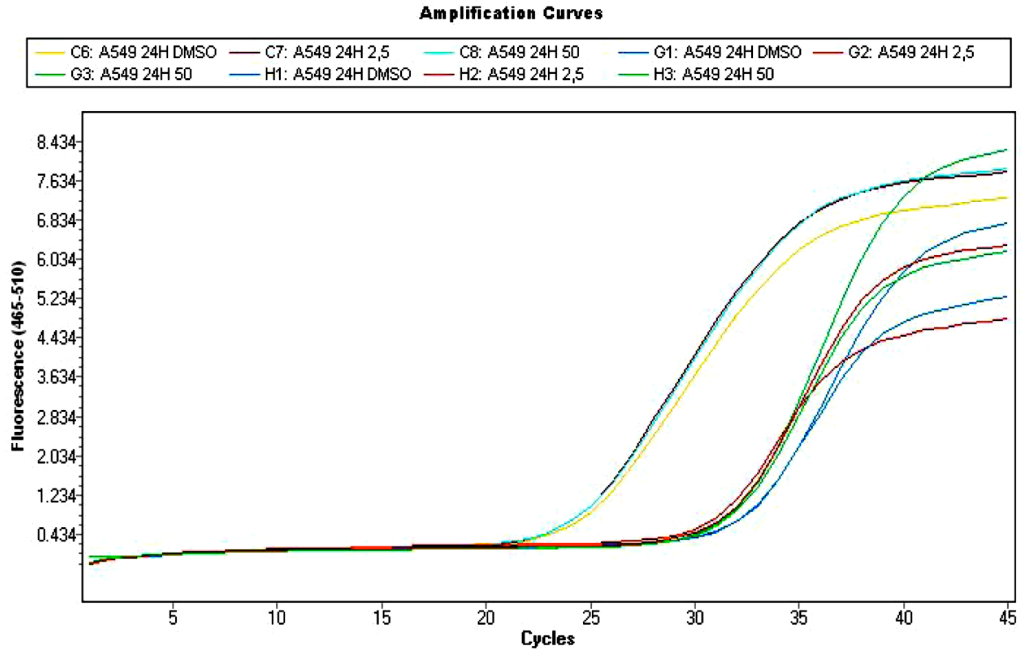
Şekil 35. Pazopanibin 48.Saatte HUVEC Hücre Hattı Üzerinde VEGF Miktarına Etkisi (n=5; ort±st.sapma)

Pazopanib konsantrasyonu ile 48 saat inkübe edilen HUVEC hücrelerinde VEGF miktarları, kontrol grubunda 40.65 pg/mL, pazopanib konsantrasyonlarında (2.5, 50 ve 200 µM) da sırasıyla 49.84, 27.33, ve 0.69 pg/mL olarak hesaplanmıştır. VEGF miktarları kontrole grubuna göre 200 µM pazopanib konsantrasyonunda önemli düzeyde azalma meydana getirmiştir ($p<0.001^{***}$).

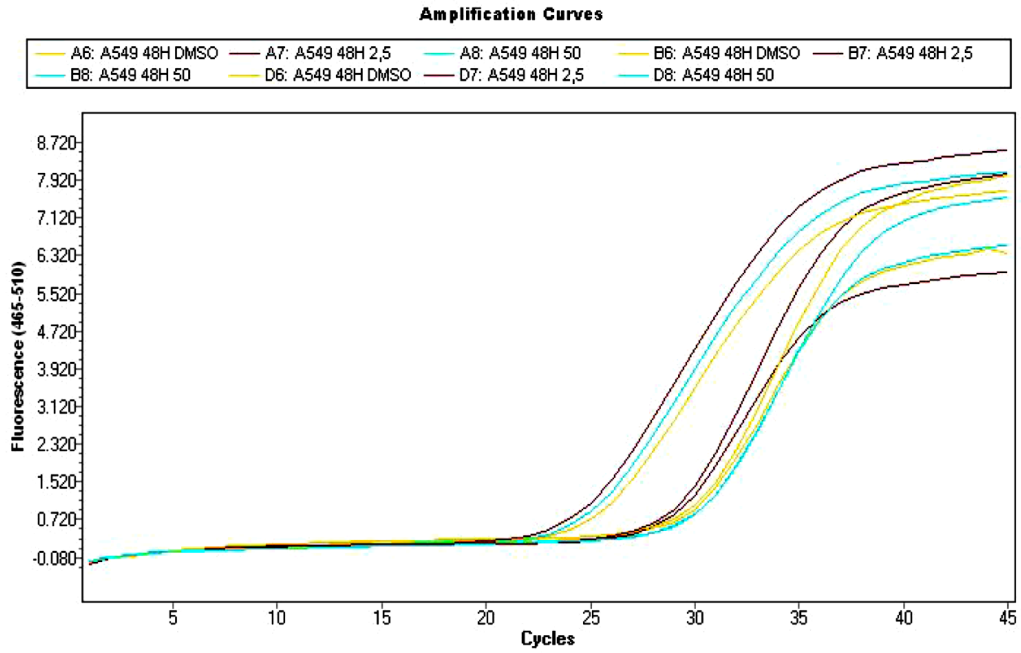
Real Time PCR (RT-PCR) Analizi ile mRNA Ekspresyonun Değerlendirilmesi

Bu çalışmada da diğer çalışmalara paralel olması açısından pazopanibin 2.5 ve 50 µM konsantrasyonları uygulanmıştır. A549 ve HUVEC hücreleri pazopanib konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat inkübe edildikten sonra RNA izolasyonları yapılmıştır. Her bir RNA örneğinin saflığı ve miktarı Nanodrop cihazında belirlenmiş ve cDNA sentezi için 100 ng RNA kullanılmıştır. Elde edilen cDNA'lar Light Cycler 480'nin 96'lık plakalarına yüklenmiş ve sonuçların analizi Software Release 1.5.0 SP4 version 1.5.0.39' da yapılmıştır.

Amplifikasyon aşamasında örnek ve referans genlerin 465-510 nm dalga boyundaki floresan aralığında eşik değerine girdikleri döngüler saptanmıştır (Şekil 36 ve Şekil 37).



Şekil 36. Pazopanib konsantrasyonları ile (2.5 ve 50 µM) 24 Saat İnkübe Edilen A549 Hücrelerinde VEGFA ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi



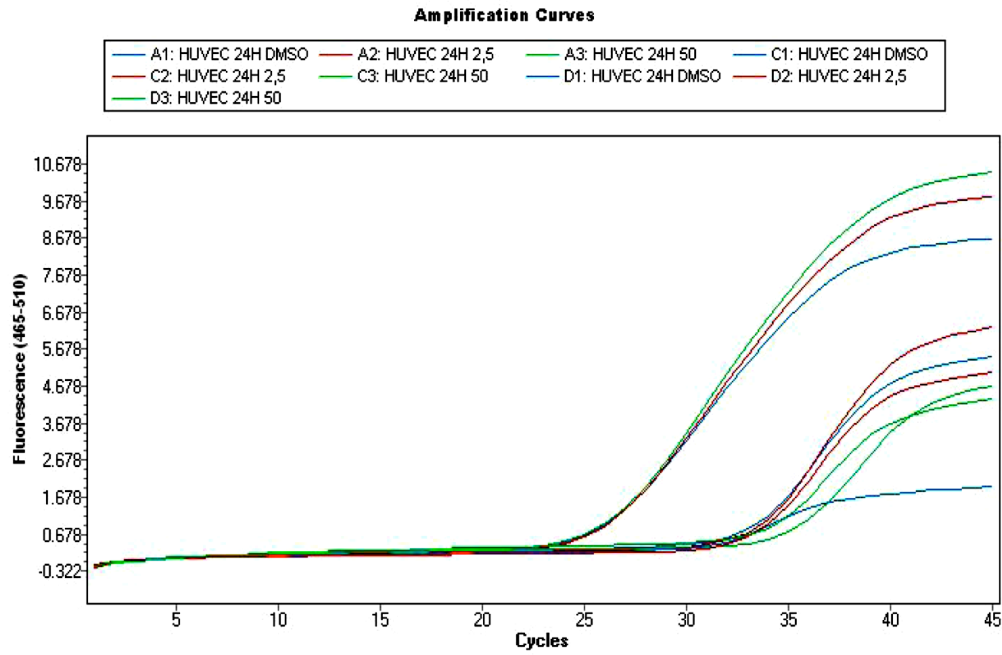
Şekil 37. Pazopanib konsantrasyonları ile (2.5 ve 50 µM) 48 Saat İnkübe Edilen A549 Hücrelerinde VEGFA ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi

Pazopanib uygulanan A549 hücrelerinde yapılan RT-PCR analiz sonucunda, VEGFA ve GAPDH genlerinin ölçülen tam niceliksel eşik değerleri (CP)'nin analizi **Tablo 7'** de verilmiştir.

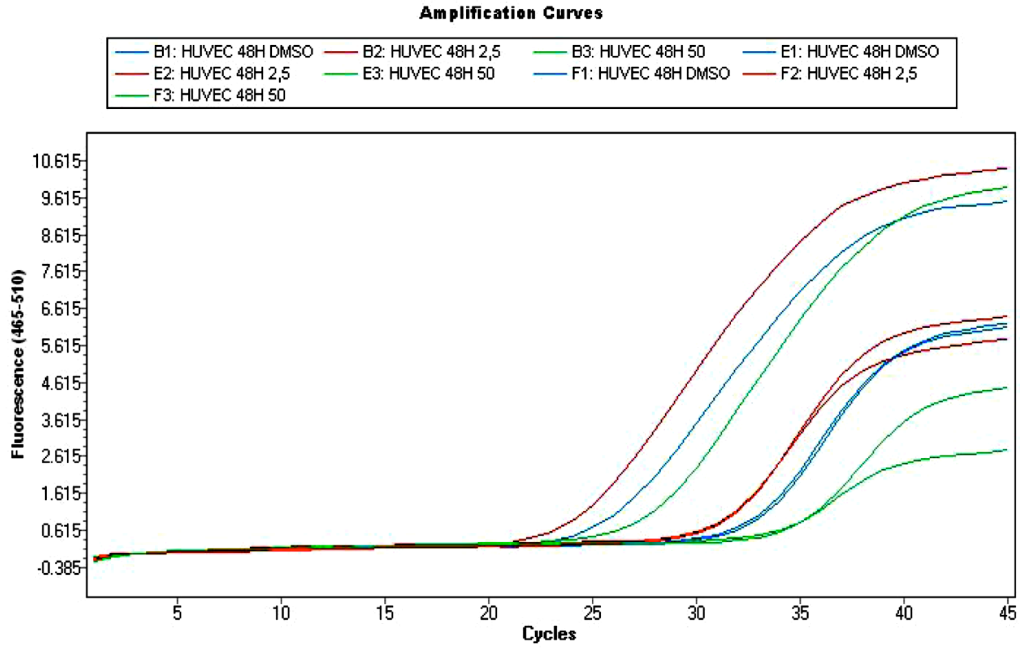
Tablo 7. Pazopanib Uygulanan A549 Hücreleri İçin Örnek ve Referans Genlerin RT-PCR SonundaElde Edilen Eşik Değerleri (CP)

24 saat	Pazopanib Konsantrasyonları (μM)	CP Değeri (VEGFA)	CP Değeri (GAPDH)
	Kontrol (%0.1 DMSO)		32.44
2.5		31.20	24.62
50		31.97	24.69
48 saat	Kontrol (%0.1 DMSO)	30.14	25.49
	2.5	29.08	24.80
	50	30.39	25.07

HUVEC hücreleri için amplifikasyon aşamasında örnek ve referans genlerin eşik değerine girdikleri döngüler saptanmıştır (Şekil 38 ve Şekil 39).



Şekil 38. Pazopanib Konsantrasyonları ile (2.5 ve 50 μM) 24 Saat İnkübe Edilen HUVEC Hücrelerinde VEGFA ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi

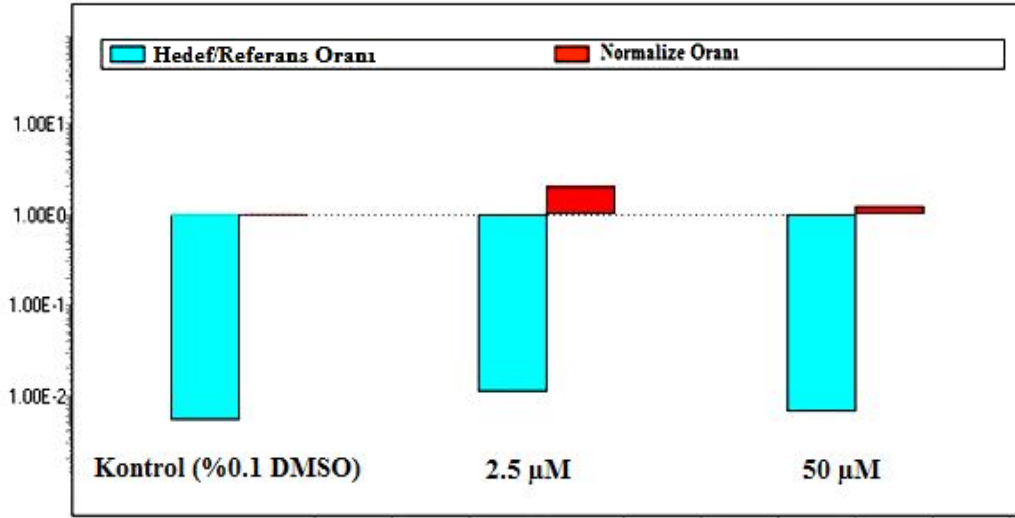


Şekil 39. Pazopanib Konsantrasyonları ile (2.5 ve 50 µM) 48 Saat İnkübe Edilen HUVEC Hücrelerinde VEGFA ve GAPDH Genlerinin Amplifikasyon Eğrisi

Pazopanib uygulanan HUVEC hücrelerinde yapılan RT-PCR analiz sonucunda, VEGFA ve GAPDH genlerinin ölçülen tam niceliksel eşik değerleri (CP)'nin analizi **Tablo 8'** de verilmiştir

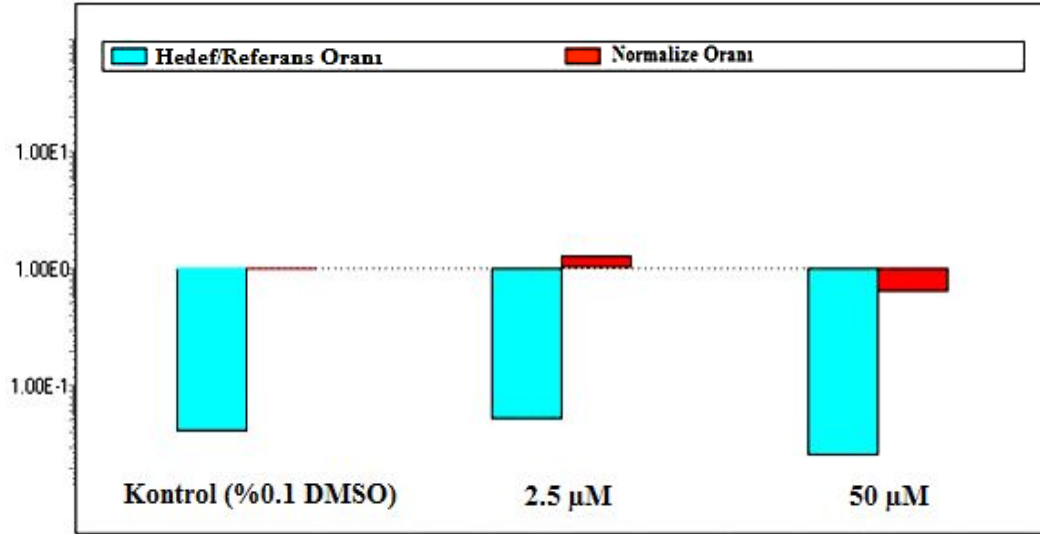
Tablo 8. Pazopanib Uygulanan HUVEC Hücreleri İçin Örnek ve Referans Genlerin RT-PCR Sonunda Elde Edilen Eşik Değerleri (CP)

24 saat	Pazopanib Konsantrasyonları (µM)	CP Değeri (VEGFA)	CP Değeri (GAPDH)
	Kontrol (%0.1 DMSO)		32.07
2.5		33.30	26.22
50		34.38	26.36
48 saat	Kontrol (%0.1 DMSO)	32.69	25.94
	2.5	31.21	24.41
	50	34.07	27.99



Şekil 40. Pazopanib Konsantrasyonları ile 24 Saat İnkübe Edilmiş A549 Hücrelerinde VEGFA Genine Ait Hedef/Referans Oranları

A549 hücrelerinde 24. saatte VEGFA mRNA ekspresyonunun kontrole göre çok fazla değişmediği ancak, IC₅₀ konsantrasyonu olan 50 µM pazopanib konsantrasyonunda, 2.5 µM'a göre VEGFA mRNA ekspresyonunun azalmış olduğu belirlenmiştir (Şekil 40 ve Tablo 9).

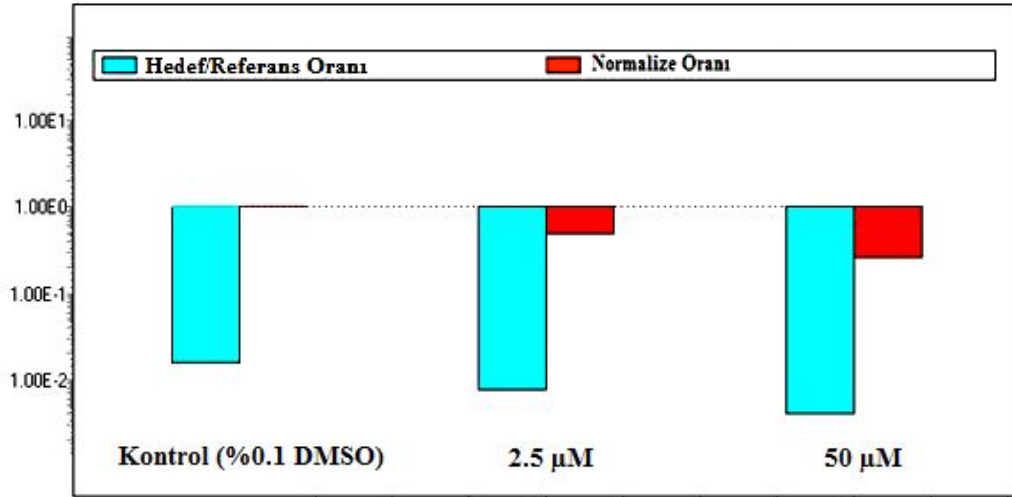


Şekil 41. Pazopanib Konsantrasyonları ile 48 Saat İnkübe Edilmiş A549 Hücrelerinde VEGFA Genine Ait Hedef/Referans Oranları

Pazopanib konsantrasyonu uygulanan A549 hücrelerinde 48. saatteki VEGFA mRNA ekspresyonları 24. saate göre azalma göstermiştir. Özellikle IC₅₀ konsantrasyonu olan 50 µM pazopanib konsantrasyonunda VEGFA mRNA ekspresyonu önemli düzeyde azalmıştır (Şekil 41 ve Tablo 9).

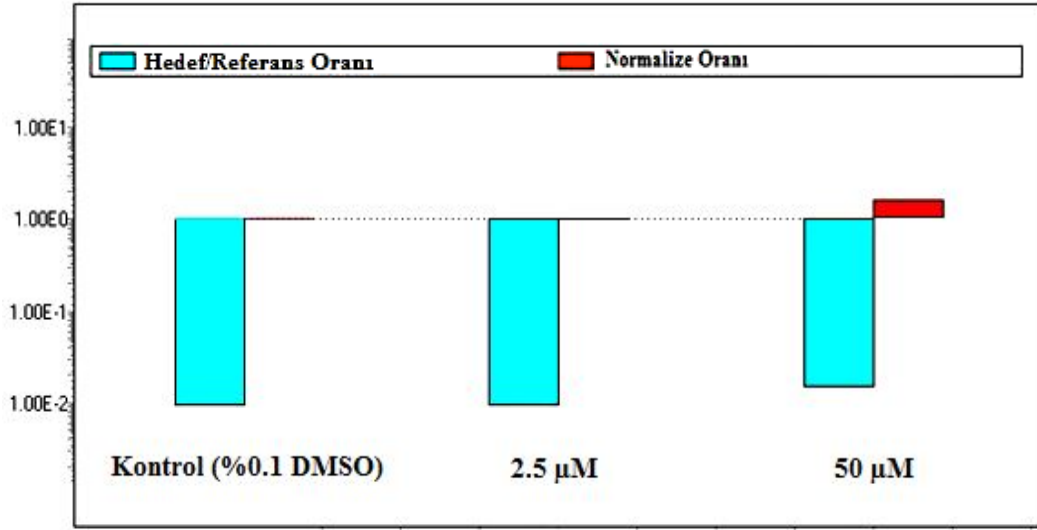
Tablo 9. Pazopanib Konsantrasyonları ile İnkübe Edilmiş A549 Hücrelerinde RT-PCR Sonucunda Hesaplanan VEGFA Genine Ait Hedef/Referans Oranları

	Pazopanib Konsantrasyonları (µM)	Hedef/Referans Oranı	Normalize Oranı
24 saat	Kontrol (%0.1 DMSO)	5.21E-3	1.000
	2.5	1.05E-2	2.015
	50	6.42E-3	1.232
48 saat	Kontrol (%0.1 DMSO)	3.99E-2	1.000
	2.5	5.14E-2	1.287
	50	2.49E-2	0.6246



Şekil 42. Pazopanib Konsantrasyonları ile 24 Saat İnkübe Edilmiş HUVEC Hücrelerinde VEGFA Genine Ait Hedef/Referans Oranları

2.5 ve 50 µM pazopanib konsantrasyonu ile 24 saat inkübe edilen HUVEC hücrelerinde, VEGFA mRNA ekspresyonu konsantrasyon artışına paralel olarak belirgin bir şekilde azalmıştır. Her iki konsantrasyonda da kontrol grubunun altında azalmış VEGFA mRNA ekspresyonu belirlenmiştir (Şekil 42 ve Tablo 10).



Şekil 43. Pazopanib Konsantrasyonları ile 48 Saat İnkübe Edilmiş HUVEC Hücrelerinde VEGFA Genine Ait Hedef/Referans Oranları

48 saat pazopanib konsantrasyonları ile inkübe edilen HUVEC hücrelerinde, kontrol ile 2.5 µM pazopanib VEGFA mRNA ekspresyonları arasında farklılık belirlenmemiş, ancak 24. saatin aksine 50 µM pazopanibin VEGFA mRNA ekspresyonunun artmış olduğu görülmüştür (Şekil 43 ve Tablo 10).

Tablo 10. Pazopanib Konsantrasyonları ile İnkübe Edilmiş HUVEC Hücrelerinde RT-PCR Sonucunda Hesaplanan VEGFA Genine Ait Hedef/Referans Oranları

	HUVEC	Hedef/Referans Oranı	Normalize Oranı
24 saat	Kontrol (%0.1 DMSO)	1.55E-2	1.000
	2.5	7.37E-3	0.4761
	50	3.84E-3	0.2483
48 saat	Kontrol (%0.1 DMSO)	9.28E-3	1.000
	2.5	8.94E-3	0.9634
	50	1.48E-2	1.594

Bu tez çalışmasında, pazopanibin sitotoksik etkileri ön tarama testi olarak kullandığımız MTT yöntemi kullanılarak araştırılmış ve pazopanibin zaman ve konsantrasyona bağlı olarak A549 ve HUVEC hücreleri üzerinde antiproliferatif etkiler meydana getirdiği belirlenmiştir. MTT absorbans sonuçları kullanılarak, kontrol grubuna göre, her bir grubun % canlılık değerleri hesaplanmıştır.

A549 hücrelerinde pazopanib uygulamasından sonraki 24 ve 48. saatte, 2.5 µM pazopanib konsantrasyonunda kontrole göre % canlılık değerlerinde çok önemli bir azalma meydana getirmese de, 25, 50, 100 ve 200 µM pazopanib konsantrasyonlarındaki % canlılık değerleri önemli derecede azalmıştır ($p < 0.001^{***}$). Pazopanib konsantrasyonu arttıkça, hücreler üzerinde sitotoksik etkinin de doğru orantılı olarak arttığı görülmüştür (Şekil 13 ve Şekil 14). 24. ve 48. saatlerde sitotoksik etkinin 25, 50, 100 ve 200 µM pazopanib

konsantrasyonlarında önemli düzeyde artmış olduğu dikkat çekmektedir. Özellikle 24. saatte kontrole göre % canlılık değerleri, 50, 100 ve 200 µM pazopanib konsantrasyonunda sırasıyla % 65.11, 23.05, 19.73 ve 48. saatte de % 51.01, 20.94, 18.63 olarak hesaplanmıştır.

HUVEC hücrelerinde ise 24. ve 48. saatte 25, 50, 100 ve 200 µM pazopanib konsantrasyonunda proliferasyonun önemli derece azaldığı belirlenmiştir ($p < 0.001^{***}$). Bizim bulgularımıza paralel olarak, pazopanib veya benzeri tirozin kinaz inhibitörlerinin aynı veya farklı kanser hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur.

Roque Diaz ve ark., (2010), bir başka tirozin kinaz inhibitörü olan lapatinibin sitotoksik etkilerini MTT yöntemi ile A549 hücreleri üzerinde incelemişlerdir. Bunun için lapatinibin 0.005, 0.5 ve 5 µM konsantrasyonlarını ile 24 saat inkübe edilen A549 hücrelerinde, kontrol göre A549 hücre canlılığında doza bağımlı olarak bir azalma olduğunu belirlemişlerdir.

Yine Roque Diaz ve ark., (2010), A549 hücrelerinde yaptıkları *in vitro* çalışmalar sonucunda, lapatinibin büyük ölçüde hücre çoğalmasını ve koloni oluşturma kapasitesini azalttığını açıklamışlardır.

Olaussen ve ark., (2009), WST-1 sitotoksikite testi ile A549 hücrelerine pazopanib ve lapatinibin 5-40 µM kombine konsantrasyonlarını uygulamışlardır. Çalışmanın sonucunda, pazopanib ve lapatinib kombine tedavisinin, ilaçların tek tek kullanımına göre daha güçlü antiproliferatif etkisi olduğunu göstermişlerdir.

İnsan karaciğer karsinom hücreleri (HCC), HUVEC ve tümör kaynaklı endotel hücrelerinin (TEC) kullanıldığı bir çalışmada hücreler üzerine 1-20 µg/mL pazopanib konsantrasyonları uygulanmıştır ve en fazla hücre inhibisyonunun 72 saat sonra HUVEC ve TEC hücrelerinde sırasıyla, 5 µg/mL ve 15 µg/mL pazopanib konsantrasyonlarında olduğu açıklanmıştır (Zhu ve ark., 2011).

Paesler ve ark., (2010), kronik lenfositik lösemi (KLL) hücrelerinin proliferasyonunda tirozin kinaz inhibitörleri olan vatalanib ve pazopanibin sitotoksik etkisini test etmek için 24 saat süre ile her maddenin 1, 10, 25, 50, 75, 100 ve 200 µmol/L konsantrasyonlarını KLL hücrelerine uygulamışlardır. Belirledikleri %50 öldürücü konsantrasyon vatalanib için 48.4 µmol/L iken, pazopanib için 32.7 µmol/L olarak belirlenmiştir.

Zhu ve ark., (2011)'ları da, pazopanibin farklı konsantrasyonlarının (0, 1, 2, 5, 10, ve 20 µg/mL) insan damar endotel hücrelerinde (HUVEC) tübül oluşumunu ve proliferasyonunu doza bağımlı bir şekilde inhibe ettiğini belirlemişlerdir.

Pazopanibin farklı hücre hatlarındaki canlılıklarının tetrazolyum bazlı analiz ile değerlendirdiği bir çalışmada Li ve ark., (2011) insan mesane kanseri hücrelerine (HTB3, HT1376, J82, RT4, CRL1749, T24 ve HTB9) pazopanibin 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5 ve 10 µM konsantrasyonları uygulanmıştır ve pazopanibin IC₅₀ değeri RT4 hücresi haricindeki hücre hatları için 10 µM' dan fazla bulunmuştur. Pazopanibin J28, T24, HT1376, RT4, CRL1749, HTB9 ve HTB3 hücre hatları için IC₅₀ değerleri ise sırasıyla; 24.57, 52.45, 28.21, 5.14, 22.69, 11.84 ve 14.16 µM olarak belirlenmiştir.

Bizim çalışmamızda A549 ve HUVEC hücre hatlarında pazopanib konsantrasyonlarının hücre proliferasyonuna etkileri Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) kullanılarak araştırılmıştır. MTT bulgularımızla da uyumlu olarak pazopanibin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak iki hücre hattı üzerinde de antiproliferatif etkileri olduğu belirlenmiştir.

A549 hücrelerinde pazopanib uygulamasından sonraki 24 ve 48. saatte pazopanib konsantrasyonlarının hücre proliferasyonunu inhibe edici etkisi en fazla 25, 50, 100 ve 200 μM konsantrasyonlarda olduğu görülmüştür ($p<0.001$). 2.5 μM pazopanib konsantrasyonunda da kontrole göre A549 hücre proliferasyonunun azaldığı belirlenmiştir ($p<0.01$) (**Şekil 15**, **Şekil 17** ve **Şekil 18**). Analiz sisteminde variable slope ile hesaplanan IC_{50} değerlerine göre pazopanib konsantrasyonu uygulanan A549 hücrelerin 24. saatteki IC_{50} değeri; 51.6 μM , 48. saatteki IC_{50} değeri de 45.1 μM olarak hesaplanmıştır (**Şekil 16**). Bu çalışmada, gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile pazopanibin A549 hücreleri üzerinde önemli antiproliferatif etkisinin olduğu belirlenmiştir.

Yine aynı cihazda HUVEC hücrelerinde pazopanib uygulamasından sonraki 24. ve 48. saatte **Şekil 19**'da görüldüğü gibi, 2.5 μM pazopanib konsantrasyonu kontrole göre önemli bir antiproliferatif etki göstermemesine rağmen, 25, 50, 100 ve 200 μM pazopanib konsantrasyonlarının zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunu önemli bir şekilde azalttığı görülmüştür (**Şekil 19**, **Şekil 21** ve **Şekil 22**). Analiz sisteminde variable slope ile hesaplanan IC_{50} değerlerine göre pazopanib konsantrasyonu uygulanan HUVEC hücrelerin 24. saatteki IC_{50} değeri; 72 μM , 48. saatteki IC_{50} değeri de 20.2 μM olarak hesaplanmıştır (**Şekil 20**).

Yapılan literatür taramalarında A549 hücrelerinde bir tirozin kinaz inhibitörü olan pazopanibin herhangi bir kanser hücre hattıyla RTCA DP sistemi ile yapılan çalışmasına rastlanmamıştır. Ancak Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde elde ettiğimiz sonuçlar MTT testimizin sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Bizim çalışmamızda Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) kullanılarak A549 ve HUVEC hücre hatlarında pazopanibin 2.5, 50 ve 200 μM konsantrasyonlarının hücre migrasyonuna ve invazyonuna etkileri araştırılmıştır. CIM plaka kullanılarak pazopanibin A549 hücre hattındaki invazyon ve migrasyonunu araştırmak açısından çalışmamız bir ilktir. İnsan akciğer kanseri hücresi olan A549'da invazyon ve migrasyonun etkisine bakarak bir endotel hücresi olan HUVEC hücrelerindeki pazopanibin invazyon ve migrasyonuna etkisini karşılaştırdık. Ön çalışmalarındaki bulgularımızla da uyumlu olarak pazopanibin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak iki hücre hattında da invazyon ve migrasyonu azalttığı belirlenmiştir.

A549 hücrelerinde 200 μM pazopanib konsantrasyonunda, HUVEC hücrelerinde de 50 ve 200 μM pazopanib konsantrasyonlarında invazyonun önemli derecede azaldığı belirlenmiştir (**Şekil 23** ve **Şekil 24**). Migrasyon analizine göre; uygulanan tüm pazopanib konsantrasyonlarında (2.5, 50 ve 200 μM), A549 hücrelerinde migrasyonun önemli derecede azaldığı belirlenmiştir (**Şekil 27** ve **28**). HUVEC hücrelerinde de invazyon sonucuna paralel olarak 50 ve 200 μM pazopanib konsantrasyonlarının, hücre migrasyonunu azalttığı görülmüştür (**Şekil 29** ve **Şekil 30**).

Morelli ve ark., (2009), Boyden chamber yöntemi ile bir tirozin kinaz inhibitörü olan cediranibin tümör hücreleri üzerindeki (5 kolon, 3 pankreas, 2 karaciğer karsinom hücresi ve A549 insan akciğer kanseri hücresi) proliferasyon, migrasyon ve invazyonunu çalışmışlardır. Bu çalışmada da bizim invazyon ve migrasyon sonuçlarımıza paralel olarak, VEGFR inhibitörü cediranibin, 100 nmol/L konsantrasyonunda tümör hücrelerinin migrasyon ve invazyonunu inhibe ettiğini, ancak hücre proliferasyonu azaltıcı etkisinin önemli olmadığını belirlemişlerdir.

Başka bir çalışmada Podar ve ark., (2006), Boyden chamber yöntemi ile çeşitli multiple myelom (MM) hücre hatlarında, pazopanibin VEGF ile indüklenen migrasyonu inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Önce HUVEC hücrelerini büyüme faktöründen yoksun olarak 6-10 saat 10 ng/ml VEGF uygulamasına maruz bırakmışlar, daha sonra büyüme faktöründen yoksun bırakılmış HUVEC hücrelerine pazopanibin 1,5 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarını uygulamışlardır. Sonuç olarak, pazopanibin HUVEC hücrelerinin migrasyonunu önlediğini açıklamışlardır.

Greiner ve ark., (2010)'nın yaptıkları bir çalışmada, A549 hücrelerinde SEC62 geninin susturulması ile invazyonun azaldığını xCELLigence sistemini kullanarak göstermişlerdir. Aienza ve ark.'ları da RTCA DP cihazında farklı sayıdaki (2×10^4 ve 4×10^4) HUVEC hücrelerinin migrasyonuna araştırmışlar ve hücre indeksinin 4×10^4 sayıda ekilen HUVEC hücrelerinde daha fazla olduğunu açıklamışlardır.

Zhu ve ark., (2011), yara iyileştirici bir *in vitro* çalışmada, pazopanibin iki karaciğer karsinom (HCC) hücre hattında (karaciğer kanser hücre hattı: HCCLM3 ve PLC/PRF/5) invazyon ve migrasyonu inhibe ettiğini ve apoptozisi önemli derecede indüklediğini belirlemişlerdir. Yine bu çalışmada pazopanibin HUVEC hücrelerinin migrasyonunu doza bağımlı bir şekilde inhibe ettiği belirlenmiştir. Özellikle 20 µg/mL pazopanib konsantrasyonunda, HUVEC hücrelerinin migrasyonunun kontrole göre %30 oranında azaldığı belirlenmiş ve 100 µg/mL pazopanib konsantrasyonunda ise yoğun hücre ölümü sebebi ile migrasyonu değerlendirememişlerdir. Bu bulgu da, bizim çalışmamızda HUVEC hücrelerinde 200 µM pazopanibin migrasyon üzerine etkisinin görülmemesini açıklamaktadır.

VEGF, tümör anjiyojenezinde, hücre yayılımında ve metastazında önemli rol oynayan potansiyel bir anjiyojenik mitojendir (Grunstein ve ark. 1999; Chau ve ark., 2008). VEGF, potansiyel olarak tümör gelişimi süresince endotel hücre proliferasyonunu ve göçünü aktive eder (Zhang ve ark., 2009).

Bizim çalışmamızda invazyon ve migrasyon sonuçlarımıza paralel olarak, ELİZA yöntemi ile A549 ve HUVEC hücrelerinde 2,5, 50 ve 200 µM pazopanibin VEGF üzerine etkisi araştırılmıştır. MTT ve RTCA DP analiz sisteminde çalışılan proliferasyon, invazyon ve migrasyon bulgularımızla da uyumlu olarak, pazopanibin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak iki hücre hattı içinde antianjiyojenik etki gösterdiği belirlenmiştir.

A549 hücrelerinde 24. saatte 200 µM ($p < 0.05$), 48. saatte ise 50 ve 200 µM (sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.01$) pazopanib konsantrasyonunda (**Şekil 32** ve **Şekil 33**) VEGF miktarının önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir. HUVEC hücrelerinde ise 24 ve 48. saatte sadece 200 µM pazopanib konsantrasyonunda VEGF miktarının önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir ($p < 0.001$) (**Şekil 34** ve **Şekil 35**).

Olaussen ve ark., (2009) yaptıkları çalışmada, lapatinibin A549 hücrelerinde VEGFR-1 fosforilasyonunu %70 oranında inhibe ettiğini ve önemli antiproliferatif aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir. Podar ve ark., (2006), yaptıkları bir çalışmada multiple myelom (MM) hücrelerinde pazopanibin VEGFR-1 fosforilasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Soydinç ve ark., (2012), küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) hastalarında, VEGF, VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin serum düzeylerini ELİZA yöntemi ile araştırmışlar ve VEGF ($p<0.001$) ve reseptörlerinin ($p<0.001$) kontrol grubuna göre azaldığını istatistiksel olarak belirlemişlerdir.

Paesler ve ark., (2010), VEGFA'nın KLL hücrelerinin apoptozun engellemesinde anjiyojenezin bağımsız bir rolü olduğunu göstermek için yaptıkları çalışmada, vatalanib ve pazopanibin VEGFR'lerinin kuvvetli inhibitörü olduğunu ve VEGFR-1 için IC_{50} değerini, vatalanib ve pazopanib konsantrasyonları için sırasıyla 54 ve 10 nmol/L; VEGFR-2 için de, 39 ve 30 nmol/L olarak belirlemişlerdir.

Roque ve ark., (2010), A549 hücrelerini 100 ng/ml EGF ile uyardıktan sonra 2 μ M lapatinib konsantrasyonu uygulamışlar ve Western blot analizi sonucunda kontrole göre p-EGFR ve p-HER-2 düzeylerinde azalma olduğunu buna bağlı olarak da, bizim çalışmamıza da paralel olarak hücre proliferasyonunun azaldığını belirlemişlerdir.

Connolly (1991), yaptığı bir çalışmada *in situ* hibridizasyon yöntemiyle VEGF düzeylerinin birçok doku ve organda artış göstererek, VEGF'in vasküler endotel hücrelerinin büyümesinde çok önemli rol üstlendiğini açıklamışlardır.

Bizim çalışmamızda A549 ve HUVEC hücre hatlarında 2.5 ve 50 μ M pazopanib konsantrasyonlarının VEGFA mRNA ekspresyonu RT-PCR kullanılarak araştırılmıştır. IC_{50} değerimiz olan 50 μ M pazopanib konsantrasyonunun, A549 hücrelerinde 48. saatte, HUVEC hücrelerinde de 24. saatte, VEGF mRNA ekspresyonunu azalttığı belirlenmiştir (**Şekil 40** ve **Şekil 42**).

Yaptığımız literatür taramalarında A549 hücrelerinde bir tirozin kinaz inhibitörü olan pazopanibin VEGFA mRNA ekspresyonu değerlendiren RT-PCR çalışmasına rastlanmamıştır.

Olaussen ve ark., (2009), A549 hücrelerinde yaptıkları gen paneli analizinde, pazopanib ve lapatinibin kombine uygulanması sonucunda 174 gen arasından 58 gende anlamlı değişimler olduğunu belirlemişlerdir.

Podar ve ark., (2006), çeşitli multiple myelom (MM) hücrelerinde pazopanib uygulamasından sonra c-Myc ekspresyonunda önemli bir azalma meydana geldiğini, VEGF mRNA düzeylerinde VEGF₁₄₅ ve VEGF₁₆₅' de azalma meydana gelmişken VEGF₁₂₁' de etki görülmediğini belirlemişlerdir.

Zygalaki ve ark., (2007), 27 erkek hastadan alınan akciğer kanseri hücrelerinde total VEGF, VEGF₁₂₁ ve VEGF₁₆₅'nin tüm örneklerde eksprese edildiğini, fakat VEGF₁₈₅ ve VEGF₁₈₉un ekspresyonun bazı örneklerde azalmış olduğunu rapor etmişlerdir. VEGF₁₆₅ oranı, örnekler arasında benzerlik gösterirken, VEGF₁₈₃ ve VEGF₁₈₉'un mRNA ekspresyonunun sağlıklı akciğer dokularında artmış olduğu belirlenmiştir.

Li ve ark., (2011), Western blot analizi çalışmalarında insan mesane kanseri hücreleri J82 ve T24 hücre hatlarında fosforlanmış- AKT ekspresyonunun 12.5 μ M pazopanib konsantrasyonu uygulaması ile azaldığını, 12.5 μ M docetaxel konsantrasyonu ile kombine uygulandığında ise ekspresyonu daha da azalttığını belirlemişlerdir.

Yine başka bir çalışmada Tanaka ve ark., (2013), RT-PCR deneylerinde yüksek düzeyde metastatik osteosarkom (LM8) hücrelerindeki VEGF salgılanmasının, Dunn (osteosarkom) hücrelerine göre daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. LM8, Dunn ve fare aort endotel hücrelerinde (mAEC), VEGFA ekspresyonu varken VEGFR-1 ve VEGFR-2 mRNA ekspresyonunu yalnızca mAEC hücrelerinde gözlemlemişlerdir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma akciğer kanserinde faz III aşamasında bir tirozin kinaz inhibitörü olan pazopanibin, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (A549) ve human umbilikal ven endotel (HUVEC) hücreleri ile karşılaştırmalı olarak antiproliferatif ve antianjiyojenik etkilerinin araştırılması için planlanmıştır. Yapılan literatür taramalarında A549 hücrelerinde bir tirozin kinaz inhibitörü olan pazopanib Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi (RTCA DP) ile yapılan çalışmasına rastlanmamıştır. Bu tez çalışması pazopanib konsantrasyonları uygulanan A549 hücrelerinin RTCA DP Sistemi ile analiz edilen proliferasyon, migrasyon ve invazyon çalışması açısından ilk olduğu için özgün bir değere sahiptir.

A549 hücrelerinde pazopanib uygulamasından sonraki 24. ve 48. saatte, 25, 50, 100 ve 200 μM pazopanib konsantrasyonlarındaki % canlılık değerleri önemli derecede azalmıştır. Pazopanib konsantrasyonu arttıkça, hücreler üzerinde sitotoksik etkinin de doğru orantılı olarak arttığı belirlenmiştir. HUVEC hücrelerinde ise 24. ve 48. saatte 25, 50, 100 ve 200 μM pazopanib konsantrasyonunda proliferasyonun önemli derece azaldığı belirlenmiştir.

Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA DP), 24. ve 48. saatte pazopanib konsantrasyonlarının artışı ve zamana bağlı olarak her iki hücre hattında da önemli antiproliferatif etkisi olduğu gösterilmiştir.

Pazopanibin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak en yüksek konsantrasyonda öldürücü dozda olduğu fakat IC_{50} değerimiz olan 50 μM pazopanib konsantrasyonunda iki hücre hattında da invazyon ve migrasyonu azalttığı belirlenmiştir.

MTT ve RTCA DP analiz sisteminde çalışılan proliferasyon, invazyon ve migrasyon bulgularımızla da uyumlu olarak, pazopanibin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak A549 hücrelerinde 24. saatte, HUVEC hücrelerinde ise 24. ve 48. saatte en yüksek pazopanib konsantrasyonunda VEGF miktarının önemli düzeyde azaldığı ve her iki hücre hattı içinde antianjiyojenik etki gösterdiği belirlenmiştir.

RT-PCR'da VEGFA mRNA ekspresyonu çalışmasının sonuçlarına göre; IC_{50} değerimiz olan 50 μM pazopanib konsantrasyonunun A549 hücrelerinde 48. saatte, HUVEC hücrelerinde de 24. saatte, VEGF mRNA ekspresyonunu azalttığı analiz edilmiştir.

Bu çalışma, KHDAK tedavisinde tirozin kinaz inhibitörlerinde kullanabileceğini gösteren bir *in vitro* ön çalışma olmuştur. Sonuç olarak biz bu çalışmada, hem A549 hem de HUVEC hücre hattında pazopanibin konsantrasyon artışına bağlı olarak antiproliferatif ve antianjiyojenik etkili olduğunu gösterdik. Bu çalışma bir tirozin kinaz reseptör inhibitörü olan pazopanibin, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin antikanserojenik etkilerinde, antianjiyojenik mekanizmaları da içeren yeni moleküler çalışmaların yapılmasına önderlik edeceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Ataergin, A.S., Özet, A., Arpacı, F., The place of angiogenesis inhibitors in cancer therapy, *T. Klin. J. Med. Sci.*, 19, 100-105 (1999).
- Bae, J.H., Schlessinger, J., Asymmetric tyrosine kinase arrangements in activation or autophosphorylation of receptor tyrosine kinases, *Mol. Cells*, 29, 443-448 (2010).
- Banerjee, T., Van Der Vliet, A., Ziboh, V.A., Downregulation of COX-2 and iNOS by amentoflavone and quercetin in A549 human lung adenocarcinoma cell line, *Prostaglandins, Leukot. Essent., Fatty Acids*, 66 (5-6), 485-492 (2002).
- Barile, F.A., Continuous cell lines as a model for drug toxicity assessment, *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research* (içinde), J. V. Castell, M. J. Gomez-Lechon (Eds.), Academic Press, California, USA, 41-43 (1997).
- Barutca, B., Bazı Bitki Ekstrelerinin Memeli Hücre Kültürlerinde Sitotoksik Aktivitelerinin *In Vitro* Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ağustos (2006).
- Bayramoğlu, A., Akciğer Kanseri Hastalarda Matriks Metalloproteinaz-2 Geni C1306T, Matriks Metalloproteinaz-9 Geni C1562T Polimorfizmi, MMP-2, MMP-9 ve Doku İnhibitör Metalloproteinazların Ekspresyonu ve Plazma MMP-2 ve MMP-9 Seviyesi, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (2007).
- Blume-Jensen, P., Hunter, T., Oncogenic kinase signalling, *Nature*, 411, 355-365 (2001).
- Bozkurt, B., Selçuk, T., Fırat, P., Kalyoncu, A. F., Artvinli, M., 1972-2002 döneminde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde akciğer kanseri tanısı konulan hastaların histolojik ve epidemiyolojik değerlendirmesi, *Toraks Dergisi*, 5(3), 148-153 (2004).
- Brower, V., Tumor angiogenesis- new drugs on the block, *Nat. Biotechnol.*, 17 (1999).
- Bustin, S.A., Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, *Journal of Molecular Endocrinology*, 25, 169-193 (2000).
- Carmeliet, P., Jain, R.K., Angiogenesis in cancer and other diseases, *Nature*, 407, 249-257 (2000).
- Chang, G.C., Hsu, S.L., Tsai, J.R., Liang, F.P., Lin, S.Y., Sheu, G.T., Chen, C.Y., Molecular mechanisms of ZD1839-induced G1-cell cycle arrest and apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells, *Biochem. Pharmacol.*, 68, 1453-1464 (2004).
- Chau, M.N., Banerjee, P.P., Development of a STAT3 reporter prostate cancer cell line for high throughput screening of STAT3 activators and inhibitors, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 377(2), 627-31 (2008).
- Choura, M., Rebai, A., Receptor tyrosine kinases: from biology to pathology, *J. Recept. Signal Transduct Res.*, 31(6), 387-394 (2011).

Clauss, M., Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family, *Semin Thromb Hemost*, 26, 561-9 (2000).

Connolly, D.T., Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function, *J. Cell Biochem.*, 47, 219–223 (1991).

Cook, K.M., Figg, W.D., Angiogenesis inhibitors—current strategies and future prospects, *CA Cancer J. Clin.*, 60(4), 222–243 (2010).

Cozzi, P.J., Li, Y., Angiogenesis as a strategic target for prostate cancer therapy, *Medicinal Research Reviews*, 30(1) 23-66 (2009).

Cvetkovic, D., Movsas, B., Dicker, A.P., Increased hypoxia correlates with increased expression of the angiogenesis marker vascular endothelial growth factor in human prostate cancer, *Urology*, 57:821-5 (2001).

da Rocha, A.B., Mans, D.R.A., Regner, A., Schwartzmann, G., Targeting Protein Kinase C: New Therapeutic Opportunities Against High-Grade Malignant Gliomas?, *The Oncologist* 7(17), 33 (2002).

Das, M., Wakelee, H., Targeting VEGF in lung cancer, *Expert Opin. Ther. Targets*, 16(4), 395-406 (2012).

Demir, V., İleri Evre Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde, Plazma Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörleri ve Trombosit Faktör 4 Düzeylerinin Prognostik Önemi ve Sağkalım Süreleri İle İlişkisi, Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi, İç Hastalıkları Anabilim dalı, Edirne, Türkiye (2008).

Denizot, F. And Lang, R.: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *Journal of Immunological Methods*, 89, 271-277 (1986).

Doğan, A.L., Güç, D., Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35, 34-42 (2004).

Drabkin, H.A., Pazopanib and anti-VEGF therapy, *Open Access Journal of Urology*, 2, 35–40 (2010).

Dudek, J., Stöckle M., Unteregger, G., Kamradt, J., Wullich B., Zimmermann, R., Silencing of the SEC62 gene inhibits migratory and invasive potential of various tumor cells, *International Journal of Cancer*, 128(10), 2284-95 (2011).

Durak, D., Cingi, A., Manukyan, M., Kaya, H., Özdemir, A., Yeğen, C., Kolo-
rektal kanserlerde vasküler endotelial büyüme faktörü (VEBF) ekspresyonunun
prognoz üzerine etkisi, *Marmara Medical Journal*, 18(2), 53-58 (2005).

Elisa Human VEGF Kit, Katalog No: KHG0111, Invitrogen Corporation, Kalifornia, A.B.D. (2011).

Er, S., *Camellia Sinensis* (Çay) Ekstrelerinin *in vitro* Antioksidan, Yara İyileştirici ve U2OS Osteosarkom Hücrelerinde Antikanser Aktivitelerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (2010).

Fang, R., Aust, A.E., Induction of ferritin synthesis in human lung epithelial cells treated with crocidolite asbestos, *Arch. Biochem. Biophys.*, 340 (2), 369-375 (1997).

- Fayette, J., Soria, J.C., Armand, J.P., Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment, *Eur. J. Cancer.*, 41,1109-1116 (2005).
- Ferrara, N., Gerber, H.P., LeCouter, J., The biology of VEGF and its receptors, *Nat. Med.*, 9, 669-6 (2003).
- Ferrara, N., Kerbel, R.S., Angiogenesis as a therapeutic target, *Nature*, 438, 967-974 (2005).
- Ferrara, N., Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 280, C1358-1366 (2001).
- Fidler, I.J., Kerbel, R.S., Ellis, L.M., *Biology of cancer: angiogenesis, Cancer:Principles & Practice of Oncology*, Devita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A. (Eds.), 6. Edition, Lippincott's Williams & Wilkins, 141, 142, Philadelphia, USA (2001).
- Folkman, J., What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?, *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 4-6 (1990).
- Franks, L.M., Teich, N.M., *Cellular and Molecular Biology of Cancer*, Oxford University Press, New York, USA, 2-4, 21-25 (1996).
- Freshney, R.I., *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique*, JohnWiley & Sons, 5th Edition, 359-372 (2005).
- Furuse, J., Sorafenib for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma, *Biologics*, 2(4), 779-88 (2008).
- Garofalo, R., Sabry, M., Jamaluddin, M., Yu, R.K., Casola, A., Ogra, P.L., Brasier, A.R., Transcriptional activation of the interleukin-8 gene by respiratory syncytial virus infection in alveolar epithelial cells: nuclear translocation of the RelA transcription factor as a mechanism producing airway mucosal inflammation, *J. Virol.*, 70 (12), 8773-8781 (1996).
- Gigianelli, G., Antonaci, S., *Gelatinases and Their Inhibitors in Tumor Metastasis: From Biological Research to Medical Applications*, *Histol Histopathol.*, 17, 339-345 (2002).
- Goto, M., Mitra, R.S., Liu, M., Lee, J., Henson, B.S., Carey, T., Bradford, C., Prince, M., Wang, C.Y., Fearon, E.R., D'Silva, N.J., Rap1 stabilizes beta-catenin and enhances beta-catenin-dependent transcription and invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck, *Clin Cancer Res.*, 16(1), 65-76 (2010).
- Greiner, M., Kreutzer, B., Jung, V., Grobholz, R., Hasenfus, A., Stöhr, R.F., Tornillo, L., Grunstein, J., Roberts, W.G., Mathieu-Costello, O., Hanahan, D., Johnson, R.S., Tumor-derived expression of vascular endothelial growth factor is a critical factor in tumor expansion and vascular function. *Cancer Res.*, 1;59(7),1592-8 (1999).
- Guidi, A.J., Fischer, L., Haris, J.R., Schnitt, S.J., Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast, *JNCI*, 86:614-9 (1994).
- Güllü, İ.H., Akalın, İ., *Metastaz Biyolojisi, Üroonkoloji Bülteni*, (4) 16-19 (2005).

Hackel, P.O., Zwick, E., Prenzel, N., Ullrich, A., Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways, *Curr Opin Cell Biol.*, 11(2) 184-9, (1999).

Holbro, T., Hynes N.E., ErbB Receptors: Directing key signaling networks throughout life, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 44, 195-217 (2004).

Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H., Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of thermus aquaticus DNA polymerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 (16), 7276-80 (1991).

Horakova, K., Sovcikova, A., Seemannova, Z., Syrova, D., Busanyova, K., Drobna, Z., Ferencik, M., Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants, *Free Radic. Biol. Med.*, 30 (6), 650–664 (2001).

Houch, K.A., Ferrara, N., Winer, H., The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA, *Mol. Endocrinol.*, 5, 1806-14 (1991).

Hurwitz, H.I., Dowlati, A., Saini, S., Savage, S., Suttle, A.B., Gibson, D.M., Hodge, J.P., Merkle, E.M., Pandite, L., Phase I trial of pazopanib in patients with advanced cancer, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 15(12), 4220–4227 (2009).

Ilyas, M., Straub, J., Tomlinson, I.P. M., Bodmer, W.F., Genetic pathways in colorectal and other cancers, *Eur. J. Cancer.*, 35 (3), 335–351 (1999).

Jepsen, K.F., Abildtrup, A., Larsen, S.T., Monophthalates promotes IL–6 production in the human epithelial cell line A549, *Toxicology in Vitro*, (18) 265–269 (2004).

Karabıyık, A., Ankaferd ve Defibrotid'in Endotel Hücre Modelinde Endotelial Protein C Reseptörü (EPCR), Plasminojen Aktivatör İnhibitör-1 (PAI-1) ve Trombin Reseptörü (PAR-1) Gen Ekspresyonları Üzerindeki Etkisinin Araştırılması, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, Türkiye (2011).

Karaca T.D., İnsan Meme Kanseri Hücre Kültüründe Nerium Oleander Bitkisinden Elde Edilen Ekstraktların Antikanserojen Etkisinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, Türkiye (2008).

Karp, G., *Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments*, , JohnWiley & Sons 4. Edition, USA, 669 (2005).

Kenemans, P., Verstraeten, R.A., Verhijen, R.H.M., Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer, *Maturitas Eur. Menopause J.*, 49, 34–43 (2004).

Klug, W.S., Cummings, M.R., *Genetik*, Palme Yayıncılık 6. Baskı, Ankara, 24,28, 635–651 (2002).

Konukoğlu, D., Turhan, S.M., Molecular basis of angiogenesis mechanisms and tumor angiogenesis. *Cerrahpaşa J Med.*, 36, 42-48 (2005).

- Kountouras, J., Zavos, C., Chatzopoulos, D., Apoptotic and anti-angiogenic strategies in liver and gastrointestinal malignancies, *J. Surg Oncol.*, 90(4), 249-59 (2005).
- Kuo, P.L., Hsu, Y.L., Lin, T.C., Lin, C.C., The antiproliferative activity of prodelphinidin B-2 3'-O-gallate from green tea leaf is through cell cycle arrest and Fas-mediated apoptotic pathway in A549 cells, *Food Chem. Toxicol.*, 43, 315-323 (2005).
- Lemmon, M.A., Schlessinger, J., Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell*, 141, 1117-1134 (2010).
- Li, Y., Yang, X., Su, L.J., Flaig, T.W., Pazopanib synergizes with docetaxel in the treatment of bladder cancer cells, *Basic and Translational Science*, doi:10.1016/j.urology, 02.041 (2011).
- Liekens, S., Clercq De, E., Neyts, J., Angiogenesis: regulators and clinical applications, *Biochem. Pharmacol.*, 61, 253-270 (2001).
- Limame, R., Wouters, A., Pauwels, B., Fransen, E., Peeters, M., Lardon, F., Wever, O.D., Pauwels, P., Comparative Analysis of Dynamic Cell Viability, Migration and Invasion Assessments by Novel Real-Time Technology and Classic Endpoint Assays, *Plos One*, Volume 7 Issue 10, e46536 (2012).
- Liotta, L.A., Kohn, E.C., Invasion and metastases, *Cancer Medicine (içinde)*, R. C. Bast (Ed.), B.C. Decker Inc., London, UK, 121-128 (2000).
- Lüleyap, H.Ü., Moleküler Genetiğin Esasları, Nobel Kitabevi, Adana, 300, 304-306 (2008).
- McMahon, G., VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis, *The Oncologist*, 5, 3-10 (2000).
- Morelli, M.P., Brown, A.M., Pitts, T.M., Targeting vascular endothelial growth factor receptor-1 and -3 cediranib (AZD2171): effects on migration and invasion of gastrointestinal cancer cell lines, *Mol. Cancer Ther.*, 8, 2546-2558 (2009).
- Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay, *J. Immunol. Method.*, 65:55-63 (1983).
- Oğuz Soydiñç, H., Duranyıldız, D., Bilgin, E., Taş, F., Yasasever, V., Küçük hücreli akciğer kanserinde anjiogenik faktörler (VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2), *Türk Onkoloji Dergisi*, 27(2), 55-61 (2012).
- Olaussen, K.A., Commo, F., Tailler, M., Lacroix, L., Vitale, I., Raza, S.Q., Richon, C., Dessen, P., Lazar, V., Soria, J.C., Kroemer, G., Synergistic proapoptotic effects of the two tyrosine kinase inhibitors pazopanib and lapatinib on multiple carcinoma cell lines, *Oncogene*. 3;28(48), 4249-60 (2009).
- Özgürtaş, T., Anjiyogeneizde bir *in-vivo* model: civciv koriyoallantoik membran, *Gülhane Tıp Dergisi*, 51, 67-69 (2009).
- Paesler, J., Gehrke, I., Gandhirajan, R.K., Filipovich, A., Hertweck, M., Erdfelder, F., Uhrmacher, S., Poll-Wolbeck, S.J., Hallek, M., Kreuzer, K.A., The vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors vatalanib and

- pazopanib potently induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells *in vitro* and *in vivo*, *Clin. Cancer Research.*,16:3390-3398 (2010).
- Paper, D., Natural products as angiogenesis inhibitors, *Planta Med.*, 64, 686-695 (1998).
- Pawson, T., Regulation and targets of receptor tyrosine kinases, *Eur. J. Cancer*, 38 (5), 3-10 (2002)
- Pick, A.M., Nystrom, K.K., Pazopanib for the treatment of metastatic renal cell carcinoma, *Clinical Therapeutics*, 34(3) (2012).
- Podar, K., Anderson, K.C., The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications, *Blood*, 105, 1383-1395 (2005).
- Podar, K., Tonon, G., Sattler, M., Tai, Y.T., LeGouill, S., Yasui, H., Ishitsuka, K., Kumar, S., Kumar R., Pandite, L.N., Hideshima, T., Chauhan, D., Anderson, K.C., The small-molecule vegf receptor inhibitor pazopanib (GW786034B) targets both tumor and endothelial cells in multiple myeloma, *PNAS*, 103(51), 19478–19483 (2006).
- Ribatti, D., *History of Research on Tumor Angiogenesis*, Springer, İtalya, 1-17 (2009).
- Ribatti, D., Judah Folkman, a Pioneer in the study of angiogenesis, *Angiogenesis*, 11, 3-10 (2008).
- Ribatti, D., Vacca, A., Roncali, L., Dammacco, F., The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for *in vivo* research on anti-angiogenesis, *Curr. Pharm. Biotechno.*, 1, 73-82 (2000).
- Riely, G.J., Miller, V.A., Vascular endothelial growth factor trap in non-small cell lung cancer, *Clin Cancer Res.*,13,4623-4627 (2007).
- Risau, W., Mechanisms of angiogenesis, *Nature*, 386, 671-674 (1997).
- Roque Diaz, R., Nguewa, P.A., Parrondo, R., Perez-Stable,C., Manrique, I., Redrado, M., Catena, R., Collantes, M., Penuelas, I., Diaz-Gonzalez, J.A., Calvo, A., Antitumor and Antiangiogenic Effect of the Dual EGFR and HER-2 Tyrosine Kinase Inhibitor Lapatinib in a Lung Cancer Model, *BMC Cancer*, 10:188 (2010).
- Rosenstein, J.M., Krum, J.M.. New roles for VEGF in nervous tissue-beyond blood vessels, *Exp. Neurol.*, 187, 246-3 (2004).
- Ruacan, S., Karsinogenez, *Klinik Onkolojinin Biyolojik Temelleri*, XV.Ulusal Kanser Kongresi, 23 Nisan, Antalya, 5–11 (2003).
- Sabancı., P.A., T98G İnsan Glioblastoma Multiforme Hücre Kültüründe Sorafenib ve Lityum Klorür Etkilerinin Araştırılması, *Uzmanlık Tezi*, İstanbul Üniversitesi, Nöroşirürji, İstanbul, Türkiye (2010).
- Sagar, S.M., Yance, D., Wong, R.K., Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer-Part 1, *Curr. Oncol.*, 13 (1), 14-26 (2006).
- Schlessinger, J., Lemmon, M.A., SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling, *Sci. STKE*, 191 (2003).

Shimizu, K., Endo, O., Goto, S., Sakoda, A., Ono, Y., Sakai, Y., Bioassay-based evaluation of toxicity of suspended particulate matter in humans: integrated uses of alveolar cells (A549) in air-liquid interface culture and hepatocarcinoma cells (Hep G2), *Biochem. Eng. J.*, 22, 1–9 (2004).

Shravan, K., Chintala, J., Jasti, S., Matrix metalloproteinases and their biological function in human gliomas, *Int. J. Devl. Neuroscience*, 17, 495-502 (1999)

Takahashi, H., Hattori, S., Iwamatsu, A., Takizawa, H., Shibuya, M., A novel snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) predominantly induces vascular permeability through preferential signaling via VEGF receptor, *J. Biol. Chem.*, 279, 46304-14 (2004).

Tanaka, T., Yui, Y., Naka, N., Wakamatsu, T., Yoshioka, K., Araki, N., Yoshikawa, H., Itoh, K., Dynamic analysis of lung metastasis by mouse osteosarcoma LM8: VEGF is a candidate for anti-metastasis therapy, *Clin. Exp. Metastasis*, 30, 369–379 (2013).

Tepeköy, F., Fare Ovaryumunda Protein Kinaz C İzotiplerinin Dağılımı Ve Folikülogenezle İlişkisi, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye (2011).

Tong, M., Tai, H.H., 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase can be induced by dexamethasone and other glucocorticoids at the therapeutic level in A549 human lung adenocarcinoma cells, *Arch. Biochem. Biophys.*, 435, 50–55 (2005).

Tunalı, G., Meme Kanseri Hücre Dizilerinde PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolu İhhibisyonunun Reseptör Tirozin Kinazların Ekspresyonuna Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye (2012).

Woodburn, J.R., The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy, *Pharmacol Ther.*, May-Jun, 82(2-3), 241-50 (1999).

Yazır, Y., Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF): reseptörleri ve fonksiyonları, *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 29 (2), 7-12 (2007).

Yenerel, N.M., Tirozin Kinaz İhhibitörlerinin KML Dışı Kullanımı, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, 3-7 Kasım Belek, Antalya, Türkiye (2010).

Zachary, I., Molecules in focus vascular endothelial growth factor, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30, 1169-1174 (1998).

Zhang, S., Zhau, H.E., Osunkoya, A.O., Iqbal, S., Yang, X., Fan, S., Chen, Z., Wang, R., Marshall F.F., Chung, L.W., Wu, D., Vascular endothelial growth factor regulates myeloid cell leukemia-1 expression through neuropilin-1-dependent activation of c-MET signaling in human prostate cancer cells, *Mol. Cancer.*, 19(9),9 (2009).

Zhu, X.D., Zhang, J.B., Fan, P.L., Xiong, Y.Q., Zhuang, P.Y., Zhang, W., Xu, H.X., Gao, D.M., Kong, L.Q., Wang, L., Wu, X.Z., Tang, Z.Y., Ding, H., Sun, H.C., Antiangiogenic effects of pazopanib in xenograft hepatocellular carcinoma models: evaluation by quantitative contrast-enhanced ultrasonography, *BMC Cancer*, 11:28 (2011).

Zwick, E., Bange, J., Ullrich, A., Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies, *Endocrine-Related Cancer*, 8 (3), 161–173 (2001).

Zygalaki, E., Tsaroucha, E.G., Kaklamanis, L., Lianidou, E.S., Quantitative real-time reverse transcription–PCR study of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants and VEGF receptors (VEGFR-1 and VEGFR-2) in non–small cell lung cancer, *Clinical Chemistry* 53(8)1433–1439 (2007).

http-1 <http://www.healthpoise.com/global-cancer-statistics/> (19.06.2013)

http-2 <http://www.selleckchem.com/products/Pazopanib-Hydrochloride.html>
(19.06.2013)

http-3 <http://www.ebiotrade.com/newsf/2009-10/20091023160208117.htm>
(19.06.2013)

http-4 <http://www.bioscience.co.uk/cpl/135041/>(19.06.2013)