

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(DOKTORA TEZİ)

**GOSSYPOL'UN ANTI-ANJİYOGENİK ETKİSİNİN *in vitro* ve *in vivo*
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

GÖNÜL ULUS

Tez Danışmanı : Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

İkinci Danışman : Doç. Dr. A. Tansu KOPARAL

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.01.00

Sunum Tarihi : 30.06.2015

Bornova-İZMİR

2015

Gönül ULUS tarafından Doktora tezi olarak sunulan “Gossypol’un Anti-anjiyogenik Etkisinin *in vitro* ve *in vivo* Yöntemlerle Araştırılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş vetarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza:

Jüri Başkanı :

.....

Raportör Üye :

.....

Üye :

.....

Üye :

.....

Üye :

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum ‘Gossypol’un Anti-anjiyogenik etkisinin *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerle araştırılması’ başlıklı tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, döküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesine usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

30/06/2015

İmzası

Gönül ULUS

ÖZET

GOSSYPOL'UN ANTI-ANJİYOGENİK ETKİSİNİN *in vitro* ve *in vivo*
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

ULUS, Gönül

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

İkinci Danışman: Doç. Dr. A. Tansu KOPARAL

30.06.2015, 120 Sayfa

Bu tez çalışması pamuk bitkisinden (*Gossypium hirsutum*) elde edilen bir madde olan Gossypol'un anti-anjiyogenik etkisini araştırmak için *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda yapılan deneysel çalışmaları kapsamaktadır. Bu çalışma ile hücre kültürü çalışmalarında HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) hücreleri ile Gossypol'un anjiyogenez sürecinin temel basamakları olan hücre canlılığı, endotel hücre göçü ve tüp oluşumu olaylarına olan etkilerine dayanılarak anti-anjiyogenik etkisi gösterilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçlara dayanılarak Gossypol'un Ross-308 cinsi tavuk yumurtaları kullanılarak CAM (Chorioallantoic Membrane) Assay ve Balb/c farelerde oluşturulan Ehrlich tümör modeli ile anti-anjiyogenik etkisi araştırılmıştır.

Test maddemizin HUVEC hücreleri üzerinde, doz artışına bağlı olarak hücre canlılığında azalma meydana getirdiği, hücre göçü ve tüp oluşumunda inhibisyona neden olduğu, CAM üzerinde kılcal damar gelişiminde ve Ehrlich tümör deneylerinde tümör gelişiminde inhibisyona yol açtığı saptanmıştır. Ayrıca Balb/c farelerde Gossypol uygulanmış tümör gruplarında deneyin başlangıcı ve bitişi kıyaslandığında biyokimyasal ve hematolojik birtakım parametrelerde değişiklikler, histokimyasal çalışmalarda tümör yoğunluğunda azalma, apoptotik hücrelerde artış, VEGF ekspresyonunda azalma gözlenmiştir.

Sonuç olarak Gossypol'un anti-anjiyogenik etkiye sahip bir madde olduğu görülmüştür. Fakat kanser tedavisinde bir alternatif yol olan anti-anjiyogenik tedavide kullanılabilecek hammadde olup olamayacağının tam olarak ortaya konulabilmesi için daha ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Gossypol, anjiyogenez, anti-anjiyogenez, endotel hücre, hücre göçü, tüp oluşumu, CAM (Chorioallantoic Membrane), Ehrlich Tümör modeli.

ABSTRACT

INVEGTIGATIONS ON ANTI-ANGIOGENIC EFFECTS OF GOSSYPOL
WITH *in vitro* and *in vivo* METHODS

ULUS, Gönül

PhD in Biological Science

Supervisor: Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. A. Tansu KOPARAL

30th of June 2015, 120 pages

This thesis includes *in vitro* and *in vivo* experimental studies to evaluate the effects of Gossypol which is derived from cotton (*Gossypium hirsutum*) on angiogenesis. This study revealed the anti-angiogenic effects of Gossypol in cell culture studies with HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) cells depending on the effects on cellular proliferation, endothelial cell migration and tube formation which are basic steps of angiogenesis. Anti-angiogenic effect of Gossypol was evaluated with CAM (Chorioallantoic Membrane) assay using fertilized Ross-308 chicken eggs and Ehrlich tumor model on Balb/c mice depending on the results of the cell culture studies.

It was seen that Gossypol decreased cell viability, inhibited cell migration and tube formation on HUVEC cells depending on the dose, inhibited capillary formation on CAM and tumor formation on Ehrlich tumor model. In addition, when the beginning and the end of the experiment of Gossypol applied tumour groups in Balb/c mice compared, changes in some biochemical and hematological parameters, reduction in tumour density in histochemical studies, increment in apoptotic cells, reduction in VEGF expression were seen.

As a result Gossypol is a substance having anti-angiogenic effect. However, further studies are needed to determine its convenience as a natural product in anti-angiogenic therapy which is an alternative way of cancer treatment.

Keywords: Gossypol, angiogenesis, anti-angiogenesis, endothelial cell, cell migration, tube formation, Chorioallantoic Membrane, Ehrlich Tumor model.

TEŞEKKÜR

Çalışmam sırasında bilimsel katkıları ve sağladığı imkanlar ile doktora eğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. N.Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU'na, ihtiyaç duyduğum her an, her anlamda bana katkıda bulunan yüksek lisans tez danışmanım ve doktora ikinci tez danışmanım Anadolu Üniversitesi öğretim üyesi Doç. Dr. A.Tansu KOPARAL'a,

Hücre kültürü çalışmaları sırasında bana her türlü bilimsel desteği sağlayan ve deneylerimi gerçekleştirmem için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi AR-GE uydu laboratuvarlarının tüm imkanlarını bana sunan Prof. Dr. Kemal BAYSAL'a,

Tezimin bir kısım deneylerini gerçekleştirebilmem için Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarının tüm imkanlarını bana sunan Doç. Dr. Günay YETİK ANACAK'a,

G.A.T.A. Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Taner ÖZGÜRTAŞ'a, İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesinden Doç. Dr. Elif İlkay İKİTİMUR ARMUTAK'a, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalından Yar. Doç. Dr. Ahmet Altun'a,

Tezimde kullandığım döllenmiş yumurtaları temin eden Abaloğlu Kuluçka Tesisleri yetkililerine,

Tez yazımında bana her türlü teknik ve manevi desteği veren kardeşim Doç. Dr. Taner ULUS'a,

Manevi destekleri ile her zaman bana güç veren, varlık sebebim aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu projenin mali desteği E.Ü. Bilimsel Araştırma Fonu 2011-FEN-006 numaralı proje tarafından sağlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
İÇİNDEKİLER.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Endotel Hücreleri.....	6
1.2. Anjiyogenez.....	7
1.3. Endojen Anjiyogenik Faktörler.....	12
1.4. VEGF'nün Anjiyogenez Sürecindeki Rolü.....	12
1.5. Tümörün Mikroçevresi.....	15
1.6. Tümör Damarlarının Yapısı.....	16
1.7. Tümörün Neovaskülarizasyonu.....	18
1.8. Kanser Hücrelerinin Özellikleri.....	18
1.9. Tümör Anjiyogenezinde Terapi Yaklaşımları.....	19
1.9.1. Tümör anjiyogenezi ve anti-VEGF Tedavi.....	21
1.9.2. Anti-VEGF tedavide problemler.....	21
1.9.3. Anti-VEGF tedaviye direncin mekanizmaları.....	22

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
1.10. İnvazyon ve Metastaz.....	22
1.10.1. Metastaz yolları.....	23
1.11. Gossypol.....	24
1.11.1. Gossypol'ün biyolojik özellikleri.....	26
1.12. Suramin.....	30
1.13. Çalışmanın Amacı.....	32
2. MATERYAL VE METOT.....	33
2.1. Materyal.....	33
2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	33
2.1.2. HUVEC Hücre Hattı.....	33
2.1.3. Deney Hayvanları.....	33
2.2. Metot.....	33
2.2.1. HUVEC hücre hattında sitotoksosite düzeylerinin belirlenmesi.....	33
2.2.3. HET-CAM testi.....	36
2.2.4. <i>in vivo</i> Antikanser etkinin değerlendirilmesi.....	37
3. BULGULAR.....	44
3.1. Test maddelerinin HUVEC Hücreleri Üzerine Etkileri.....	44
3.1.1. Gossypol'un HUVEC hücrelerinin çoğalması üzerine etkisi.....	44
3.1.2. Suramin'in HUVEC hücrelerinin çoğalması üzerine etkisi.....	45
3.2. Test Maddelerinin Anti-Anjiyogenik Etkinin Belirlenmesi.....	46

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.1. Gossypol'un in vitro AntiAnjiyogenik Etkisinin Belirlenmesi.....	46
3.2.2. Suramin'in in vitro Anti-Anjiyogenik Etkisinin Belirlenmesi.....	46
3.2.3. Test Maddelerinin <i>in vivo</i> Anti-Anjiyogenik Etkisinin Belirlenmesi.....	52
3.2.4. Gossypol ve Suramin'in Anti-anjiyogenik Etkisinin Karşılaştırılması.....	57
3.2.5. Antikanser Etkinin Değerlendirilmesi.....	60
4. TARTIŞMA	75
5. SONUÇ.....	87
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	88
ÖZGEÇMİŞ.....	120

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Anjiyogenezin rol oynadığı fizyolojik ve patolojik durumlar.....	8
1.2. Tümör gelişimi ve damarlanma ilişkisi.....	9
1.3. Anjiyogenez süreci.....	11
1.4. Anjiyogenez aktivatör ve inhibitörler arasındaki denge.....	11
1.5. Anjiyogenik büyüme faktörleri tarafından parakrin ve otokrin uyarılma.....	12
1.6. VEGF ve anti-anjiyogenez hedefli ilaçlarla etkileşimini gösteren ana anjiyogenez yolağı.....	14
1.7. Tümör mikroçevresinin hücreli ve hücreli olmayan elementleri.....	16
1.8. Normal damarlar ile tümör damarlarının yapısı.....	17
1.9. Tümörün anti-anjiyogenik tedaviye varsayımsal cevabı.....	19
1.10. VEGF’den bağımsız pro-anjiyogenik mekanizma.....	20
1.11. Pamuk bitkisi ve <i>Thespesia populnea</i> bitkisi.....	24
1.12. Gossypol’un kimyasal yapısı.....	25
1.13. Gossypol enantiomerlerinin yapısı.....	26
2.1. Deney hayvanlarının bakımlarının yapıldığı kafesler.....	38
2.2. Gossypol tedavisi uygulanan hayvanların bakımının yapıldığı kafesler.....	40
2.3. Suramin tedavisi uygulanan hayvanların bakımının yapıldığı kafesler.....	40
3.1. Gossypol’un HUVEC hücrelerinin çoğalması üzerine etkisi.....	44
3.2. Suramin’in HUVEC hücrelerinin çoğalması üzerine etkisi.....	45

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.3. Gossypol'un HUVEC hücrelerinin göçü üzerine etkisi.....	48
3.4. Gossypol'un HUVEC hücrelerinin tüp oluşturması üzerine etkisi.....	49
3.5. Suramin'in HUVEC hücrelerinin göçü üzerine etkisi.....	50
3.6. Suramin'in HUVEC hücrelerinin tüp oluşturulması üzerine etkisi.....	51
3.7. Gossypol'un CAM üzerine etkisi.....	53
3.8. Gossypol'un anti anjiyogenik etki puanları.....	54
3.9. Gossypol'un ortalama anti-anjiyogenik ortalama skor değerleri.....	54
3.10. Suramin'in CAM üzerine etkisinin görüntüleri.....	55
3.11. Suramin'in anti anjiyogenik etki puanları.....	56
3.12. Suramin'in ortalama anti-anjiyogenik ortalama skor değerleri.....	56
3.13. Gossypol ve Suramin'in hücre göçüne etkisinin karşılaştırılması.....	57
3.14. Gossypol ve Suramin'in tüp oluşumuna etkisinin karşılaştırılması.....	58
3.15. Gossypol ve Suramin'in CAM üzerine etkisinin karşılaştırılması.....	59
3.16. Tümör kontrol grubu ve negatif kontrol grubu deney hayvanları	60
3.17. Kontrol grubu tümör dokusu histolojik kesiti.....	66
3.18. Suramin grubu tümör dokusu histolojik kesiti.....	67
3.19. Post-Gossypol grubu tümör dokusu histolojik kesiti.....	68
3.20. Kontrol grubu tümör dokusu histolojik kesiti.....	69
3.21. Suramin grubu tümör dokusu histolojik kesiti.....	70
3.22. Gossypol grubu tümör dokusu histolojik kesiti.....	71
3.23. Kontrol grubu tümör dokusu histolojik kesiti.....	72

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.24. Suramin grubu tümör dokusu histolojik kesiti.....	73
3.25. Gossypol grubu tümör dokusu histolojik kesiti.....	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Anjiyogenezi uyaran ve inhibe eden faktörler	13
1.2. VEGF blokajının bilinen yan etkileri.....	22
2.1. CAM üzerinde anti anjiyogenik etkinin değerlendirilmesi için kullanılan skor değerleri.....	36
2.2. Tümör Hacminin Hesaplanması.....	39
3.1. Ehrlich Ascites Tümör Modeli Sonuçları.....	60
3.2. Farelerin Total Vücut Ağırlığı Ortalamaları.....	61
3.3. Hematoloji Parametrelerinin Başlangıç Ortalamaları.....	63
3.4. Hematoloji Parametrelerinin Bitiş Ortalamaları.....	63
3.5. Biyokimyasal Parametrelerin Başlangıç Ortalamaları.....	64
3.6. Biyokimyasal Parametrelerin Bitiş Ortalamaları.....	64

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Kısaltmalar**

DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FBS	: Fetal Bovine Serum
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür)
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi (Phosphate Buffer Saline)
EDTA	: Ethylenediaminetetraaceticacid
EBM-2	: Endothelial Cell Basement Medium-2
CAM	: Chorioallantoic Membrane
HBSS	: Hank's Balanced Salt Solution

1. GİRİŞ

Kanser, dokuların kontrolsüz gelişimi ve düzensiz gelişim ve farklılaşma olmadan invazyonudur. Çoğalma, sinyalizasyon, büyüme süpresörlerinin kaybı, hücre ölüm direnci, replikatif ölümsüzlük, anjiyogenez, invazyon ve metastaz olarak 6 biyolojik yetenek kanserin karakteristik özellikleridir (Nazir et al., 2014).

Kanserin günümüzde dünyada kalp ve enfeksiyon hastalıklarından sonra en yaygın üçüncü ölüm nedeni olduğu düşünülmektedir. Kanser, gerçekte çeşitli mekanizmalarla ortaya çıkan bir patolojidir ve son yıllarda kanser tedavisinde yeni bir çok yöntem geliştirmiştir. Birçok etkili kemoterapötik ajan bulunmasına rağmen var olan antikanser ilaçlar düşük su çözünürlüğü, iritan özellikler, kararsızlık, seçici olmayan ilaç dağılımı gibi çeşitli yan etkilere neden olan farmasötik ve farmakolojik özellikler açısından ideal değildir (Tila et al., 2015).

Tümör; normal dokuları aşan ve normal dokularla koordine olmayan anormal doku kütesidir (Robbins, 1999). Tümörler üç grupta sınıflandırılabilir:

- Bening tümörler herhangi bir dokuda ortaya çıkarlar. Ortak özellikleri farklı bölgelere metastaz yapamamalarıdır.
- In situ tümörler genellikle epitelde oluşurlar. Tümör hücreleri kanser hücrelerinin morfolojik görünümüne sahip olmalarına rağmen epitel aşamasında kalırlar. Bazal membran ve mezenşim dokuya yayılmazlar.
- Kanserler, mezenşim dokuyu saran kötü huylu tümörlerdir (Franks and Teich, 1996).

Anjiyogenez, önceden var olan damarlardan yeni damarların oluştuğu çok basamaklı bir süreçtir (Mousa, 1998; Kerbel, 2008). Bu basamaklı süreç fetal gelişim, kadın üreme sistemi (Liekens et al. 2001), yara iyileşmesi gibi normal şartlarda ve romatoid artrit, diyabetik retinopati, duodenal ülserasyon, solid ve hematolojik tümör gelişiminde meydana gelir (Griffioen et al., 1998).

Tümör gelişimi ve metastaz, anjiyogenez ve lenfanjiyogeneze bağlıdır. Anjiyogenez hızlı çoğalma fazında olan tümör hücrelerinden salgılanan kimyasal sinyallerle tetiklenir. (Folkman, 1995).

Anjiyogenez aktivatör ve inhibitörler arasındaki denge ile düzenlenir. Anjiyogenik büyüme faktörleri anjiyogenik faktörlerden fazla üretildiğinde denge 'anjiyogenik süreç' olarak adlandırılan kan damarı oluşumu lehine döner. Anjiyogenez, üreme siklusu (korpus luteum oluşumu, endometrial damarlanma, plasental gelişim), yara iyileşmesi, kemik tamiri gibi baz olaylar dışında sınırlandırılmıştır. Bu olaylar sırasında gerçekleşen anjiyogenez geçici bir süre gerçekleşir. Bunun aksine kalıcı ve düzensiz anjiyogenez tümörün uyku fazından malign faza değişiminde temel adımdır. Günümüzde anjiyogenez kanserin karakteristik özelliklerinden biri olarak kabul edilir. Anjiyogenez tümör gelişimi

invazyon ve metastazla ilişkilidir (Hanahan and Weinberg, 2011). Fakat anjiyogenez olayı neoplastik hastalık patogenezinde sınırlı değildir. Neoplastik hastalıkları dışında makuler dejenerasyon, diyabetik retinopati, diyabet, romatoid artrit gibi hastalıklarla da ilişkilidir. Tüm bunlar anjiyogenez inhibisyonunu farmakolojik araştırmalarda cazip bir hedef haline getirmektedir (Quesada et al., 2010; Caballero et al., 2013).

Anjiyogenez hücre, ekstrasellüler matriks, çözünebilir faktörler arasındaki yoğun bir etkileşim ile ilgili kompleks bir süreçtir (Lee et al. 2010). Anjiyogenez tümör gelişimi ve metastaz gibi patolojik süreçlerde önemli rol oynar (Huang et al. 2006). Yeni oluşmuş kan damarları kanser gelişimini besin ve oksijen sağlayarak ve atık ürünlerin uzaklaştırılmasına yardım ederek destekler. Metastaz, tümör hücrelerinin primer tümörden ayrılıp hedef organlarda gelişmesi, anjiyogeneze bağımlıdır (Mathur et al. 2006; He et al. 2009; Pund . et al., 2014).

Tümör damarlanması tümör büyümesi ve metastazda önemli rol oynadığı için tümör damarlanmasının hedeflenmesi antitümör tedavide cazip bir yaklaşım haline gelmiştir. Antianjiyogenik tedavinin elli yıldan fazla süredir kanser tedavisinde önemli bir unsur olduğu düşünülmektedir (Folkman, 1972). Çoğu tümörler anjiyogenez olmaksızın 1-2 mm³' den daha fazla büyüyemezler (Deng et al., 2011). Antianjiyogenik etki gösteren 300'den fazla ajan bildirilmiştir. Bu moleküllerden yaklaşık 40 tanesi klinik denemelerde kullanılmaktadır (Tong et al., 2006). Bu anti-anjiyogenik ilaçlar kansere karşı etkin iken iyi gelişmiş tümörlerde var olan damarlar üzerinde minimal etkiye sahiptirler ve büyük tümörlerde sınırlı aktivite gösterirler (Bergers et al., 2003).

Damar bozucu tedavide kullanılan damar bozucu ajanlar (VDA) önceden var olan damarların fonksiyonunu ve bütünlüğünün bozulmasına yöneliktir. Dolayısıyla tümörün damar sisteminin kesilmesine ve tümör hücrelerinin ölmesine neden olur (Micheletti et al., 2003). VDA'ların potansiyel avantajlarından biri deneysel büyük tümörlerde küçüklere göre daha büyük aktivite gösterebilmesidir (Siemann and Rojiani, 2005). Terapötik yaklaşım olarak tümör damarlanmasının hedef alınması görüşü prelinik çalışmalarla desteklenmiştir ve klinik çalışmalarla onaylanmıştır (s (Folkman, 2007; Kim et al., 2012). Bununla birlikte VDA'lar deneysel tümörlerde merkezde nekroza neden olurlar fakat anjiyogenezin meydana geldiği tümör periferinde herhangi bir etki göstermezler. Bu yüzden anti-anjiyogenik ve damar bozucu aktiviteye sahip yeni bileşikler geliştirilmesi çok cazip hale gelmiştir (Ren et al., 2009; Jiang, et al., 2013)

Kanser zor tedavi edilebilen bir hastalıktır. Günümüzde birçok kimyasal bileşik birçok toksik yan etkiye sahiptir. Bu yüzden yüksek biyoaktiviteye ve düşük toksisiteye sahip antikanser ilaç araştırmaları aktif bir alandır (Wang et al., 2014).

Doğal ajanların kullanımı sadece geleneksel kemoterapilerle kıyaslandığında insanlarda minimal toksisiteye sahip olmaları değil birçok sinyal yolağını hedeflemesiyle ümit de vericidir. Malignant transformasyonu ve ilerlemesi birçok sinyal yolağında genetik değişikliklere neden olan çok aşamalı bir süreçtir (Li et al., 2010). Kanser tedavisinde doğal ajanlar tek başlarına ve/veya adjuvan kombinasyon kemoterapide ilaç direncinin üstesinden gelmek ve ve/veya ilaç nedenli toksisiteyi azaltmak için daha etkili olabilir. Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan bir çok antikanser ajan bitkiler (vincristine, vinblastine, etoposide, paclitaxel, camptothecin, topotecan, and irinotecan), deniz canlıları (cytarabine), mikroorganizmalar (dactinomycin, bleomycin, and doxorubicin) gibi ürünlerden elde edilmişlerdir (Bhanot et al., 2011). *In vitro* ve *in vivo* çalışmalardan elde edilen umut verici sonuçlardan dolayı kanser tedavisinde doğal ajanlar klinik denemelerde araştırılmaktadır (Phuah and Nagoor, 2014).

Tümör anjiyogenezi için sadece anjiyogenik faktörlerin up-regülasyonu yeterli değildir. Aynı zamanda negatif inhibitörlerin de down regülasyonu gereklidir (Dameron et al., 1994). VEGF gen ailesi VEGF-A, -B, -C, -D and -E, and Plazental Büyüme Faktörü üyelerini içerir. Bunların içinde VEGF-A (VEGF olarak adlandırılır) bu altı üye içinde anahtar anjiyogenik sinyal faktördür. VEGF-C ve VEGF-D ise esas olarak lenfanjiyogeneze ilişkilidir (Hicklin and Ellis, 2005; Sitohy et al., 2012). VEGF ailesinin üyeleri tirozin kinaz aktivitesine sahip VEGFR-1, -2 ve -3 olmak üzere 3 reseptöre bağlanır. VEGF, VEGF-1 ve VEGF-2 reseptörleri ile bağlanarak iş görür. VEGF-2 sinyali endotel hücre çoğalması, proteaz üretimi, damar permeabilitesine neden olur (Dvorak, 2002). VEGF-1'in negatif anjiyogeneze regülatörü olduğu düşünülmektedir (Ferrara, 2004; Theocharis S., et al., 2015).

Günümüzde tümör anjiyogenezi sınırlamak için belirlenen en uygun strateji VEGF yolağını bloke etmektir. Preklinik çalışmaların sonuçları VEGF blokerlerinin diğer tedavi şekilleri ile tedavi edilememiş ilerleyen ve tekrarlayan çeşitli insan kanserlerinde önemli terapötik etkileri göstermiştir (Kubota, 2012).

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Testi hücre çoğalmasının ve mitokondrial fonksiyonun bir belirteci olarak kullanılmaktadır. MTT testi tek tabakalı kültürlerde sitotoksikite ölçümleri veya toksik madde varlığında hücre canlılığının belirlenmesinde sık kullanılan bir yöntemdir (Fotakis and Timbrell 2005; Fent 2001). Bu testin, hızlı ve yüksek duyarlılığa sahip olduğu kanıtlanmıştır (Potera, 2007). MTT testi, sarı renkli suda çözünebilen tetrazolium tuzunun mor renkli çözünmeyen formazon tuzuna dönüşümüne dayalı, hızlı ve hassas kalorimetrik bir testtir ve hızlı bir şekilde başlıca mitokondrilerde bulunan süksinatdehidrogenaz aktivitesini ölçmektedir (Wu et al, 1999). Formazan tuzunun yoğunluğunun ölçülmesiyle canlı hücrelerin yoğunluğu belirlenmektedir. MTT, yaşayan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat-dehidrogenaz enzimine spesifik olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanmanın

sonunda suda çözünmeyen koyu mavi renkte kristaller oluşmaktadır. Kristaller, DMSO ve izopropanol gibi organik çözücülerde kolayca çözünmektedir. Çözünmüş olan bu boya, konsantrasyona bağımlı olarak spektrofotometrik yöntemle görünür dalga boylarında ölçülebilen bir absorbanı vermektir. Böylece indirekt olarak hücrelerin metabolik aktiviteleri ölçmektedir. Ayrıca ölçülen değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir (Mossman, 1983; Potera, 2007). Tetrazoliumun formazona dönüşüm ürünleri NADP ve NADPH'ın indirgenmesi ile oluşur. NADH dehidrogenazlar primer olarak solunum siklusunun enerji üretim reaksiyonunda (glikoliz, TCA siklusu ve oksidatif fosforilasyon) görev alırlar. NADPH dehidrogenaz ise primer olarak biyosentezdeki indirgeyici reaksiyonda görev alır. MTT yönteminde canlı hücrelerin mitokondrial dehidrogenazı tetrazolium halkasını böler ve MTT sitotoksite yöntemi hücrenin, tetrazolium tuzunu formazon ürününe çevirebilme yeteneğini ölçer. Hücrenin canlılığı (metabolik aktivitesi) kaybolduğu zaman mitokondrial fonksiyon azalır ve sonuç olarak çevirebilme yeteneği azalır. Formazon miktarı birçok hücre hattında hücre sayısı ile orantılı olarak oluşur. Bu nedenle MTT testi hücre canlılığının ve çoğalmasının ölçülmesinde kullanılır. Bu teknik özellikle metabolik olarak aktif hücreler için kullanılmaktadır, çoğalmayan yada süspansiyon hücre kültürlerinde kullanılmaz (Mossman, 1983; Alley et al., 1988; Wu et al., 1999; Putnam et al., 2002).

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)Testi hücre çoğalmasının ve mitokondrial fonksiyonun bir belirteci olarak kullanılmaktadır. MTT testi tek tabakalı kültürlerde sitotoksisite ölçümleri veya toksik madde varlığında hücre canlılığının belirlenmesinde sık kullanılan bir yöntemdir (Fotakis and Timbrell 2005; Fent 2001). Bu testin, hızlı ve yüksek duyarlılığa sahip olduğu kanıtlanmıştır (Potera, 2007). MTT testi, sarı renkli suda çözünebilir tetrazolium tuzunun mor renkli çözünmeyen formazon tuzuna dönüşümüne dayalı, hızlı ve hassas kalorimetrik bir testtir ve hızlı bir şekilde başlıca mitokondrilerde bulunan süksinatdehidrogenaz aktivitesini ölçmektedir (Wu et al, 1999). Formazan tuzunun yoğunluğunun ölçülmesiyle canlı hücrelerin yoğunluğu belirlenmektedir. MTT, yaşayan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat-dehidrogenaz enzimine spesifik olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanmanın sonunda suda çözünmeyen koyu mavi renkte kristaller oluşmaktadır. Kristaller, DMSO ve izopropanol gibi organik çözücülerde kolayca çözünmektedir. Çözünmüş olan bu boya, konsantrasyona bağımlı olarak spektrofotometrik yöntemle görünür dalga boylarında ölçülebilen bir absorbanı vermektir. Böylece indirekt olarak hücrelerin metabolik aktiviteleri ölçmektedir. Ayrıca ölçülen değer yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir (Mossman, 1983; Potera, 2007). Tetrazoliumun formazona dönüşüm ürünleri NADP ve NADPH'ın indirgenmesi ile oluşur. NADH dehidrogenazlar primer olarak solunum siklusunun enerji üretim reaksiyonunda (glikoliz, TCA siklusu ve oksidatif fosforilasyon) görev alırlar. NADPH dehidrogenaz ise primer olarak biyosentezdeki indirgeyici reaksiyonda görev alır. MTT yönteminde canlı

hücrelerin mitokondrial dehidrogenazı tetrazolium halkasını böler ve MTT sitotoksite yöntemi hücrenin, tetrazolium tuzunu formazon ürününe çevirebilme yeteneğini ölçer. Hücrenin canlılığı (metabolik aktivitesi) kaybolduğu zaman mitokondrial fonksiyon azalır ve sonuç olarak çevirebilme yeteneği azalır. Formazon miktarı birçok hücre hattında hücre sayısı ile orantılı olarak oluşur. Bu nedenle MTT testi hücre canlılığının ve çoğalmasının ölçülmesinde kullanılır. Bu teknik özellikle metabolik olarak aktif hücreler için kullanılmaktadır, çoğalmayan yada süspansiyon hücre kültürlerinde kullanılmaz (Mossmann, 1983; Alley et al., 1988; Wu et al., 1999; Putnam et al., 2002).

İdeal anjiyogenez çalışma modelinin aşağıdaki ihtiyaçları karşılaması gerekmektedir:

- Model, yeni damar oluşumunun kantitatif ölçümüne imkan sağlamalıdır (vasküler uzunluk, volüm, damar ağındaki damarların sayısı, bazal membranın genişliği gibi).
- Model, yeni damarın fonksiyonel karakteristiklerinin ölçümünü sağlamalıdır (Endotel hücresi migrasyon, proliferasyon oranı, tüp oluşum oranı, kan akım oranı ve vasküler permeabilite gibi)
- Yeni oluşan damarlarla var olan damarlar kolayca ayırt edilebilmelidir Yeni damar oluşumuna neden olabileceği için doku hasarlanmasından kaçınılabilmelidir
- Herhangi bir *in vitro* yanıt, *in vivo* modelde de gösterilebilmelidir.
- Model, uzun süreli ve noninvaziv monitörizasyona izin vermelidir Aynı zamanda yöntem, maliyet uygun, hızlı, kolay uygulanabilir, tekrarlanabilir ve güvenilir olmalıdır (Özgürtaş, 2009).

Yukarıda sayılan nedenler dikkate alındığında, HET-CAM modeli uygun bir *in vivo* model olarak, kanser davranışlarının ortaya konmasında, anjiyogenezde sıklıkla kullanılan uygun bir model olarak karşımıza çıkmaktadır (Leng et al., 2004).

HET-CAM testi toksisite ve irritasyon çalışmaları için alternatif olarak geliştirilmiş ve embriyolu tavuk yumurtasının kullanıldığı bir metottur (Krenn and Paper, 2009).

Bu yöntem ile hiperami, hemoraji ve pıhtılaşma gibi chorioallantoic membran içerisindeki makroskopik değişikliklerin incelenmesi mümkündür (Krenn and Paper, 2009).

Böylece birçok *in vitro* yöntemin aksine HET-CAM kan damarlarının incelenmesini sağlamaktadır. HET-CAM'da anjiyogenez, gelişimsel olarak 3 safhadan oluşur:

- Erken faz (5. günden 7. güne kadar)
- Ara faz (8. günden 12. güne kadar)
- Geç faz (12. veya 13. günden itibaren) (Özgürtaş, 2009).

HET-CAM deneyinde en temel sorun, nonspesifik inflamasyon reaksiyonlarıdır. Fiziksel ve kimyasal travma hücrel hasar ve inflamasyona neden olur. Bu hasar bazen yumurtanın kırık kabuk parçalarından dahi başlayabilir. Bu yüzden çok dikkatli temiz çalışılması gerekir. Bir diğer sorun ise, gerçek neovaskülarizasyonun artmış vasküler dansiteden ayrılmasının zorluğudur. Bunun dışında, görüntüleme güçlükleri de çalışmaları zorlaştırmaktadır (Özgürtaş, 2009).

Bu model ile çalışmanın avantajları arasında, çalışma yapılacak döllenmiş yumurtaların ucuz ve kolay oluşu gelmektedir. Bu model üzerinde yapılacak çalışmaların hayvan etik kurul onayı gerektirmemesi de bu modelin avantajlarından biridir. Bu modelle yapılan çalışmalarda sonuçlara çok kısa sürede ulaşmak mümkündür (Özgürtaş, 2009).

1.1. Endotel Hücreleri

Endotel, damar sistemi içinde yer alan ve birçok fizyolojik ve patolojik olaylarda çok önemli damar duvarı (düz kaslar) arasına sınırlandırılmış mezoderm kaynaklı tek katlı, büyük yassı yada kübik hücrelerden oluşur. (Yaylalı ve Küçükaslan, 2011). Erişkin bir insanda endotel hücre kitlesi toplam, ortalama 1 kg ağırlığında olup 1-7 m²'lik bir yüzey oluşturmaktadır. Yüzeyindeki glikoproteinler ile glikozaminoglikanların negatif yük kazandırdığı endotel hücreler, hücrel ve hormonal moleküllerle etkileşim içinde olduklarından çok sayıda reseptör taşımaktadırlar. Trombosit agregasyon inhibisyonu, fibrinolizis fonksiyonları ile pıhtılaşmayı önleyici bir yüzey oluşturmak, ayrıca doku ve dolaşım arasında madde alışverişi, vasküler tonusun düzenlenmesi, lökosit ve trombosit adhezyonunun regülasyonu gibi görevleri vardır (Yaylalı ve Küçükaslan, 2011).

Hemen hemen bütün dokuların kan desteğine ihtiyacı bulunmaktadır ve kan desteği de endotel hücrelerinin varlığına bağlıdır. Endotel hücreler adapte edilebilen bir yaşam destek sistemi yaratırlar ve vücudun herhangi bir alanında damar oluşturabilirler (Alberts et al., 1980). Kan damarlarında sıralanmış olan endotel hücrelerinin, buldukları çevrenin ihtiyaçlarına göre kendi sayılarını ve düzenlerini adapte edebilirler. (Alberts et al., 1980). Bulduğu bölgeye veya lokal çevrenin özelliklerine göre olarak önemli fenotipik çeşitlilikleri vardır. Lenf endotel yumu, lenfler tümör metastazında rol oynadığından önem taşımaktadır (Kumar et al., 2005).

Endotel tabakanın damar geçirgenliğindeki rolü, damarın tipine ve yerine göre farklılık gösterir. Lipofilik ve düşük molekül ağırlıklı hidrofilik maddeler herhangi bir engel ile karşılaşmadan kan ve dokular arasında hareket edebilirler.

Ancak intravasküler ve ekstrasvasküler sıvı dengesinin sürdürülebilmesi için makromoleküllere karşı seçici bir geçirgenlik vardır. İnflamasyon, immün cevap ve yara iyileşmesi gibi olayların başlaması için hormon, antikor vb. moleküllerin geçişi gereklidir (Yaylalı ve Küçükaslan, 2011).

Endotel hücreler aktin mikrofilyamentler, ara filament ve tubulin mikrotübüller olmak üzere üç farklı büyük hücre iskeletine sahiptirler. Mekanik özellikleri belirlemekten başka sabitlenmek zorunda olan hücre iskeleti, hücre şeklini ve farklılaşmasını sağlayan ve hücre dışı uzantılara cevap veren sinyalleşme mekanizmalarını belirler. Hücre iskeleti aynı zamanda hücre dışı matrikse göçün ve hücrenin yapışması için gerekli olan hücre içi gerilimi sağlamaya yardımcı etkenlerden en önemlisidir (Janmey,1998; Apostolovave et al., 2003).

Endotel hücreleri kan damarlarının önemli bir hücresel bileşenidir. Endotel bağlantı proteinleri doku bütünlüğü, vasküler geçirgenlik, lökosit ekstrasvazasyon ve anjiyogenezde önemli bir rol oynar (Jang, 2014). Endotel hücreler arası bağlantılar doku bütünlüğü, bariyer fonksiyonu ve hücre hücre iletişimde önemli bir rol oynar. Hücre-hücre bağlantıları endotel hücreler arası bağlantı bölgeleridir. Sinyal yapıları olarak görev yaparlar. Aynı zamanda da hücre pozisyonu, gelişiminin ve apoptozun sınırlandırılması, vasküler homeostazinin düzenlenmesinde sinyal yapıları olarak görev yaparlar (Jang, 2014). Endotel hücrelerinin geçirgenliği, esas olarak hücrenin şeklini belirleyen subsellüler matrikse hücrenin yapışmasını kolaylaştıran ve bağlantı yapısının oluşumunda rol oynayan hücre iskeletinin kısımlarınca kontrol edilir (Wehlang et al., 1979; Savion et al.,1982; Wong and Goblet, 1986, Goblet et al., 1990; Kolodgie et al., 1999). Hücre iskeletini oluşturan bölümlerin işlevleri, ikincil mesaj sistemleri olarak kabul edilen kalsiyum, protein kinaz C ve periyodik nükleotidler ile düzenlenir (Hoek et al., 1992; Kolodgie et al., 1999).

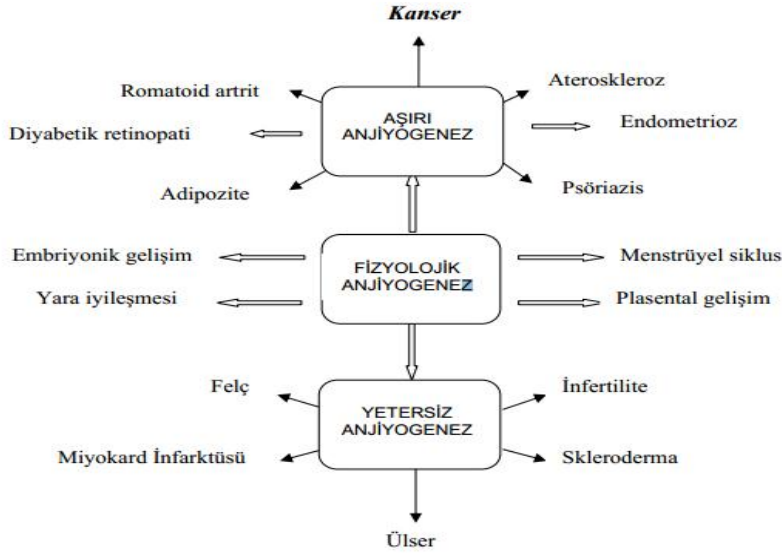
1.2. Anjiyogenez

Anjiyogenez önceden var olan damarlardan yeni kapillerlerin gelişmesi sürecidir (Folkman, 1971; Theocharis S. et al., 2015).

Anjiyogenez kelimesi ilk kez 1935 yılında Hertig tarafından isimlendirilmiş, mekanizması ise Folkman tarafından gösterilmiştir (Folkman 1972; Folkman and Klagsbrun 1987; Wang et al., 2004).

Anjiyogenez yetişkinlerde yara iyileşmesi, ovulasyon, embriyogenez gibi normal fizyolojik olaylarda gerekli bir olaydır ve bu olaylar dışında baskılanmıştır (Şekil 1.1). Bu olaylar sırasında meydana gelen anjiyogenez fizyolojik anjiyogenez adını alır (de Vos et al., 2004; Jian et al., 2006). Tümör gelişimi, ilerlemesi, yayılması ve metastaz, hemanjiyoma ve damarsal malformasyon, diabetik retinopati, yaşlanmaya bağlı makular dejenerasyon, sedef hastalığı, romatoid artrit, osteoartrit, astım, enfeksiyon hastalıkları, obezite, granulasyon

doku formasyonu, hemanjiyo, kronik akciğer hastalıkları gibi hastalıkların gelişimi sırasında meydana gelen anjiyogenez ise patolojik anjiyogenez olarak isimlendirilir (de Vos et al., 2004; Eun and Koh, 2004; Jian et al., 2006; Nazer et al., 2011; Friis et al, 2013; De Falco, 2014).



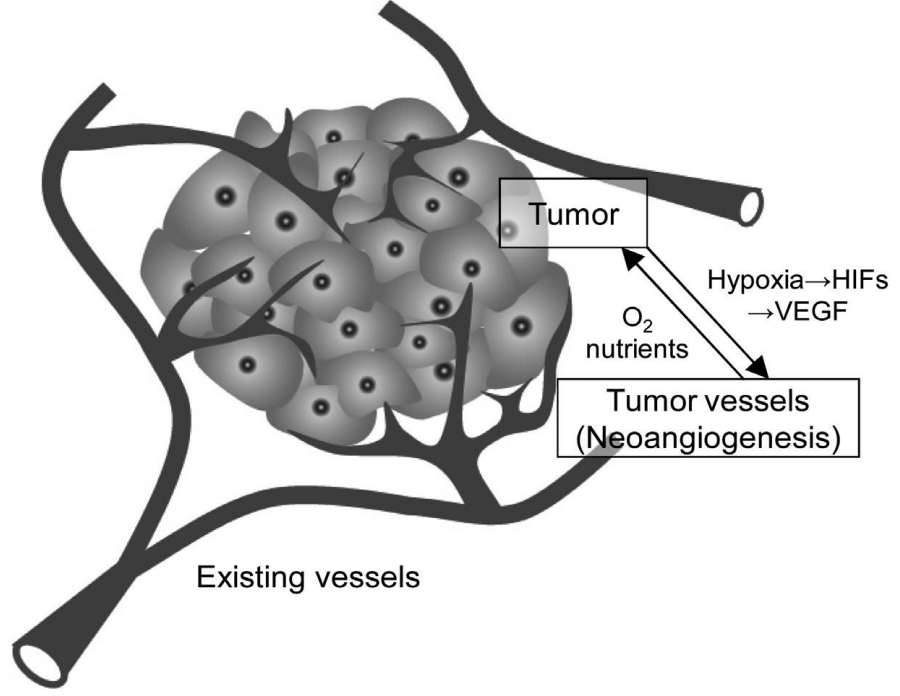
Şekil 1.1. Anjiyogenezin rol oynadığı fizyolojik ve patolojik durumlar (Aktaş, 2010).

Tümöral anjiyogenez fizyolojik anjiyogenezden farklıdır. Fizyolojik anjiyogenez stabil bir olay olup kendi kendisini sınırlandırmaktadır. Tümöral anjiyogenez ise stabil değildir. Hipoksi sonucu tümöral anjiyogenez olur ve tümöral anjiyogenez sonucu tümör büyür. Tümör büyüdükçe yine hipoksi olur ve yine anjiyogenez uyarılır. Dolayısı ile tümöral anjiyogenez fizyolojik anjiyogenez gibi sınırlı bir olay değildir (Özuysal, 2001; Kılıç ve ark., 2005; Aydın, 2008).

Anjiyogenez doku kütleindeki ve bunun sonucu olarak besin ve oksijen ihtiyacındaki artışa cevap olarak oluşan karmaşık bir mekanizmadır (Tong et al., 2004). 1-2 mm³e kadar olan tümörler besin ve oksijen ihtiyaçlarını basit difüzyon ile karşılayabilirler. Tümörün daha fazla büyüebilmesi için ev sahibi dokudan gelişecek kılcal damarlarla tümörün damarlanması gerekmektedir (Folkman, 2000; Ferrara, 2004; Nishida et al., 2006).

Tümör hücreleri temel olarak anjiyogenik faktörleri hücre yüzeyinde artık olarak bırakırlar veya dış uyarılara tepki verirler. En etkili dış anjiyogenik faktör uyarıcı ise hipoksidir. Hipoksi, bir dokunun kötü bir şekilde üzerinin kapanmasının bir sonucudur ve teleolojik olarak hayatta kalmaya çalışan bir hücrenin bu olaya tepki vermesidir (Fidler et al., 2001). Anjiyogenez, tümörlerin gelişimi ve ilerlemesinde çok önemli bir rol oynar. Basit difüzyon ile tümöre besin ve oksijen karşılanması yeterli olmayacağı için anjiyogenez olmadan tümör gelişimi birkaç milimetre çap ile sınırlanacağından tümör gelişimi ve ilerlemesi

anjyogenez gerektirir (Chia et al., 2010). Tümör gelişiminin damarlanma ile ilişkisi Şekil 1.2’de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Tümör gelişimi ve damarlanma ilişkisi (Kubota, 2012).

Tümör büyüdükçe ve tümörün merkezindeki hücrelerde hipoksi meydana geldikçe tümör kendi kan ihtiyacını karşılamak için ikmale başlamaktadır. Ayrıca anjyogenez ve damarlanma metastatik hücrelerin dolaşıma kaçmasına ve diğer organlara sıçramasına olanak sağlar. Tümör büyüdüğünde lokal hipoksik koşulların tümör hücrelerinde moleküler bir yanıt oluşturması bir anahtar transkripsiyon faktörü olan HIF (Hypoxia-Inducible Factor)’ın aktivasyonuna neden olur. Bu transkripsiyon faktörü VEGF gibi endotel hücrelerin yüzeyinde bulunan ilgili reseptörlere bağlanıp hücreleri aktive eden proanjyogenik faktörlerin ekspresyonunu tetikler ve anjyogeneze neden olur. Anjyogenezin tümör gelişimi ve metastazda önemli bir role sahip olduğundan anjyogenezin inhibisyonu kanser tedavisinde önemli bir rol strateji olarak düşünülür (Chia et al., 2010).

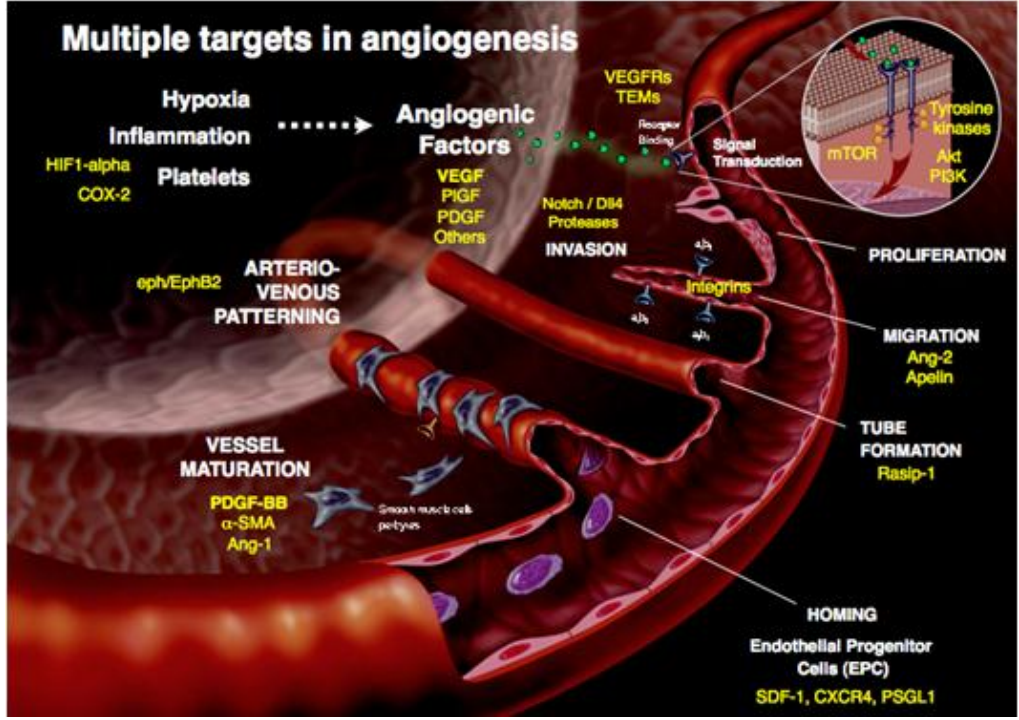
Anjyogenezin başlaması; vasküler endotel büyüme faktörü ailesi (VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D), asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörü (aFGF, bFGF), trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF) gibi proanjyogenik büyüme faktörlerinin endotel hücrelerini aktive etmesi ile tetiklenmektedir (Hanahan and Folkman 1996; Bussolino et al; 1997; Kuwano et al., 2001; Bisacchi et al., 2003; Jung et al., 2003; Margeli et al., 2003; Tonget al., 2004). Bu anjyogenik faktörler tümör hücrelerinde ve komşu stromal hücrelerde üretilirler, bunlar çevredeki endotel hücrelerinde bulunan reseptörlerine bağlanırlar ve anjyogenik sinyallerin aktarımını sağlarlar (Shimizu

and Oku, 2004). Daha sonra Şekil 1.3' de görülen ve kan damarı oluşumu için gerekli olaylar dizisi başlar:

- 1- Bazal membran (BM) ve Ekstraselüler Matriks (ECM)'in proteolitik enzimlerle yıkılması: Anjiyogenik faktörler matriks metalloproteinazlar (MMP) ve plazminojen aktivatör (PA) enzimlerini aktive eder. MMP adı verilen enzimlerle ekstrasellüler matriks proteinleri degrade edilir dolayısıyla damar stabilizasyonu bozulur ve endotel hücreler, hücrelerarası kontaklarını kaybeder ve onları destekleyen düz kas hücrelerinden ayrılırlar. MMP'ler ekstrasellüler matriksi parçalayıp ortaya çıkan boşluklarda endotel hücreleri rahatlıkla göç edebilir (Liao et al., 2007; Donati et al., 2008).
- 2- Endotel migrasyonu: ECM ve BM yıkımını takiben endotel hücre göçünü uyaran anjiyogenik faktörler endotel hücrelerindeki reseptörlerine bağlanarak onları aktive eder ve endotel hücrelerinin ECM içinde göçünü sağlarlar. Bu uyarıcı faktörler arasında endotel hücrelere spesifik davranan ve en iyi bilineni VEGF'dir (Liao et al., 2007).
- 3- Endotel proliferasyonu: ECM içinde göç eden endotel hücreleri yeni kan damarı yapımı için gerekli hücre sayısını sağlamak amacıyla büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalır.(Aydın, 2008).
- 4- Lümen oluşumu, matürasyon, anjiyogenezin inhibisyonu: Normal fizyolojik koşullar altında endotel hücrelerle sıkı bir ilişki halinde bulunan perisitler yeni damarlarının oluşturulması için yıkılan bazal membranı takiben ayrılırlar. Bazal membran yıkımı sonrası endotel hücreler uyarının geldiği yöne göç ederler (Aydın, 2008).

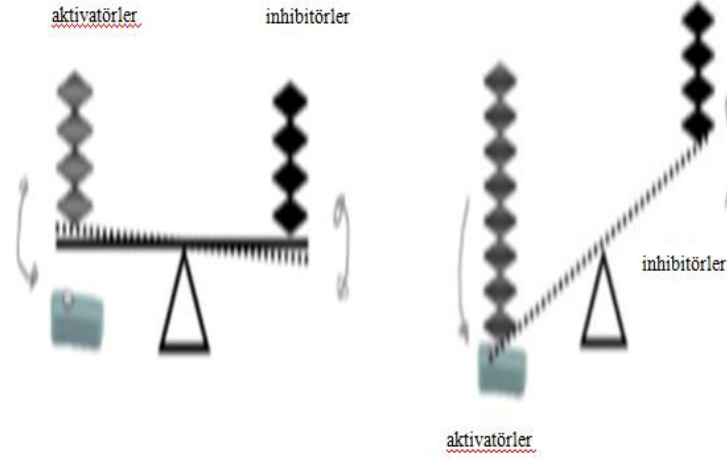
İntegrinler ve diğer membran proteinleri endotel hücrelerinin birleşmesini ve ECM'ye tutunmalarını sağlayarak lümen oluşumunu sağlarlar. Perisitler göç kolonuna çekilir ve yeni oluşturulan kan damarlarını çevreleyen bazal lamina oluşturulur. Yeni oluşan damarlarda perisit, endotel hücre birlikteliği sayesinde damar yapısı yıllarca stabil olarak korunur (Liao et al., 2007).

Anjiyogenez aktivatör ve inhibitör moleküller arasındaki denge ile düzenlenir (Şekil 1.4.) Tümör dokusu besin ve oksijene ihtiyaç duyduğunda anjiyogenez uyarılır. Bununla birlikte anjiyogenik faktörlerin aktivasyonunu up-regülasyonu anjiyogenezin başlaması için tek başına yeterli değildir. Aynı zamanda damar gelişiminde rol alan inhibitörlerin veya negatif regülatörlerin de down-regülasyonu gereklidir (Nishida et al., 2006). Anjiyogenez büyüme faktörleri, sitokinler ve bunların reseptörlerinin rol oynadığı karmaşık bir olaydır ve endotel hücreleri bu olayda temel rol oynamaktadır (Konukoğlu ve Turhan, 2005; Aydın 2008). Anjiyogenez, hipoksi ve enflamasyon uyarısı sonucu aktivatör faktörlerin artması ve inhibitör faktörlerin azalması ile başlamaktadır (Konukoğlu ve Turhan, 2005; Kılıç ve ark., 2005).



Şekil 1.3. Anjiyogenez süreci (The Angiogenesis Foundation, 2015)

Anjiyojenik Kontrol



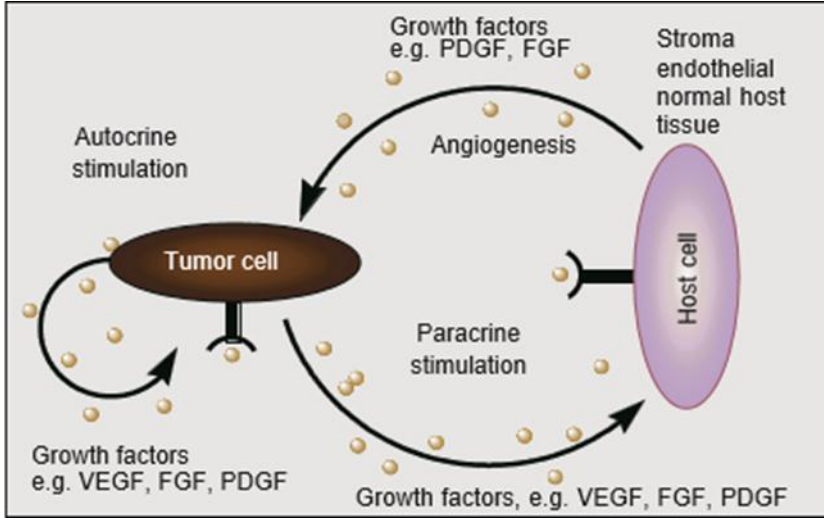
a) Anjiyogenezin Durması

b) Anjiyogenezin Başlaması

Şekil 1.4. Anjiyogenez aktivatör ve inhibitörler arasındaki denge. Tümör dokusu besin ve oksijene ihtiyaç duyduğunda, anjiyogenez uyarılır (a), Neoplazinin anjiyogenez için anjiyojenik aktivatörlerin tek başına up-regülasyonu yeterli olmayıp inhibitörlerin de down-regülasyonu gereklidir (b) (Nishida et al., 2006).

1.3. Endojen Anjiyogenik Faktörler

VEGF, temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), angiyojenin, transforme edici büyüme faktörü (TGF- α , TGF- β), tumor nekroz faktörü (TNF- α), trombosit kökenli endotel faktörü, granulosit koloni sitümüle edici faktör, plasental büyüme faktörü, interlökin-8, hepatosit büyüme faktörü ve epidermal büyüme faktörü gibi çok sayıda anjiyogenik aktivatör protein tanımlanmıştır (Şekil 1.5) (Nishida et al., 2006). Çizelge 1.1’de anjiyogenezi uyarın ve engelleyen faktörler gösterilmiştir.



Şekil 1.5. Anjiyogenik büyüme faktörleri tarafından parakrin ve otokrin uyarılma (VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor; FGF: Fibroblast Growth Factor; PDGF :Platelet-Derived Growth Factor) (McMahon, 2000).

1.4. Vasküler Endotel Growth Faktör (VEGF)’ün Anjiyogenez Sürecindeki Rolü

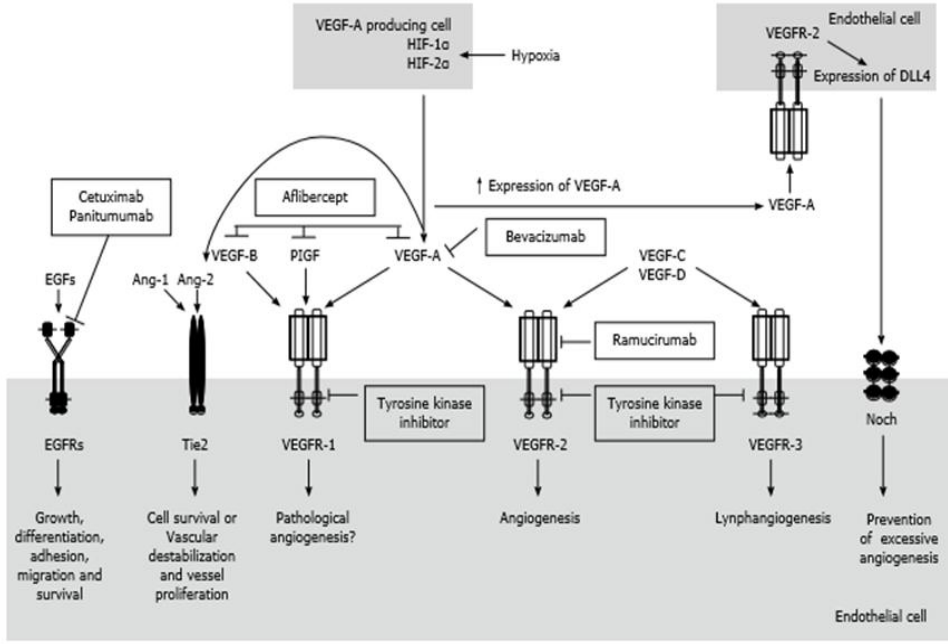
VEGF ailesi ve VEGF reseptörleri (VEGFR) neoplastik damarlanmada en çok üzerinde durulan faktördür. VEGF neoplastik dokularda ve normal dokularda çok güçlü bir anjiyogenik ajandır (Şekil 1.6.). Ayrıca anjiyogenezi uyarın faktörler içinde hem anjiyogenik etki gösteren hem de damar geçirgenliğini arttıran tek faktör VEGF’ dir (Kaiser, 2006; Erol, 2007). VEGF ailesi kanserli dokularda ve komşu stromada bulunur ve neovaskularizasyonda önemli bir rol oynar (Nishida et al., 2006).

Hipoksi, anjiyogenezi indükleyen hipoksiyle uyarılabilir faktör-1’ün (HIF-1 α) up-regülasyonuna ve HIF-1 α yoluyla VEGF ve reseptörlerinin ekspresyonuna neden olur (Bottaro and Liotta 2003; Bindra and Glazer, 2005; Nishida et al., 2006). Tümör hücreleri VEGF üretimi ile yeni kan damarlarından beslenirler ve tümör hücreleri endotel hücreleri ile karşılaştığında endotel hücrelerinin dış yüzeyinde bulunan reseptörlerine bağlanırlar. VEGF’nin reseptörlerine bağlanması sinyalleri endotel hücrelerinin çekirdeğine taşıyan nakil

proteinlerini aktive eder. Nükleer sinyal yeni endotel hücrelerinin gelişimi için gerekli ürünleri yapan genleri harekete geçirir (Nishida et al., 2006).

Çizelge 1.1. Anjiyogenezi uyaran ve inhibe eden faktörler (Nishida et al., 2006; Erol, 2007).

Anjiyogenezi uyaran faktörler	Anjiyogenezi engelleyen moleküller
Vasküler Endotel Büyüme Faktörü	Matriks kaynaklılar
Anjiyogenin	Arrestin
Anjiyopoetin-1, Anjiyopoetin-2	Kallistatin veya Kallikrein bağlayan protein (KBP)
Eritropoetin (EPO)	Endorepellin
Fibroblast büyüme faktörleri(aFGF,bFGF)	Filubin
İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1)	Trombospondin-1 (TSP-1)
İntegrinler	Trombospondin-2 (TSP-2)
İnterlökin-8	Tumstatin
Hepatosit büyüme faktörü	İnterferonlar (alfa, beta, gama)
Leptin	İnterlökinler (IL-4, IL-10, IL-12, IL-18)
Matriks metalloproteinazlar	Pigment epitelyum kaynaklı faktör (PEDF)
Nitrik osit sentetaz	Trombosit faktör-4
Plasental büyüme faktörü (PIGF)	Troponin-1
Trombosit kaynaklı büyüme faktörü-BB (PDGF-BB)	Anjiyostatin
Pleiotrophin	Antitrombin
Doku faktörü/PAR	Prolaktin fragmanı (16 kd lık fragman)
Transforme edici büyüme faktörü- α (TGF- α)	Taurolidin
Tümör nekrozis faktör- α (TNF- α)	Doku inhibitör metalloproteinazlar (TIMP)
VE-kadherin	Vazostatin



Şekil 1.6. VEGF ve anti-anjiyogenez hedefli ilaçlarla etkileşimini gösteren ana anjiyogenez yolağı (VEGF: Vaskular endotel büyüme faktörü, HIF: Hipoksi ile uyarılabilir faktör; EGF: Epidermal büyüme faktörü; EGFR: Epidermal büyüme faktör reseptör; VEGFR: Vaskular endotel büyüme faktörü reseptör; PlGF: Plasental büyüme faktörü (McMahon, 2000).

VEGF gen ailesi içinde VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, Plasental büyüme faktörü, VEGF-E ve VEGF-F olmak üzere 7 VEGF üyesi tanımlanmıştır (Byrne et al., 2005; Erol, 2007). Temel olarak anjiyogenez, lenfanjiyogenez ve damar geçirgenliğini düzenleyen bu faktörlerin tanımlanan VEGF reseptörlerine bağlanma özellikleri farklıdır (Erol, 2007).

VEGF-A anjiyogenez ile en güçlü ilişkisi olan ve üzerinde en çok çalışma yapılan faktördür. Anti-VEGF tedavilerin çoğu bu faktör üzerinde yoğunlaşmaktadır (Bhisitkul 2006; Erol, 2007). VEGF ailesi içinde, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C and VEGF-E kan damarlarının proliferasyonuna neden olurken, VEGF-C and VEGF-D lenfanjiyogenez ile ilgilidir. VEGF-A aynı zamanda VEGF/VPF (Vascular Permeability Factor) olarak bilinir. Daha sonra yapılan DNA çalışmaları ile aslında bu iki faktörün aynı olduğu gösterilmiştir (Erol, 2007). İnsan VEGF-A geni kromozom 6q21.3'da bulunur. VEGF-A bir heparin bağlanan glikoproteindir. 121, 145, 165, 183, 189 ve 206 aminoasit içeren ve mRNA'nın alternatif splicingi ile oluşan en az 6 izoformda oluşur. VEGF-A vasküler endotel hücreler için kuvvetli ve çok spesifik bir mitojendir ve anjiyogenez için gerekli olaylar dizisini uyarır. Çoğu tümörde over-eksprese olur. VEGFR1 ve VEGFR2 yoluyla etki eder ve hipoksi ile aktive olduğu gösterilen tek VEGF üyesidir (Erol, 2007). Yapılan çalışmalar ile VEGF-A'nın çeşitli fonksiyonları gösterilmiştir. Bunlar:

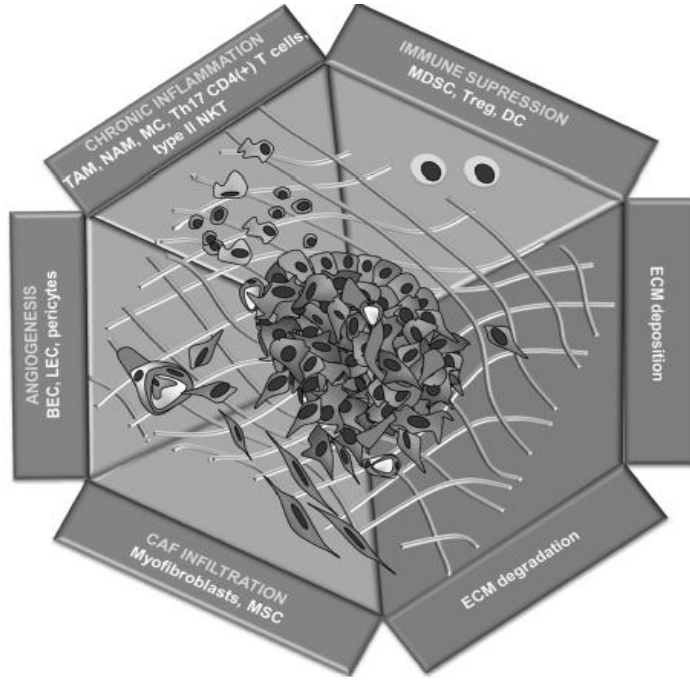
- Vaskülojenez, anjiojenez, lenfanjiojenez düzenler (Kaiser, 2006; Bhisitkulm, 2006).
- Damar geçirgenliğinde artışa neden olur (Miyamoto et al., 2000).
- Endotel hücrelerinin büyüme ve farklılaşması için gereklidir (Byrne et al., 2005).
- Endotel hücrelerinde apoptozisi engelleyerek hücre devamlılığını sağlar (Ferrara, 2004).

1.5. Tümör Mikroçevresi

Tümör hücrelerinin anjiyogenik faktörlerin ana kaynağı olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte fibroblastlar, perisitler, mezenşimal kök hücreler ve inflamatuvar immün hücreler, sinyal molekülleri, komşu kan damarları ve ekstrasellüler matriksden oluşan tümör mikroçevresinin de anjiyogenik moleküllerin salınımı ve immün sistemin modülasyonu yoluyla anjiyogeneze katkıda bulunduğu kanıtlanmıştır (Şekil 1.7.) (Prager et al., 2012).

Tümör ve tümörün mikroçevresi yakından ilişkilidir ve sürekli bir ilişki içindedirler. Tümörler salgıladıkları hücre içi sinyaller ile mikroçevreyi etkileyebilirler, tümör anjiyogenezini teşvik ederler ve immün hücreleri kanser hücrelerinin gelişimini ve büyümesini etkileyebilirken mikroçevredeki periferik immün toleransını etkilerler. Tümör mikroçevresinin tümör heterojenliğine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Tümör ile tümörün mikroçevresi ilişki Stephan Paget' in belli bir kanser tipinin metastazı (tohum) belli bölgelere metastaz eder şeklindeki 'tohum ve toprak' teorisindeki gibidir. Yani orijinal tümörün çevresi ile sekonder tümörün çevresi benzerlik gösterir (Paget, 1889). Tümör mikroçevresinin kanserin temel unsurlarından biri olarak belirlenmesinden sonra tümörün bu konakçı bileşenini, hedef alan tedaviler düzenlenip uygulanmaya başlamıştır (Sounni and Noel, 2013).

Kanser hücrelerinin malign özellikleri kanser hücreleri ile kanser hücrelerinin lokal çevreleri arasında bir etkileşim olmadan ortaya çıkamaz. Tümörden sızan immün hücreler, anjiyogenik vasküler hücreler, lenfatik endotel hücreler ve kanser bağlantılı fibroblastik hücreler kanser ilerlemesinde rol oynar. Bu komşu yapıların değişme özellikleri tümör hücrelerinin tümör gelişimi ve metastatik yayılması için gerekli bazı karakteristik fonksiyonları kazanabilmesinde önemli bir özelliktir ve bu yüzden tümör çevresini tahrip etmek için hedeflenen klinik uygulamalar zorunlu hale gelmiştir. Stromal hücrelerin çeşitliliği, tümör stromasının moleküler bileşiminin karmaşıklığı ve normal dokularla benzerliği tümör mikroçevresinin tedavi hedefi olmasında çok büyük zorluklara neden olmaktadır (Sounni and Noel, 2013).

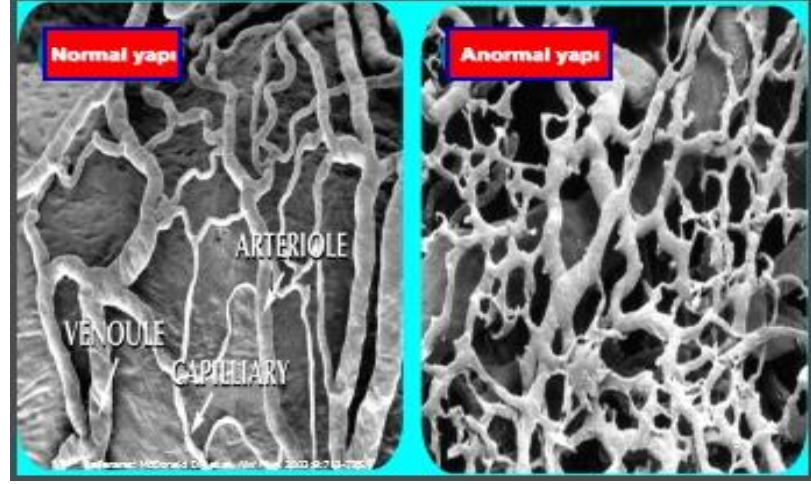


Şekil: 1.7. Tümör mikroçevresinin hücresel ve hücresel olmayan elementleri (Sounni and Noel, 2013).

Tümör mikroçevresi genellikle hipoksiktir. Tümör kütlesi arttığı için tümörün iç kısmı önceden var olan kan kaynağından uzaklaşır. Anjiyogenez bu etkiyi azaltırken lokal olarak ilerlemiş solid tümörlerin %50'sinde daha fazlasında kısmi oksijen basıncı 5 mm Hg'nin altındadır (venöz kanda kısmi oksijen basıncı 40 mm Hg'dir) (Blagosklonny, 2004; Weber and Kuo, 2012). Bu hipoksik çevre kanser ilerlemesine bağlı olarak nükleotid eksizyon tamiri (NER) ve yanlış eşleşme tamirinin down-regülasyonu nedeniyle genetik olarak düzensizliğe neden olur (Bindra and Glazer, 2005). Bu durum kötü prognoz ve metastazla ilişkili genlerin aktivasyonu ile ilgilidir (Blagosklonny, 2004).

1.6. Tümör Damarlarının Yapısı

Tümör damarları ile ev tümörün bulunduğu dokunun damarları arasında farklılıklar vardır. (Şekil 1.8.) (McDonalds and Baluk, 2002; Cao, 2004). Fizyolojik anjiyogenezle oluşmuş bir kapillerde her bir lümen başına 1-2 endotel hücresi bulunurken beyin tümörleri kapillerlerinde lümen başına 5-10 endotel hücresi bulunmaktadır. Tümör mikrodamarlanması normal dokulardaki mikrodamarlanmaya benzemez. Normal dokularda arter, arteriyol, kapiller, post kapiller venül ve ven yapısı bulunurken tümörlerde arteriyo-venöz şant veya değişik şekillerde olmaktadır. Dolayısı ile tümörlerdeki mikrodamarlanma dokulardaki gibi değildir (Özaysal 2001; Aydın, 2008).



Şekil 1.8. Normal damarlar ile tümör damarlarının yapısı (McDonald and Choyke, 2003).

Normal bir dokuda anjiyogenik aktivite homojen iken vaskülarize bir tümörde anjiyogenik aktivite heterojendir. Vaskülarize tümörde tüm tümör hücreleri anjiyogenik değildir. Çok iyi vaskülarize tümörlerde bile mikrodamar dansitesinin düşük olduğu alanlar ve yüksek olduğu alanlar bulunmaktadır ve anjiyogenik aktivite heterojendir (Özuysal 2001; Aydın, 2008).

Tümör damarları yapısal ve fonksiyonel açıdan anormaldirler. Heterojen kıvrımlı, kaotik olarak dallanmışlardır ve engebeli damar lümenine sahiptirler (Kim et al., 2015). Tümör kan damarları, normal damarlar gibi endotel hücreleri, perisitler ve bazal membrandan oluşmaktadır. Tümörlerin kan damarları yapısal ve fonksiyonel çeşitli anormallikler sahiptirler. Damarlar düzensiz kıvrımlı olarak şekillenmişlerdir ve arteriol, kapiller ve venüllerin hiyerarşik düzenine sahip değildirler (Baluk et al., 2005). Tümörlerdeki endotel hücreleri de düzensizdir (Cao, 2004). Anormal gen ekspresyonuna sahiptirler, canlı kalmak için büyüme faktörlerine ihtiyaçları vardır (Baluk et al., 2005). Tümör damarlarını oluşturan endotel hücreleri normal endotel hücrelerden 20 ile 2000 kat daha hızlı çoğalırlar (Gong et al., 2004). Tümör damarlarındaki perisitler de anormal yapı gösterirler. Anormal perisitler ve anormal endotel hücreleri bozulmuş bazal membran oluşumuna neden olurlar (Baluk et al., 2005). Tümör damarlarında normal bariyer görevini yerine getirebilmek için gerekli olan endotel katman bulunmaz. Bu durum tümör damarında sızıntıya neden olarak (Hatshizume et al., 2000; Baluk et al., 2005, Kim et al., 2015) dokular arası sıvı basıncını artmasına neden olurlar (Jain et al., 2002; Baluk et al., 2005, Kim et al., 2015). Ortaya çıkan bu dokular arası yüksek basınç sonucu kan akımı heterojendir ve besin, oksijen immün hücreler ve ilaçlar dengesiz olarak dağılırlar. (Kim et al., 2015). Lenfatik damarların tümörlerin içine doğru büyümesi bir taraftan dokular arasındaki sıvı basıncını azaltırken diğer yandan da lenf düğümlerine tümörün metastaz yapma riskini artırır. (Baluk et al., 2005). Tümör damarlarında, sağlıklı dokulardaki kan damarlarından farklı olarak arterioller ve venüller arasında bir fark yoktur. Bu anormal damar yapısı sonucu tümör damarlarında kaotik bir kan akışı kan akışı vardır. Örneğin, tek bir damar merkezden uzak tümör hücrelerine kanı taşıyabilir

ve tümör dokularından kanı toplayabilir. (Jain, 2002; Cao, 2004). Bu damar anormallikleri hipoksi, düşük pH, yüksek sıvı basıncı ile karakterize kötü bir çevre oluşturur (Kim et al., 2015).

1.7. Tümör Neovaskülarizasyonu

Tümör neovaskularizasyonu; anjiyogenez, vaskulogenez ve invaginasyon olmak üzere üç olay içermektedir (Papetti and Herman, 2002; Cao, 2004). Yeni oluşmuş kan damarlarına kök hücrelerden özelleşmiş dolaşımdaki endotel hücrelerinin eklenmesi olan vaskulogenez tümör damarlaşmasında önemli bir role sahiptir. (Lyden, 2001; Cao, 2004). Geniş ana damarların daha küçük damarlara bölünmesi olayı invaginasyon olayı da tümör damarlarının büyümesinde rol alır. (Dvarok, 2002; Cao, 2004).

1.8. Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Kanser hücrelerinin bazı karakteristik özellikleri vardır:

1. İmmortalite: Çoğu normal hücrenin bölünme sayısı sınırlıdır. Kanser hücreleri ise sınırsız sayıda bölünürler ve çok miktarda hücre oluştururlar. (Lowitz and Casciato, 2000).
2. Klonal orjin: Çoğu kanser hücresi tek bir anormal hücreden doğar. Bazı kanserler birden fazla sayıda malign klonlardan doğar. Bu klonlar ya bir saha hasarı sonucu (dokunun birden fazla sayıda hücrelerinin karsinojene maruz kalmasıyla) ya da bazı genlerdeki kalıtsal defektler sonucu oluşurlar (Lowitz and Casciato, 2000).
3. Kontakt inhibisyonun ve substratuma tutunarak büyüme özelliklerinin kaybı: Kültür ortamında büyüyen normal hücreler hücrelerin normalde yapıştığı substratuma yapışamazlarsa bölünemezler. Hatta besiyerleri bölünmeleri için gerekli tüm büyüme faktörleri ve diğer besin elemanlarını ihtiva etse bile bölünmezler. Kanser hücreleri ise, yarı katı bir besiyerinde substratuma yapışmaya gereksinim duymadan bağımsız olarak bölünmeye (büyümeye) devam edebilirler. (Lowitz and Casciato, 2000).
4. Proliferasyonun büyüme faktörlerinden ve besinden bağımsız olarak devamlı artışı: Bu durum kültür ortamındaki kanser hücrelerinin bir özelliğidir. Kanser hücreleri beslenmeleri için gerekli besin faktörlerini tüketmelerine rağmen büyümeye devam ettiklerinden aslında kendi kendilerini öldürmektedirler (Lowitz and Casciato, 2000).
5. Genetik instabilite: Bu durum, DNA tamirindeki ve DNA “mismatche”lerini tanımadaki defektlerden dolayıdır ve kanser hücrelerinin heterojen olmasına yol açar. (Lowitz and Casciato, 2000).

6. Metastaz: Benign tümörlerde veya normal hücrelerde bulunmayan bir özelliktir. (Lowitz and Casciato, 2000).

1.9. Anti-anjiyogenik Tedavi Yaklaşımları

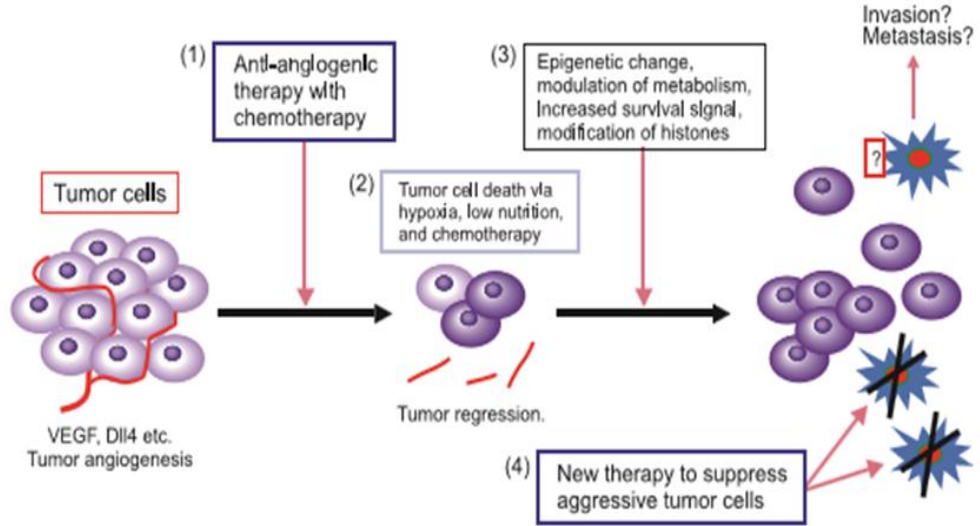
Anti-anjiyogenetik tedavi kanser tedavisinin aktif alanlarından biridir. Anti-anjiyogenik tedavinin cazip bir yaklaşım olması tümörün hipoksiye verdiği tepki sonucunda tümör anjiyogenezinin tetiklenmesinden kaynaklanmaktadır (Matter, 2001).

Anti-anjiyogenez 3 ana nedenden dolayı caziptir:

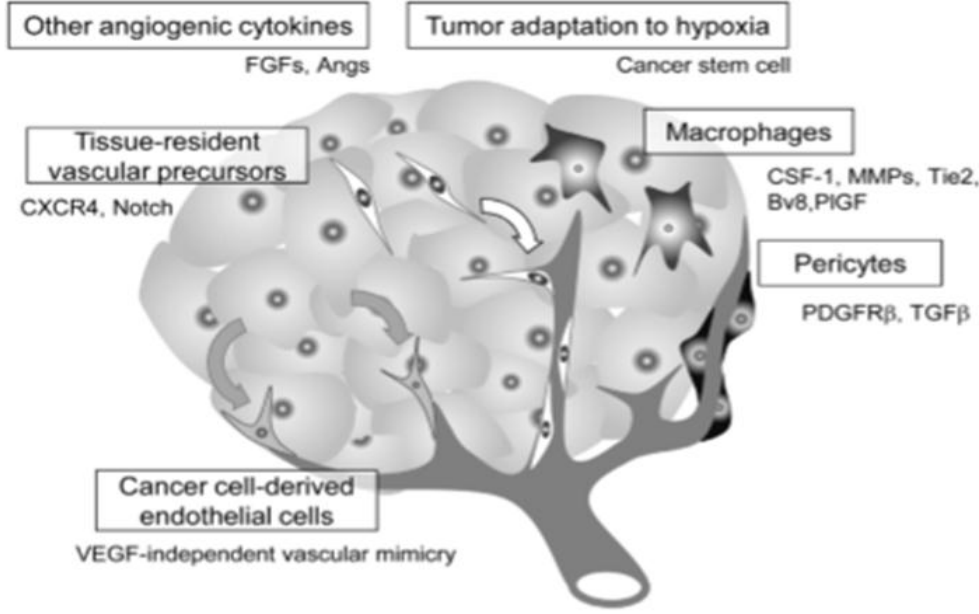
- Çoğu tümör anjiyogeneze bağımlıdır. Dolayısıyla yaygın birçok hastalığın tedavisinde ortak bir hedef sağlar.
- Endotel hücrelerde bazı tümörlerde görülen ilaç direnci gibi adaptasyonlar gelişmesi daha az muhtemeldir.
- Tümör damarlarının normal dokularda bulunan sessiz damarlardan daha farklılaşmış hedef sağladığı umulmaktadır (Iruela-Arispe M.L., 2005).

Tümör anjiyogenezine dayalı tedavi yaklaşımları iki grupta incelenebilir:

- Yeni kan damarlarının oluşum sürecini engelleyen vaskülostatik ajanlar
- Yeni oluşmuş kan damarlarının çatı elementlerini hedefleyen, bunları yıkan ve böylece antitümör etkiler yaratan vaskulotoksinler (Matter, 2001).



Şekil 1.9. Tümörün anti-anjiyogenik tedaviye varsayımsal cevabı. Anti anjiyogenik tedaviden sonra tümör hücrelerindeki hipoksi ve kötü beslenme ilaç direncinin gelişimine neden olabilir (Shibuya, 2014).



Şekil 1.10. VEGF'den bağımsız pro-anjiyogenik mekanizma: Anti-anjiyogenik tedavi için yeni hedefler. VEGF blokajı tümörlerde fibroblast büyüme faktörleri (FGFs), anjiyopoetinler gibi pro-anjiyogenik sitokinlerin ekspresyonunu artırır. Hipoksiye toleranslı tümör hücrelerinin seçilimi anti-anjiyogeneze tümörün adaptasyonuna neden olur. Makrofajlar, perisitler gibi damar bağlantılı hücreler tümör anjiyogenezine ve VEGF blokajına dirençli neden olur (Kubota, 2012).

Kemoterapi tümör hücre proliferasyonunu inhibe etmek için çoğu kanseri tedavi etmek için aktif ve etkili bir yoldur. Yeni kemoterapotik ajanlar keşfetmek için devam eden çalışmalar özellikle konakçı hücrelerin çoğalması üzerine daha az inhibitör etki yapan, belli tümör tipleri için seçici bileşikler üzerine odaklanmıştır. Ayrıca yeni ümit verici hedeflenmiş kemoterapotik ajanlar ise tümör hücrelerinin otonom çoğalmasına yönelmiştir. Tümör kan desteğinin inhibisyonu tümör gelişiminin durdurulması için tek yaklaşım olarak düşünülmektedir (Zhou and Huang, 2009). Bir anti-kanser stratejisi olan anti-anjiyogenik tedavi aktif olarak çoğalmakta olan tümör hücrelerine besin ve oksijen sağlamak için gelişen yeni damarları hedef alır (Zhou and Huang, 2009; Ebos and Kerbel, 2011; Kubota, 2012).

Anjiyogeneze inhibitörlerine karşı hücre direnç gelişme riskinin düşük olduğu düşünülmektedir. Çünkü anti-anjiyogenik tedavinin hedefi genetik olarak instabil tümör hücreler değil, yeni kan damarı oluşumuyla ilgili olan transforme olmamış endotel hücreleridir. Bununla birlikte tümör hücreleri anaerobik metabolizmaya dönüşümden dolayı kısmen hipoksiye dirençlidir. Buna rağmen anjiyogeneze inhibitörleri kanser tedavisinde tamamlayıcı olarak değerlidirler. Anjiyogeneze, anjiyogenik sürecin bir ya da daha fazla adımına etki edilerek inhibe edilebilir. Farklı inhibitör mekanizmaları ile anjiyogeneze inhibitörleri 2 gruba ayrılır: (i) İnsan vücudunda bulunan endojen inhibitörleri (ii) antitoksinler ve düşük molekül ağırlıklı bileşiklerden oluşan eksojen inhibitörler. Endojen anjiyogeneze

inhibitörleri VEGF sinyal sisteminin çeşitli bileşenlerini içerirler. Bunlar direk ve indirek olarak rol oynarlar. Eksojen anjiyogenez inhibitörleri ise heterojen bir gruptur ve direkt ve indirekt olarak rol oynayabilirler (Friis et al. 2013).

Anti-anjiyogenik ajanlar 2 yolla geliştirilir: (1) anjiyogenik faktörlerin hedef alınması, (2) anjiyogenik faktörlerin reseptörlerinin hedef alınması. Mekanizma bazal membrana zarar veren ve vaskular endotel hücre proliferasyonunu inhibe etme, ekstrasellüler matriks bileşenlerini degrade edici enzimleri tetikleyen moleküllere bağlanmasıdır (Zhou and Huang, 2009).

VEGF tedavisindeki problemlerin üstesinden gelmek için olası yolları belirlemek için yapılan çalışmalar, geleneksel VEGF blokajları ile veya VEGF blokajları olmaksızın yapılacak kombinasyonlar ile VEGF'den bağımsız ve tümör seçici ve pro-anjiyogenik mekanizmalar bulunmuştur. Bu bulgular günümüzdeki anti-anjiyogenik kanser tedavilerinin geliştirilmesi için seçenekler sunmaktadır (Kubota, 2012).

1.9.1. Anti-anjiyogenik tedavide Anti-VEGF tedavinin yeri

Folkman (1971), eğer kan ihtiyacı kesilirse tümörün büyümesinin duracağını belirtmiştir. O zamandan beri tümör anjiyogenezini sınırlayan çeşitli anti-anjiyogenik moleküllerin keşfedilmesi ile ilgili çalışmaların başlamasına neden olmuştur (Kubota, 2012).

VEGF Senger ve arkadaşları (1986) tarafında Gine domuzu tümör hücre hatları tarafından salgılanan Vasküler Geçirgenlik Faktörü (VPF) olarak keşfedilmiştir. Çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar VEGF'nin fizyolojik ve patolojik anjiyogenezde esas oyuncu olarak rol oynadığını ortaya koymuştur (Ferrara N., 2009). Anjiyogenez sürecini engellemek için VEGF blokerlerinin kullanımı en çok kullanılan yöntemdir. VEGF blokeri kullanılarak anjiyogenezin inhibisyonu ile ilgili birçok prelinik çalışma ile çeşitli kanser tiplerinde önemli tümör baskılayıcı etki gösterilmiştir (Kim et al., 1993; Ferrara N., 2005).

1.9.2. Anti-VEGF tedavide karşılaşılan problemler

Anti-VEGF tedavide karşılaşılan problemlerin (Çizelge 1.2) üstesinden gelmek için izlenecek yolları belirlemek için yapılan çalışmalarla, geleneksel VEGF blokajları ile veya VEGF blokajları olmaksızın yapılacak kombinasyonlar ile VEGF'den bağımsız ve tümör seçici ve pro-anjiyogenik mekanizmalar bulunmuştur. Bu bulgular günümüzdeki anti-anjiyogenik kanser tedavilerinin geliştirilmesi için seçenekler sunmaktadır (Kubota, 2012).

Çizelge 1.2. VEGF blokajının bilinen yan etkileri

Yan etki	Muhtemel mekanizma
Kanama	Endotel hücre apoptozisi; endotel hücre astar tabakasında
Trombotik olaylar	Artmış trombosit aktivasyonu; protrombotik bazal membranın kan dolaşımına maruz kalması
Hipertansiyon	Arterler ve venler arasında uygun olmayan denge; azalmış prostaglandin I-2 ve nitrik oksit seviyesi
Proteinüri	Podosit disfonksiyonu
Lökopeni, lenfopeni	Bozulmuş hematopoez
Hipotroidizm	Tiroit foliküllerinin etrafındaki kapillerlerin regresyonu

1.9.3. Anti-VEGF Tedaviye Direncin Mekanizmaları

Bazı kanserli hastalarda görülen VEGF blokajına direncin altında çeşitli mekanizmalar olduğu düşünülmektedir. Her mekanizmanın sorumluluk kapsamı kullanılan VEGF blokerinin tipine bağlı olarak farklı kanserlerde çeşitlilik gösterir. VEGF blokajına karşı kanser tipine bağlı olarak görülen direnç mekanizmalarının moleküler temelini anlaşılmaması anti-anjiyogeneik tedavinin geliştirilmesine fırsatlar sunmaktadır. VEGF blokajına karşı kanser tipine bağlı olarak gelişen direnç mekanizmalarının moleküler temelini anlaşılmaması anti-anjiyogenik tedavinin geliştirilmesi olanağı sunar (Bergers et al., 2008).

VEGF blokajına bağlı damar gerilemesi tümör dokularında hipoksiye neden olur. Yeterli miktarda oksijenin yokluğunda tümör hücrelerinin çoğalması tümör hücrelerinin çoğunluğunun elenmesine neden olabilir. Bununla birlikte kanser kök hücreleri olarak adlandırılacak hipoksiye toleranslı kanser hücreleri zayıf oksijenli ortamda hayatta kalabilir ve anti-anjiyogeneze tümör adaptasyonuna neden olur. Bazı çalışmalarda tümör hücrelerinin seçiminden sonra kalan hücrelerin tümörü daha invaziv ve metastatik yaptığını belirtmişlerdir (Ebos et al., 2009; Páez-Ribes et al., 2009). Bu çalışmalarda VEGF blokerlerinin yalnız başına kullanılmasının tümörde hipoksiyi malignant durumu kötüleştirdiğini bildirilmiştir. Bununla birlikte diğer karşıt prelinik ve klinik çalışmalarda VEGF blokajının kanserin kötüleşmesine neden olduğu kanıtlanamamıştır (Padera et al., 2008; Miles et al., 2010).

1.10. İnvazyon ve Metastaz

İnvazyon ve metastaz habis tümörlerin biyolojik işaretleridir. Kanserden kaynaklanan hastalıkların ve ölümlerin en önemli nedenleridir. Tümör hücreleri ana tümör kitlesinden ayrılarak tümör kan damarlarına veya lenf damarlarına girer ve farklı bir bölgede ikincil bir büyümeye neden olurlar (Kumar et al., 1992; Stetler et al, 2001; Kumar et al., 2005).

İnvazyon malign tümörlerin komşu dokuya yayılmasıdır. Benign tümörler kitlesini genişleterek büyürler ve genellikle kapsülleri vardır. Kanserde ise tümör çevre dokuların içine doğru ilerler ve dokuyu harap ederek o dokunun yerini alır. Preinvaziv dönemde olan kanserlere karsinoma denir. Karsinomada kanser henüz örtü epitelyum içerisinde olup bazal membranı geçmemiştir (Kumar et al., 1992; Stetler et al, 2001; Kumar et al., 2005).

Kanserin, birincil (primer) odakla aralarında bir devamlılık olmadan vücudun başka doku ve organlarına yayılmasına metastaz denir. İnvazyon yeteneği olan kanser hücreleri kan ve lenf damarlarına veya vücut boşluklarına girerek vücudun başka organ ve dokularına yayılır ve oralarda yeni tümör odakları oluşturur. Büyük, kötü diferansiye olmuş ve hızlı büyüyen malign tümörlerde metastaz yeteneği yüksektir. (Kumar et al., 2005).

Metastaz iki safhada gerçekleşir (Kumar et al., 2005):

Hücre-dışı Matriksin İstila Edilmesi: Normal dokuların yapısal düzeni ve işlevleri geniş ölçüde hücreler arası etkileşime ve ECM bağlı olarak belirlenir. Dokular birbirlerinden iki tip ECM ile ayrılmıştır: Bazal membran ve dokulararası bağ dokusu. Farklı şekilde organize edilmiş olsalar da her iki ECM kollajen, glikoprotein ve proteoglikandan oluşmaktadır. Metastaz safhasının birçok evresinde tümör hücreleri hücre-dışı matriksle etkileşime girmektedir. Hücre-dışı matriksin istilasını basamaklı bir işlemdir. Bunlar; tümör hücrelerinin birbirlerinden ayrılması, matriks bileşenlerine bağlanma, ekstrasellüler matriksin bozulması ve tümör hücrelerinin göçüdür (Kumar et al., 2005).

Tümör Hücrelerinin Damarlara Yayılması ve Yerleşmesi: Dolaşıma giren tümör hücreleri bağışıklık sisteminin savunmasına karşı doğuştan savunmasızdır. Dolaşım esnasında tümör hücreleri küme halinde biraraya gelme eğilimindedirler. Biraraya gelme tümör hücrelerinin kendi aralarında olan homotipik yapışma veya tümör hücreleriyle kan hücrelerinin arasında olan heterotipik yapışma ile sağlanır (Kumar ve ark., 2005).

1.10.1. Metastaz yolları

Kanserler başlıca; vücut boşlukları ve yüzeyleri, lenf damarları, kan damarları yoluyla yayılırlar.

Vücut Boşlukları ve Yüzeyleri Yoluyla Yayılma: Malign neoplazmın vücut boşluklarını çevreleyen yüzeylere ulaşması ile, tümörden kopan hücreler tohum rolü görerek o vücut boşluğuna komşu diğer doku ve organlara yayılabilir. (Anadolu Üniversitesi, 2014).

- Lenf Damarları Yoluyla Yayılma: Karsinomların yayılması genellikle bu yolla olmaktadır. Sarkomlar nadiren lenfatik damarlarla yayılır. Ancak lenf damarları ve kan damarları arasında pek çok bağlantılar olduğu için, lenf yoluyla yayılma sırasında kan yoluyla yayılma da söz konusu olabilir. Lenf yollarına giren kanser hücreleri bölgesel lenf düğümlerine ulaşır ve burada tutularak kanserin yayılmasına bir süre engel oluşturulur. Ancak lenf düğümü kanser hücreleri ile dolduğunda veya lenf düğümüne erişen kanser hücrelerinin burada yerleşip büyümelerinden bir müddet sonra diğer lenf düğümlerine yayılma olabilir. (Anadolu Üniversitesi, 2014).
- Kan Damarları Yoluyla Yayılma: Sarkomlar daha çok bu yolla yayılırlar. Ancak, karsinomlar da bu yolu kullanabilirler. Özellikle venöz damarların çeperi kanser hücreleri tarafından kolayca invaze edilebilir ve koparak kan akımına giren kanser hücreleri başka organ ve dokulara yayılabilir. Ayrıca sonuçta venöz dolaşıma katılan lenf akımı nedeniyle de, lenf yollarına giren tümör hücreleri kan akımına karışabilir. Arter duvarları ise tümör invazyonuna oldukça dirençlidir (Anadolu Üniversitesi, 2014).

1.11. Gossypol

Gossypol [(2,20-binaphthalene)-8,8'-dicarboxaldehyde, 1',1',6,6',7,7'-hexahydroxy-5,5'-diisopropyl-3,3'-dimethyl] pamuk bitkisi (*Gossypium hirsutum*) ve tropikal bir ağaç olan *Thespesia populnea*'dan (her iki üye de Malvaceae) elde edilen yağda çözünen polifenolik bir bileşiktir (Şekil 1.11.). Gossypol bitkide hemigossypol'un iki molekülünün dimerizasyonu ile üretilir ve dimer-sesquiterpenoid olarak sınıflandırılır. Sesquiterpenoidler terpenlerin bir sınıfıdır ve 3 adet isoprene ünitesine sahiptir. Ağaçları patojenlerden ve böceklerden korur (Stipanovic et al., 1986; Keshmiri- Neggab and Goliaei, 2013).



Şekil 1.11. Pamuk bitkisi (solda) ve *Thespesia populnea* bitkisi (sağda) (Keshmiri-Neggab and Goliaei, 2013).

Gossypol, Longmore (1886) tarafından keşfedilmiştir. Marchlewski (1899), Gossypol asedik asidi, üretmek için gossypol'u bir eter solusyonundan

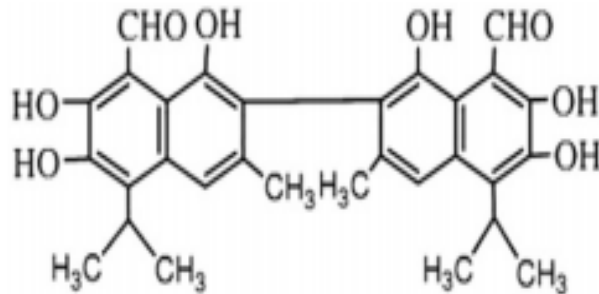
asetik asit kullanarak çökeltme yoluyla saflaştırmıştır. Bazı araştırmacılar gossypol'u boya olarak kullanmayı denemişler ve ışığa maruz kaldığında instabil hale geldiğini görmüşlerdir. Gossypol Gossypium' dan geldiği ve polifenolik kimyasal yapısından dolayı bu ismi almıştır (Keshmiri-Neggab and Goliaei, 2013).

Gossypol pamuk tohumundan rasemik karışım olarak izole edilen bir polifenolik bisesquiterpendir (Şekil 1.12.). Gossypol binaftal bağların etrafında dönmeyişinin engellenmesinden dolayı (+) ve (-) olmak üzere iki enantiomere sahiptir (Şekil 1.13) (Freedman et al., 2003; Keshmiri- Neggab and Goliaei, 2013). İlk olarak antifertilite ajanı olarak araştırılmıştır.

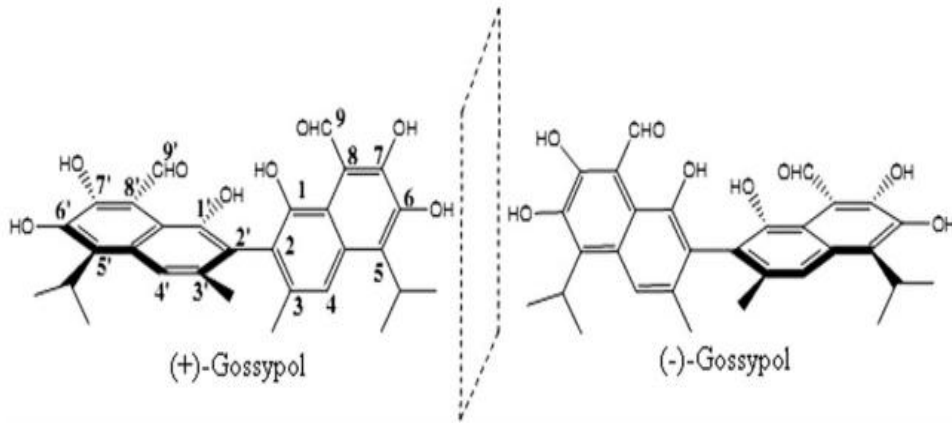
Gossypol serbest form ve kombine form olmak üzere iki formda incelenebilir. Gossypol'un serbest formu serbest gossypol aktif aldehit ve hidroksil grupları sayesinde toksik etki gösterir (Dao et al., 2000). Gossypol asetik asit gossypol'un tıbbi formudur ve ışık ve sıcaklığa karşı gossypol'den daha dayanıklıdır (Prasad and Diczfalusy 1982; Deng et al., 2013).

Gossypol, Çin'de erkeklerde doğum kontrol ajan olarak kullanılmaktadır. Yiyecek olarak pamuk tohumu kullanan çiftçilerde testesteronu baskılayarak seksüel potansiyelde bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Şahin ve ark., 2010).

Literatür gossypol'un toksik ve terapötik farmakolojik etkilerini enzim, sinyal iletim araçları ve membranlar gibi biyomoleküler hedefler ile etkileşimler gösterdiğini göstermektedir. Bu etkileşimler ile ilgili çalışmalar sayesinde gossypol'un potansiyel terapötik kullanımı keşfedilmiştir (Qian ve ark., 2014). Gossypol ilk olarak antifertilite ajanı olarak araştırılmıştır. Yakın zamanlarda gossypol'un *in vitro* ve *in vivo*da çeşitli malignant hücre tiplerinde antineoplastik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Oliver et al., 2005).



Şekil 1.12. Gossypol'un kimyasal yapısı (Keshmiri- Neggab and Goliaei, 2013).



Şekil 1.13. Gossypol enantiomerlerinin yapısı (Keshmiri- Neggab and Goliaei, 2013).

Gossypol'un yapılan çalışmalarla antitümör, anti-parazidik, antiviral etki gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir. Gossypol ilk olarak 1960'larda anti-fertilite ajan olarak incelenmiş ve erkeklerde spermatogenezi baskılayarak, kadınlarda ise progesteron hormonunun salgılanmasını inhibe ederek antifertilite etkisini gösterir. Bununla birlikte gossypol'un anti-inflamatuar ve immün fonksiyon etkileriyle ilgili raporlar da vardır. Gossypol sahip olduğu bu çok çeşitli biyolojik etkilerinden dolayı son yıllarda dikkat çeken bir maddedir. (Deng et al., 2013).

1.11.1. Gossypol'ün Biyolojik Özellikleri

Kısırlık yapıcı/gebelik önleyici özellik

Gossypol non-steroiddir ve hormon seviyesini etkilemez. Fakat erkek hayvanlar ve insanlarda sperm üretimini ve hareketliliğini önler. Sperm ve spermatogenik hücrelerde enerji metabolizmasını etkileyen enzim sistemlerini etkileyerek gebelik önleyici olarak rol oynar (Coutinho, 2002; Wang et al., 2009).

İnsan laktat dehidrogenaz (LDH) 5 İZOMERE SAHİPTİR. Anaerobik şartlar altında pürivat LDH tarafından NADH varlığında azaltılır. Birçok çalışmada gossypol'un anfertilitte özelliğinin özellikle (-) izomeri ile ilgili olduğu belirtilmektedir. (-) gossypol ile NADH'nın LDH ile bağlanmasına rakip seçici olmayan bir inhibitördür. Yu et al. (2001) gossypol'un antifertilite özelliğini sadece testis ve spermelerde bulunan ve enerji üretimi için gerekli olan mitokondrial LDH-C4 (LDH-X)'in inhibisyonuna dayandırmaktadır. Bununla birlikte bu etkinin koşulu ribonükleotit redüktaz (McClarty et al., 1985), malat dehidrogenaz (MDH), gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GA3PDH), sitoplazmik fosfolipaz A₂ (cPLA₂) gibi birçok enzim sistemlerinin inhibisyonu ile ilgilidir (Ikeda, 1990). Malat dehidrogenaz (MDH), sperm olgunlaşması sırasında akrozomal reaksiyonda önemli bir rol oynar. (Dodou, 2005; Vainio et al., 1985).

Antioksidan özellik

Polifenoller bitkilerin sekonder metabolitleridir. Genellikle ultraviyole radyasyon veya patojen saldırılarına karşı savunma ile ilgilidirler. Birçok romatik fenolik kimyasallar gibi gossypol de etkili bir antioksidandır (Laughton et al., 1989).

Gossypol'un ratlarda ferrik/askorbat ile inkübasyondan sonra karaciğer mikrozomal peroksidasyonu inhibe ettiği rapor edilmiştir (Hove & Hove, 1944). Bazı durumlarda gossypol'un fenolik hidroksil gruplarının modifikasyonunun antioksidan yeteneğini düşürdüğü, hidroksil gruplarının antioksidan aktivite için önemli olduğu gösterilmiştir (Wang et al., 2008).

Dodou et al. (2005) gossypol'un antioksidan özelliğinin lipit oksidatif hasar ile ilgili karakterize hastalıklarda (örneğin psoriasis) yararlı olabileceğini varsaymaktadırlar.

Antitümör özellik

Araştırmacılar gossypol'un antikanser özelliğinin birçok kanser hücre tipinde MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) veya flow sitometri hücre canlılık deneylerini kullanarak değerlendirilmiştir. Düşük dozlarda (-) gossypol'un hücreler üzerinde (+) gossypol ile kıyaslandığında daha etkili olduğu görülmüştür (Oliver et al., 2004, Kitada et al., 2003, Liu et al., 2002). Bu etkiler enerji üretimi ile ilgili sitoplazmik ve mitokondrial enzimlerin inhibisyonu (Zhai et al., 2006), oksidatif fosforilasyon zincirinin çözülmesi (Ueno et al., 1988) ve hücre ATP'nin tükenmesidir (Flack et al., 1993).

Gossypol'un aynı zamanda HeLa hücrelerinde DNA replikasyonu ve tamirinden sorumlu DNA polimeraz α (Keniry et al., 1989) ve topoizomeraz II gibi anahtar nükleer enzimleri inhibe eder ve DNA sentezini bloke ettiği gösterilmiştir. (Rosenberg et al., 1986).

Gossypol'un *in vitro* da regülatör proteinler Rb ve Siklin D1'i değiştirerek hücre siklusunu inhibe ettiği, TGF-b1 gen ekspresyonunu arttırdığı, protein kinaz-C aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Ligueros et al., 1997; Shidaifat, 1997; Teng, 1995)

Telomeraz, telomerlerin uzunluğunun sabit kalmasına yardımcı olan bir revers transkriptazdır. Telomeraz aktivitesinin yokluğu hücrenin yaşlanması ve ölümüne neden olur. Gossypol'un insan lösemi hücrelerinde hTERT'in transkripsiyonel downregülasyonu ve posttranslasyonel modifikasyonu yoluyla apoptosize ve telomeraz aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir. Transkripsiyonel downregülasyon c-Myc'nin inaktivasyonu ve Akt'nin posttranslasyonel modifikasyonu ile ilgilidir (Moon et al., 2008a). Gossypol ayrıca IAP-1, IAP-2, and X-linked IAP gibi apoptosiz inhibitörleri gibi NF-kappaB tarafından düzenlenen gen ürünlerinin ekspresyonunu downregüle eder. Moon et al. (2008b)

gossypol'un neden olduğu apoptozisin NFkappaB aktivitesinin baskılanması ile ilgili olduğunu düşünmektedirler.

(-)-Gossypol mitokondriden sitokrom c salınımına neden olur, caspaz-3 ve caspaz-9 aktivitesini artırır ve apoptotik ölüme neden olur. Balakrishnan et al. (2008) (-)- gossypol'un BH3'ü taklit ettiğini ve Bcl2 ailesinin proapoptotik proteinlerde BH3-bağlanan domaine bağlandığını ve apoptozisi indüklediğini bulmuşlardır. Bu durum X-ray ışınları ve kemoterapatik ajanların antitümör aktivitesini antiapoptotik Bcl-xL proteinini inhibe ederek ve proapoptotik Noxa and Puma'nın artışına neden olur (Meng et al., 2008; Xu et al., 2005).

Antivirüs özellik

Gossypolun HIV-1, HSV-2, influenza, parainfluenza gibi virüslere karşı antiviral özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir (Lin et al., 1993; Vander Jagt et al., 2000). Gossypol AZT'den daha az potent olmasına rağmen AZT uygulamasındaki kemik iliği üzerine olan ciddi yan etkilere sahip değildir. Gossypol tarafından HIV-1 revers transkriptazın inhibisyonu bu etkinin birincil mekanizmasıdır (Keshmiri-Neggab and Goliaei, 2013).

Antiparazidik özellik

Malaria, *Plasmodium* cinsinden protozoan parazitlerinin neden olduğu sivrisinek tarafından taşınan bulaşıcı bir hastalıktır. 4 türü (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*) insanlar tarafından taşınabilir (Mendis et al., 2001).

Etil, propil veya izopropil yan zincirli gossypol türevleri ve gossylic nitrile 1,1- divalerat *Plasmodium falciparum*'a karşı gossypol'un diğer türevlerinden daha güçlü etki göstermektedir. (Razakantoanina et al., 2000; Royer et al., 1986). Gossypol ayrıca *Endameba histolytica* ve *Trypanosoma cruzi*'ye karşı antiviral özellik göstermektedir. Gossypol'un antiparazidik aktivitenin arkasındaki moleküler mekanizma parazitlerin anaerobik hayat döngüsünde hayati ve temel enzimlerin seçici inhibisyonuna neden olur (Gonzalez-Garza et al., 1993; Montamat et al., 1982).

Antimikrobiyal özellik

Margalith (1967), gossypol'un antibiyotik özelliklerini spor üreten ve laktobasillere karşı pamuk tohumu ile beslenen hayvanlarda inhibitör etkisini göstermiştir. Bu sonuçlar gossypolun gastrointestinal sistemin mikrobiyasının dengesinde temel değişikliklere neden olduğunu göstermiştir. Vadehra et al., (1985) gossypolun gram pozitif bakterilere (*Streptococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Staphylococcus aureus*) karşı gram negatif bakterilerden (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella spp.*, *Proteus spp.*, and *Escherichia coli*) daha etkili olduğu belirtilmiştir. Bu durum gram pozitif ve gram negatif gruplarda hücre duvarı ve hücre membranı yapısal farklılıklardan

kaynaklanmaktadır. Örneğin gram pozitif bakteriler hücre duvarlarında daha fazla peptidoglikana sahiptir. Gram negatif bakterilerde ise dış membran yoktur. Bu ihtimal gossypol'un hedef bölgesine taşınmasını etkiler (Keshmiri-Neggab ve Goliaei, 2013).

Plazma kolesterol azaltıcı özellik

Kolesterol karaciğer tarafından üretilen bir lipittir ve normal vücut fonksiyonları için hayatidir. Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) yükselmiş seviyesi kalp hastalıkları riskini artırır (Keshmiri-Neggab ve Goliaei, 2013).

Shandilya et al. (1982) yetişkin dişi *Cynomolgus* maymunlarına 6 ay boyunca oral olarak 10mg/kg/gün olarak gossypol verildiğinde total plazma kolesterolü ve LDL seviyelerinde önemli bir azalma görülürken yüksek yoğunluklu protein (HDL) seviyesinde önemli bir azalma görülmemiştir. Bu durumun muhtemel mekanizmasının beslenmeyle alınan kolesterolün bağırsak emilimindeki azalma ve LDL'nin hepatic sentezindeki azalmaya bağlı olarak düşünülmektedir

Bu bahsedilen biyolojik fonksiyonlardan başka gossypol'un tümör hücreleri ve normal hücrelerde apoptosize neden olduğu rapor edilmiştir. Çeşitli hücre tiplerinde gossypol'un neden olduğu apoptosiz için çeşitli mekanizma ve yollar vardır. Örneğin gossypol mitokondride Bcl-2/Bcl-XL aracılı antiapoptotik fonksiyonu inhibe ettiği, kolorektal kanserlerde ROS-bağımlı mitokondrial apoptosize aracılık ederek antitümör etkiye neden olduğu belirlenmiştir. Gossypol'un insan prostat kanser hücreleri PC-3 üzerinde kaspaz bağımlı ve kaspaz bağımsız hücre ölümünü düzenleyerek apoptosize neden olduğu rapor edilmiştir (Deng et al., 2013).

Araştırmacılar gossypol'un antikanser özelliğinin birçok kanser hücre tipinde MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) veya flow sitometri hücre canlılık deneylerini kullanarak değerlendirilmiştir. Düşük dozlarda (-) gossypol'un hücreler üzerine etkisi (+) gossypol ile kıyaslandığında daha etkili olduğu görülmüştür (Oliver et al., 2004, Kitada et al., 2003, Liu et al., 2002, Keshmiri-Neggab and Goliaei, 2013). Gossypol'un aynı zamanda HeLa hücrelerinde DNA replikasyonu ve tamirinden sorumlu DNA polimeraz α (Keniry et al., 1989) ve topoizomerez II gibi anahtar nükleer enzimleri inhibe ettiği ve DNA sentezini bloke ettiği gösterilmiştir (Rosenberg et al., 1986, Keshmiri-Neggab and Goliaei, 2013).

Gossypol'un apoptotik etkisi antiapoptotik Bcl-2 (B-cell lymphoma2) ailesinin ve mitokondrial kaspaz yollarının etkileşimlerinin inhibisyonu ile ilgilidir (Qian et al., 2014). Gossypol BH3 (Bcl-2 homology 3)'ü taklit eden bir ajandır ve antiapoptotik Bcl-x1 (B-cell lymphoma-extra large) ve Bcl-2 (B-cell

lymphoma2) proteinlerinin BH3 domainine bağlanırlar ve bunların etkilerini antagonize ederler.(Qian et al., 2014).

Kusurlu apoptozis birçok solid ve hematolojik malignansi türünde yaygındır ve anti-apoptotik Bcl-2 protein ailesinin özellikle de Bcl- ve Bcl-XL'nin overekspresyonundan kaynaklanmaktadır. Bu proteinlerin overekspresyonu apoptozisin mitokondrial aracılı yolağının baskılanmasına neden olur ve kemo ve radyo dirence neden olur. Bu yüzden Bcl-2 ve Bcl-XL'in anti-apoptotik aktivitesi kanser hücrelerinde kemoterapi ve radyoterapi direncini yenmek için yeni antikanser ajanlar dizayn etmek için dikkat çekici bir hedeftir (Oliver et al., 2005).

1.12. Suramin

Suramin 1429 dalton molekül ağırlığında polisülfonatlanmış bir naftilüre bileşiğidir (Gagliardi et al., 1992; Meyers al., 2000; Öktem, 2007; Ganapaty et al., 2009; Friis et al., 2013). İlk kez 1917'de bulunmuş ve tripanosomiazise karşı antiparazitik bir ajan olarak kullanılmıştır (Gagliardi et al., 1992; Ergüven, 2004; Öktem, 2007; Friis et al., 2013). Son zamanlarda suramin'in insan malignansilerde kullanışlı bir antitümorejenik ajan olduğunu gösteren umut verici sonuçlar yayınlanmıştır (Zaniboni, 1990; Gagliardi et al., 1992). Suramin'in *in vitro* çalışmalarda endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonunu ayrıca birçok *in vivo* çalışmalarda büyüme faktörü ve tümör anjiyogenezini inhibe ettiği bildirilmiştir (HoSang, 1985; Waltenberger et al,1996; Friis et al., 2013).

Bu bileşik PDGF,-1 EGF, TGF β , IGF-1, bFGF ve vaskulotropin/vaskular endotel büyüme faktörü gibi çeşitli büyüme faktörlerinin spesifik hücre yüzey bağlanmasını bloke ederler (Cofey et al., 1987; Bikfalvi et al., 1991; Gagliardi et al., 1992; Bocci et al., 1999; Turgut, 2007; Güler, 2011).Suramin'in anjiyogenezi direk olarak VEGF'ye bağlanarak, indirek olarak ise bFGF ve PDGF'ye bağlanarak etkilediği gösterilmiştir (HoSang 1985; Waltenberger et al., 1996; Friis et al., 2013). Suramin angiogenezi ve bazı tümör hücrelerinin invazyonunu engellemekte ve tümör hücrelerinin adezyonunu bozmaktadır. Reverse transkriptazı engellediği fark edilince AIDS tedavisinde kullanımı düşünülmüş, fakat bu alanda başarılı olunamamıştır (Stein, 1993; Öktem, 2007). Suramin onkoloji hastalarının tedavisinde, özellikle metastatik böbrek tümörleri, adenokarsinomalar, lenfomalar, prostat kanseri ve yüksek dereceli gliomalarda kullanılmaktadır (La Rocca et al.,1991; Grossman, 2001; Öktem 2007).

Suramin'in polianyonik büyük bir bileşik oluşu proteinlere daha fazla bağlanmasına olanak vermektedir. Suramin'in bu özelliği ile ilgili biyolojik etkileri aşağıdaki gibidir:

- PDGF, EGF, bFGF, IGF-1, TGF- β , VEGF gibi polipeptit büyüme faktörlerine bağlanarak onların reseptörleri ile etkileşimini engeller ve

böylece hücre dışı mitojenik sinyalin hücre içine iletilmesini engeller (LaRocca et al., 1990; Liekens et al., 2001; Ergüven, 2004).

- Hücre migrasyonu ve adezyonunu inhibe eder (LaRocca et al., 1990; Liekens et al., 2001; Ergüven, 2004).
- Adrenal steroidojenezi inhibe eder (LaRocca ve ark., 1990, Liekens et al., 2001, Ergüven, 2004).
- Anjiyogenezini inhibe eder (LaRocca et al., 1990, Liekens et al., 2001, Ergüven, 2004).
- DNA ve RNA polimerazları (Spigelman, 1987; Jindal et al., 1990; Ergüven, 2004), PKC- α , Akt/PKB (Gschwendt, 1998; Ergüven, 2004), G-proteinine bağlı GTPaz aktivitesini (Hohenegger et al., 1998; Ergüven, 2004), adenilat siklaz (Sabala, et al., 2001; Ergüven, 2004), topoizomeraz-2 aktivitelerini (Bojanowski et al., 1992; Ergüven M, 2004) inhibe eder.
- Süksinat dehidrojenazı, ATPaz kompleksini ve/veya adenin nükleotit translokazı inhibe ederek mitokondri fonksiyonunu durdurur (Rago et al., 1991; Ergüven, 2004).
- İnterkökin-2, TNF- α , interferon- γ gibi sitokinleri inhibe eder (Mills et al., 1990; Czernin et al., 1993; Ergüven, 2004).
- Plazmada V, VIII, IX ve XII faktörlerini inhibe eder (Horne et al., 1992, Ergüven, 2004).

1.13. Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışması, gossypol maddesinin anti-anjiyogenik etkisini araştırmak ve kanser tedavisinde bir seçenek olan anti-anjiyogenik tedavide kullanılabilir bir ajan olup olmadığını ortaya koymak amacıyla gerçekleştirildi. Bu amaç doğrultusunda gossypol'un *in vitro* ve *in vivo* metotlar kullanılarak anti-anjiyogenik etkisi ortaya konmaya çalışıldı.

In vitro deneylerde gossypol'un hücre canlılığına ve anjiyogenez sürecinin temel adımlarından olan hücre göçü ve tp oluşumuna olan etkisi araştırıldı.

In vivo deneylerde ise, HET-CAM deneyinde gossypol'un CAM zerindeki kılcal damarlara etki edip etmeyeceği, dolayısıyla anti-anjiyogenik potansiyeli araştırıldı. Ehrlich tümör modeli deneylerinde ise gossypol ile muamele edilmiş deney hayvanlarında tümör gelişimini saptayabilmek amacıyla histolojik çalışmalar yapıldı, ayrıca apoptoz ve VEGF ekspresyonunun nasıl etkileneceği araştırıldı.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

M199 medium (Gibco), Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma), Penicilin-Streptomycin (Gibco), 1x Trypsin-EDTA solüsyonu (Sigma), Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Merck), MTT (Methylthiazoletetrazolium=Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) (Sigma), Tripa Blue (Sigma), Endothelial Cell Basement Medium-2 (Clonetics), Matrigel Basement Membrane Matrix (Bioscience), Fibronectin Solution (Bovine) (Biological Industry), Suramin (Sigma), Gossypol (Sigma).

2.1.2. HUVEC Hücre Hattı

HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) hücreleri (ATCC-CRL-1730; HUV-EC-C) Doç. Dr. A. Tansu Koparal (Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) tarafından sağlanmıştır.

2.1.3. Deney Hayvanları

Anti-anjiyogenik etkinin değerlendirilmesi için yapılan HET-CAM testinde kullanılan Ross-308 cinsi embriyolu yumurtalar Abalıoğlu Kuluçka Tesisleri'nden (İzmir) elde edilmiştir.

Tümör etkinlik çalışmalarında, KOBAY Deney Hayvanları AŞ.'den temin edilen, seksüel olgunluğa erişmiş 6-8 haftalık, ağırlıkları 15-20 g arasında değişen dişi (n=36) Balb-c albino deney fareleri kullanılmıştır. Ehrlich ascites hücreleri (EAC) İstanbul Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi'nden temin edilmiştir.

2.2. Metot

2.2.1. HUVEC Hücre Hattında Sitotoksikite Düzeylerinin Belirlenmesi

2.2.1.1. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması

Gossypol, DMSO içinde çözülerek önce 1000 µg/ml'lik ana stok hazırlanmıştır. Daha sonra bu ana stoktan dilüsyon yolu ile deney dozları olan 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM'lik dozlar hazırlanmıştır. DMSO oranı total inkübasyon hacminin %0.1'ini geçmemiştir. Gossypol'un hazırlanan dozları (+4°C)'de saklanmıştır.

Suramin, DMSO içinde çözülerek önce 1000 µg/ml'lik ana stok hazırlanmıştır. Daha sonra bu ana stoktan dilüsyon yolu ile deney dozları olan 0,1 µM, 1 µM, 4 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 300 µM,

400 μM 'lık dozlar hazırlanmıştır. DMSO oranı total inkübasyon hacminin %0.1'ini geçmemiştir. Suramin'in hazırlanan dozları (+4°C)'de saklanmıştır.

Gossypol için hazırlanan konsantrasyonlar MTT testleri ile belirlenmiş olup, suramin için ise literatür taraması neticesinde belirlenen ve gossypol için MTT testleri ile yapılan doz belirleme çalışmalarından elde edilen konsantrasyonlar hazırlanmıştır.

2.2.1.2. HUVEC Hücre Kültürü

HUVEC hücreleri 37 °C de, nemli bir ortamda (%5 CO₂, %95 hava), %10 FBS, 30 $\mu\text{g/ml}$ ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement) ve %1 penisilin/streptomisin eklendi, M199 medyum içinde 25 cm²'lik flasklarda kültüre edildi.

Flasklarda bulunan HUVEC hücreleri görünümüleri kaldırım taşlarını andırır biçimde flaskları %70 oranında doldurduklarında Phosphate Buffer Saline-Ethylenediaminetetraaceticacid (PBS-EDTA) ile yıkanmışlardır. Daha sonra Tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak flask yüzeyinden ve birbirlerinden ayrılmaları sağlandı. Üzerlerine 800 μl Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) ilave edilmiştir. 2 ml hacimli ependorf tüplere her bir örneğimiz için 0.5 ml %0.4'lük Tripan mavisi solusyonundan eklenmiş ve üzerine iyice pipetlenerek homojen hale getirilen hücre süspansiyonundan 0.5 ml ilave edilerek karıştırıldı. 10 dakika beklendikten sonra Trypan mavisi ile boyanmış HUVEC hücreleri Neubauer lamı ile sayıldı. Sayımlar 3 kez tekrarlandı.

Test maddeleri uygun çözücüler içinde çözülmüş ve negatif kontrol, pozitif kontrol ile uygun dozları içeren deney setleri hücre çoğalımı, hücre migrasyonu ve tüp oluşumu deneylerinde kullanıldı.

2.2.1.3. Hücre canlılık testi (MTT Testi)

Aynı pasaj numarasına sahip HUVEC hücreleri flaskların %70'ini kapladığında flasklardaki besiyeri uzaklaştırıldı ve Tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak hücrelerin tabanından ve birbirlerinden ayrılması sağlandı. Daha sonra hücreler Neubauer lamı ile sayıldı. Hücre canlılığı deneyleri için 96 kuyucuklu plakalar kullanıldı. Hücreler her kuyucuğa 5×10^3 hücre gelecek şekilde 4 adet 96 kuyucuklu plakalara ekildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından besiyerleri uzaklaştırıldı. Negatif kontrol, pozitif kontrol ve test maddelerinin belirlenen dozları hücrelere eklendi. Deneyler 4 gün boyunca sürdürülmüştür. Hücreler gerekli sürelerde inkübasyona bırakıldı. Besiyerleri gerekli inkübasyon sürelerinin sonunda hücrelerden uzaklaştırıldı ve MTT ilavesi yapılarak test maddelerinin hücre çoğalmasına olan etkileri saptandı. Hücreler 5mg/ml MTT stok solusyonu ile 2 saat CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda MTT içeren

besiyerleri kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözünmesi için her kuyucuğa 100 µl DMSO ilave edilmiştir. 5 dakika beklendikten sonra plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri mikropate reader cihazında 540 nm. dalga boyunda okutuldu (Bézivin et al., 2003; Holst and Oredsson, 2005).

Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol grubunda hücre canlılık oranı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edildi. Bu testler 3 kez gerçekleştirildi (Mossman, 1993).

MTT deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesinde SPSS programı kullanıldı ve elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post- hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlendi. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edildi.

2.2.2. HUVEC Hücre Hatlarında Anti-anjiyogenik Potansiyelinin Belirlenmesi

2.2.2.1. Hücre Göçü (Yara İyileşmesi) Deneyi

25 cm²'lik flasklarda büyütülen HUVEC hücreleri Tripsin-EDTA ile flask tabanından kaldırıldıktan sonra her bir kuyucuğa 3×10^5 hücre gelecek şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekildi ve %95 hava ve %5 CO₂'li gaz ortamında 37°C'deki CO₂ inkübatöründe 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 6'lı plaka kuyucukları alt taraflarından kuyucuk boyunca kuyucuklardaki hücre tabakası çizilmiş ve çizgi boyunca belli aralıklarla işaretler konuldu. Daha sonra besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Negatif kontrol, pozitif kontrol ve test maddelerinin belirlenen dozları hücrelere verildi. 48 saatlik inkübasyonun ardından yara oluşturulan hücre tabakasında oluşturulan yaranın onarılıp onarılmadığı inverted mikroskopla tespit edildi ve deney sonucu Olympus CKX41 mikroskop ile görüntülendi.

2.2.2.2. Tüp oluşumu deneyi

96 kuyucuklu plakalar 50 µl/kuyucuk olacak şekilde matrijel ile kaplandı. Plakalar 37°C'de 20 dakika bekletilmiştir. Daha sonra hücreler yaklaşık 4 saat serum açlığına maruz bırakıldı. Hücreler 4×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde test maddelerinin belirlenen konsantrasyonlarını içeren medyum içinde matrijellerin üzerine ekildi ve yaklaşık 12 saat kültüre edildi. Tüp ağı oluşumları Olympus CKX41 inverted mikroskop altında rastgele seçilmiş 5 farklı alandan fotoğraflandı.

2.2.3. Hen's Egg Chorio-Allantoic-Membran (HET-CAM) Testi

Gossypol'un anti-anjiyogenik etkisini değerlendirmek için ilk olarak Abaloğlu Kuluçka Tesislerinden (İzmir) temin edilen döllenmiş yumurtalar 6 gün boyunca 37°C'de %70 nem oranında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından embriyolu yumurtalarda embriyonun varlığını tespit etmek için ışık ile kontrol yapılmış ve yumurta kabukları %70'lik alkol ile temizlenerek koryoallantoik membranı görünür hale getirmek için kabukta 1-2 cm çapında bir pencere açıldı. Kabuktaki pencereler embriyoların kurummasını engellemek amacıyla kabuktaki bu açıklık laboratuvar filmi ile kapatıldı. Embriyolu yumurtalar negatif kontrol, pozitif kontrol (Suramin) ve Gossypol olmak üzere 10'lu gruplara ayrılarak test maddeleri (15 mM, 30 mM, 60 mM, 120 mM'lık dozlar) uygulandı. Daha sonra yumurtalar tekrar 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. Maddelerin antianjiyogenik etkisini belirlemek için koriyoallantoik membranlar değerlendirildi. CAM'lar üzerindeki antianjiyogenik maddelerin etkileri World Precision Instruments, Inc. (Model : 502001) stereo mikroskop ile görüntülendi.

Maddelerin anjiyogenik skorları belirlenerek anjiyogenik skorlar belirlendi. Skorlama için Bürgermeister ve ark.'nın (2002) skorlama sistemi kullanıldı (Bürgermeister et al., 2002). Maddelerin anjiyogenik skorları hemoraji, vasküler lizis ve koagülasyon bakımından çizelge 2.1.'e göre belirlendi.

Çizelge 2.1. Koryoallantoik membran üzerinde anti anjiyogenik etkinin değerlendirilmesi için kullanılan skor değerleri (Ödemiş ve ark., 2012).

Skor	Etki	İzlenim/Açıklama
0	Yok	Normal embriyo oluşumu gözlenmektedir. Çevre kapillerlere göre değişiklik yoktur. Hemoraji, lizis veya koagülasyon durumu tespit edilmemiştir.
0,5	Zayıf	Kapiller damarsız alan yoktur. Kapillerlerin yoğunluğu azalmıştır
1	Orta	Kapillersiz alan az veya kapiller yoğunluk belirli bir alanda azalmıştır. Etkiler madde alanının 2 katından fazla değil.
2	Kuvvetli	Kapillersiz alan mevcuttur. Normal embriyo oluşumu gözlenmemektedir.

Antianjiyogenik ortalama skorun belirlenmesi için kullanılan denklem şu şekildedir:

Ortalama skor = [Yumurta sayısı (Skor 2) X 2 + Yumurta sayısı (Skor 1) X 1] / [Toplam Yumurta Sayısı (Skor 0, 1, 2)]. Bu ortalama skor sistemine göre skor<0.5 antianjiyogenik etki yok, skor:0.5-1 zayıf düzeyde antianjiyogenik etki, skor 1: güçlü antianjiyogenik etki olarak değerlendirilmektedir. (Ödemiş ve ark., 2012).

Her deney grubu için sadece steril distile su ile doyurulmuş sterilize filtre kağıdı uygulandığı negatif kontrol yumurtaları da değerlendirmeye alındı. Uygulama sonrası koryoallantoik membranında iritasyon oluşan yumurtalar değerlendirmeye alınmadı. Gossypol'un anti-anjiyogenik etkisini kıyaslamak için pozitif kontrol aracı olarak antianjiyogenetik özelliği olduğu bilinen Suramin kullanıldı.

Veriler, n (%) ve ortanca-%25-75 interkuartil aralık olarak ifade edilmiştir. Kolmogorov Smirnov testi ile normal dağılıma uymadıkları tespit edilen verilerin analizi için Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testleri kullanılmıştır. Yanılma düzeyi 0,05 olarak alındı (Ödemiş ve ark., 2012). CAM deneylerinde anti-anjiyogenik etki fotoğraflanması Eoromex DC.5000 DC5 Optical Microscope Imager ile yapıldı.

2.2.4. *In vivo* Antikanser Etkinin Değerlendirilmesi (Ehrlich Ascites Tümör Modeli)

Ehrlich Asit karsinoma (EAC) farelerde spontan olarak ortaya çıkmış adenokarsinomdur. Seri intraperitoneal pasajlarla fareler arasında taşınabilir (Jaganathan et al., 2010). Tümör hücreleri içeren asit sıvısı intraperitoneal ve subkutan olarak hayvanlara enjekte edildiğinde Ehrlich Asit tümörü sıvı veya solid formda gelişmektedir (Gümüştan ve Musa, 2008). *In vivo* anti-kanser etki değerlendirmesi, Ege Üniversitesi, Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu' nun onayı (24.02.2012 tarih ve 2012-032 no'lu onay) ile Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma-Uygulama Merkezi (ARGEFAR) Faz Öncesi Araştırmalar Birimi Deney Hayvanı Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Çalışmada, KOBAY Deney Hayvanları AŞ' den temin edilen, seksüel olgunluğa erişmiş 6-8 haftalık, ağırlıkları 22-25 g arasında değişen dişi (n= 35) BALB-c albino deney fareleri kullanıldı. Hayvanlar çalışmaya başlamadan 7 gün önce deney ortamına alınarak deneye hazırlandı. Fareler kontrol ve deney grupları için tesadüfi olarak seçilmiş ve 7'şerli gruplar şeklinde kafeslere yerleştirildi. Çalışma süresince hayvanlar, Tecniplast firmasından satın alınan, her biri bireysel havalandırmaya sahip ve mikrobiyolojik kontaminasyonu önlemek adına 0,2 mikron por çapında filtreli kafeslerde tutuldu (Şekil 2.1). Laboratuvar sıcaklığı 20-24 °C ve nispi nem % 45-65 olarak düzenlenmiş ve günde 3 defa kontrol edilmiştir. 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık periyodu uygulandı. Deney hayvanlarının beslenmeleri için yeteri kadar standart laboratuvar yemi (pellet) ve su kullanıldı. Yem ve su günlük olarak değiştirildi.



Şekil 2.1. Deney hayvanlarının bakımlarının yapıldığı kafesler

Denemenin başında hayvanlar tartılmış ve her grupta 7 fare olacak şekilde 5 deney grubu oluşturuldu.

- 1. Grup:**Negatif Kontrol grubu (n=7):7 gün boyunca 0,5 mL %0,9 NaCl çözeltisi (kg/bw) uygulandı.
- 2. Grup:**Tümör Kontrol grubu (n=7): Farelere yalnızca EAC hücreleri sc. enjekte edildi.
- 3. Grup:**Pozitif Kontrol grubu (n=7): EAC hücreleri sc. enjekte edildikten 3 gün sonra başlayacak şekilde 7 gün boyunca anti-kanser etkisi belirlenmiş olan 10 mg/kg dozda Suramin (Suramine sodium salt, Sigma-Aldrich, Cas:129-46-4) ip. olarak uygulandı.
- 4. Grup:**Pre-implantasyon grubu (n=7): EAC hücreleri sc. enjekte edilmeden önceki 7 gün boyunca 40 mg/kg dozda Gossypol olarak uygulandı.
- 5. Grup:**Post-implantasyon grubu (n=7): EAC hücreleri sc. enjekte edildikten 3 gün sonra başlayacak şekilde 7 gün boyunca 40 mg/kg dozda Gossypol uygulandı (Şekil 2.3., Şekil 2.4.).

EAC hücreleri Neubauer lamında sayılmış, $2,5 \times 10^6$ /mL olacak şekilde serum fizyolojik ile seyreltildi ve hücreler solid tümör oluşturmak üzere hayvanlara subkutan (sc) olarak 0,3 mL enjekte edildi (Gothoskar and Ranadive, 1971; Ulukaya vd., 2011). Enjeksiyon sonrasında hayvanlarda tümör gelişimi bakımında gözlem altına alındı. Çalışmanın hem başında hem de sonunda farelerden alınan kan örneklerinde hematolojik ve biyokimyasal analizler gerçekleştirildi.

Deneme gruplarındaki hayvanlarda tümör gelişimi palpasyon metodu ile değerlendirildi (Taşkın vd., 2009). Denemenin 14. gününde hayvanlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edildiler. Hayvanlardan çıkartılan tümörlerin ölçümleri kumpas (vernier caliper) kullanılarak ölçüldü ve tümör hacmi çizelge 2.2’de verilen formüle göre hesaplandı (Abdin et al., 2014). Ölçümler tamamlandıktan sonra çıkarılan tümör örnekleri %4’lük paraformaldehit çözeltisine alındı histopatolojik incelemeler yapıldı, imminohistokimyasal incelemeler kapsamında ise TUNEL boyama ve VEGF markerı ile çalışıldı.

Çizelge 2.2. Tümör Hacminin Hesaplanması

V (mm³) : a x b/2	
V	Tümör Hacmi
A	Tümör Uzunluk (küçük çap)
B	Tümör Genişliği (büyük çap)



Şekil 2.2. Gossypol tedavisi uygulanan hayvanların bakımının yapıldığı kafesler.



Şekil 2.3. Suramin tedavisi uygulanan hayvanların bakımının yapıldığı kafesler.

2.2.4. 1. Hematolojik Analizler

Çalışmanın hem başında hem de sonunda farelerden alınan kan örnekleri potasyum EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) içeren tüpler içinde Vetscan HM 5 cihazına verilmiş ve 100 µL tam kandan 15 hematoloji parametresinin (Lökosit-WBC, Lenfosit-LYM, Monosit-MON, Nötrofil-NEU, Eritrosit-RBC, Hemoglobulin-HGB, Hemotokrit-HCT, Eritrositlerin ortalama büyüklüğü-MCV, Hemoglobulin miktarı-MCH, Hemoglobulin konsantrasyonun yüzde ifadesi-MCHC, Eritrositlerin dağılım genişliği-RDWc, Trombosit-PLT, Trombositlerin kana oranı-PCT, Trombosit ortalama büyüklüğü-MPV, Trombositlerin dağılım genişliği-PDWc) kalitatif değerlendirmesi gerçekleştirildi.

Kan örnekleri cihaza verilip “start” tuşuna basıldıktan sonra 4 dakika içinde analiz sonlandı; tüm sonuçlar ve histogramlar otomatik olarak cihaz belleğine kaydedilmiş ve çıktıları alındı.

2.2.4. 2. Biyokimyasal Analizler

Farelerden alınan heparinize tam kan örneklerinin biyokimyasal parametreleri ve karaciğer profilleri tek kullanımlık reagent rotolar ile Vetscan VS 2 cihazı kullanılarak incelendi. Vetscan, biyokimyasal analiz cihazı, kan biyokimyasallarının, elektrolitlerinin ve T4 ölçümünün lityum heparinli tam kan, plazma veya serumdan kalitatif değerlendirmesini yapan taşınabilir *in vitro* analiz cihazıdır. Cihaz, kimyasal cihazı heparinize tam kan örneği işlemek ve dilüsyon edilmiş plazmayı reagent rotorlarına iletmek için merkezi ve kapiler güç kullanmaktadır. Ayrıca kimyasal reaksiyonları optik olarak ölçmekte bu ölçümlerden ve rotor üzerindeki barkod halkasındaki kalibrasyon faktörlerinden analiz konsantrasyonlarını hesaplamaktadır. Tam kan, rotor içinde plazma ve hücrelerine ayrılır, plazma ve dilüent karıştırılır ve ölçüm haznelere dağıtılır. Böylece seyreltilmiş edilmiş plazma reagent boncukları ile reaksiyona girmiş olur. Cihaz kendini kalibre eden bir sisteme sahip olmakla birlikte reagent rotorlarındaki barkodlar kalibrasyon için gerekli veriye sahiptir ve her rotor çalıştırıldığında cihaz kendini kalibre etmektedir.

Farelerden alınan kanlar hem çalışmanın başında hemde çalışma sona erdiğinde analiz edildi. “Comprehensive Diagnostic Kit” ve “Mammalian Liver Profile Kit” ile 16 parametre (Albümin-ALB, Alkalen fosfataz-ALP, Alanin aminotransferaz-ALT, Amilaz-AMY, Total bilirbin-TBIL, Kan üre azotu-BUN, Kalsiyum-Ca, Fosfat-Phos, Kreatinin-CRE, Glukoz-GLU, Sodyum-Na, Potasyum-K, Total protein-TP, Globulin-GLOB, Bazofil-Ba, Kolestrol-CHOL) incelenmiş olup sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Deneme gruplarındaki hayvanlarda tümör gelişimi palpasyon metodu ile değerlendirilmiştir (Taşkın vd., 2009). Denemenin 14. gününde hayvanlar servikal

dislokasyon ile sakrifiye edildiler. Hayvanlardan çıkartılan tümörlerin ölçümleri kumpas (vernier caliper) kullanılarak ölçüldü ve hacmi çizelge 2.2’da verilen formüle göre hesaplandı (Abdin et al., 2014). Ölçümler tamamlandıktan sonra çıkarılan tümör örnekleri %4’lük paraformaldehit çözeltisine alınmış histopatolojik incelemeler yapılmış, imminohistokimyasal incelemeler kapsamında ise TUNEL boyama ve VEGF markerları ile çalışıldı.

2.2.4.3. Histokimyasal Boyamalar (Hematoksilen & Eosin (H&E.)

Boyama)

- Ksilol I 10 dakika
- Ksilol II 10 dakika
- Ksilol III 10 dakika
- Kuruduktan sonra alkole geçirildi.
- % 100 Alkol ve 2. % 100 Alkolde 2’şer dakika
- % 95 Alkol ve %80 alkolde 2’şer dakika
- Distile suda 5 dakika yıkandı.
- Hematoksilende 2,5 dakika tutuldu.
- Akarsu 5 dakika
- Asit alkol (Doku pembe renk alana kadar batırıp çıkarılır.)
- Akarsuda yıkandı.
- Amonyaklı su (Doku mor renk alana kadar batırıp çıkarıldı)
- Akarsu
- Distile su 5 dakika yıkandı.
- Eozin 2,5 dakika
- % 95 Alkol , %100 Alkol ve 2. %100 Alkolde 2’şer dakika bekletildi.
- Dışarıda kurutuldu.
- Ksilol ile muamele edildi.
- Boyalı preparatlar entellan damlatılarak kapatıldı.

2.2.4. 4. İmmunohistokimyasal Boyama

- Kesitler, bir gece 60°C etüvde ve soğuduktan sonra 2x30 dakika ksilolde tutuldu.
- Sırasıyla %95, %80, %70 ve %60’ lık etil alkolde 2’şer dk bekletildi.
- Kesitler distile su ile 10 dk yıkanır ve çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizildi.
- PBS (Phosphate Buffered Saline) solüsyonu ile 3x5 dk yıkandı.
- Kullanılacak antikor için önerilen antijen “retrival” yöntemi uygulandı.
- PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkandı. Endojen peroksit blokajı yapıldı.(% 3 H₂O₂) (5 dakika).
- PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkandıktan sonra kesitler üzerine Blok solüsyonu (non-immun serum) damlatılarak 1 saat beklendi.

- Blok solüsyonu yıkamadan uzaklaştırıldı ve uygun şekilde dilüsyonu yapılmış 50 µl primer antikor damlatıldı, kapalı nemli kutuda bir gece 4°C’de bekletildi (Primer antikor: TUNEL, VEGF).
- PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkandı.
- Primer antikor ile uyumlu biyotinlenmiş sekonder antikor monoklonal antikor damlatılır, kapalı nemli kutuda 30 dakika oda ısısında bekletildi.
- PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkandı. Hazırlanan streptavidinle işaretli sekonder antikor damlatılır, kapalı nemli kutuda 30 dk oda ısısında bekletildi.
- PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkandı. DAB (3,3-diaminobenzidine) solüsyonu damlatılır, 10 dk kapalı nemli kutuda bekletildive tekrar PBS solüsyonu ile 3x5 dk ve distile su ile yıkandı.
- Mayers’in hematoksileni ile Nükleus boyanması kontrol edilerek 5 dk boyama yapıldı.
- Distile su ile yıkandı.
- Sırasıyla %80, %95 ve %100’lük etil alkolde 1’er dk bekletildi.
- Kesitler kurduktan sonra 2 kez 5’er dk ksilolde şeffaflaştırıldı.
- Kapama medyumuyla lamel ile kesitler kapatıldı.

Çalışmadaki istatistiksel değerlendirmeler SPSS for Windows 10.0 istatistiksel analiz programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SS) olarak ifade edildi. Deney sonunda bütün gruplardaki farelere ait total vücut ağırlıkları, tümör ağırlık, uzunluk ve hacimleri, hematolojik ve biyokimyasal parametreler hesaplanarak, sonuçlar varyans analizi (One-Way ANOVA) ile kontrole göre karşılaştırdı. Ayrıca hematolojik ve biyokimyasal paramerterin başlangıç ve bitiş değerleri arasındaki karşılaştırmalardan student-t testi kullanıldı. İstatistiksel açıdan önem kontrolü $p < 0,05$ seviyelerinde, kontrol grubu ile uygulama grupları arasında yapıldı.

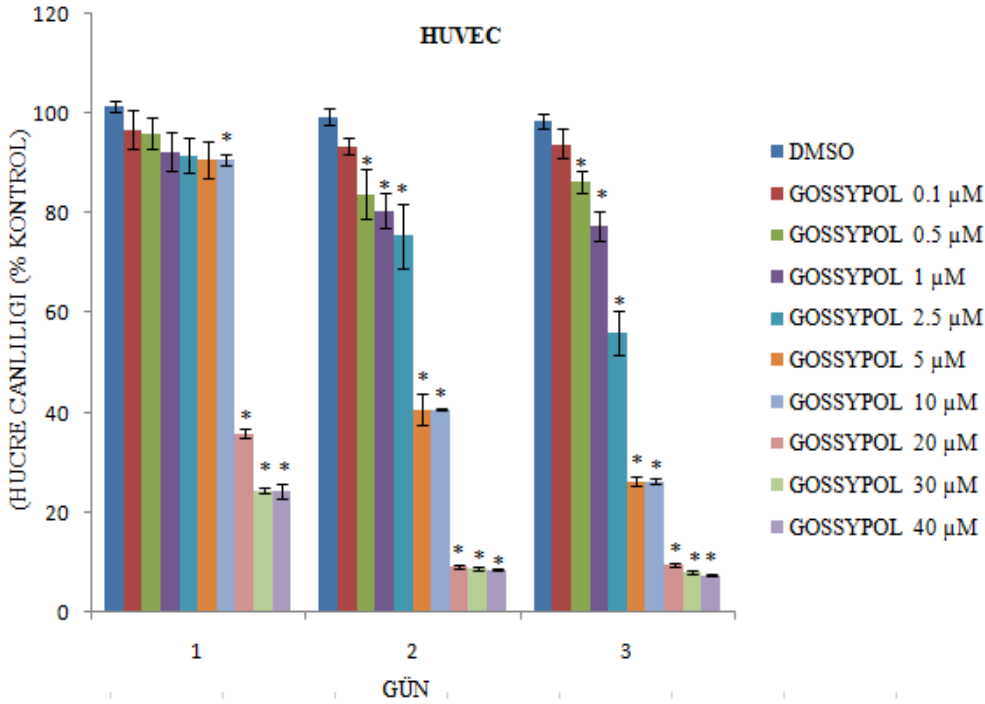
3. BULGULAR

3.1. Test Maddelerinin HUVEC Hücreleri Canlılığı Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

3.1.1. Gossypol'un HUVEC hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi

Hücre çoğalımı deneylerinde negatif ve pozitif kontrol gruplarındaki hücrelerin flasklarda bulunan hücreler gibi kaldırım taşı görünümünde oldukları, test maddesi uygulanmış gruplarda hücrelerin test maddesi etkisiyle iğsi bir görünüm kazandığı, en büyük dozlar olan 20 μM , 30 μM , 40 μM 'lık dozlarda ise hücrelerin morfolojilerinin tamamen bozulduğu görülmüştür.

MTT deneylerinde Gossypol'un tüm günlerde ve tüm dozlarda hücre sayısında bir azalmaya neden olduğu görülmüştür. Bu sonuç Gossypol'un hücre göçü, tüp formasyonu ve CAM deneyleri sonuçları da uyuşmaktadır. 5 μM 'lık ve daha büyük dozlarda ilk güne göre hücre sayısında daha fazla azalmaya neden olduğu görülmüştür (Şekil 3.1.).

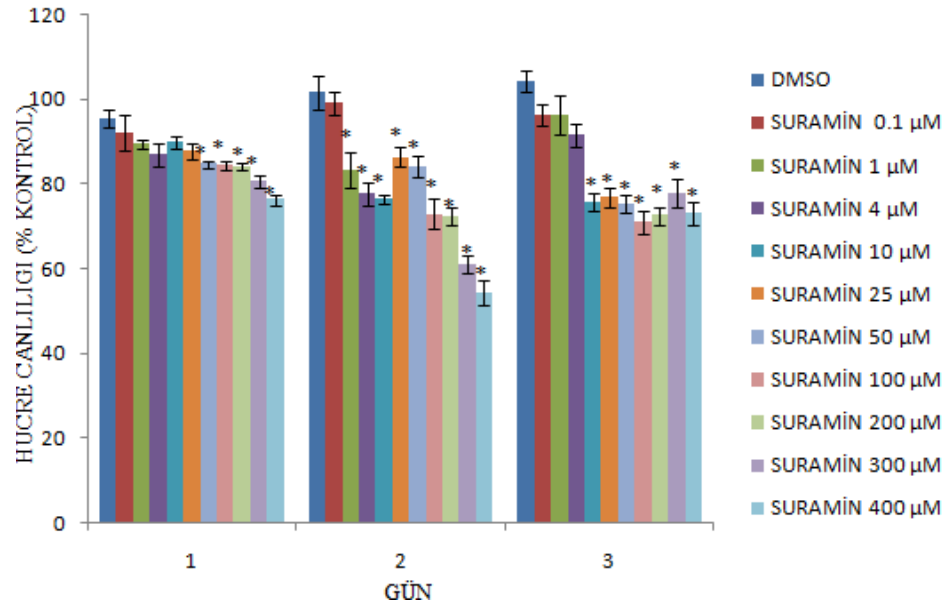


Şekil 3.1. Gossypol'un HUVEC hücrelerinin canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. *Tukey testi ile kontrol grubuna göre anlamlı farklılıklar. Anamlılık değeri $p < 0.05$

3.1.2. Suramin'in HUVEC hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi

Hücre çoğalımı deneylerinde negatif ve pozitif kontrol gruplarındaki hücrelerin flasklarda bulunan hücreler gibi kaldırım taşı görünümünde oldukları, test maddesi uygulanmış gruplarda hücrelerin test maddesinin etkisiyle hücrelerin morfolojilerinin tamamen bozulduğu görülmüştür.

MTT deneylerinde Suramin'in tüm dozlarda hücre sayısında bir azalmaya neden olduğu görülmüştür. Bu sonuç Suramin'in hücre göçü, tüp formasyonu ve CAM deneyleri sonuçları da uyuşmaktadır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Suramin'in HUVEC hücrelerinin canlılığı üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. *Tukey testi ile kontrol grubuna göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri $p < 0.05$.

3.2. Test Maddelerinin Anti-Anjiyojenik Etkinin Belirlenmesi

3.2.1. Gossypol'un *in vitro* Anti-Anjiyojenik Etkisinin Belirlenmesi

3.2.1.1. Gossypol'un HUVEC hücrelerinin göçü üzerine etkisi

Hücre göçü deneyinde kuyucukları tamamen kaplamış ve kaldırım taşı görünümünde olan HUVEC hücrelerinin negatif ve pozitif kontrol gruplarında, 0.5 μM , 2.5 μM , 5 μM , 10 μM 'lık dozlarda oluşturulan kesiği kapatabildiği, 20 μM 'lık dozda hücre ölümünün hızlandığı, 20 μM 'lık dozda ise hücrelerin tamamen öldüğü görülmüştür. Sonuçta Gossypol'un küçük dozlarda hücre göçünde çok etkili olmadığı, yüksek dozlarda hücre göçünü azalttığı görülmüştür (Şekil 3.3).

3.2.1.2. Gossypol'un HUVEC hücrelerinin tüp oluşumu üzerine etkisi

Tüp oluşumu deneyinde besiyerinde test maddesi içermeyen kontrol gruplarındaki HUVEC hücrelerin tüp formu oluşturdukları görülürken, besiyerlerinde test maddesi içeren HUVEC hücrelerinin tüp formu oluşturamadıkları gözlenmiştir. Tüp oluşumunda bozulmalar 20 μM 'lık dozda başlamıştır. 30 μM 'lık dozda ise hücreler tamamen ölmüştür (Şekil 3.4.).

3.2.2. Suramin'in *in vitro* Anti-Anjiyojenik Etkisinin Belirlenmesi

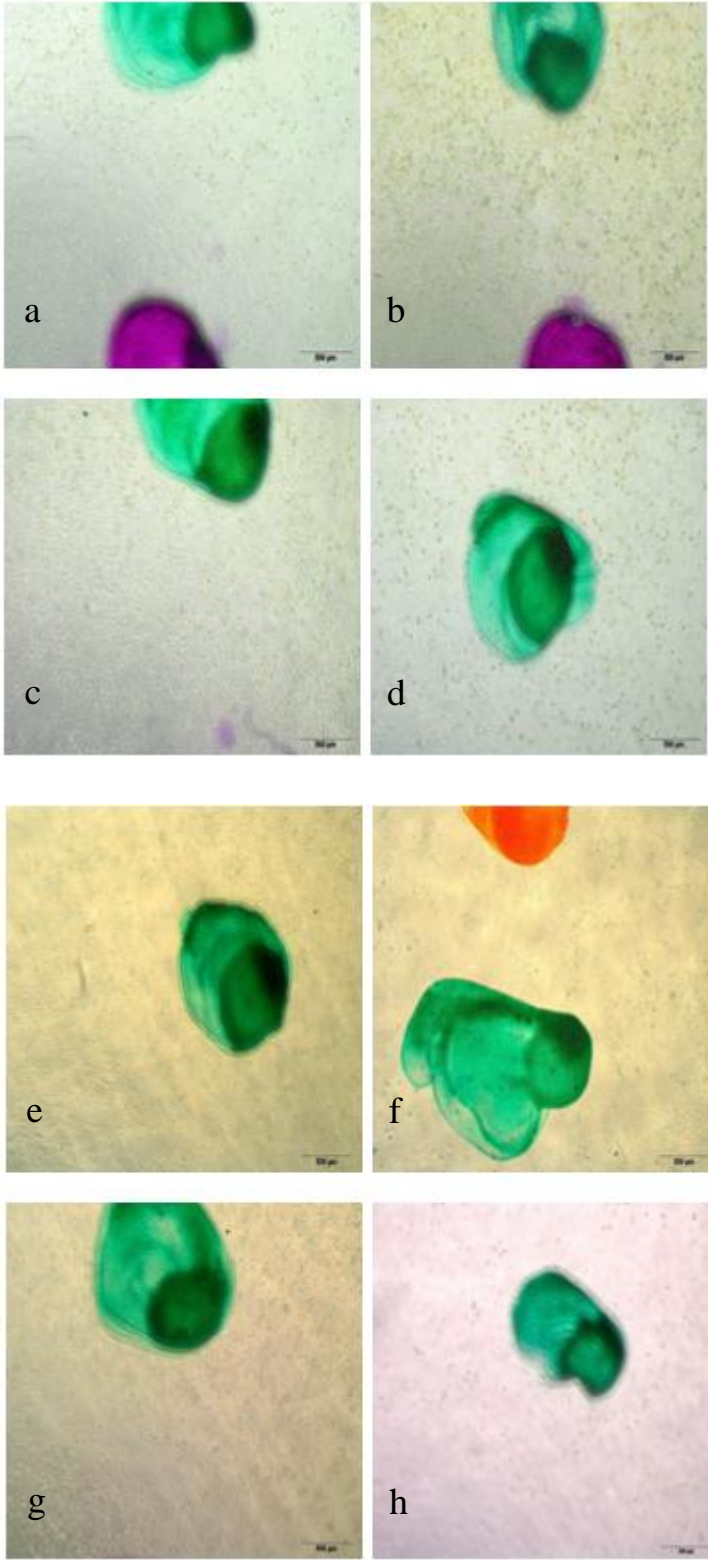
3.2.2.1. Suramin'in HUVEC hücrelerinin göçü üzerine etkisi

Hücre göçü deneyinde kuyucukları tamamen kaplamış ve kaldırım taşı görünümünde olan HUVEC hücrelerinin negatif ve pozitif kontrol gruplarında, 0.5 μM 'lık ve 2.5 μM 'lık oluşturulan yarıyı kapatabildiği, 5 μM 'lık dozda kontrol gruplarına göre yara iyileşmesinin azaldığı, 10 μM 'lık, 20 μM 'lık, 30 μM 'lık dozlarda ise hücrenin öldüğü ve yara iyileşmesinin gerçekleşmediği görülmüştür (Şekil 3.5.).

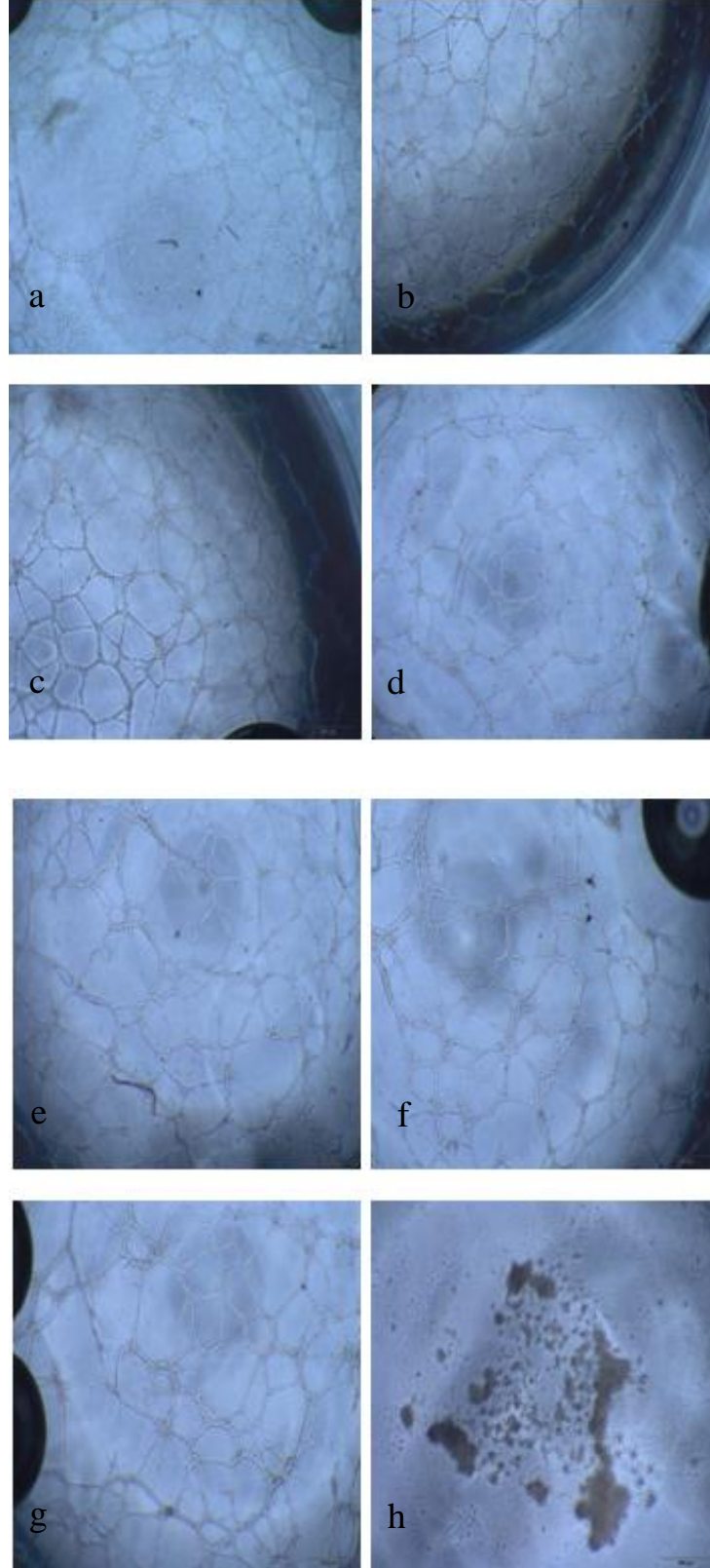
3.2.2.2. Suramin'in HUVEC hücrelerinin tüp oluşumu üzerine etkisi

Tüp oluşumu deneyinde besiyerinde test maddesi içermeyen ve açlığa maruz bırakılmış kontrol gruplarındaki HUVEC hücrelerin tüp formu

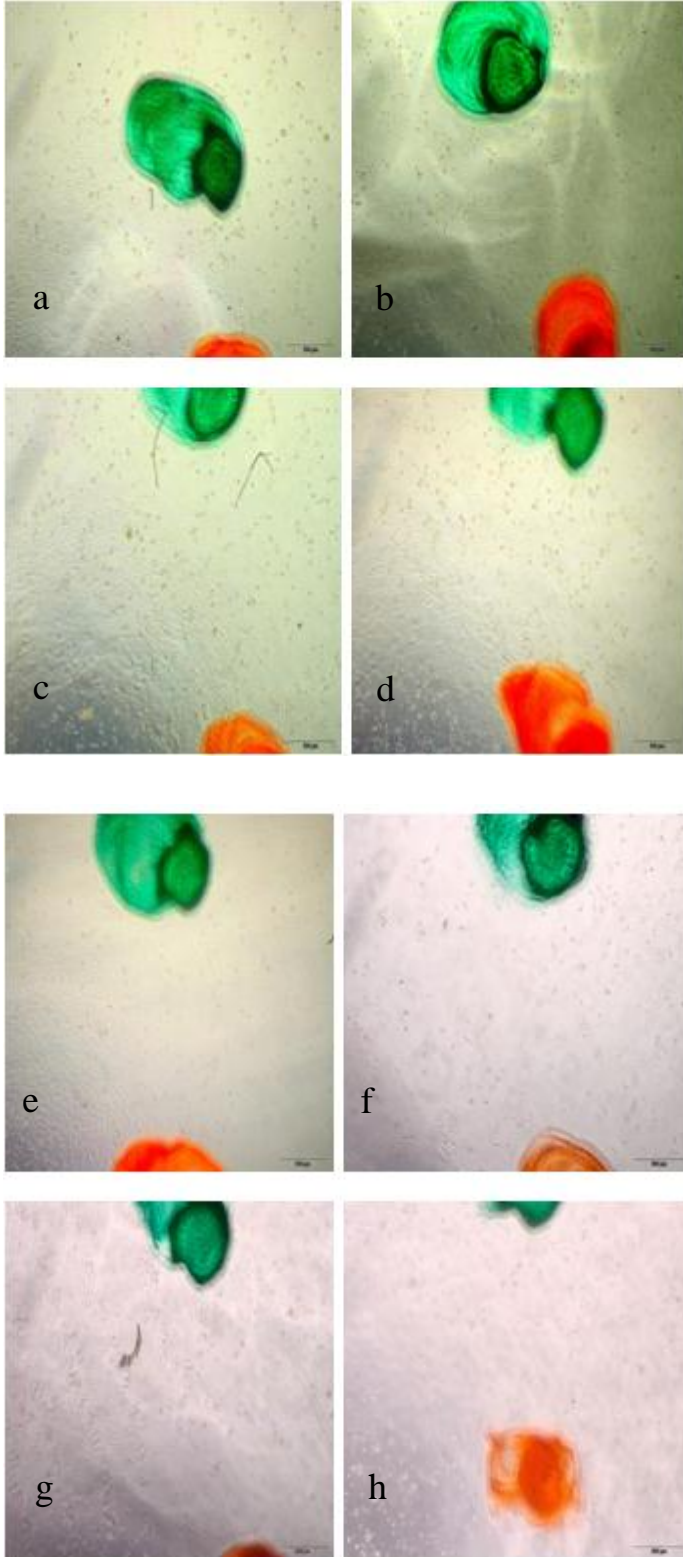
oluşturdukları görülürken, 10 μ M'lık dozda tp formasyonunun bozulmaya başladığı, 10 μ M'lık ve 20 μ M'lık dozlarda hücrelerin tamamen öldüğü ve tp formasyonunun gerçekleşmediği görülmüştür (şekil 3.6.).



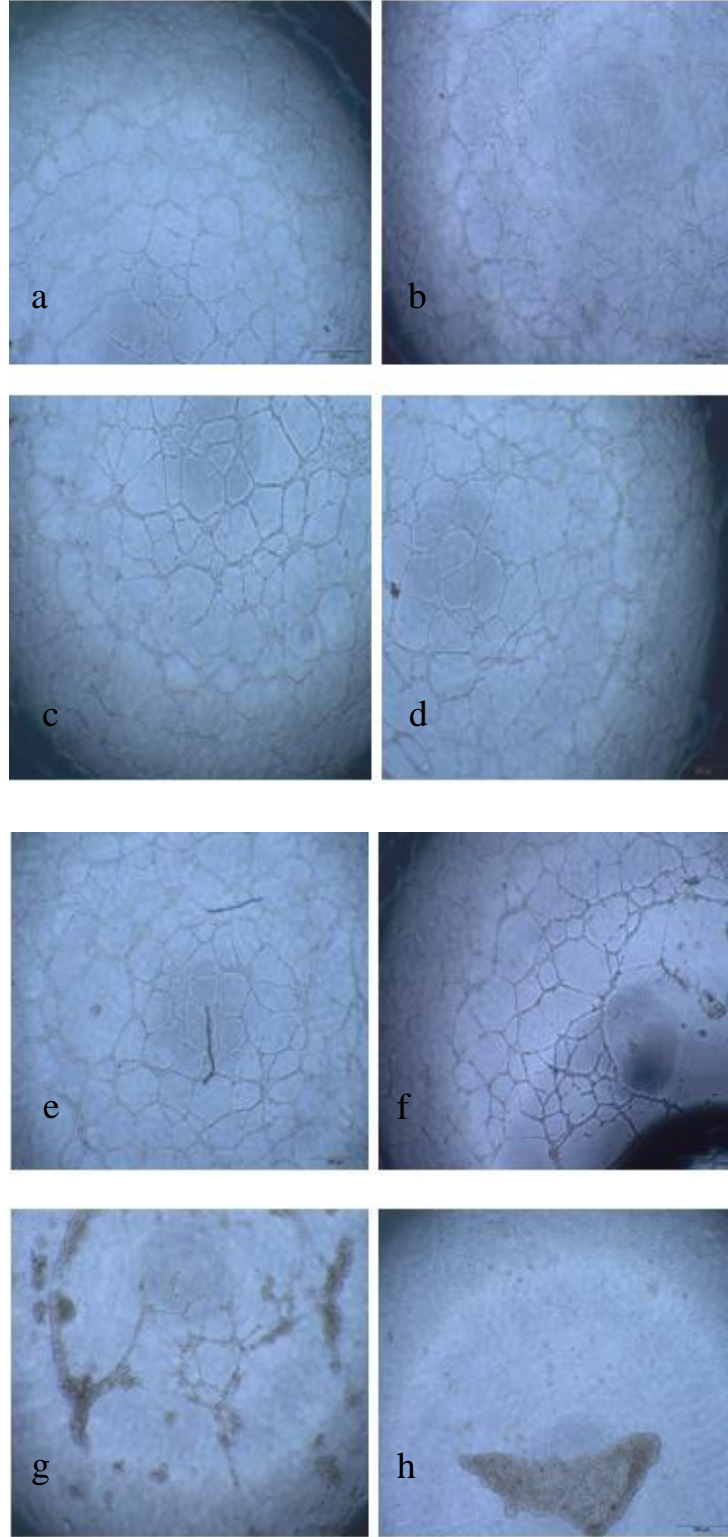
Şekil 3.3. Gossypol'un HUVEC hücrelerinin göçü üzerine etkisinin görüntüleri. a) Negatif kontrol grubu, b) Çözücü grubu, c) 0,5 μM gossypol uygulanan grup, d) 2,5 μM gossypol uygulanan grup, e) 5 μM gossypol uygulanan grup, f) 10 μM gossypol uygulanan grup, g) 20 μM gossypol uygulanan grup, h) 30 μM gossypol uygulanan grup.



Şekil 3.4.Gossypol'un HUVEC hücrelerinin tüp oluşturması üzerine etkisinin görüntüleri.a) Negatif kontrol grubu, b) Çözücü grubu, c) 0,5 μM gossypol uygulanan grup, d) 2,5 μM karvakrol uygulanan grup, e) 5 μM gossypol uygulanan grup, f) 10 μM gossypol uygulanan grup, g)20 μM gossypol uygulanan grup, h)30 μM gossypol uygulanan grup.



Şekil 3.5. Suramin'in HUVEC hücrelerinin göçü üzerine etkisinin görüntüleri. a) Negatif kontrol grubu, b) Çözücü grubu, c) 0,5 μ M suramin uygulanan grup, d) 2,5 μ M suramin uygulanan grup, e) 5 μ M suramin uygulanan grup, f) 10 μ M suramin uygulanan grup, g) 20 μ M suramin uygulanan grup, h) 30 μ M suramin uygulanan grup.



Şekil: 3.6 Suramin'in HUVEC hücrelerinin tüp oluşturulması üzerine etkisinin görüntüleri. a) Negatif kontrol grubu, b) çözücü grubu, c) 0,5 μ M suramin uygulanan grup, d) 2,5 μ M suramin uygulanan grup, e) 5 μ M suramin uygulanan grup, f) 10 μ M suramin uygulanan grup, g) 20 μ M suramin uygulanan grup, h) 30 μ M suramin uygulanan grup.

3.2.3. Test Maddelerinin *in vivo* Anti-Anjiyojenik Etkisinin Belirlenmesi

3.2.3.1. Gossypol'un *in vivo* Anti-Anjiyojenik Etkisinin Belirlenmesi (HET-CAM üzerine etkisi)

HET-CAM deneylerinde negatif kontrol ve çözücü gruplarında CAM yüzeyinin 24 saat sonrasında normal şekilde gelişim gösterdiği görülmüştür. Gossypol uygulanmış tüm CAM yüzeylerinde anti-anjiyojenik etki skorlama yapılarak belirlenmiştir.

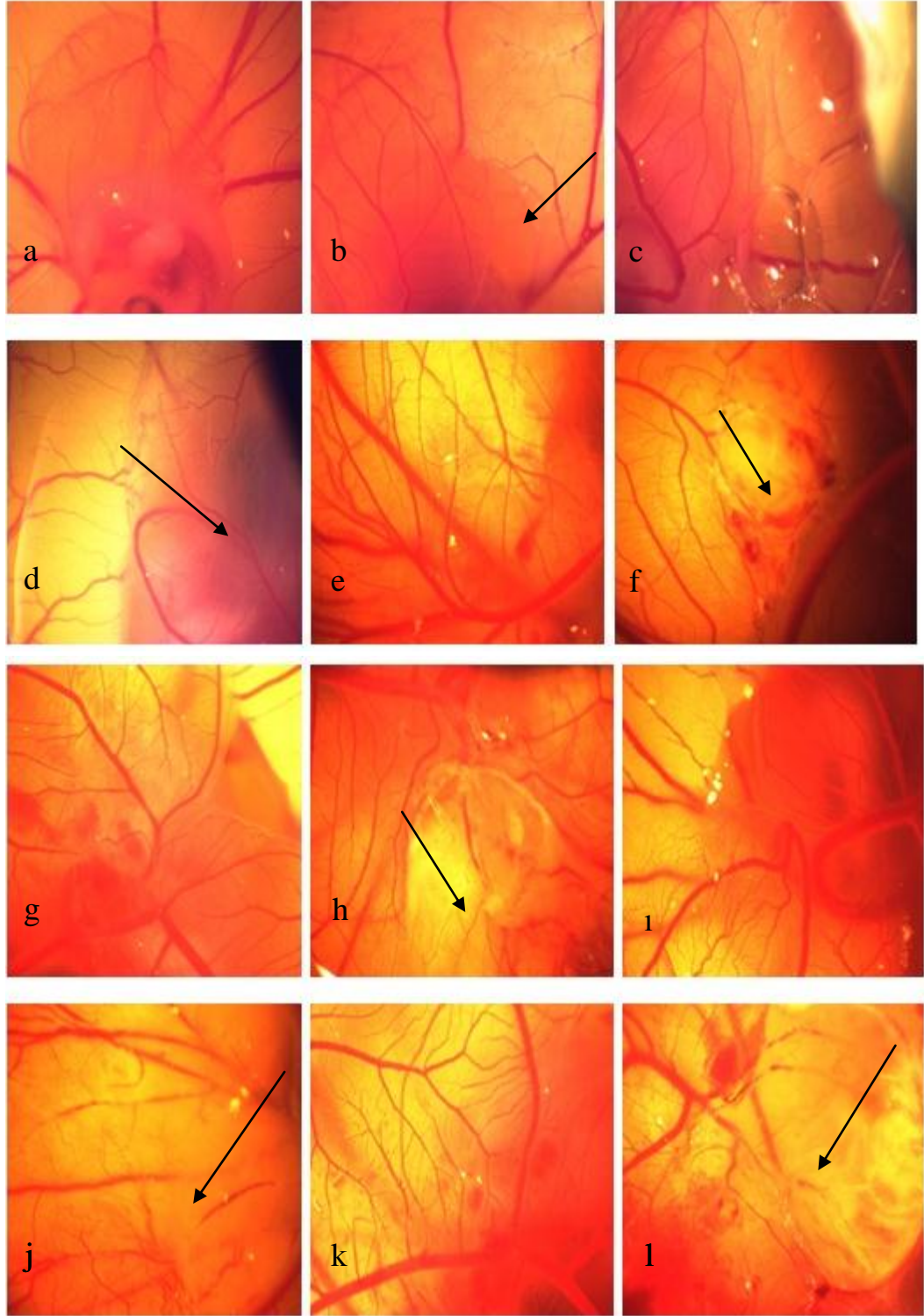
Skorlar CAM üzerinde Gossypol'un konsantrasyona bağımlı olarak anti-anjiyojenik etkiye sahip olduğunu, görülmektedir (Şekil 3.7.).

Gossypol'un ortalama anti-anjiyojenik skoru 15mM'lık konsantrasyon için 0,2 (anti-anjiyojenik etki yok), 30mM'lık konsantrasyon için 0.33 (zayıf anti-anjiyojenik etki yok), 60mM'lık konsantrasyon için 0,6 (zayıf anti-anjiyojenik etki), 120mM'lık konsantrasyon için 1.13 (orta düzeyde anti-anjiyojenik etki)'dir (Şekil 3.8, Şekil 3.9.) Gossypol'un 120mM'lık konsantrasyon için anti-anjiyojenik etki puanı diğer konsantrasyonlardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olarak bulunmuştur ($p < 0.05$).

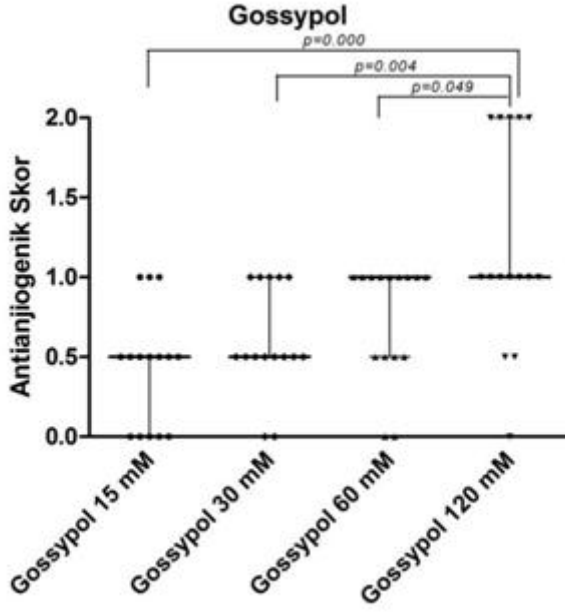
3.2.3.2. Suramin'in *in vivo* Anti-Anjiyojenik Etkisinin Belirlenmesi (HET-CAM üzerine etkisi)

CAM deneylerinde negatif kontrol ve çözücü gruplarında CAM yüzeyinin 24 saat sonrasında normal şekilde gelişim gösterdiği görülmüştür. 15mM ve 30 mM'lık dozlarda suramin'in CAM yüzeyine etki etmediği, 60 mM'lık dozda CAM yüzeyinde bozulma başladığı, 120 mM'lık dozda ise CAM yüzeyinin tamamen yapısının bozulduğu görülmüştür (Şekil 3.10). Skorlar CAM üzerinde Suramin'in konsantrasyona bağımlı olarak anti-anjiyojenik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

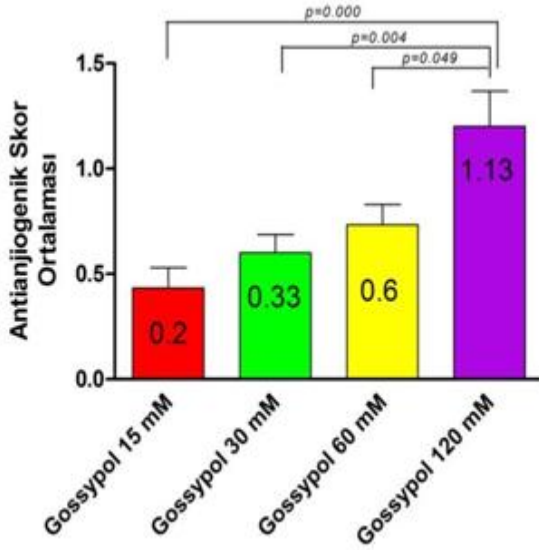
Suramin'in ortalama anti-anjiyojenik skoru 15mM'lık konsantrasyon için 0 (anti-anjiyojenik etki yok), 30mM'lık konsantrasyon için 0 (anti-anjiyojenik etki yok), 60mM'lık konsantrasyon için 0,6 (zayıf anti-anjiyojenik etki), 120mM'lık konsantrasyon için 1.26 (orta düzeyde anti-anjiyojenik etki)'dir (Şekil 3.11, Şekil 3.12).



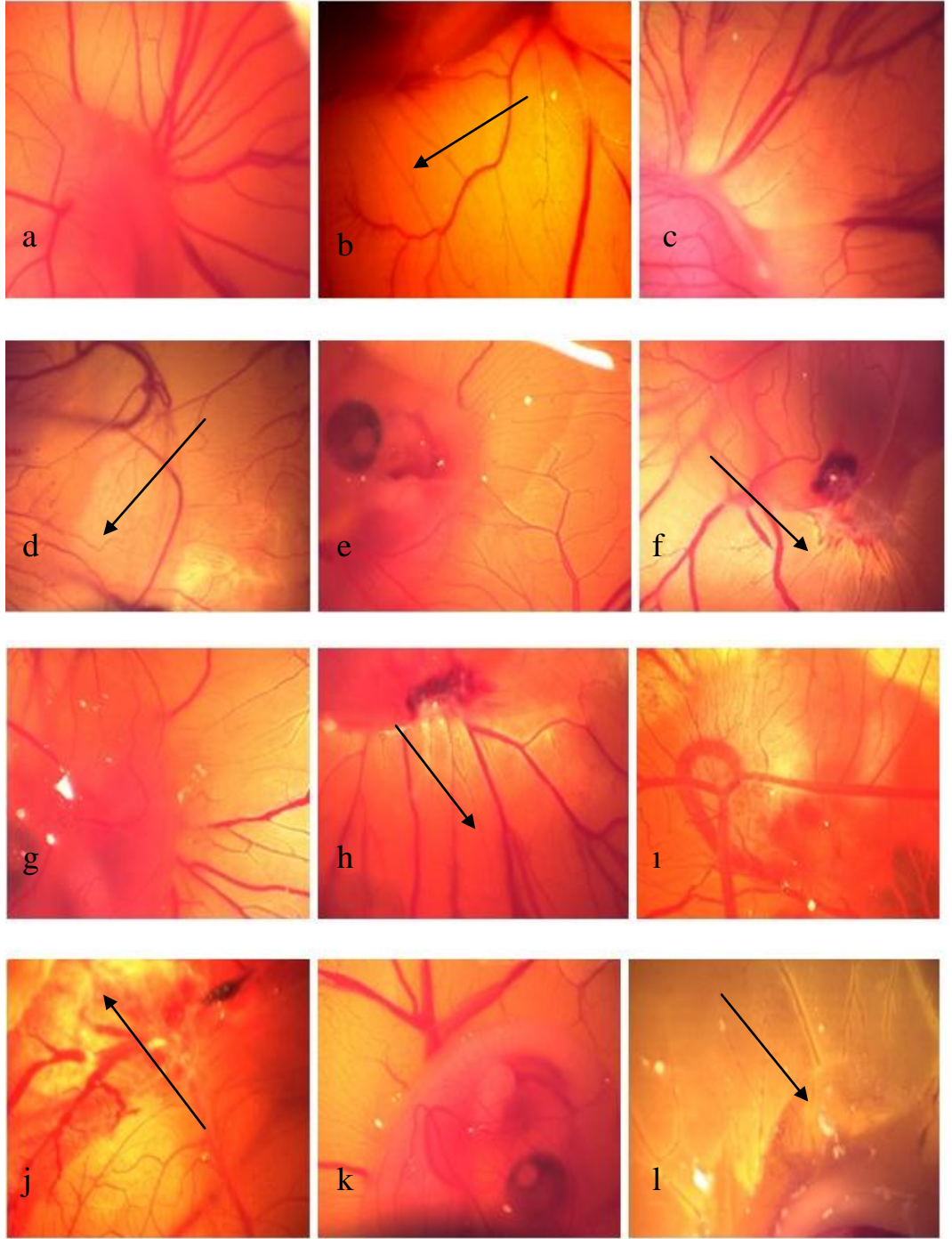
Şekil 3.7. Gossypol'un CAM üzerine etkisinin görüntüleri. a) Negatif kontrol grubu, işlem öncesi, b) Negatif kontrol grubu, 24 saat, c) çözücü grubu, işlem öncesi, d) çözücü grubu 24 saat, e) 15 mM gossypol uygulanan grup, işlem öncesi f) 15 mM gossypol uygulanan grup, 24 saat, g) 30 mM gossypol uygulanan grup, işlem öncesi, h) 30 mM gossypol uygulanan grup, 24 saat, i) 60 mM gossypol uygulanan grup, işlem öncesi j) 60 mM gossypol uygulanan grup, 24 saat sonrası, k) 120 mM gossypol uygulanan grup, işlem öncesi, l) 120 mM gossypol uygulanan grup, 24 saat (X10).



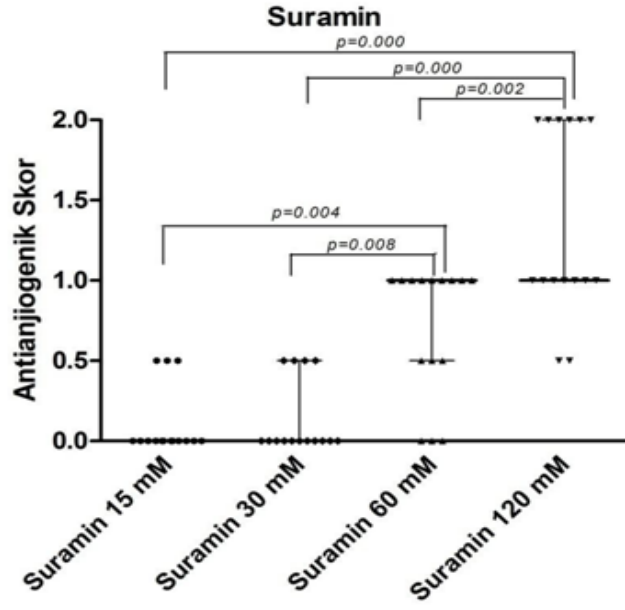
Şekil 3.8. Gossypol'un 15mM, 30mM, 60mM, 120mM'lık konsantrasyonlarda anti anjiyojenik etki puanları ($p<0.05$).



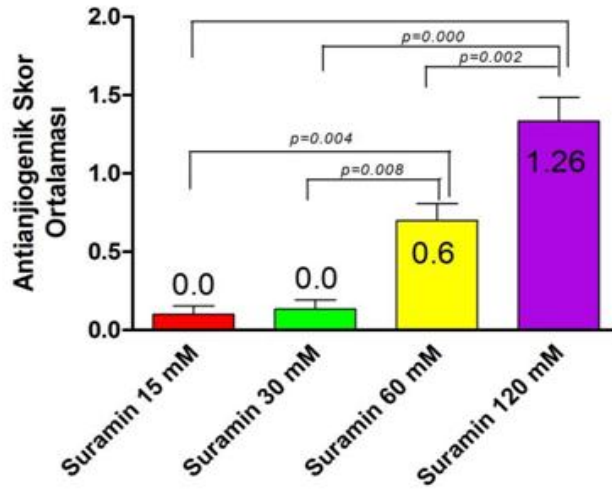
Şekil 3.9. Gossypol'un 15mM, 30mM, 60mM, 120mM'lık konsantrasyonlarda ortalama anti-anjiyojenik ortalama skor değerleri ($p<0.05$).



Şekil 3.10. Suramin'in CAM üzerine etkisinin görüntüleri. a) Negatif kontrol grubu, işlem öncesi b) Negatif kontrol grubu, 24 saat sonrası, c) Çözücü grubu, işlem öncesi, d) Çözücü grubu, 24 saat., e) 15 mM suramin uygulanan grup, işlem öncesi f) 15 mM suramin uygulanan grup, 24 saat sonrası, g) 30 mM suramin uygulanan grup, işlem öncesi, h) 30 mM suramin uygulanan grup, 24 saat, .ı) 60 mM suramin uygulanan grup, işlem öncesi, j) 60 mM suramin uygulanan grup, 24 saat sonrası, k) 120 mM suramin uygulanan grup, işlem öncesi, l) 120 mM suramin uygulanan grup, 24 saat. (X10)



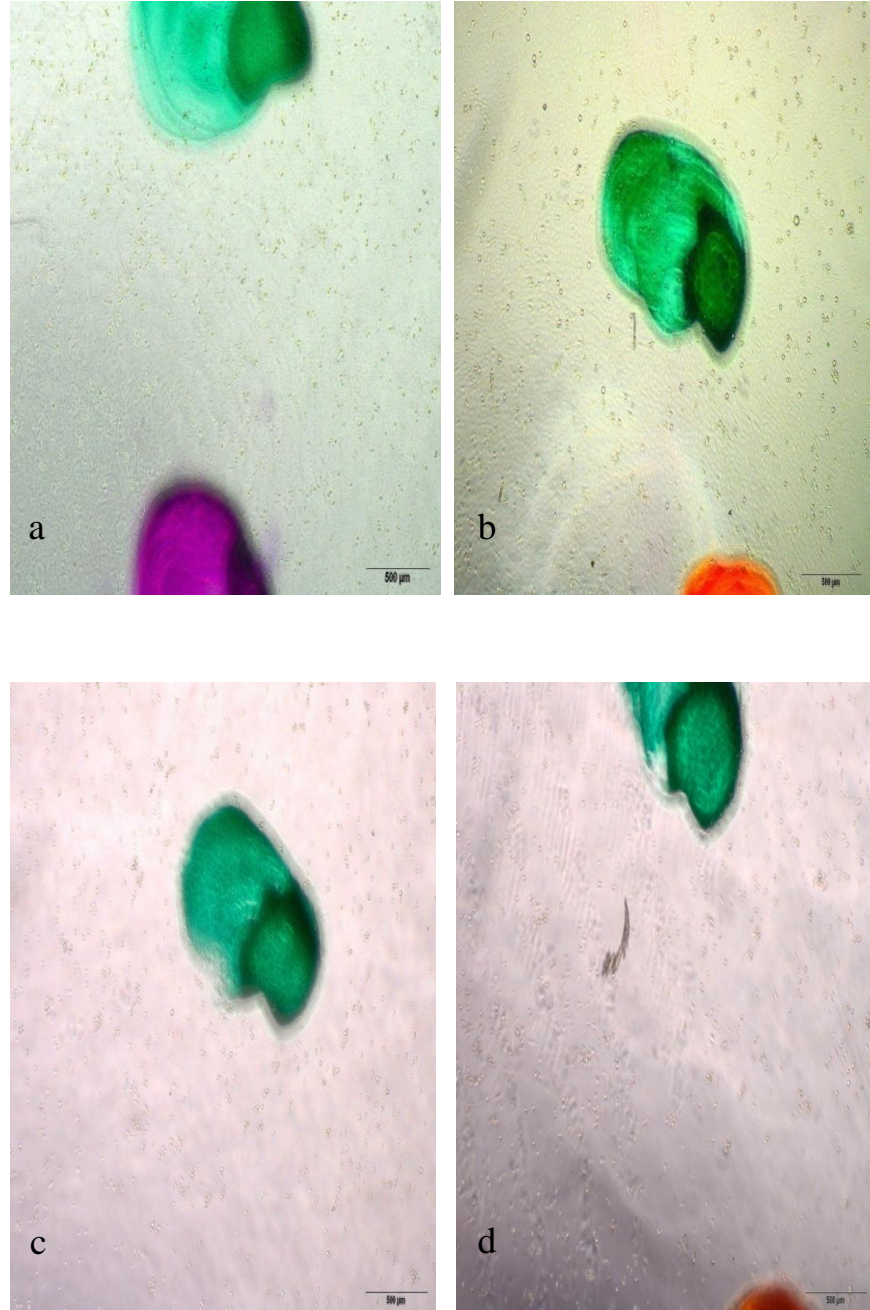
Şekil 3.11. Suramin'in 15mM, 30mM, 60mM, 120mM'lık konsantrasyonlarda anti anjiyojenik etki puanları ($p < 0.05$).



Şekil 3.12. Suramin'in 15mM, 30mM, 60mM, 120mM'lık konsantrasyonlarda ortalama anti-anjiyojenik ortalama skor değerleri ($p < 0.05$).

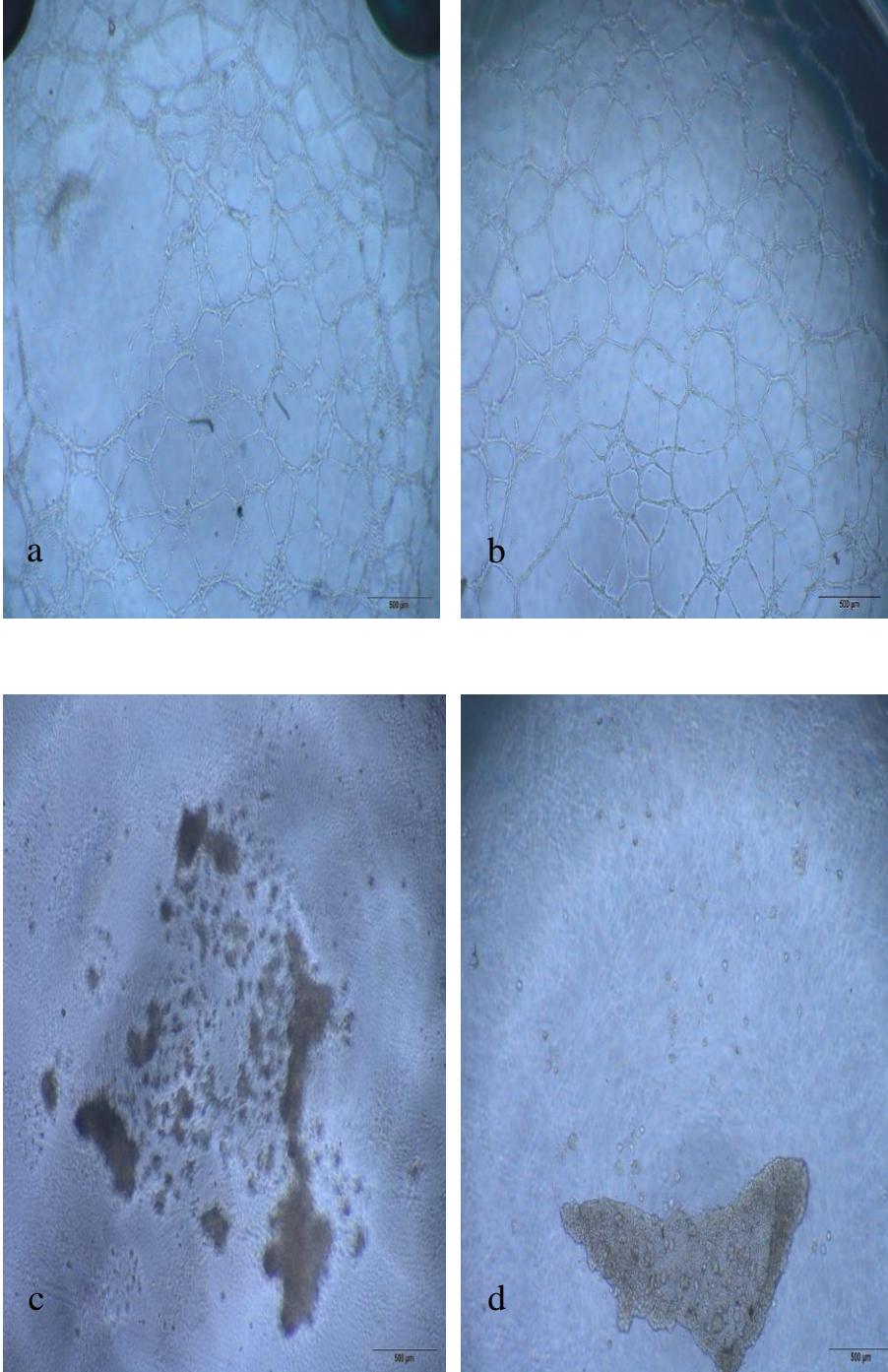
3.2.4. Gossypol ve Suramin'in Anti-anjiyogenik Etkisinin Karşılaştırılması

Gossypol ve suramin kontrol gruplarında yara iyileşmesinin tam olarak gerçekleştiği, Gossypol ve suramin'in 30 μ M'lık dozlarında ise yara iyileşmesinin gerçekleşmediği şekil 3.12'de görülmektedir.



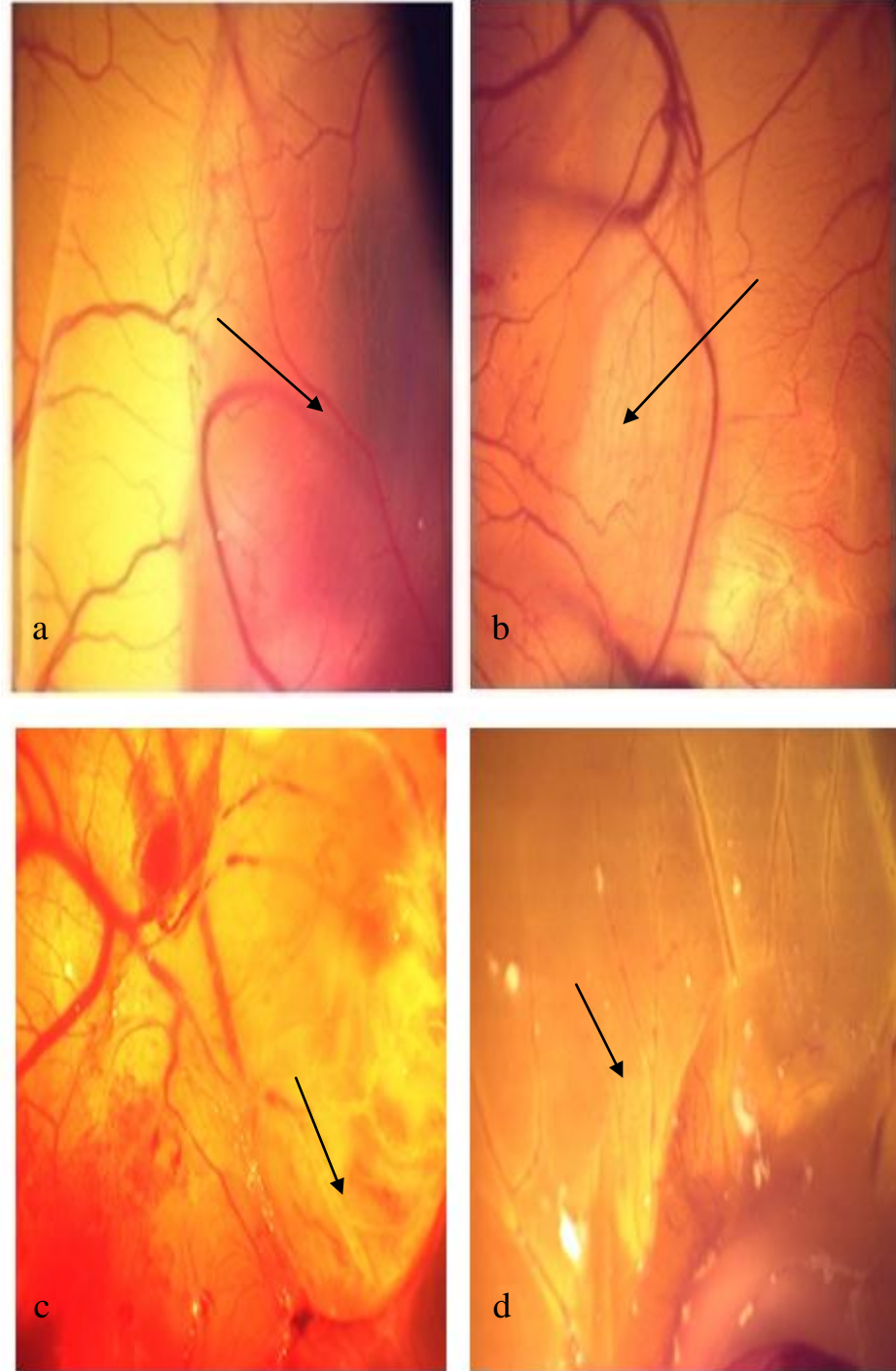
Şekil 3.13. Gossypol ve Suramin'in kontrol gruplarında ve madde uygulanmış gruplarda hücre göçüne etkisinin karşılaştırılması Gossypol kontrol grubu, (b) Suramin kontrol grubu. c) 30 μ M Gossypol, d) 30 μ M Suramin.

Gossypol ve suramin kontrol gruplarında t p oluşumunun tam olarak gerçekleştiği, 30 μM 'lık dozlarında ise t p oluşumunun gerçekleşmediği Şekil 3.14'de görülmektedir.



Şekil 3.14. Gossypol ve Suramin'in kontrol gruplarında t p oluşumuna etkisinin karşılaştırılması
a)Gossypol kontrol grubu, b) Suramin kontrol grubu. c) 30 μM Gossypol, d) 30 μM Suramin.

Gossypol ve suramin kontrol gruplarında koryoallantoik membranda damar gelişimi devam ederken, 120 mM'lık dozda her iki maddede de damar gelişiminin inhibe olduğu şekil 3.15'de görülmektedir.



Şekil 3.15. Gossypol ve Suramin'in doz uygulanmış deney gruplarında HET-CAM üzerine etkisinin karşılaştırılması. (c)120 μM Gossypol, (d) 120 μM Suramin. Gossypol ve Suramin'in kontrol gruplarında HET-CAM üzerine etkisinin karşılaştırılması. (a) Gossypol kontrol grubu, (b) Suramin kontrol grubu.

3.2.5. Antikanser Etkinin Değerlendirilmesi (*In vivo* Ehrlich Ascites Tümör Modeli)

3.2.5.1. Tümör Oluşumu ile İlgili Bulgular

Çalışma kapsamında tümör kontrol grubunda EAC hücreleri ile başarılı bir şekilde solid tümör oluşturulmuştur (Şekil 3.15).



Şekil 3.16. a) Tümör kontrol grubu, b) Negatif kontrol grubu deney hayvanları

Tümör kontrol grubundaki tüm deney hayvanlarında % 100 tümör oluşumu gözlenirken, pozitif kontrol grubundaki (suramin uygulaması gerçekleştirilmiş) 7 deney hayvanından 3 tanesinde tümör oluşumu tespit edilmemiştir ve % 57.1 oranında tümör oluşumu gözlenmiştir. Pre-implantasyon ve post-implantasyon gruplarında ise Gossypol uygulamasına bağlı olarak inhibisyon tespit edilmiştir (Çizelge 3.1). Pre-gossypol uygulanan grupta hiç tümör oluşmazken, post gossypol uygulanan grupta tümör oluşum %' si 28.57 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. Ehrlich Ascites Tümör Modeli Sonuçları

	Ağırlık Ort. ± SS	Uzunluk Ort. ± SS	Genişlik Ort. ± SS	Hacim Ort. ± SS	Tümör oluşum %
Kontrol	-	-	-	-	0
Tümör kontrol	0.23± 0.037	1.12 ± 0.25	0.88± 0.14	0.54 ± 0.19	100.0
Pre-Gossypol	-	-	-	-	0
Post-Gossypol	0.19± 0.060	1.42 ± 0.57	1.17 ± 0.32	0.93 ± 0.56	28.6*
Suramin	0.28± 0.040	1.27 ± 0.37	0.85 ± 0.10	0.59 ± 0.23	57.1*

* Tümör kontrol grubuna göre $p < 0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli fark

Uygulama sürecini kapsayan 14 gün boyunca fareler düzenli olarak tartılmışlardır. Farelerin vücut ağırlıklarının başlangıç ve bitiş değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığında negatif kontrol grubuna göre pre gossypol ve post gossypol uygulanan grupta önemli derecede vücut ağırlığında azalma tespit edilmiştir. Ancak tümör kontrol ve suramin gruplarında çalışma sonlandığında istatistiksel açıdan $p < 0,05$ seviyesinde önemli bir artış tespit edilmiştir (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. Farelerin Total Vücut Ağırlığı Ortalamaları

Günler	Total vücut ağırlığı (g) (ort ± SS)				
	Uygulama Grupları		Kontrol Grupları		
	Pre-Gossypol	Post-Gossypol	Tümör	Süramin	Negatif
1	23,06±2,61	23,24±1,66	23,85±3,41	24,19±1,67	22,39±3,13
2	23,89±2,83	23,66±2,88	24,48±3,17	25,08±1,65	23,43±3,33
3	24,03±2,76	23,35±2,93	24,28±2,62	25,36±1,52	23,55±2,97
4	24,17±5,09	24,65±3,72	24,86±3,51	25,95±1,53	24,76±3,96
5	24,01±2,71	25,33±4,14	24,89±3,51	25,59±1,27	24,97±3,77
6	23,19±2,82	25,33±4,02	24,55±3,45	26,54±1,39	24,47±4,83
7	22,26±2,52	25,08±3,85	24,97±3,72	26,58±1,07	25,08±3,80
8	22,11±2,57	25,00±4,30	25,41±3,41	26,29±1,44	25,60±4,46
9	21,90±1,58	25,05±3,81	25,50±4,10	26,62±5,13	26,55±4,82
10	21,31±3,41	25,06±2,03	25,88±4,53	28,18±0,74	26,86±5,60
11	21,78±0,94	24,49±3,17	25,95±4,92	28,62±1,25	27,04±5,87
12	20,73±3,16	24,45±3,82	26,18±4,89	28,91±1,40	27,24±0,99
13	20,56±3,25	22,91±1,57	26,38±4,61	29,26±1,04	27,30±5,45
14	20,01±1,35*	20,67±1,62*	26,52±4,18	29,66±1,15	27,44±1,92

*Negatif kontrol grubuna göre bitiş değerleri bakımından $p < 0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli fark

3.2.5.2.Hematolojik ve Biyokimyasal Bulgular

Deneme gruplarında bulunan farelerin deneme başlangıcında ölçülen hematoloji parametreleri incelendiğinde gruplar arasında herhangi farklılık tespit edilmemiştir. Bununla birlikte deneme sonucunda ölçülen hematoloji parametreleri incelendiğinde negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında pregossypol uygulanan grupta WBC, LYM, NEU, HTC değerlerinde azalma, PLT değerinde ise artış saptanmıştır. Ayrıca negatif kontrol grubu ile

karşılaştırıldığında suramin uygulama grubunda eritrosit hemoglobin konsantrasyonunun % olarak ifadesi olan MCHC parametresi ve trombositlerin dağılım genişliği olarak adlandırılan PDWc parametresinde istatistiksel açıdan $p<0,05$ seviyesinde önemli bir artış tespit edilmiştir (Çizelge 3.3., 3.4.). Deneme gruplarının başlangıç ve bitiş değerleri incelendiğinde ise, negatif kontrol, tümör kontrol ve suramin uygulama gruplarındaki değerlerde herhangi bir farklılık gözlenmezken pregossypol uygulama grubunda PLT değerinde ve post gossypol uygulama grubunda NEU değerinde farklılık tespit edilmiştir.

Çizelge 3.3. Hematolojik Parametrelerinin Başlangıç Değerleri

Parametreler	Hematoloji Analizleri (ort ± SS)				
	Uygulama Grupları		Kontrol Grupları		
	Pre-Gossypol	Post-Gossypol	Tümör	Süramin	Negatif
WBC (10 ⁹ h/L)	9,62±3,47	8,58±2,17	8,44±2,02	9,13±0,57	9,00±0,88
LYM (10 ⁹ h/L)	4,45±0,07	4,21±0,35	5,60±2,12	6,64±0,73	6,81±0,43
MON (10 ⁹ h/L)	0,47±0,02	0,26±0,02	0,14±0,02	0,31±0,23	0,25±0,11
NEU (10 ⁹ h/L)	2,21±0,13	2,54±0,66	1,31±1,31	0,54±0,03	0,59±0,13
RBC (10 ¹² h/L)	7,66±0,31	7,50±0,22	7,19±0,46	8,27±0,95	8,08±1,72
HGB (g/L)	14,33±2,03	15,14±1,18	14,65±0,67	13,21±0,43	14,33±0,32
HCT (%)	42,43±1,56	39,89±2,50	36,88±2,52	34,16±2,47	37,54±1,37
MCV (fl)	49,50±3,53	49,00±1,41	50,50±3,54	45,00±0,10	46,50±0,70
MCH (pg)	11,05±0,07	11,00±0,01	11,85±1,20	12,60±0,10	12,65±0,21
MCHC (g/dL)	28,10±0,70	27,50±3,39	27,90±1,98	29,51±2,28	30,00±0,71
RDWc (%)	18,55±0,91	18,80±0,70	18,90±0,42	17,65±0,77	18,30±0,14
PLT (10 ⁹ hücre/L)	325,00±7,07	325,00±35,35	280,00±28,28	308,00±82,02	280,00±14,14
PCT (%)	0,20±0,04	0,17±0,02	0,11±0,11	0,20±0,15	0,13±0,11
MPV (fl)	8,20±0,84	7,00±1,83	7,55±0,91	6,90±0,28	7,60±0,56
PDWc (%)	31,90±0,56	34,50±1,62	39,45±0,35	34,30±,40	35,70±1,69

Çizelge 3.4. Hematolojik Parametrelerinin Bitiş Değerleri

Parametreler	Hematoloji Analizleri (ort ± SS)				
	Uygulama Grupları		Kontrol Grupları		
	Pre-Gossypol	Post-Gossypol	Tümör	Pozitif	Negatif
WBC (10 ⁹ h/L)	3,27±4,10*	7,94±0,28	10,75±0,16	8,84±3,16	7,95±0,62
LYM (10 ⁹ h/L)	2,37±2,37*	3,57±0,74	5,59±1,34	4,45±0,05	4,31±0,79
MON (10 ⁹ h/L)	0,09±0,01	0,08±0,02	0,72±0,42*	0,25±0,13	0,12±0,09
NEU (10 ⁹ h/L)	0,76±0,94*	5,04±0,67	4,35±1,13	3,92±3,10	2,91±0,64
RBC (10 ¹² h/L)	6,01±4,22	7,87±0,17	8,54±0,83	8,08±0,46	8,46±0,43
HGB (g/L)	9,55±7,14	13,15±1,48	13,70±1,84	17,40±20,49	13,90±0,71
HCT (%)	28,51±20,01*	38,29±3,83	38,70±4,93	38,25±3,18	41,90±1,14
MCV (fl)	47,00±0,01	47,50±4,94	45,00±1,41	48,50±2,12	49,50±3,54
MCH (pg)	15,50±0,89	15,65±0,77	16,10±0,56	16,60±0,14	16,45±0,07
MCHC (g/dL)	32,70±2,12	35,10±1,55	35,55±0,21	43,20±14,28*	33,25±2,47
RDWc (%)	18,95±1,20	18,75±0,49	18,10±0,85	18,35±0,07	18,90±0,56
PLT (10 ⁹ hücre/L)	905,00±21,21*	391,00±12,72	322,50±14,85	463,00±424,26	588,00±50,91
PCT (%)	0,30±0,40	0,28±0,10	0,29±0,07	0,30±0,23	0,37±0,10
MPV (fl)	6,60±0,28	6,97±0,24	6,05±0,07	7,45±1,76	6,30±0,56
PDWc (%)	32,10±3,53	31,70±0,70	29,05±0,77	35,35±8,84*	29,35±0,35

*Negatif kontrol grubuna göre p<0.05 seviyesinde istatistiksel olarak önemli fark

Deneme gruplarında bulunan farelerin deneme başlangıcında ölçülen biyokimya parametreleri incelendiğinde gruplar arasında herhangi farklılık tespit edilmemiştir. Bununla birlikte deneme sonucunda ölçülen biyokimya parametreleri incelendiğinde negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında pregossypol uygulanan grupta ALP ve ALT değerlerinde azalma, GLOB değerlerinde artma saptanmıştır. Ayrıca negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diğer tüm uygulama gruplarında ALT değerinde azalma tespit edilmiştir (Çizelge 3.5., 3.6.).

Çizelge 3.5. Biyokimyasal Parametrelerin Başlangıç Ortalamaları

Parametreler	Comprehensive Diagnostic Kit ile Biyokimyasal Analizler (ort ± SS)				
	Uygulama Grupları		Kontrol Grupları		
	Pre-Gossypol	Post-Gossypol	Tümör	Pozitif	Negatif
ALB (g/dL)	3,25±0,35	4,35±0,07	4,15±0,21	4,25±0,07	4,15±0,21
ALP (u/L)	76,50±3,53	84,00±1,41	82,00±2,82	79,00±7,07	89,50±9,19
ALT (u/L)	55,00±7,01	63,00±5,65	66,00±1,41	46,00±5,65	64,00±19,79
AMY (u/L)	783,50±23,33	719,50±36,06	670,0±45,25	833,00±178,19	764,00±50,91
TBIL (mg/dL)	0,35±0,07	0,35±0,07	0,35±0,07	0,30±0,01	0,25±0,21
BUN (mg/dL)	11,50±0,70	11,00±1,41	11,50±2,12	15,50±0,70	15,50±3,54
Ca (mg/dL)	10,55±0,07	9,95±1,48	9,80±0,42	9,85±0,49	9,40±0,84
Phos (mg/dL)	7,65±0,07	8,60±2,40	8,50±2,68	8,65±0,77	8,30±0,98
Cre (mg/dL)	0,30±0,01	0,30±0,07	0,30±0,01	0,20±0,01	0,30±0,14
GLU (mg/dL)	259,50±55,86	172,50±24,74	174,50±34,6	214,00±18,38	215,50±6,36
Na (mmol/L)	134,50±6,36	138,50±0,70	132,50±0,70	214,00±18,38	137,00±1,41
K (mmol/L)	6,95±0,49	4,45±2,21	4,60±0,42	7,80±2,26	5,90±0,14
TP (g/dL)	5,25±0,02	5,20±0,42	5,60±0,98	5,70±0,42	5,95±0,35
GLOB (g/dL)	1,65±0,21	3,05±0,35	2,80±0,56	3,00±0,56	2,65±0,63

Çizelge 3.6. Biyokimyasal Parametrelerin Bitiş Ortalamaları

Parametreler	Comprehensive Diagnostic Kit ile Biyokimyasal Analizler (ort ± SS)				
	Uygulama Grupları		Kontrol Grupları		
	Pre-Gossypol	Post-Gossypol	Tümör	Pozitif	Negatif
ALB (g/dL)	2,50±0,70	3,65±0,07	3,10±0,56	3,30±0,14	3,15±0,21
ALP (u/L)	45,00±8,48*	91,00±1,41	53,50±28,99*	96,00±21,21	95,00±2,82
ALT (u/L)	29,50±6,36*	56,50±4,94*	46,50±3,53*	39,50±2,12*	73,00±2,82
AMY (u/L)	865,00±145,66	996,50±136,47	960,00±46,66	1077,50±33,23*	793,50±9,19
TBIL (mg/dL)	0,40±0,01	0,40±0,01	0,50±0,01	0,50±0,01	0,50±0,01
BUN (mg/dL)	25,00±1,41	24,50±0,70	18,50±0,70	21,00±0,01	21,00±1,41
Ca (mg/dL)	10,50±0,01	9,85±0,77	9,70±0,28	9,40±0,01	10,35±0,07
Phos (mg/dL)	7,90±1,41	8,70±0,42	6,75±1,34	7,55±0,35	9,90±0,14
Cre (mg/dL)	0,20±0,01	0,20±0,01	0,20±0,01	0,20±0,01	0,20±0,01
GLU (mg/dL)	189,50±10,60	238,00±2,82	211,00±28,28	239,50±10,60	251,00±1,31
Na (mmol/L)	145,50±0,70	147,00±1,41	145,00±0,01	143,50±0,70	146,00±1,41
K (mmol/L)	5,60±0,42	5,40±0,14	4,70±0,28	4,95±0,35	4,90±0,42
TP (g/dL)	5,40±0,42	5,45±0,21	4,75±0,49	5,00±0,28	4,95±0,07
GLOB (g/dL)	2,85±0,35*	1,85±0,21	1,65±0,07	1,65±0,07	1,80±0,28

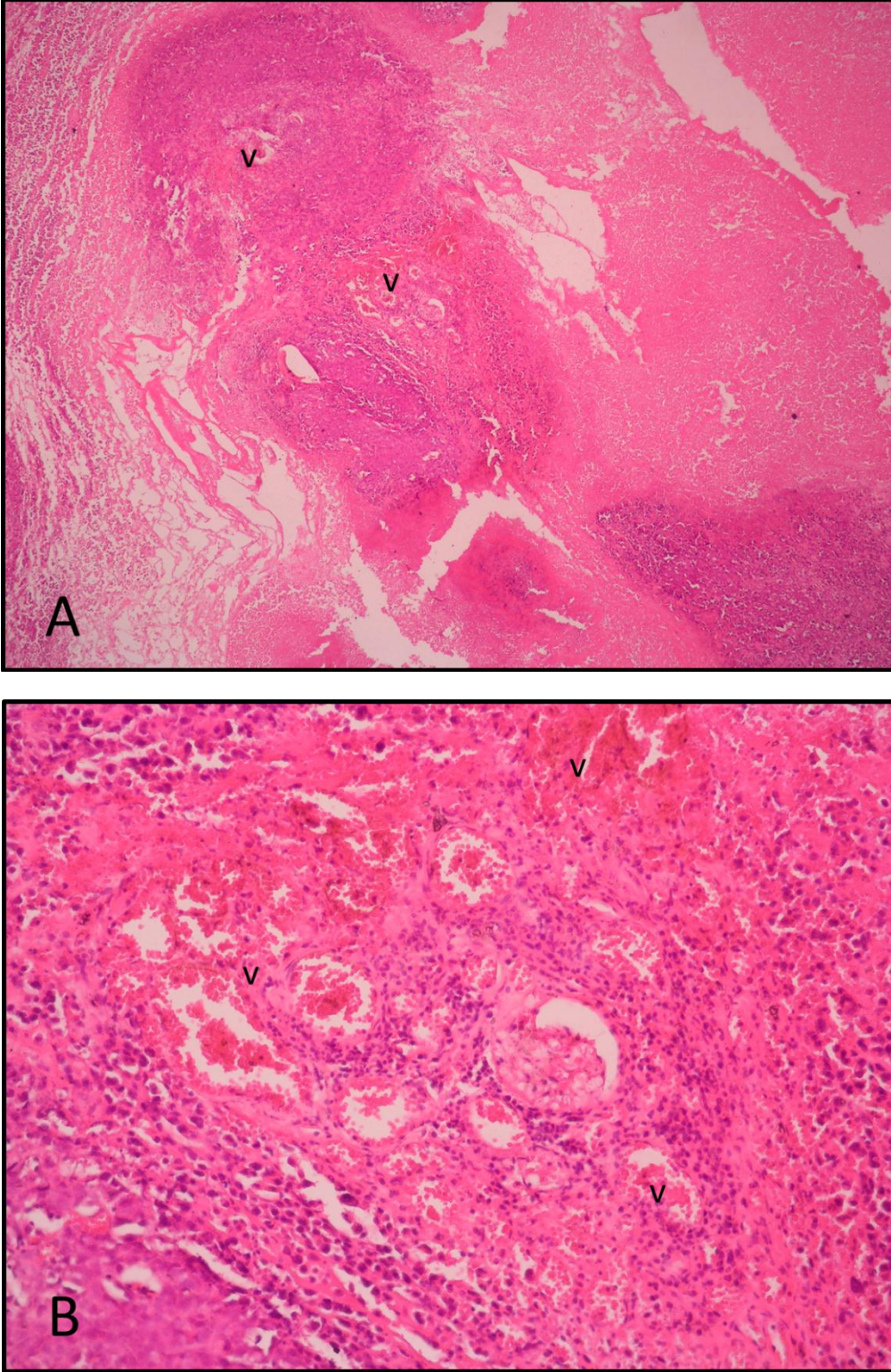
*Negatif kontrol grubuna göre p<0.05 seviyesinde istatistiksel olarak önemli fark

3.2.5.3. Histolojik Bulgular:

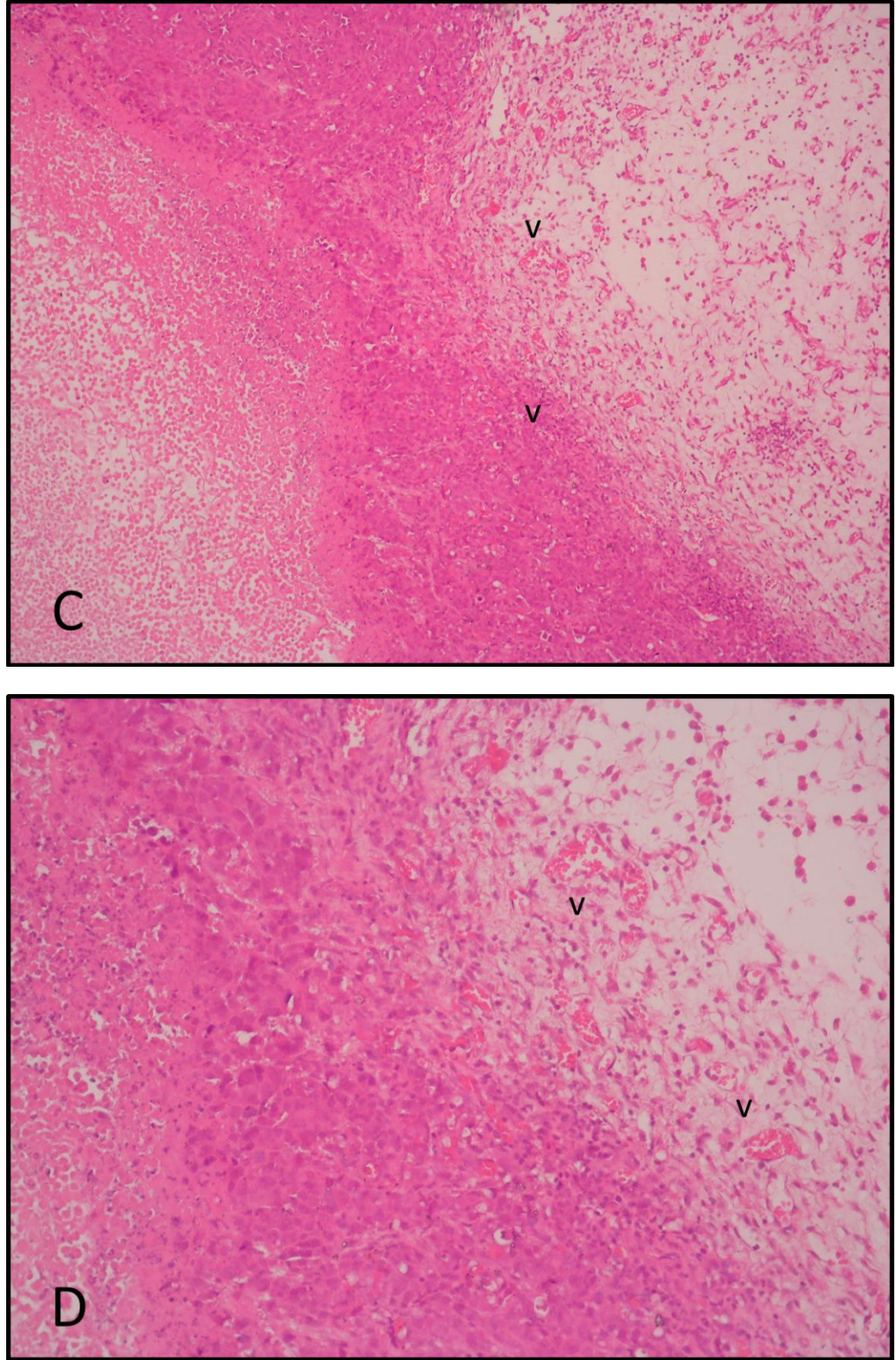
Hematoksilen-Eosin ile boyanmış tümör dokusu kesitleri rutin histolojik parametreler açısından değerlendirilmiştir. Buna göre, genel histolojik görünüm tümör dokusu yaygınlığı ve yoğunluğu, inflamasyon,ve damar yoğunlukları açısından deney grupları karşılaştırılarak incelenmiştir. Kontrol grubu tümör dokusu histolojik kesitlerinde oldukça yoğun (kompakt) ve yaygın tümör dokusu görülmektedir. Ayrıca yoğun inflamasyon ve bol miktarda ve hemorajik damarlar izlenmektedir. Suramin grubu tümör dokusu histolojik kesitlerinde ise oldukça azalmış yoğunluk ve yaygınlıkta tümör dokusu görülmektedir. Ek olarak damar yapıları ve inflamasyon da oldukça azalmış olarak izlenmektedir. Gossypol grubu tümör dokusu histolojik kesitleri incelendiğinde ise kontrol grubuna göre daha az yoğun ve daha az yaygın, fakat suramin grubuna göre daha yoğun ve daha yaygın düzeyde tümöral dokuya rastlanmıştır. Kontrol grubuna göre daha azalmış, suramin grubu ile kıyaslandığında ise daha yoğun damar ve inflamasyon değerlendirilmiştir.

TUNEL ile boyanmış tümör dokusu kesitleri genel apoptotik parametreler açısından değerlendirilmiştir. Buna göre, kontrol grubu tümör dokusu histolojik kesitlerinde oldukça az sayıda apoptotik hücelere rastlanmıştır. Suramin grubu tümör dokusu histolojik kesitlerinde ise apoptotik hücelere Kontrol grubuna kıyasla oldukça fazla miktarda görülmektedir. Gossypol grubu tümör dokusu histolojik kesitleri incelendiğinde ise kontrol grubuna göre daha fazla apoptotik hücelere rastlanırken, suramin grubuna göre ise daha az miktarda apoptotik hücelerin boyandığı görülmüştür.

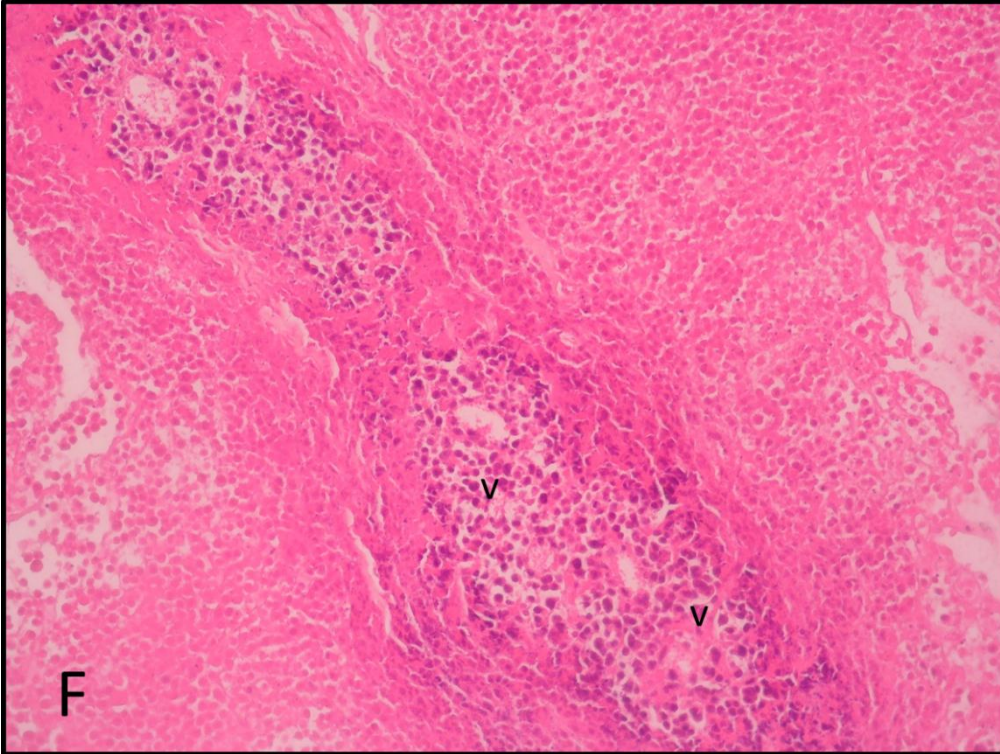
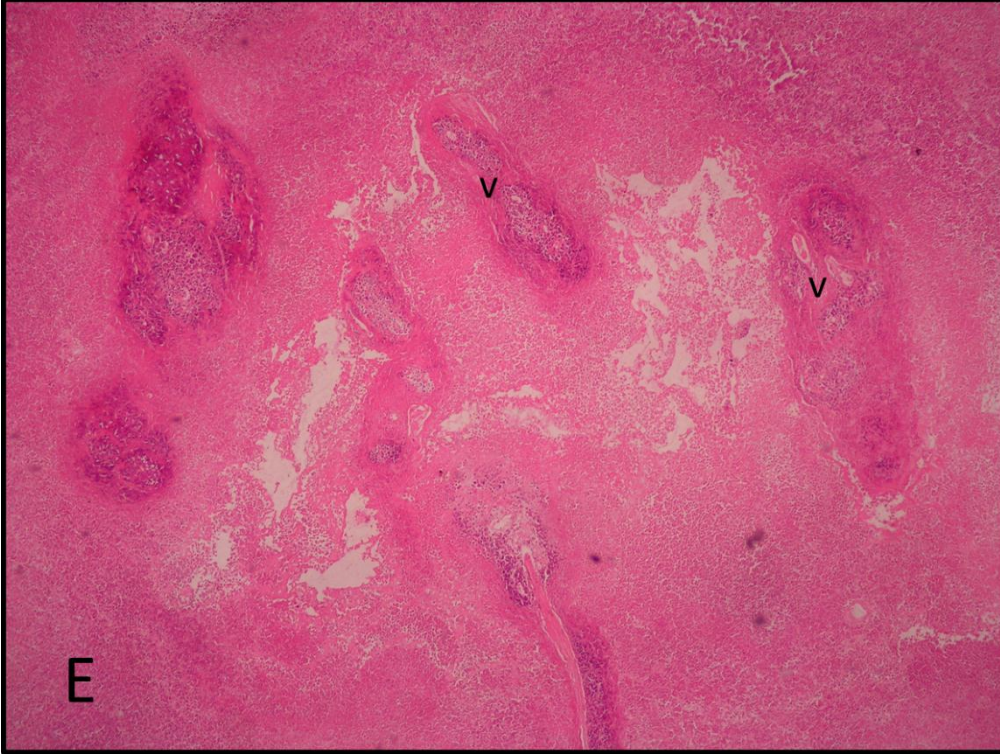
VEGF immunohistokimyasal değerlendirmeler her bir grup için ve gruplar arasında olacak şekilde karşılaştırılmıştır. Buna göre kontrol grubu tümör dokusunda VEGF ekspresyonu oldukça yoğun ve yaygın olarak izlenmiştir. Suramin grubu tümör dokusunda kontrol grubuna göre azalmış VEGF ekspresyonu görülmüştür. Gossypol grubunda da VEGF ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalmış olarak değerlendirilmiştir. Suramin grubu ile karşılaştırıldığında ise VEGF ekspresyonunun Gossypol grubunda nispeten daha fazla olduğu izlenmiştir.



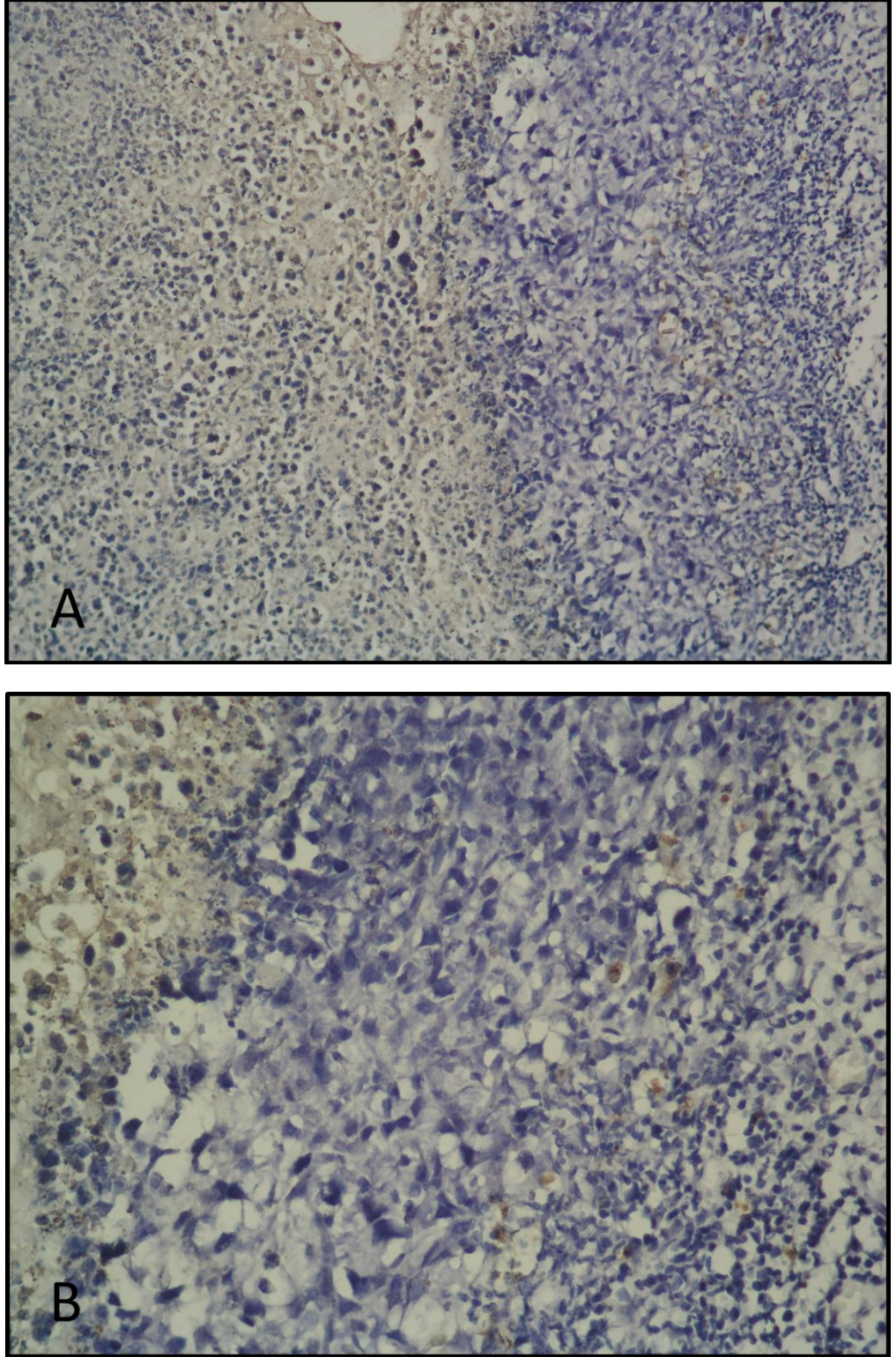
Şekil 3.17. Kontrol grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Oldukça kompaktlaşmış tümör dokusu içerisinde ve etrafında yaygın inflamasyon ve çok sayıda hemorajik damar izlenmektedir (v). Hematoksilen-Eosin boyama; büyütme Ax4, Bx20.



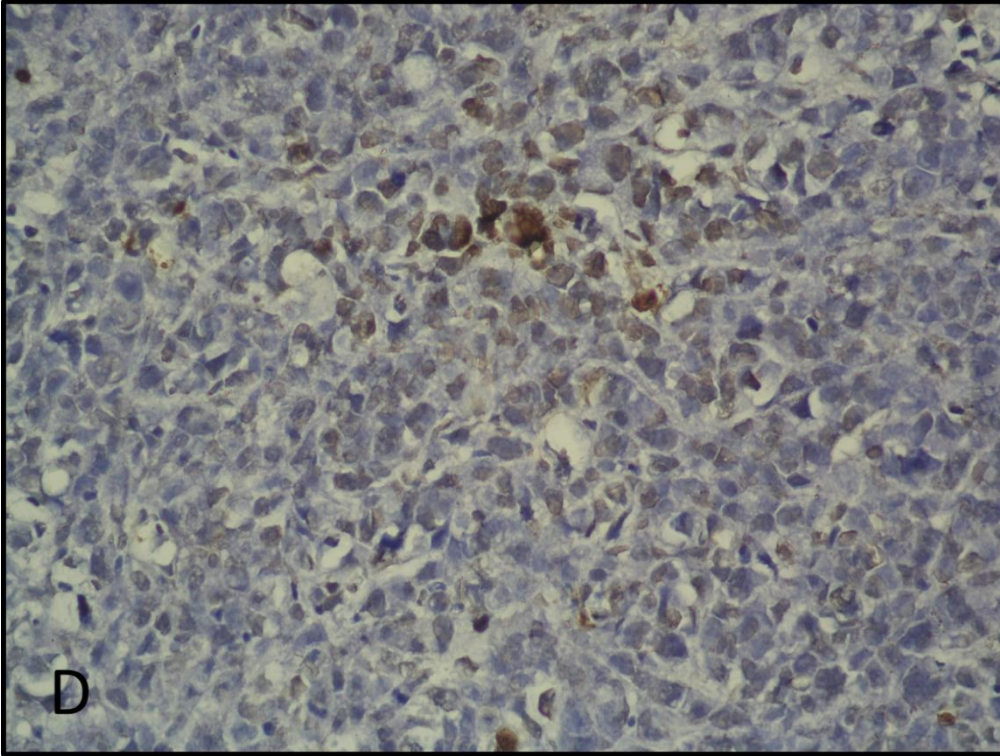
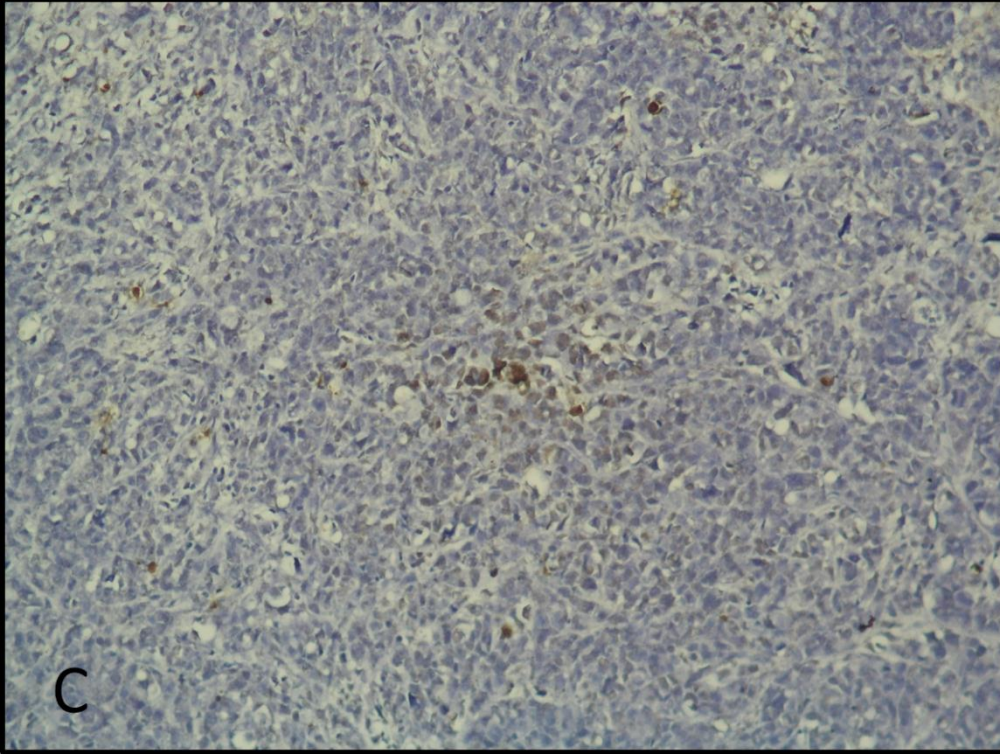
Şekil 3.18. Suramin grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Kontrol grubuna göre azalmış nonkompakt tümör dokusu içerisinde ve etrafındaki stromal doku içerisinde daha az sayıda damar ve inflamatuvar hücre görülmektedir (v). Hematoksilen-Eosin boyama; büyütme Cx4, Dx20.



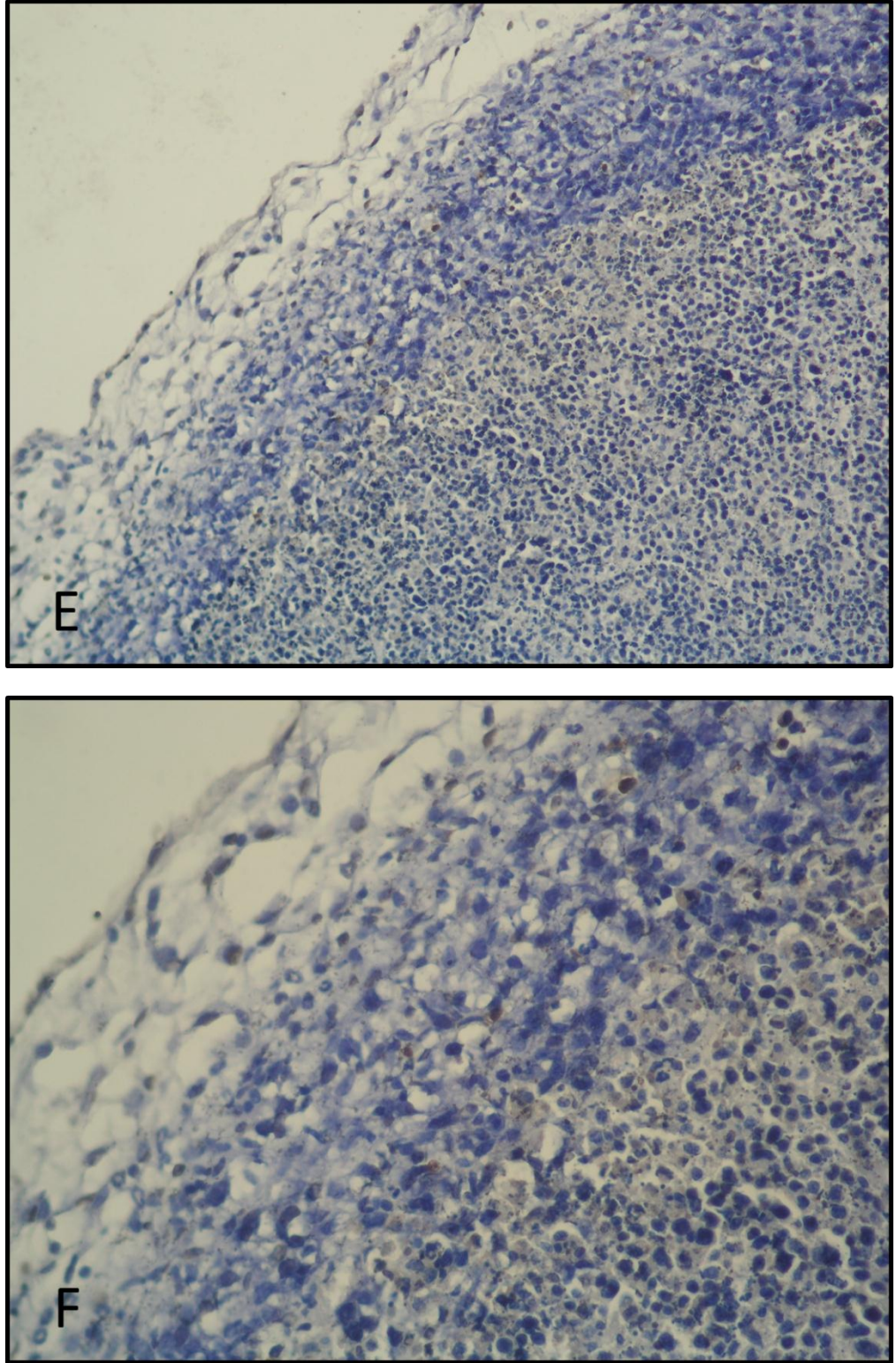
Şekil 3.19. Post-Gossypol grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Kontrol grubuna göre daha az yaygın kompakt tümör dokusu görülmektedir. Daha az sayıda damar ve azalmış inflamasyon görülmektedir (v). Hematoksilen-Eosin boyama; büyütme Ex4, Fx20.



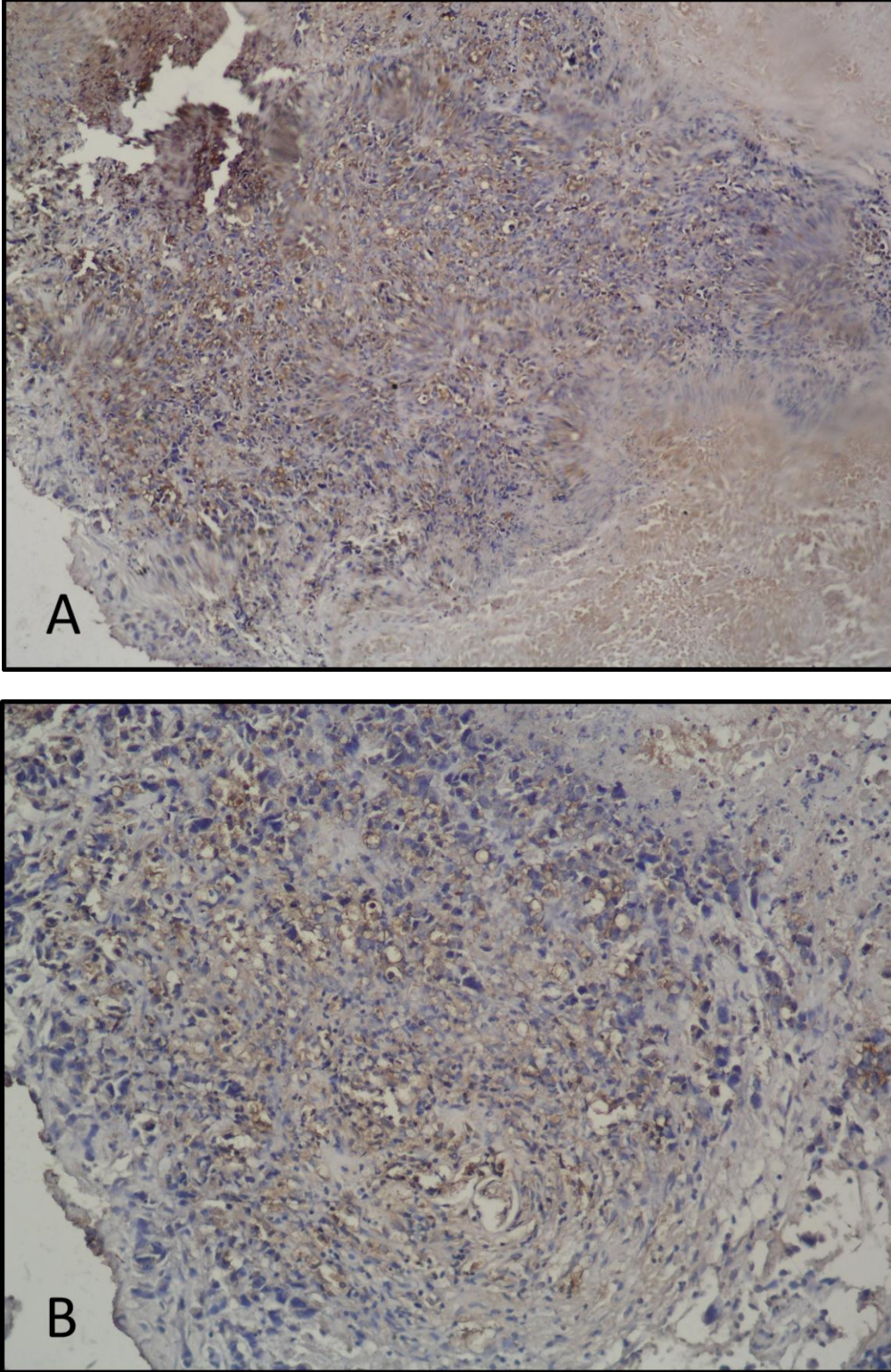
Şekil 3.20. Kontrol grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Oldukça az sayıda apoptotik hücreler görülmektedir. TUNEL immunohistokimya boyama; büyütme Ax20, Bx40.



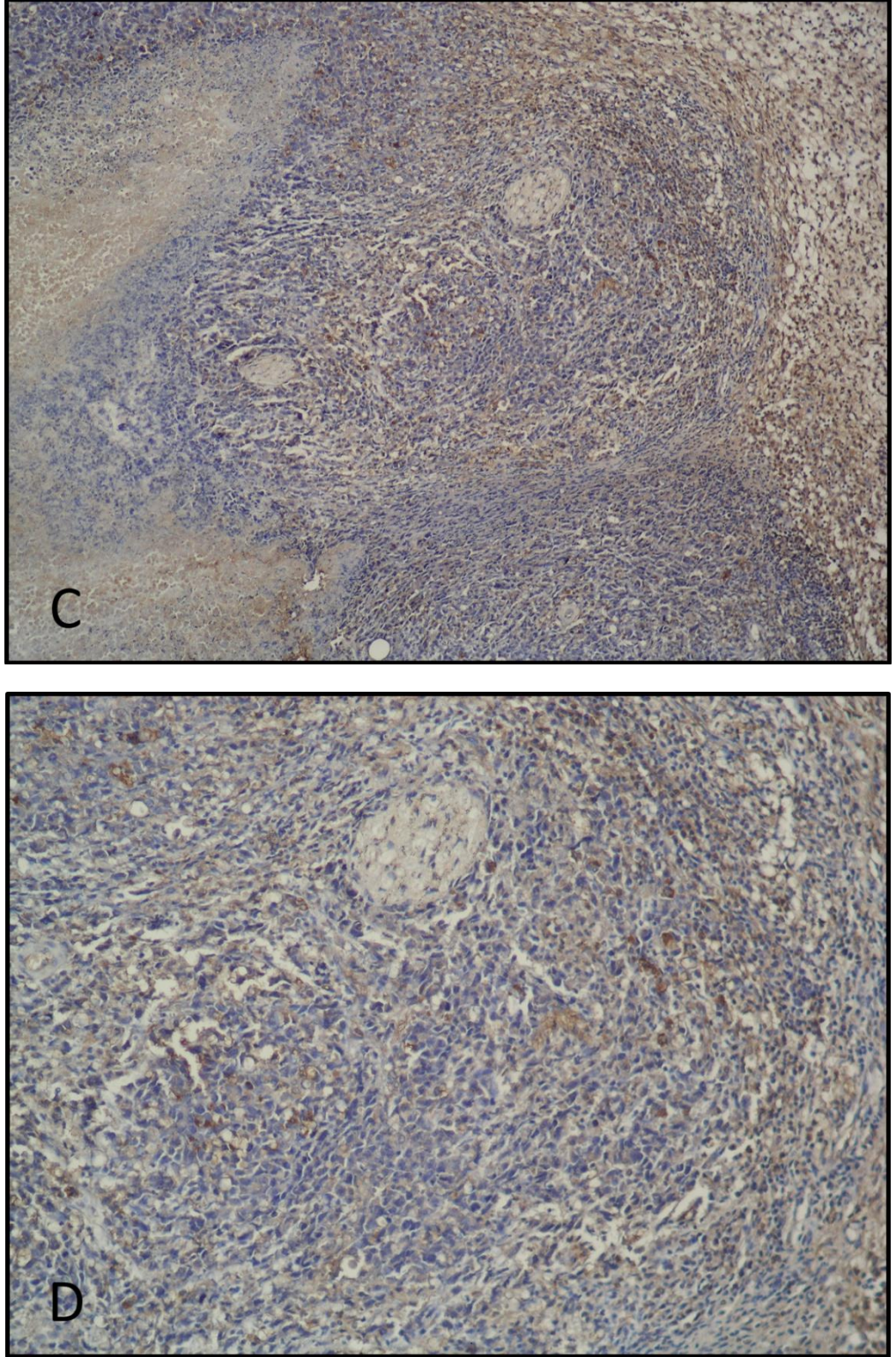
Şekil 3.21. Suramin grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Apoptotik hücreler yoğun bir şekilde tümör dokusu içerisinde izlenmektedir. TUNEL immunohistokimya boyama; büyütme Cx20, Dx40.



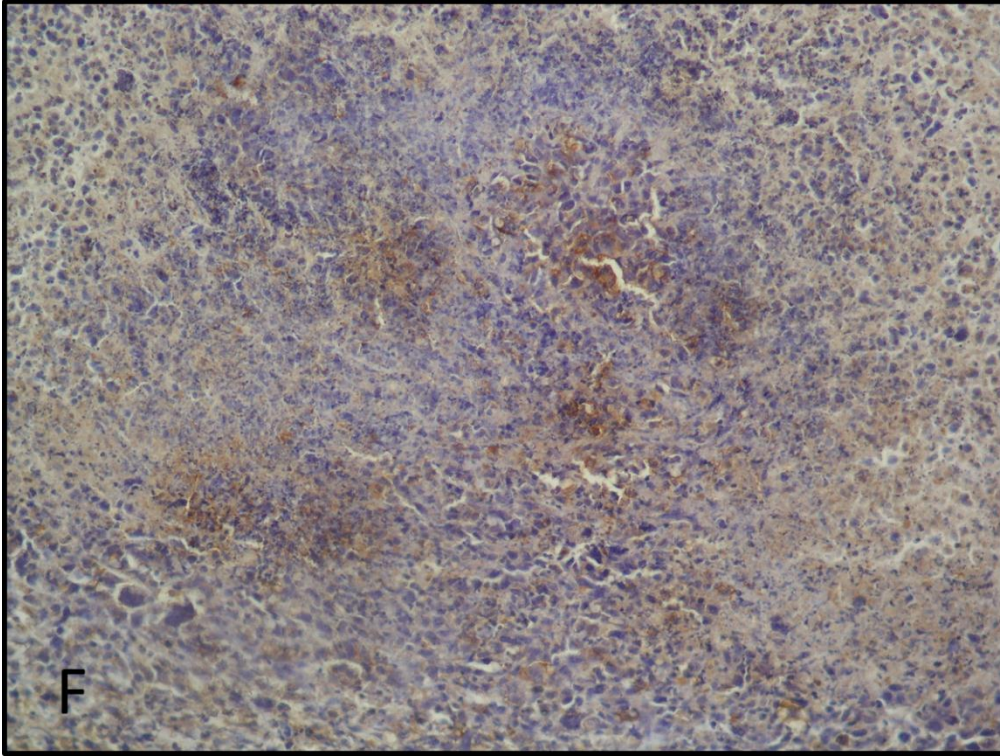
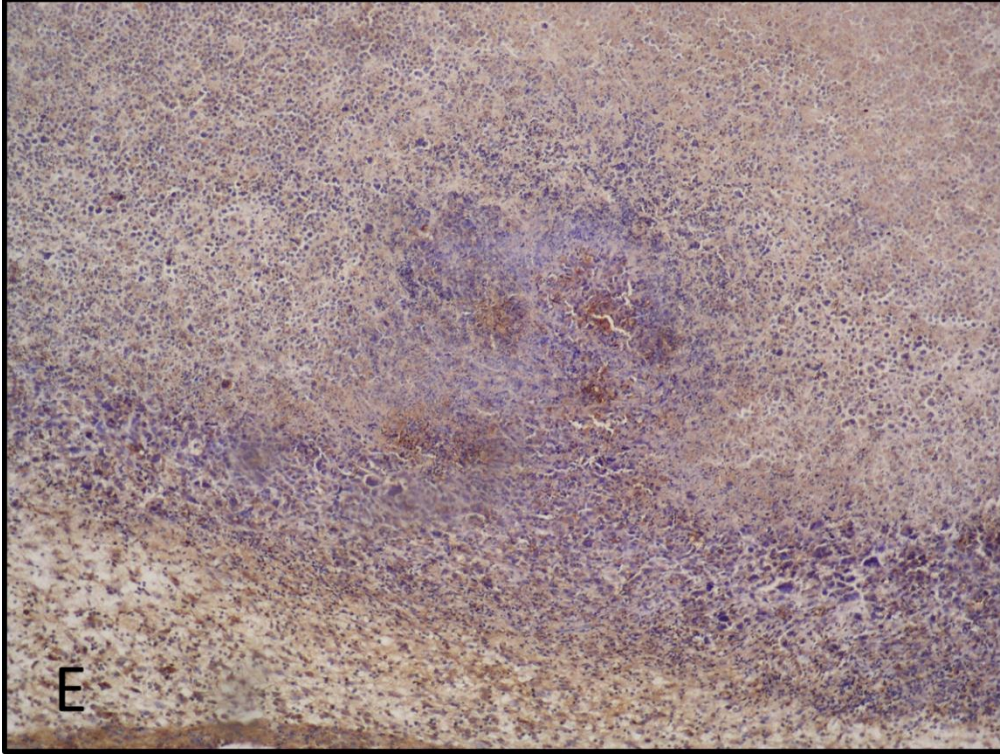
Şekil 3.22. Gossypol grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Apoptotik hücreler izlenmektedir. TUNEL immunohistokimya boyama; büyütme Ex20, Fx40.



Şekil 3.23. Kontrol grubu tümör dokusu histolojik kesiti. Oldukça yoğun ve yaygın VEGF ekspresyonu izlenmektedir. VEGF immunohistokimya boyama; büyütme Ax10, Bx20.



Şekil 3.24. Suramin grubu tümör dokusu histolojik kesiti. .Kontrol grubuna göre azalmış VEGF ekspresyonu görülmektedir. VEGF immunohistokimya boyama; büyütme Cx10, Dx20.



Şekil 3.25. Gossypol grubu tümör dokusu histolojik kesiti. VEGF ekspresyonu izlenmektedir. VEGF immunohistokimya boyama; büyütme Ex10, Fx20.

4. TARTIŞMA

Kanser, içerisinde bulunduğumuz modern çağın en ciddi hastalığı olup, gelişmiş toplumlarda kanserden kaynaklanan ölümler ilk sırada yer alırken gelişmekte olan ülkelerde ise giderek artmaktadır. Günümüzde kanser ile mücadelede çok ciddi çabalar ve yüksek miktarlarda bütçeler harcanmaktadır. Buna rağmen kanser, insan sağlığını tehdit eden ilk faktör olma özelliğini korumaktadır (Yenidoğan, 2010).

Anjiyogenez, sonuçta yeni bir kan damarı oluşumuna neden olan; bazal membran degradasyonu, endotel hücre çoğalması, hücre göçü ve tüp oluşumu gibi aşamaları içeren bir süreçtir (Ulus, 2006). Günümüzde tümör büyümesinin anjiyogeneze bağımlı olduğu ve tümörün büyümesinin damarlaştırma artışı gerektirdiği kabul edilmektedir. Anjiyogenez sürecinin gerçekleşmediği tümörler süresiz olarak uyku halinde kalırlar (Ulus, 2006). Kanser terapisi olarak anti-anjiyogenik tedavi; patolojik anjiyogenezin aşamalarının hedef alınmasıdır. Anjiyogenezi önleyici ajanları amacı tümör oluşumu sırasında yeniden doku oluşumu ve organizmanın tamamında iyileştirme gibi esaslı fonksiyonlarını tehlikeye düşürmeden yeni damar oluşumunu önlemektir (Bisacchi et al., 2003; Ulus, 2006).

Vasküler destek olmadan tümörler nekrotik veya apoptotik hale gelirler. Bu yüzden tümörün büyüebilmesi için tümörün anjiyogenik fenotipe dönüşmesi ve çevredeki damarları kendine yöneltmesi gerekir. Tümör anjiyogenezi temel olarak dört aşamalı bir süreçtir. İlk olarak dokudaki bazal membran lokal olarak zedelenir. Bu anda dokuda yıkım ve hipoksi vardır. İkinci olarak matriks metalloproteinazlar (MMP) aktive olur ve ekstrasellüler matriks yıkılır. Endotel hücreler anjiyogenik faktörlerle çoğalma ve göç için aktive olur. Üçüncü aşamada göç eden endotel hücreler lümen oluşumunu tetikler. En son olarak da yeni kapiller oluşur ve stabilizasyon gerçekleşir (Theocharis S. et al., 2015).

Tümör kan damarları geliştikleri ortamdan dolayı birçok anormaldirler. Arteriollerin kılcal damarlara bağlandığı klasik damar hiyerarşisi tümör damarlarında yoktur. Tümör damarlarında bulunan endotel hücreler sıkı bir duvar oluşturamazlar ve perisitler endotel hücrelere gevşek bağlanmışlardır. Anjiyogenez inhibitörleri ile tümör tedavisi yeni damar gelişmesini durdurabilir, bazı damarları geriletebilir ve diğerlerini normalleştirir. Tümör damarlarının normalizasyonu tümör hücrelerine ilaç dağılımını artırır. Perisitler ve endotel hücre gerilemesinden kurtulan bazal membran, tedavi durdurulduğunda yeni tümör damarlarının gelişmesi için bir tür yapı iskelesine dönüşebilir (Baluk et al., 2005).

Kanser tedavisinde denenen birçok anjiyogenez inhibitörü bulunmaktadır.

Bunlar:

- İnterferon: 1988'lerde pulmoner hemanjiyolu bir hastada başarıyla kullanılmıştır. İnterferon- α ile ilgili yapılan çalışmalar da ümit verici sonuçlar vermektedir (White et al., 1989; Folkman, 1989).
- Fumagilin Analogları: Fumagilin, *Aspergillus fumigatus fresenius*'dan elde edilmiş olan bir antibiyotik türevidir. *In vitro* olarak endotel hücre proliferasyonunu, *in vivo* olarak ise anjiyogenezini inhibe eder (Stepien ve ark., 1996).
- Sinyal transdüksiyon yolağıyla aktif olan ajanlar: Protein kinaz C, endotel büyümesinde etkin olduğu kadar tümör büyümesinde de çok önemli rol oynar. Bu yüzden bu yolağı inhibe eden ve transforme edici büyüme faktör- β 'yı (TGF- β) indükleyen bir ajan olan Briostatin, faz-1 çalışmalarda kullanılmaya başlamıştır. Kemik iliğini baskılamadığı ve TNF- α ve IL-6 düzeylerini arttırıcı etkisi olduğu görülmüştür (Harris et al., 1994).
- Metalloproteinaz inhibitörleri: Meme kanseri tedavisi ile ilgili yapılan araştırmalarda, hem *in vitro* hem *in vivo* yapılan çalışmalar, matriks metalloproteinazların önemli rolü olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, matriks metalloproteinazlarına karşı tedavide kullanılması düşünülmüştür (Sledge, 1996).
- Heparin-steroid konjüгатları: Folkman, yaptığı *in vivo* çalışmalarda protaminin anjiyogenez inhibitörü özelliğın taşıdığını ifade etmiştir. Sonraki çalışmalarında yine Folkman ve ark. heparinle kortizonun kombine kullanımının anjiyogenezini güçlü bir şekilde inhibe ettiğini, embriyogenez, enflamasyon, bazı immün reaksiyonlar ve solid tümörlerin büyümesini kapiller proliferasyonu inhibe etmek suretiyle önlediğini göstermiştir (Folkman et al., 1983). Sonraki yıllarda Wong ve ark. yaptıkları karşılaştırılmalı bir çalışmada AGM-1470 (fumagillin analogu), hidrokortizon 21-fosfat+heparin kompleksi veya heparin+ b-siklodekstrinin her üçünün de doza bağımlı olarak hücre büyümesinde inhibisyon oluşturduğunu tespit etmişlerdir (Wong et al., 1994).
- Östrojen metabolitleri: 2-metoksiöstradiolün yapılan *in vitro* bir çalışmada, solid tümörlerde neovaskularizasyonu inhibe edip tümör büyümesini engellediğini gösterilmiştir. Buna dayanarak bu steroid preparatın kanser tedavisinde ve diğer anjiyogenezle seyreden hastalıklarda yeri olabileceği belirtilmiştir (Fotsisve ark., 1994).

- Anjiyostatin: Etkin bir endojen anjiyogenez inhibitörü olan anjiyostatin aynı zamanda güçlü bir antitümöral ajandır (O'Reilly ve ark., 1994; O'Reilly ve ark., 1996) Anjiyostatin endotel proliferasyonunun spesifik bir inhibitörüdür. Tümör hücrelerinin büyümesi, epitel hücreleri, düz kas hücreleri veya fibroblast gibi neoplastik olmayan hücrelerin büyümesi üzerinde hiç bir etkisi yoktur. (Ataergin ve ark., 1999).
- Tecogalan (DS 4152): Arthrobacter isimli bir bakteri tarafından üretilen sülfatlanmış bir polisakkaridinin düşük molekül ağırlıklı bir fraksiyonundan izole edilmiştir (Tanaka ve ark., 1989). Endotel hücrelerin migrasyon ve proliferasyonunu inhibe edici etkisi vardır. Antitümör aktivitesi melanoma, histiositoma, Lewis akciğer karsinoması kobay anjiyosarkoması ve insan meme kanserinde belirlenmiştir (Tulpule et al., 1994).

Kanser tedavisinde yeni ufuklar vaat eden anjiyogenez inhibitörleriyle tedavide amaç, kapiller endotel hücrelerinin proliferasyonunu önlemek olarak görünmektedir. Endotel hücrelerine seçici etki gösteren anjiogenez inhibitörleriyle yapılan çalışmalarda, kemik iliğinde baskılanma, gastrointestinal sistemle ilgili şikayetler veya saç kaybına neden olma tarzında kemoterapötiklerle yapılan tedavilerde oldukça sık görülen yan etkilerin çok daha az görüldüğü tespit edilmiştir (Ataergin ve ark., 1999).

Diğer taraftan, antianjiyogenez tedavisinin optimal düzeyde faydalı olabilmesi için aylar hatta yıllar gerekebilmektedir. Çünkü hızla büyüyen kapiller yatağın küçültülmesi işlemi tümör hücrelerinin lizise uğratılması işleminden daha uzun bir süreç gerektirmektedir. Bu nedenle, antianjiyogen tedavi konvansiyonel sitotoksik tedavilerin aksine kesintisiz uzun süreli bir tedaviyi gerektirir. Sitotoksik tedavi ile elde edilen kısmi ya da tam yanıtlar, anjiyogenez inhibitörleriyle özellikle de tek başlarına kullanıldıklarında görülmeyebilir. Bu durumda tedavi için uzun süreye gerek olacaktır (Ataergin ve ark., 1999). Antianjiyogen ve sitotoksik tedavinin kombine kullanılmasının tek olmalarına göre daha etkin olduğu bulunmuştur (Ataergin ve ark., 1999).

Sonuç olarak anjiyogenik tedavi için şunlar söylenebilir:

- Damarlanması fazla olan tümörlerin anjiyogenez inhibitörleri ile tedaviden daha fazla fayda görebildiğine inanılmaktadır.
- Büyük çaplı tümörlerin (>2-3 cm) anti-anjiyogenlerle tedavi edilmesi yoluna gidilmemesi söylenmektedir.

- Antianjiyogenik tedavi ile benign tümörlerin değil sadece malign tümörlerin tedavi edilmesi tavsiye edilmekte olup tüm bu öneriler halen spekülatif düzeydedir (Ataergin ve ark., 1999).

Anjiyogenezi uyaran ve inhibe eden faktörler anjiyogenezisin değişik aşamalarında etkilidirler. Anjiyogenezisi uyaran faktörler içinde son yıllarda en çok üzerinde durulan ve araştırılan faktör VEGF'dir. Ayrıca anjiyogenezi uyaran faktörler içinde hem anjiyogenik etki gösteren hem de damar geçirgenliğini arttıran tek faktör VEGF'dür (Erol, 2007). VEGF'in etkisini gösterebilmesi için, endotel hücreleri ve lenf damarları üzerinde bulunan özgün transmembran tirozin kinaz reseptörlerine bağlanması gereklidir. Bağlanma sonucu aktifleşen VEGF reseptörleri hücre içerisinde sinyal iletisi sağlayan bir dizi proteini fosforilize eder. Bu olay da ikincil habercilerin oluşmasına katkıda bulunarak, endotel hücrelerin çoğalmasını ve göçünü sağlar (Erol, 2007).

VEGF anjiyogeneze;

- Nitrik oksit salınımını indükleyerek damar permeabilitesini artırır,
- Bazal membran ve matriks yıkımını artırır.
- Anjiyopietinler sayesinde endotel hücrelerin farklılaşmasında ve maturasyonunda rol oynar (Demirer ve ark., 2014).

VEGF, erken vasküler gelişimden tüp formasyonu oluşumuna kadar etkili bir maddedir. Bu aşamadan sonra damar stabilizasyonu için anjiyopietin (Ang) endotel ile ilişkiye girerek, periendothelyal hücreleri toplar ve damar stabilizasyonu sağlar (Demirer ve ark., 2014).

VEGF-A inhibisyonuna yönelik çeşitli farmakolojik ajanlar geliştirilmiştir. VEGF-A döngüsünün değişik basamaklarına etki ederek VEGF-A etkisi bloke edilebilir (Erol, 2007).

- Hücre dışı VEGF inhibisyonu
- Reseptör tirozin kinaz inhibitörleri
- VEGF-A yapımı inhibisyonu
- VEGFR-1 yapımı blokajı

Biz bu çalışmamızda test ajanımız olan Gossypol'un tümörün büyümesi ve metastaz yapması için gerekli bir olay olan anjiyogenezin temel adımları olan endotel hücre çoğalması, hücre göçü ve tüp oluşumunu durdurup durduramayacağını, dolayısıyla Gossypol'un anjiyogenez önleyici özelliklerini *in vitro* ve *in vivo* modeller kullanarak inceledik.

Gossypol pamuk bitkisinden elde edilmiş doğal olarak oluşan polifenolik bir bileşiktir (Lin et al., 2013). İlk olarak antifertilite ajanı olarak araştırılmıştır. Yakın zamanlarda gossypol'un *in vitro* ve *in vivo*da çeşitli malignant hücre tiplerinde antineoplastik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Oliver et al., 2005).

Yapılan bir çalışmada (-) gossypol'un PC-3 ve DU-145 hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı, apoptosize neden olduğu, *in vitro*da doz bağımlı olarak PC-3 ve DU-145 (İnsan prostat kanser hücreleri) ve HUVEC hücrelerinde VEGF, Bcl-2 ve Bcl-xL ekspresyonunu inhibe ettiği, farelerde insan prostat tümör PC-3 ksenogreft büyümesini baskıladığı, HUVEC ve HMEC (Human Microvascular Endothelial Cell) hücrelerinde VEGF'nin neden olduğu kemotaksik hareketliliği ve tüp oluşumunu inhibe ettiği, VEGF2 kinazı bloke ettiği, anahtar konumdaki hücre içi proanjyogenik kinazların aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu çalışma ile (-)-gossypol'un anjiyogenez aracılı tümör gelişimini VEGF sinyalini değiştirmek yoluyla inhibe ettiği gösterilmiştir (Pang et al., 2011).

Bu çalışmalar gossypol'un antikanser ilaç potansiyeli olduğunu göstermektedir. Gossypol'un bu etkisiyle ilgili mekanizmalar oksidatif fosforilasyonun kesilmesi, ATP üretiminin azalması, elektron taşıma zincirinde laktik dehidrogenaz X, süksinil-CoA sentetaz gibi enzimlerin aktivitesinin inhibisyonu, bunun yanı sıra adenilat siklaz, ATPaz gibi diğer enzimlerin inhibisyonudur (Şahin ve ark., 2010).

Gossypol ayrıca Bcl-2/Bcl-XL inhibitörü olduğu ve proapoptotik ve antiapoptotik proteinler arasındaki bağlantının çözülmesini inhibe ettiği, IκB bozulması yoluyla NF-κB aktivitesinin down-regülasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Şahin ve ark., 2010).

Gossypol'un apoptotik etkisi antiapoptotik Bcl-2 (B-cell lymphoma2) ailesinin ve mitokondrial kaspaz yollarının etkileşimlerinin inhibisyonu ile ilgilidir (Qian et al., 2014). Gossypol BH3 (Bcl-2 homology 3)'ü taklit eden bir ajandır ve antiapoptotik Bcl-xl (B-cell lymphoma-extra large) ve Bcl-2 (B-cell lymphoma2) proteinlerinin BH3 domainine bağlanırlar ve bunların etkilerini antagonize ederler (Qian et al, 2014).

Çalışmalarda gossypol'un bazı tümörlerde antiproliferatif ve antimetastatik etkisine sahip olduğu gösterilmiştir (Lin et al., 2013). Ayrıca gossypol tümör hücrelerinin kemoterapi ve radyoterapiye olan ilaç direnci hassasiyetini arttırabilir. Bazı klinik denemeler gossypol'un iyi tolere edildiği, ve bazı hastalarda kısmi yanıt verdiği görülmüştür. (Lin et al., 2013).

Çalışmamızın *in vitro* kısmı hücre canlılığı deneyi ve anjiyogenez sürecinin temel adımları olan hücre göçü ve tüp oluşumu deneylerinden oluşmaktadır.

Şahin ve ark. (2010), tarafından yapılan bir çalışmada gossypol'un HL-60 hücreleri üzerinde zaman ve doza bağımlı olarak sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir.

Gossypol'un birçok solid kanser hücre hattı ve hematolojik malign hücre hattında güçlü bir antiproliferatif etkiye sahiptir. Bu özellik klinik denemelerle de test edilmiştir (van Poznak C. et al., 2001). Bu çalışmalar gossypol'un iyi tolere edildiğini ve güvenli olduğu gösterilmiştir. Küçük bir raporda gossypol içeren sütun kronik lenfatik lösemi teşhisi almış hastalarda lenfosit sayısında bir azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (Politzer, 2008). Fakat bu raporda sadece hipotez yer almakta, bu olayın altında yatan mekanizma açıklanmamaktadır (Şahin ve ark., 2010).

Literatürde bir gossypol türevi olan Apogossypolone'nun (ApoG2) HUVEC hücreleri üzerine etkisi hücrelerin çoğalması ve apoptosine etkisi araştırılarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada MTT deneylerinde HUVEC hücrelerinin zamana ve doza bağımlı olarak apoptosiz oranını arttırarak hücre çoğalmasını ve tüp oluşumunu inhibe ettiğini gösterilmiştir. Sonuç olarak ApoG2'nin hücrelerin gelişimini inhibe ederek ve apoptosize neden olarak HUVEC hücreleri üzerinde anjiyojenezi inhibe ettiği gösterilmiştir (Zhan et al., 2013). Başka bir çalışmada da ApoG2'nun LNCaP hücrelerinin gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Zhang et al., 2014).

In vitro hücre canlılığı deneylerinde HUVEC hücreleri 24 saat, 48 saat, 72 saatlik sürelerle çeşitli konsantrasyonlardaki Gossypol dozları ile muamele edilmiş, hücrelerin doz artışına bağlı olarak hücre morfolojisinin bozulduğu, hücre canlılığı ve çoğalmasının azaldığı tespit edilmiştir.

Hücre çoğalımı deneylerinde negatif ve pozitif kontrol gruplarındaki hücrelerin flasklarda bulunan hücreler gibi kaldırım taşı görünümünde oldukları, test maddesi uygulanmış gruplarda hücrelerin test maddesi etkisiyle iğsi bir görünüm kazandığı, en büyük dozlar olan 20 µM, 30 µM, 40 µM'lık dozlarda ise hücrelerin morfolojilerinin tamamen bozulduğu görülmüştür.

MTT deneylerinde Gossypol'un tüm günlerde ve tüm dozlarda hücre sayısında bir azalmaya neden olduğu görülmüştür. Bu sonuç Gossypol'un hücre göçü, tüp formasyonu ve CAM deneyleri sonuçları da uyusmaktadır. 5 µM'lık ve daha büyük dozlarda ilk güne göre hücre sayısında daha fazla azalmaya neden olduğu görülmüştür.

Gossypol'un hücre göçü üzerindeki inhibitör etkisi HUVEC ve HMEC-1 hücreleri üzerinde gösterilmiştir. Sonuçlar (-) gossypol ile muamele edilmiş endotel hücrelerinde sadece VEGF ile indüklenmiş hücrelere göre hücre küçünün çarpıcı bir biçimde daha az gerçekleştiği görülmüştür. Bu sonuç VEGF-ile indüklenmiş endotel hücrelerinin göçü üzerinde (-) gossypol'un inhibitör etkisini göstermiştir (Pang et al., 2011).

Bir gossypol türevi olan ApoG2'nin hücre göçü üzerine olan inhibitör etkisini araştırmak üzere HUVEC hücreleri ApoG2 ile muamele edilmiş ve hücre göçünün inhibe olduğu görülmüştür (Zhan et al., 2013).

Ayrıca (-) gossypol'un A549 hücreleri üzerinde hücre göçünü inhibe ettiği yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (Ren et al, 2014).

Yara iyileşmesi, yara oluşumundan sonra başlayıp, bir süre sonra dokunun tekrar eski durumuna almasına kadar geçen süredeki tüm olaylar yara iyileşmesi kapsamında girmektedir. Bu sürecin temelini hücre büyümesi ve rejenerasyon oluşturmaktadır. Yaralı dokular oldukça kompleks bir yapıya sahip olmalarının yanı sıra iyileşme süreci de bir o kadar karmaşık prosesleri içermektedir (Kılınç, 2003). Anjiyogenik faktörler tarafından indüklenen vaskülarizasyon, hücre proliferasyonunda artış ve ekstraselüler matriks depozisyonu gibi biyolojik olay bu sürecin basamaklarını oluşturmaktadır. Yara iyileşme evleri, Hemostaz, İnflamatuvar, Proliferatif (Fibroblastik) ve Maturasyon Evresi (Remodeling) olmak üzere 4'e ayrılmaktadır (Diegelmann and Evans, 2004). Çalışmamızda *in vitro* yara iyileşme proseüdürü özellikle HET-CAM metodunu destekleyici olmasının yanısıra Gossypolün anti-kanser etkisinin aydınlatılmasına yardımcı analizlerden biridir.

Bizim çalışmamızda gossypol ile muamele edilmiş HUVEC hücrelerinde doza bağımlı olarak hücre göçünü inhibe ettiği gözlenmiştir. Negatif kontrol, çözücü ve 0,5 μM lık konsantrasyonda yara tamamen iyileşmiştir. 5 μM 'lık dozda hücre sayısında azalma ve yara iyileşmesinde azalma görülmektedir. 10 μM ve 20 μM 'lık dozlarda hücre sayısı ve yara iyileşmesi doz artışına bağlı olarak azalmış, 30 μM 'lık dozda ise hücrelerin tamamen öldüğü görülmüştür.

Endotel hücrelerde tüp oluşumu anjiyogenez sürecinde bir temeldir. Zhan ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada bir gossypol türevi olan ApoG2 ile muamele edilmiş HUVEC hücrelerinin doz artışına bağlı olarak tüp oluşumunda inhibisyon görülmüştür (Zhan et al., 2013)

Tüp oluşumu deneyinde gossypol ile muamele edilmiş HUVEC hücrelerinde doz arttıkça tüp oluşumunda inhibisyon gözlemlenmiştir. Negatif kontrol, çözücü, 0.5 μM , 2,5 μM , ve 5 μM 'lık dozda tüp oluşumunun gerçekleştiği, 10 μM 'lık dozda tüp oluşumunun kısmen bozulmaya başladığı görülmüştür. 20 μM 'lık dozdan itibaren hücrelerin tamamen öldüğü, tüp oluşumunun gerçekleşmediği görülmüştür.

In vivo deneyler ise döllenmiş yumurtalar üzerinde CAM (Chorioallantoic Membrane) deneyi ve Ehrlich tümör hücrelerinin hayvana verilerek solid tümör oluşturulmasını içeren Ehrlich tümör modelinden oluşmaktadır.

CAM modeli *in vivo* çalışmalarda anti-anjiyogenik etkisi araştırılmak istenen bileşikler değerlendirilmek için hızlı, basit, tekrarlanabilir bir deneydir

(Özçetin ve ark., 2013). Bu yöntem anjiyogenez araştırmalarında kullanılan bir modeldir ve koriyoallantoik membran ölçümünün anjiyogenik yanıt açısında basit, güvenilir, tekranabilir olması ve uygun maliyetli olması araştırmacılar için bu yöntemi cazip kılmaktadır (Özgürtaş, 2009).

Literatürde Gossypol'un CAM üzerinde etkisini gösterecek bir çalışma bulunmamaktadır.

6 günlük embriyolarda anti-anjiyojenik etki Gossypol verilmesinde 24 saat sonra değerlendirildi. Değerlendirme sonucu pozitif kontrol ve çözücü gruplarında CAM (Chorioallantoic membrane) normal gelişimine devam ederken 15mM, 30mM, 60mM, 120mM'lık dozlarda doz artışına bağlı olarak CAM üzerinde damar gelişiminde inhibisyon görülmüştür.

Transplante edilebilen tümör modelleri spontan oluşan tümörlerden elde edilen süspansiyonlardan türetilmektedir. Spontan tümörler genelde idiopattiktir (oluşumunda bir sebep gösterilemeyen). Geç dönemde ölçülebilir hale gelen bu tümörler insan kanser tiplerine kinatik özellik açısından benzerlik gösterirler. Ayrıca karsinogenezin biyolojisinin anlaşılmasında, kemopreventif ve kemosüpresif ilaçların geliştirilmesinde önemli rol oynayan modellerdir. Solid tümörler, subkutan, intradermal, intramuskuler, intraperitoneal veya intravenöz yolla hücre süspansiyonlarının inokülasyonu sonucunda transplante edilirler. Transplante edilen tümör hücreler kendilerine özgü histokompatibilite antijenlerine sahiptir. Bu antijenlere, Tümöre Spesifik Transplantasyon Antijenleri (Tumor Associated Transplantation Antigens, TATA) adı verilmektedir. TATA'ların yüksek immünite meydana getirme kapasiteleri vardır. Spontan veya transplante edilebilen tümörlerin çoğunluğunda TATA bulunmaktadır (Zeybek, 2012).

Kanser alanında uygulanan tedaviler önceki öğretiler dikkate alınarak sistemli ilaç uygulamaları ile günümüze kadar büyük gelişme kaydetmiştir. Bu çalışmalar kapsamında hangi metot kullanılırsa kullanılsın, mevcut tedavilere alternatif ya da destek olacak yeni formülasyonların keşfi ve ilaç geliştirme araştırmalarında hayvan modellerinden yararlanmak zorunluluk göstermektedir. Özellikle son yıllarda ön plana çıkan hücre kültürü veya moleküler biyoloji tekniklerine rağmen, uygulanan ajanlara karşı metabolizma cevabında yaşanan eksiklikler, hayvan modellerinin kullanılmasını zorunlu hale getirmektedir. Çeşitli kimyasal ajanları, deney hayvanlarına değişik yollarla vererek birbirinden farklı özellikte tümör modelleri oluşturulabilmektedir. Ancak hazırlanış şekilleri, uygulama yolları, uygulama sonrası karsinojenin etki mekanizması iyi belirlenerek en verimli çalışma modeli ortaya konmalıdır (Kumar et al., 2009)

Transplante edilebilen tümör modelleri spontan oluşan tümörlerden elde edilen süspansiyonlardan türetilmektedir. Spontan tümörler genelde idiopattiktir (oluşumunda bir sebep gösterilemeyen). Geç dönemde ölçülebilir hale gelen bu tümörler insan kanser tiplerine kinatik özellik açısından benzerlik gösterirler Solid

tümörler, subkutan, intradermal, intramuskuler, intraperitoneal veya intravenöz yolla hücre süspansiyonlarının inokülasyonu sonucunda transplante edilirler. Transplante edilen tümör hücreler kendilerine özgü histokompatibilite antijenlerine sahiptir. Bu antijenlere, Tümöre Spesifik Transplantasyon Antijenleri (Tumor Associated Transplantation Antigens, TATA) adı verilmektedir. TATA'ların yüksek immünite meydana getirme kapasiteleri vardır. Spontan veya transplante edilebilen tümörlerin çoğunluğunda TATA bulunmaktadır (Zeybek, 2012).

Deneysel kanser araştırmalarında Ehrlich ascites tümör (EAT) hücrelerinin tercih edilme nedeni transplante edilme oranının çok yüksek olması ve regresyon göstermemesidir. EAT hücrelerinin kökeni farelerin spontan başlayan meme adenokarsinomundan gelmektedir. Bu tümörün farelerin peritonunda sıvı halde büyüyen formunu elde edilmiştir. Sıvı EAT bazı ilaçların özellikle de kemoterapide kullanılan ilaçların tümörler üzerindeki etkilerinin araştırılmasında sıklıkla kullanılan bir tümör olmuştur.(Yenidoğan, 2010).

(-)-Gossypol'un insan prostat tümörü ksenogreft fare modelinde tümör gelişimi ve anjiyogenezi engellediği gösterilmiştir (Zeybek, 2012). Ayrıca ApoG2'un tümör hacmini önemli derecede azalttığı gösterilmiştir (Zhang et al., 2014).

Zhang ve ark., (2010) tarafından yapılan bir çalışmada PC3 ksenogreft tümör modelinde gossypol uygulanmasının ardından tümör hacimlerinde azalma gözlenmiştir. Zhang ve ark., (2010), transplante tümör bulunduran ve (-) gossypol uygulanmış farelerde yaptıkları histopatolojik görünüm değerlendirmelerinde kontrol gruplarında nekrotik alanlar yokken gossypol uygulanmış gruplarda nekrotik alanlar belirlenmiştir.

Molla ve ark. (1987) tarafından yapılan bir çalışmada 5-hydroxytryptamine'nin lonidamine veya gossypol ve hipertermi ile kombinasyonunun CD-1 fareleri ile *in vivo* Ehrlich tümör modeli üzerinde etkisi araştırılmıştır. Bu bileşikler yalnız başlarına kullanıldıklarında hafif derecede antitümör etki gösterirler. Fakat hipertermi ile kombine edildiğinde sitotoksit etkilerinin arttığı belirtilmiştir. 5-hydroxytryptamine'nin özellikle lonidamine ile kombine edildiğinde antitümör etkisinin daha da arttığı rapor edilmiştir.

Floridi ve ark., (1984) tarafında yapılan bir çalışmada ise gossypol ve Lonidamine'nin Ehrlich ascites tümör modeli üzerinde mitokondrideki elektron transfer sistemi etkisi araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda:

- Düşük dozlarda gossypol solunum zincirinin üçüncü. basamağında oksijen tükeminin arttığı, yüksek dozlarda ise solunum zincirinin birinci ve ikinci seviyesinde oksijen tüketiminin inhibe olduğu, üçüncü seviyenin etkilenmediği,

- Gossypol'un ATPAaz aktvitesini uyardığı
- Gossypol'un oksijen tüketiminde Lonidamine'nin etkisini arttırdığı görülmüştür.

Sonuçta gossypol'un Lonidamine'nin etkisini arttırdığı, dahası Lonidamine'nin diğer ilaçlarla kombinasyonun veya hipertermi gibi uygulamaların antitümör etkisini arttırdığı belirtilmiştir.

Literatürde gossypol'un solid tümörlerde anti-anjiyogenik etkisinin Ehrlich tümör modeli ile araştırılması yapılmamıştır.

Tümör kontrol grubundaki tüm deney hayvanlarında % 100 tümör oluşumu gözlenirken, pozitif kontrol grubundaki (suramin uygulaması gerçekleştirilmiş) 7 deney hayvanından 3 tanesinde tümör oluşumu tespit edilmemiştir ve % 57.1 oranında tümör oluşumu gözlenmiştir. Pre-implantasyon ve post-implantasyon gruplarında ise Gossypol uygulamasına bağlı olarak inhibisyon tespit edilmiştir (Çizelge 3.1). Pre-gossypol uygulanan grupta hiç tümör oluşmazken, post gossypol uygulanan grupta tümör oluşum %' si 28.57 olarak belirlenmiştir.

Uygulama sürecini kapsayan 14 gün boyunca fareler düzenli olarak tartılmışlardır. Farelerin vücut ağırlıklarının başlangıç ve bitiş değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığında negatif kontrol grubuna göre pre gossypol ve post gossypol uygulanan grupta önemli derecede vücut ağırlığında azalma tespit edilmiştir. Ancak tümör kontrol ve suramin gruplarında çalışma sonlandığında istatistiksel açıdan $p < 0,05$ seviyesinde önemli bir artış tespit edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada diyetlerine farklı miktarlarda gossypol eklenmiş ördeklerin gossypol'e verecekleri cevap araştırılmıştır. Bu ördeklerin kan parametrelerindeki değişiklikler şu şekilde raporlanmıştır: 35 günlük ördeklerde diyetdeki gossypol miktarı arttıkça HGB, MCH ve MCHC seviyelerinin doğrusal bir şekilde azaldığı görülmüştür. Kontrol grubundaki ördekler ile 35 günlük ördekler ile kıyaslandığında kan HGB konsantrasyonunda %5'lik bir azalma tespit edilmiştir. 28 günlük ördeklerde diyetdeki gossypol artışına bağlı olarak serum ALT miktarında doğrusal bir artma, AST/ALT oranında doğrusal bir azalma tespit edilmiştir. 35 günlük ördeklerde serum TP, ALB, and GLB değerleri diyetdeki gossypol artışına bağlı olarak doğrusal olarak azaldığı izlenmiştir.

Tüm deney gruplarında deney başlangıcı ve deney sonunda hematolojik ve biyokimyasal parametreleri ölçülerek karşılaştırmıştır.

Deney başlangıcında deney gruplarında bulunan farelerin hematolojik parametreleri arasında bir farklılık tespit edilmiştir. Deney sonunda ise negatif kontrol grubu ile yapılan karşılaştırma sonucu tümör kontrol gruplarındaki değerlerde herhangi bir farklılık gözlenmezken, pregossypol uygulanan grupta

WBC, LYM, NEU, HTC değerlerinde azalma, PLT değerinde ise artış saptanmıştır. Post gossypol uygulama grubunda ise NEU değerinde farklılık tespit edilmiştir.

Deney başlangıcında deneme gruplarında bulunan farelerin deneme başlangıcında ölçülen biyokimya parametreleri incelendiğinde gruplar arasında herhangi farklılık tespit edilmemiştir. Deneme sonucunda ölçülen biyokimya parametreleri incelendiğinde negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında pregossypol uygulanan grupta ALP ve ALT değerlerinde azalma, GLOB değerlerinde artma saptanmıştır. Ayrıca negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diğer tüm uygulama gruplarında ALT değerinde azalma tespit edilmiştir.

Bir çalışmada tümörde histopatolojik değişiklikler hemotoksilen-eozin boyama ile gösterilmiştir. Kontrol gruplarında nekrotik alanlar görülmezken bir gossypol türevi olan ApoG2 ile muamele edilmiş alanlarda nekrotik alanlar tespit edilmiştir (Zhang et al., 2014).

Tümör dokusu kesitleri Hematoksilen-Eosin ile boyanmış, rutin histolojik parametreler açısından değerlendirilmiştir. Deney grupları genel histolojik görünüm tümör dokusu yaygınlığı ve yoğunluğu, inflamasyon ve damar yoğunlukları açısından karşılaştırılarak incelenmiştir. Kontrol grubu tümör dokusu histolojik kesitlerinde oldukça yoğun (kompakt) ve yaygın tümör dokusu gözlemlenmiştir. Ayrıca yoğun inflamasyon ve bol miktarda ve hemorajik damarlar izlenmektedir. Gossypol grubu tümör dokusu histolojik kesitleri incelendiğinde ise kontrol grubuna göre daha az yoğun ve daha az yaygın tümöral dokuya izlenmiştir.

Zhang ve ark., (2010), farklı deney gruplarında apoptosiz seviyesini değerlendirmek için yaptıkları TUNEL boyama sonuçlarından TUNEL pozitif nükleuslar gözlemlenmişlerdir.

Çalışmamızda immünohistokimyasal değerlendirmelerde kullanılan TUNEL boyama sonuçlarına göre kontrol grubundan alınan tümör dokusu incelemelerinde az sayıda apoptotik hücelere rastlanırken Gossypol uygulanmış tümörden alınan hücrelerin kontrol grubuna göre daha fazla apoptotik hücre gözlemlenmiştir.

VEGF, endotel hücre çoğalması, göç, anjiyogenez ve vasküler permeabilitesini uyaran majör bir büyüme faktörüdür. Pang ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada İnsan prostat kanser ksenogreftinde (-) gossypol'un VEGF ekspresyonunun down-regülasyonuna neden olup olmayacağı araştırılmış, doz artışına bağlı olarak VEGF inhibisyonu görülmüştür.

VEGF immünokimyasal değerlendirmeler hem grup içinde hem de gruplar arası karşılaştırmalar şeklinde yapılmıştır. Kontrol grubunda VEGF ekspresyonunun oldukça yoğun ve yaygın olduğu görülmüştür. Gossypol kontrol grubunda VEGF ekspresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda pozitif kontrol aracı olarak anti-anjiyogenik etkisi daha önceden belirlenmiş suramin kullanılmıştır. Suramin'in *in vitro* çalışmalarda endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonunu ayrıca birçok *in vivo* çalışmalarda büyüme faktörü ve tümör anjiyogenezini inhibe ettiği bildirilmiştir (HoSang, 1985; Waltenberger et al., 1996; Friis et al., 2013). Suramin, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), plasental büyüme faktörü (PIGF) ve fibroblast büyüme faktörünü (FGF) inhibe ederek etki göstermektedir (Bocci, et al., 1999; Güler, 2011).

Suramin ile yaptığımız deneylerde *in vitro* çalışmalarda suramin'in hücre canlılığını doza bağımlı olarak azalttığı, hücre göçünün ve tüp olumunun doza bağımlı olarak inhibe edildiği görülmüştür.

In vivo deneylerinde ise CAM deneyinde doz arttıkça CAM üzerindeki kılcal damar oluşumunun inhibe olduğu görülmüştür.

Ehrlich tümör deneylerinde ise biyokimyasal ve hematolojik parametreler izlenmiş ve tedavi sonrasında bazı parametrelerde değişiklikler izlenmiştir.

Histokimyasal değerlendirmelerde ise kontrol grubunda yoğun bir tümör dokusu ve hemorajik damarlar izlenirken suramin ile muamele edilmiş tümör grubunda kontrol grubuna ve gossypol ile muamele edilmiş tümör grubuna göre daha az yoğun tümör dokusu izlenmiştir.

VEGF immünokimyasal değerlendirme çalışmalarında ise kontrol grubunda VEGF ekspresyonu yoğun olarak izlenmiştir. Suramin uygulanmış tümör grubunda VEGF ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalırken Gossypol grubuna göre daha fazla VEGF ekspresyonu izlenmiştir.

5. SONUÇ

Gossypol'un anti-anjiyogenik etkisini *in vitro* ve *in vivo* yöntemler ile araştırmak üzere planladığımız bu çalışmada şu sonuçlar elde edilmiştir:

- Sitotoksisite deneylerinde Gossypol'un HUVEC hücreleri üzerinde yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmüştür.
- Anti-anjiyogenik etkiyi ortaya koymak için anjiyogenezin temel adımlarından hücre göçü ve tüp formasyonu deneyleri gerçekleştirilmiş ve gossypol'un doza bağımlı olarak hücre göçünü engelleyip yüksek dozlarda hücre ölümüne neden olduğu, tüp formasyonun da aynı şekilde doza bağımlı olarak inhibe edildiği görülmüştür.
- *In vitro* deneylerden elde edilen sonuçları doğrulamak üzere CAM (Chorioallatoic membrane) ve Ehrlich tümör modeli deneyleri gerçekleştirilmiştir.
- HET-CAM deneylerinde anti-anjiyogenik etkiyi göstermek için gossypol farklı dozlarda uygulanmış ve 24 saat sonra anti-anjiyogenik etki değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler sonucu doz arttıkça CAM üzerindeki damarlanmanın azalmasında azalma görülmüştür. Yapılan istatistiklerle de gossypol'un anti-anjiyogenik etkisi ortaya konmuştur.
- Hayvan deneylerinde Ehrlich tümör hücreleri enjekte edilmiş ve tümör oluşturulmuş hayvanlar üzerinde gossypol'un anti-anjiyogenik etkisini ortaya koymak üzere kontrol ve deney grupları oluşturulmuştur. Deney gruplarında gossypol uygulandıktan sonra tümör hücreleri enjekte edilmiş hayvanlarda tümör oluşumu görülmemiş, tümör oluşturulmuş hayvanlarda ise gossypol uygulamasından sonra tümör hacminde küçülmeler tespit edilmiştir. Ayrıca histolojik ve immünokimyasal değerlendirmeler yapılmış ve anti-anjiyogenik etkiyi doğrulayan sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca hem deney başında hem de deney sonunda biyokimyasal ve hematolojik çalışmalar yapılarak anti-kanser ilaç adayı olabileceğini düşündüğümüz gossypol'un etkileri hakkında bilgiler ortaya konmuştur.

Çalışmamızda anti-anjiyogenik etkisi önceki çalışmalarla ortaya konmuş suramin kullanılmış ve gossypol sonuçları suramin sonuçları ile paralellik gösterdiği için ve tüm veriler göz önüne alındığında gossypol'un anti-anjiyogenik etkisi ortaya konmuştur. Fakat gossypol'un kanser tedavisinde bir alternatif olan anti-anjiyogenik ilaç hammaddesi olup olamayacağını tam olarak ortaya koymak için farklı dozlarda, değişik sürelerde, farklı hücre tiplerinde ve farklı *in vivo* çalışmalarda denenebilecek, araştırmaya uygun bir konu olduğunu düşünüyoruz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdin A.A., Soliman N.A., Saied E.M.**, 2014, Effect of propranolol on IL-10, visfatin, Hsp70, iNOS, TLR2, and survivin in amelioration of tumor progression and survival in Solid Ehrlich Carcinoma-bearing mice., *Pharmacol Rep.*;66(6), 1114-21.
- Akbulut, H., Akbulut K.G.**, 2005, *Tıbbi Onkoloji Kitabı*,. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antıp Yayınları, 23s.
- Aktaş, S.H.**, 2010, Kemoterapinin kolon kanseri, meme kanseri ve mide kanserinde VEGF düzeylerine etkisinin *in vivo* ve *in vitro* incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, 56 s.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff M., Roberts, K. and Watson, J.D.**, (1989), *Molecular Biology of The Cell, 2nd Edition*, 17, 962-966pp
- Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.C., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H. and Boyle, M.R.**, (1988), Feasibility of drug screening with panels of human tumour cell lines using a microculture tetrazolium assay, *Cancer Res.*, 48, 589-601pp.
- Altunkaynak B.Z., Elvan Özbek E.**, 2008, Programlanmış hücre ölümü;Apoptoz nedir? Tıp araştırmaları dergisi, 6(2), 93-104s.
- Anadolu Üniversitesi,** 'Neoplazi',
<http://www.anadolu.edu.tr/aos/kitap/EHSM/1215/unite06.pdf> (Erişim tarihi:15 Temmuz 2014)
- Apostolova, M.D., Bontchev, P.R., Ivonova, B.B., Russel, W.R., Mehandjiev, D.R., Beattie, J.H. and Nachev, C.K.**, (2003), Copper-homocysteine complexes and potential physiological actions, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **95**, 321-333.
- Arjamaa O. and Nikinmaa M.**, 2006 Oxygen-dependent diseases in the retina: role of hypoxia-inducible factors. *Exp Eye Res.*, 83, 473-483pp.
- Ataergin A.S., Özet A., Arpacı F.**, 1999, Kanser Tedavisinde Anjiyogenez inhibitörlerinin yeri, *T Klin Tıp Bilimleri*, 100-105pp.
- Aydın R.**, 2009, Tümör Anjiyogenezi, *İstanbul üniversitesi Cerrahpaşa öğrenci bilimsel dergisi, Güz Sayısı*, 11(1).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Aydın R.**, 2009, Tümör Anjiyogenezi, *İstanbul üniversitesi Cerrahpaşa öğrenci bilimsel dergisi, Güz Sayısı*, 11(1).
- Baluk, P., Hashizume, H. and McDonals, D.M.**, (2005), Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer, *Current Opinion in Genetics & Development*, 15, 1-10p.
- Beloussow K., Wang L., Wu J., David A. and Shen W.C.**, 2002, Recombinat arginine deiminase as a potential anti-angiogenic agent, *Cancer Letters*, 183(2), 155-162pp.
- Benedetta Donati M.B. and Gozdzikiewicz J.**, 2008, Angiogenesis and the progress of vascular and tumor biology: A tribute to Judah Folkman, *Thromb Haemost*, (99), 647–650pp.
- Bergers G., Hanahan D.**, 2008, Modes of resistance to anti-angiogenic therapy, *Nat Rev Cancer*, 8, 592–603pp.
- Bergers G., Song S., Meyer-Morse N., Bergsland E., Hanahan D.**, 2003, Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors, *Journal of Clinical Investigation*, 111(9), 1287–1295pp.
- Beşikçi Ödemiş Z., Kaya Temiz T., Balcı E., Parlak M. ve Altun A.**, 2012, Simvastatin ve mevastatin'in anjiyenez inhibisyonu üzerine etkilerinin koryoallantoik membran modelinde araştırılması, *Cumhuriyet Tıp Dergisi*, 34, 164-172s.
- Bèzivin, C., Tomasi, S., Lohèzic-Le Dèvèhat, F. and Boustie, J.**, (2003), Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer lines, *Phytomedicine*, 10, 499-503pp.
- Bhanot A., Sharma R., Noolvi M.N.**, 2011, “Natural sources as potential anti-cancer agents: a review”, *International Journal of Phytomedicine*, 3(1). 9–26pp.
- Bhisitkul R.B.**, 2006, Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments, *Br J Ophthalmol*, 90, 1542–1547pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bian W., Chen F., Bai L., Zhang P. and Qin W.**, 2008, Dihydrotanshinone I inhibits angiogenesis both in vitro and in vivo, *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 40(1), 1-6 pp.
- Bikfalvi, A., Sauzeau, C., Moukadir, H., Maclouf, J., Buso, N., Bryckaert, M., Plouet, J., and Tobelem, G.**, 1991, Interaction of vasculotropin/vascular endothelial cell growth factor with human umbilical vein endothelial cells: binding, internalization, degradation, and biological effects, *J. Cell. Physiol.*, 149, 50-59pp.
- Bisacchi, D., Benelli, R., Vanzetto, C., Ferrara, N., Tosetti, F. and Albin, A.**, (2003), Anti-angiogenesis and angioprevention: mechanisms, problems and perspectives , *Cancer Detection and Prevention* 27, 229–238pp.
- Blaauwgeers H.G., Holtkamp G.M., Rutten H, Witmer A.N., Koolwijk P., Partanen T.A., Alitalo K., Kroon M.E., Kijlstra A., van Hinsbergh V.W. and Schlingemann R.O.**, 1999, Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation, *Am J Pathol.*, 155:421-428pp.
- Blacher S., Devy L., Hlushchuk R., Larger E., Lamandé N., Burri P, Corvol P., Djonov V., Foidart J.M. and Noël A.**, 2005, Quantification of Angiogenesis In the Chicken Chorioallantoic membrane (CAM), *Image Anal Stereol*, 24, 169-180pp.
- Blagosklonny M.V.**, (2004), Antiangiogenic therapy and tumor progression, *Cancer Cell*, 5(1), 13–17 pp.
- Bocci G., Danesi R., Benelli U., Innocenti F., Di Paolo A., Fogli S. and Del Tacca M.**, 1999, Inhibitory effect of suramin in rat models of angiogenesis in vitro and in vivo., *Cancer Chemother Pharmacol*, 43(3), 205-212pp.
- Bojonozi K., Lelieure S., Markovits J., Couprie J., Jacquemin-Sabion A. and Larsen AK.**, 1992, Suramin is an inhibitor of DNA topoisomerase II in vitro and in chinese Lamster fibrosarcoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 3025-3029pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bottaro D.P. and Liotta L.A.**, 2003, Cancer: Out of air is not out of action. *Nature*, 423, 593-595pp.
- Brunicardi, C.F.**, 2005, Schwartz's Principles Of Surgery, 8th Edition, McGraw-Hill Medical Publishing: New York, 1950p.
- Bussolino, F., Mantovani, A. and Perciso G.**, (1997), Molecular mechanisms of blood vessel formation, *Trends Biochem. Sci.*, 22, 251p.
- Bürgermeister J., Paper D.H., Vogl H., Linhardt R.J. and Franz G.**, 2002, LaPSvS1, a (1-->3)- beta-galactan sulfate and its effect on angiogenesis in vivo and in vitro, *Carbohydr Res*; 337,1459-1466pp.
- Byrne A.M., Bouchier-Hayes D.J. and Harmey J.H.**, 2005, Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med.*, 9,777-794p.
- Cao J.G., Peng S.P., Sun L, Li H., Wang L. and Deng HW.**, 2006, Vascular basement membrane-derived multifunctional peptide, a novel inhibitor of angiogenesis and tumor growth, *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 38(7),514-21pp.
- Cao, Y.**, (2004), Antiangiogenic cancer therapy, *Seminars in Cancer Biology*, 14,139-145pp.
- Carmeliet P., Jain R.K.**, 2000, Angiogenesis in cancer and other diseases., *Nature*, 14;407(6801), 249-257pp.
- Celec, P., Gardlik, R., Roland, P., Hodosy, J., Stuchlik, S., Drahovska, H., Stuchlikova, M., Minarik, G., Lukacs, J., Jurkovicova I., Hulin I., Turna J., Jakubovsky J., Kopani M., Danisovic L., Jandzk, D., Kudela, M. and Yonemitsu, Y.**, 2005, The use of transformed Escherichia coli for experimental angiogenesis induced by regulated in situ production of vascular endothelial growth factor--an alternative gene therapy, *Medical Hypotheses*, 64, 505-511pp.
- Chengyuan Q., Mengxia L., Jiangdong S., Tao R., Zheng L., Liang Z., Liwei Z., Yi C. and Dong W.**, 2014, Identification of a novel potential antitumor activity of gossypol as an APE1/Ref-1 inhibitor, *Drug Design, Development and Therapy*, 8, 485–496pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chia J.S., Du J.L., Hsu W.B., Andy Sun A., Chiang C.P. and Wang W.B.,** 2010, Inhibition of metastasis, angiogenesis, and tumor growth by Chinese herbal cocktail Tien-HsienLiquid, *BMC Cancer* 10,175p.
- Chia Y.C., Rajbanshi R., Calhoun C. and Chiu R.H.,** 2010, Anti-neoplastic effects of gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extract, on oral squamous carcinoma cells., *Molecules.*, 16;15(11), 8377-8389pp.
- Cofey, R. J., Jr., Leof, E. B., Shipley, G. D., and Moses, H. L.,** 1987, Suramin inhibition of growth factor receptor binding and mitogenicity in AKR-2B cells, *J. Cel. Physiol.*, 132, 143-148pp.
- Cooper, G.M.,** 1997, *The Cell A Molecular Approach*, Oxford University Press, 51, 592, 593, 607pp.
- Coutinho E.M.,** (2002). Gossypol: A contraceptive for men. *Contracept*, 65, 259–263pp.
- Cross T.G., Scheel-Toellner D., Heriquez N.V., Deacon E., Salmon M. and Lord J.M.,** 2000, Serine/Threonine protein kinases and apoptosis. *Exp Cell Res*, 256,34-41pp.
- Czernin S., Gassi A., Wilfing A., Holter W., Trieb K., Waldhausl W., Vierhapper H., Forster O. and Grubeck-Loebenstein B.,** 1993, Suramin affects human peripheral blood mononuclear cells in vitro: inhibition of Tcell growth and modulation of cytokine secretion, *Int Arch Allergy Immol*, 101, 240-246pp.
- Dameron K.M., Volpert O.V., Tainsky M.A., Bouck N.,** 1994, Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1, *Science*, 1265, 1582-1584pp.
- Dao V.T., Gaspard C., Mayer M., Werner G.H., Nguyen S.N., Michelot R.J.,** 2000, Synthesis and cytotoxicity of gossypol related compounds, *Eur J Med Chem*, 35, 805-813pp.
- De Falco S.,** 2014, Antiangiogenesis therapy: an update after the first decade, *Korean J Intern Med* ;29, 1-11pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- de Vos, F.Y.F.L., Willemse, P.H.D., de Vries, E.G.E. and Gietema, J.A.**, 2004, Endothelial cell effects of cytotoxics: balance between desired and unwanted effects, *Cancer Treatment Reviews*, 495-513pp.
- Dellabona, P., Moro, M., Crosti, M.C., Casorati, G. and Corti, A .**, 1999, Vascular attack and immunotherapy: a 'two hits' approach to improve biological treatment of cancer, *Gene Therapy*, 6, 153-154pp.
- Demirer E., Ayten Ö. ve Taş D.**, 2014, Anjiyogenez ve Anti-Anjiyogenik Tedaviler, *J Clin Anal Med*, 5(1), 75-79s.
- Deng S., Yuan H., Jine Yi J., Lu Y., Wei Q., Guo C., Jing Wu J., Liyun Yuan L., Zuping He Z.**, 2013, Gossypol acetic acid induces apoptosis in RAW264.7 cells via a caspase-dependent mitochondrial signaling pathway , *J. Vet. Sci.*, 14(3), 281-289pp.
- Deng ZT, Feng T, Wang P, Qi X, Chen XH, Li YX, Song CL, Geng MY, Li J**, 2011, Effects of the novel vascular targeting agent MDS-11P on tumor vascularity and its antitumor activity, *Biochemical Pharmacology*, 82(12), 1832–1842pp.
- Diegelmann, R.F. and Evans, M.C.**, 2004, Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing, *Frontiers in Bioscience*, (9), 283-289 pp.
- Dimmeler, S. and Zeiher, A.M.**, 2000, Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression, *Circulation Res.*, 87(6), 434-439pp.
- Dodou K; Anderson R.J., Lough W.J., Small D.A., Shelley M.D., Groundwater P.W.**, 2005, Synthesis of gossypol atropisomers and derivatives and evaluation of their antiproliferative and antioxidant activity, *Expert Opin Investig Drugs*, 13,4228–3742pp.
- Donati, M.B. and Gozdzikiewicz, J.**, 2008, Angiogenesis and the progress of vascular and tumor biology: A tribute to Judah Folkman. *Thromb Haemost*, 99, 647-650pp.
- Dvorak H.F.**, 2002, Vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy, *J Clin Oncol*, 20,4368-4380pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ebos J.M. and Kerbel R.S.**, 2011, Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis, *Nat Rev Clin Oncol.*, 1,8(4), 210-221pp.
- Ebos J.M., Lee C.R., Cruz-Munoz W., Bjarnason G.A., Christensen J.G., Kerbel R.S.**, 2009, Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis, *Cancer Cell*, 15, 232–239pp.
- Eddine S.N. and Agne`s N.**, 2013, Targeting the Tumor Microenvironment for Cancer Therapy, *Clinical Chemistry*, 59(1), 85–93pp.
- Ergüven M.**, 2004, Suramin'in C6 gliomada telomeraz aktivitesi üzerine etkisi, Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 65s.
- Erol N.**, 2007, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü ve Anti-VEGF Ajanlar, *Ret-Vit*;15, 35-40s.
- Eröz R. , Karataş A., Alkoç O.A., Baltacı D., Oktay M. ve Çolakoğlu Serdar**, 2012, Apoptozis Hakkında Bilinenler (Literatür Taraması), *Düzce Tıp Dergisi*, 14(2), 87-101s.
- Eröz R., Akbulut M., Yılmaz S., Ayvaz A. and Sadykhov S.**, 2010, Age dependent DNase activity in larvae, pupae and adult stages of Mediterranean Flour Moth *Ephesia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), *Turkish Journal of Entomology*, 34 (1), 3-13s.
- Eun, J.P. and Koh G.Y.**, 2004, Suppression of angiogenesis by plant alkaloid, sanguinarine, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 30/317(2), 618-624pp.
- Evisa, G.**, 2005, Tumor Angiogenesis A Review on Established and Innovative Concepts in Anti-angiogenic Therapy, *MSc.Drug Innovation Faculty of Pharmaceutical Sciences University of Utrecht, M.Sc. Dissertation*.
- Fent, K.** (2001). Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: Assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicol. in Vitro* 15, 477-488pp.
- Ferrara N.**, 2004a, Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress, *Endocr Rev*, 25,581-611pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ferrara N.**, 2004b, Vascular Endothelial Growth Factor as a Target for *Anticancer Therapy*, 9(1), 2-10pp.
- Ferrara N., Kerbel R.S.**, 2005, Angiogenesis as a therapeutic target, *Nature*, 438, 967–974pp.
- Fidler, I.J., Kerbel, R.S. and Ellis, L.M.**, (2001), *Cancer; Principles&Practice of Oncology*, 137-140pp.
- Flack M.R., Pyle R.G., Mullen N.M., Lorenzo B., Wu Y.W., Knazek R.A., Nisula B.C., Reidenberg M.M.**, 1993, Oral gossypol in the treatment of metastatic adrenal cancer, *J Clin Endocrinol Metab*, 76, 1019–1024pp.
- Floridi A., D'Atri S., Bellocchi M., Marcante M.L., Paggi M.G., Silvestrini B., Caputo A., De Martino C.**, 1984, The effect of gossypol and Lonidamine on electron transport in Ehrlich ascites tumor mitochondria., *Exp Mol Pathol*, 40(2), 246-261pp.
- Folkman J.**, 1995, Tumor angiogenesis. In: Mendelsohn J, Howley P, Israel A, Liotta LA, *The molecular basis of cancer*. W.B. Saunders Company; Philadelphia, 206-224pp.
- Folkman J.**, 1989, Successful treatment of an angiogenic disease, *New Engl J Med*, 320, 1211p.
- Folkman J.**, 2007, Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?, *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(4), 273–286pp.
- Folkman J., Langer R., Linhardt R.J., Hamdenschild C., Taylor S.**, 1983, Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin in the presence of cortisone, *Science*, 221, 719-725pp.
- Folkman J.**, 1971, Tumor angiogenesis, therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285, 1182–1186pp.
- Folkman J.**, 1990, How the field of controlled-release technology began, and its central role in the development of angiogenesis research., *Biomaterials*.11(9), 615-618pp.
- Folkman, J.**, 2000, Incipient Angiogenesis, *Journal of the National Cancer Institute*, 92(2), 94-95pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Folkman, J.**, 1972, Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors, *Annals of Surgery*, 175(3), 409-416pp.
- Folkman, J. and Klagsbrun, M.**, 1987, Angiogenetic factors, *Science*, 235(4787), 442-447pp.
- Folkman, J. and Shing Y.**, 1992, Angiogenesis, *J. Biol. Chem.*, 267, 10931-10934pp.
- Folkman, J.**, 1986, How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture, *Cancer Res.*, 46(2), 467-473pp.
- Folkman, J.**, 1995, Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease, *Nat. Med.*,1, 27-31pp.
- Fotakis, G. and Timbrell, J.A.** (2006), In vitro Cytotoxicity assays: comparison of LDH, Neutral Red, MTT and Protein Assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicol. Lett.* 160, 171-177pp.
- Fotsis T., Zhang Y., Pepper M.S., Adlercreutz H., Montesano R., Nawroth P.P., Schweigerer L.**, 1994, The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth, *Nature*, 368 (6468), 237-239pp.
- Franks, L.M. and Teich, N.M.**, 1996, Cellular and Molecular Biology of Cancer, 3rd. edition, *Oxford Univ. Press.* 1, 4,22 pp.
- Freedman T.B., Cao X., Oliveira R.V., Cass Q.B. and Nafie L.A.**, (2003). Determination of the absolute configuration and solution conformation of gossypol by vibrational circular dichroism. *Chirality*, 15, 196–200pp.
- Friis T., Engel AM., Bendiksen CD., Larsen LS. and Gunnar Houen G.**, 2013, Influence of Levamisole and Other Angiogenesis Inhibitors on Angiogenesis and Endothelial Cell Morphology in Vitro, *Cancers*, 5, 762-785pp.
- Gad, S.C.** (2000), *In vitro Toxicology*, Second Edition, Taylor & Francis, New York.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gagliardi A., Had H. and Colins D.C.**, 1992, Inhibitor of Angiogenesis by Suramin, *Cancer Research*, 52, 5073-5075pp.
- Ganapaty S., Chandrashekhar V.M. and Narsu M.L.**, 2010, Evaluation of anti-allergic activity of gossypin and suramin in mast cell-mediated allergy model, *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 47, 90-95pp.
- García-Caballero M., Mari´-Beffa M.M., Canˆedo L., Miguel Angel Medina M.A., Quesada A.R.**, 2013, Toluquinol, a marine fungus metabolite, is a new angiostatic that interferes the Akt pathway, *Biochemical Pharmacology*, 85, 1727–1740pp.
- Gerber H.P., Hillan K.J., Ryan A.M., Kowalski J., Keller G.A., Rangell L., Wright B.D., Rattke F., Aguet M. and Ferrara N.**, 1999, VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development*, 126, 1149-1159pp.
- Gjini, E.**, 2005, Tumor Angiogenesis A Review on Established and Innovative Concepts in Anti-angiogenic Therapy. *Drug Innovation Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Utrecht*.
- Gong, Y.Q., Fan, Y., Wu, D.Z., Yang, H., Hu, Z.B. and Wang, Z.T.**, (2004), *In vivo* and *in vitro* evaluation of erastin, a novel anti-angiogenic agent, *European Journal of Cancer*, 40, 1554-1565pp.
- Gonzalez-Garza M.T, Matlin S.A., Mata-Cardenas B., Said-Fernandez S.**, 1993, Differential effects of the (+)- and (-)-gossypol enantiomers upon *Entamoeba histolytica* axenic cultures, *J Pharm Pharmacol*, 45, 144–145pp.
- Gothoskar S.V. and Ranadive K.J.**, 1971, Anticancer screening of SAN-AB: an extract of marking nut, *Semecarpus anacardium*, *Indian J Exp Biol.*, 9(3), 372-375pp.
- Gotlieb, A.I.**, 1990, The endothelial cytoskeleton: Organization in normal and regenerating endothelium, *Toxicol. Pathol.*, 18, 603-617pp.
- Griffioen A.W., Barendz-Janson A.F., Mayo K.H., Hillen H.F.**, 1998, Angiogenesis, a target for tumor therapy, *J Lab Clin Med*, 132, 363-368pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Grossman S.A., Phuphanich S., Lesser G., Rozental J., Grochow L.B. Fisher J., and Piantadosi S.**, 2001, Toxicity, efficacy, and pharmacology of suramin in adults with recurrent high-grade gliomas, *J Clin Oncol.* 1;19(13), 3260-3266pp.
- Gschwendt M., Kittstein W. and Johannes F.J.**, 1998, Differential effects of suramin on protein kinase C isoenzymes. A novel tool for discriminating protein kinase C activities, *FEBS Letters*, 421(2), 165-168pp.
- Güler S.**, 2011, Suramin ile sıçanda oluşturulan preeklampsi-benzeri sendromdaki değişiklikler üzerine nebivololün etkileri, Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 107s.
- Gümüşhan H. ve Musa D.**, 2008, Effects of Adriamycin Administered via Different Routes on Ehrlich Ascites Tumor Cells, *IUFS, J. Biol.*, 67(1), 49-54pp.
- Hanahan D, Folkman J.**, 1996, Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis, *Cell.*, 9;86(3), 353-364pp.
- Hanahan D., Weinberg R.A.**, 2011, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 144(5), 646–674pp.
- Harris A.L., Fox S., Bicknell R., Lee R., Relf M., Le Jeune S., Kaklamanis L.**, 1994, Gene therapy through signal transduction pathways and angiogenic growth factors as therapeutic targets in breast cancer, *Cancer*, 73,1021-1025pp.
- Hathizume, H., Baluk, P., Morikawa, S., Mclean, J.W., Thurston, G., Roberge, S., Jain, R.K. and McDonald, D.M.**, (2000), Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness, *Am J Pathol*, 156, 1363-1380pp.
- He, Z.H., He, M.F., Ma, S.C., Paul, B.P.H.**, 2009, Anti-angiogenic effects of rhubarb and its anthraquinone derivatives, *J. Ethnopharmacol.*, 121, 313–317pp.
- Hicklin D.J., Ellis L.M.**, Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis, *J Clin Oncol*, 23,1011-1027pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hoek, J.B.**, (1992), Intracellular signal transduction and the control of endothelial permeability, *Lab Invest*, 67, 1-4pp.
- Hohenegger M., Waldhoer M., Beindl W., Böing B., Kreimeyer A., Nickel P., Nanoff C., and Freissmuth M.**, 1998, Gsalpha-selective G protein antagonists, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6;95(1), 346-351pp.
- Holst, C.M. and Oredsson, M.S.**, (2005), Comparison of three cytotoxicity tests in the evaluation of the cytotoxicity of a spermine analogue on human breast cancer lines, *Toxicology in vitro*, 19, 379-387pp.
- Horne M.K., 3rd., Wilson O.J., Cooper M., Gralnick H.R. and Myers C.E.**, 1992, The effect of suramin on laboratory tests of coagulation, *Thromb Haemost*, 67F, 434-439pp.
- HoSang, M.**, 1985, Suramin binds to platelet-derived growth factor and inhibits its biological activity, *J. Cell. Biochem.*, 29, 265–273pp.
- Hove EL, Hove Z.**, 1944, A method for estimating total fat-soluble antioxidants based on the relation between fat peroxides and carotene destruction, *J Biol Chem*, 156, 611–226pp.
- Huang, S.T., Yang, R.C., Lee, P.N., Yang, S.H., Liao, S.K., Chen, T.Y., Pang, J.H.**, 2006, Anti-tumor and anti-angiogenic effects of *Phyllanthus urinaria* in mice bearing lewis lung carcinoma, *Int. J. Immunopharmacol.*, 6, 870–879pp.
- Huan-Huan, C., Li-Li, Y., Shang-Bin, L.**, (2004), Artesunate reduces chicken choriallantoic membrane neovascularisation and exhibits antiangiogenic and apoptotic activity on human microvascular dermal endothelial cell, *Cancer Letters*, 211, 163-173pp.
- Igney F.H., Krammer P.H.**, 2002, Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2, 277–288pp.
- Ikeda M.**, 1990, Inhibition kinetics of NAD-linked enzymes by gossypol acetic acid, *Andrologia*, 22:409–16.
- Iruela-Arispe M.L.**, The Cell Biology of Angiogenesis, www.mcdb.ucla.edu/VBTG/course224-W1.pdf (Erişim Tarihi: 03.07.2015).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jaganathan S.K., Mondhe D., Wani Z.A., Pal H.C., and Mandal M.,** 2010, Effect of Honey and Eugenol on Ehrlich Ascites and Solid Carcinoma, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 5p.
- Jain RK, Munn, L.L., Fukumura D,** (2002), Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy, *Nat Rev Cancer*, 2, 266-276pp.
- Jain, R.K.,** (2002), Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor, *Semin. Oncol.*, 29, 2-3pp.
- Jang A.S.,** 2014, The Apical Junctional Complex in Respiratory Diseases, *Chonnam Med J.*, 5, :1-5pp.
- Janmey, P.A.,** (1998), The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling, *Physiol. Rev.*, 78, 763pp.
- Jiang J., Slivova V., Jedinak A., Sliva D.,** 2012, Gossypol inhibits growth, invasiveness, and angiogenesis in human prostate cancer cells by modulating NF- κ B/AP-1 dependent- and independent-signaling, *Clin Exp Metastasis*, 29(2):165-78pp.
- Jindal H.K., Anderson C.W., Davis R.G., Wishwanatha J.K.,** 1990, Suramin affects DNA synthesis in HeLa cells by inhibition of DNA polymerases, *Cancer research*, 1990, 50, 7754-7757pp.
- Jing L., Zhang Y.M., Luo J.G., Kong L.Y.,** 2015, Tirucallane-Type Triterpenoids from the Fruit of *Ficus carica* and Their Cytotoxic Activity, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 63(3), 237-243pp.
- Jun Liu, Babak R., Shaoqing T., Bruce I. T., J. Anthony W., Michael P. L.,** 1999, Angiogenesis activators and inhibitors differentially regulate caveolin-1 expression and caveolae formation in vascular endothelial cells. Angiogenesis inhibitors block vascular endothelial growth factor-induced down-regulation of caveolin-1. , *The journal of biological chemistry*, 274(22), 15781–15785pp.
- Jung H.J., Lee H.B., Lim C.H., Kim C.J., Kwon H.J.,** (2003), Cochlioquinone A1, A New Anti-Angiogenic Agent From *Bipolaris Zeicola*, *Bioorganic&Medicinal Chemistry*, 11, 4743-4747pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kaiser P.K.**, 2006, Antivascular Endothelial Growth Factor Agents and Their Development: Therapeutic Implications in Ocular Diseases, *American Journal of Ophthalmology*, Volume 142, Issue 4, Ophthalmol.,142: 660-668pp.
- Keniry M.A., Hollander C., Benz C.C.**, (1989). The effect of gossypol and 6-aminonicotinamide on tumor cell metabolism: A ³¹P-magnetic resonance spectroscopic study. *Biochem Biophys Res Commun.*, 164: 947–953pp.
- Kerbel R.S.**, 2008, Tumor angiogenesis, *N Engl J Med*, 358, 2039-2049pp.
- Kerr J.F., Winterford C.M., Harmon B.V.**, 1994, Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy, *Cancer* 73:2013– 2026pp.
- Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R.**, 1972, Apoptosis: a basic biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics, *Br J Cancer*, 26(4): 239–257pp.
- Keshmiri-Neghab H., Goliaei B.**, 2014, Therapeutic potential of gossypol: An overview, Vol. 52, No. 1 , *Pharm Biol*, 124-128pp.
- Kılıç T. ,Yıldırım Ö., Şahin S., Pamir M.N.**, 2005, Glial tümörlerin anjiyogenezi, *Türk Nöroşirürji Dergisi*,15: 1, 1-9pp.
- Kim E. C., Kim S.H., Piao S.J., Kim T.J., Bae K., Kim H.S., Hong S.S., Lee B.I., Nam M.**, 2015, Antiangiogenic Activity of Acer tegmentosum Maxim Water Extract in Vitro and in Vivo, *J Korean Med Sci*, 30, 979-987pp.
- Kim K.J., Li B., Winer J., Armanini M., Gillett N., Phillips H.S., Ferrara N.**, 1993, Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo, *Nature*, 1993; 362: 841–844pp.
- Kim S., Peshkin L., Mitchison T.J.**, 2009, Vascular disrupting agent drug classes differ in effects on the cytoskeleton, *PloS ONE* , 7(7), e40177p.
- King K.L., Cidlowski J.A.**, 1998, Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol*, 60, 601–617pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kitada S., Leone M., Sareth S., Zhai D., Reed J.C., Pellecchia M.,** (2003). Discovery, characterization, and structure-activity relationships studies of proapoptotic polyphenols targeting B-cell lymphocyte/leukemia-2 proteins. *J Med Chem* 46, 4259–4264pp.
- Kolodgie F.D., Wilson P.S., Mergner W.J., Virmani R.,** 1999, Cocaine-induced increase in the permeability function of human vascular endothelial cell monolayers, *Exp Mol Pathol.*, 1999, 66(2), 109-122pp.
- Krenn L., Paper D.H.,** 2009, Inhibition of angiogenesis and inflammation by an extract of red clover (*Trifolium pratense L.*), *Phytomedicine*, 16(12), 1083-1088pp.
- Kroll, A., Pillukat, M.H., Hahn, D., Schnekenburger J.,** 2009, Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72, 370–377pp.
- Kubota Y.,** 2012, Tumor Angiogenesis and Anti-angiogenic Therapy, *Keio J Med*, 61(2), 47-56pp.
- Kumar, A., D'Souza, S.S., Tickoo, S., Salimath, B.P., Singh, H.B.,**2009, Antiangiogenic and proapoptotic activities of allyl isothiocyanate inhibit ascites tumor growth *in vivo*, *Integr Cancer Ther.*, 8(1), 75-87 pp.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N.,** 2005, Robbins And Cotran, *Pathologic Basis of Disease*, 7 th edition, 513p.
- Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L.,** (1999), *Basic Pathology*, 5 th edition, W.B. Saunders Company, Philedelphia, Pennsylvania.
- Kuwano, M., Fukushi, J., Okamoto, M., Nishie, A., Goto, H., Ishibashi, T., Ono, M.,** 2001, Angiogenesis factors, *Intern. Med.*, 40, 565-572pp.
- Kvanta A., Algreve P.V., Berglin L., Seregard S.,** 1996, Subfoveal fibrovascular membranes in age-related macular degeneration express vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 37, 1929-1934pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- La Rocca R.V., Cooper M.R., Uhrich M., Danesi R., Walther M.M., Linehan W.M., Myers C.E.**, (1991) Use of suramin in treatment of prostatic carcinoma refractory to conventional hormonal manipulation. *Urol. Clin. North Am.* 18, 123-129pp.
- La Rocca R.V., Stein C.A., Danesi R., Myers C.E.**, 1990, Suramin, a novel antitumor compound, *Journal of Steroid, Biochemistry Molecular Biology*, 37, 893-896pp.
- La Rocca R.V., Stein C.A., Danesi R., Cooper M.R., Uhrich M., Myers C.E.**, 1991, A pilot study of suramin in the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* , 67, 1509-1513pp.
- Laughton M.J., Halliwell B., Evans P.J., Hoult J.R.**, (1989). Antioxidant and prooxidant actions of the phenolics quercetin, gossypol, and myricetin. *Biochem Pharmacol*, 38, 2859–2865pp.
- Lee, Y.S., Kim, Y.H., Shin, E.K., Kim, D.H., Lim, S.S., Lee, J.Y., Kim, J.K.**, 2010, Antiangiogenic activity of methanol extract of *Phellinus linteus* and its fractions, *J. Ethnopharmacol.*, 131, 56–62pp.
- Leng T., Miller J.M., Bilbao V., Palanker D.V., Huie P., Blumenkranz M.S.**, 2004, The chick chorioallantoic membrane as a model tissue for surgical retinal research and simulation, *Retina*, 24, 427-434pp.
- Li Y., Kong D., Z. Wang Z., F. H., Sarkar F.H.**, 2010, “Regulation of microRNAs by natural agents: an emerging field in chemoprevention and chemotherapy research”, *Pharmaceutical Research*, 27(6), 1027–1041pp.
- Liao, D. and Johnson, R.S.**, 2007, Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 281-290pp.
- Liekens S., De Cleroq E. and Neyts J.**, 2001, Angiogenesis: regulators and clinical applications, *Biochemical Pharmacolog*, 61(3), 253-270pp.
- Ligueros M., Jeoung D., Tang B., Hochhauser D., Reidenberg M.M., Sonenberg M.**, 1997, Gossypol inhibition of mitosis, cyclin D1 and Rb protein in human mammary cancer cells and cyclin D1 transfected human fibrosarcoma cells, *Br J Cancer*, 76, 21–28pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lin J., Wu Y., Yang D., Zhao Y.**, 2013, Induction of apoptosis and antitumor effects of a small molecule inhibitor of Bcl-2 and Bcl-x1, gossypol acetate, in multiple myeloma *in vitro* and *in vivo*, *Oncology Reports*, 30, 731-738pp.
- Lin R.C., Rosenfeld P.J.**, 2007, Antiangiogenic therapy in neovascular age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol Clin.*, 47, 117-137pp.
- Lin T.S., Schinazi R.F., Zhu J., Birks E., Carbone R., Si Y., Wu K., Huang L. and Prusoff W.H.**, 1993, Anti-HIV-1 activity and cellular pharmacology of various analogs of gossypol. *Biochem Pharmacol* 46, 251–255pp.
- Liu J., Razani B., Tang S., Terman B.I., Ware J.A., Lisanti M.P.**, 1999, Angiogenesis activators and inhibitors differentially regulate caveolin-1 expression and caveolae formation in vascular endothelial cells. Angiogenesis inhibitors block vascular endothelial growth factor-induced down-regulation of caveolin-1. *J Biol Chem*, 274, 15781–15785pp.
- Liu S., Kulp S.K., Sugimoto Y., Jiang J., Chang H.L, Dowd M.K., Wan P., Lin Y.C.**, 2002, The (-)-enantiomer of gossypol possesses higher anticancer potency than racemic gossypol in human breast cancer. *Anticancer Res* 22, 33–38pp.
- Liu Y., Thor A., Shtivelman E., Cao Y., Tu G., Heath T.D., Debs R.J.**, 1999, Systemic gene delivery expands the repertoire of effective antiangiogenic agents., *J Biol Chem.*,7;274(19), 13338-13344pp.
- Lowitz B.B., Casciato D.A.**. Kanser Biyolojisi ve Onkogenler: Ana bilgi. Medical Oncology& Principles of Cancer Biology, www.stomaseite.de/SiklusApoptozisKanser.pdf (Erişim Tarihi:27.04.2015)
- Lu, J., Kunimoto, S., Yamazaki, Y., Kaminishi, M., Esumi, H.**, (2004), Kigamicin D, a novel anticancer agent based on a new anti-austerity strategy targeting cancer cells'tolerance to nutrient starvation, *Cancer Sci.*, 95(6), 547-552pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Lyden D., Hattori K., Dias S., Costa C., Blaikie P., Butros L., Chadburn A., Heissig B., Marks W., Witte L., Wu Y, Hicklin D., Zhu Z, Hackett NR., Crystal R.G., Moore M.A., Hajjar K.A., Manova K., Benezra R., Rafii S., (2001), Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth, *Nat. Med.*, 7, 1194-1201pp.

Manuela B., Raymond M. S., Marcel H.A.M. F., Josbert M. M., Gert S., 2006, Anti-angiogenic effects of liposomal prednisolone phosphate, *Journal of Controlled Release*, 113, 1–8pp.

Margalith P., 1967, Inhibitory effect of gossypol on microorganisms, *Appl Microbiol*, 15, 952–953pp.

Margeli, A., Kouraklis G., Theocharis S., (2003), Peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR- γ) ligands and angiogenesis, *Kluwer Academic Publishers, Angiogenesis* 6, 165-169pp.

Marneros A.G., Fan J., Yokoyama Y., Gerber H.P., Ferrara N., Crouch R.K., Olsen B.R. 2005, Vascular endothelial growth factor expression in the retinal pigment epithelium is essential for choriocapillaris development and visual function. , *Am J Pathol.*, 167, 1451-1459pp.

Marques I., António Araújo A., de Mello R.A., 2013, Anti-angiogenic therapies for metastatic colorectal cancer: Current and future perspectives, *World J Gastroenterol*, 28; 19(44): 7955-7971pp.

Martinvalet D., Zhu P., Lieberman J., 2005, Granzim A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*, 22, 355–370pp.

Masabumi S., 2014, VEGF-VEGFR Signals in Health and Disease, *Biomol Ther*, 22(1), 1-9pp.

Mathur, R., Gupta, S.K., Singh, N., Mathur, S., Kochupillai, V., Velpandian, T., 2006, Evaluation of the effect of Withania somnifera root extracts on cell cycle and angiogenesis, *J. Ethnopharmacol.*, 105, 336–341pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Matter A.**, 2001, Tumor angiogenesis as a therapeutic target, *Drug Discov Today.*, 1;6(19):1005-1024pp.
- McDonald D.M., Choyke P.L.**, (2003) Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med.*, 9, 713–725pp.
- McDonald D.M., Baluk P.**, 2002, Significance of blood vessel leakiness in cancer, *Cancer Res.*, 15;62(18), 5381-5385pp.
- McMahon G.**, 2000, VEGF Receptor Signaling in Tumor Angiogenesis, *The Oncologist*, 5(1), 3-10pp.
- Me Cubrey J.A., May W.S., Duronio V. and Mufson A.**, 2000, Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction, *Leukemia*, 14, 9-21pp.
- Mehrpour M., Patrice Codogno P., Chen Q.**, 2009, Gossypol: from contraceptive for men to antitumoral activity, *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench* , 2, 51-55pp.
- Mendis K., Sina B.J., Marchesini P., Carter R.**, 2001, The neglected burden of Plasmodium vivax malaria, *Am J Trop Med Hyg.* 64, 97–106pp.
- Meng Y., Tang W., Dai Y., Wu X., Liu M., Ji Q., Ji M., Pienta K., Lawrence T., Xu L.**, 2008, Natural BH3 mimetic (-)-gossypol chemosensitizes human prostate cancer via Bcl-xL inhibition accompanied by increase of Puma and Noxa, *Mol Cancer Ther*, 7,2192–2202.
- Meyers M.O., Gagliardi A.R., Flattmann G.J., Su J.L., Wang Y.Z. and Woltering E.A.**, 2000, Suramin analogs inhibit human angiogenesis in vitro. *J Surg Res.* , 15;91(2), 130-134pp.
- Micheletti G., Poli M., Borsotti P., Martinelli M., Imberti B., Taraboletti G., Giavazzi R.**, 2003, Vascular targeting activity of ZD6126, a novel tubulin-binding agent, *Cancer Research*, 63(7), 1534–1537pp.
- Miles D., Harbeck N., Escudier B., Hurwitz H., Saltz L., Van Cutsem E, Cassidy J., Mueller B., Sirzén F.**, 2010, Disease course patterns after discontinuation of bevacizumab: pooled analysis of randomized phase III trials, *J Clin Oncol*, 29, 83–88pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mills G., Zhang N., Mey C., Hill M., Chung A.,** 1990, Suramin prevent binding of interleukin 2 to its cells surface receptor:a possible mechanism for immunosupression, *Cancer Research*, 1990, 51, 3036-3042pp.
- Miyamoto K., Khosrof S., Bursell S.E., Yasufumi Moromizato Y., Lloyd Paul Aiello L.P., Yuichiro Ogura Y., Adamis A.P.** 2000, Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced retinal vascular permeability is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Am J Pathol.*, 156, 1733-1739pp.
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B., Reed J.C.,** 1994, Tumor suppressor p53 is a regulator of Bcl-2 and Bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799–1805pp.
- Miyashita T., Reed J.C.,** 1995, Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80, 293–299pp.
- Molla M.R., Yoshiga K., Takada K.,** 1987, Influence of 5-hydroxytryptamine on the combination effect of lonidamine or gossypol and hyperthermia on Ehrlich tumour in vivo., *Anticancer Res.*7(3), 361-364pp.
- Montamat E.E., Burgos C., Gerez de Burgos N.M., Rovai L.E., Blanco A., Segura E.L.,** 1982, Inhibitory action of gossypol on enzymes and growth of Trypanosoma cruzi, *Science*, 218, 288–928pp.
- Monteiro-Riviere N.A., Inman A.O., Zhang L.W.,** 2009, Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 234, 222–235pp.
- Moon D.O., Kim M.O., Lee J.D., Kim G.Y.,** 2008b, Gossypol suppresses NF-kappaB activity and NF-kappaB-related gene expression in human leukemia U937 cells, *Cancer Lett* 264,192–200pp.
- Moon D.O., Kim M.O., Choi Y.H., Lee H.G., Kim N.D., Kim G.Y.,** 2008a, Gossypol suppresses telomerase activity in human leukemia cells via regulating hTERT, *FEBS, Lett*, 582,3367–3373pp.
- Mossman T.** (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 65, 55–63pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mountz J.D. and Zhou T.,** 2001, Apoptosis and Autoimmunity. In: Koopman WJ ed. *A Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions.* Lippincott Williams & Wilkins.
- Mousa S.,** 1998, Angiogenesis: regulation and dysregulation, *Mol Med Today*, 97,101p.
- Nader R.,** 2006, Vascular endothelial growth factor receptors: Molecular mechanisms of activation and therapeutic potentials, *Exp Eye Res.*, 83(5): 1005–1016pp.
- Nazer B., Humphreys B.D. and Moslehi J.,** 2011, Effects of Novel Angiogenesis Inhibitors for the Treatment of Cancer on the Cardiovascular System, *Circulation*, 124, 1687-1691pp.
- Nazir S., Hussain T., Ayub A., Rashid U., MacRobert A.J.,** 2014, Nanomaterials in combating cancer: Therapeutic applications and developments, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 10, 19–34pp.
- Nishida N., Yano H., Nishida T., Kamura T. and Kojiro M.,** 2006, Angiogenesis in cancer, *Vascular Health and Risk Management*, 2(3), 213–219pp.
- Norbury C.J. and Hickson I.D.,** 2001 Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41, 367–401pp.
- O’Reilly M.S., Holmgren L., Chen C., Folkman J.,** 1996, Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice, *Nature Med*, 2, 689p.
- O’Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y., Chen V., Rosenthal R.A., Moses M., Lane W.S., Cao Y., Sage E.H., Folkman J.,** 1994, Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma, *Cell*, 79,315p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Okaji Y., Tsuno N.H., Kitayama J., Saito S., Takahashi T., Kawai K., Yazawa K., Asakage M., Tsuchiya T., Sakurai D., Tsuchiya N., Tokunaga K., Takahashi K. and Nagawa H., 2004,** A novel method for isolation of endothelial cells and macrophages from murine tumors based on Ac-LDL uptake and cd16 expression, *Journal of Immunological Methods*, 295, 183-193pp.
- Oliver C.L., Bauer J.A., Wolter K.G., Ubell M.L., Narayan A., O'Connell K.M., Fisher S.G., Wang S., Wu X., Ji M., Carey T.E. and Bradford C.R., (2004).** In vitro effects of the BH3 mimetic, (-)-gossypol, on head and neck squamous cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res*, 10, 7757–7763pp.
- Ozaki H., Yu A.Y., Della N., Ozaki K., Luna J.D., Yamada H., Hackett S.F., Okamoto N., Zack D.J., Semenza G.L. and Campochiaro P.A. 1999,** Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 40, 182-189pp.
- Öktem, Ç., 2007,** Deneysel ayarlanabilir sütür ile şaşılık cerrahisi modelinde suramin, genistein ve duragen bariyer matriksin mekanik, immünhistokimyasal ve histopatolojik etkileri, *Uzmanlık tezi, Ankara.*
- Özçetin A., Aigner A., Bakowsky U., 2013,** A chorioallantoic membrane model for the determination of anti-angiogenic effects of imatinib, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85, 711–715pp.
- Özgürtaş T., 2009,** Anjiyogenezde bir in-vivo model: Cıvıv Koriyoallantoik Membran, *Gülhane Tıp Dergisi 2009; 51: 67-69s.*
- Özuyal S., 2001,** Tümöral Anjiogenezis, *Türk Patoloji Dergisi 17 (3-4), 90-93s.*
- Padera T.P., Kuo A.H., Hoshida T., Liao S., Lobo J., Kozak K.R., Fukumura D., Jain R.K. , 2008,** Differential response of primary tumor versus lymphatic metastasis to VEGFR-2 and VEGFR-3 kinase inhibitors cediranib and vandetanib, *Mol Cancer Ther*, 7, 2272–2279pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Padera T.P., Stoll B.R., Tooredman J.B., Capen D., di Tomaso E., Jain R.K.,** Pathology: cancer cells compress intratumour vessels, 2004, *Nature.*, 19;427(6976), 695p.
- Pàez-Ribes M., Allen E., Hudock J., Takeda T., Okuyama H., Viñals F., Inoue M., Bergers G., Hanahan D., Casanovas O.,** 2009, Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis, *Cancer Cell*, 15, 220–231pp.
- Paget S.,** 1889, The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet.*, 133(3421), 571–573pp.
- Pang X., Wu Y., Wu Y., Lu B., Chen J., Wang J., Yi Z., Qu W., Liu M.,** 2011, (-)-Gossypol, a Natural BH3 Mimetic, Suppresses the Growth of Human Prostate Cancer Xenografts via Modulating VEGF Signaling-Mediated Angiogenesis, *Mol Cancer Ther*, 10(5), 795–805pp.
- Papetti M., Herman I.R.,** 2002, Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis, *Am J Physiol Cell Physiol* 282, 947–970pp.
- Paweletz N., Walther F.,** 2001, pioneer of mitosis research, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2(1), 72-75pp.
- Phuah N.H., Nagoor H.N,** 2014, Regulation of MicroRNAs by Natural Agents: New Strategies in Cancer Therapies, *Biomed Res Int.*, 804510, 17p.
- Pietenpol J.A., Stewart Z.A.,** 2002, Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 181–182, 475– 481pp.
- Politzer W.M.,** 2008, Long-term clinical remission of a patient with chronic lymphocytic leukemia using alternative treatment option: cottonseed oil (gossypol), *Phytomedicine*, 15, 563–565pp.
- Potera, C.,** (2007) More Human, More Humane: A New Approach for Testing Airborne Pollutants, *Environmental health perspectives*, 115, A148-151pp.
- Prager G. W., Poettler M., Unseld M., Zielinski C. C.,** 2012, Angiogenesis in cancer: anti-VEGF escape mechanisms, *Transl Lung Cancer Res*, 1(1), 14-25pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Prasad M.R.N., Diczfalusy E.**, 1982, Gossypol, *Int J Androl* 1982, 5(5), 53-70pp.
- Pund S., Borade G., Rasve G.**, 2014, Improvement of anti-inflammatory and anti-angiogenic activity of berberine by novel rapid dissolving nanoemulsifying technique, *Phytomedicine*, 21(3), 307-314pp.
- Putnam, K.P., Bombick, D.W., Doolittle, D.J.** (2002), Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate, *Toxicology In Vitro*, 16, 599-607pp.
- Qian C., Li M., Sui J., Ren T., Li Z., Zhang L., Zhou L., Cheng Y., Wang D.**, (2014), Identification of a novel potential antitumor activity of gossypol as an APE1/Ref-1 inhibitor, *Drug Design, Development and Therapy*, 8, 485–496pp.
- Quesada A.R., Medina M.A.´ , Mun˜oz-Cha´puli R., Ponce A.´ L.**, 2010, Do not say ever never more:the ins and outs of antiangiogenic therapies, *Curr PharmDes*, 16(35), 3932–3957pp.
- Rago R., Mitchen J., Cheng A.L., Oberley T., Wilding G.**, 1991, Disruption of cellular energy balance by suramin in intact human prostatic carcinoma cells, a likely proliferative mechanism, *Cancer Research*, 51, 6629-6635pp.
- Ranjit S. Bindra R.S., Peter M., Glazer P.M.**, (2005) Genetic instability and the tumor microenvironment: towards the concept of microenvironment-induced mutagenesis *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 569-1/2, 75–85 pp.
- Razakantoanina V., Nguyen Kim P.P., Jaureguiberry G.**, 2000, Antimalarial activity of new gossypol derivatives, *Parasitol Res*, 86, 665–668pp.
- Ren T., Shan J., QingY., Qian C., Li, Q. Lu G., Li M., Li C., Peng Y., Luo H., Zhang S., Zhang W., Wang D., Zhou S.H.**, 2014, Sequential treatment with AT-101 enhances cisplatin chemosensitivity in human non-small cell lung cancer cells through inhibition of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1-activated IL-6/STAT3 signaling pathway, *Drug Des Devel Ther*, 8, 2517–2529pp.
- Ren X., Dai M., Lin L.P., Li P.K., Ding J.**, 2009, Anti-angiogenic and vascular disrupting effects of C9, a new microtubule-depolymerizing agent, *British Journal of Pharmacology*, 156(8), 1228–1238

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Renahan A.G., Booth C., Potten C.S.,** 2006, What is apoptosis, and why is it important? *Bmj*, 322, 1536–1538pp.
- Rivera L.B., Bergers G.,** 2014, Targeting Vascular sprouts, *Science*, Vol:344, No:6191, 1449-1450pp.
- Rivera L.B., Bergers G.,** 2013, Location, Location, Location: Macrophage positioning within tumors determines pro-or anti-tumor activity, *Cancer Cell*, 9; 24(6), 687–689pp.
- Robbins M., Ali K., McCaw R., Olsen J., Vartak S., Lubaroff D.,** 1999, gamma-linolenic acid (GLA)-mediated cytotoxicity in human prostate cancer cells, *Adv Exp Med Biol.*, 469, 499-504pp.
- Robinson C.J., Stringer S. E.,** 2001, The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors, *J Cell Sci.*, 114(5), 853-865pp.
- Rosenberg L.J., Adlakha R.C., Desai D.M., Rao P.N.** (1986). Inhibition of DNA polymerase alpha by gossypol. *Biochim Biophys Acta* 866, 258–267pp.
- Royer R.E. , Deck L.M. , Campos N.M. , Hunsaker L.A., . Vander Jagt D.L.,** 1986, Biologically active derivatives of gossypol: Synthesis and antimalarial activities of peracylated gossylic nitriles, *J Med Chem*, 29,1799–1801pp.
- Sabala P., Czajkowski R., Przbyłek K., Kalita K., Kacmarek L., Baranska J.,** 2001, Two subtypes of G protein coupled nucleotide receptors P2Y₁ and P2Y₂ are involved in calcium signalling in glioma C6 cells, *British Journal of Pharmacology*, 132, 393-402pp.
- Savion, N., Vlodaysky, I., Greenburg, G., Gospodarowicz, D.,** 1982, Synthesis and distribution of cytoskeletal elements in endothelial cells as a function of cell growth and organization, *J. Cell Physiol*, 110, 129-141pp.
- Shah S.M., Sadiq A., Shah S.M., Khan S.,** 2014, Extraction of saponins and toxicological profile of *Teucrium stocksianum* boiss extracts collected from District Swat, Pakistan. *Biol Res.* 4;47(1), 65p.
- Shams N., Ianchulev T.,** 2006, Role of vascular endothelial growth factor in ocular angiogenesis. *Ophthalmol Clin N Am.*,19, 335-344pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shandilya L.N., Clarkson T.B., Adams M.R., Lewis J.C.,** 1982. Effects of gossypol on reproductive and endocrine functions of male cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Biol Reprod* 27, 241–252pp.
- Shandilya L.N., Clarkson T.B., Adams M.R., Lewis J.C.,** 1982, Effects of gossypol on reproductive and endocrine functions of male cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*), *Biol Reprod*, 27,241–252pp.
- Sheikh M.S., Burns T.F., Huang Y., Wu G.S., Amundson S., Brooks K.S., Fornace A.J. JR., el Deiry W.S.,** 1998, p53-dependent and -independent regulation of the death receptor KILLER/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res* 58, 1593–1598pp.
- Shidaifat F., Canatan H., Kulp S.K., Sugimoto Y., Zhang Y., Brueggemeier R.W., Somers W.J., Chang W.Y., Wang H.C., Lin Y.C.,** 1997, Gossypol arrests human benign prostatic hyperplastic cell growth at G0/G1 phase of the cell cycle, *Anticancer Res*, 17, 1003–1009pp.
- Shimizu K., Oku, N.,** (2004), Cancer Anti-angiogenic Therapy, *Biol. Pharm. Bull.*, 27(5), 599-605pp.
- Siemann D.W., Rojiani A.M.,** 2005, The vascular disrupting agent ZD6126 shows increased antitumor efficacy and enhanced radiation response in large, advanced tumors, *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 62(3), 846–853pp.
- Sills A.K., Williams J.J.I., Tyler B.M., Epstein D.S., Sipos E.P., Davis J.D., McLane M.P., Pitchford S., Cheshire K., Gannon F.H, Kinney W.A., Chao T.L., Donowitz M., Laterra J., Zasloff M., Brem H.,** 1998, Squalamine Inhibits Angiogenesis and Solid Tumor Growth in Vivo and Perturbs Embryonic Vasculature, *Cancer Research*, 58(13), 2784-2792pp.
- Sitohy B., Nagy J.A., Dvorak H.F.,** 2012, AntiVEGF/VEGFR therapy for cancer: reassessing the target, *Cancer Res*, 72, 1909-1914pp.
- Sledge G.W. Jr.** 1996, Implications of the new biology for therapy in breast cancer . *Semin Oncol*, 23(1), 76-81pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Slee E.A., Adrain C., Martin S.J.**, 2001, Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*, 276, 7320–7326pp.
- Smyth M.J., Godfrey D.I., Trapani J.A.**, 2011, A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol*, 2, 293–239pp.
- Sounni N.E. and Noel A.**, 2013, Targeting the tumor microenvironment for cancer therapy, *Clin Chem.*, 59(1), 85-93pp.
- Spigelman Z., Dowers A., Kennedy S., DiSorbo D., O'Brien M., Barr R. and McCaffrey R.**, 1987, Antiproliferative effects of suramin on lymphoid cells., *Cancer Res.*, 1;47(17), 4694-4698pp.
- Staton C.A., Reed M.R.R. and Brown N.J.**, 2009, A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays, *Int. J. Exp. Path.*, 90(3), 195–221pp.
- Stein C.A.**, 1993, Suramin: a novel antineoplastic agent with multiple potential mechanisms of action, *Cancer Res.* 15;53(10), 2239-2248pp.
- Stepien H., Grochal M., Zielinsky K.W., Mucha S., Kunert Radak J., Kulig A., Stavouy A., Pisarek H.**, 1996, Inhibitory effects of fumagillin and its analogue TNP-470 on the function, morphology and angiogenesis of an oestrogen-induced prolactinoma in fisher 344 rats, *J Endocrinol*, 150(1): 99-106pp.
- Stipanovic R.D., Stoessl A., Stothers J.B., Altman D.W., Bell A.A., Heinstejn P.**, 1986. The stereochemistry of the biosynthetic precursor of gossypol, *J Chem Soc Chem Commun*, 2, 100–102pp.
- Susan E.**, 2007, Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, *Toxicol Pathol.*, 35(4), 495–516pp.
- Şahin F. , Avci Ç.B. , Cumhuri Gunduz C. , Canfeza Sezgin C. , Simsir I.Y., Guray Saydam G.**, 2010, Gossypol exerts its cytotoxic effect on HL-60 leukemic cell line via decreasing activity of protein phosphatase 2A and interacting with human telomerase reverse transcriptase activity, *Hematology*, 15(3), 144-150pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tanaka N.G., Sakamoto N., Inoue K., Korenaga H., Kakoya S., Ogawa H., Osada Y.**, 1989, Antitumor effects of an antiangiogenic polysaccharide from an Arthrobacter species with or without a steroid, *Cancer Res*, 49, 6727-6730pp.
- Taşkın E.İ., Akgün-Dar K., Kapucu A., Osanç, E., Doğruman H., Eraltan H., Ulukaya E.**, 2009, Apoptosis-inducing effects of Morinda citrifolia L. and doxorubicin on the Ehrlich ascites tumor in Balb-c mice., *Cell Biochem Funct.*, 27(8), 542-546pp.
- Teng C.S.**, 1995, Gossypol-induced apoptotic DNA fragmentation correlates with inhibited protein kinase C activity in spermatocytes, *Contraception*, 52,389–395pp.
- Terrero M.N., Li, S.**, 2004, Growth factor receptors: targets for gene therapy and immunotherapy for cancer treatment. *Gene Ther Mol Biol*, 8, 175-80pp.
- The Angiogenesis Foundation**, ‘How is Angiogenesis Important for Health?, The angiogenesis process, <http://www.angio.org/learn/angiogenesis/> (Erişim tarihi:17 Nisan 2015).
- Theocharis S., Gribilas G., Giaginis C., Patsouris E., Klijanienko J.**, 2015, Angiogenesis in salivary gland tumors: from clinical significance to treatment, *Expert Opin. Ther. Targets*, 19(6), 807-819pp.
- Tila D., Ghasemi S., Yazdani-Arazi S.N., Ghanbarzadeh S.**, 2015, Functional liposomes in the cancer-targeted drug delivery, *Journal of Biomaterials Applications*, 30(1), 3–16pp.
- Tolgalı, Y.T., Küçükaslan, M.**, 2011, Endotel disfonksiyonu, *Pamukkale Tıp Dergisi*, 4(3), 152-157s.
- Tong J.P., Yao Y.F.**, 2006, Contribution of VEGF and PEDF to choroidal angiogenesis: A need for balanced expressions, *Clinical Biochemistry*, 39, 267–276pp.
- Tong Y.G., Zhang X.W., Geng M.Y., Yue J.M., Xin X.L., Tian F., Shen X., Tong L.J., Li M.H., Zhang C., Li W.H., Lin L.P., Ding J.**, 2006, Pseudolarix acid B, a new tubulin-binding agent, inhibits angiogenesis by interacting with a novel binding site on tubulin, *Molecular Pharmacology*, 69(4), 1226–1233pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tong, Y., Zhang, X., Zhao, W., Zhang, Y., Jingyu, L., Shi, Y., Tan, W., Li, M., Zhang, Y., Tong, L., Lu, H., Lin, L., Ding, J.,** 2004, Anti-angiogenic effects of Shiraiachrome A, a compound isolated from a Chinese folk medicine used to treat rheumatoid arthritis, *European Journal of Pharmacology*, 494, 101-109pp.
- Tulpule A., Snyder J.C., Espina B.M.,** 1994, A phase I study of Tecogalan, a novel angiogenesis inhibitor in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarkoma and solid tumors, *Blood*, 84,248pp.
- Turgut, N.H.,** 2007, Suraminle oluşturulan sıçan preeklampsi modelinde damar düz kas cevaplarında oluşan değişiklikler üzerine fosfodiesteraz-5 inhibisyonunun etkisi, *Doktora tezi, Sivas.*
- Türker K., Yıldırım Ö., Pamir M.N.,** 2005, Beyin Tümörlerinde Anti-Anjiogenik Yaklaşımlar, *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 15(1), 10-16s.
- Ueno H., Sahni M.K., Segal S.J., Koide S.S.,** 1988, Interaction of gossypol with sperm macromolecules and enzymes, *Contraception*, 37, 333–341pp.
- Ulus G.,** 2006, Bazı bitki ekstraktlarının sıçan endotel hücreleri üzerine etkilerinin *in vitro* incelenmesi, Yüksek lisans tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi, 98 sayfa.
- Vadehra, D. V., Kalla, N. R., Saxena, M., Hashia, R., Kaur, P., Gupta, L. K.,** (1985). Antimicrobial activity of gossypol acetic acid. *IRCS Med. Sci.* 13, 10-11pp.
- Vainio P., Thurén T., Wichman K., Luukkainen T., Kinnunen P.K.** 1985, Hydrolysis of phospholipids monolayers by human spermatozoa: Inhibition by male contraceptive gossypol, *Biochim Biophys Acta*, 814,405–408pp.
- Van Poznak C., Seidman A.D., Reidenberg M.M., Moasser M.M., Sklarin N., Van Zee K., Borgen P., Gollub M., Bacotti D., Yao T.J, Bloch R., Ligueros M., Sonenberg M., Norton L.,** 2001, Oral gossypol in the treatment of patients with refractory metastatic breast cancer; a phase I/II clinical trial, *Breast Cancer Res Treat*, 66, 239–248pp.
- Vander Jagt D.L., Deck L.M., Royer RE.,** (2000). Gossypol: Prototype of inhibitors targeted to dinucleotide folds. *Curr Med Chem* 7, 479–498pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vargas A., Zeisser-Labouèbe M., Lange N., Gurny R., Delie F,** 2007, The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems, *Adv Drug Deliv Rev.*, 30;59(11), 1162-1176pp.
- Vecchi Brumatti L., Marcuzzi A., Tricarico P.M., Zanin V., Girardelli M., Bianco A.M.,** 2014, Curcumin and inflammatory bowel disease: potential and limits of innovative treatments, *Molecules*, 16;19(12), 21127-21153pp.
- Waltenberger, J., Mayr, U., Frank, H., Hombach, V.,** 1996, Suramin is a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor. A contribution to the molecular basis of its antiangiogenic action. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 28(7), 1523–1529pp.
- Wang D., Wang S., Feng Y., Zhanga L., Li Z., Ma J., Luo Y., Xiao W.,** 2014, Antitumor effects of Bulbus Fritillariae cirrhosae on Lewis lung carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*, *Industrial Crops and Products*, 54, 92–101pp.
- Wang X., Beckham T.H., Morris J.C., Chen F., Gangemi J.D.,** 2008, Bioactivities of gossypol, 6-methoxy gossypol and 6, 60 -dimethoxy gossypol, *J Agric Food Chem*, 56:4393–4398pp.
- Wang X.W., Harris C.C.,** 1997, p53 tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis, *J Cell Physiol*, 173, 247–255pp.
- Wang Y., Fei D., Vanderlaan M., Song A.,** 2004, Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro, *Angiogenesis*, 7(4), 335-345pp.
- Weber CE., Kuo P.C.,** (2012), The tumor microenvironment, *Surgical Oncology*, 21(3), 172–177pp.
- Wehland, J., Osborn, M., Weber, K.,** (1979), Cell-to-substratum contacts in living cells: a direct correlation between interference-reflexion and indirect-immunofluorescence microscopy using anti-bodies against actin-and alpha-actinin, *J. Cell Sci*, 37, 257-273pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- White C.W., Sondheimer H.M., Crouch E.C., Wilson H., Fan L.L.** 1989, Treatment of pulmonary hemanjiomatosis with recombinant interferon alfa-2a, *New Engl J Med*, 320, 1197p.
- Witmer A.N., Vrensen G.F., Van Noorden C.J., Schlingemann R.O.**, 2003, Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease, *Prog Retin Eye Res.*, 22(1), 1-29pp.
- Wong J., Wang N., Miller J.W., Schuman J.S.**, 1994, Modulation of human fibroblast activity by selected angiogenesis inhibitors, *Exp Eye Res*, 58(4), 439-451pp.
- Wong M.K., Gotlieb A.I.**, 1986, Endothelial cell monolayer integrity. I. Characterization of dense peripheral band of microfilaments, *Arteriosclerosis.*, 6(2), 212-219pp.
- Xu L., Yang D., Wang S., Tang W., Liu M., Davis M., Chen J., Rae J.M., Lawrence T., Lippman M.E.**, 2005, (-)-Gossypol enhances response to radiation therapy and results in tumor regression of human prostate cancer, *Mol Cancer Ther*, 4,197–205pp.
- Yaylalı Y.T., Küçükaslan M.**, 2011, Endotel disfonksiyonu, *Pamukkale Tıp Dergisi*, 4(3), 152-157s.
- Yıldırım, Y.**, 2013, Anjiyogenez ve VEGF'nin Rolü, *Türkiye Klinikleri J Ophthalmol-Special Topics*, 6(2), 1-7s.
- Yoshiaki K.**, 2012, Tumor Angiogenesis and Anti-angiogenic Therapy, *Keio J Med*, 61(2), 47-56pp.
- Yu Y., Deck J.A., Hunsaker J.A.**, inhibitors of human lactate dehydrogenases A4, B4 and C4, *Biochem Pharmacol*, 62,81–89pp.
- Zaniboni, A.**, 1990, Suramin: the discovery of an old anticancer drug. *Med. Oncol Tumor Pharmacother.*, 7(4), 287-290pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zeng Q.F., Bai P., Wang J.P., Ding X.M., Luo Y.H., Bai S.P., Xuan Y., Su Z.W., Lin S.Q., Zhao L.J., Zhang K.Y.**, 2015, The response of meat ducks from 15 to 35 d of age to gossypol from cottonseed meal, *Poult Sci*, 1;94(6), 1277-1286pp.
- Zeybek, Ü.**, 2012, Kanser Araştırmaları ve Deneysel Modeller, *İ.Ü.Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 2(5), 1-12 pp.
- Zhai D., Jin C., Satterthwait A.C., Reed J.C.**, 2006, Comparison of chemical inhibitors of antiapoptotic Bcl2 family proteins, *Cell Death Differ*, 13,1419–1421.
- Zhan Y.H., Huang X.F., Hu X.B., An Q.X., Liu Z.X., Zhang X.Q.**, 2013, Growth Inhibition and Apoptosis Induction of Human Umbilical Vein Endothelial Cells by Apogossypolone, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(3):1791-1795pp.
- Zhan Y.H., Huang X.F., Hu X.B., An Q.X., Liu Z.X., Zhang X.Q.**, 2013, Growth inhibition and apoptosis induction of human umbilical vein endothelial cells by apogossypolone, *Asian Pac J Cancer Prev.*, 14(3):1791-1795pp.
- Zhang X., Hu X., Mu S., Zhan Y., An Q., Liu Z., Huang X.**, 2014, Apogossypolone inhibits the proliferation of LNCaP cells in vitro and in vivo, *Molecular Medicine Reports*, 10: 1184-1194pp.
- Zhang X.Q., Huang X.F., Mu S.J. , An Q.X., Xia A.J. , Chen R., Wu D.C.**, 2010, Inhibition of proliferation of prostate cancer cell line, PC-3, in vitro and in vivo using (-)-gossypol, *Asian Journal of Andrology*, 12: 390–399pp.
- Zhou Y.X. and Huang Y.L.**, 2009, Antiangiogenic effect of celastrol on the growth of human glioma: an in vitro and in vivo study, *Chin Med J (Engl)*. 20, 122(14), 1666-1673pp.

ÖZGEÇMİŞ

Gönül ULUS 15 Mart 1974 tarihinde İzmir’de doğdu. Türkiye Cumhuriyeti vatandaşıdır. İlk, orta, lise öğrenimini İzmir’de tamamlamıştır. Lisans Eğitimini Balıkesir Üniversitesi Necatibey Eğitim Fakültesi’nde (Balıkesir), Yüksek Lisans Eğitimini Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi’nde (Eskişehir) tamamlamıştır. Doktora eğitimine 2008-2009 öğretim yılı bahar döneminde Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda başlamıştır.