

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KEMOTERAPİNİN KOLON KANSERİ, MEME KANSERİ VE MİDE
KANSERİNDE VEGF DÜZEYLERİNE ETKİSİNİN İN VİVO VE İN VİTRO
İNCELEMESİ**

Sedef Hande AKTAŞ

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Hakan AKBULUT

ANKARA

2010

Kemoterapinin kolon kanseri, meme kanseri ve mide kanserinde VEGF düzeylerine etkisinin in vivo ve in vitro incelenmesi

ÖZET

Kanser insidansı son yıllarda artan bir hastalıktır. Farklı tedavi rejimleri kullanılmasına rağmen henüz kanseri eradike edebilecek bir tedavi mevcut değildir. Anjiyogenez inhibisyonu son yıllarda kanser tedavisinde önem kazanmıştır. Klasik kemoterapi ilaçlarının anjiyogenez üzerindeki etkileri tartışmalıdır. Bu çalışmamızda kemoterapide sıklıkla kullanılan bazı kanser ilaçlarının anjiyogenez düzeyleri üzerindeki etkisini araştırmayı amaçladık.

Bu amaçla kolon, mide ve meme kanserli hastalarda rutin kemoterapinin VEGF düzeylerine etkisini ve ayrıca kolon, meme ve mide kanseri hücre dizilerinde in vitro olarak kemoterapi ilaçlarının sitotoksik ve VEGF üzerindeki etkileri araştırıldı. Hasta serum örneklerinden VEGF, ELISA yöntemiyle ölçüldü. In vitro sitotoksite deneyleri MTT yöntemi ile tayin edildi ve Trypan mavisi yöntemi ile konfirme edildi.

Sonuç olarak kanserli hastalarda kemoterapinin, genellikle tedavi yanıtı ile paralel olarak, serum VEGF düzeylerini azalttığı görüldü. Çalışmada kullanılan ilaçlardan irinotekanın tümör küçültücü etkisinden bağımsız olarak serum VEGF düzeylerinde bir azalmaya yol açabileceği bulundu. Tümör hücre kültürlerinde incelenen tüm kemoterapötik ilaçlar düşük konsantrasyonlarda VEGF salgısını azalttı. Anjiyogenezin hastalığın seyrinde, özellikle metastazlarla ilişkisi düşünüldüğünde VEGF düzeylerinin kemoterapötiklerle azaltılması kanser açısından önemli olabilir.

Anahtar kelimeler: VEGF, anjiyogenez, sitotoksisite, MTT, kolon kanseri, meme kanseri, mide kanseri.

The effects of conventional chemotherapy on VEGF secretion in colon cancer, breast cancer and gastric cancer.

ABSTRACT

The incidence of cancer is still increasing. Although there are different treatment modalities in cancer treatment, the disease needs to be eradicated effectively. Recently, anti-angiogenesis treatment strategies have gained great importance. The effects of conventional chemotherapy drugs on angiogenesis are not known. In this study we aimed to investigate the effects of conventional chemotherapy drugs on VEGF secretion.

For this purpose, some chemotherapy drugs's effect on cytotoxic VEGF levels was investigated on colon, breast and stomach cell lines in vitro and the effects of conventional chemotherapy on VEGF levels on colon, breast and stomach cancer patients. VEGF in patient's serum was evaluated by ELISA method. In vitro cytotoxic experiments was evaluated with MTT cell proliferation assay and confirmed with trypan blue viability assay.

As a result, along with its cytotoxic effects, the chemotherapy could decrease the serum VEGF levels. Irinotecan seems to decrease the serum VEGF level independent of its cytotoxic effect. We found that the chemotherapy drugs decreased the VEGF secretion at the lower doses. If we think about angiogenesis on course of disease, especially the relationship between metastases, decreasing VEGF levels with chemotherapeutics could be important in cancer treatment.

Key words: VEGF, angiogenesis, cytotoxicity, MTT, colon cancer, breast cancer, stomach cancer.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren, sayesinde pek çok pratik bilgi ediniş kendime çok şey katabildiğim, her zaman ılımlı ve eğitici çok değerli hocam Prof.Dr. Hakan AKBULUT'a en içten teşekkürlerimle başlamak istiyorum. Kendisinin ayrıca kanserden kaybettiğim dedemin doktoru olması dolayısıyla bu tezde onunla çalışmak benim için bu tezi daha anlamlı kılıyor. Bana bu fırsatı verdiği ve güvendiği için ne kadar teşekkür etsem az...

Teşekkürün yanında özellikle tezimin son dönemindeki yoğunluğundan dolayı çaldığım vakitler için hocamın eşinden ve kızlarından özür diliyorum.

Tüm laboratuvar çalışmalarım boyunca hiçbir zaman desteğini eksik etmeyen, ihtiyacım olduğu her zaman işime kendi işi gibi koşan Nalan AKGÜN'e, bildiğimiz her şeyi birbirimizle paylaştığımız Pınar BAYDIN'a ve bu huzurlu çalışma ortamı için her ikisine çok teşekkür ediyorum.

Hasta kanları toplamam aşamasında bana çok yardımcı olan, adeta Hızır gibi yetişen Uzm. Dr. Güze ÖZAL'a, Dr. Ozan YAZICI'ya,

Yoğunluğuna rağmen gösterdiği iyi niyetle çalışmaya koyduğu hastaları için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Zeki ÜSTÜNER'e,

Yine çalışma hastalarımın tamamlanması için yaptığı katkıları nedeniyle Ankara Numune Hastanesi Başhekimi ve Tıbbi Onkoloji Klinik Şefi Doç. Dr. Nurullah ZENGİN'e,

Yaşamım boyunca beni maddi, manevi destekleyen, akademik kariyer yapmamı belki benden daha çok isteyen, eşlerini, benzerlerini bulamayacağım inanılmaz aileme; sevgili annem Nurcan ENFEZ'e, babam Mustafa ENFEZ'e ve kardeşim Hakan ENFEZ'e,

Onlarsız teşekkürü tamamlayamayacağım elbette ki başta ananeme, teyzemlere, -kayın kelimesinden hoşlanmadığım için ikinci anne ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ve elbette ki her zaman yanımda olan sevgili eşim Tamer AKTAŞ'a binlerce teşekkürler...

Ve dedeme, teşekkür edemediğim herşey için...

Bu tez sana ithaf olunur...

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Karsinogenez	6
2.1.1. Hücre döngüsü ve kanser.....	7
2.2. Anjiyogenez.....	12
2.2.1. Anjiyogenez ve VEGF araştırmaları tarihçe.....	12
2.2.2. Anjiyogenez oluşum basamakları.....	13
2.2.3. Anjiyogenik dönüşüm (switch).....	15
2.2.4. Anjiyogenik aktivatörler ve inhibitörler.....	15
2.3. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü.....	17
2.3.1. Genel Bilgiler.....	17
2.3.2. VEGF reseptörleri.....	18
2.4. Kolon kanseri.....	20
2.5. Meme kanseri.....	21
2.6. Mide kanseri.....	22
2.7. Kanser tedavisi: Kemoterapi.....	23

3. HASTALAR ve YÖNTEM.....	26
3.1. Hasta profili ve örneklerin elde edilmesi.....	26
3.2. İn vitro araştırmalar için hücre kültürü çalışmaları.....	27
3.3. İlaçlar.....	27
3.4. Sitotoksisite deneyleri.....	27
3.5. VEGF Tayini: Hücreden salgılanan ve kan örneklerindeki VEGF'in tayini.....	28
3.6. İstatistik.....	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. Tedavi yanıtı.....	29
4.2. Sitotoksisite.....	29
4.3. Serum VEGF düzeyleri ve hücre kültürü VEGF düzeyleri.....	41
5. TARTIşMA ve SONUÇ.....	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1: Anjiyozde rol alan fizyolojik ve patolojik durumlar

Şekil 2.1: Hücre siklusu kontrol noktaları

Şekil 2.2: Tümör Anjiyogenez Faktör

Şekil 2.3: Anjiyogenez oluşum basamakları

Şekil 2.4: VEGF ailesi ligand ve reseptörleri

Şekil 2.5: VEGF ve dokulara göre reseptör dağılımı

Şekil 3.1: HT-29 hücrelerinde 5-FU ile in vitro sitotoksisite grafiği

Şekil 3.2: HT-29 hücrelerinde dosetaksel ile in vitro sitotoksisite grafiği

Şekil 3.3: HT-29 hücrelerinde irinotekan ile in vitro sitotoksisite grafiği

Şekil 3.4: HT-29 hücrelerinde oksaliplatin ile in vitro sitotoksisite grafiği

Şekil 3.5: HT-29 hücrelerinde paklitaksel ile in vitro sitotoksisite grafiği

Şekil 3.6: HT-29 hücrelerinde adriamisin ile in vitro sitotoksisite grafiği

Şekil 3.7: Primer mide kanseri hücrelerinde 5-FU ile in vitro sitotoksisite grafiği

Şekil 3.8: Primer mide kanseri hücrelerinde dosetaksel ile in vitro sitotoksisite grafiği

Şekil 3.9: Primer mide kanseri hücrelerinde irinotekan ile in vitro sitotoksisite grafiği

Şekil 3.10: Primer mide kanseri hücrelerinde oksaliplatin ile in vitro sitotoksisite grafiği

Şekil 3.11: Primer mide kanseri hücrelerinde paklitaksel ile in vitro sitotoksisite grafiği

Şekil 3.12: Primer mide kanseri hücrelerinde adriamisin ile in vitro sitotoksisite grafiği

Şekil 3.13: MCF-7 hücrelerinde 5-FU ile in vitro sitotoksisite grafiği

Şekil 3.14: MCF-7 hücrelerinde dosetaksel ile in vitro sitotoksisite grafiği

Şekil 3.15: MCF-7 hücrelerinde irinotekan ile in vitro sitotoksisite grafiği

Şekil 3.16: MCF-7 hücrelerinde oksaliplatin ile in vitro sitotoksisite grafiği

Şekil 3.17: MCF-7 hücrelerinde paklitaksel ile in vitro sitotoksisite grafiği

Şekil 3.18: MCF-7 hücrelerinde adriamisin ile in vitro sitotoksisite grafiği

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1: Anjiyogenik faktörler ve anjiyogenezi önleyen faktörler

Çizelge 2.1: Hasta özellikleri

Çizelge 2.2: In vitro deneylerde kullanılan hücrelerin çeşitli kemoterapi ilaçlarına olan duyarlılıkları (IC50 değerleri,/mL)

Çizelge 2.3: Hastaların tanılarına, kullanılan ilaç tipine göre VEGF düzeyleri

Çizelge 2.4: Tedavide kullanılan ilaç kombinasyonlarına göre yanıt oranları ve tedavi sonrası VEGF değişimi arasındaki ilişki

Çizelge 2.5: Çalışmaya alınan hastaların tanılarına göre yanıt oranları ve tedavi sonrası VEGF değişimi

Çizelge 2.6: Çalışmada kullanılan kanser hücre dizilerinde kemoterapi ilaçlarının VEGF düzeylerine etkisi

SİMGELER DİZİNİ

5-FU: 5- Fluorourasil

BCL2: B Cell Lymphoma 2, B Hücreli Lenfoma 2

BCR/ALB: Breakpoint Cluster Region/ Abelson murine Leukemia füzyon proteini

BER: Base Excision Repair, Baz Kesip Çıkarma

BM: Basal Membrane, Bazal Membran

BRCA1: Breast Cancer 1, Meme Kanseri 1

BRCA2: Breast Cancer 2, Meme Kanseri 2

CDK4: Cyclin Dependent Kinase 4, Siklin Bağımlı Kinaz 4

C-ERBB2: Human Epidermal growth factor Reseptor 2, İnsan Epidermal büyüme faktörü Reseptörü 2

c-MYC: myelocytomatosis oncogene, myelositomatozis onkogeni

DCC: Deleted in Colorectal Carcinoma, Kororektal Karsinomda Silinen protein

DCF: Dosetaksiel + Cisplatin + 5-FU, Dosetaksiel + Sisplatin + 5-Fluourourasil

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Serum

DNA: Deoxyribonucleic acid, Deoksiribo Nükleik Asit

ECM: Extracelular Membrane, Ekstraselüler Membran

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Enzim Bağlantılı İmmün Test

FAP: Familial Adenomatous Polyposis, Ailesel Adenomatöz Polipozis

FGF: Fibroblast Growth Factor, Fibroblast Büyüme Faktörü

FLT1: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1, Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü 1

FOLFIRI: Folinic acid (leucovorin) + Fluorouracil + Irinotekan, Folinik asit + Fluourourasil + İrinotekan

FOLFOX: Folinic acid + Fluorouracil + Oksaliplatin, Folinik asit + Fluorourasil + Oksaliplatin

HCl: Hydro Chloric Acid, Hidroklorik Asit

HNPCC: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer, Herediter non-polipozis Kolorektal Kanseri

HT-29: Human colon adenocarcinoma cells, İnsan kolon adenokarsinom hücre hattı

IC50: Half maximal inhibitory concentration, Maksimum inhibitör konsantrasyonunun yarısı

KDR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2, Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü 2

KRK: Kolorektal Kanser

LOH: Loss of Heterozygosity, Heterozigotluğun kaybolması

MCF-7: Human breast adenocarcinoma cell line, İnsan meme adenokarsinom hücre hattı

MET: Mesenchymal-epithelial transition factor, Mezenşimal-epitelyal geçiş faktörü

ml: Mililitre

MMP: Matrix Metalloproteinases, Matriks Metalloproteinazlar

MMR: Mismatch Repair, Yanlış eşleştirme onarımı

MTT: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide, 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid

NER: Nucleotide Excision Repair, Nükleotid kesip çıkarma

NF1: Neurofibromatosis type-1, Nörofibromatozis tip-1

NF2: Neurofibromatosis type-2, Nörofibromatozis tip-2

NO: Nitric Oxide, Nitrik Oksit

NRP1: Neurophilin 1, Nörofilin1

P: Null hipotezinin doğru olma olasılığı

p53= TP53: Tumor protein 53

pg: Pikogram

PIGF: Placental Growth Factor, Plasental Büyüme Faktörü

PTEN: Phosphatase and tensin homolog protein, Fosfataz ve tensin homolog protein

RAS: Rat sarcoma oncogene, Sıçan sarkoma onkogeni

Rb: Retinoblastoma

RB1: Retinoblastoma protein

RET: REarranged during transfection gene, Transfeksiyonda yeniden düzenlenen protein.

RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute Medium, Roswell Park Memorial Enstitüsü Besiyeri

SN-38: 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin, 7-etil-10 hidroksil-kamptotekin

TAF: Tumor Angiogenic Factor, Tümör AnjiyogenikFaktör

TGF α ve β : Transforming Growth Factor α and β , Dönüştürücü Büyüme Faktörü α ve β

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor, Damar Endotelyal Büyüme Faktörü

WT1: Wilms Tumor Protein, Wilms Tümör Protein

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

1. GİRİŞ

Kanser, son yıllarda insidansı ve mortalitesi hızla artan bir hastalıktır. Yüzyılın başlarında ölüme neden olan hastalıklar sıralamasında 7., 8. sıralarda yer alırken bugün birçok ülkede kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırayı almıştır (Haydaroğlu 2007). En sık görülen kanser türleri erkeklerde akciğer(%22), kolorektal(%12) ve prostat(%11) iken kadınlarda ise meme(%26), kolorektal(%14) ve midedir(%7) (TKASKD 1995).

Kanser türlerinin dağılımı ülkelere göre farklılık göstermekle birlikte kolorektal kanserlerin (KRK) gelişmiş batılı ülkelerde önemli sağlık problemlerinden biri olduğu görülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda yaklaşık 150.000 yeni olgu tespit edildiği ve bunların da yaklaşık üçte birinin bu hastalıktan öldüğü hesaplanmaktadır. Ülkemizde sağlıklı istatistikler bulunmamakla birlikte Sağlık Bakanlığı verilerine göre KRK tüm kanserler içinde 4.sırayı almaktadır (Li & Kantor 1997, Eser 2007) . 1960'lı yıllardan itibaren KRK hastaların 5 yıllık sağkalım oranlarında anlamlı artışlar gözlemlenmiştir. Sağkalımdaki bu artış daha radikal cerrahi girişimlerin yanında cerrahi öncesi evreleme, daha iyi patolojik değerlendirmeler ve adjuvan tedavilerin uygulanması sonucudur (Akbulut H. 2005).

Meme kanseri tüm dünyada kadınlarda en çok görülen kanser türlerinin başında gelir. Yapılan bazı araştırmalarla ABD'de kadın kanserlerinin %29.7'sini (1998) ve Türkiye'deki kadın kanserlerinin %26'sını (1995) oluşturduğu tespit edilmiştir. İnsidansında artışa rağmen erken tanı yöntemleri ve etkin tedavi yaklaşımlarıyla mortalitesi azalma eğilimindedir (Onur 2005).

Mide kanseri insidansında son yıllarda bir azalma izlenmektedir. 20.yüzyılın son çeyreğine kadar kanser vakalarının önemli bir bölümünü oluşturan mide kanseri diyet, gıda hazırlama yöntemleri ve çevresel faktörlerin iyileştirilmesine paralel olarak batı dünyasında insidansında anlamlı azalmalar izlenmiştir (Karpeh M.S. et al. 2001). Ülkemizde ise mide kanseri hala çok önemli bir sorun olup tüm kanserler içinde erkeklerde 2. ve kadınlarda ise 3. sırayı almaktadır. Batıdaki insidans patternine paralel olarak da ülkemizde özellikle doğudan batıya doğru bir insidans azalması dikkati çekmektedir (Eser 2007) .

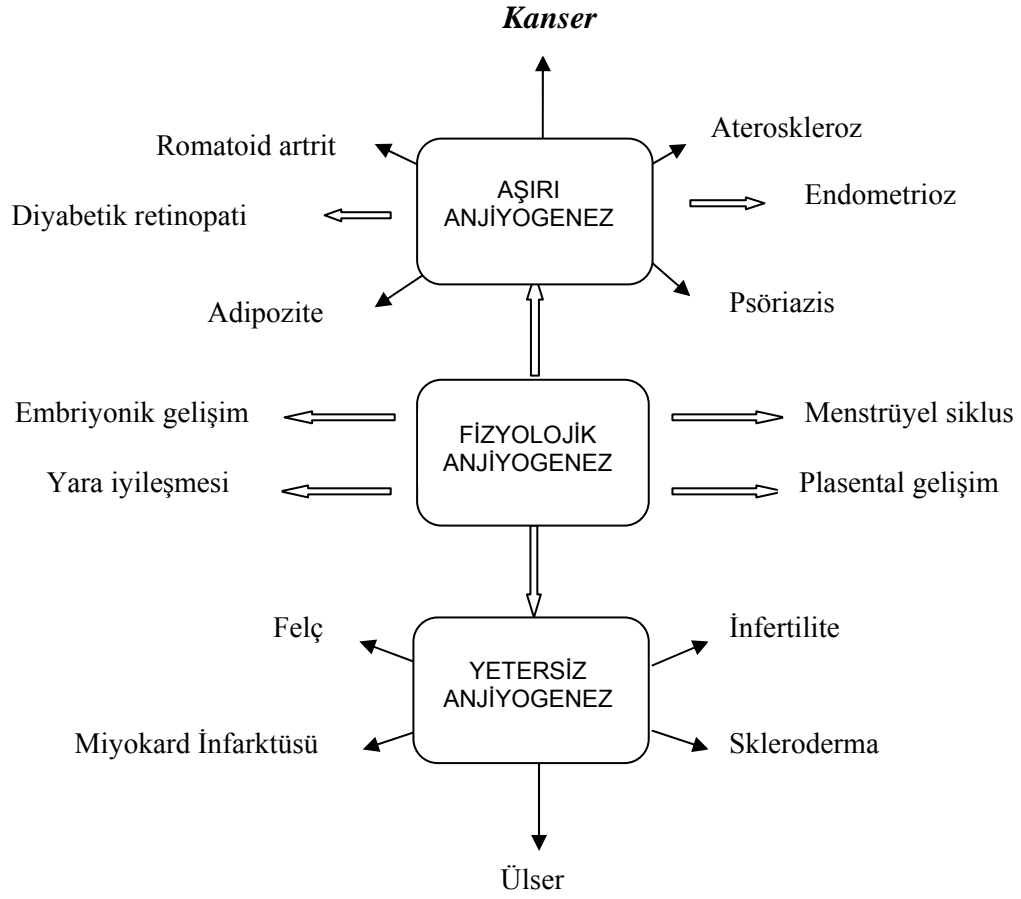
Kanser tedavisinde mortaliteyi azaltmak ve sağkalımı artırmak için farklı birçok tedavi modaliteleri kullanılır. Bunlar: cerrahi, radyoterapi, kemoterapi-hormon tedavisi ve yeni tedavi yöntemlerinden immunoterapi, sinyal ileti sistemi inhibitörleri, gen tedavisi ve anjiyogenez inhibitörleri olarak sayılabilir (Dellabona P. et al. 1999, Terrero M.N. 2004).

Kanser tedavisi için son yıllarda çok sayıda ilaç ve yeni tedavi yöntemleri geliştirilmiş olmasına karşın günümüzde ilerlemiş kanser vakalarında şifa sağlayıcı tedavi seçenekleri hemen hemen yok gibidir. Bu durum özellikle kanser gelişim sürecinin karmaşıklığı ve henüz aydınlatılması gereken çok sayıda noktaların olması ile kısmen açıklanabilir.

Kanser hücrelerinin otonomi, kontakt inhibisyon, apoptozisi baskılama, anjiyogenez, ölümsüzlük, invazyon ve metastaz gibi birtakım temel özellikleri vardır (Akbulut H. ve Akbulut K.G. 2005). Bu özelliklerden anjiyogenez belki de üzerinde en çok çalışılanıdır.

Tümörler besinlerini difüzyon yolu ile sağlayarak ancak 1-2 mm çapında küçük hücre popülasyonları şeklinde yaşamlarını sürdürebilirler. Difüzyon yolu ile beslenme daha büyük tümörlerin gelişimi ve bunun sonucunda klinik kanser hastalığı oluşturabilmeleri için yetersiz kalmaktadır. Tümörün büyümesi, yeterli miktarda besin, oksijen, proteolitik enzim ve diğer gerekli elementleri sağlamak için tümör anjiyogenezi adı verilen süreçle yeni kan damarlarının oluşması gerekir (Tobelem 2007).

Anjiyogenez, mevcut damar yapılarından yeni kan damarlarının oluşması anlamına gelir (Ribatti D. 2004). Fizyolojik durumlarda; menstrüel siklus boyunca endometriyumda, yara iyileşmesi boyunca doku rejenerasyonu ya da onarımında, embriyogenez sırasında diferansiyasyon ve organ gelişimi için anjiyogenez limitli bir turn-over ile devam eder (Werther et al. 2000, Maharaj A.S.R. et al. 2007). Fizyolojik durumlarda izlenen anjiyogenez organizmanın bütünlüğünün korunması ve dengenin devam etmesi açısından önem taşırken, tümörlerde izlenen anjiyogenez hastalığın ilerlemesi ve vücuda yayılmasında çok önemli rol oynar (Konukoğlu 2005).



Şekil 1.1: Anjiyogezde rol alan fizyolojik ve patolojik durumlar

*Dr. Ayşe Sibel Turgutun uzmanlık tezinden alınmıştır.

Normalde anjiyogenez süreci çok sıkı bir denetim altındadır. Anjiyogenez birçok faktör tarafından uyarılır ya da inhibe edilir. Tümörlerde inhibitör ve uyarıcılar arasındaki denge genellikle uyarıcılar lehine bozulur (Zetter B.R. 2008).

Anjiyogenezi uyaran başlıca faktörler arasında damar endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), anjiyogenin, anjiyotropin, transforme edici büyüme faktörü (TGF α ve β) ve epidermal büyüme faktörü yer alırken, inhibitörleri arasında ise angiostatin, endostatin ve trombospondin-1 bulunur. Anjiyogenez bu uyarıcı ve inhibe edici faktörler arası dengesizlik sonucu başlar ve bu durum anjiyogenetik dönüşüm (switch) olarak bilinir (Tobelem 2007).

Anjiyogenezde en potent uyarıcılardan biri damar endotelial büyüme faktörü (VEGF) dür. VEGF, özellikle vasküler endotelium üzerinde anjiyogenik, mitojenik ve vasküler permeabilite arttırıcı etkileri olan, homodimerik yapıda, 45 kDa ağırlığında çok fonksiyonlu bir glikoproteindir (Tobelem 2007, Kumar H. et al 1998, Wynendaele W. et al. 1999). VEGF'ün tümör büyümesindeki etkilerini ise şu şekilde sıralamak mümkündür: Endotelial hücre proliferasyonu ve sağkalımı, neovaskülarizasyonun uyarılması, artmış intratümoral basınç ve konakçı immün cevabının baskılanması (Tobelem 2007).

Kanserli hastalarda serum VEGF düzeyleri ile hastalığın seyri arasındaki ilişki uzun süredir araştırılan bir konudur . Kanserli hastalarda serum VEGF düzeyleri ile hastalığın evresi ve prognozu arasında bir ilişki olduğunu gösteren çalışmaların yanı sıra herhangi bir ilişki göstermeyen çalışmalar da söz konusudur .

KRK, meme ve mide kanserli hastalarda serum VEGF düzeylerinin hastalığın prognozunu belirlemede anlamlı olup olmadığını gösteren birçok araştırma yapılmıştır. Bazı araştırmalarda hastalık derecesini değerlendirmede, adjuvan terapiye ihtiyaç duyan hastaları seçmek için VEGF ölçümünün anlamlı olabileceği ortaya konulurken bazı araştırmalar da ise anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Kumar H. et al 1998, Fujisaki K. et al. 1998, Werther K. et al. 2000, Fidler I. J. et al. 2001, Akbulut H. et. al. 2002, Broll R. et al. 2001, Gonzales F-J et al. 2007, Karayiannakis A.J. et al. 2002, Berglund A. et al. 2002, Heer K. et al 2001). Günümüzde serum VEGF düzeylerinin yukarıda sayılan kanser türlerinde hastalığın prognozu konusundaki rolü hala tartışmalıdır.

Kemoterapi esas olarak kanser hücrelerinin öldürülmesini hedefleyen bir tedavi şeklidir. Ancak mevcut kemoterapi ajanlarının değişik kanser türlerindeki etkinliği sınırlıdır. Bazı kemoterapi ilaçları ise, örneğin paklitaksel , düşük dozlarda kullanıldıklarında tümörlerin damarlanmasını azaltarak hastalığın kontrol edilmesine yardımcı olabilmektedir. Kemoterapi ilaçlarının bu etkilerinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Anjiyogeneizde önemli bir rol oynayan VEGF'nin tümör hücreleri tarafından salgılanmasının baskılanması mekanizmalardan birisi olmaya aday görünmektedir. Son yıllarda yapılan kemoterapi cevabı ile VEGF düzeylerindeki düşüş arasında bir korelasyon olduğunu gösteren çalışmalar yayınlanmaya başlamıştır (Vincenzi et al. 2007). Serum VEGF düzeyleri bu anlamda kemoterapi ilaçlarının bu amaçla kullanılmasını belirlemede yararlı olabilir. Fakat bu çalışmalarda kemoterapiye iyi yanıt veren hastalarda serum VEGF değerlerinin anlamlı olarak düşmesi, söz konusu ilaçların VEGF'yi baskılaması mı yoksa tümör kitlesinin küçülmesinden mi kaynaklandığı konusu çok net değildir. Biz bu çalışmada çeşitli kemoterapötik ilaçların VEGF üzerindeki etkilerini hem in vivo olarak metastatik kanserli hastalarda ve hem de in vitro olarak hücre kültürlerinde araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karsinogenez

Kanser genetik bir hastalıktır. Kanser gelişimi ile ilgili değişik teoriler olmakla birlikte hücreler karsinogenez sürecinde genetik değişikliklerin ve çevresel faktörlerin etkisiyle çok basamaklı bir süreç içinde bazı temel özellikler kazanır. Kanser hastalığının ortaya çıkabilmesi için tümör hücrelerinde mutlaka bulunması gereken özellikler başlıca otonomi (bağımsız çoğalabilme), kontrolsüz çoğalma (kontak inhibisyon kaybı), apoptozisin baskılanması, anjiyogenez, ölümsüzlük, invazyon ve metastaz yeteneğidir. Bu özelliklere sahip olan hücrelerin çoğalması ile kanser hastalığı ortaya çıkar (Akbulut H. ve Akbulut K.G. 2005).

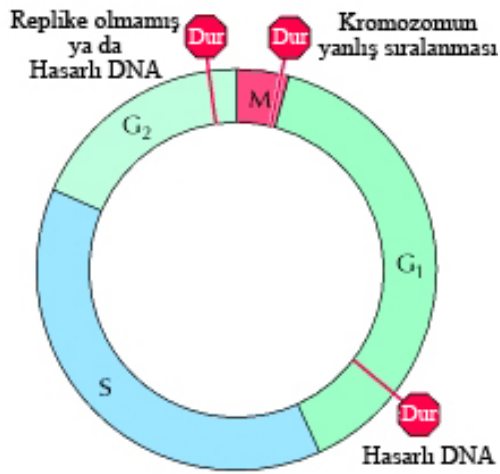
Kanser hücrelerinde izlenen bu fonksiyonel değişikliklere hücrelerin genetik materyalinde meydana gelen bazı değişiklikler neden olur. Karsinogenez sürecindeki genetik değişiklikler genel olarak ; genomik dayanıksızlık, kromozom kaybı, kromozomların yeniden düzenlenmesi veya insan kromozomlarının lokuslarına yabancı DNA dizilerinin(genellikle viral DNA dizileri) girmesi şeklinde özetlenebilir (Fışkın K. 2002).

Genlerde izlenen değişikliklerin bir kısmı kalıtsal olabildiği gibi önemli bir kısmı ise çevresel faktörlerin etkisiyle ortaya çıkmaktadır. Çevresel faktörler arasında ise radyasyonu, beslenme tarzı gibi kişisel alışkanlıkları, meslekle bağlantılı olarak bazı ajanlara sürekli maruz kalma durumundaki, örneğin akciğer kanserinde asbestoz, arsenik ilişkisi, lösemi de benzen ilişkisi, kanser gelişimini saymak mümkündür (Fışkın K. 2002 , Bilir N.2007).

2.1.1. Hücre Döngüsü ve Kanser

Normalde hücreler proliferatif uyarılara bağlı olarak gereken durumlarda bölünürler. Kansersiz hücrelerde ise mutasyonlar sonucunda normal hücrelerde görülen kontrollü büyüme süreci kaybolmuştur (Evan G.I. and Vousden, K.H 2001). Kansersiz hücrelerinde sıklıkla hücre döngüsünün düzenlenmesinde bir defekt söz konusudur (Fışkın K. 2002).

Hücre döngüsü bir G₂/M geçişi, bir diğeri S fazına girmeden önceki geç G₁ fazının da dahil olduğu noktada ve M kontrol noktasında olmak üzere farklı noktalarda denetlenir (Fışkın K.).



Şekil 2.1: Hücre Siklusu Kontrol Noktaları

*The cell, A Molecular Approach Second Edition, Geoffrey M. Cooper, Figure 14.8'den uyarlanmıştır.

Bu denetim noktalarının her birinde, ilgili proteinlerce döngünün ilerlemesine veya durmasına karar verilmektedir. Bu kararların verilmesinin kontrolü, hedef proteinleri seçip fosforile eden bir enzim ailesinden olan protein kinazlar ve hücre döngüsünün işlerliğini kontrol eden siklin adlı proteinler tarafından yapılır (Fışkın K. 2002).

İlk kontrol noktası geç G₁ fazı olup hücrenin G₁ fazını terkedip S fazına geçebilmesi için DNA'nın hasarsız olması gerekmektedir. Aksi takdirde hasar onarılanaya kadar hücre bu kontrol noktasında durur. Hasar onarılamayacak boyutta ise birkaç saat alan G₁

noktasındaki bu durma p53'ün girmesiyle uzatılır (Cabadak, H. 2008, Kastan, M. and Bartek, J. 2004).

Kanser hücrelerindeki genetik bozukluğun en önemli nedenlerinden biri hücre döngüsünün kontrolünün herhangi bir basamakta bozulmasını sağlayan mutasyonlardır. Örneğin G1 kontrol noktasında görev alan kinazları ya da siklinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonların hücrelerin malign dönüşümünde önemli rol alabileceği düşünülmektedir (Fışkın K. 2002). Ayrıca G2 fazında tamir mekanizmalarından kaçmış hasarlı DNA veya replike olmamış DNA varsa bu fazda kontrol edilir.

Buna ek olarak, tam bir kromozom takımının yavru hücrelere geçmesini sağlamak üzere kromozomların mitoz sırasındaki dizilimlerini kontrol eden M kontrol noktası bir diğer önemli kontrol noktasıdır. Eğer, hatalı dizilim sonucu kromozomların tam bir takımının yavru hücrelere dağılımında bir problem olursa hata giderilinceye kadar mitoz fazının metafazında siklus durur.

Özetle, normal hücreler DNA sekansında oluşan hasarlı nükleotidleri normal moleküllerle değiştirme, tamiri olanaksız DNA hasarında ya da yanlış, eksik, gereksiz olarak fazla transkribe olmuş DNA söz konusu olduğunda ise apoptoz adını verdiğimiz mekanizmanın devreye girmesi gibi hataları saptayan, yok etmeye çalışan mekanizmalara sahiptirler. Sonuç olarak, kontrol noktaları genetik defektlerin düzeltilmesi için hataların saptanmaya çalışıldığı önemli yerlerdir. Böylece, DNA'sını sadece doğru bir şekilde ve tam olarak replike etmiş hücrelerin döngüde ilerlemesine izin verilir.

Buna karşılık kanser dokusunda hızlı bir hücre çoğalması ve dokunun büyümesi söz konusudur. Kanser dokusunun büyümesinde belli başlı 4 ana mekanizma önemli rol oynamaktadır:

1. *Apoptosis* mekanizmasındaki problemler,
2. Hücre proliferasyonunu istenmeyen biçimde uyaran *genetik defektler*,
3. *Tümör baskılayıcı genlerdeki bozukluklar* ve
4. *Tümör anjiyogenezi*.

Apoptosis:

Apoptoz, kanser gibi patolojik olaylarda önemli olduğu kadar fizyolojik olaylarda da etkin rol oynamaktadır.

Hücre yapım-yıkımı apoptozun rol aldığı önemli fizyolojik olaylardan biridir. Örneğin; deri, barsak epiteli, kan hücreleri gibi hücre yapım-yıkımının hızlı olduğu dokularda yaşlanan hücreler apoptozla ortadan kaldırılır ve yerine yeni hücrelerin yapımı sağlanır. Apoptoz ayrıca, fetusun implantasyonundan organogenezise kadar tüm gelişim sürecinde yani embriyogenezde, metamorfozda, insanın embriyolojik gelişiminde; parmak aralarındaki zarın, sinir sisteminde istenmeyen nöronların ortadan kaldırılmasında, kurbağa tetarında kuyruğun ayrılmasında, erişkinde hormona bağlı involüsyonda; örneğin menstrüel siklusta endometriyal hücre yıkımında, menapozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin küçülmesinde ve bağışıklık sistemi hücrelerinin seçimi gibi pek çok olayda rol alır. Ek olarak, yenidoğan timusunun involusyonu sonucunda T lenfositlerin yaklaşık %98'inin seleksiyona uğradığı bilinmektedir. Ayrıca B hücrelerinde de lenfositlerinin duyarlı olduğu uyaranla yeniden karşılaşması durumunda hazır bulunmasını sağlamak amacıyla apoptozun baskılandığı belirtilmektedir (Tomatır 2003).

Apoptoz genetik olarak düzenlenir, hatalı ya da hasarlı DNA'nın apoptozis ile yok edilememesi sonucunda kromozom sayısının korunumunda devamlılık sağlanamaz ve anöploidi gibi istenmeyen durumlar oluşur (Melet A vd, 2008) Kanserli hücrelerde genellikle apoptozis baskılanmıştır. Bunun sonucu olarak tümör dokusu sürekli büyüme eğilimindedir.

Genetik defektler:

Kanser ile ilgili üç sınıf gen vardır: *onkogenler*, *tümör baskılayıcı genler* ve *DNA onarım genleri*.

Protoonkogenler normal hücrelerde hücre bölünmesinin kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmesinden sorumludur. Hücre membranındaki reseptöre bağlanan büyüme faktöründen, reseptöre ve çekirdeğe kadar giden yolda rol alan tüm protoonkogenler gerektiği zamanlarda aktivite göstererek normal hücre bölünmesi olaylarını kontrol ederler. Bu süreçte rol alan genlerden herhangi birisinde aktivasyonu artırıcı yönde bir değişiklik, mutasyon, meydana gelirse bu durum genellikle hücre çoğalmasının kontrolünün kayboması ile sonuçlanır. Hücre bölünmesinin düzenlenmesi için, bu genlerin ve/veya bu genlerin ürünlerinin inaktifleştirilmiş durumda olmaları gerekmektedir. Protoonkogen mutasyonlarının sonucunda *onkogen* adını verdiğimiz kontrolsüz hücre çoğalmasının uyarılmasına neden olan genler oluşur (Fışkın K. 2002).

Büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, sinyal iletim proteinleri ve transkripsiyon faktörleri onkogenlere örnektir. En iyi bilinen onkogenler: RAS, c-MYC, RET, MET, CDK4, BCR/ALB, BCL2'dir (Kopnin, B.P. 2000).

Tümör baskılayıcı genler:

Tümör baskılayıcı genler diğer adlarıyla anti onkogenler hücre bölünmesini durdurur. Yaptıkları işlev genelde onkogenlerin tersi yönündedir ve inaktivasyonları sonucu tümör gelişimi söz konusu olur (Akbulut H. ve Akbulut K.G 2005).

Tümör baskılayıcı genler ilk kez herediter ve sporadik formları olan ve çocukluk çağında en sık görülen göz içi tümörü retinoblastomda tespit edilmiştir (Fışkın 2002).

Tümör baskılayıcı genlere örnek olarak pro veya antiapoptotik proteinler, hücre siklusu kontrol proteinleri, DNA tamir proteinleri, hücrelerarası iletişimde görevli proteinler verilebilir. En iyi bilinen tümör baskılayıcı gen **p53** geni olup diğerleri: RB1, WT1, NF1, NF2, DCC, **BRCA1**, **BRCA2** dir (Kopnin, B.P 2000).

Alfred Knudson'ın 1971 yılında "ikili vuruş" hipotezinde de önermiş olduğu gibi tümör-baskılayıcı genin her iki allelinde oluşan mutasyonlar kanser gelişimini başlatmakta iken

onkogenin tek kopyasında meydana gelecek bir mutasyon kanser gelişimini başlatabilmektedir (Fışkın K. 2002, Knudson 1971).

DNA onarım genleri ise baz kesip çıkarma (BER), hasarın direkt geriye döndürülmesi, yanlış eşleştirme onarımı (MMR), nükleotid kesip çıkarma (NER), homolog rekombinasyon gibi aktivitelere sahip olup hücre döngüsü süresince oluşan mutasyonların onarılmasını sağlamaktadırlar (Wood 2001).

Onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarım genleri kanserle bağlantılı mutasyonlarda ana neden olmakla beraber mutasyonlar aynı zamanda karsinojenleri aktive ya da deaktive eden genlerde, hücre sinyal genlerinde, hücre döngüsü kontrol noktaları genlerinde, hücrel diferansiyasyon genlerinde, metastaz genlerinde, hücrel senesans genlerinde de olabilir (Pierotti MA 2003).

Tümör anjiyogenezi

Kanser ile ilgili gen bozukluklarının yanı sıra pek çok kanser hücresi kendi büyümesini stimüle eden büyüme faktörleri üretir. Bu da kanserin ilerlemesine zemin hazırlar.

Yeni damar gelişimi olmayan tümörler asemptomatik lezyonlar olarak kalır. Bu, tümörlerin damar gelişimi olmaksızın nasıl yıllarca yaşamı tehdit etmeyecek şekilde dormant halde kaldıklarının en iyi açıklamasıdır (Zetter, B.R. 2008).

Tümörlerin salgıladıkları büyüme faktörleri içinde Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) anjiyogenez oluşumunu sağlayan primer sitokindir.

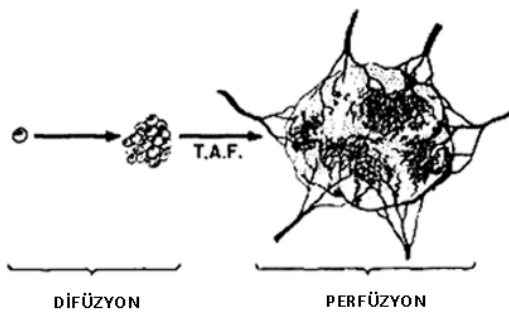
2.2. ANJİYOGENEZ

2.2.1. Anjiyogenez ve VEGF Araştırmaları Tarihçe

Anjiyogenez, mevcut vasküler yataktan yeni kan damarlarının oluşması anlamına gelir (Tobelem 2007, Wynendaele et al. 1999, Gonzales et al. 2007, Salven et al. 1997, Puchner et al. 2000, Kut et al. 2007, Larsson et al. 2002, Donati et al. 2008, Konukoğlu vd. 2005). Solid tümörlerde anjiyogenezin önemi ilk kez 70'li yılların başlarında Folkman ve arkadaşlarının çalışmaları ile ortaya konmuştur (Donati et al. 2008). Anjiyogenez mekanizması uzun yıllardır araştırılmasına ve iyi bilinmesine karşın anjiyogenezin en iyi hangi şekilde hedefleneceği halen araştırılmakta olan konular arasındadır (Liao et al. 2007).

Anjiyogenez ve Damar Endotelial Büyüme Faktörü araştırmaları oldukça eskiye dayanmaktadır: 1800 yılı sonları Rudolf Virchow ve diğer alman patologlar bazı insan tümörlerinin oldukça vaskülerize olduğu çıkarımında bulunmuşlardır (Ribatti,2004 (a)).

1971 yılında Folkman ve arkadaşları “endotelial hücreler için mitojenik olan ve yeni damarların yapılmasından sorumlu olan” o zamanlar “Tümör Anjiyogenik Faktör” (TAF) olarak tanımlanan ve bugün için Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) olarak bildiğimiz faktörü izole etmeye çalışmışlardır (J.Folkman et al. 1970).



Şekil 2.2: Tümör Anjiyogenez Faktör.

T.A.F,bugün bilinen adıyla VEGF'in tümör anjiyogenezindeki öneminin ortaya konulduğu J.Folkman'ın önemli makalesinde T.A.F'ın anjiyogenezde önemli olduğu ve bloke edilirse tümörün küçük bir çapta tutulabileceği açıklanıyor.

* J. Folkman et al. 1970. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis adlı makalesinden uyarlanmıştır.

Daha sonraki yıllarda değişik araştırıcı grupları vasküler sızıntıyı kontrol eden proteinleri saflaştırmaya çalışmışlardır. 1989 yılında Ferrara ve arkadaşları yalnızca endotelial hücreler için mitojenik olan bir protein izole etmişler ve bu özelliğinden dolayı bu proteine Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) ismini vermişlerdir (Ferrara N vd 1989)..

Bu alışmaları takiben VEGF ekspresyonunun en çok tümörün iskemik bölgelerinde olduğu gözlemlenmiş ve bu gözlemler doğrultusunda hipoksinin tümör anjiyogenezinde anahtar bir çevresel tetikleyici olabileceği ortaya çıkmıştır. Ayrıca endotel membranında VEGF ve diğer anjiyogenik faktörlerin bağlanabileceği VEGFR-1 (FLT1) ve VEGFR-2 (KDR) adı verilen iki adet tirozin kinaz reseptörü tanımlanmıştır (Hicklin DJ vd 2005).

1996 yılında faredeki tek bir VEGF alelinin susturulması (knockout) embriyogenik ölümlerle sonuçlanması , VEGF'nin tümör anjiyogenez gibi patolojik anjiyogenez yanısıra normal embriyogenik gelişim için gerekli olduğunu ortaya koymuştur (Carmeliet, P. et. al. 1996).

2.2.2. Anjiyogenez Oluşum Basamakları

Kan damarları iki farklı aşamada oluşur. Öncelikle, embriyogenik gelişim boyunca ilk vasküler yapı, anjiyoblast adıyla da bilinen endotelial prekürsör hücrelerin vaskülojeniz olarak bilinen bir süreçte diferansiyasyonu ile oluşur. Anjiyogenez ve vaskülojeniz ayrımındaki ince nokta yukarıda da belirtildiği üzere vaskülojenizin primer damarları oluşturması, anjiyogenezin ise bu primer damarlardan dallanma sonucuyla yeni damar oluşturmasıdır. Primer kapiller pleksus oluştuğunda, yeni kan damarları anjiyogenez ile fonksiyonel ve organize bir damar ağı oluştururlar. Anjiyogenik dallanmayı anjiyogenez aktivatörleri ve inhibitörleri arasındaki denge düzenler (Liao et al. 2007, Maharaj et al. 2006, Maharaj et al. 2007). Anjiyogenez basamaklarını maddeler halinde özetleyecek olursak:

1. *Vazodilatasyon*

Öncelikle, kan damarları vazodilatasyona uğrar, bu basamak VEGF ve Nitrik Oksit (NO) tarafından başlanır. VEGF vasküler geçirgenliği de arttırarak vazodilatasyona katkıda bulunur. Vasküler geçirgenliğin artışıyla VEGF ve plazma proteinleri ekstravaze olabilir ve endotelial hücrelerin göçü için gerekli ekstraselüler matriksin oluşumu sağlanır. Bu süreç vasküler geçirgenlik inhibitörlerince düzenlenir (Liao et al. 2007, Maharaj et al. 2006).

2. *Bazal Membran ve Ekstraselüler Matriksin Proteolizi*

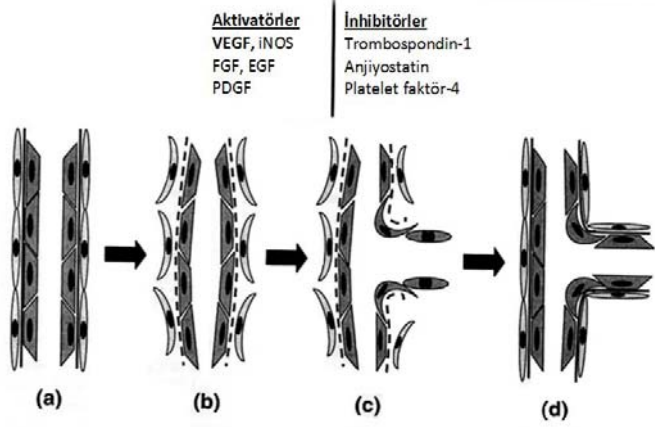
Matriks Metalloproteinaz (MMP) adı verilen enzimlerle ekstraselüler matriks proteinleri degrade edilir dolayısıyla damar stabilizasyonu bozulur ve endotelial hücreler, hücrelerarası kontaklarını kaybeder ve onları destekleyen düz kas hücrelerinden ayrılırlar. MMP'ler ekstraselüler matriksi parçalayıp ortaya çıkan boşluklarda endotelial hücreleri rahatlıkla göç edebilir (Donati et al. 2008, Liao et. Al. 2007).

3. *Endotel hücrelerin proliferasyon ve migrasyonu*

Endotelial hücreler ECM ve BM yıkımını takiben göçlerini uyarıcı birçok faktörün etkisi ile uzak bölgelere doğru ilerler (Liao et. Al. 2007). Bu uyarıcı faktörler arasında endotelial hücrelere spesifik davranan ve en iyi bilineni VEGF'dir.

4. *Lümen oluşumu ve olgunlaşma*

Normal fizyolojik koşullar altında endotelial hücrelerle sıkı bir ilişki halinde bulunan perisitler yeni damarlarının oluşturulması için yıkılan bazal membranı takiben ayrılırlar. Bazal membran yıkımı sonrası endotelial hücreler uyarının geldiği yöne göç ederler. Perisitler göç kolonuna çekilir ve yeni oluşturulan kan damarlarını çevreleyen bazal lamina oluşturulur. Yeni oluşan damarlarda perisit, endotelial hücreleri birlikteliği sayesinde damar yapısı yıllarca stabil olarak korunur (Liao et. Al. 2007).



Şekil 2.3: Anjiyogenez oluşum basamakları.

(a) endotelial hücre (koyu gri), bazal lamina (siyah çizgi) ve perisit (açık gri) birlikteliğindeki normal damar yapısı. (b) bazal membran yıkımını takiben perisit ayrılması. (c) anjiyogenik uyarana doğru endotelial hücrelerin göçü. (d) bazal membranın konumlanması, perisit tutunması ve lümen oluşumu.

*Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer adlı makaleden uyarlanmıştır.

2.2.3. Anjiyogenik Dönüşüm

Çoğu dokuda anjiyogenez düzenlenmesi uyarıcı ve inhibe edici faktörlerin dengesi tarafından kontrol altında tutulmaktadır. Anjiyogeneze gereksinim duyulduğunda ya anjiyogenik uyarıcıların seviyesinde bir artış ya da anjiyogenik inhibitörlerin seviyesinde bir azalış olur (Zetter 2008).

2.2.4. Anjiyogenik Aktivatörler ve İnhibitörler

Anjiyogenezin en potent aktivatörü VEGF'dir. Bunun dışında anjiyogenezin diğer aktivatörleri ve inhibitörleri Çizelge 1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1: Anjiyogenik faktörler ve anjiyogenezi önleyen faktörler

Anjiyogenik Faktörler	Anjiyogenezi Önleyen Faktörler
VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü)	Trombospondin-1
PGF (Plasental Büyüme Faktörü)	Anjiostatin
FGF (Asidik, bazik fibroblast büyüme faktör)	Endostatin
FGF-3 (Fibroblast Büyüme Faktör-3)	Vazostatin
FGF-4 (Fibroblast Büyüme Faktör-4)	Vasküler endotelial büyüme faktörü inhibitörü
TGF- α (Transforme edici büyüme faktör- α)	Trombosit faktör-4 fragmanı
TGF- β (Transforme edici büyüme faktör- β)	Prolaktin derivesi
EGF (Epidermal büyüme faktör)	Restin
HGF (Hepatosit büyüme faktör)	Proliferinle ilgili protein
TNF- α (Tümör nekroz faktör- α)	İnterferon α - β
PDGF (Trombosit kaynaklı büyüme faktör)	Anjiopoetin-2
GCSF (Granülosit koloni uyaran faktör)	Antitrombin-3 fragmanı
IL-8 (İnterlökin-8)	İnterferon ile indüklenabilen protein
Anjiogenin	10
Proliferin	

*Cerrahpaşa tıp dergisi Cilt (Sayı) 36 (1), Anjiyogenezin Temel Moleküler Mekanizmaları ve Tümör Anjiyogenezi adlı makaleden alınmıştır.

Yukarıda belirtilen anjiyogenik faktörlere ek olarak anjiyogenik dönüşümün önemli fizyolojik düzenleyicisi olan hipoksi, ayrıca düşük pH, hipoglisemi, inflamasyon, onkogen aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin delesyonu anjiyogenezi tetikleyen etmenler arasındadır (Fidler I. J. et al. 2001).

2.3. VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ

2.3.1. Genel Bilgiler

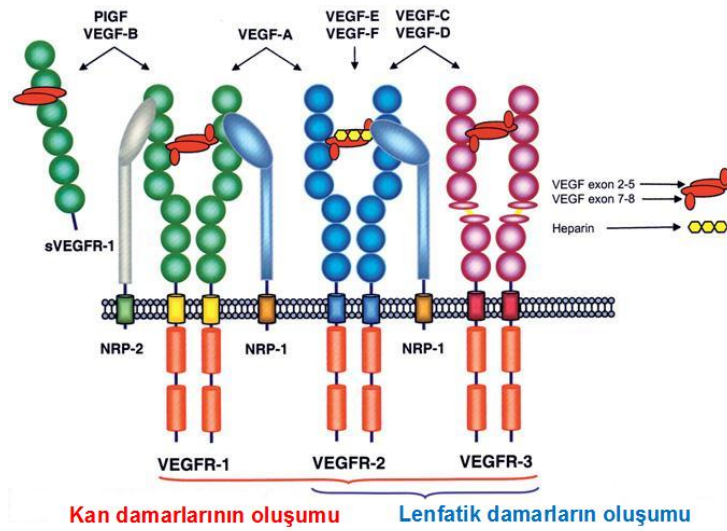
VEGF, tümör anjiyogenezinde rol alan \pm 45 kDa homodimerik yapılı, spesifik olarak vasküler endotelyum üzerinde etkili bir glikoproteindir [10,15]. Vasküler endotelyal hücrelerin gelişiminden, sağkalımından ve proliferasyonundan sorumludur (Kut et al. 2007).

İnsan VEGF geni kromozom 6p21.3'te lokalize olup 7 intron ile ayrılan 8 exonun alternatif değişimleri ile oluşur (Broll et al. 2001). VEGF gen ailesi VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve PlGF, Plasental Büyüme Faktörü, olmak üzere 5 üyeden oluşur . VEGF ile genellikle VEGF-A ifade edilmektedir. VEGF-A ailesinde alternatif splicingler sonucu oluşan farklı izoformlar bulunmaktadır (Wynendaele et al. 1999, Stefanini et al. 2008). Oluşan izoformlar , rakamlar içerdiği aminoasit sayısı olmak üzere, başlıca 5 tanedir: VEGF_{121,145,165,189,206} (Yazır 2007). Bu farklı varyantlar heparine bağlanma özelliklerine göre kendi aralarında ayrılırlar. Büyük olan formlardan VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆'nın heparine afiniteleri yüksektir, dolayısıyla hücre yüzeyine ve ECM 'e kuvvetle bağlanırlar. Küçük olan formlar yani VEGF₁₂₁ ve VEGF₁₆₅ ise heparin bağlanma domainleri az yada yetersiz olduğu için çözünebilen proteinlerdir. Bu nedenle VEGF₁₂₁ ve VEGF₁₆₅'i ELISA gibi immunoassay yöntemiyle serumda tespit etmemiz mümkündür (Broll et al. 2001, Liao et al. 2007). Kanda tespit edilen VEGF'ün çok büyük kısmı VEGF₁₆₅ dir (Karayiannakis et al. 2002, Stefanini et al. 2008). Ayrıca çözünebilen izoformların hücre yüzeyine bağlanan formlardan daha fazla tümörijenik ve anjiyogenik özellikleri olduğu öne sürülmüştür (Garvin et al. 2003).

2.3.2. VEGF Reseptörleri

VEGF etkilerini tirozin kinaz reseptörleri üzerinden gösterir. Bunlar: *VEGFR1* (*Flt -1*, *fms*-benzeri tirozin kinaz- 1) ve *VEGFR2* (*Flk-1*, fetal karaciğer kinaz -1/Kinaz domaini içeren reseptör) dir (Stefanini et al. 2008).

Reseptör tirozin kinazlar bir hücre dışı ligand bağlama domaini, bir transmembran domaini ve bir de stoplazmik tirozin kinaz domaini olmak üzere üç domaine sahip transmembran proteinlerdir (Carpenter C. L. et al. 2001).



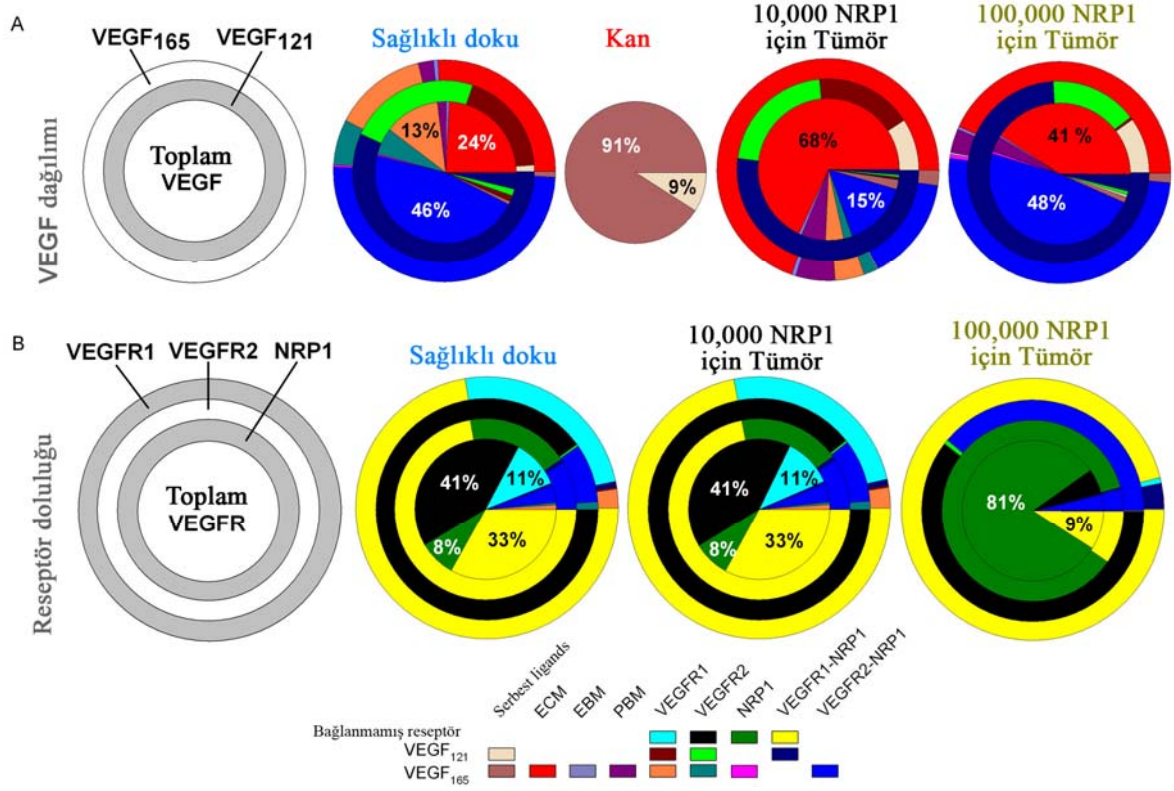
Şekil 2.4: VEGF ailesi ligand ve reseptörleri

*The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships adlı derlemeden uyarlanmıştır.

Reseptörün adından da anlaşıldığı üzere reseptör uyarımı sonucu reseptörün stoplazmik bölgesindeki tirozinden fosforillenme olur (Carpenter C. L. et al. 2001). Fosforillenme sonucu $-SH_2$ domaini olarak bilinen polipeptit segmentlerinin bu fosforillenen yapıya bağlanmalarına olanak sağlanmış olur. Böylece ilgili birçok protein birbiriyle etkileşime girerek neticede kinaz kaskadının son hedefi olan transkripsiyon faktörleri fosforillenir. Böylece gen transkripsiyonunda değişimler sonucunda anjiyogenezin uyarılması, vasküler permeabilitenin artması, mitojenez ve sağlıklı endotelial hücrelerin kemotaksisiyle ilgili genlerin ekspresyonu artar (Iqbal et al. 2004, Doğan 2004).

Sağlıklı dokudaki VEGF dağılımına bakıldığında VEGF'ün yaklaşık yarısından fazlasının reseptör tirozin kinaz VEGFR2 ve ko-reseptörü Nörofilin-1 ile kompleks

yapmış olarak bulunduğu görülür. Hastalıklı dokularda ise bu oran %15'lere kadar düşebilir (Stefanini et al. 2008).



Şekil 2.5: VEGF ve dokulara göre reseptör dağılımı.

*Stefanini et al. 2008. A compartment model of VEGF distribution in blood, healthy and diseased tissues adlı makaleden uyarlanmıştır.

Tümör yapısında ise VEGF'ün yarısından fazlasının ECM'e bağlı olduğunu, geri kalan anlamlı miktarın ise yine VEGFR2 ve ko-reseptörü Nörofilin-1 ile kompleks yapmış halde bulunduğu görülür (Stefanini et al. 2008).

Reseptör dağılımında ise sağlıklı dokuda ve tümör dokusunda benzer yüzdeler görülmekte olup VEGFR2'nin dağılımı diğer reseptörlere oranla fazladır ve ikinci sırayı VEGFR1-NRP1 reseptör kompleksi alır.

2.4. Kolon kanseri

Kolorektal kanserler ülkemizde ve dünyada sık görülen kanserlerden biridir. Kolorektal kanser (KRK), özellikle gelişmiş ülkelerde ana sağlık problemlerinden birini oluşturmaktadır. Etyolojisine bakıldığında temelde kolon mukozasındaki epitelyal hücrelerin genetik değişim süreci söz konusudur.

Kalın bağırsak kanserini tetikleyen faktörler arasında mutajen etkilere yatkınlık, fekal mutajenler, kırmızı et tüketimi, safra asitleri, yetersiz vitamin ve mineral alımı sayılabilir (Skibber, J.M. et. al. 2001). Bu faktörlerin yanı sıra ailesel adenomatöz polipoziskoli (FAP) ve Herediter non-polipozis kolorektal kanser (HNPCC) gibi genetik yatkınlık durumları da söz konusudur (Asmis T.R. et al 2008).

Esas tedavisi cerrahi olmakla beraber sadece cerrahi tedavi ile hastaların önemli bir kısmında cerrahiye takibeden ilk 3 yıl içinde nüksler ortaya çıkar. Son yıllarda metastatik kanser tedavisinde kullanılmaya başlanan irinotekan, oksaliplatin gibi yeni kemoterapi ajanları ve bevacizumab ve cetuximab gibi monoklonal antikorlar hastaların sağkalımında önemli ilerlemeler sağlamıştır (Doğan M, Akbulut et al. T. Klinikleri 2009).

KRK 'de kullanılan kemoterapi ilaçlarına bakıldığında 5-FU'in 1957 yılında ilk kez keşfinden beri sıklıkla kullanılmakta olduğunu görmekteyiz (Skibber J. M. et al. 2001).

Son on yıldır 3 sitotoksik ajan: oksaliplatin, irinotekan ve katesitabin ve 3 biyolojik ajan: bevasizumab, cetuximab ve panitumumab tedaviye eklenmiştir. Metastatik hastalıkta standart tedavi fluoropirimidin temelli kombinasyon tedavisidir. Sıklıkla 5-FU, Lökovorin ve Oksaliplatin kombinasyonu: FOLFOX yada 5-FU, Lökovorin ve İrinotekan kombinasyonu (FOLFİRİ) kullanılmaktadır (Zuckerman D.S. et al 2008).

2.5. Meme kanseri

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Bir kadında yaşamı boyunca meme kanseri geliştirme riski %10-12.2 olup başka bir ifadeyle her 8-10 kadından birisinin meme kanserine yakalanma riski olduğunu ifade eder (Onur 2005).

Seksenli yıllarda birçok onkogenin ve baskılayıcı genin keşfedilmesiyle hastalığın progresyonu ve büyüme faktörü ile steroid düzenleyici yolaklarla ilişkisi aydınlatılmaya başlanmıştır (Dickson R. B. et al. 2001).

Meme kanserindeki temel genetik defekt TP53 (p53), PTEN, Rb, BRCA-1, BRCA-2 gibi tümör baskılayıcı genlerdeki heterozigotluğun kaybolması (LOH) ya da C-ERBB2 ve C-MYC gibi onkogenlerdeki amplifikasyonlardır (Dickson R. B. et al. 2001).

Son yıllarda meme kanseri insidansında artış olmasına rağmen hastalığın mortalitesinde azalma söz konusudur. Hastalığın tedavisinde erken evrelerde cerrahi ve radyoterapi ile birlikte adjuvan amaçlı olarak uygulanan hormonal tedavi ya da kemoterapi hastaların sağkalımında önemli iyileştirmeler sağlamıştır. (Dickson R. B. et al. 2001).

Meme kanseri esas olarak kemoterapiye duyarlı bir tümördür. Metastatik hastalıkta şifa sağlanamasa bile kemoterapi ve eğer hormon reseptörleri pozitif ise tamoksifen veya aromataz inhibitörü ilaçlarla uzun süreli yaşam sağlanabilmektedir.

En sık kullanılan kemoterapötikler antrasiklin grubu (örn:Doksorubisin) ve taksan grubu (paklitaksel ve dosetaksel) ilaçlardır. Son yıllarda bevacizumab ve sorafenib gibi anti-anjiyojenik ilaçların da meme kanserinde etkili olduğu gösterilmiştir (Onur H 2005).

2.6. Mide kanseri

Mide kanseri tüm dünyada kanser bağlantılı ölümler arasında ilk sıralarda yer almaktadır (Moehler 2008).

Batı ülkelerinde gastrointestinal sistem kanserleri arasında kolon kanserinden sonra ikinci sırada görülürken ülkemizde birinci sırada yer alır (Eser 2007).

Tüm dünyada distal gastrik kanserin insidansında azalma olmasına rağmen proksimal kanserler (kardiya ve gastro-özafageal bağlantıda lokalize olan) artış göstermektedir (Moehler 2008).

Mide kanseri gelişme riskini arttıran faktörler arasında kötü hijyenik koşullarda saklanmış yiyecekler, aşırı tuz ve nitrat tüketimi, sigara gibi çevresel faktörlerin yanı sıra Helikobakter pilori de önemli bir etkidir. Bunların yanı sıra ailevi yatkınlık, Li Freumeni sendromu ve herediter nonpolipozis koli sendromu, gibi kalıtsal durumlar ve atrofik gastrit, pernisiyöz anemi de mide kanseri riskini arttıran faktörlerdendir (Karpeh M.S et al. 2001).

Hastaların önemli bir kısmı geç dönemde tanı aldığı için küratif cerrahi tedavi şansı bulunmamaktadır. Hastalığın sık görüldüğü Japonya'da rutin tarama yöntemleri ile hastalığın erken yakalanması sonucu yapılan cerrahi tedavi ile 5-yıllık sağkalım oranları %90'nın üzerine çıkmıştır (Moehler 2008).

Batı ülkelerinde ve ülkemizde ise hastaların önemli bir kısmı kliniğe geç başvurduğu için hastalığın küratif tedavi şansı ne yazık ki çok azdır. Cerrahi tedavi uygulanan hastaların yarısından çoğu nüks etmektedir. Nükseden hastalarda ve metastatik dönemde başvuran hastalarda ise tek tedavi seçeneği kemoterapidir (Moehler 2008).

Mide kanseri kemoterapisinde 5-florourasil önemli bir yer tutmaktadır. Bunun yanı sıra irinotekan, dosetaksel ve sisplatin de rutin tedavide yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ilaçlardır.

2.7. KANSER TEDAVİSİ: KEMOTERAPİ

Kemoterapi kelimesi ilk kez Paul Ehrlich tarafından ortaya atılmıştır. Bu tedavi yönteminde birçok kemoterapi ilacı kullanılmakla birlikte I. Ve II. Dünya Savaşında İngiltere tarafından gizli gaz programı kapsamında kullanılan alkilleyici ajanlar kemoterapötik ilaçların ilk sınıfını oluştururlar. II. Dünya Savaşında bu ajana maruz kalan kişilerde ilik ve lenfoid hipoplazisi saptanmış ve daha sonraları hematolojik neoplazmlarda bunun gibi ajanların direkt uygulanımı söz konusu olmuştur (Chu E. et al. 2001).

Alkilleyici ajanların dışında kemoterapide kullanılan pek çok kemoterapötik bulunmaktadır. Platin ilaçlardan oksaliplatin, antimetabolitlerden 5-fluorourasil, topoizomeraz etkileşimli ilaçlardan irinotekan, antimikrotübül ajanlardan dosetaksel ve paklitaksel, antibiotiklerden adriamisin bunlardan önemli birkaçıdır (Pamir A. 2001).

Oksaliplatin: Oksaliplatin, bir diaminosikloheksan platin olup etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte DNA da zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlanmalar yaparak DNA replikasyonunu ve transkripsiyonu engellemek suretiyle etki gösterdiği düşünülmektedir (Asmis T.R. et al 2008, Punt 1998).

İlk kez 1996 yılında metastatik kolon kanserinde kullanılmak üzere Avrupa'da ve 2002 yılında da ABD de onay almıştır. Metastatik kolorektal kanserli hastalarda birinci basamakta infüzyonel 5-FU ve Folinik asitle kombine edildiğinde kontrol koluna göre belirgin sağkalım avantajı sağlamaktadır. Evre 2 ve 3 KRK li hastalarda hastalısız sağkalımı uzattığı gösterilen oksaliplatin adjuvan tedavi için onay almış ve rutin olarak kullanılmaktadır (Doğan M, Akbulut et al, Türkiye Klinikleri 2009).

Oksaliplatinin VEGF düzeylerine etkisi çok iyi bilinmemekle birlikte VEGF ekspresyonu fazla olan tümör hücrelerinin oksaliplatine dirençli olduğu bildirilmiştir (Lim S. J. et al. 2008).

5-FU: 5FU, pirimidin metabolizmasında önemli olan timidilat sentazı inhibe ederek etki gösteren bir antimetabolittir. Karaciğerden ilk geçiş etkisiyle büyük oranda yıkıldığı için parenteral uygulanır. 1990'lı yılların ortalarına kadar KRK tedavisinde etkili tek ilaç olarak uzun yıllar kullanılmıştır. Doksanlı yılların ikinci yarısında itibaren irinotekan veya oksaliplatin ile birlikte kullanılmaları standart haline gelmiştir. Halen metastatik veya

erken evre KRK de vazgeçilmez bir ajandır. 5-Florourasil kolon kanserinin yanı sıra mide kanserinin de temel ilaçları arasında yer almaktadır. 5-Florourasilin anjiyogenez üzerinde önemli bir etkisi gösterilememiş olmakla birlikte düşük dozlarda kullanımda VEGF düzeylerini arttırabildiği gösterilmiştir (Albertsson P. et al. 2009).

İrinotekan: Semisentetik bir kamptotekin türevidir. Çindeki *Camptotheca acuminata* adlı bir bitkide bulunmuştur. Topoizomeraz 1 adı verilen, DNA'nın replikasyon sürecinde bir zincirini keserek ve bunun hemen ardından tekrar o zincire bağlanarak çözülmesine ve yeniden sarılmasına yardım eden enzimi inhibe eder. Aktif sitotoksik metaboliti olan 7-etil-10-hidroksil-kamptotekin (SN-38)'e karboksil esteraz enzimi ile dönüşür ki Topoizomeraz 1 inhibitörü olan bu aktif metabolittir (Asmis T.R. et al. 2008, Cunningham et al. 2001, Vanhoefer et al. 2001). Kolon kanserlerinde birinci basamak tedavide ve mide kanserinde ikinci basamak tedavide kullanılan önemli bir kemoterapi ilacıdır (Tebbutt et al. 2002). İrinotekanın VEGF düzeylerine doğrudan bir etkisi gösterilememiş olmakla birlikte VEGF ekspresyonu fazla olan tümörlerde bu ilacın daha etkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Koizumi F. et al. 2006, Bocci G. et al 2008).

Dosetaksel: *Taxus baccata* adı verilen porsuk ağacından elde edilen dosetaksel hücre iskeleti toksik kemoterapötik bir ajandır ve paklitaksel'in semi-sentetik analogudur (Risinger et al. 2008). Hücre bölünmesi ve mitozun dinamik dengesini bozduğu için apoptozu uyandırabilir. Bunu tübuline bağlandıktan sonra mikrotübül ayrılmasını önleyerek yapar (Guo et al. 2002). Dosetakselin düşük dozlarda endotel çoğalmasını baskılayarak antianjiyojenik etkili olabileceğini gösteren in vitro çalışmaların yanı sıra kolon kanseri hücre kültürlerinde başta VEGF olmak üzere bazı pro-anjiyojenik faktörleri baskılayacağına dair veriler de yayınlanmıştır (Guo X-L. et al. 2002).

Paklitaksel: Taxan grubunda yer alan bir diğer ilaç paklitakseldir. Meme, yumurtalık, mide, akciğer gibi farklı tümör çeşitlerinde kullanılır. Mekanizması dosetakselde olduğu gibi mitotik aresti uyarmaya yöneliktir (Loo et al. 2005). Paklitakselin düşük dozlarda antianjiyojenik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Bu etkide paklitakselin endotel hücrelerince alınması olduğu kadar in vitro çalışmalarda da gösterilmiş olan paklitakselin VEGF düzeylerini azaltıcı etkisi de rol oynayabilir (Merchan J.R. et al. 2005, Loo et al. 2005, Pasquier et al. 2005). Fakat son yıllarda yapılan çalışmalarda paklitakselin VEGF

düzeylerini serbest oksijen radikalleri üzerinden arttırabileceğini gösteren çalışmalar da yayınlanmıştır (Kim H.S. et al 2008).

Doksorubisin: Antrasiklin grubundan bir antitümör antibiyotik olup DNA interkalasyonu yaparak sitotoksik etki gösterir. Başta meme kanseri ve lenfomalar olmak üzere birçok kanser türünde temel ilaçlardan biridir.

Doksorubisinin anjiyogenez üzerindeki etkileri konusunda çelişkili sonuçlar bildirilmiştir. Genellikle VEGF ekspresyonu fazla olan tümörlerde doksorubisin daha etkili bulunurken, in vitro çalışmalarda doksorubisinin VEGF sentezi üzerindeki etkilerinin çelişkili olduğu öngörülmektedir (Duyndam M.C.A. et al. 2007, Minko T. et al. 2000).

Kemoterapötik ilaçlar genellikle kanser hücresi üzerinde sitotoksik etki gösterir. Ancak kemoterapi ilaçlarının sitotoksik etkilerinin yanı sıra genellikle dozla değişkenlik göstermek üzere anjiyogenezin baskılanması ve apoptozisin uyarılması gibi etkileri de olmaktadır . Özellikle düşük dozlarda kullanıldığında bu etkilerin daha belirgin olduğu göstermiştir . Bu etkileri dolayısıyla son yıllarda kemoterapi ilaçlarının düşük dozlarda ve sürekli kullanılmaları şeklinde uygulanan "metronomik kemoterapi" kavramı klinik uygulamalarda yerini almaya başlamıştır (Salter, J.T. and Miller K.D. 2007., Fioravanti A. et al. 2009).

3.HASTALAR VE YÖNTEM

3.1.Hasta profili ve örneklerin elde edilmesi

Kemoterapi ilaçlarının in vivo etkinliği ve serum VEGF düzeylerine etkisini çalışmak amacıyla çalışmamızda kullanılan ilaçlardan bir yada birkaçını içeren kemoterapi için başvuran ileri evre meme, kolon ve mide kanserli hastalar çalışmaya dahil edildi.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

1. Histopatolojik olarak tanı almış ve ölçülebilir lezyonu olan kolon, meme veya mide kanseri tanısı olan,
2. 18-65 yaş arasında ve metastatik hastalığı için hiçbir tedavi almamış olan,
3. Yazılı onam verebilen hastalar çalışmaya dahil edildi.

Çalışmadan çıkarılma kriterleri

1. Ölçülebilir lezyonu olmayan hastalar,
2. Herhangi bir nedenle antikoagülan veya antiagregan tedavi alan
3. Kemoterapiye başlanmadan önceki 2 ay içinde cerrahi müdahale yapılan,
4. Yazılı onam veremeyen hastalar çalışma dışında tutuldu.

3.2. İn vitro araştırmalar için hücre kültürü çalışmaları

İn vitro çalışmaları için insan kolon kanseri (HT29), insan meme kanseri (MCF-7) ticari hücre hatları ile A.Ü.T.F. Tıbbi Onkoloji kliniği laboratuvarında mide kanseri dokusundan üretilen primer mide kanseri hücre hattı kullanıldı. HT29 hücreleri %10 fetal sığır serumu içeren McCoy's 5A, MCF-7 hücreleri DMEM ve primer mide kanseri hücreleri de RPMI 1640 vasatında, %5 CO₂ ortamında 37 C° de inkübe edildiler. Ortama salınan VEGF düzeylerini test etmek amacıyla hücreler 6-kuyucuklu plaklara 10⁵ hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Ekimi takiben 24. saatte çalışma ilaçları ile değişik konsantrasyonlarda uygulamaya tabii tutuldu. İlaç uygulanan hücrelerin 72 saatlik inkübasyon sonucu hücre vasatları toplanarak -152 C de saklandı.

3.3. İlaçlar

Çalışma dolayısıyla hastaların kullandıkları tedavi şemalarına müdahale edilmedi. Çalışmaya takip edildikleri onkoloji kliniğinde rutin olarak planlanan ve 5-florourasil, irinotekan, oksaliptin, paklitaksel, dosetaksel veya adriamisinden en az birini alan hastalar dahil edildi. Aynı ilaçlar invitro sitotoksisite deneylerinde de kullanıldı. Çalışmada kullanılan ilaçlar (5-florourasil; 5FU Biosyn; irinotekan: Campto® Pfizer, Oksaliptin: Eloxatin® Sanofi Aventis,; Paklitaksel: Taxol® Bristol Myers; Dosetaksel: Taxotere® Sanofi Aventis; Doxorubisin: Adriablastina® Mustafa Nevzat) piyasadan temin edildi.

3.4.Sitotoksisite deneyi:

Tümör hücreleri her kuyucukta 10⁴ hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. 72 saatlik inkübasyona sonrasında canlı hücre oranını saptamak amacıyla MTT testi yapıldı. Kısaca: 96 kuyucuklu kültür kaplarının her bir kuyucuğuna 10 µl MTT konup 37 C° de mor formazan kristalleri oluşana kadar ortalama 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası canlı hücrelere giren MTT koyu mavi renkli formazon ürününe dönüştüğü için renk değişimi gözlemlendi. Son olarak her bir kuyucuğa 100 µl izopranoöl/ HCl çözeltisi koyulup formazon kristallerinin çözülmesi sağlandıktan sonra ELISA okuyucusunda 492-630 nm de absorbans değerleri hesaplandı. MTT yöntemini test etmek amacıyla benzer koşullarda kemoterapötik ilaçlarla inkübe edilen tümör hücrelerinin canlılık oranları trypan mavisi ile boyanarak ışık mikroskobunda sayıldı ve kontrol hücrelere oranlandı.

3.5. VEGF tayini:

Hücreden salgılanan ve kan örneklerindeki VEGF'in tayini

VEGF tayininde kullanılan kan örneklerinden serumları ayrılarak -85 C de saklandı. Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve Osmangazi Üniversitesi Hastanesinden çalışmaya alınan hastaların serum örnekleri çalışmanın yapılacağı Ankara Üniversitesi Tıbbi Onkoloji Bilim dalı Araştırma Laboratuvarına kuru buz içinde transfer edildi.

Serum ve hücre kültürü vasatı örneklerindeki VEGF düzeyleri ölçümü için BioSource VEGF kiti kullanıldı. Kısaca; anti-VEGF antikoru ile kaplı 96-kuyucuklu ELISA plağına VEGF standart örnekleri ve çalışma örnekleri pipetlenerek örneklerdeki VEGF moleküllerinin plağa bağlanması için oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyonu takiben yıkama işlemlerinden sonra biyotin-antiVEGF konjugatı eklenerek oda ısısında inkübe edildi. Sonrasında streptavidin solüsyonu ile inkübasyon yapıldı ve renk oluşumu için kromojen eklenerek standartların bulunduğu kuyucuklarda yeterli mavi renk oluşumu için 20-25 dakikalık inkübasyonu bırakıldı. İnkübasyon sonrası stop solüsyonu ile renk oluşumu durduruldu ve 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak kuyucuklardaki renk gelişimi tayin edildi. Daha sonra standart kuyucuklardaki absorbans ve konsantrasyon değerlerinden hareketle çalışma örneklerindeki VEGF konsantrasyonları pg/ml cinsinden hesaplandı.

Hücre kültür örneklerinde standardizasyonu sağlamak amacıyla hücre vasatı protein konsantrasyonu Bradford metodu ile tayin edildi (Bradford 1976).

3.6. İstatistik

İn vitro sitotoksiste testlerinde IC₅₀ değerlerinin hesaplanmasında non-lineer regresyon analizi ile eğriler çizdirilerek eğri formülünden %50 hücre sağkalımına karşılık gelen ilaç konsantrasyon değerleri hesaplandı. İlaçların VEGF sekresyonu ve çalışmada yer alan hastalık gruplarında yanıt oranı ile VEGF değişimi arasındaki ilişkilerin karşılaştırılmasında ANOVA ve Spearman rho korelasyon analizi yapıldı. İstatistiksel değerlendirmelerde SPSS 10.0 programından yararlanıldı. .

4.BULGULAR

4.1. Tedavi yanıtı

Çalışmaya 12 tane metastatik kolon kanseri, 6 tane metastatik meme kanseri ve 10 tanede metastatik mide kanserli hasta alındı. Hastaların özellikleri Çizelge 2.1’de gösterilmiştir. Çalışmaya Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim dalı, Ankara Numune Hastanesi Tıbbi Onkoloji Kliniği ve Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalında takip edilen hastalar alınmıştır. Kolon kanserli hastalar tedavi olarak FOLFOX ya da FOLFIRI, meme kanserli hastalar paklitaksel ya da dozetaksel, mide kanserli hastalar ise dozetaksel, cisplatin ve fluorourasil içeren DCF kombinasyon kemoterapisi almışlardır. Hastaların tedavilerine çalışma dolayısıyla herhangi bir müdahalede bulunulmamıştır. Kan örnekleri kemoterapiye başlanmadan hemen önce ve 2. kür tedaviye başlanmadan hemen önce alınarak serumlar ayrıldı ve VEGF tayinine kadar -85 C de saklandı. Kan örneklerinin alındığı dönemde eş zamanlı tam kan sayımları ve diğer rutin biyokimyasal tetkik sonuçları kaydedilmiştir. Hastaların kemoterapiye olan tümör cevapları 2. kür kemoterapi sonrasında rutin görüntüleme yöntemleri ile değerlendirilmiş ve Dünya Sağlık Örgütü yanıt kriterlerine göre tam remisyon, parsiyel remisyon, stabil hastalık ya da hastalık progresyonu şeklinde kaydedilmiştir. Hastaların tedavi yanıtları Çizelge 2.2’de de gösterilmiştir.

4.2. Sitotoksosite

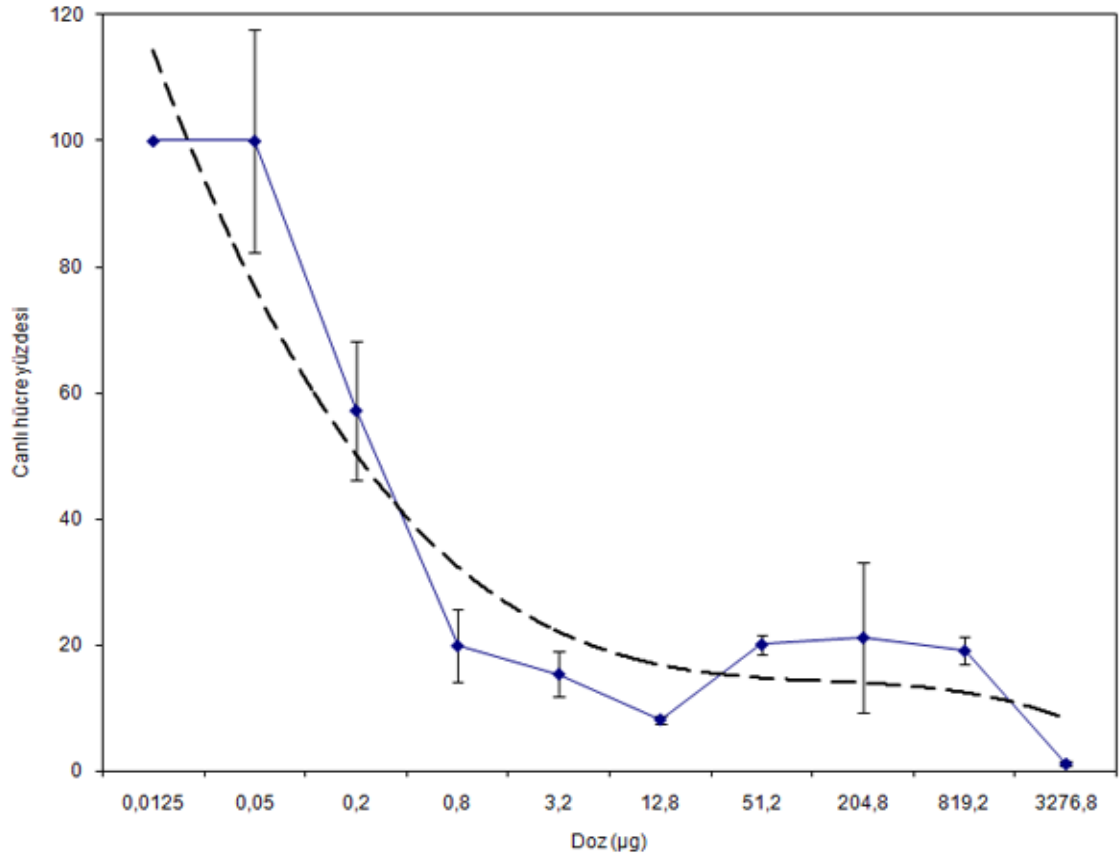
Çalışmada kullanılan ilaçların in vitro sitotoksik etkileri MTT testi ve Trypan mavisi eksluzyon testi ile araştırıldı. MTT testi için hücreler 96 kuyucuklu kültür plaklarına ekildi ve her bir ilaç için 0.0125 µg/ml - 3276 µg/ml arasında toplam 10 farklı doz herbiri 4 kuyucuk kullanıldı. 72 saatlik ilaç inkübasyonundan sonra her bir kuyucuğa 10 µl MTT ajanı konarak mavi-mor formazan kristalleri oluşumunu takiben isopropanolol/HCL çözeltisinde çözülerek 450-640 nm de absorbansları ölçüldü. Trypan mavisi testi için ise 24 kuyucuklu hücre kültür plaklarına ekilen tümör hücreler kullanıldı ve 72 saatlik ilaç inkübasyonunu takiben ışık mikroskopunda sayılarak canlı hücrelerin oranı saptandı.

Deneylerde kullanılan her üç tümör hücresinin ve ilgili kemoterapi ilaçları ile elde edilen doz-hücre ölümü eğrileri şekil 3.1 –3.18’de gösterilmiştir.

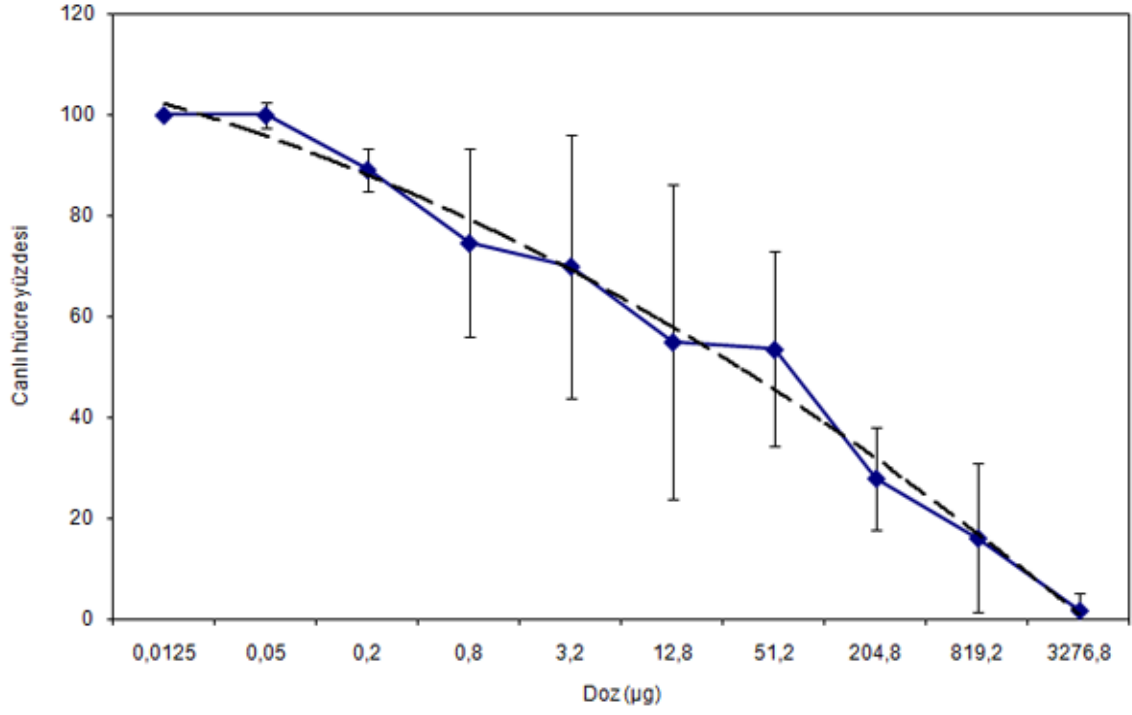
Test sonuçlarına göre canlı hücre oranları grafiklerde gösterilmiştir. İlaçların etkinlik ölçütü hücrelerin %50 sini öldüren inhibitör konsantrasyon 50 (IC₅₀) değerleri hesaplandı. HT29 kolon kanseri, meme kanseri ve ve primer mide kanseri hücreleri için çalışmada kullanılan ilaçlarla elde edilen IC₅₀ değerleri Çizelge 2.2’de verilmiştir. Çizelgede de görüleceği üzere HT29 kolon kanseri hücreleri ve MCF-7 meme kanseri hücreleri için en etkili ilaçlar olarak (IC₅₀ si en düşük) 5-florourasil ve adriamisin bulunmuştur. Primer mide kanseri hücreleri için en etkili ilaçlar olarak da 5-florourasil ve oksaliptatin bulunmuştur.

Çizelge 2.1: Hasta özellikleri

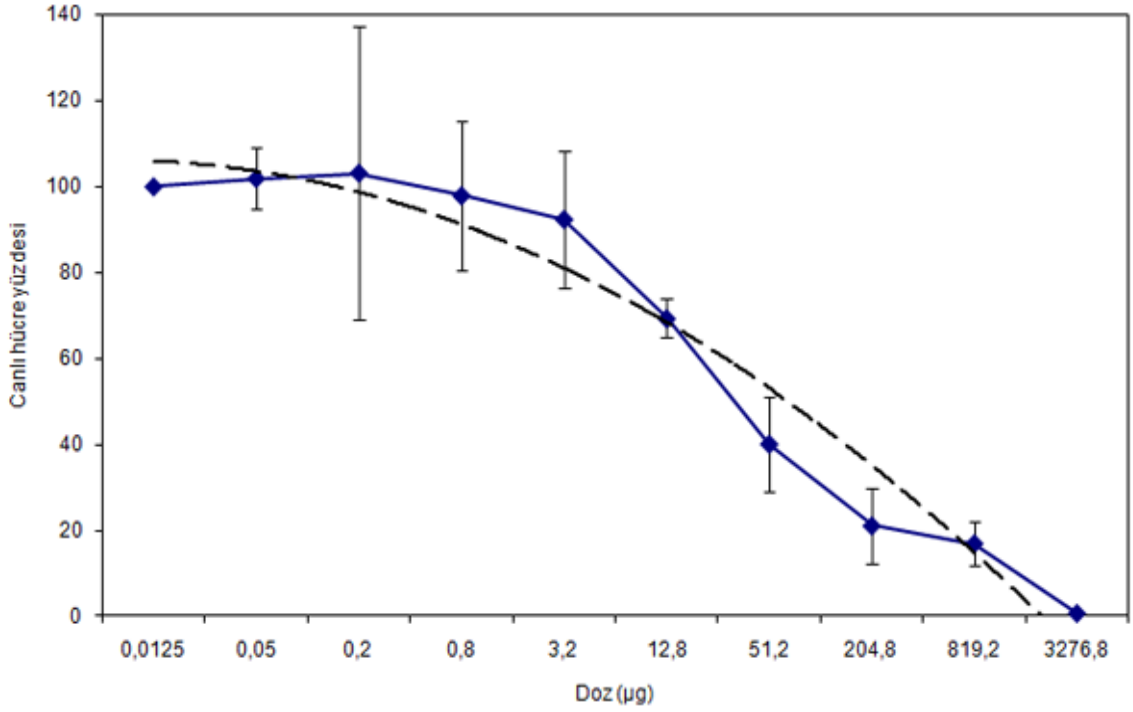
Parametre	N
Medyan yaş (Dağılım)	57,5 (29-65)
Cins (Kadın/Erkek)	14/14
Tanı	
Kolon Ca	12
Mide Ca	10
Meme Ca	6
İlaç Kombinasyonu	
İrinotekan	4
Oksaliptatin	8
Dosetaksel	11
Paklitaksel	5
Tedavi yanıtı (Parsiyel remisyon)	
Kolon Ca	%50
Mide Ca	%10
Meme Ca	%66.7



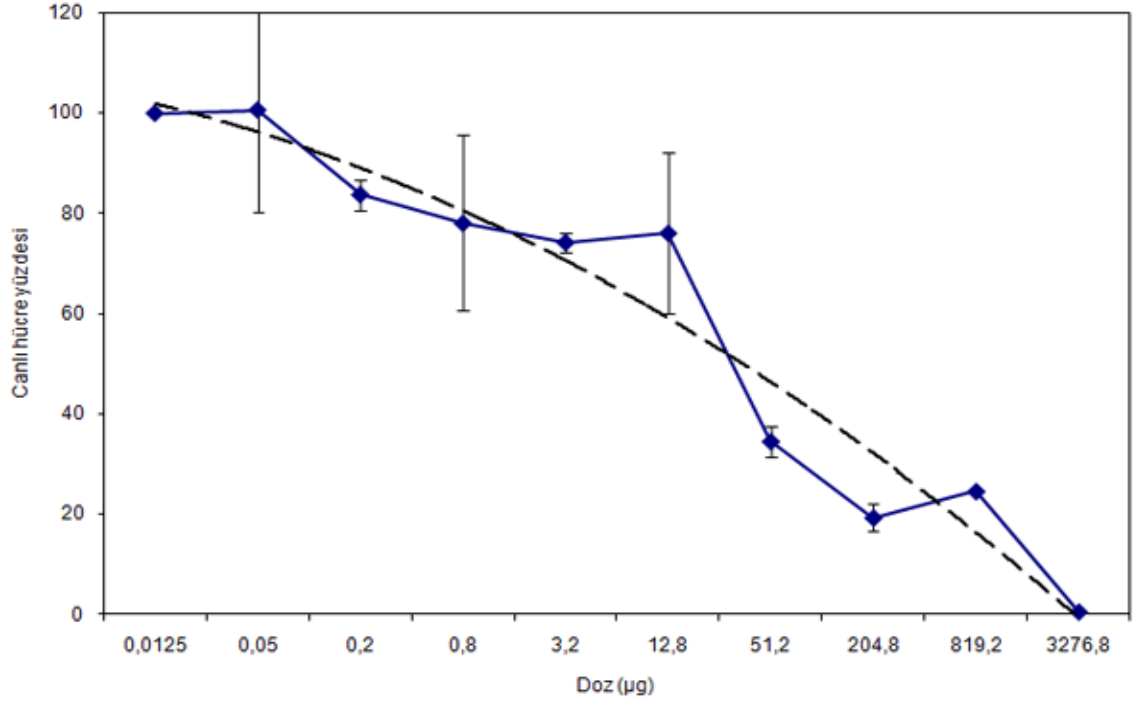
Şekil 3.1: HT29 hücrelerinde 5-FU ile invitro sitotoksiste grafiği (Kesikli çizgi eğim çizgisini göstermektedir.).



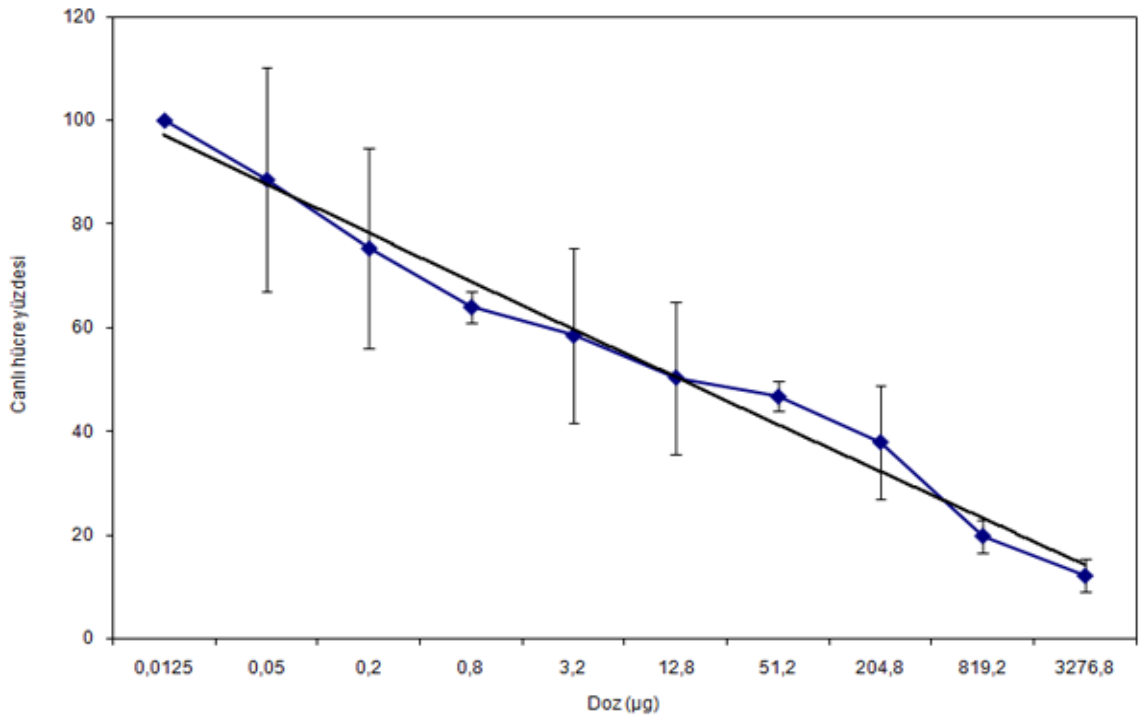
Şekil 3.2: HT29 hücrelerinde dozetaksel ile invitro sitotoksosite grafiği (Kesikli çizgi eğim çizgisini göstermektedir.).



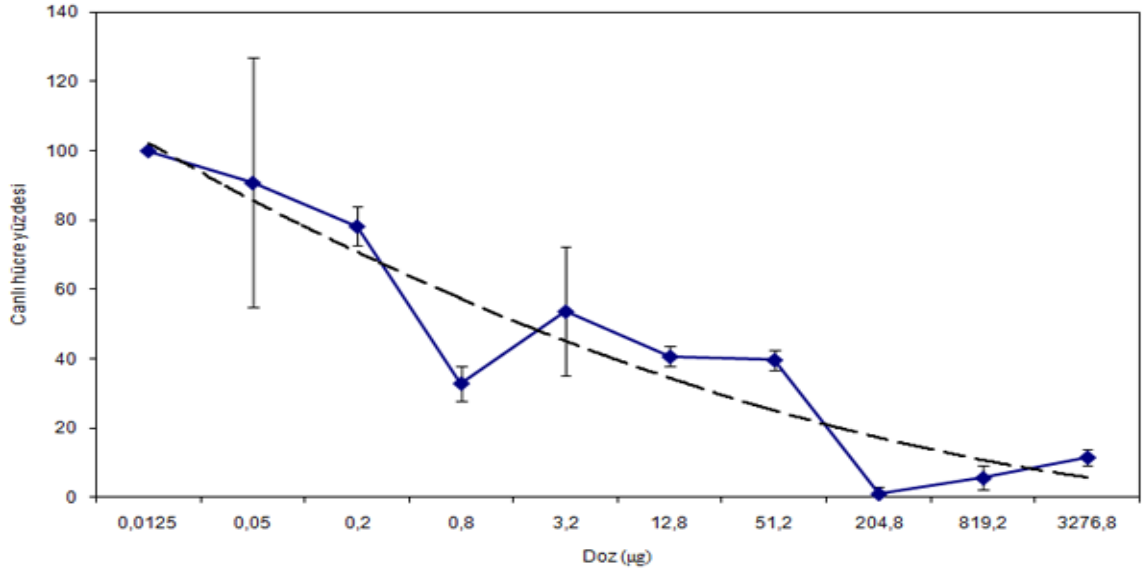
Şekil 3.3: HT29 hücrelerinde irinotekan ile invitro sitotoksosite grafiği (Kesikli çizgi eğim çizgisini göstermektedir.).



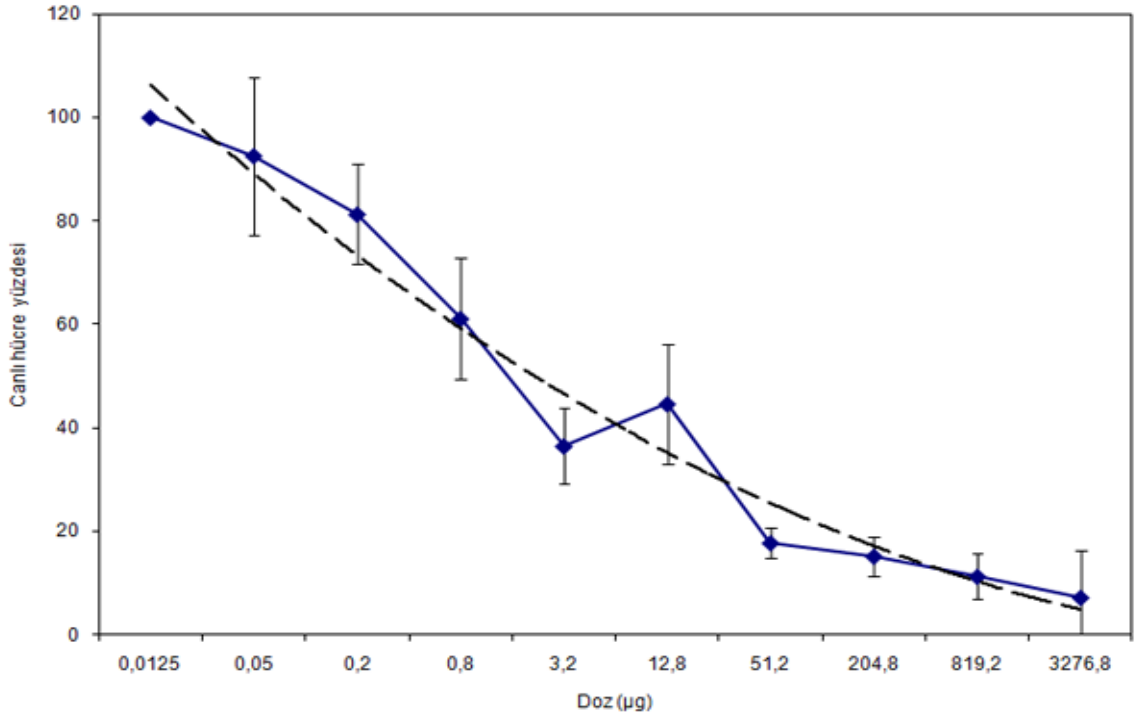
Şekil 3.4: HT29 hücrelerinde oksaliplatin ile invitro sitotoksiste grafiği (Kesikli çizgi eğim çizgisini göstermektedir.).



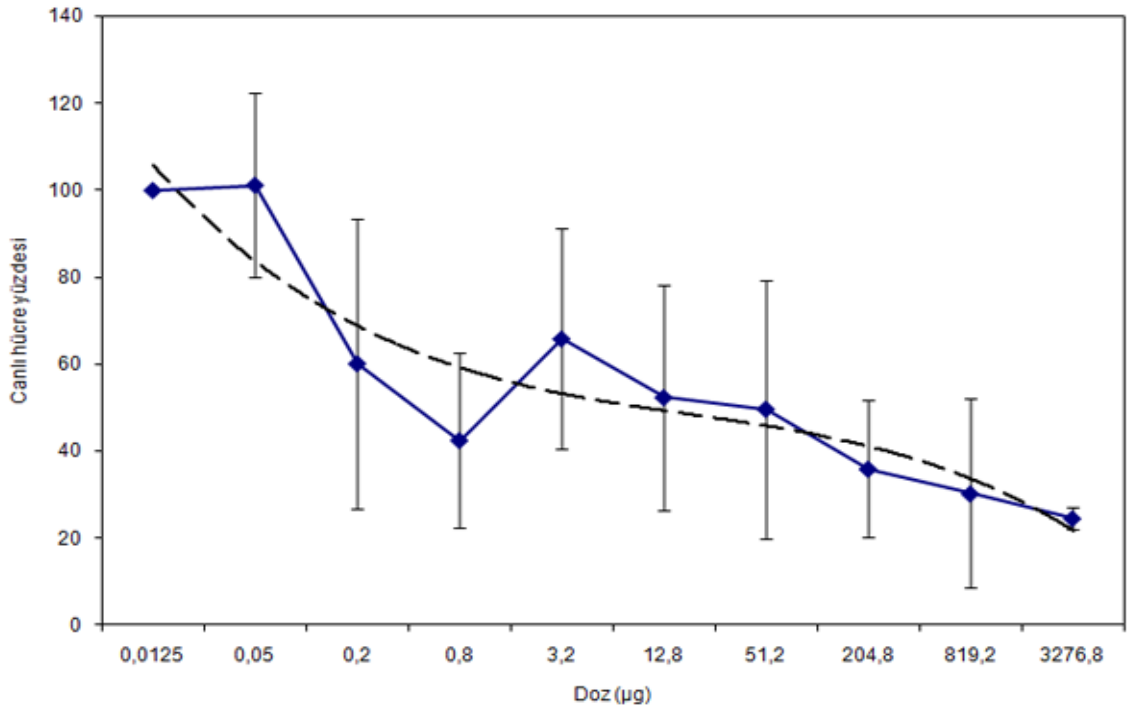
Şekil 3.5: HT29 hücrelerinde paklitaksel ile invitro sitotoksiste grafiği (Kesikli çizgi eğim çizgisini göstermektedir.).



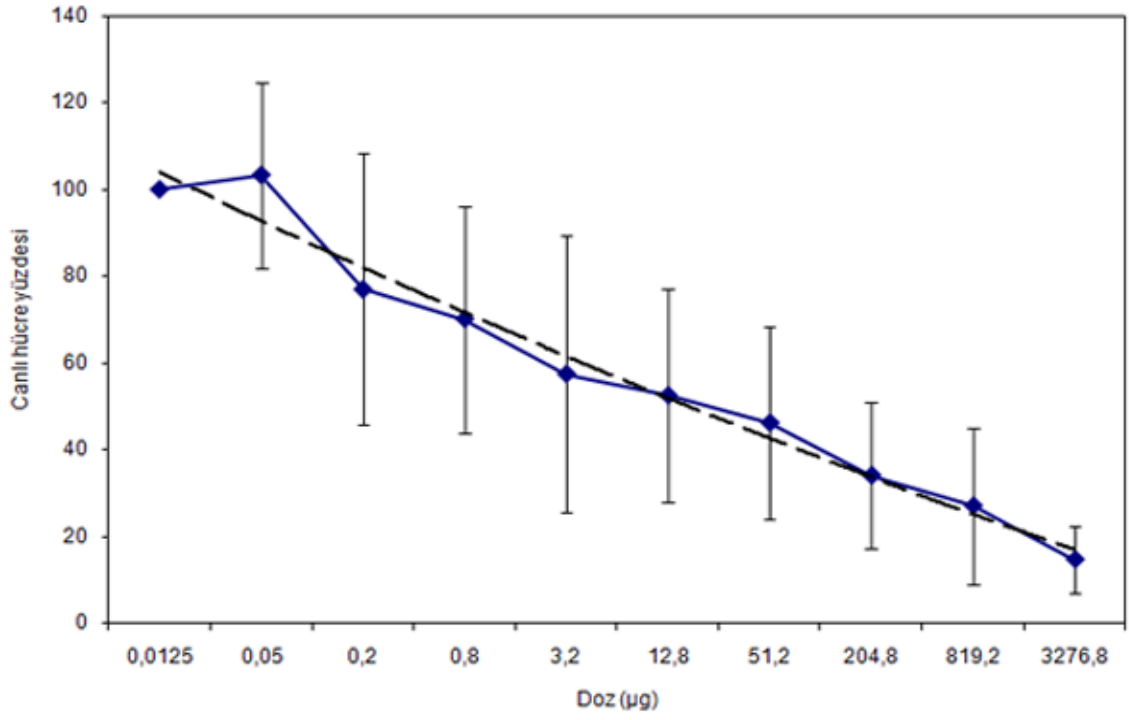
Şekil 3.6: HT29 hücrelerinde adriamisin ile invitro sitotoksosite grafiği (Kesikli çizgi eğim çizgisini göstermektedir.).



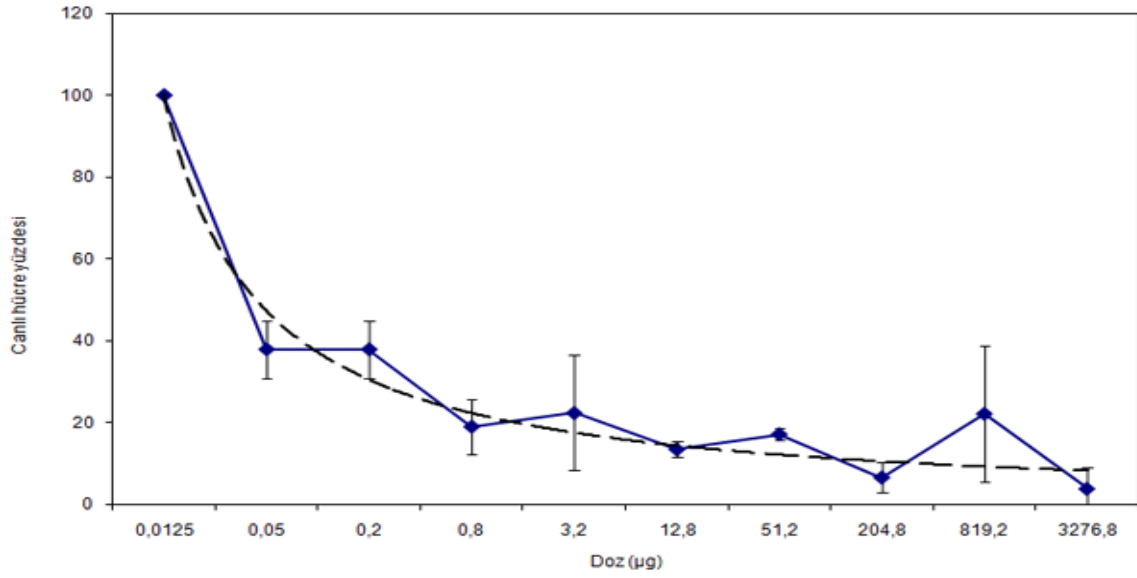
Şekil 3.7: Primer mide kanseri hücrelerinde 5-FU ile invitro sitotoksosite grafiği (Kesikli çizgi eğim çizgisini göstermektedir.).



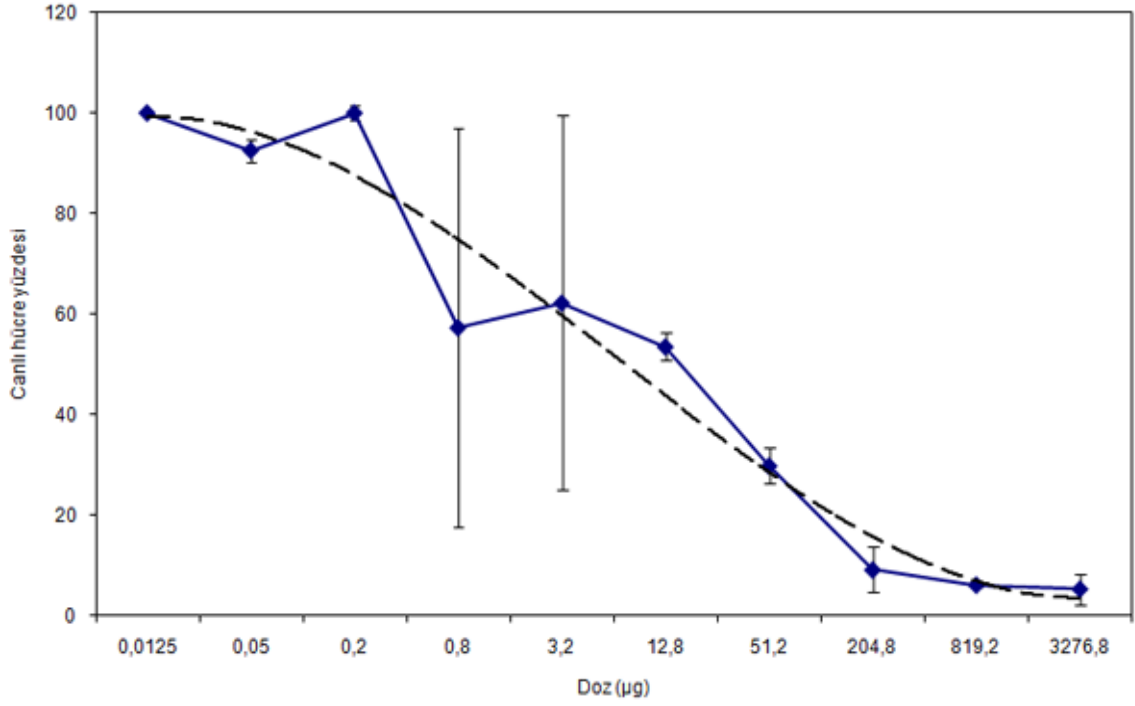
Şekil 3.8: Primer mide kanseri hücrelerinde dosetaksel ile invitro sitotoksosite grafiği (Kesikli çizgi eğim çizgisini göstermektedir.).



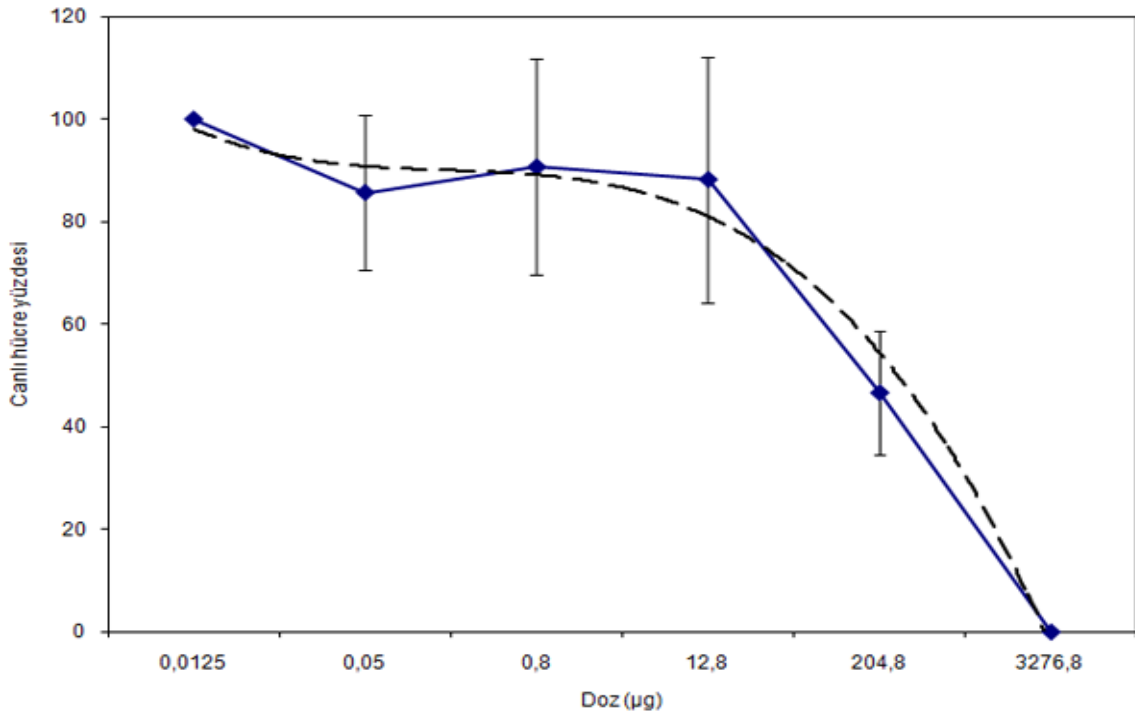
Şekil 3.9: Primer mide kanseri hücrelerinde irinotekan ile in vitro sitotoksosite grafiği (Kesikli çizgi eğim çizgisini göstermektedir.).



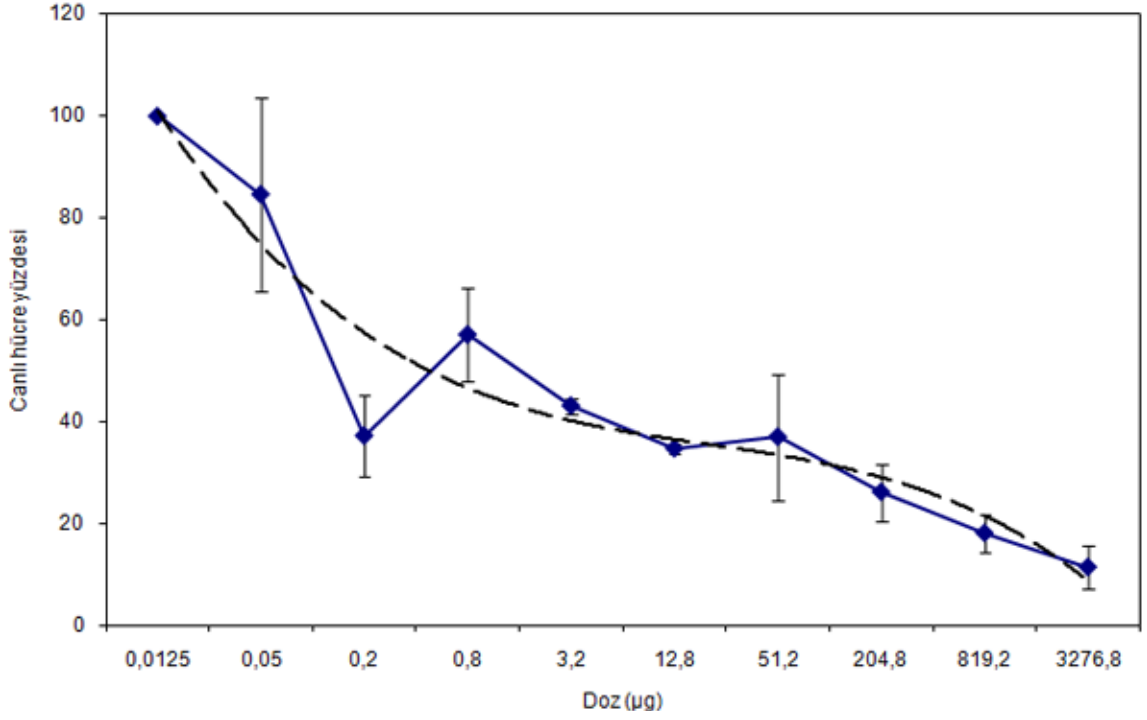
Şekil 3.10: Primer mide kanseri hücrelerinde oksaliplatin ile in vitro sitotoksosite grafiği (Kesikli çizgi eğim çizgisini göstermektedir.).



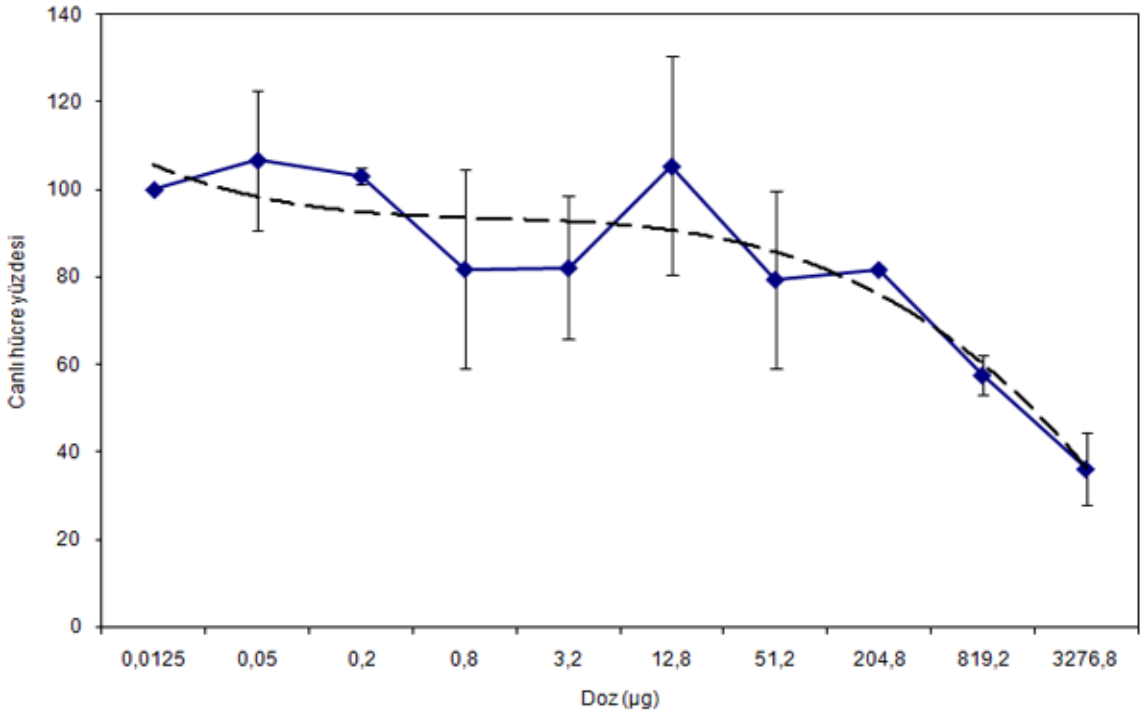
Şekil 3.11: Primer mide kanseri hücrelerinde paklitaksel ile in vitro sitotoksosite grafiği (Kesikli çizgi eğim çizgisini göstermektedir.).



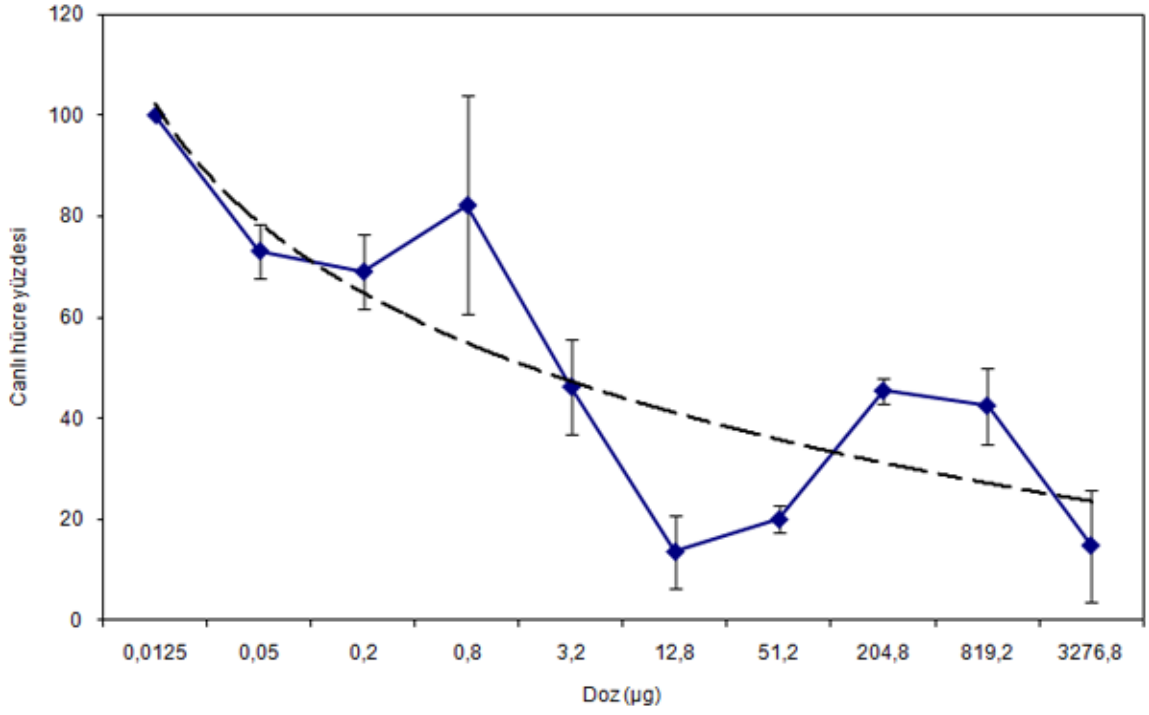
Şekil 3.12: Primer mide kanseri hücrelerinde adriamisin ile in vitro sitotoksosite grafiği (Kesikli çizgi eğim çizgisini göstermektedir.).



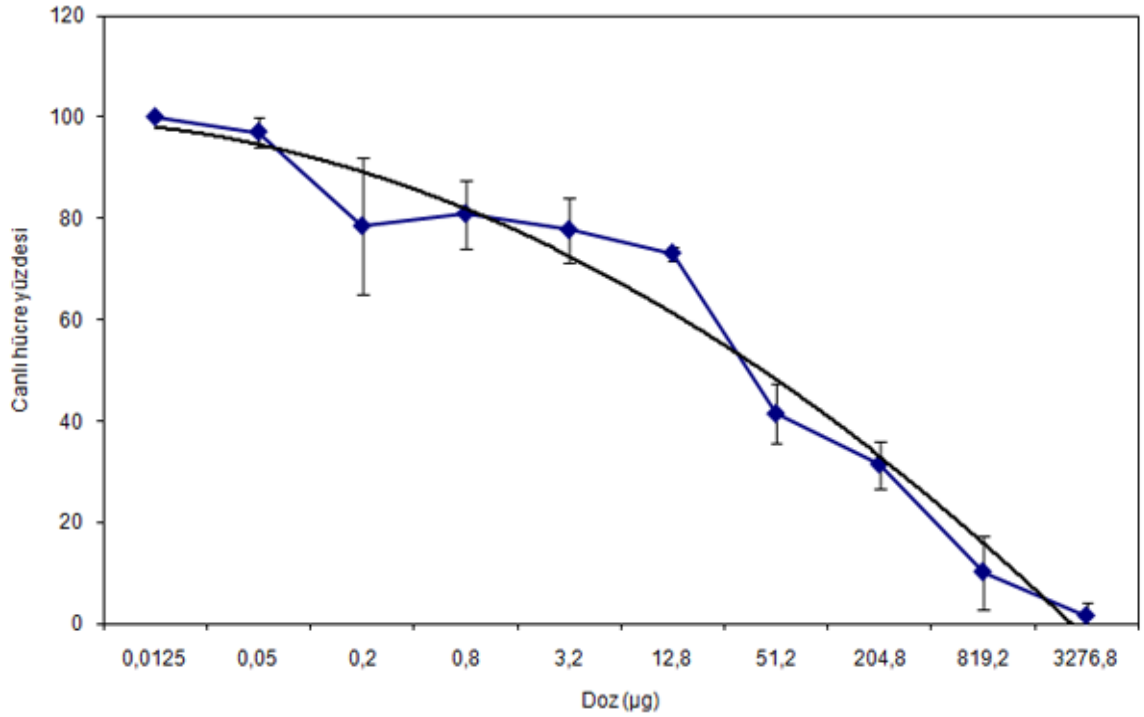
Şekil 3.13: MCF-7 hücrelerinde 5-FU ile in vitro sitotoksosite grafiği (Kesikli çizgi eğim çizgisini göstermektedir.).



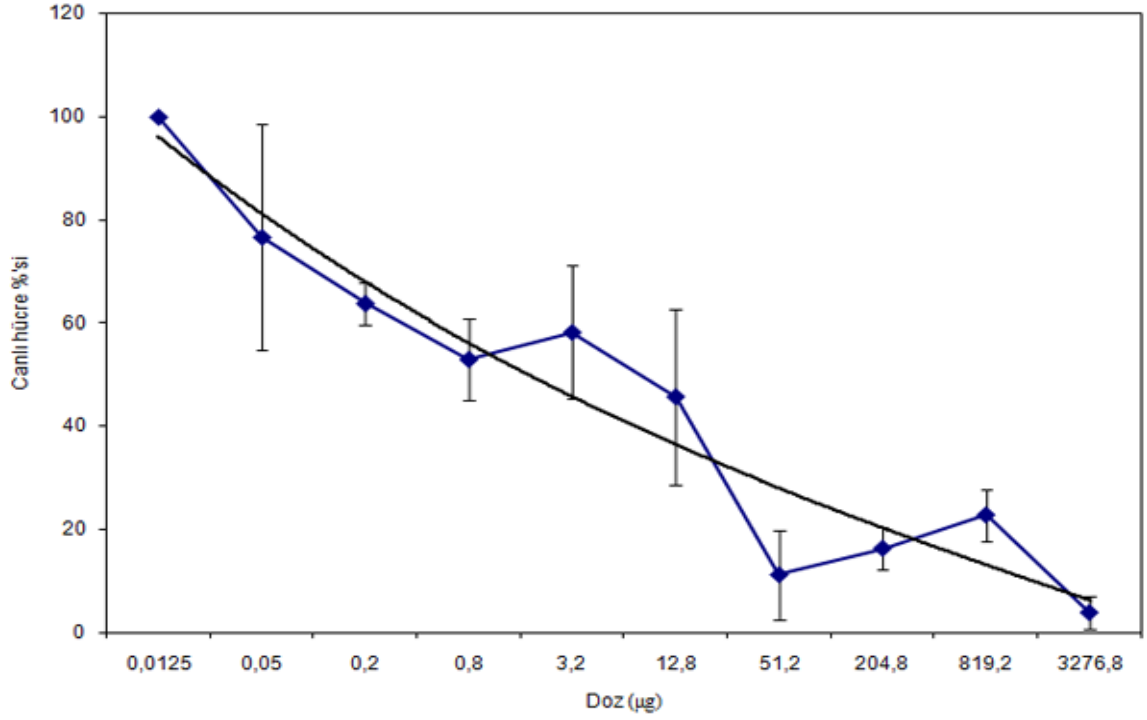
Şekil 3.14: MCF-7 hücrelerinde dosetaksel ile in vitro sitotoksosite grafiği (Kesikli çizgi eğim çizgisini göstermektedir.).



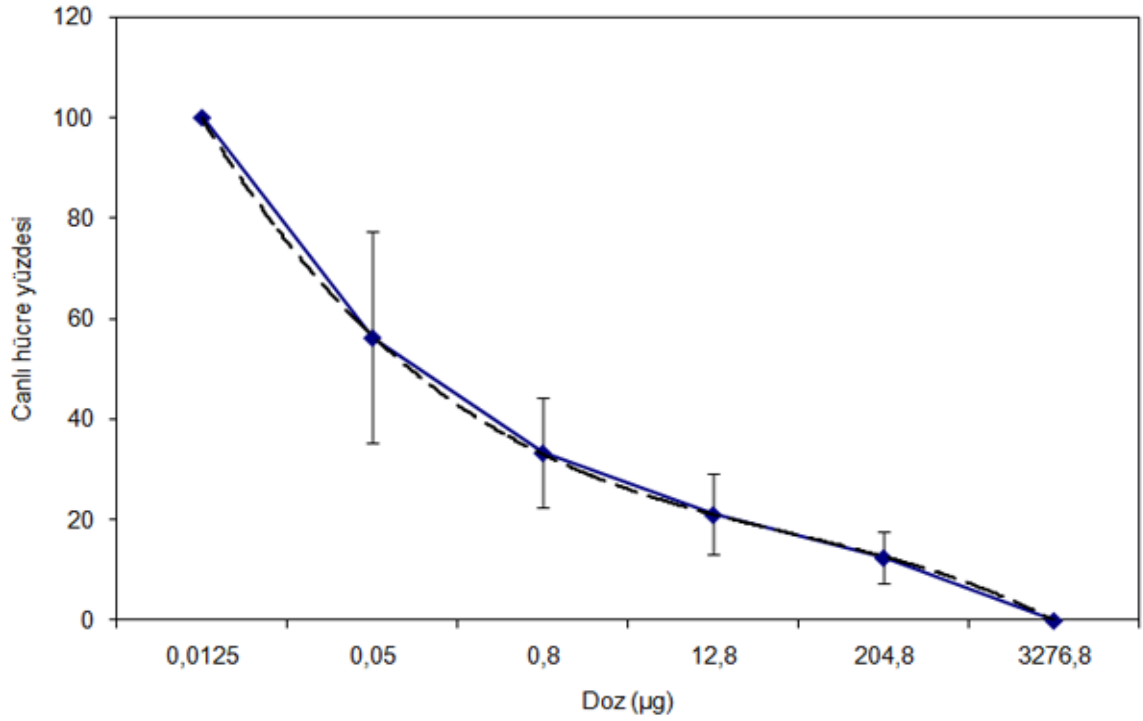
Şekil 3.15: MCF-7 hücrelerinde irinotekan ile in vitro sitotoksosite grafiği (Kesikli çizgi eğim çizgisini göstermektedir.).



Şekil 3.16: MCF-7 hücrelerinde oksaliplatin ile in vitro sitotoksosite grafiği (Kesikli çizgi eğim çizgisini göstermektedir.).



Şekil 3.17: MCF-7 hücrelerinde paklitaksel ile in vitro sitotoksosite grafiği (Kesikli çizgi eğim çizgisini göstermektedir.).



Şekil 3.18: MCF-7 hücrelerinde adriamisin ile in vitro sitotoksosite grafiği (Kesikli çizgi eğim çizgisini göstermektedir.).

Çizelge 2.2: In vitro deneylerde kullanılan hücrelerin çeşitli kemoterapi ilaçlarına olan duyarlılıkları (IC₅₀ değerleri ug./mL)

İlaç	HT29	Primer Mide	MCF7
5Florourasil	0,034190	0,188709	0,054931
Dosetaksel	3,084362	2,440761	103,0100
İrintekan	8,580526	4,133655	0,314280
Oksaliplatin	2,996559	0,048225	2,912423
Paklitaksel	4,210019	0,601715	0,230097
Adriamisin	0,197718	2,684210	0,006354

4.3. Serum VEGF düzeyleri ve hücre kültürü VEGF düzeyleri

Kan örnekleri için ölçülen VEGF değerlerinin trombosit oranı alınarak 100.000 trombosit başına VEGF değeri ve hücre kültürü vasatlarında ise mg protein başına VEGF değerleri hesaplandı (George M.L. et al. 2000). VEGF tayininde kantitatif ELISA (Biosource, Invitrogen, USA) kiti kullanıldı. Kitin çalışma prensibi kısaca plak üzerinde bulunan VEGF antikoruna bağlanan VEGF'yi daha sonra biotinle işaretli sekonder antikorunu ile bağlayarak oluşan renk değişikliği spektrofotometrede standart değerlere karşı okundu.

Hücre kültür vasatlarında ilaçsız ve değişik dozlarda kemoterapi uygulandıktan sonraki VEGF düzeyleri ile hastalarda tedavi öncesi ve sonrası VEGF düzeyleri çizelge 2.3 ve çizelge 2.4'te gösterilmiştir. Serum VEGF düzeyinde tedavi öncesine göre %40 ve daha fazla azalma olması "anlamlı VEGF azalması" olarak alınmıştır. Çizelgeden de görüleceği üzere kemoterapi cevabı ile VEGF düzeyleri arasındaki korelasyona baktığımızda objektif yanıt alınan hastalarda serum VEGF düzeylerinde objektif yanıt oranları arasında bir paralellik söz konusudur.

İn vitro testlerde ise kemoterapi dozları ile VEGF düzeyleri karşılaştırıldığında sitotoksik dozlarda VEGF baskılanması doğal olarak daha fazla izlenirken IC₅₀ den daha düşük dozlarda da VEGF baskılanması izlendi.

Çizelge 2.3: Hastaların tanılarına, kullanılan ilaç tipine göre VEGF düzeyleri

	Tedavi öncesi VEGF	Tedavi sonrası VEGF
Kolon Ca	27.9±8.1	14.8±5.9
Mide Ca	35.5±12.8	28.1±10.5
Meme Ca	19.5±6.0	27.7±9.5
Oksaliplatin	34.6±11.3	12.7±4.6
Dosetaksel	33.4±11.3	27.4±9.5
Paklitaksel	19.3±11.7	9.9±4.2
İrinotekan	14.7±6.8	18.9±16.9

Çizelge 2.4: Tedavide kullanılan ilaç kombinasyonlarına göre yanıt oranları ve tedavi sonrası VEGF değişimi arasındaki ilişki

İlaç	Anlamlı VEGF azalması (%)*	Objektif yanıt oranı (%)
İrinotekan	50,0	25,0
Oksaliplatin	87,5	62,5
Dosetaksel	36,4	27,3
Paklitaksel	66,7	66,7
P	0.603	0.065

*VEGF düzeyinde tedavi öncesine göre %40 ve daha fazla azalma olması anlamlı azalma olarak alınmıştır.

Çizelge 2.5: Çalışmaya alınan hastaların tanılarına göre yanıt oranları ve tedavi sonrası VEGF değişimi

Tanı	Anlamlı VEGF azalması (%)	Objektif yanıt oranı (%)
Kolon Ca	50,0	75,0
Mide Ca	10,0	40,0
Meme Ca	66,7	33,3
P	0.034	0.068

Çizelge 2.6: Çalışmada kullanılan kanser hücre dizilerinde kemoterapi ilaçlarının VEGF düzeylerine etkisi

Hücre tipi ve uygulanan ilaçlar (doz: ug/mL)	VEGF pg/mg.protein
HT29	
Negatif Kontrol	1710,0 ±23,4
5FU (0,05)	1715,5 ±17,67
5FU (0,2)	1273,5±365,7
İrinotekan (0,015)	1056,0±212
İrinotekan (0,06)	1063,0±125,4
Oksaliplatin(0,0075)	1241,0±214,8
Paklitaksel.(0,015)	295,3±42,0
Dosetaksel (0,005)	22,7±8,2
Adriamisin (0,005)	60,0±21,8
MCF-7	
Negatif Kontrol	172,2±7,8
5FU (0,05)	63,8±2,5
5FU (0,2)	37,0±5,8
İrinotekan (0,015)	34,8±11,4
İrinotekan (0,06)	0,8±0,6
Oksaliplatin(0,0075)	187,4±19,5
Paklitaksel(0,015)	156,1±86,1
Dosetaksel(0,005)	209,2±84,6
Adriamisin (0,005)	147,1±46,1
Primer mide	
Negatif Kontrol	230,0±42,4
5FU (0,05)	110,0±34,6
5FU (0,2)	173,6±32,4
İrinotekan (0,015)	217±48,8
İrinotekan (0,06)	95,2±14,6
Oksaliplatin(0,0075)	141±34,6
Paklitaksel(0,015)	147,1±23,4
Dosetaksel(0,005)	154±42,8
Adriamisin (0,005)	110±21,2

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Kolon kanseri, meme kanseri ve mide kanseri toplumda en sık görülen kanser türlerindedir. Kolon kanseri ve meme kanserinde erken dönemlerde yakalanan hastalarda cerrahi ve cerrahi sonrası kemoterapi ve radyoterapinin eklenmesi ile uygulanan adjuvan tedavilerle 5-yıllık yaşam süreleri %90 ların üzerine çıkmaktadır. Bu oranlar erken dönemlerde tanı alan mide kanserli hastalarda ise %50-60 arasında değişmektedir. Fakat ilerlemiş dönemde tanı konan hastalarda ise ne yazık ki şifa sağlanamamaktadır. Her üç hastalığın da metastatik döneminde en önemli tedavi seçeneği kemoterapidir. Son yıllarda anjiyogenezin hastalığın gelişmesinde ve metastaz sürecindeki rolünün aydınlatılması ve sürece yönelik tedavi ajanlarının da geliştirilmesi ile tedavide önemli ilerlemeler sağlanmıştır (Barbareschi M. et al. 1995, Szabo S. et al. 1998, Kuroi K. et al. 2001, Poon RTP et al. 2001).

VEGF tümör anjiyogenezinin en önemli düzenleyicilerinden biridir. Serum VEGF düzeylerinin genellikle tümör yükü ile paralellik gösterdiği bulunmuştur (Eroğlu A. et al. 1999, Chin KF. et al. 2000, Broll R. et al. 2001).

Periferik kan hücrelerinden özellikle trombositler önemli VEGF kaynağıdır (Banks RE. et al. 1998). Plateletlerdeki VEGF de her ne kadar metastaz sürecine katılsa da platelet sayısına göre düzeltilmiş VEGF değerleri tümörün anjiyojenik potansiyelini yansıtmaktadır (Salven P. 1999). Çalışmamızda hasta serumlarında ölçülen VEGF düzeylerini 100.000 trombosit sayısına göre standardize ettik. Kolon kanseri ve meme kanserli hasta gruplarında kemoterapi sonrasında tedavi yanıtı ile serum VEGF düzeylerinde azalma arasında bir paralellik söz konusu iken mide kanserli hastalarda tedavi yanıtı ile serum VEGF azalması arasında bir ilişki görünmemektedir (Çizelge 2.4). Kolon kanserli hastalarda VEGF azalması kısmen tedavi yanıtı ile açıklanabilirse de mide ve meme kanserli hastalarda tedavi yanıtı ile serum VEGF düzeyleri ilişkisiz görünmektedir (Çizelge 2.2). Kanserli hastalarda serum VEGF değişiklikleri tedavide kullanılan ilaçlara göre değerlendirildiğinde oksaliptatin alan hastalarda VEGF azalması daha belirgin olarak izlenmektedir (Çizelge 2.3). Serum VEGF azalması tümör boyutunun tedavi ile küçülmesi ile açıklanabilir.

Çizelge 2.3'den de görüleceği üzere İrinotekan kombinasyonu ile tedavi edilen hastalarda objektif yanıt alınamayan hastalarda bile yaklaşık olarak %25 oranında anlamlı VEGF azalması izlenmektedir. İrinotekan dışındaki ilaçlarda tümör yanıtı ile VEGF azalması arasındaki paralellik ilacın VEGF salgısı üzerindeki etkisinden ziyade tümör hücre sayısındaki azalma ile açıklanabilir. Buna karşılık irinotekan tümör hücre sayısını azaltmasa bile VEGF salgısında bir baskılanmaya yol açıyor gibi görünmektedir. Benzer olarak hücre kültürlerinde de irinotekanın VEGF salgılanmasını belirgin ölçüde azalttığını bulduk.

Çalışmada kullanılan ilaçların tümör hücre kültürlerinde VEGF sekresyonunu azalttığı görülmektedir (Çizelge 2.5). İncelenen tümör hücrelerinde (HT-29, MCF-7, primer mide CA hücreleri) ilaçların IC₅₀ değerleri ile VEGF sekresyonu üzerindeki etkileri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (p>0.05).

KAYNAKLAR

Akbulut, H ve Akbulut K.G. 2005. Tıbbi Onkoloji Kitabı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antıp Yayınları, Editör İçli F. Sayfa 23

Akbulut, H. 2005. Tıbbi Onkoloji Kitabı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antıp Yayınları, Editör İçli F. Sayfa 281

Akbulut, H., Altuntaş, F., Akbulut K.G., Ozturk, G., Cindoruk, M., Unal, E., İçli F. 2002. Prognostic role of serum vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor and nitric oxide in patients with colorectal carcinoma. CYTOKINE, Vol.20, No.4; pp 184-190.

Albertsson, P., Lennernäs, B. and Norrby, K. 2009. Low-dose continuous 5-fluorouracil infusion stimulates VEGF-A-mediated angiogenesis. Acta Oncologica. Vol. 48, No. 3, Pages 418-425.

Anonim 1995. Dünyada Kanser İstatistikleri. Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu (TKASKD), <http://turkkanser.org.tr>

Asmis, T.R., Saltz, L. 2008. Systemic Therapy for Colon Cancer. Gastroenterol Clin N Am 37, 287-295.

Banks, R.E., Forbes, M.A., Kinsey, S.E., Stanley, A., Inham, E., Walters, C., Selby, D.J., 1998. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. Br J Cancer 77: 956-964.

Barbareschi, M., Gasparini, G., Morelli, L., Forti, S., Dalla, P. 1995. Novel methods for the determination of the angiogenic activity of human tumors. Breast Cancer Res Treat 36:181-192.

Berglund, A., Molin, D., Larsson, A., Einarsson, R., Glimelius, B. 2002. Tumour markers as early predictors of response to chemotherapy in advanced colorectal carcinoma. 2002. Annals of Oncology 13: 1430-1437.

Bilir, N. 2007. Mesleksel Kanserler. Türkiye’de Kanser Kontrolü kitabı. Editör Tuncer M. Sayfa 243.

Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.

Bocci, G., Falcone, A., Fioravanti, A., Orlandi, P., Di Paolo, A., Fanelli, G., Viacava, P., Naccarato, A.G., Kerbel, R.S., Danesi, R., Del Tacca M. and Allegrini, G. 2008. Antiangiogenic and anticolorrectal cancer effects of metronomic irinotecan chemotherapy alone and in combination with semaxinib. *British Journal of Cancer* **98**, 1619–1629.

Broll, R., Erdmann, H., Duchrow, M., Oeverman, E., Schwandner, O., Markert, U., Bruch, H.P., Windhovel, U. 2001. Vascular endothelial growth factor (VEGF)- a valuable serum tumour marker in patients with colorectal cancer? *Eur J Surg Oncol* **27**:37-42.

Cabadak, H. 2008. Hücre Siklusu ve Kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi.* **9** (3): 51-61.

Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Plolefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Ebhhardt, C., Declercq, C., Pawling, j., Moons, L., Collen, D. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**, 435-394.

Carpenter, C.L., Cantley, L.C. 2001. Editors; Vincent T.DeVita, Jr., Hellman, S., Rosenberg, S.A. *Cancer Principles&Practice of Oncology* 6th edition. page 32.

Chin, K.F., Greenman, J., Gardiner, E., Kumar, H., Topping, K., Monson, J. 2000. Pre-operative serum vascular endothelial growth factor can select patients for adjuvant treatment after curative resection in colorectal cancer. *Br J Cancer* **83**: 1425-1431.

Chu, E., Vincent T. DeVita, Jr. 2001. Editors; Vincent T.DeVita, Jr., Hellman, S., Rosenberg, S.A. *Cancer Principles&Practice of Oncology* 6th edition. page 289.

Cunningham, D., Maroun, J., Vanhoeffter, U., Cutsem, E.V. 2001. Optimizing the Use of Irinotecan in Colorectal Cancer. *The Oncologist*; **6** (suppl 4):17-23

Dellabona, P. Moro, M., Crosti, MC, Casorati, G. and Corti, A .1999.Vascular attack and immunotherapy: a ‘two hits’ approach to improve biological treatment of cancer. *Gene Therapy* 6, 153-154.

De Vita, F., Orditura, M., Lieto, E., Infusino, S., Morgillo, F., Martinelli, E., Castellano, P., Romano, C., Ciardiello, F., Catalano, G., Pignatelli, C., Galizia, G. 2003. Elevated perioperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colon carcinoma. *American Cancer Society DOI 10.1002/cncr.11911*

Dickson, R.B., Lippman, M.E. 2001. Editors; Vincent T.DeVita, Jr., Hellman, S., Rosenberg, S.A. *Cancer Principles&Practice of Oncology* 6th edition. pages 1633,1641, 1688.

Donati, M.B., Gozdzikiewicz, J. 2008. Angiogenesis and the progress of vascular and tumor biology: A tribute to Judah Folkman. *Thromb Haemost* 99: 647-650.

Duyndam, M.C.A., Berkel, M.P.A., Dorsnam J.C., Rockx, D.A.P., Pinedo, H.M., Boven, E. 2007. Cisplatin and doxorubicin repress Vascular Endothelial Growth Factor expression and differentially down-regulate Hypoxia-inducible Factor I activity in human ovarian cancer cells. *Biochem Pharmacol*; 74(2):191-201.

Eroglu, A., Demirci, S., Ayyildiz, A., Kocaoglu, H., Akbulut, H., Akgul, H., Elhan, H.A., 1999. Serum concentrations of vascular endothelial growth factor and nitrite as an estimate of in vivo nitric oxide in patients with gastric cancer. *Br J Cancer* 80:1630-1634.

Eser S. Türkiye'de kanser insidansı. In; Tuncer M (Ed). *Türkiyede Kanser Kontrolü*. T.C. Sağlık Bakanlığı Kanseri Savaş Dairesi Başkanlığı Yayınları, Ankara 2007, s 17-45.

Evan, G.I. and Vousden, K.H. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342.

Ferrara, N., Henzel, W.J. 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 161:851-858.

Fışkın, K. 2002. *Genetik Kavramlar*. Altıncı baskıdan çeviri. Öner, C. Sayfalar 635-651.

Fidler, I. J., Kerbel, R.S., Ellis, L.M. 2001. Editors; Vincent T.DeVita, Jr., Hellman, S., Rosenberg, S.A. Cancer Principles&Practice of Oncology 6th edition. pages 138-141.

Fioravanti, A., Canu, B., Ali, G., Orlandi, P., Allegrini G., Di Desidero, T., Emmenegger, U., Fontanini, G., Danesi, R., Del Tacca, M., Falcone, A. and Bocci, G. 2009.

Fujisaki, K. MD, Mitsuyama, K. MD, Toyogana, A. MD, Matsuo, K. PhD and Tanikawa, K. MD. 1998. Circulating vascular endothelial growth factor in patients with colorectal cancer. The American Journal of Gastroenterology. Vol.93, No2, ISSN 0002-9270/98.

Garvin S. and Dabrosin, C. 2003. Tamoxifen Inhibits Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor in Breast Cancer in Vivo. CANCER RESEARCH 63;8742-8748.

George, M. L., Eccles, S.Z, Tutton, M.G., Abulafi, A.M. ve Swift, R.I. 2000. Correlation of Plasma and Serum Vascular Endothelial Growth Factor Levels with Platelet Count in Colorectal Cancer: Clinical Evidence of Platelet Scavenging? Clinical Cancer Research. Vol. 6, 3147-3152.

Gonzales, F.J., Quesada, A.R., Sevilla, I., Baca, J.J., Medina, M.A., Amores, J., Diaz, J.M., Diaz, F.R., Marques, E., Alba, E., 2007. Prognostic value of serum angiogenic activity in colorectal cancer patients. J.Cell. Mol. Med. Vol 11, No 1, pp. 120-128.

Granato, A.M., Frassinetti, G.L., Giovannini, N., Ballardini, M., Nanni,O., Maltoni, R., Amadori, D., Volpi, A. 2006. Do serum Angiogenic Growth Factors Provide Additional Information to That of Conventional Markers in Monitoring the Course of Metastatic Breast Cancer? Tumor Biology; 27:302-308.

Guo, X.L., Lin, G.J., Zhao, H., Gao, Y., Qian, L.P., Xu, S.R., Fu, L.N., Xu, Q., Wang, J.J. 2002. Inhibitory effects of docetaxel on expression of VEGF, bFGF and MMPs of LS174T cell. World J Gastroenterol; 9:1995-1998.

Haydaroglu, A. 2007. Ege Üniversitesi'nde kanser kayıt analizleri: 34134 Olgunun değerlendirmesi. Türk Onkoloji Dergisi, Cilt 22, Sayı 1, Sayfa(lar) 022-028

Heer, K., Kumar, H., Read, J.R., Fox, J.N., Monson, J.R.T. and Kerin, M.J. 2001. Serum vascular endothelial growth factor in breast cancer: Its relation with cancer type and estrogen receptor status. Clinical Cancer Research. Vol. 7, 3491-3494.

- Hicklin DJ, Ellis LM. 2005. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol.* 23:1011-1027.
- Iqbal, S., Lenz, H.J. 2004. Integration of novel agents in the treatment of colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 54(Suppl 1): S32-S39.
- Karayiannakis, A.J., Syrios, K.N., Polychronidis, A., Zbar, A., Kouraklis, G., Simopoulos, C. and Karatzas, G. 2002. Circulating VEGF levels in the serum of gastric cancer patients. *Annals of Surgery.* Vol. 236, No.1, 37-42.
- Karpeh, M.S., Kelsen, D.P., Tepper, J.E. Editors; Vincent T.DeVita, Jr., Hellman, S., Rosenberg, S.A. 2001. *Cancer Principles&Practice of Oncology* 6th edition. page 1092-1093
- Kastan, M. and Bartek, J. 2004. Cell cycle check points and cancer. *NATURE.* Vol 432, 316-323.
- Kim, HS, Oh, JM., Jin, DH., Yang, KH., Moon, EY. 2008. Paclitaxel induces vascular endothelial growth factor expression through reactive oxygen species production. *Pharmacology.* 81(4):317-24.
- Klug, W.S. and Cummings, M.R. 2002. *Genetik Kavramlar.* Altıncı baskıdan çeviri. Çeviri editörü Öner, C. Sayfa 638.
- Knudson, A.G. 1971. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 68(4): 820–823.
- Konukoğlu, D., Turhan, M. S., 2005. Anjiyogenezin temel moleküler mekanizmaları ve tümör anjiyogenezi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi,* cilt(sayı) 36(1).
- Kopnin, B.P. 2000. Targets of oncogenes and tumor suppressors: Key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry.* Vol 65. No 1, pp. 2-27.
- Koizumi, F., Kitagawa, M., Negishi, T, Onda, T., Matsumoto, S., Hamaguchi T. and Matsumura, Y. 1996. Novel SN-38–Incorporating Polymeric Micelles, NK012, Eradicate Vascular Endothelial Growth Factor–Secreting Bulky Tumors. *Cancer Research* 66, 10048.

- Kumar,H., Heer, K., Lee, Peter W.R., Duthie, G.S., MacDonald, A.W., Greenman, J., Kerin, M.J. and Monson, J.R.T. 1998. Preoperative serum vascular endothelial growth factor can predict stage in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, vol.4,1279-1285.
- Kuroi K, Toi M .2001. Circulating angiogenesis regulators in cancer patients. *Int Journal Biol Marker* 16:5-26.
- Kut, C., Gabhann, F.M. and Popel, A. 2007. Whereis VEGF in the body? A meta-analysis of VEGF distribution in cancer. *British Journalof Cancer* 97, 978-985.
- Larsson, A., Sköldenberg, E.& Ericson, H. 2002. Serum and plasma levels of FGF-2 and VEGF in healthy blood donors. *Angiogenesis* 5: 107-110.
- Li F.P and Kantor A.F. Cancer epidemiology. In: *Cancer Medicine (4th Ed)* Holland, JF, Bastr RC, Morton DL, Frei E, Kufe DW, Weichselbaum RR. *Cancer Medicine* 1997, pp 401-422.
- Liao, D., Johnson, R.S. 2007. Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 26: 281-290.
- Lim, S.J, Fan, F., Dallas, NA, Gray, MJ., Xia, L., Samuel, S., Gaur, P., Ellis, LM. 2008. Resistance to oxaliplatin in human intestinal-type gastric cancer cells demonstrates increased migration, invasion, and expression of angiogenic factors. Abstract No: 91
- Loo, W.T.Y., Fong, J.H.M., Chow, L.W.C. 2005. The efficacy of Paclitaxel on solid tumour analysed by ATP bioluminescence assay and VEGF expression: atranslational research study. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 59, S337-S339.
- Lowitz, B.B. and Casciato, D.A. *Medical Oncology&Principles of Cancer Biology . Kanser Biyolojisi ve Onkogenler.*
- Maharaj, A.S.R., Sent-Geniez, M., Maldonao, A.E.and D'Amore, P.A. 2006. Vascular Endothelial Growth Factor Localization in the Adult. *American Journalof Pathology*, Vol.168, No.2.
- Melet, A., Song, K., Bucur, O., Jagani, Z., Grassian, A.R., Khosravi-Far, R. Apoptotic pathways in tumor progression and therapy. *Adv Exp Med Biol.* 2008;615:47-79.

- Merchan, J.R., Jayaram, D.R., Supko, J.G., He, X, Bublely, G.J., Sukhatme, V.P. 2005. Increased endothelial uptake of paclitaxel as a potential mechanism for its antiangiogenic effects: Potentiation by Cox-2 inhibition. *Int. J. Cancer*: 113, 490–498.
- Minko, T., Kopeřková, P., Kopeřek, J. 2000. Efficacy of the chemotherapeutic action of HPMMA copolymer-bound doxorubicin in a solid tumor model of ovarian carcinoma. *Int. J. Cancer*: 86, 108–117.
- Moehler, M., Lyros, O., Gockel, I., Galle, PR., Lang H. 2008. Multidisciplinary management of gastric and gastroesophageal cancers. *World J Gastroenterol* 28; 14(24): 3773-3780.
- Doğan M, Akbulut H. 2009. Kolorektal kanserde adjuvan tedavi. *T. Klinikleri Tıbbi Onkoloji Özel Dergisi* 2 (3):49-57.
- Onur, H. 2005. Tıbbi Onkoloji Kitabı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antıp Yayınları, Editör İçli F. Sayfa 247
- Onur, H. Meme Kanseri 2005. Tıbbi Onkoloji Kitabı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antıp Yayınları, Editör İçli F. Sayfa 257
- Pamir A. 2005. Tıbbi Onkoloji Kitabı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antıp Yayınları, Editör İçli F. Sayfa 145.
- Pasquier, E., Honore, S., Pourroy, B., Jordan, M.A., Lehmann, M., Briand, C. and Braguer D. 2005. *Cancer Res*; 65: (6).
- Pierotti MA, Sozzi G, Croce CM. Oncogenes. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al, eds. *Cancer Medicine*. 6th ed. Hamilton, Ontario: BC Decker Inc; 2003: 73–85.
- Poon, R.T.P., Fan, S.T., Wong, J., 2001. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 19:1207-1225.
- Puchner, A.M., Tziotis, J., Tsonou, A., Protonotariou, E., Sarandakou, A. and Creatsas, G. 2000. Changes in Serum Levels of Vascular Endothelial Growth Factor in Males and Females Throughout Life. *J Soc Gynecol Investig*, 7:309-12

- Punt, C.J.A. 1998. New Drugs in the Treatment of Colorectal Carcinoma. American Cancer Society.
- Ribatti, D. 2004. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *BJH*, 128, 303-309
- Ribatti, D. 2004 (a). The first evidence of the tumor-induced angiogenesis *in vivo* by using the chorioallantoic membrane assay dated 1913. *Leukemia* 18, 1350–1351
- Risinger, A.L., Giles, F.J., Mooberry, S.L. 2008. Microtubule Dynamics as a target in oncology. *Cancer Treatment Reviews*, article in press.
- Salter J.T. and Miller K.D. 2007. Antiangiogenic Agents in Breast Cancer. *Cancer Investigations*. 25:518-526
- Salven P, Orpana A, Joensuu H (1999) Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 5:487-491.
- Salven, P., Miettinen, H., Orpana, A., Alitalo, K. and Joensuu, H. 1997. Serum vascular endothelial growth factor is often elevated in disseminated cancer. *Clinical Cancer Research*. Vol.3, 647-651.
- Skibber, J.M., Minsky, B.D., Hoff, P.M. 2001. Editors; Vincent T. DeVita, Jr., Hellman, S., Rosenberg, S.A. *Cancer Principles & Practice of Oncology* 6th edition. page 1256.
- Stefanini, M.O., Wu, F.T.H., Gabhann, F.M. and Popel, A.S. 2008. A compartment model of VEGF distribution in blood, healthy and diseased tissues. *BMC Systems Biology* 2:77.
- Szabo, S., Sandor, Z. 1998. The diagnostic and prognostic value of tumor angiogenesis. *Eur J Surg* 58:99-103.
- Tebbutt, N.C., Cattell, E., Midgley, R., Cunningham, D., Kerr, D. 2002. Systemic treatment of colorectal cancer. *European Journal of Cancer* 38, 1000-1015.
- Terrero, M.N. and Li, S. 2004. Growth factor receptors: targets for gene therapy and immunotherapy for cancer treatment. *Gene Ther Mol Biol* Vol 8, 175-180.

Tirkkonen, M., Johannsson, o., Agnarsson, B.A., Olsson, H., Ingvarsson, S., Karhu, R., Tanner, M., Isola, J., Barkardottir, R.B., Borg, A. and Kaffioniemi, O.P. 1997. Distinct Somatic Genetic Changes Associated with Tumor Progression in Carriers of BRCA1 and BRCA2 Germ-line Mutations.

Tobolem G. 2007. VEGF: a key therapeutic target for the treatment of cancer-insights into its role and pharmacological inhibition. *Targ Oncol* 2:153-164

Tomatır, A.G. 2003. Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *T Klin Tıp Bilimleri*, 23:499-508.

Vanhoefer, U., Harstrick, A., Achterrath, W., Cao, S., Seeber, S., Rustum, Y.M. 2001. Irinotekan in the Treatment of Colorectal Cancer: Clinical Overview. *Journal of Clinical Oncology*. Vol 19, No 5 (March 1) pp:1501-1518.

Vincenzi, B., Santini, D., Russo, A., Gavasci, M., Battistoni, F., Dicuonzo, G., Rocci, L., Rosaria, VM., Gebbia, N., Tonini, G. 2007. Circulating VEGF reduction, response and outcome in advanced colorectal cancer patients treated with cetuximab plus irinotecan. *Pharmacogenomics* 8(4): 319-27.

Werther, K., Christensen, I.J., Brünner, N., Nielsen, H.J. and the Danish RANX05 Colorectal Cancer Study Group. 2000. Soluble vascular endothelial growth factor levels in patients with primary colorectal carcinoma. *European Journal of Surgical Oncology* 26: 657-662

Wood, R. D., Mitchell, M., Sgouros, J., Lindahl, T. 2001. Human DNA Repair Genes. *SCIENCE*. Vol 291. p.1284-89.

Wynendaele, W., Derua, R., Hoylaerts, M.F., Pawinski, A., Waelkens, E., de Bruijn, E.A., Paridaens, R., Merlevede, W. & van Oosterom, A.T. 1999. Vascular endothelial growth factor measured in platelet poor plasma allows optimal separation between cancer patients and volunteers: A key study an angiogenic marker *in vivo*? *Annals of Oncology* 10: 965-971

Yazır, Y. 2007. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (Vegf): Reseptörleri ve Fonksiyonları. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 29 (3):128-136.

Zetter, B.R. 2008. The scientific contributions of M. Judah Folkman to cancer research. Nature Reviews/ Cancer Volume 8.

Zuckerman, D.S., Clark, J.W. 2008. Systemic Therapy for Metastatic Colorectal Cancer. 1;112(9):1879-91.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sedef Hande AKTAŞ

Doğum Yeri : Eskişehir

Doğum Tarihi : 13.10.1982

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Eskişehir Gazi Lisesi

Üniversite: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji