



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



METRONOMİK KEMOTERAPİNİN ENDOTEL HÜCRE FONKSİYONLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Fatma Gizem SONUGÜR

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan AKBULUT**

ANKARA

2017

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**METRONOMİK KEMOTERAPİNİN ENDOTEL HÜCRE
FONKSİYONLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Fatma Gizem SONUGÜR

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan AKBULUT**

Bu araştırma TÜBİTAK-114S496 ve BAP-16L0230001 ile desteklenmiştir.

**ANKARA
2017**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Metronomik Kemoterapinin Endotel Hücre Fonksiyonları Üzerindeki Etkisi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Fatma Gizem SONUGÜR

Tarih: 18 01 2017

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları Anabilim Dalında Fatma Gizem Sonugür tarafından hazırlanan “Metronomik Kemoterapinin Endotel Hücre Fonksiyonları Üzerindeki Etkisi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 18/01/2017

İmza

Prof. Dr. Hakan AKBULUT

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Filiz ÇAY ŞENLER

Ankara Üniversitesi

Üye

İmza

Prof. Dr. Saadettin KILIÇKAP

Hacettepe Üniversitesi

Üye

Tez Hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Zafer KARAER

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	xii
Çizelgeler	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser	1
1.2. Kanserin Tarihçesi	4
1.3. Endotel Hücreler ve Anjiyogenez	5
1.3.1. Yeni Damar Oluşumu (Neovaskülarizasyon)	10
1.3.1.1. Vaskülogenez ve Anjiyogenez	10
1.3.2. Tümörlerde Anjiyogenez	12
1.3.2.1. Anjiyogenik Dönüşüm	12
1.3.2.2. Tümörlerde VEGF Ekspresyonu	15
1.3.2.3. Tümörlerde Anjiyogenez Süreci	16
1.4. Kanser Tedavisi	18
1.4.1. Kemoterapi	19
1.4.1.1. Kullanılan İlaçlar	19
1.4.1.1.1. 5 Florourasil (5-FU)	19
1.4.1.1.2. İrinotekan (IR)	19
1.4.1.1.3. Okzaliplatin (OX)	20
1.4.1.2. Metronomik Kemoterapi	21
1.4.2. Kanserde Anti-anjiyojenik Tedaviler	22
1.4.3. Kombinasyon Tedavisi	26
2. GEREÇ VE YÖNTEM	29
2.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	29
2.1.1. Gereçler	29
2.1.1.1. Kullanılan Kimyasallar	29

2.1.1.2. Kullanılan Cihaz ve Gereçler	30
2.1.2. Yöntem	30
2.2. Hücre Kültürü Çalışmaları	31
2.2.1. Sitotoksisite Deneyi (Hücre Canlılığının Ölçülmesi)	31
2.2.1.1. Kullanılacak İlaçlar	31
2.2.1.2. MTT ile Hücre Canlılığının Ölçülmesi	32
2.3. Gen İfadelerinin Ölçülmesi İçin Hücrelerin Hazırlanması	32
2.3.1. RNA izolasyonu	32
2.3.2. RNA konsantrasyonu ve kalitesi tayini	33
2.3.3. cDNA sentezi	34
2.4. Kantitatif gerçek zamanlı PZR (qPZR)	34
2.4.1. PCR ürünlerinin kontrolü (Agaroz jel)	36
2.5. Hücre Migrasyonu Deneyi	36
2.6. <i>In vitro</i> Damar Oluşumu Deneyi	37
2.7. Salgılanan anjiyojenik faktör tayini için hücrelerin hazırlanması	38
2.7.1. Anjiyojenik faktör tayini	38
2.7.2. Bradford Deneyi	39
2.7.3. Nitrik Oksit Deneyi	39
2.8. İstatistiksel Analiz Yöntemleri	40
3. BULGULAR	41
3.1. HUVEC hücrelerinde 5 Florourasil, irinotekan ve okzaliplatin ile <i>in vitro</i> sitotoksisitenin belirlenmesi	41
3.2. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirmesi	43
3.3. HUVEC Hücrelerinde Kemoterapinin Anjiyojenik Faktör Düzeylerine Etkisi	50
3.4. HUVEC Hücrelerinde Kemoterapinin Nitrik Oksit Düzeylerine Etkisi	53
3.5. HUVEC Hücrelerinde Kemoterapinin Hücre Migrasyonuna Etkisi	55
3.6. Kemoterapinin <i>In vitro</i> Damar Oluşumu Üzerine Etkisi	56
4. TARTIŞMA	57
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	60
ÖZET	61
SUMMARY	62
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	70

ÖNSÖZ

Lisans eğitimim sırasında yaptığım stajda hocamı tanımam ile mezun olduğumda başka hiçbir yeri düşünmeden başladığım yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübeleri ile yol gösteren, bu süreçte bilimsel anlamda bana kattıklarının yanında maneviyatı ve güler yüzü ile de her an destek olan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Hakan AKBULUT'a,

Tez çalışmam boyunca özverili yardımları ve önerileri ile tezime katkı sağlayan laboratuvar arkadaşlarım ve dostlarım Müge ÖÇAL, Cansu BABAHAN ve Samira ABDİ ABGARMİ olmak üzere, Sedef Hande AKTAŞ ve Nalan AKGÜN'e,

Kantitatif gerçek zamanlı PZR deneyinde yardımcı olan değerli hocam Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a ve Dr. M. Reza DASTOURİ'ye,

Çalışmalarım esnasında sıkıntılarımı sıkılmadan dinleyen, desteğini, güler yüzünü, anlayışını asla benden eksik etmeyen sevgili dostum Gülhan IŞIK'a,

Dostluklarıyla hayatıma anlam katan, tez dönemimi hayatımın diğer anlarında olduğu gibi güzel anılarla şenlendiren lisans hayatımın bana kattığı dostlarıma,

Hayata gerçekten çok şanslı başladığımı sonuna kadar hissettiren, beni hayatımın hiçbir anında yalnız bırakmayan, gösterdikleri sonsuz sevgileriyle her daim içimi ısıtan, hayattaki en kıymetli varlıklarımın annem Sema SONUGÜR'e, babam Fuat SONUGÜR'e ve kardeşim Sinem SONUGÜR'e

Teşekkürü borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µmol	Mikromol
°C	Santigrat derece
5-FU	5 Florourasil
Ang	Anjiopietin
bp	Baz çifti
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
dk	Dakika
DLL-4	Delta benzeri ligand-4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dUMP	Deoksiüridin monofosfat
EC	Endotel hücre
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit

EGFL	Epidermal büyüme faktörü benzeri
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ELAM	Endotelial lökosit adezyon molekülü
ELIZA	Enzim bağlı immünosorbent deneyi
END-1	Endotelin-1
eNOS	Endotelial nitrik oksit sentetaz
EtOH	Etanol
FBS	Fötal sığır serumu
Fc	Kristalize olan bölge
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FOLFOX	Folinik asit-5FU-Okzalipatin
gDNA	Genomik deoksiribonükleik asit
GIST	Gastro intestinal stromal tümör
gr	Gram
GZ-PZR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
HBA	Human Beta Aktin
HCC	Hepatoselüler karsinom
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografi
HRP	Horseradish peroksidase enzimi

HUVEC	İnsan göbek kordonu ven endotel hücresi
ICAM	İntraselüler adezyon molekülü
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL	İnterlökin
IR	İrinotekan
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz
L	Litre
M	Molar
M.Ö.	Milattan önce
mCRC	Metastatik kolorektal kanser
mg	Miligram
MHC II	Majör histokompatibilite kompleks 2
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mmol	Milimol
MMP	Matriks metaloproteaz
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi

ng	Nanogram
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentetaz
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentetaz
NSCLC	İleri evre-skuamöz hücreli akciğer kanseri
OX	Okzaliptatin
PAI-I	Plazminojen aktivatör intibitör tip 1
PBS	Fosfat tamponu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDGF	Platelet kökenli büyüme faktörü
PDGFR-β	Platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü beta
PF-4	Platelet faktör-4
PIGF	Plasental büyüme faktörü
pmol	Pikomol
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
qPZR	Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
RCC	Renal hücre karsinomu
RIN	RNA Integrity Number

RNA	Ribonükleik asit
SMC	Düz kas hücresi
sn	Saniye
TAF	Tümör anjiyogenez faktörü
TBE	Tris/Borat/EDTA
TGF	Dönüştürücü büyüme faktörü
TKI	Tirozin kinaz inhibitörü
TMP	Timidin monofosfat
TNF-α	Tümör nekrozis faktör alfa
t-PA	Doku plazminojen aktivatör
TS	Timidilat sentaz
TSP-1	Trombospondin-1
TTP	Timidin trifosfat
UV	Ultraviyole
VCAM	Vasküler hücre adezyon molekülü
VEGF-A	Vasküler endotelial büyüme faktörü-A
VEGFR	Vasküler endotelial büyüme faktör reseptörü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Normal hücreden kanser hücresine dönüşüm aşamaları.	3
Şekil 1.2.	Anjiyogenezin düzenlenmesinde rol alan faktörler.	10
Şekil 1.3.	Vaskülogenez ve anjiyogenez.	11
Şekil 1.4.	Anjiyogenik dönüşüm ve tümör anjiyogenezi.	13
Şekil 1.5.	Tümör anjiyogenezinin anti-anjiyogenik ve pro-anjiyogenik faktörlere göre düzenlenmesi.	14
Şekil 1.6.	Tümörün endotel hücrelerine VEGF ifadesi.	16
Şekil 1.7.	Anjiyogenezde A) Pasif endotelyumun VEGF-A ile uyarılması B) Endotel hücrelerin aktivasyonu ve hücre dışı matrisin degradasyonu C) Tip ve stalk hücre seçimi D) Stalk hücre uzaması E) Hücre füzyonu F) Olgunlaşma ve stabilizasyon.	18
Şekil 1.8.	VEGF ligand ve reseptörlerini hedefleyen tedavi hedefleri.	23
Şekil 1.9.	VEGF ligandını hedefleyen Bevacizumab antikoru.	24
Şekil 1.10.	Kanserde VEGF ligand ve reseptörlerini hedefleyen moleküller.	25
Şekil 2.1.	Deney planının şematik gösterimi.	29
Şekil 3.1.	HUVEC hücrelerinin 5-florourasil (5-FU) (A), irinotekan (IR) (B) ve okzaliplatin (OX) (C) ile 72 saat inkübasyonu sonrası hücre canlılık oranları.	42
Şekil 3.2.	HUVEC hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzaliplatin uygulaması sonrası VEGF-A gen ifade düzeyleri.	45
Şekil 3.3.	HUVEC hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzaliplatin uygulaması sonrası PDGF-B gen ifade düzeyleri.	45
Şekil 3.4.	HUVEC hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzaliplatin uygulaması sonrası VEGFR2 gen ifade düzeyleri.	46
Şekil 3.5.	HUVEC hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzaliplatin uygulaması sonrası END-1 gen ifade düzeyleri.	47
Şekil 3.6.	HUVEC hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzaliplatin uygulaması sonrası ANG-2 gen ifade düzeyleri.	47
Şekil 3.7.	HUVEC hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzaliplatin uygulaması sonrası TBS-1 gen ifade düzeyleri.	48

Şekil 3.8. HUVEC hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzaliplatin uygulaması sonrası NOS-2 gen ifade düzeyleri.	49
Şekil 3.9. HUVEC hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzaliplatin uygulaması sonrası NOS-3 gen ifade düzeyleri.	49
Şekil 3.10. HUVEC hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzaliplatin uygulama sonrası VEGF-A sitokin düzeyleri.	51
Şekil 3.11. HUVEC Hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzaliplatin uygulama sonrası PDGF-BB sitokin düzeyleri.	51
Şekil 3.12. HUVEC Hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzaliplatin uygulama sonrası ANG-2 proteini sitokin düzeyleri.	52
Şekil 3.13. HUVEC Hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzaliplatin uygulama sonrası END-1 sitokin düzeyleri.	52
Şekil 3.14. HUVEC Hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzaliplatin uygulama sonrası TBS-1 sitokin düzeyleri.	53
Şekil 3.15. HUVEC hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzaliplatin uygulaması sonrası nitrat/nitrit konsantrasyonları.	54
Şekil 3.16. HUVEC hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan, okzaliplatin ve bevacizumab uygulaması sonrası hücrelerin migrasyon oranları.	55
Şekil 3.17. HUVEC hücrelerinde kemoterapi ilaçlarının in vitro damar oluşumuna etkisi. A-Kontrol, B-C-Bevacizumab, D-5FU -3logIC50, E- 5FU -2logIC50, F- 5FU -1logIC50, G- 5FU IC50, H- IR -3logIC50, I- IR -2logIC50, J- IR -1logIC50, K- IR IC50, L-OX -3logIC50, M- OX -2logIC50, N- OX -1logIC50, O-OX IC50	56

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Endotel hücrelerden salgılanan biyolojik faktörler.	6
Çizelge 1.2.	Pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler.	14
Çizelge 2.1.	MTT hücre canlılığı ölçümü için HUVEC hücrelerine uygulanan ilaç dozları.	31
Çizelge 2.2.	RNA saflık ve konsantrasyon değerleri.	33
Çizelge 2.3.	Deneylerde kullanılan primer ve prob dizileri.	35
Çizelge 2.4.	PZR koşulları.	35
Çizelge 3.1.	HUVEC için 5-FU, IR irinotekan ve oksaliptatin ile elde edilen IC50 değerleri.	43
Çizelge 3.2.	HUVEC hücrelerinde 5FU, IR ve OX uygulaması sonrası gen ifade düzeyleri (Ortalama \pm Standart Hata).	43
Çizelge 3.3.	HUVEC hücrelerinde 5FU, IR ve OX uygulaması sonrası gen ifade düzeyleri (Ortalama \pm Standart Hata)	44
Çizelge 3.4.	HUVEC hücrelerinde kemoterapi ilaç uygulaması sonrası VEGF-A, PDGF-BB, ANG-2, END-1 ve TBS-1 sitokin düzeyleri (mg protein başına) (ortalama \pm standart hata).	50
Çizelge 3.5.	HUVEC hücrelerinde 5-Florourasil, irinotekan ve oksaliptatin uygulaması sonrası NO (Nitrat/nitrit) konsantrasyonları (ortalama \pm standart hata).	54

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Kanser, birtakım moleküler değişiklikler sonucunda normal hücrelerde meydana gelen değişimle oluşmaktadır. Normal hücre çoğalmasını durduran ya da uyaran bir geri bildirim mekanizması vardır fakat bu mekanizma kanser hücrelerinde engellenmiştir. Bu değişime uğrayan hücreler, hücre çoğalmasını engelleyen faktörlerin varlığında bile bölünüp çoğalabilmektedir. Bu nedenle, hücre büyümesini ve bölünmesini uyararak için özel sinyallere ihtiyacı yoktur (Nishida ve ark., 2006). Bu hücreler, hücre kültüründe değişikliğe uğrama, hücre adezyonunu azaltma ve yeni enzim üretebilme gibi yeni karakteristikler geliştirirler. Bu değişiklikler hücrelerin etrafında normal hücre olmasına rağmen onların çoğalmasını inhibe ederek kendi bölünme ve gelişmelerine izin verir (Upreti ve ark., 2013).

Yeni oluşan hücreler, hücre sayısını yaklaşık olarak aynı tutacak biçimde ve kontrollü bir hızla çoğalırlar. Ancak hücrelerin zarar görmesi sonucu hücre kaybına bir yanıt olarak, daha hızlı hücre çoğalması ortaya çıkar. Sınırsız üreyen kanser hücreleri salgıladıkları toksik ve proteolitik enzimlerle dokuları eriterek, kendilerine yer açarlar ve kapladıkları alan artar (Carmeliet ve Jain, 2000). Bunun yanı sıra kanserli dokular, besin bakımından da normal dokulara ortak olur ve sayıları giderek daha da çok arttığı için, vücudun normal dokularını artan bir açlıkla besin yetersizliği içine sokarlar. Kanser hücreleri aynı zamanda farklılaşma özelliklerini de kaybederler (Villanueva, 2015). Farklılaşma, normal hücrelerin, vücudun değişik yapılarını oluşturmak için geçirdikleri fiziksel ve yapısal değişiklik sürecidir. Farklılaşmanın bozulmasına paralel olarak kanser hücresi apoptozis (programlı hücre ölümü) yeteneğini de kaybeder ve normal hücreye kıyasla daha uzun yaşarlar (Tsimberidou ve ark., 2015).

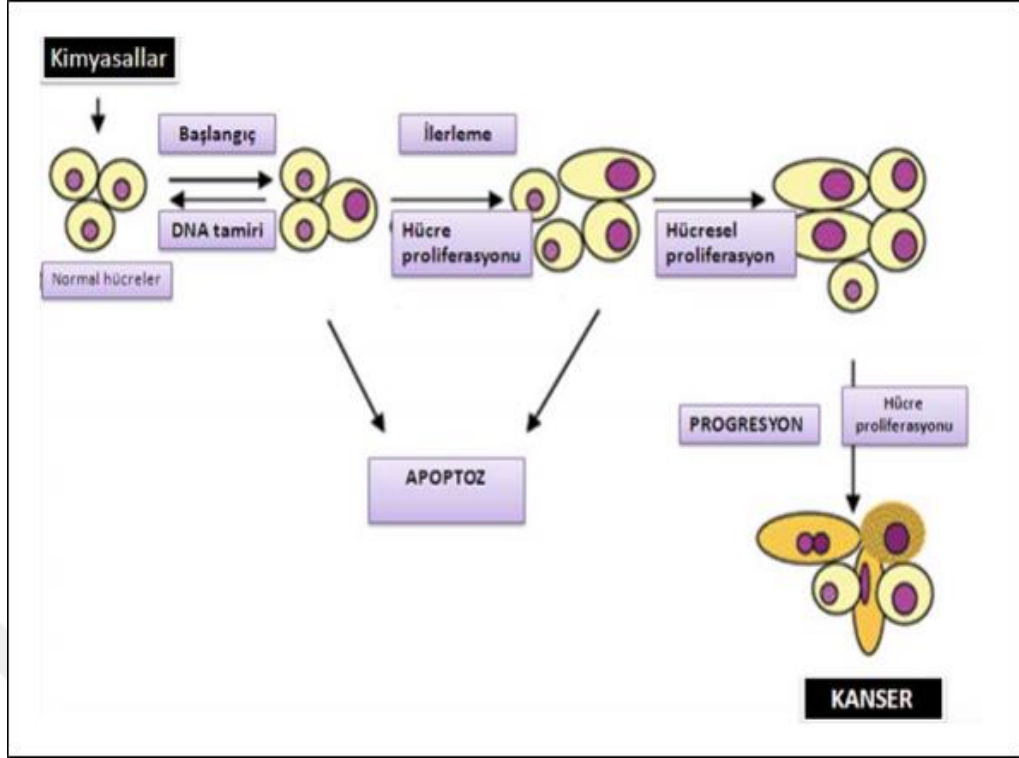
Kanser hücrelerini tanımlayan başlıca altı özellik tanımlanmıştır. Bunlar, büyüme sinyalleri oluşturabilme, büyümeyi durdurabilecek sinyallere duyarsızlaşma, programlanmış hücre ölümünden (apoptoz) kaçabilme, sınırsız bölünme, çoğalma

potansiyeline sahip olma, anjiogenezi sürekli destekleyebilme, invazyon ve metastaz yapabilme özellikleridir (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Son yıllarda, ileri teknoloji ile geliştirilen moleküler biyoloji teknikleriyle kanserin genetik temelini aydınlatılması, kalıtsal ve somatik mutasyonların tanımlanması amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Tüm kanserler, DNA dizisinde meydana gelen birtakım anormallikler sonucu oluşmaktadır. Kanserlerin %10-15'inin, kalıtsal olarak genlerle aktarıldığı, geriye kalan %85-90'lık kısmının ise yaşam boyunca canlı hücrelerdeki DNA'nın, mutajenlere maruz kalması, hücre DNA'sındaki hafif progressif değişiklikler ve replikasyonda hatalar oluşması ile şekillendiği düşünülmektedir (Weinberg, 2013). Bazen oluşan bu mutasyonlardan biri, bulunduğu hücrenin büyümesine ve bu hücreden bir kanser klonunun oluşmasına neden olmaktadır.

Bakterilerden virüslere, radyasyondan kalıtıma, çevresel faktörlerden beslenme alışkanlığına ve kimyasallara kadar birçok faktör kanser oluşumuna neden olabilmektedir. Kanser çok genli, çok faktörlü ve çok basamaklı (Şekil 1.1.) gelişim gösteren bir hastalık olarak tanımlanır.

Normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümü için genomun hasara uğraması gerekmektedir. Genomdaki hasar, DNA replikasyonunda meydana gelen hataların sonucu olabileceği gibi, metabolizma sırasında meydana gelen serbest radikallerin bazı DNA bazları üzerinden hasar oluşturması gibi nedenlerden de kaynaklanabilir (Shah ve Bennett, 2016). DNA hasarı, iyonize radyasyon, UV ve kimyasal karsinojen gibi ajanların etkileşimi ile de gerçekleşebilmektedir. Hücrede DNA hasar tamir mekanizmaları bulunmaktadır. Ancak bazı nedenlerle hasar onarılamazsa, mutasyon adı verilen, genomda kalıcı olan değişiklikler meydana gelir.



Şekil 1.1. Normal hücreden kanser hücresine dönüşüm aşamaları (Erdoğan, 2011).

Kalıtım yoluyla kanser meydana gelme olasılığı çevresel faktörlere oranla çok daha azdır. Genlerin, bazı hastalıklara karşı yatkınlığa neden olup olmadıkları konusundaki araştırmalar hala devam etmektedir. Normalde tümör gelişimini önleyen tümör baskılayıcı genlerdeki bir bozukluğun, kalımsal olarak aktarılması ve sigara gibi bir karsinojenin ilave katkısı ile bireyler kansere yatkın bir hale gelebilmektedirler. Tüm meme kanserlerinin %5-10'u ailesel geçişe bağlı olduğu, bunun yanı sıra yumurtalık kanserinin de kalımsal geçişine ait bazı genlerin varlığı tespit edilmiştir (Kitsera ve ark., 2016). Lösemiler ve bazı çocukluk çağı tümörleri (Wilms tümörü, retinoblastoma) kalımsal özellik gösterir. Kalın barsakta polip gelişimine olan genetik yatkınlık da, kalın barsak kanseri gelişim riskini arttırmaktadır. Her ne kadar kolon kanserlerinin çoğu, yaklaşık %85-90'ı, doğumdan sonra meydana gelen mutasyonların eseri olsa da, geriye kalan kısmı kalımsaldır (Hinds, 2016).

Malign hücreler köken aldıkları normal hücrelerdeki işlev, görünüş ve özellikleri yitirirler, bazı durumlarda köken aldıkları hücrelerin işlevlerine hiç benzemeyen yeni hücresel işlevler de gösterebilirler.

Tümörler benign (iyi huylu) ya da malign (kötü huylu) oluşumlardır. İyi ve kötü huylu tümörlerin her ikisi de anormal hücre büyümesi sonucu oluşurlar. Ancak benign tümörler, sınırlı büyüme potansiyelleri olup, buldukları bölgede büyüyerek genişler ve metastaz yapmazlar. Malign tümörler hızla çoğalıp, çevre dokulara yayılırlar. Uzak organlara kan ve lenf yoluyla metastaz yaparlar. Kansereleşme, normal hücrelerin malignite özelliğini kazanma sürecidir. Hücre DNA'sında bir değişim ya da genetik bir zedelenmenin ardından gelen değişimler, kansereleşmenin çok aşamalı sürecini oluştururlar (Mosquera ve ark., 2013).

1.2. Kanserin Tarihçesi

Geçtiğimiz yüzyıl boyunca bulaşıcı hastalıklar; aşılama, gelişmiş sanitasyon ve antibiyotikler ile kontrol altına alınırken, kanserin de kontrol altına alınıp alınmayacağı konusunda ilgi artmıştır. Bu ilgi yeni olmasına rağmen, kanser yeni bir hastalık değildir. Antik Mısır mumyalarının otopsilerinde kemik tümörlerinin ve diğer neoplazilerin varlığı saptanmıştır. Kötü huylu hastalıkların belirtilerinin neler olduğu Çince ve Arapça tıbbi yazılarda belirtilmiştir. M.Ö. 4. yüzyıla kadar birçok tümör, klinik olarak tanımlanmıştır (Friis ve Sellers, 2013). Kanser terimi ilk defa Hipokrat tarafından, vücut yüzeyinde görülen, genellikle kırmızı, sıcak, ağrılı, diğerlerinden farklı karakterde olan, daha yavaş büyüyen şişlikler için görüntüsünü yengece benzeterek "karkinoma" adını vermiş; Romalı hekim Celcus (M.Ö. 28-50) Yunanca terimi Latinceye çevirerek "cancer" (yengeç) adını kullanmıştır (Merrill, 2015).

Kanser, 18. yüzyılın sonlarına kadar sistematik ve yoğun bir şekilde çalışılmamıştır. Bichat, insanlardaki birçok neoplazmanın patolojisini tarif etmiş ve kanseri, organizmanın herhangi bir parçasıyla aynı şekilde oluşan, dokunun 'kazara

oluşumu' olarak tanımlamıştır (1771–1802). A. Leewenhoek tarafından mikroskop keşfedildikten sonra, Müller (1801–58) ve Virchow (1821–1902), Bichat'ın bulgularını genişletmiştir. Müller ve Virchow, mikroskobu kullanarak, kanserli dokunun hücrelerden oluştuğunu göstermiştir. O zamandan itibaren, patoloğlar ve klinisyenler, vücudun çeşitli organlarındaki kanserleri, farklı morfolojileri, klinik bulguları ve prognozları açısından tamamen farklı hastalıklar olarak dikkate almaya başlamıştır (Faguet, 2015).

1.3. Endotel Hücreler ve Anjiyogenez

Endotelyum kanı dokulardan ayıran tek tabakalı hücrelerden oluşan, bütün damarları kaplayan yüksek derecede özelleşmiş bir hücresel sistemdir. 10-15 µm genişliğinde, 20-25 µm uzunluğunda olan endotel hücreleri, uzamış nükleusları ile kan damarlarının iç yüzeyinin uzun eksenini boyunca sıralanarak tek katlı bir tabaka oluşturan poligonal hücrelerdir. Endotel hücrelerinin yaklaşık %99'u aktif değildir (Rajendran ve ark., 2013). Sağlıklı endotelyum kan akışının düzenlenmesi, besin taşınımı, metabolik homeostaz, koagülasyon ve immün hücre taşınımı gibi fizyolojik süreçlerde yer aldığı gibi inflamasyon, tromboz, aterosklerozis, tümör metastazı ve organ reddi gibi patolojik olaylarda da anahtar rol oynar. Endotel fonksiyonları proteinler (büyüme faktörleri, pro- ve anti-koagülasyon proteinleri), lipidler (düşük-yağlı lipoproteinler), metabolitler (azot oksit ve serotonin) ve hormonlar (endotelin-1) dahil çok sayıda molekülden membrana-bağlı reseptörler aracılığı ile etkilendiği gibi hücre-hücre ve hücre-matrix etkileşimlerini yöneten spesifik proteinlerden de etkilenir (Marcelo ve ark., 2013). Endotel hücrelerinin fizyolojik ve patolojik süreçlerdeki rolü hakkında bilgilerin çoğu insan göbek bağı damar endotel hücreleri ile yapılan çalışmalara dayanmaktadır.

Endotel hücrelerinden başlıca vazodilatör, vazokonstrüktör, anti-trombotik faktörler, büyüme ve inflamasyon mediyatörleri salgılanır. Bu maddeler Çizelge 1.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Endotel hücrelerden salgılanan biyolojik faktörler.

1- Vazodilatörler

- Nitrik oksit (NO)
- Endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktörler
- Histamin
- Prostaglandin (PGI₂)
- Serotonin

2- Vazokonstriktörler

- Endotelinler (ET-1, ET-2, ET-3)
- Angiotensin II
- Serotonin
- Prostaglandin H₂

3- Antitrombotik (homeostaz) maddeler

- Trombomodülin
- Doku plazminojen aktivatör (t-PA)
- Plazminojen aktivatör inhibitör tip I (PAI-1)

4- Büyüme modülatör / mediatörleri

a) Büyüme promotörleri

- PDGF
- FGF
- IGF-1
- IL-1
- Endotelin

b) Büyüme inhibitörleri

- NO
- TGF- β
- Heparin sülfat
- Bradikinin
- Prostaglandin

5- İnflamatuar mediatörler

Adezyon molekülleri:

- Endotelyal Lökosit Adezyon Molekülü (ELAM)
- İntraselüler Adezyon Molekülü (ICAM)
- Vasküler Hücre Adezyon Molekülleri (VCAM)

Antijenler :

- Major histokompatibilite kompleks 2 (MHC II)
-

Endotel hücrelerinden salgılanan en önemli vazokonstriktör madde, 21 aminoasitli peptid yapısında olan endotelin-1 (END-1)'dir. END-1 sentezi kompleks bir süreç olup, preproendotelin denen öncü bir molekülden sentezlenir ve ardından endoteline dönüşür. Daha sonra endotelin dönüştürücü enzim aracılığıyla aktif END-1'e dönüşür. END-1 salımı yavaş yavaş başlar ve saatler hatta günlerce devam edebilir. Vazoaktif özelliklerine ek olarak düz kas hücre proliferasyonunu uyarır,

damarın yeniden şekillenmesine ve lökosit adezyonuna katkıda bulunur (Wang ve ark., 2015).

Endotelden salınan vazoaaktif maddelerin en önemlilerinden biri olan nitrik oksit, yarı ömrü birkaç saniye olan, endotel fonksiyonlarının birçoğunda rol alan önemli bir biyolojik moleküldür. İlk kez 1979'da siklik guanozin monofosfat (cGMP) üzerinden etki gösteren potent bir periferik vasküler düz kas gevşetici olarak tanımlanmıştır. Güçlü vazodilator etkisinin yanısıra nitrik oksit, endotele lökosit yapışmasını, vasküler düz kas proliferasyonunu ve trombosit agregasyonunu engeller. Küçük molekül yapısından dolayı hücre membranları arasında hızlı bir şekilde difüze olabilir (Choudhari ve ark., 2013).

NO, nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimi tarafından sentezlenir. NOS'un başlıca üç izoformu vardır: Nöronal (nNOS veya NOS-1), İndüklenebilir (iNOS veya NOS-2) ve Endotelyal (eNOS veya NOS-3). Nöronal NOS, esas olarak sinir sisteminde bulunur ve nNOS tarafından sentezlenen NO sinapsların şekillenmesinde, koku alma, görme, ağrıyı algılama, hafıza oluşması gibi işlevlerde rol oynar. Ayrıca akciğer, pankreas, mide ve uterusda da bulunur ve kalsiyuma bağımlı olarak salgılanmaktadır. İmmun sistem hücrelerinde bulunan iNOS tarafından üretilen NO ise kalsiyumdan bağımsız olarak sentezlenir. Uyarıcılar tarafından transkripsiyonel olarak (mRNA artışıyla) enzim indüklenir (Cheng ve ark., 2014). Makrofajlardaki NO, tümör hücresi ve mikroorganizmalara antimikrobiyal ve antitümöral sitotoksik etki gösterir. Vasküler endotel hücrelerinde eksprese edilen eNOS tarafından üretilen NO, damar sağlığı açısından çok önemli bir moleküldür. Düz kasların gevşemesini sağlayarak kan akış hızını regüle eder ve vasküler düz kas hücreleri üzerinde antiproliferatif etkiye sahiptir. cGMP aracılığıyla trombositlerin hem agregasyonunu hem de adezyonunu inhibe ederek trombus oluşumunu engeller. Endotel yüzeyindeki adezyon (yapışma) moleküllerinin ekspresyonunu inhibe ederek antiinflamatuvar etki gösterir (Rath ve ark., 2015; Lankhorst ve ark., 2014).

NO, hücre proliferasyonunu destekleyerek ve apoptozu inhibe ederek endotel hücreleri için sağkalım faktörü gibi davranır. İn vitro koşullarda anjiyogenik

uyarılar karşı, HUVEC hücrelerinin tüp benzeri yapılar oluşumu ve migrasyonun desteklenmesi için NO sinyalizasyonu gereklidir (Morbidelli ve ark., 2003; Cooke, 2003). Nitrik oksitin vazodilatör etkisi, anjiyogenez boyunca artan kan akışına karşı endotel hücre proliferasyonunu stimüle eder. Meme kanseri hücreleri ile yapılan *in vivo* bir çalışmada, iNOS'u olmayan farelerde iNOS'u fonksiyonel olan farelere göre tümör gelişim hızı bozulmuş ve tümör yükü azaldığı bulunmuştur (Ellies ve ark., 2003). Kolon adenokarsinom hücreleri ile yapılan başka bir *in vivo* çalışmada ise iNOS'un aşırı ifadesinin tümör gelişimi ve anjiyogenezi teşvik ettiği gösterilmiştir (Cullis ve ark., 2006).

Hücre kültürü deneyleri, uygun büyüme etmenlerini içeren ortamlarda bulunan endotel hücrelerinin, diğer bütün hücre tiplerinden yalıtılmış olsalar dahi, migrasyon sağlayıp tüp oluşumu yapabildiğini göstermektedir (Liang ve ark., 2007). Bu deneyler gelişen kapiller tüplerin kan ya da içlerinde geçen herhangi başka bir şey içermelerine gerek olmadığı, yani kapiller ağın oluşumunun başlaması için kan akımı ve basıncının şart olmadığını göstermektedir.

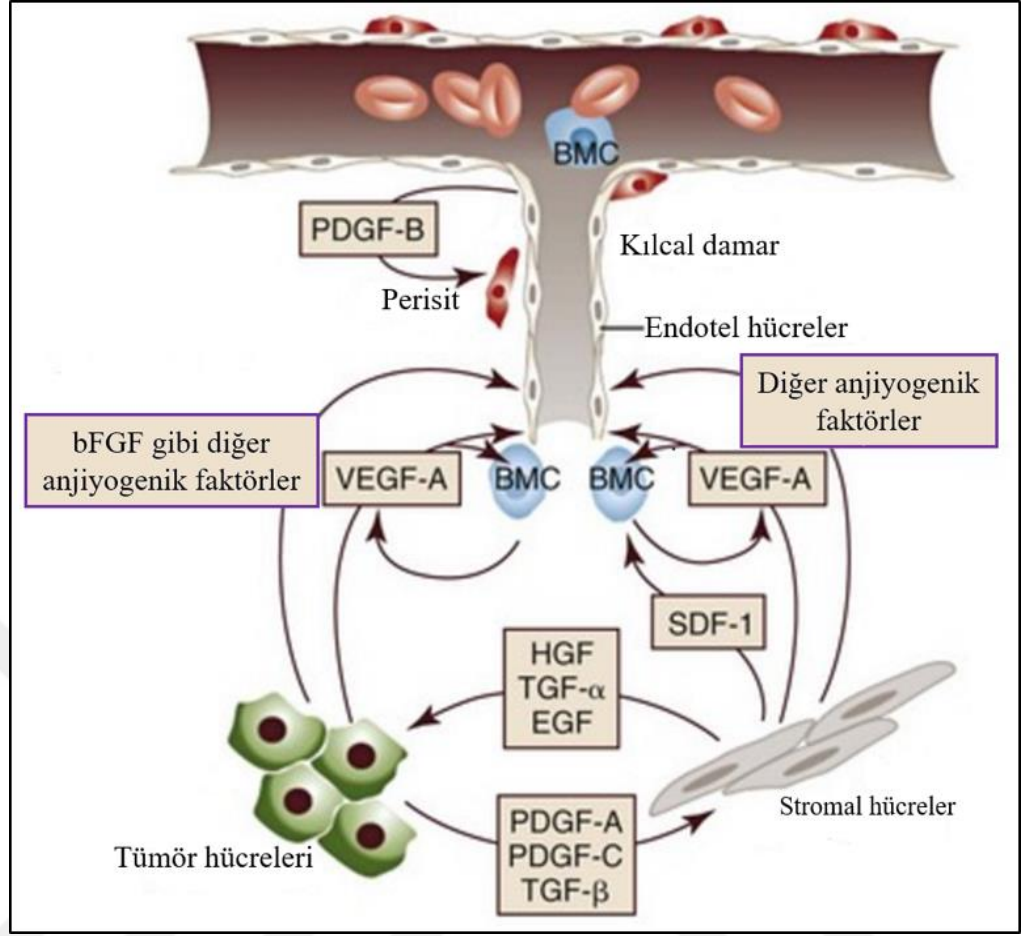
Anjiopietin ailesi Ang-1, 2, 3 ve 4 olmak üzere 4 molekülden oluşur. Tie 1 ve 2 olmak üzere 2 adet endotel reseptör tirozin kinaza bağlanarak çalışırlar. Ang 2, Ang 1'in yarışmalı inhibitörüdür. Endotel hücreleri tarafından üretilerek, Weibel-Palade cisimciklerinde depolanır (van Meurs ve ark., 2009). Endotel hücrelerinin stres altında olduğu durumlarda Ang 2 salımı, VEGF, fibroblast büyüme faktörü ve hipoksi tarafından indüklenir. Weibel-Palade cisimciklerinden salınan Ang 2, Tie 2 reseptörlerine bağlanarak Ang-1'in etkisini inhibe eder. Endoteli inflamatuvar ajanlara duyarlı hale getirir (damar destabilizasyonu) ve VEGF aracılı anjiogenezi kolaylaştırır (Fiedler ve ark., 2004). Transgenik fare embriyolarında Ang-2'nin fazla salımının, endotel hücreler ile periendotelyal hücreler arasındaki bağlara zarar verdiği, bunun da Ang-1'i olmayan fare embriyolarına benzer şekilde, damar oluşumunda ciddi hasarlara yol açtığı tespit edilmiştir. Yetişkin farelerde ve insanlarda Ang-2 sadece damarın yeniden yapılandırılmasında (remodeling) salgılanır. Ang-2'nin anjiyogenezdeki rolü VEGF-A ile ilişkilidir. VEGF-A varlığında Ang-2 damar destabilizasyonunu sağlar ve vasküler filizlenmeyi destekler.

VEGF-A yokluğunda ise baskılayıcı bir rol oynayarak vasküler regresyonu hızlandırır (Mueller ve Kontos, 2016).

Ang-2 salımı tümör anjiyogenezinde tümör ve çevre dokusu tarafından üretilen birçok faktör tarafından uyarılır. Tümör kaynaklı VEGF artışı bunların içerisinde en önemlisidir. İnsulin benzeri büyüme faktörü 1, platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), hipoksi, diğer Ang-2'yi uyaran başlıca faktörlerdir (Tait ve Jones, 2004).

Normal bir dokuda Ang 1 salımı daha ön planda iken, tümör dokusunda Ang 2 salımı ön plandadır. Tümör anjiyogenezinde Ang 2 ve VEGF A ilişkisi önemlidir. Bu ilişkinin tümör anjiyogenezinde ana basamak olduğu düşünülmektedir. Tümörlerden salınan Ang 2'nin adapte olmuş endotel üzerine parakrin etkileri tümör büyümesini ve vaskülarizasyonu arttırırken, sistemik artmış Ang-2'nin tümör büyümesini azalttığı ve damar regresyonuna yol açtığı tespit edilmiştir. Bu durum ortamdaki VEGF A varlığı ile ilişkili bulunmuştur. Tümör dokusunda VEGF A varlığında Ang-2, tümör dokusunda damar destabilizasyonunu sağlar, VEGF A etkilerini artırarak yeni damar oluşumlarını destekler (Daly ve ark., 2013).

Platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), hücre büyümesi ve bölünmesini düzenleyen başlıca faktörlerden olup, anjiyogenezde önemli rol oynar. Mezenkimal hücreler olan fibroblastlar, düz kas hücreleri ve glial hücreler için güçlü bir mitojendir. Fare ve insanlarda; PDGF sinyal sisteminde 4 ligand (PDGF A-D) ve 2 reseptör (PDGF α ve β) bulunmaktadır. Endotelial hücreler, başlıca PDGF-BB üretir ve bu faktör de platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü- β (PDGFR- β) aktivasyonu ile endotel hücre migrasyonunu, proliferasyonunu ve mikrodamarlaşmada tüpsü yapının oluşabilmesi için perisitlerin toplanmasını uyarır (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. Anjiyogenezin düzenlenmesinde rol alan faktörler (Crinò ve Metro, 2014).

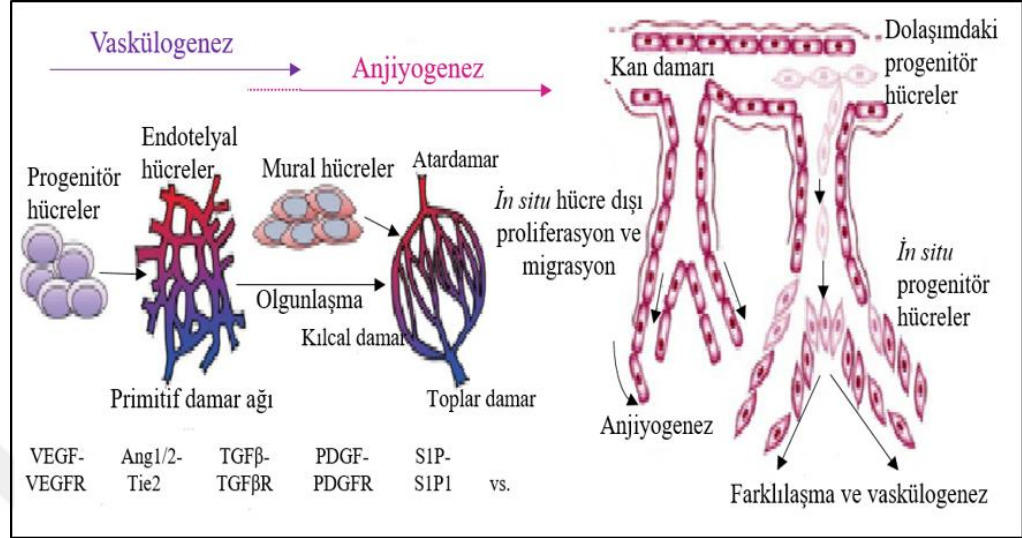
1.3.1. Yeni Damar Oluşumu (Neovaskülarizasyon)

Yeni kan damarlarının oluşumunu sağlayan başlıca iki temel süreç vardır: Vaskülogenez ve Anjiyogenez.

1.3.1.1. Vaskülogenez ve Anjiyogenez

Embriyonik gelişim sürecinde vasküler ağ anjiyoblastları, endotel hücre öncüllerini (EC) ve düz kas hücrelerini (SMC) içeren bir ya da daha fazla vasküler prekürsörlerin farklılaşmasıyla gelişmektedir. Endotel hücre toplulukları primitif endotel tüplerin oluşumuna öncülük eder, ardından düz kas hücrelerinin yardımıyla primitif vasküler ağ oluşturulur. Son olarak oluşan bu tüplerin uzaması, bölünmesi ve

olgunlaşması ile arter ve ven eksenlerinin 3 boyutlu yapısı oluşur (Şekil 1.3.) (Chun ve ark., 2016).



Şekil 1.3. Vaskülojeniz ve anjiyogenez (Takuwa ve ark., 2010; Sales ve ark., 2005).

Vaskülojeniz, embriyonik kök hücrelerin veya anjiyoblast öncüllerinin endotel hücrelerine farklılaşarak primitif kan damarlarının ya da endotel tüplerin oluşumu olarak tanımlanır. Vaskülojenizi 2 alt tipe ayırmak mümkündür. Anjiyoblast birleşmesinin in situ olarak kök hücre farklılaşmasından köken alması durumunda Tip I, bu kök hücrelerin migrasyonu ile meydana gelen anjiyoblast birleşmesi ise Tip II olarak isimlendirilmektedir. Anjiyogenez ise mevcut damarlardan köken alan vasküler ağın uzaması olarak tanımlanır (Salomon ve ark., 2013).

Anjiyogenez, doğum sonrası, menstrual döngü boyunca endometriyumdaki değişiklikler gibi 'zorunlu' fizyolojik durumlarda devam edebildiği gibi, 'adaptif' fizyolojik durumlardan kas egzersizleri ya da yara dokularında da devam edebilmektedir. Ayrıca patolojik olarak kanser, diyabetik retinopati, sedef hastalığı, romatizmal poliartrit, aterosklerotik plak gelişimi gibi durumlarda da görülebilmektedir (Yoo ve Kwon, 2013).

1.3.2. Tümörlerde Anjiyogenez

Mevcut damarlardan yeni kan damarı oluşumu anlamına gelen anjiyogenez terimi, İngiliz cerrah John Hunter tarafından, 1794 yılında, soğuğa uzun süreli maruz kalan ren geyiklerinin boynuzlarındaki kan damarı gelişimini anlatabilmek için kullanılmıştır (Serhan ve Savill, 2005).

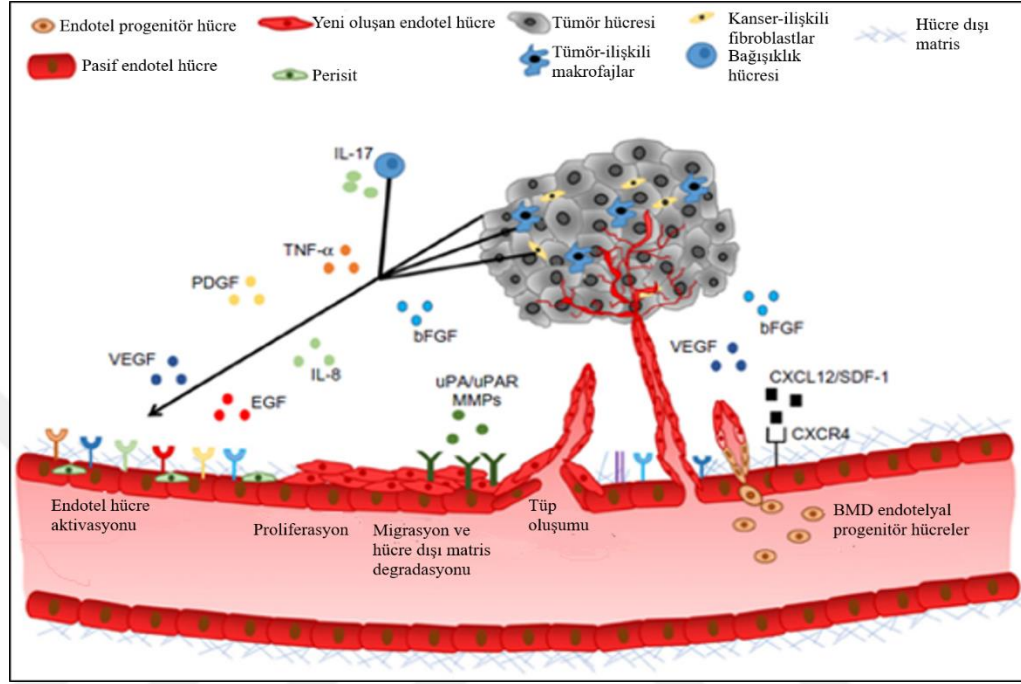
Patolojik anatominin kurucusu olan Virchow, 1865 yılında, bir tümör kitlesi içinde fazla sayıda kan damarı bulunduğuna ve tümör stromasının kendine özgü bir kapiller ağına sahip olduğuna dikkat çekmiştir. Tümör vaskülarizasyonu, sistematik olarak ilk defa 1907 yılında, Goldman tarafından çalışılmıştır. Goldman, arter içine yağ ile birlikte enjekte ettiği bizmut yardımıyla tümörün geliştiği organdaki vazoproliferatif yanıtı tanımlamıştır. Bu organlardaki normal kan damarlarının düzensiz bir büyüme ile bozulduğunu, genişlediğini ve sarmal bir şekil aldığını, ardından belirgin kapiller tomurcuklanmalar oluşturarak yeni damar oluşumu gözlendiğini belirtmiştir (Scholz ve ark., 2002).

1939 yılında ilk defa Ide ve arkadaşları, tümörlerin kan damarlarının gelişimini stimüle eden spesifik faktörler salgıladıklarını belirtmişlerdir. 1971 yılında Folkman ve arkadaşları tarafından ilk defa bir anjiyogenik faktör izole edilmiş, aktif kısmı ‘Tümör Anjiyogenez Faktörü’ (TAF) olarak adlandırılmıştır. Yaptıkları çalışmalar sonucunda tümör gelişiminin anjiyogeneze bağlı olduğunu belirtmeleri ve anti-anjiyogenez terimini tanıtmaları ardından birçok çalışma yapılmış, anjiyogenik ve anti-anjiyogenik aktiviteye sahip olan çeşitli büyüme faktörü aileleri tanımlanmıştır (Ribatti, 2008).

1.3.2.1. Anjiyogenik Dönüşüm

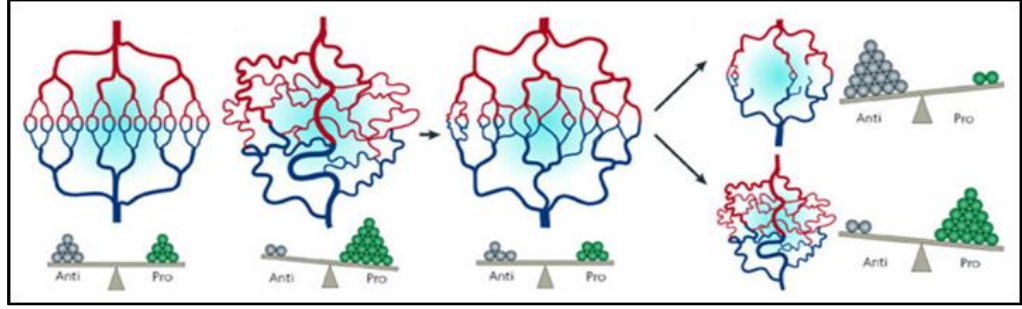
Hücrelerdeki genetik ve epigenetik değişimlere ek olarak, tümör gelişimi ve yayılımı için gerekli olan bir diğer adım ‘anjiyogenik dönüşüm’ yani tümör vaskülarizasyonunun indüklenmesidir (Şekil 1.4.). Normal dokular gibi tümörlerin de oksijen ve metabolit desteği ile atık bileşiklerini uzaklaştırmaya ihtiyaçları vardır.

Tümör hücrelerinin buldukları dokudan vasküler sisteme erişimleri ile kan desteği sağlamaları, tümörlerin gelişimlerinde hız sınırlayıcı basamaktır (Hanahan ve Folkman, 1996).



Şekil 1.4. Anjiyogenik dönüşüm ve tümör anjiyogenezi (Toro Bejarano ve Merchan, 2015).

Tümör anjiyogenezinin düzenlenmesinde pro-anjiyogenik moleküller ile anti-anjiyogenik moleküller rol oynamaktadır (Çizelge 1.2.). Normal dokuda az miktarda anjiyogenik faktör salgılanırken daha fazla miktarda anjiyogenezi inhibitörleri salgılanmaktadır (Şekil 1.5.). Hipoksi, onkogen aktivasyonu ya da tümör süpresör mutasyonu gibi uyarılarla anjiyogenik gen ekspresyonu artar ve tümör tipi ile mikroçevresine göre anjiyogenik dönüşüm indüklenir (Carmeliet ve Jain, 2000).



Şekil 1.5. Tümör anjiyogenezinin anti-anjiyogenik ve pro-anjiyogenik faktörlere göre düzenlenmesi (Jain, 2008).

Çizelge 1.2. Pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler (Vasudev ve Reynolds, 2014).

Anjiyogenezi inhibe eden faktörler	Anjiyogenezi aktive eden faktörler
Trombospondin	Vasküler endotelial büyüme faktörü
Anjiyostatin (plazminojen kısmı)	Bazik fibroblast büyüme faktörü
Endostatin (kolajen XVIII kısmı)	Asidik fibroblast büyüme faktörü
Vazostatin	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
Prolaktin	Hepatosit büyüme faktörü
Troponin 1	Epidermal büyüme faktörü
Anjiyopietin-2	İnsülin-benzeri büyüme faktörü
Alfa interferon	TGF- α
Gama interferon	TGF- β
İnterlökin 12	TNF- α
Fibronektin	Plasental büyüme faktörü
Metalloproteinaz doku inhibitörleri	Anjiyopietin-1
Plazminojen aktivatör inhibitör 1	Anjiyogenin
Platelet faktör 4 (PF 4)	İnterlökin 8
Pigment epitelyal hücre faktörü	Granülosit koloni uyarıcı faktörü
Retinoik asit	Proliferin
	Leptin

Tümörler çeşitli pro-anjiyogenik faktörleri eksprese ederler. Tümörlerde en fazla bulunan anjiyogenik faktör VEGF'dir. Memelilerde VEGF ailesinin VEGF A, B, C, D ile plasental büyüme faktörü (PlGF) izoformları yer alır. Tümör anjiyogenezinde en fazla rol oynayanı VEGFA'dır. VEGFA gibi, diğer VEGF ailesi üyeleri de insan tümörleri tarafından üretilmektedir. VEGF reseptör 2'ye (VEGFR2) bağlanan VEGFC ve VEGFD, VEGFA'nın aktive ettiği yolaklardan çoğunu aktive edebilmektedir. Diğer bir VEGF ailesi üyesi olan PlGF, normal gelişim için zorunlu

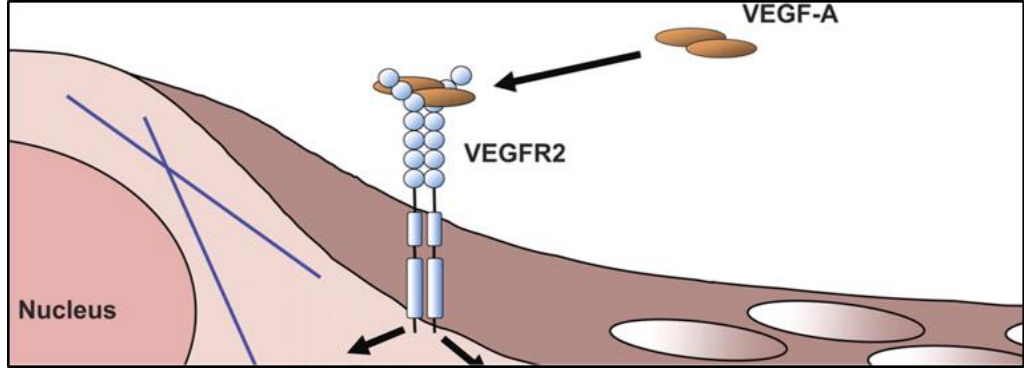
değilken, kanser ve diğer patolojik olaylarda çok temel görevlere sahiptir. VEGFR2 yerine VEGFR1'e bağlanır (Hay, 2013).

Normal fizyolojik anjiyogenez sürecinde, yeni damarlar hızla olgunlaşır ve stabil kalır. Tersine, hiç iyileşmeyen yaralar olarak tanımlanan tümörlerde, pozitif ve negatif kontroller arasındaki denge kaybedildiği için damarlar stabil olarak kalamamaktadır. Her yeni oluşan damar, tümöre yeni bir kan damarı oluşturabilecek şekilde düzenlenir. Bu nedenle tümör vaskülarizasyonu kendine özgü karakteristikler geliştirir ve normal kan desteği sağlayan sistemden farklıdır (Shibuya, 2013).

Tümörde oluşan kan damarları, düzensiz şekilleri, genişlikleri ve kıvrımları ile normal damarlardan ayrılır. Ayrıca belirli venüller, arterioller ve kapillerler şeklinde düzenlenmemişlerdir, hepsinin kaotik özellikleri mevcuttur. Tümör içinde oluşan vasküler ağ fazla miktarda sentezlenen vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) nedeniyle sızıntılı ve hemorajiktir. Bu nedenle tümör damarlarında kan akışı çok daha yavaştır (Szabo ve ark., 2013).

1.3.2.2. Tümörlerde VEGF Ekspresyonu

VEGF, tümörlerin çoğunda ifade edilmektedir (Şekil 1.6.). VEGF mRNA'sı neoplastik hücrelerde büyük oranda ifade edilirken, endotel hücrelerinde bu miktar daha düşüktür. Buna karşılık endotel hücrelerinde VEGFR1 ve VEGFR2 mRNA ve proteinleri daha fazla ifade edilmektedir. Neoplastik hücrelerden sentezlenen VEGF, yakındaki endotel hücrelerini etkilemektedir. İmmünohistokimyasal çalışmalar, VEGF'in hem neoplastik hücrelerde hem de endotel hücrelerinde lokalize olduğunu göstermiş, VEGF fonksiyonlarının parakrin etki gösterdiğini doğrulamıştır. Dvorak ve arkadaşları, kobay ve insanlardaki solid tümörlerin yakınındaki damarlarda VEGF proteininin varlığını göstermişlerdir, fakat tümöre 0,5 mm'den daha uzak olan damarlarda aynı sonucu bulamamışlardır (Dvorak, 2015).



Şekil 1.6. Tümörün endotel hücrelerine VEGF ifadesi (Satchell ve Braet, 2009).

1.3.2.3. Tümörlerde Anjiyogenez Süreci

Erken embriyo döneminde kullanılan vaskülogenez süreci, belli koşullarda tümörler tarafından da kullanılmaktadır. Tümör neovaskülarizasyonlarının çoğu anjiyogenez yoluyla gerçekleşir.

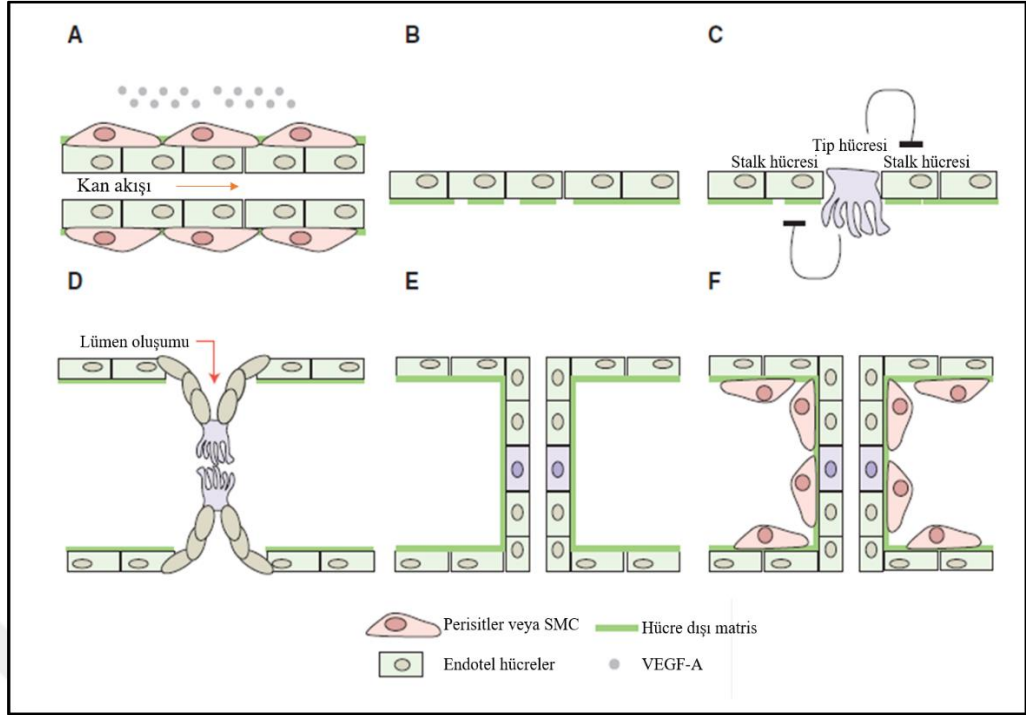
Kan damarlarının, etraftaki dokulara yeterli oksijen desteği sağlanıp sağlanmadığını kontrol eden, oksijen ve hipoksi ile indüklenen sensörleri ve reseptörleri vardır. Bu bileşenler kan akımının ayarlanmasından damarların yeniden düzenlenmesine kadar çeşitli düzenlemeler sağlar. Hipoksi ve diğer endojen sinyaller hücreleri aktive eder ve VEGF, Ang-2, FGF ve kemokinler gibi var olan damarlardan yeni damar oluşumunu indükleyecek sinyal faktörlerinin salınımını sağlarlar (Shahi ve Pineda, 2008).

Tek başına yüksek miktarda VEGFA ekspresyonu, anjiyogenez başlatabilir ve olgunlaşma süreci boyunca erken evredeki ana damarların oluşumunu takip eden morfolojik değişimleri ve adımları düzenler. bFGF gibi diğer büyüme faktörleri, endotel hücrelerin proliferasyonunu ve lümen oluşumunu destekleyen sinyal sağlar. Erken evrelerde, VEGF'e yanıt olarak, damar genişlemesi ve daha önceden var olan kapillerlerin ya da post-kapiller venüllerde vasküler geçirgenlikte artış gözlenir. Ardından, Ang-2'nin fonksiyonu olduğu düşünülen, endoteli saran perisitlerin gevşemesi gerçekleşir. Endotel hücreler aktifleşir ve vasküler endotelyal ile kaderin

sinyalizasyonu azalır, böylece endotel hücrelerinin birbirlerine olan yakınlıkları azalır, damar genişlemeye başlar (Chung ve Ferrara, 2011).

Vasküler bazal membran ve hücre dışı matriks, altta kalan endotelial hücrelerin, kemotaktik anjiyojenik uyarıya karşı, perivasküler boşluğa göç etmelerini sağlayabilmek için lokal olarak parçalanır. Neuropilin, VEGF/VEGFR and NOTCH / DLL4 and JAGGED1 sinyalizasyonları ile matrix metaloproteazların salımı ve ekstraselüler matriks ile bazal membranın degradesyonu başlar. MMP'lerin salgılanmasını sağlayan bazı endotel hücreleri (tip cells) polarize olarak migrasyona öncülük edebilmek için filopodia oluştururlar ve VEGF gradienti ile migrasyonu devam ettirirler. Bu hücrelerin hemen yanındaki stalk hücreler ise bölünerek tip hücrelerini takip ederler. Bu sırada proliferen olan endotel hücreleri bir endotel hücre kemoatraktanı olan EGFL7 salgırlar. Bu molekül ekstraselüler membran komponentlerine bağlanır ve vasküler lümen oluşumunu düzenler. 2 tip hücresi birbiri ile yakınlıştığında EC-EC bağlantıları kurulmaya başlar ve sürekli bir lümen yapısı oluşturulmuş olur. Ardından perisitler bağlanır. Perivasküler hücrelerin endotel hücreleri çevrelemesi ardından yeni oluşan kan damarı etrafında vasküler bazal lamina üretilir. Kan akımı başladığında, oksijen ve nutrient perfüzyonu VEGF ekspresyonunu azaltır ve endotel hücrelerdeki oksijen sensörlerini inaktive eder (Şekil 1.7.) (Potente ve ark., 2011).

Normal vaskülarizasyonda, perisitler endotel hücre proliferasyonunu ve dokunun VEGFA üretiminden etkilenmesini azaltır. Tersine, tümörlerde perisitler ile damar ilişkisinin azalması, anormal damar çapları ile VEGFA inhibisyonuna duyarlılığını açıklamaktadır. VEGF'in sağkalım faktörü olarak fonksiyon göstermesinden dolayı, aktivitesinin yokluğu ya da inhibisyonu, endotel hücrelerin apoptozunu indüklemektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, Ang-1 ya da PIGF gibi diğer anjiyogenik sitokinlerin de sağkalım sinyalleri üretebildiğini ve VEGF yokluğundan dolayı olgunlaşmamış kan damarlarını kurtarabileceğini göstermektedir (Chung ve ark., 2010).



Şekil 1.7. Anjiyogenezde **A)** Pasif endoteliumun VEGF-A ile uyarılması **B)** Endotel hücrelerin aktivasyonu ve hücre dışı matrisin degradasyonu **C)** Tip ve stalk hücre seçimi **D)** Stalk hücre uzaması **E)** Hücre füzyonu **F)** Olgunlaşma ve stabilizasyon (Blanco ve Gerhardt, 2013).

1.4. Kanser Tedavisi

Kanser dünyadaki ölüm nedenleri arasında en ön sıralarda gelmekte olup, hastalığın tedavisinde kombine ya da tek başına kullanılabilen çok çeşitli tedavi seçenekleri vardır.

Solid tümörlerde erken evrelerde en çok kullanılan tedavi şekli cerrahidir. Cerrahi ile birlikte yaygın olarak kullanılan diğer tedavi seçenekleri ise kemoterapi ve radyoterapidir.

Radyoterapi, yüksek enerjiye sahip ışınların penetrasyonu ile kanserli hücrelerin öldürülmesi temeline dayanmaktadır.

Cerrahi ve radyoterapi ile birlikte kemoterapi de solid tümörlerin tedavisinde standart bir tedavi yöntemidir. Kemoterapide esas olarak sistemik yoldan

uygulandığında kanser hücrelerinin öldürülmesi amaçlanır fakat bu ilaçlar tümör hücrelerine ek olarak hızlı bölünen sağlıklı hücrelere de zarar verdiği için ciddi yan etkilere neden olmaktadır. Bu istenmeyen yan etkiler çoğu zaman tedavinin erken sonlanmasına neden olabilmektedir (DeSantis ve ark., 2014).

Yukarıda sayılan tedavi seçeneklerine ek olarak, tek başına veya birlikte uygulanabilen, hormon tedavileri, biyolojik tedavi yöntemleri ve hedefe yönelik tedaviler de rutin kanser tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır.

1.4.1. Kemoterapi

1.4.1.1. Kullanılan İlaçlar

1.4.1.1.1. 5 Florourasil (5-FU)

5 Florourasil kanser tedavisinde en sık kullanılan ilaçlardan biridir. 5-FU'nun kesin etki mekanizması tamamen aydınlatılamamıştır, ancak ilacın deoksiüridin monofosfattan (dUMP) timidin monofosfat (TMP) oluşumunu katalizleyen timidilat sentetazı (TS) inhibe ettiği bilinmektedir. TMP sonradan timidin trifosfata (TTP) dönüştürülür, TTP'ye DNA sentez ve onarımı için ihtiyaç duyulmaktadır. 5-FU RNA sentezine katılarak protein üretimini de engellemektedir. Hızlı çoğalan hücreler üzerindeki etkisi çok daha fazladır (Pandey ve ark., 2016).

1.4.1.1.2. İrinotekan (IR)

İrinotekan, topoizomeraz 1 inhibitörü olarak kanser tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Kimyasal olarak bakıldığında irinotekan, doğal bir alkaloid olan kamptotesinin yarısentetik analogudur. CPT-11 olarak bilinen irinotekan, 1996 yılında FDA tarafından hızlandırılmış olarak, 1998 yılında ise tam onay almıştır.

WHO (DSÖ)'nün sağlık sisteminde ihtiyaç duyulan en önemli ilaçlar listesinde yer almaktadır.

En sık kolon kanserinde kullanılmakta olup, genellikle 5-FU, lökovorin, irinotekanı içeren FOLFIRI rejimi gibi diğer kemoterapi ilaçları ile kombine olarak kullanılır. Kolon kanseri dışında mide kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri ve pankreas gibi kanserlerin ikinci basamak tedavisinde de kullanılmaktadır (Etienne-Grimaldi ve ark., 2015).

1.4.1.1.3. Okzaliptatin (OX)

Okzaliptatin, kanser kemoterapisinde kullanılan platin temelli anti-neoplastik bir ajandır. 1996 yılında Avrupa'da kullanılmaya başlayan okzaliptatin 2002 yılında FDA tarafından onay alarak tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Kolorektal kanser tedavisinde, sıklıkla FOLFOX (Folinik asit-5FU-Okzaliptatin) olarak bilinen bir kombinasyon ile kullanılmaktadır. Kolon kanseri dışında başta gastrointestinal sistemin diğer tümörleri olmak üzere sisplatinin etkili olduğu pek çok solid tümörde ikinci ve üçüncü basamak tedavide kullanılmaktadır.

Klasik kemoterapi ilaçları genellikle kanser hücrelerini öldürebilecek dozlarda kullanılmaktadır. Bu dozlarda kullanıldığında normal hücreler üzerinde de sitotoksik etki yaptıkları için ciddi yan etkiler ortaya çıkar. Günümüzde kullanılan kanser kemoterapi ajanlarının tümör seçici özelliklerinin bulunmaması nedeniyle bu ilaçların rutin kullanımında bazı kısıtlamalar söz konusu olmaktadır. Özellikle ilaçların daha iyi tolere edilebilmeleri için doz azaltılması yoluna gidilmektedir. Bu durumda ilacın kanser hücrelerini öldürme potansiyeli önemli ölçüde azalmaktadır (Alcindor ve Beauger, 2011).

Klasik kemoterapi ilaçlarının da sadece kanser hücrelerini doğrudan öldürmeyip karsinogenezin değişik basamaklarını etkileyerek, son yıllarda geliştirilen hedefe yönelik kanser ilaçlarına benzer bir etkinlik profiline sahip

olabileceğini gösteren çalışmalar söz konusudur. Genellikle kemoterapi ilaçlarının sitotoksik olmayan düşük dozlarda kullanılması ile daha fazla oranda gözlenen bu etkiler, kanser tedavisinde faydalı olabilmektedir. Klasik kemoterapi ilaçlarının düşük dozlarda anti-kanser etki gösteren bu uygulama biçimi klinikte genel olarak metronomik kemoterapi olarak adlandırılmaktadır.

1.4.1.2. Metronomik Kemoterapi

Metronomik kemoterapi terimi ilk olarak 2000 yılında Hanahan ve ark. tarafından gündeme getirilmiş ve klasik tedavi düzenininin 2-3 hafta gibi uzun süre ara verilmeden, daha sık ve düşük dozda uygulanması olarak tanımlanmıştır (Hanahan ve ark., 2000). Bu tedavi şeklinde, geleneksel kemoterapide izlenen tümör hücrelerindeki sitotoksik etkiye karşı ilaç direncini aşabilmek için tedavi hedefinin farklı bir mekanizmaya kaydırılması amaçlanır. Kanser hücrelerinin bölünmesiyle karşılaştırıldığında daha yavaş bölünen endotel hücrelerinin hedeflenmesi esas amaçlardan biridir. Standart kemoterapide genellikle hızlı bölünen hücreler etkilendiği için, yavaş çoğalan endotel hücrelere verilen hasar oldukça zayıf olmaktadır. Ayrıca tedavi planında 2 ilaç uygulama zamanı arasında verilen ortalama 2-3 haftalık sürede tıpkı tümör hücrelerinde olduğu gibi, endotel hücreleri de kendilerini onarabilmektedir. Endotel hücreler tümör gelişimini desteklediği için, onların yeniden çoğalması aynı zamanda tümör direncine de yol açmaktadır. Standart kemoterapiye göre, endotel hücrelerinde daha etkin ve hastalarda daha az toksik olacak küçük dozlarda ve daha sık aralıklarla ilaç uygulamaları metronomik kemoterapinin temellerini oluşturmuştur (Gnoni ve ark., 2015).

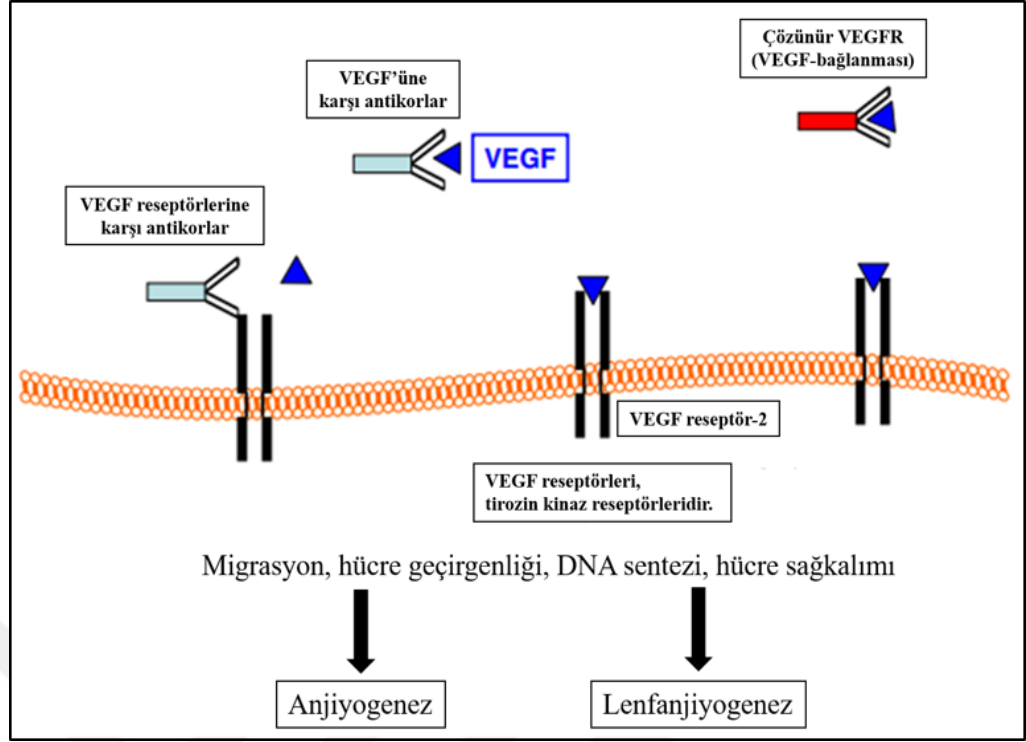
Değişik çalışmalarda, hücre kültüründe uygulanan metronomik kemoterapi ilaçlarının endotel hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir. Metronomik kemoterapinin endotel hücre ölmünü tetiklemenin yanı sıra, tümör hücrelerinden anjiyogenezi düzenleyen çeşitli faktörlerin salgılanmasını da etkilediği gösterilmiştir (Daenen ve ark., 2009). Bocci ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, düşük doz metronomik kemoterapi olarak siklofosfamid almış tümörlü farelerde TBS-1 düzeyi yükseldiği bulunmuştur. Yine bu çalışmada, bu tedavinin TBS-1 ifadesi olmayan

farelerde anti-tümör aktivite göstermediği bulunmuştur (Bocci ve ark., 2003). Benzer olarak, düşük doz metronomik kapessitabin, siklofosamid, metotreksat ve talidomid ile tedavi edilen hastalarda, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve platelet kökenli büyüme faktörü-B (PDGF-B) gibi anjiyogenik faktör düzeylerinde azalma olduğu bulunmuştur (Loven ve ark., 2008).

Ek olarak, metronomik dozlarda uygulanan kemoterapi ajanları aktif endotel hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder ya da apoptozunu indükler. Ayrıca, endotel hücre migrasyonunu inhibe edebildiği ve kemik iliği kökenli endotel öncül hücrelerin sayısını ve canlılığını azaltabildiği de gösterilmiştir (Tas ve ark., 2008). Bu mekanizmalar, tek başına kullanıldığında düşük antitümör etkisine sahip olan diğer antianjiyogenik ilaçlarda da olmaktadır. Metronomik kemoterapinin yüksek antitümör etkisinin arkasında anti-anjiyogenik etkileri dışında başka mekanizmaların da rol oynayabileceği düşünülmektedir (Tsuchida ve ark., 2014).

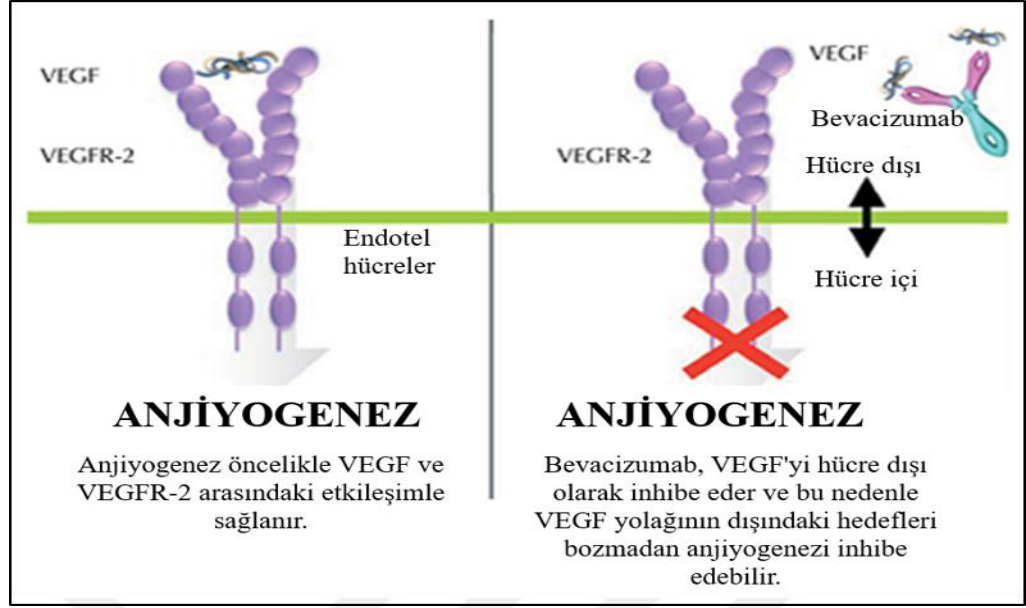
1.4.2. Kanserde Anti-anjiyogenik Tedaviler

Son yıllarda, anjiyogenik etki gösteren büyüme faktörü ve reseptör ailelerini hedefleyen birçok anti-anjiyogenik molekül geliştirilmiştir. Çoğunun klinik öncesi sonuçları ümit vaat ediyor olsa da bunların büyük çoğunluğu klinik araştırmalarda başarısız olmuştur. Yalnızca VEGF ligand ya da reseptörlerini hedefleyen moleküller başarılı olabilmıştır (Şekil 1.8.). Günümüzde çeşitli kanserlerde ve oküler neovasküler hastalıklarda tedavi olarak kullanılmaya devam etmektedir.



Şekil 1.8. VEGF ligand ve reseptörlerini hedefleyen tedavi hedefleri (Pircher ve ark., 2012).

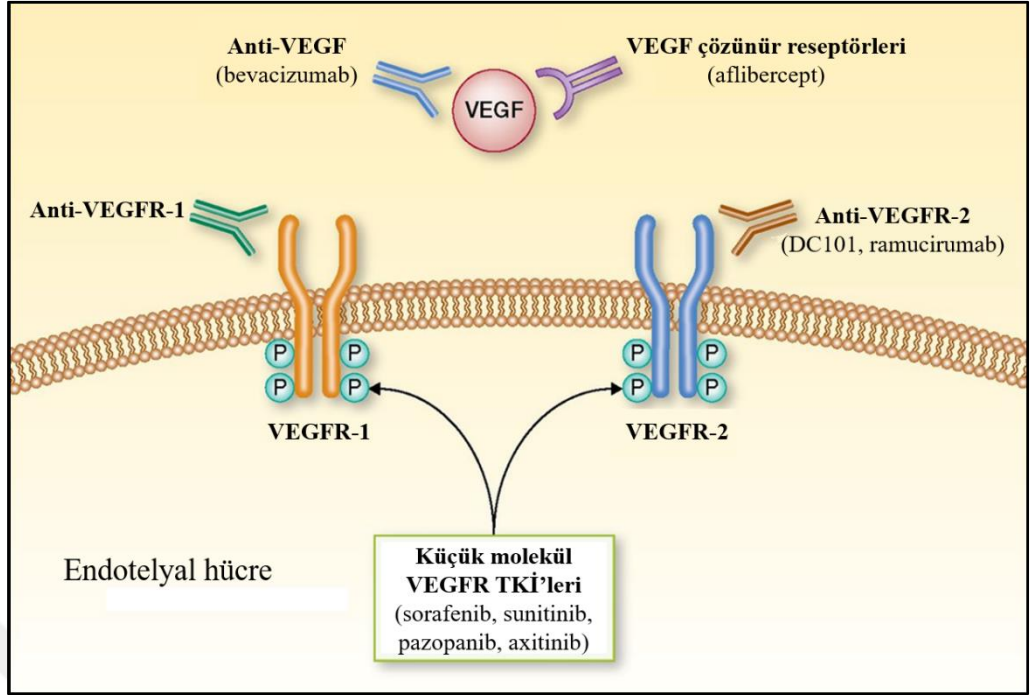
FDA'nın ilk anti-anjiyogenik ilaç olan bevacizumab'a (Avastin, Genentech/Roche) onay vermesiyle birlikte, anti-anjiyogenik tedavi, 2004 yılında başlamıştır. İnsan VEGF-A'sına karşı hümanize bir monoklonal antikor olan bevacizumab ilk olarak metastatik kolorektal kanser (mCRC) tedavisinde kemoterapi ile birlikte kullanılması için onay almıştır (Şekil 1.9.) (Hurwitz ve ark., 2004). Yapılan klinik çalışmalar sonucunda, metastatik renal hücre karsinomu (RCC), ileri evre non-skumöz hücreli akciğer kanseri (NSCLC) ve metastatik meme kanseri endikasyonlarında da kemoterapi ile birlikte kullanılmaya başlanmıştır. Tekrarlayan glioblastoma multiformeli yetişkin hastalarda ise tek ajan olarak kullanımı onaylanmıştır (Tarallo ve De Falco, 2015).



Şekil 1.9. VEGF ligandını hedefleyen Bevacizumab antikorü (Ferrara ve ark., 2004).

Bevacizumab sonrasında, VEGF-A'nın, VEGF-B'nin ve PlGF'nin aktivitesini bloke edebilen, önceleri VEGF-trap olarak bilinen, yeni bir anti anjiyogenik molekül (aflibercept) geliştirilmiş ve onay almıştır. Aflibercept, insan VEGF reseptörleri 1 ve 2'nin ekstraselüler bölgesi ile insan immunglobulin G1 Fc kısmı birleşmesinden oluşan rekombinant bir füzyon proteindir (Şekil 1.10.). Tuzak bir reseptör gibi davranıp, intravasküler ve ekstraselüler VEGF-A, VEGF-B ve plasental büyüme faktörüne bağlanarak fonksiyonlarını engeller. Metastatik kolorektal kanserli hastaların tedavisinde, kemoterapi ile birlikte kullanılmak üzere onay almıştır (Ciombor ve Berlin, 2014).

Kanser tedavisi için onay alan ve klinikte kullanılan diğer bir grup ilaç da tirozin kinaz inhibitörleridir ve etkilerini VEGFR-1 ve/veya VEGFR-2 sinyalini engelleyerek gösterirler. Bu tirozin kinaz inhibitörlerinden bazıları PDGF, TIE ve FGF reseptörleri gibi anjiyogenik sinyalde yer alan birden fazla reseptöre de bağlanabilmektedir (Gotink ve Verheul, 2010).



Şekil 1.10. Kanserde VEGF ligand ve reseptörlerini hedefleyen moleküller (Tarallo ve De Falco, 2015).

Sorafenib (Nexavar, Bayer), 2005 yılında, metastatik RCC ve rezeke edilemeyen hepatoselüler karsinom tedavisinde tek ajan olarak kullanılmaya başlanmıştır. Opere edilemeyen HCC hastalarında medyan sağkalımı arttıran ilk ilaçtır. Bunun dışında, kanser tedavisinde kabul edilen birçok anti-anjiyogenik TKI, Sunitinib (Sutent, Pfizer), Axitinib (Inlyta, Pfizer), Pazopanib (Votrient, Glaxo Smith Kline), Regorafenib (Sti-varga, Bayer), Vandetanib (Caprelsa, AstraZeneca) Cabozantinib (Cometriq, Exselixis Inc.), metastatik RCC, ileri evre yumuşak doku sarkomu, gastrointestinal stromal tümör (GIST), ileri evre metastatik pankreatik nöroendokrin tümörler, medüller tiroid kanseri vb endikasyonlarda kullanılmaya başlanmıştır (Llovet ve ark., 2008; De Falco, 2014).

Anti-anjiyogenik tedaviler klinikte özellikle ileri evre kolorektal, akciğer, meme, nöroendokrin ve over kanserlerinde progresyonsuz sağkalımı, metastatik renal kanserli ve ilerlemiş HCC'li hastalarda sağkalım süresini uzatmaktadır. Bu kısıtlı etkinliğin yanı sıra, kısa sürede ilaca direnç gelişmesi birçok hastada bu ilaçların kullanımını kısıtlamaktadır.

VEGF yolağı inhibisyonunun sonucu olarak oluşan hipoksi, PIGF, FGF, kemokinler ve ephrinler gibi proanjiyogenik faktörlerin artışına neden olabilmekte, böylece tümör vaskülarizasyonu indüklenmektedir. Ek olarak, kanser hücreleri, VEGF blokajından sonra, normal dokulara daha agresif bir şekilde göç edebilmektedir. Klinik çalışmalardaki gözlemler ve bazı deneysel modeller anti-anjiyogenik tedavinin daha invaziv ve metastatik tümörler oluşturabileceği konusunda ciddi kuşklar gündeme getirmiştir. Hedefe yönelik anti-anjiyojenik ilaçlar (antikorlar, peptidler ve TKI) genellikle iyi tolere edilebilmelerine karşın, bazen ciddi yan etkilere de neden olabilmektedir. En yaygın olanları yorgunluk, ishal, bulantı ve kusmadır. Yine, VEGF bloke edilen tedavilerde standart bir yan etki olarak gözlenen hipertansiyon, bazen ciddi morbiditeye ve mortaliteye yol açabilmektedir. Bu nedenle genellikle antihipertansif tedavi ile tıbbi müdahale gerektirmektedir (Sennino ve McDonald, 2012).

1.4.3. Kombinasyon Tedavisi

Hedefe yönelik tedavi araştırmaları hala devam ediyor olmasına rağmen, kemoterapi çoğu kanser için tedavide hala ilk basamağı oluşturmaktadır. Fakat her iki tedavi şeklinin de tek başına kullanılması durumunda, tedavi etkinlikleri yeterli olamamaktadır. Bu nedenle, VEGFR, EGFR, MAPK, PI3K veya mTOR yollarını hedefleyen ajanlar ile sitotoksik ajanların birlikte uygulanması daha iyi anti-tümör etkinlik yönünden klinik olarak test edilmektedir.

Anjiyogenez malignite için önemli bir belirteçtir ve tümör dokularında VEGF/VEGFR ekspresyonu artışı sık gözlenmektedir. VEGF antikorları ve VEGFR-tirozin kinaz inhibitörleri (TKI) ile uygulanan monoterapi, sınırlı antitümör etki gösterir. Ancak, geleneksel sitotoksik ajanlar ile kombinasyonlarının çok daha iyi sonuçlar verdiğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Örnek olarak VEGFR antikoru olan DC101 tek başına kullanıldığında önemli fakat kısa süreli gerileme sağladığı görülmüş, vinblastin ile birlikte kullanıldığında ise nöroblastom ksenograft modelindeki büyük tümörlerin tam ve sürekli regresyonu ile sonuçlanmıştır (Mutsaers, 2009).

Anti anjiyogenik tedaviler, kemoterapinin indüklediği VEGF/VEGFR ifadesi artışı gibi adaptif reaksiyonları engelleyerek sitotoksik ajanların antitümör etkisini artırır. Klinik çalışmalarda, küçük hücreli dışı akciğer kanserli ve platinum-duyarlı over kanserli hastalarda platinum temelli kemoterapi ile kombine olarak verilen bevacizumab ile hastalısız sağkalım oranlarında artış izlenmiştir (Coras ve ark., 2004). Metastatik meme kanserli hastalara verilen bevacizumab-paklitaksel kombinasyonu anti-tümör etkinliği arttırmıştır. Diğer taraftan, Her2-negatif meme kanseri ya da ileri evre melanom tedavisi faz 2 çalışmalarında kullanılan sorafenib ile dakarbazin/kapersitabin kombinasyonu antitümör etkinliğine sinerjistik etki yaptığı gözlenmesine rağmen, sorafenib ile paklitaksel ve karboplatin kombinasyonu, ileri evre küçük hücre dışı akciğer kanseri ve melanomlu hastalarda antitümör etkinliği artırmada başarısız olmuştur.

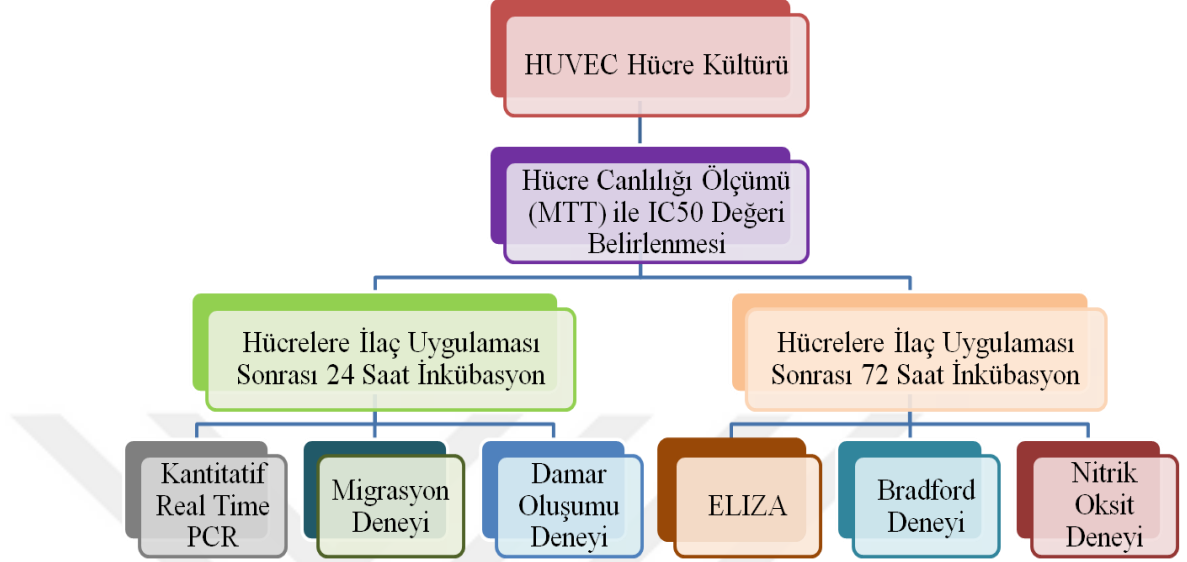
VEGF/VEGFR dışında, EGFR mutasyonu veya aşırı ekspresyonu da tümör hücrelerinin gelişiminde, proliferasyonunda ve onkogeneze önemli rol oynamaktadır. Sitotoksik ajanlarla birlikte EGFR'yi hedef alan ajanların kullanılması ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. EGFR antikoru olan Setüksimab ile gemitabin, 2004 yılında, ileri evre pankreas kanseri tedavisinde faz 2 çalışmasında kullanılmıştır. Sonrasında, setüksimab ile sitotoksik ajan kombinasyonunun pozitif sonuçlar vermesi ile çeşitli klinik araştırmalarda ileri evre küçük hücre dışı akciğer kanseri ve metastatik kolorektal kanserde çalışılmıştır. Günümüzde RAS mutasyonu bulandırmayan metastatik kolorektal kanserli hastaların tedavisinde anti-EGFR antikoları (setüksimab, panitumumab) okzaliptatin ya da irinotekan temelli tedavilerle kombine olarak kullanılmaktadır. EGFR tirozin kinaz inhibitörü olan erlotinib ile gemitabin, faz 3 çalışmasında, ileri evre pankreas kanserinde sağkalım oranını önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir (Moore ve ark., 2005).

Kanserde rol oynayan RAS/RAF/MEK/ERK ve PI3K/Akt/mTOR yolları kombinasyon tedaviler için potansiyel hedeflerdir. Bu yolları hedef alan birçok inhibitör geliştirilmiştir.

Bu çalışmada, düşük doz kemoterapinin endotel hücreleri üzerindeki etkisinin araştırılması, kemoterapi (5FU, IR ve OX) ve kemoterapi ile kullanılacak bevasizumab kombinasyonlarının anti-anjiyojenik etki mekanizmalarının araştırılması ve klinikte etkili olabilecek düşük doz kemoterapi ve anti-anjiyojenik tedavi kombinasyonları için bir temel oluşturulması amaçlanmıştır. Anti-anjiyojenik ilaçlarla kombine kullanılabilecek kemoterapi ilaçları dozlarının azaltılarak, daha az toksik ve daha etkin kombinasyonların geliştirilmesi ile kullanılan kemoterapi ilaç dozlarının, anjiyogenez boyunca rol oynayan genlerin ifadelerine etkisinin saptanması hedeflenmiştir.



2. GEREÇ VE YÖNTEM



Şekil 2.1. Deney planının şematik gösterimi.

2.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Burada amaç deneysel çalışmalarda kullanılan besi ortamı ve solüsyonların içeriği ve kullanılan temel hücre kültürü teknikleri hakkında ayrıntılı bilgi verilmesidir.

2.1.1. Gereçler

2.1.1.1. Kullanılan Kimyasallar

- DMEM (Biological Industries, 01-052-1A)
- FBS (Biological Industries, 04-001-1A)
- Penisilin-Streptomisin (Biological Industries, 03-031-1B)
- Tripsin/EDTA solüsyonu (Biological Industries, 03-050-1B)
- Tripan mavisi (Sigma, 105H5021)
- DMSO (Merck, 102952)

- MTT (Chemicon, CT01-5)
- Borik Asit (Sigma, B6768-1)
- Tris (Appllichem, A2264-1000)
- EDTA (Amresco, 1651C381)

2.1.1.2. Kullanılan Cihaz ve Gereçler

- CO₂'li inkübatör
- Inverted mikroskop
- Laminar hava akışlı kabin
- Santrifüj cihazı
- -80°C soğutucu
- Hassas tartı
- Manyetik karıştırıcı
- Hemositometre
- Hücre kültürü kapları
- Tek kullanımlık doku kültürü pipetleri
- Santrifüj tüpleri
- Elektronik pipet
- Otomatik pipet
- Filtre
- pH-metre

2.1.2. Yöntem

- **%10 FBS'li DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) Hazırlanışı:** 500 ml'lik L glutamin içeren DMEM içine 50 ml FBS ve 5 ml Penisilin-Streptomisin (%1 v/v) eklenerek hazırlandı.
- **MTT Hazırlanması:** MTT 5 mg/ml olacak şekilde PBS içinde çözüldü. 100 mg MTT tartılarak 2 ml PBS içine eklendi. Çözünmesi için vorteks ile karıştırıldı. Hazırlanan solüsyon kabin içinde filtreden geçirildi. Çalışma hacimlerine uygun olarak santrifüj tüplerine bölündü.
- **5X ve 1X TBE Hazırlanması:** 1 litre son hacim için 27,5 gr borik asit ve 20 ml EDTA (0,5M, pH 8) yaklaşık 300 ml distile su içine eklendi. Manyetik karıştırıcı ile çözünmeleri sağlandı. Ardından üzerine 54 gr Tris eklenerek homojen hale geldikten sonra pH ayarlaması yapıldı. 5X TBE'den 200 ml alınarak 800 ml distile su içine konulmasıyla son hacmi 1 lt olan 1X TBE hazırlandı.

2.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

HUVEC hücreleri çözme işlemi sonrası DEMEM (%10 FBS, %1 Pen-St) besi ortamında kültüre alındı. Hücrelerin besi ortamları 2 günde 1 değiştirilerek kültüre devam edildi. Hücrelerin kültür kabı yüzeyini doldurması ile karar verilen pasaj oranlarına göre pasajlamaları yapıldı.

2.2.1. Sitotoksite Deneyi (Hücre Canlılığının Ölçülmesi)

2.2.1.1. Kullanılacak İlaçlar

Laboratuvarımızda daha önceki çalışmalarımızda kullanılan kemoterapi ilaçlarından 5-FU (410 – 0,05 $\mu\text{mol/L}$), IR (1,3 mmol/L – 5 nmol/L) ve OX (500 – 0,0075 $\mu\text{mol/L}$) belirtilen konsantrasyon aralıklarında, 9 farklı dozda eklenerek hücre canlılığının ölçümünde kullanıldı. Detaylı ilaç dozları Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir (5-florourasil: 5FU Koçak Farma; İrontu: Onko; Okzaliptatin: Eloxatin® Sanofi Aventis).

Çizelge 2.1. MTT hücre canlılığı ölçümü için HUVEC hücrelerine uygulanan ilaç dozları.

Dozlar / İlaçlar	5-FU ($\mu\text{mol/L}$)	IR ($\mu\text{mol/L}$)	OX ($\mu\text{mol/L}$)
1. Doz	410,00	1300,00	500,00
2. Doz	102,50	325,00	125,00
3. Doz	25,625	81,25	31,25
4. Doz	6,40	20,00	7,8125
5. Doz	1,60	5,78	1,9532
6. Doz	0,40	1,25	0,488
7. Doz	0,10	0,3125	0,12207
8. Doz	0,025	0,078	0,03052
9. Doz	0,00625	0,0195	0,00763

2.2.1.2. MTT ile Hücre Canlılığının Ölçülmesi

Endotel hücreleri (HUVEC) kuyucuk başına 10^4 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. 24 saat sonrasında Çizelge 2.1.'de belirtilen ilaç dozları besi ortamları ile hazırlanıp hücreler üzerine eklendi ve 72 saatlik inkübasyona bırakıldı. Canlı hücre oranını saptamak amacıyla, canlı hücrelerdeki mitokondriyal redüktaz enzimi ile suda çözünmeyen mor renkli formazan kristalleri oluşturan MTT (3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid) bileşiği kullanıldı. 20 μ l MTT, 50 μ l taze vasat içinde her kuyucuğa eklendi. Canlı hücrelerde oluşan formazan kristallerinin, çalkalayıcı üzerinde, 150 μ l DMSO içinde çözünmesiyle ELISA plate okuyucuda (Thermo Scientific-Multiskan Go, Almanya) 590 ve 620 nm'de alınan değerler ile hücre proliferasyonu ölçüldü. İlaç uygulanmayan kuyucukların absorbans değeri referans olarak kullanıldı ve bu kuyulardaki hücrelerin canlılık oranı %100 olarak alındı. İlaç uygulanan kuyucukların absorbans değerleri ilaç uygulanmayan kontrol kuyucuklarına oranlanarak ilgili dozlar için canlı hücre miktarları yüzde olarak hesaplandı.

2.3. Gen İfadelerinin Ölçülmesi İçin Hücrelerin Hazırlanması

HUVEC hücreleri 6 kuyucuklu plaklara, 10^6 hücre/kuyucuk olacak şekilde, 2 tekrarlı olarak ekildi. 24 saat sonra hücrelerin vasatları aspire edilerek, 2 ml taze besiyeri içinde çözülmüş olan, IC50, -1 logIC50, -2 logIC50 ve -3 logIC50 dozlarında 5-FU, irinotekan ya da okzalipatin kuyucuklara eklendi. Kontrol olarak kullanılacak kuyucuklara ilaç eklenmedi. 24 saatlik inkübasyon sonrasında hücreler tripsinize edilerek toplandı ve PBS ile yıkamayı takiben hücreler RNA izolasyonu yapılmak üzere $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

2.3.1. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu ticari kit (RNeasy® Mini Kit, Qiagen, Germany) kullanılarak yapıldı. Kısaca, bir önceki deneyde hazırlanarak $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan hücre pelleti

üzerine hücreleri parçalamak için 350 µl RLT tamponu eklendi. 8000 G'de 3 dakika santrifüjün ardından 350 µl %70'lik EtOH eklemesi yapıp, RNeasy mini spin kolonuna 700 µl alındı. 8000 G'de 15 sn santrifüj yapıldı. Kolon membranından alt kısma geçen sıvı atıldı. Spin kolonuna sırasıyla 700 µl yıkama tamponu, 500 µl RPE yıkama tamponu eklenerek 15'er sn santrifüj yapıldı. Bir kere daha 500 µl RPE yıkama tamponu eklenerek 2 dakika santrifüj yapılması ardından, 30 µl RNaz içermeyen su eklenerek membrana bağlı bulunan RNA'nın elüsyonu sağlandı.

2.3.2. RNA konsantrasyonu ve kalitesi tayini

İzole edilen RNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonu λ_{260} ile λ_{280} dalga boyunda spektrofotometre (Beckman Coulter, DU 730) ile yapıldı.

RNA izolasyonu sonrası RNA bütünlüğünün saptanması için kit protokolüne uygun olarak her örnekten 1,2 µl, sırayla Agilent Bioanalyzer kitine (RNA 6000 Nano Assay, 5067-1511) yüklemesi yapıldı ve kapiler elektroforez temelli yürüme sonrası örneklerden alınan RIN (RNA Integrity Number) değerine göre örnek bütünlüğü saptandı.

Çizelge 2.2. RNA saflık ve konsantrasyon değerleri.

HUVEC (10 ⁶ hücre/kuyucuk)			
		RNA Saflık ($\lambda_{260}/\lambda_{280}$)	RNA Konsantrasyonu (µg/ml)
1	5 FU IC50	2,12	373,29
2	5 FU -1	2,03	750,49
3	5 FU -2	2,10	174,18
4	5 FU -3	1,98	163,93
5	IR IC50	1,95	624,48
6	IR -1	2,00	274,58
7	IR -2	1,95	461,03
8	IR -3	1,98	421,98
9	OX IC50	1,96	327,26
10	OX -1	1,95	542,17
11	OX -2	1,95	487,30
12	OX -3	1,96	339,80
13	24 saat kontrol	1,91	1236,80

2.3.3. cDNA sentezi

Her bir örnek için 250 ng RNA kullanılarak ticari kit ile (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen, Germany) cDNA sentezi yapıldı. Kısaca, öncelikle genomik DNA eliminasyonu için 250 ng RNA örneklerine kit tarafından sağlanan 2 µl gDNA wipeout solüsyonu eklendi (toplam hacim 14 µl). Genomik DNA eliminasyonunu takiben 250 ng total RNA içeren 4 µl lik bu çözeltilere sırasıyla kit tarafından sağlanan RT tamponu (4 µl), RT primer karışımı (2 µl), reverse transkriptaz enzimi (1 µl) eklenerek 42 derecede 30 dk cDNA sentezi yapıldı.

Sentezlenen cDNA'lar son hacimleri (20 µl) üzerine 80 µl eklenerek 100 µl'ye tamamlandı.

2.4. Kantitatif gerçek zamanlı PZR (qPZR)

Gerçek zamanlı PZR'de, HUVEC hücrelerinde 5FU, IR ve OX ilaçlarının IC50, -1 logIC50, -2 logIC50 ve -3 logIC50 dozları uygulanması ardından hücrelerde HBA, VEGF-A, PDGF-BB, ANG-2, VEGFR2, END-1, iNOS, eNOS ve TSP-1 genlerinde meydana gelen ifade değişikliklerine bakıldı.

Gen ifadelerinin kontrolü için primer ve hidroliz probları tasarlandı. Kısaca, mRNA dizileri bulunarak exon kontrolü yapıldı. Daha sonra ifade bakılması istenen bölgenin ortalama 19-22 bazlık primerleri (F: forward, R: reverse) ve bunlara uygun problar tasarlandı. Tasarlanan primer ve problar NCBI/nucleotide web sayfasından (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) kontrol edilerek problar 5'FAM – 3'TAMRA işaretli olacak şekilde, 200 nmol sentez skalasında ve 100 µM konsantrasyonda sentezletildi (Ella Biotech, Germany).

Çizelge 2.3. Deneylerde kullanılan primer ve prob dizileri.

Gen Adı	Nükleotid Dizisi (5'→3')
Human Beta Aktin (HBA)	F: 5'-CCCTGGAGAAGAGCTACGAG-3' R: 5'-AAGGTAGTTTCGTGGATGCC-3' P: 5'-CCAGCCTTCCTTCTGGGCA-3'
Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF-A)	F: 5'-TGTGAATGCAGACCAAAGAAAGA-3' R: 5'-GCTTTCTCCGCTCTGAGCAA-3' P: 5'-AGAGCAAGACAAGAAAATCCCTGTGGGC-3'
Platelet Kökenli Büyüme Faktörü (PDGF-BB)	F: 5'-GGGCACACAGACTGGAGAAA-3' R: 5'-CACACCACCAAGAG GAGTC-3' P: 5'-CCCACGGTGCCCAAACACCAGTCA-3'
Anjiyopietin 2 (ANG-2)	F: 5'-GGACCCACATGCTCCAGATT-3' R: 5'-TCTCAGCCTCGGGTTCATCT-3' P: 5'-ACCAAAGCAAGACCCTAAACATCCATAATTGTGAT-3'
Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörü (VEGFR2)	F: 5'-GATTCTCCAGCCTGACTCGG-3' R: 5'-CTGCAGTCCGAGGTCCTTTT-3' P: 5'-AGGACCTCGGACTGCAGGGAGCCA-3'
Endotelin 1 (END1)	F: 5'-GCTCGTCCCTGATGGATAAAG-3' R: 5'-AGGGCTTCCAAGTCCATACG-3' P: 5'-TGTGTCTACTTCTGCCACCTGGACATCA-3'
İndüklenebilir NOS (NOS2)	F: 5'-CCTCGGCTCCAGCATGTAC-3' R: 5'-TGGGACAGCTTCTGATCAATG-3' P: 5'-TCGGTCTGCGCCTTGCTCAT-3'
Endotelial NOS (NOS3)	F: 5'-TGAAGCACCTGGAGAATGAG-3' R: 5'-TTGACCATCTCCTGATGGAA-3' P: 5'-CGATCCAGGCCAGTCTGCA-3'
Trombospondin 1 (TBS-1)	F: 5'-TGCACCTGAGTGTCACTGTCAGAA-3' R: 5'-CATTGGAGCAGGGCATGAT-3' P: 5'-TACCATCTGCAAAAAGGTGTCTGCC-3'

qPZR deneyleri Light Cyler 480 (Roche, İsviçre) cihazı ile 384 kuyucuklu plak kullanılarak gerçekleştirildi. Kısaca, sentezlenen cDNA örneklerinden optimizasyon sonucu en iyi sonuç alınan 3 µl hacimde örnekler kullanıldı. Kuyucuklara kit tarafından sağlanan qPCR karışımından (Solis Bio Dyne, 08-15-00001) 2 µl, her primer ve probtan (10 pmol/µl) 0,2'şer µl ve son hacmi 10 µl'ye tamamlamak için 4.4 µl PZR grade su eklendi. Daha sonra Çizelge 2.4.'teki reaksiyon koşullarına göre amplifikasyon gerçekleştirildi.

Çizelge 2.4. PZR koşulları.

	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Hold	95 °C	900 saniye	1 cycle
2 step Amplification	95 °C	20 saniye	45 cycle
	60 °C	60 saniye	
Cooling	37 °C	180 saniye	1 cycle

Reaksiyon sonrası Cq değerleri ile grafikler kaydedildi. Amplifiye edilen örnekler agaroz jelde yürütülerek amplifikasyon teyidi yapıldı.

2.4.1. PCR ürünlerinin kontrolü (Agaroz jel)

Kantitatif PZR ile elde edilen ürünlerin kontrolü %2'lik agaroz jelde yürütülerek yapıldı. 50 bp DNA ladder (Bioron, 304007) ve 5X'lik yükleme boyası (Promega, M791A) ile hazırlanan örnekler jele yüklenerek yürütüldü. Jel görüntüleme cihazında (Bio-Rad Gel Doc XR, ABD) görüntüledi.

2.5. Hücre Migrasyonu Deneyi

Boyden chamber hücre migrasyonu kiti (Biovision, K906-100) ile yapılan deneyde, hücre migrasyonunun gözlenmesi amacıyla HUVEC hücreleri (p10) kullanıldı. Kısaca, hücreler Yöntem 2.3'te anlatıldığı gibi 10^6 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu plaklara ekildi, 24 saat sonrasında 5FU, irinotekan, okzaliplatinin IC50, -1 logIC50, -2 logIC50 ve -3 logIC50 dozları ile Bevacizumab 0,25 mg/ml dozunda uygulandı. 24 saat inkübasyonun ardından hücreler toplanarak, 1000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Her doz için hücre sayımı yapıldı ve kit tarafından sağlanan plağın üst odacıklarına, serumsuz besi ortamı ile hazırlanan 100 µl (5×10^5 hücre/ml) hücre süspansiyonu eklendi. Alt odacıklara ise 150 µl DMEM (%10 FBS) eklendi. Yine kit tarafından sağlanan indükleyici bileşen içeren kuyuya 135 µl besi ortamı (%10 FBS) ile 15 µl inducer eklenerek hazırlandı. Plak 24 saat 37 °C, %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. İnkübasyonu takiben üst odacıklardaki ortamlar aspire edilerek kalan hücreleri pamuk ile temizlendi. Alt odacıkları içeren kısım 1000 g'de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant atılıp yıkama tamponu (200 µl/kuyucuk) ile yıkayıp tekrar santrifüj yapılması ardından, alt odacıklara boya ile hücreleri yarı geçirgen zardan çözecek solüsyon karışımı eklendi. Üst odacıkları içeren kısım tekrar üzerine konularak 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.

Standart eğri çizimi için, yıkama tamponu ile 8 dilüsyon (50000, 25000, 12500, 6250, 3125, 1562, 781, 390) ve 1 kör hazırlandı. Boya eklenmesi ardından 37°C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası örneklerin ve standartların absorbanları florometrik olarak (Ex/Em: 530/590 nm’de) tayin edildi (Thermo Scientific, Fluoroskan Ascent FL).

2.6. *In vitro* Damar Oluşumu Deneyi

Anjiyogenez, menstrual döngü ve yara iyileşmesi gibi normal ve diyabetik retinopati, tümör gelişimi ve metastazı gibi patolojik süreçlerin temel bir bileşenidir. Hücre dışı matriks; laminin, kollajen tip IV, heparan sülfat proteoglikanlar, entaktin ve nidogen bileşenlerinden ve TGF- β , FGF gibi büyüme faktörlerinden ve plasminojen, tPA ve MMP’ler gibi proteolitik enzimlerden oluşmaktadır. *In vitro* koşullarda bu bileşenlerin optimum damar oluşumu sağlanacak şekilde bir araya getirilmesi ile her örnekteki damar oluşum oranları karşılaştırılır.

In vitro damar oluşumu deneyleri ticari kit (Millipore, ECM625) kullanılarak gerçekleştirildi. Kısaca, kit tarafından sağlanan ECMatrix 1 gece önceden +4 °C’ye çıkarıldı, çalışılacak malzemelerden 96 kuyucuklu plak, pipet uçları da +4 °C’de 1 gece inkübe edildi. Seyreltici tampon buz üzerinde eritildi. 10X tampon ile ECMatrix solüsyonu hazırlandı. 96 kuyucuklu plaklara, kuyucuk başına 50 μ l olacak şekilde dağıtım yapıldı. Plak 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. Eş zamanlı olarak, 48 saat önce ekilen, 24 saat önce 5FU, irinotekan ve okzaliplatinin IC50, -1 logIC50, -2 logIC50 ve -3 logIC50 dozları ile Bevacizumab 0,25 mg/ml dozunda uygulanan endotel hücreleri plak yüzeyinden toplanarak hücre sayımı yapıldı. Daha sonra kuyucuk başına 10⁴ hücre olacak şekilde hücreler ekildi. Kuyucuklara ekilen hücreler 10 saat boyunca inverted mikroskop (Nikon Eclipse, TS100) altında gözlemlenerek fotoğrafları çekildi.

2.7. Salgılanan anjiyojenik faktör tayini için hücrelerin hazırlanması

HUVEC hücreleri 6 kuyucuklu plaklara, 10^6 hücre/kuyucuk olacak şekilde, 2 tekrarlı olarak ekildi. 24 saat sonra hücrelerin vasatları aspire edilerek, 2 ml taze besiyeri içinde çözünmüş olan, IC50, -1 logIC50, -2 logIC50 ve -3 logIC50 ilaç dozları kuyucuklara eklendi. İlaç uygulanmayan kuyucuklar kontrol olarak alındı. 72 saatlik inkübasyon sonrasında kuyucuklardaki kültür vasatı toplanarak 600 RPM 4 dakika santrifüj edildi. Süpernatant alınarak salgılanan anjiyogenik faktörlerin tayini için $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de saklandı.

2.7.1. Anjiyojenik faktör tayini

HUVEC hücreleri tarafından salgılanan anjiyojenik faktörlerin (VEGF-A, PDGF-BB, ANG-2, END-1 ve TSP-1) düzey tayini biotin ile işaretlenmiş çift antikor temelli sandwich ELIZA (enzim bağlı immüno sorbent deneyi) tekniği kullanan ticari kitler kullanılarak yapıldı (Yehua, Çin).

Kısaca, kitler çalışmadan yaklaşık 30 dakika önce oda sıcaklığına çıkarıldı. Kit tarafından sağlanan standart solüsyon seyreltilerek standartlar (5 farklı konsantrasyonda) hazırlandı. Kuyucuklara 50 μl standart, 50 μl streptavidin-HRP eklendi. Hücre kültüründen hazırlanan hücre vasatları (40 μl) ile 10 μl antikor, önceden kit yüzeyine monoklonal antikorları kaplanan kuyucuklara eklendi. 50 μl biotin ile işaretli, streptavidin-HRP'yi bağlayacak anti-antikorlar eklenip immün kompleks oluşturuldu ve $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 60 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sonrası bağlanmayan enzimler yıkama solüsyonu ile elimine edildi. Daha sonra kit tarafından sağlanan substrat A (50 μl) ve B (50 μl) eklenerek 10 dakika inkübe edildi. 50 μl stop solüsyon eklenmesiyle kuyucuk içindeki rengin, asit etkisiyle maviden sarıya dönmesi sağlandı. Daha sonra oluşan renk değişiklikleri ELIZA plate okuyucuda (Thermo Scientific, Multiskan GO) 450 nm dalga boyunda okunarak absorbansları tayin edildi. Standart örneklerin absorbansları referans alınarak bilinmeyen örneklerdeki faktör düzeyleri hesaplandı.

2.7.2. Bradford Deneyi

Bradford protein tayini yöntemi, Comassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşerek, renk oluşturması temeline dayanır. Boya normal şartlarda 465 nm’de maksimum absorbands verirken, protein ile bağlandığı zaman 595 nm dalga boyunda maksimum absorbands verir..

Deney için Bradford reaktifi (Sigma, B6916) +4 °C’den, örnekler -80 °C’den oda sıcaklığına çıkarıldı. Sığır serum albümini (BSA) stok çözeltisinden (15 mg/ml) 5 farklı konsantrasyonda protein ölçüm standartları (1400 – 574 µg/ml aralığında) hazırlanarak 96-kuyucuklu plaklarda 3’er tekrarlı olacak şekilde 5’er µl eklendi, daha sonra salgılanan sitokin düzeyleri deneyi (Deney 2.7) için hazırlanmış olan hücre vasatları da ilgili kuyucuklara 3’er tekrarlı olacak şekilde 5’er µl eklendi. Tüm örnek ve standart kuyucuklarına Bradford reaktifi 250 µl/kuyucuk olacak şekilde eklendi. ve ELIZA plaka okuyucuda 595 nm’de okundu.

2.7.3. Nitrik Oksit Deneyi

Nitrik oksit (NO); vasküler düzenlenme, sinir iletimi, immün cevap ve apoptoz gibi süreçlerde önemli rol oynar. NO sentaz (NOS) enzimleri tarafından NO oluşturulduktan sonra hızlı bir şekilde nitrit ve nitrata dönüşür, bu nedenle NO ölçümü bu bileşikler üzerinden yapılmaktadır. Kullanılan kitte (Biovision, K262-200) ilk adım nitratı, nitrat redüktaz enzimiyle nitrite çevirmek, ikinci adım ise Griess reaktifi ile nitriti koyu mor renkli azo bileşiğine dönüştürülmesidir.

Deneyde, Yöntem 2.7.’de anlatılan hücre kültürü sonrası toplanmış olan hücre supernatantları kullanıldı. Hücrelerin sentezledikleri nitrit ve nitrat konsantrasyonlarının çok yüksek miktarda olmadığı düşünülerek seyreltme yapılmadı. Kit protokolüne uygun olarak standartları hazırlandı. Kuyulara örnek dağıtımını yapıldı, üzerlerine sırasıyla deney tamponu, nitrat redüktaz enzimi, enzimin kofaktörü eklenip 1 saat inkübe edildi. Sonrasında enhancer ile Griess reaktifleri

eklendi. ELIZA plate okuyucuda (Thermo Scientific, Multiskan GO) 540 nm'de ölçüm yapılarak standart eğriye göre örnek konsantrasyonları hesaplandı.

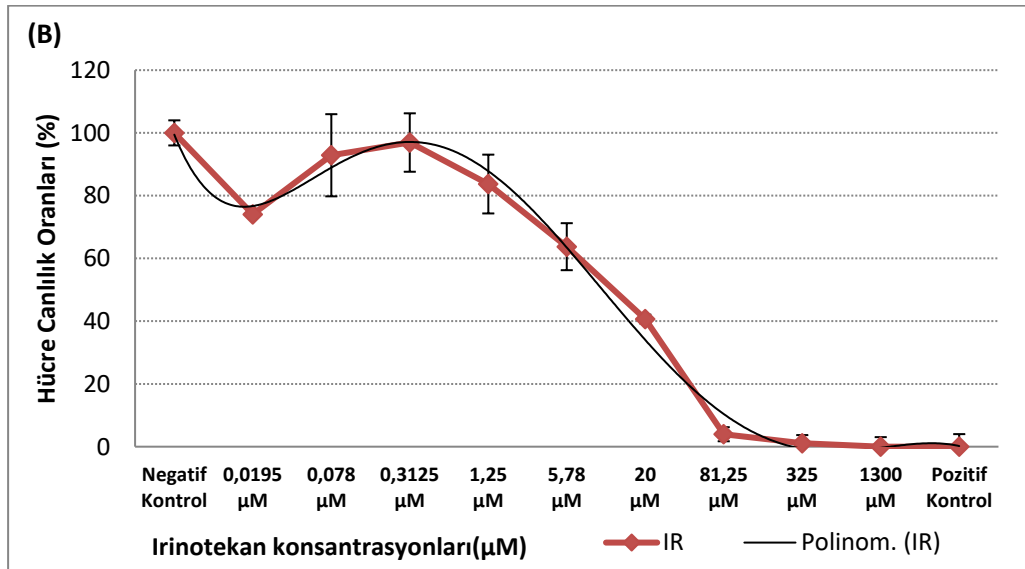
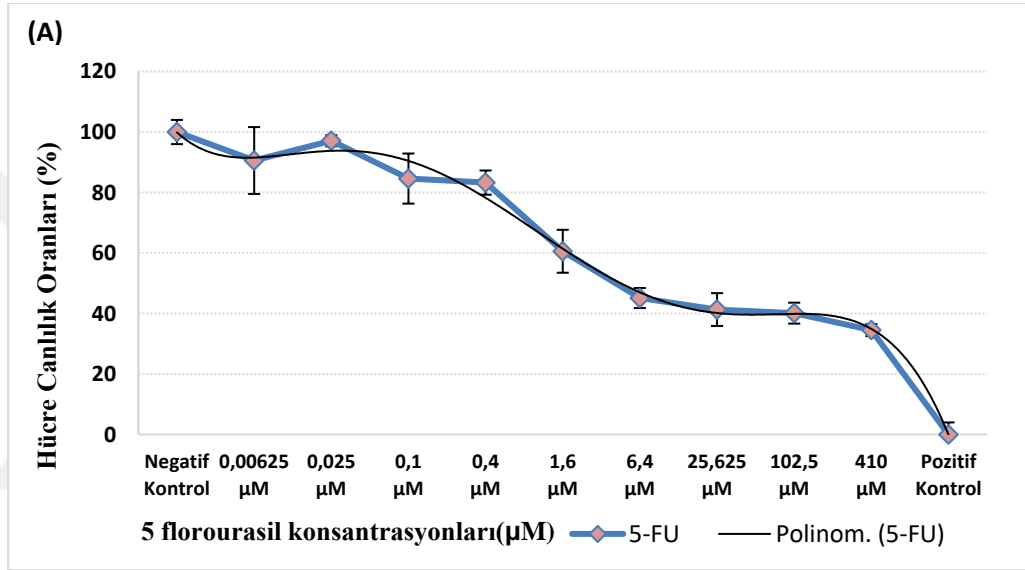
2.8. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

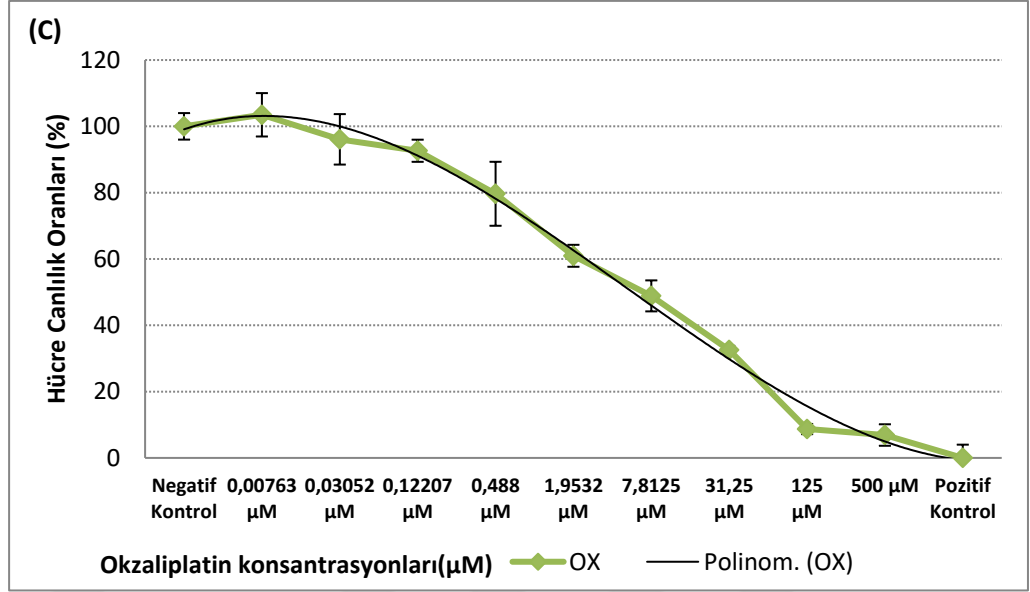
5-Florourasil, irinotekan ve okzaliplatin dozlarına bağlı olarak yapılan gerçek zamanlı PZR, ELIZA, hücre migrasyonu ve nitrik oksit deneylerinden elde edilen kantitatif verilerin analizinde tek yönlü ANOVA testi, T testi ve Mann-Whitney U testleri kullanıldı. Analizler SPSS 10.0 programı kullanılarak yapıldı. P değerleri <0,05 olan karşılaştırmalar istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi. Gen ifade düzeyleri ile sitokin düzeyleri arasındaki ilişkinin analizinde Pearson ve Spearman korelasyon testleri uygulanmıştır.

3. BULGULAR

3.1. HUVEC hücrelerinde 5 Florourasil, irinotekan ve okzaliptatin ile in vitro sitotoksitenin belirlenmesi

HUVEC hücreleri ile 5 Florourasil, irinotekan ve okzaliptatin ilaç dozlarının uygulanması sonrasında elde edilen grafikler Şekil 3.1.'de gösterilmektedir.





Şekil 3.1. HUVEC hücrelerinin 5-florourasil (5-FU) (A), irinotekan (IR) (B) ve okzaliplatin (OX) (C) ile 72 saat inkübasyonu sonrası hücre canlılık oranları.

Uygulanan doz ve karşılık gelen canlı hücre oranını gösteren grafiklerden her bir ilaç için IC50 değeri hesaplandı.

Doz-canlı hücre oranı eğrileri lineer dağılım gösteren ilaçlar için;

$$y = a * x + b, (b: \text{sabit}, a: \text{eğrinin eğimi}).$$

$$IC_{50} = \frac{(50 - b)}{a}$$

Sigmoid dağılım gösteren cevap eğrileri için;

$$y = 100 + \frac{100 - a}{1 + 10^{(x - \log IC_{50}) * b}}$$

(a: minimum değer, IC50: %50 inhibisyon yapan doz, b: eğrinin tepe eğimi).

Formüller kullanılarak ilaçların IC50, -1 logIC50, -2 logIC50 ve -3 logIC50 değerleri hesaplandı (Çizelge 3.1.). Tezin bundan sonraki deneylerinde kullanılan ilaçlar hesaplanan IC50, -1 logIC50, -2 logIC50 ve -3 logIC50 dozlarında kullanıldı.

Çizelge 3.1. HUVEC için 5-FU, IR irinotekan ve oksaliplatin ile elde edilen IC50 değerleri.

HUVEC			
	5-FU ($\mu\text{mol/L}$)	İrinotekan ($\mu\text{mol/L}$)	Okzaliplatin ($\mu\text{mol/L}$)
IC50	9,1767	9,79	11,7636
-1 logIC50	0,91767	0,979	1,17636
-2 logIC50	0,091767	0,0979	0,117636
-3 logIC50	0,0091767	0,00979	0,0117636

3.2. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirmesi

Hücrelerdeki gen ifade değişimleri, $\Delta\Delta\text{Ct}$ metodu (yaklaşım methodu) insan β -aktin geni referans alınıp normalize edilerek hesaplanmıştır. *In vitro* sitotoksosite deneylerinde ilaçlar için belirlenen IC50 dozları ile birlikte -1logIC50, -2logIC50 ve -3logIC50 dozlarının VEGF-A, PDGF-BB, VEGFR2, ANG-2, END-1, NOS-2, NOS-3 ve TBS-1 genlerinin ifadeleri üzerindeki etkileri incelendi.

Çizelge 3.2. HUVEC hücrelerinde 5FU, IR ve OX uygulaması sonrası gen ifade düzeyleri (Ortalama \pm Standart Hata).

	VEGF-A	PDGF-BB	VEGFR-2	END-1
KONTROL	0,914 \pm 0,019	1,001 \pm 0,028	-	1,04 \pm 0,19
5FU -3 logIC50	0,143 \pm 0,035	0,263 \pm 0,009	0,89 \pm 0,143	0,1 \pm 0,003
5FU -2 logIC50	1,61 \pm 0,011	1,373 \pm 0,033	3,991 \pm 0,00	2,723 \pm 0,248
5FU -1 logIC50	0,261 \pm 0,077	0,103 \pm 0,015	0,201 \pm 0,063	0,128 \pm 0,014
5FU IC50	0,076 \pm 0,002	0,052 \pm 0,01	-	0,039 \pm 0,003
IR -3 logIC50	0,098 \pm 0,005	1,31 \pm 0,462	0,36 \pm 0,009	0,123 \pm 0,007
IR -2 logIC50	0,03 \pm 0,004	0,063 \pm 0,008	-	0,059 \pm 0,003
IR -1 logIC50	0,062 \pm 0,002	0,049 \pm 0,006	0,457 \pm 0,179	0,097 \pm 0,002

Çizelge 3.2. devam HUVEC hücrelerinde 5FU, IR ve OX uygulaması sonrası gen ifade düzeyleri (Ortalama ± Standart Hata).

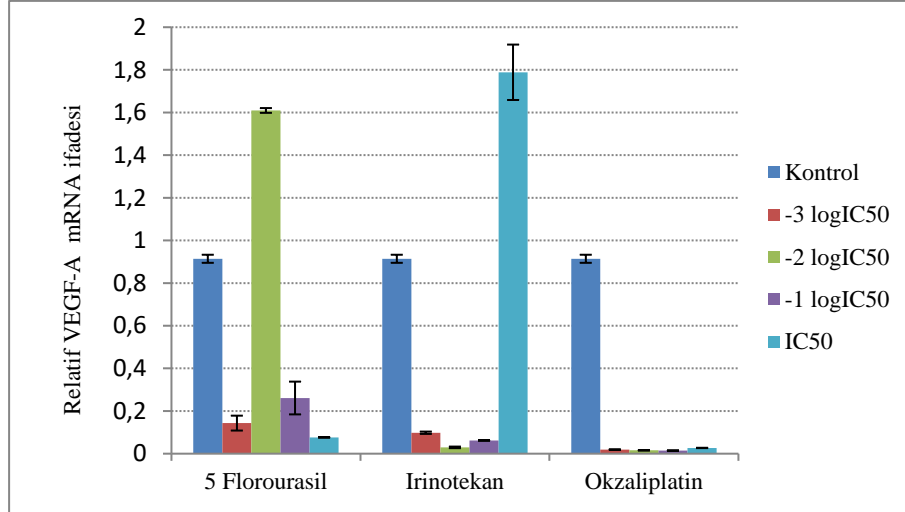
IR IC50	1,789 ± 0,13	1,114 ± 0,121	0,841 ± 0,195	0,735 ± 0,057
OX -3 logIC50	0,019 ± 0,001	0,054 ± 0,008	0,251 ± 0	0,045 ± 0,007
OX -2 logIC50	0,016 ± 0	0,095 ± 0,012	-	0,091 ± 0,004
OX -1 logIC50	0,015 ± 0,001	0,018 ± 0,002	-	0,019 ± 0,001
OX IC50	0,027 ± 0,001	0,149 ± 0,013	-	0,096 ± 0,005

5FU: 5-florourasil, IR: irinotekan, OX: okzalipatin

Çizelge 3.3. HUVEC hücrelerinde 5FU, IR ve OX uygulaması sonrası gen ifade düzeyleri (Ortalama ± Standart Hata)

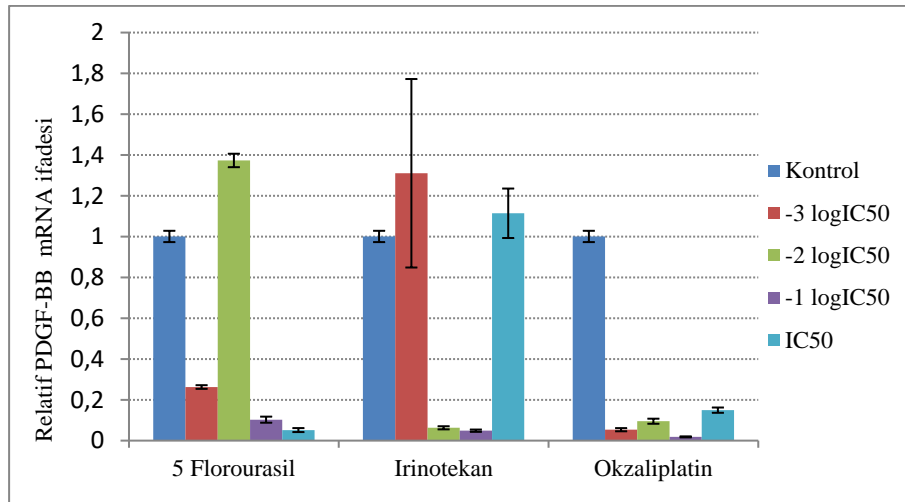
	ANG-2	TBS-1	NOS-2	NOS-3
KONTROL	1,072 ± 0,296	1 ± 0,1	1,046 ± 0,232	1,019 ± 0,135
5FU -3 logIC50	0,495 ± 0,054	0,337 ± 0,016	0,14 ± 0,005	0,1 ± 0,01
5FU -2 logIC50	0,653 ± 0,199	1,746 ± 0,031	-	0,239 ± 0,02
5FU -1 logIC50	0,043 ± 0,005	0,095 ± 0,002	0,014 ± 0	-
5FU IC50	0,055 ± 0,008	0,019 ± 0,001	0,547 ± 0	0,015 ± 0,001
IR -3 logIC50	0,473 ± 0,094	0,051 ± 0,002	0,03 ± 0	-
IR -2 logIC50	0,153 ± 0,046	0,04 ± 0,003	-	-
IR -1 logIC50	0,063 ± 0,006	0,036 ± 0,003	0,042 ± 0,015	-
IR IC50	0,097 ± 0,023	0,326 ± 0,047	-	-
OX -3 logIC50	0,153 ± 0,003	0,061 ± 0,003	0,124 ± 0,026	0,028 ± 0,002
OX -2 logIC50	0,101 ± 0,022	0,055 ± 0,002	0,03 ± 0,001	-
OX -1 logIC50	0,088 ± 0	0,008 ± 0,001	0,013 ± 0	0,019 ± 0,001
OX IC50	0,222 ± 0,078	0,034 ± 0,003	0,041 ± 0	-

5FU: 5-florourasil, IR: irinotekan, OX: okzalipatin



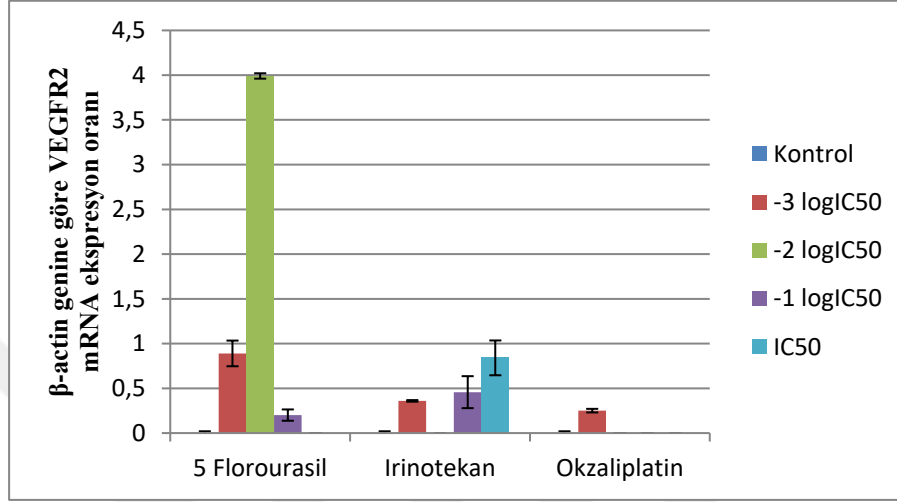
Şekil 3.2. HUVEC hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzaliptatin uygulaması sonrası VEGF-A gen ifade düzeyleri.

HUVEC hücrelerine uygulanan 5-florourasil sonrası -2 logIC50 dozunda kontrole göre anlamlı bir artış olurken, diğer dozlarda ifade düşüşü görüldü ($p < 0,001$). Irinotekan uygulanması sonrasında IC50 dozunda anlamlı artış olurken, diğer dozlarda gen ifadelerinde azalma görüldü ($p < 0,005$). Okzaliptatin uygulaması sonrası 4 ilaç dozunda da ifade azalmıştı ($p < 0,0001$).



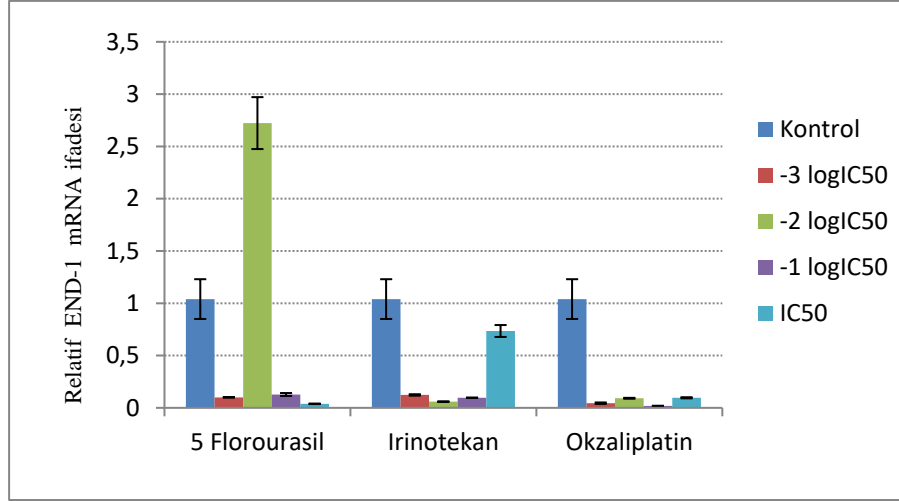
Şekil 3.3. HUVEC hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzaliptatin uygulaması sonrası PDGF-B gen ifade düzeyleri.

PDGF-B gen ifadesinde 5-florourasil sonrasında $-2 \log IC_{50}$ değeri kontrole göre anlamlı artış gösterirken, diğer dozlarda azalma görüldü ($p < 0,001$). Irinotekan uygulanması sonrasında -2 ve $-1 \log IC_{50}$ değerlerinde ve oksaliplatinin tüm dozlarında kontrole göre anlamlı düşüş görüldü ($p < 0,0001$).



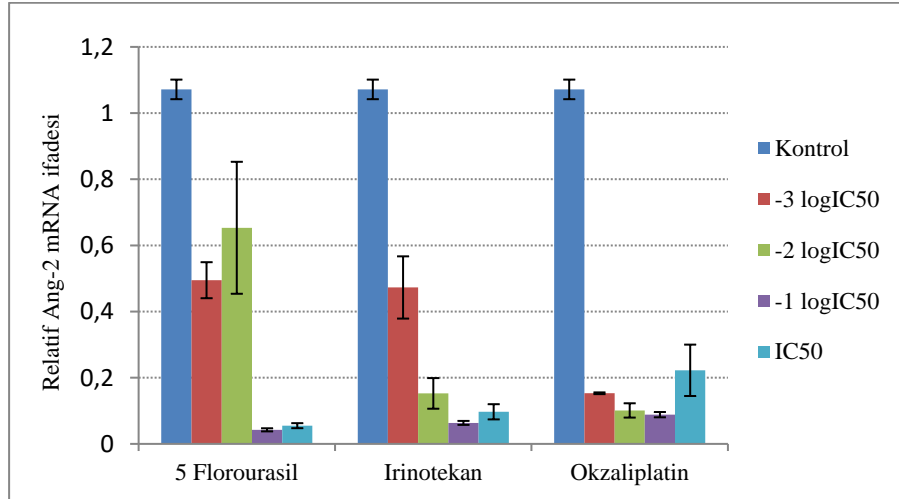
Şekil 3.4. HUVEC hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve oksaliplatin uygulaması sonrası VEGFR2 gen ifade düzeyleri.

İlaç uygulanmayan kontrol örneğinde VEGFR2 gen ifadesi izlenmez iken 5-florourasil ve irinotekan uygulamaları bu gen ifadesinde artışa neden olmuştur ($p < 0.05$). 5-florourasil IC₅₀ ve irinotekan $-2 \log IC_{50}$ dozlarında ise gen ifadesi izlenmemiştir. Okzaliplatinin uygulanan hiç bir dozunda HUVEC hücrelerinde VEGFR2 gen ifadesi izlenmemiştir.



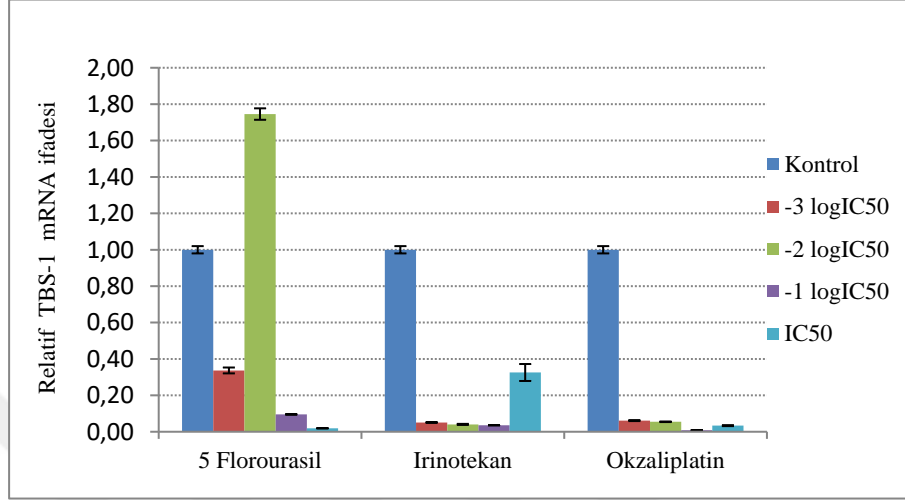
Şekil 3.5. HUVEC hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzaliplatin uygulaması sonrası END-1 gen ifade düzeyleri.

END-1 geninde 5-florourasil -2logIC50 dozunda endotelin ifadesinde anlamlı artış izlenirken diğer dozlarında anlamlı azalma izlendi ($p < 0.05$). Irinotekan ise IC50 dozunda endotelin ifadesi düzeyinde anlamlı değişiklik yapmazken diğer dozlarda anlamlı düşüşe yol açtı ($p < 0.05$) ve okzaliplatin ise tüm dozlarda endotelin-1 geni ifade düzeyini anlamlı olarak azalttı ($p < 0,05$).



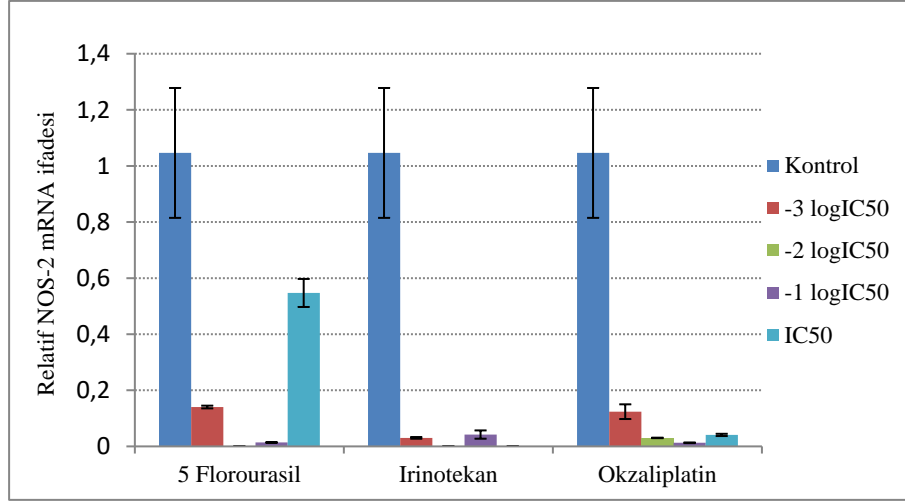
Şekil 3.6. HUVEC hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzaliplatin uygulaması sonrası ANG-2 gen ifade düzeyleri.

Angiopietin-2 gen ifadesinde her üç ilacın tüm dozlarında azalma izlendi. Ancak bu azalma miktarı 5-florourasilin IC50 ve -1logIC50, irinotekan ve okzaliplatinin ise IC50, -1logIC50 ve -2logIC50 dozlarında anlamlı idi ($p<0.05$).



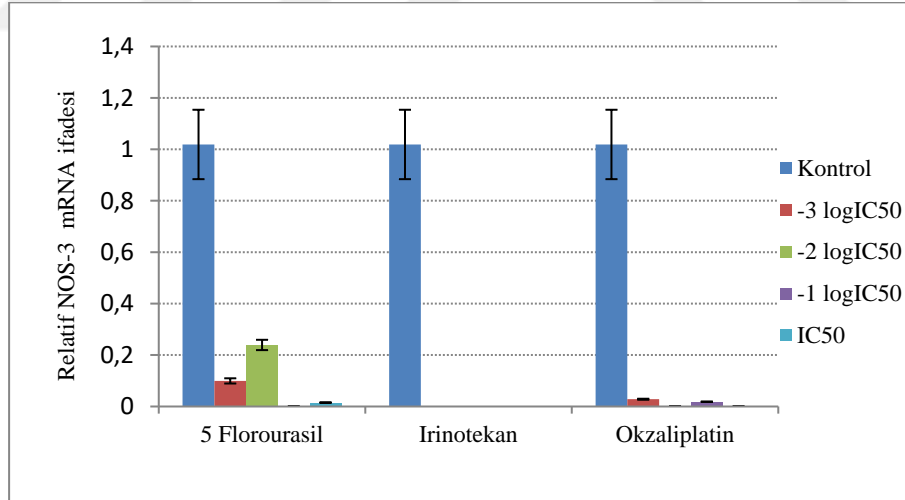
Şekil 3.7. HUVEC hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzaliplatin uygulaması sonrası TBS-1 gen ifade düzeyleri.

TBS-1 gen ifadesinde, ilaç uygulanması sonrasında 5-FU -2logIC50 değerinde kontrole göre anlamlı artış olduğu, diğer dozlarda ise anlamlı azalış olduğu görüldü ($p<0,0001$). İrinotekan ve okzaliplatinin tüm dozlarında TBS-1 gen ifadesinde belirgin olarak baskılanma izlendi ($p<0.0001$).



Şekil 3.8. HUVEC hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzaliplatin uygulaması sonrası NOS-2 gen ifade düzeyleri.

NOS-2 geni ifade düzeyleri, 5-florourasil IC50 dozu dışında uygulanan tüm ilaç dozlarında belirgin olarak azalmıştır ($p < 0.001$). 5-Florourasil ve irinotekanın -2 logIC50 dozlarında ise NOS-2 geninde hiç ifade gözlenmedi.



Şekil 3.9. HUVEC hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzaliplatin uygulaması sonrası NOS-3 gen ifade düzeyleri.

HUVEC hücrelerinde 5-florourasil ve okzaliplatin sonrası tüm dozlarda NOS-3 gen ifade düzeylerinde azalma izlenirken, irinotekan uygulaması sonrasında ise ifade görülmedi ($P < 0,05$).

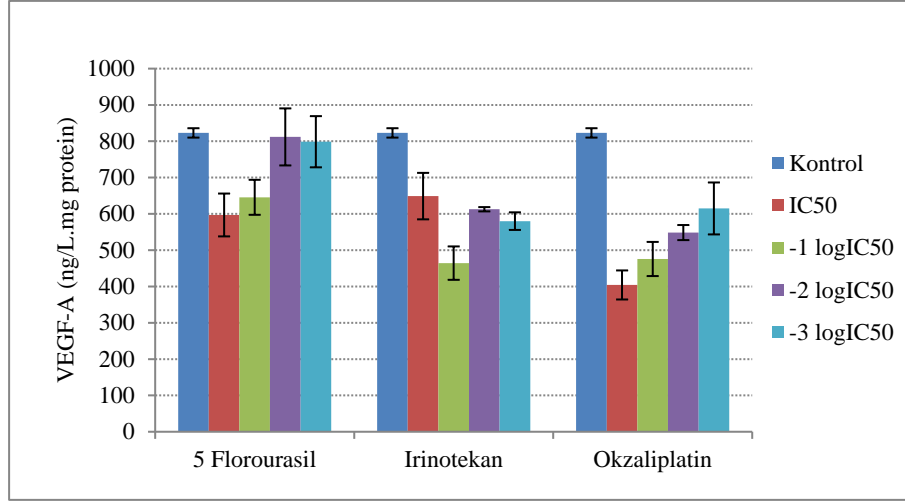
3.3. HUVEC Hücrelerinde Kemoterapinin Anjiyojenik Faktör Düzeylerine Etkisi

VEGF-A, PDGF-BB, END-1, ANG-2 ve TBS-1 için yapılan ELIZA deneyi ile hesaplanan sitokin düzeyleri değerleri, her bir örneğin içerdiği total protein miktarına göre normalize edilerek mg protein başına olacak şekilde ifade edildi. Çalışılan sitokinlerin hücre kültür ortamına salgılanan düzeyleri ortalama \pm standart hata olarak Çizelge 3.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. HUVEC hücrelerinde kemoterapi ilaç uygulaması sonrası VEGF-A, PDGF-BB, ANG-2, END-1 ve TBS-1 sitokin düzeyleri (mg protein başına) (ortalama \pm standart hata).

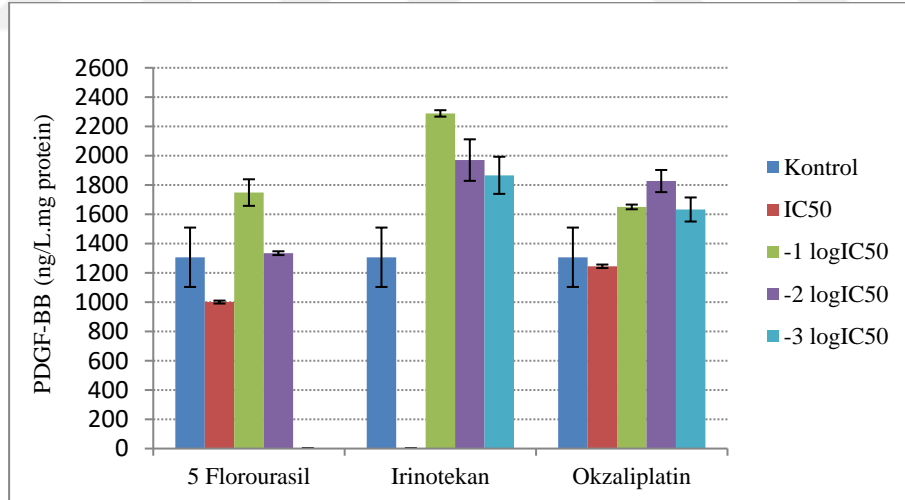
	VEGF-A (ng/L)	PDGF-BB (ng/L)	ANG-2 (ng/L)	END-1 (ng/L)	TBS-1(ng/ml)
KONTROL	822,94 \pm 12,93	1306,30 \pm 202,77	238,27 \pm 19,56	131,83 \pm 0,42	76,82 \pm 6,17
5FU IC50	596,95 \pm 59,00	1000,53 \pm 10,00	0 \pm 0	73,02 \pm 7	109,66 \pm 10
5FU -1 logIC50	645,61 \pm 48,18	1748,15 \pm 90,74	169,7 \pm 16	110,29 \pm 6,03	136,44 \pm 4,36
5FU -2 logIC50	811,97 \pm 78,55	1334,22 \pm 13,00	168,11 \pm 13,94	119,16 \pm 0,21	104,04 \pm 12,62
5FU -3 logIC50	798,71 \pm 70,51	0 \pm 0	224,87 \pm 22	131,97 \pm 0,46	99,49 \pm 12,56
IR IC50	648,91 \pm 64,00	0 \pm 0	0 \pm 0	98,88 \pm 9,00	58,71 \pm 5,00
IR -1 logIC50	464,37 \pm 46,00	2288,67 \pm 22,00	163,65 \pm 16	85,59 \pm 8,00	94,6 \pm 9,00
IR -2 logIC50	612,74 \pm 5,91	1969,87 \pm 141,83	143,2 \pm 2,56	106,4 \pm 0,6	91,99 \pm 2,75
IR -3 logIC50	579,99 \pm 24,26	1865,91 \pm 126,81	173,79 \pm 17	79,87 \pm 17,92	74,04 \pm 2,92
OX IC50	404,22 \pm 40,00	1244,69 \pm 12,00	123,17 \pm 12	59,71 \pm 5,00	50,87 \pm 5,00
OX -1 logIC50	475,77 \pm 46,80	1650,13 \pm 16,00	140,85 \pm 14	62,67 \pm 6,00	59,25 \pm 5,00
OX -2 logIC50	548,51 \pm 20,74	1826,85 \pm 75,61	191,54 \pm 19	115,12 \pm 3,6	89,96 \pm 29,62
OX -3 logIC50	614,95 \pm 71,52	1632,54 \pm 82,18	157,71 \pm 13,99	130,9 \pm 4,24	131,23 \pm 3,66

5FU: 5-florourasil, IR: irinotekan, OX: okzaliptatin



Şekil 3.10. HUVEC hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzalipatin uygulama sonrası VEGF-A sitokin düzeyleri.

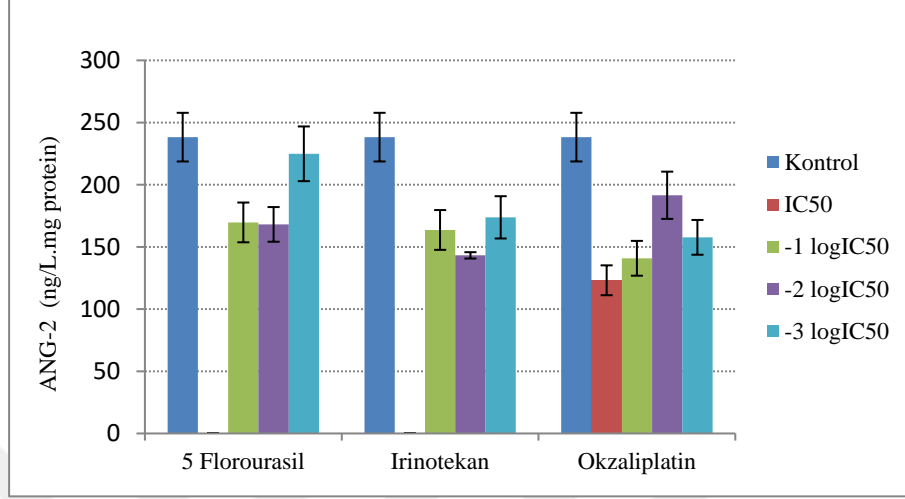
5-Florourasil IC50 irinotekan -1logIC50 ve okzalipatini ise -3logIC50, -2logIC50 ve -1logIC50 dozlarında VEGF-A düzeyleri anlamlı olarak azaldı ($p < 0,05$).



Şekil 3.11. HUVEC Hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzalipatin uygulama sonrası PDGF-BB sitokin düzeyleri.

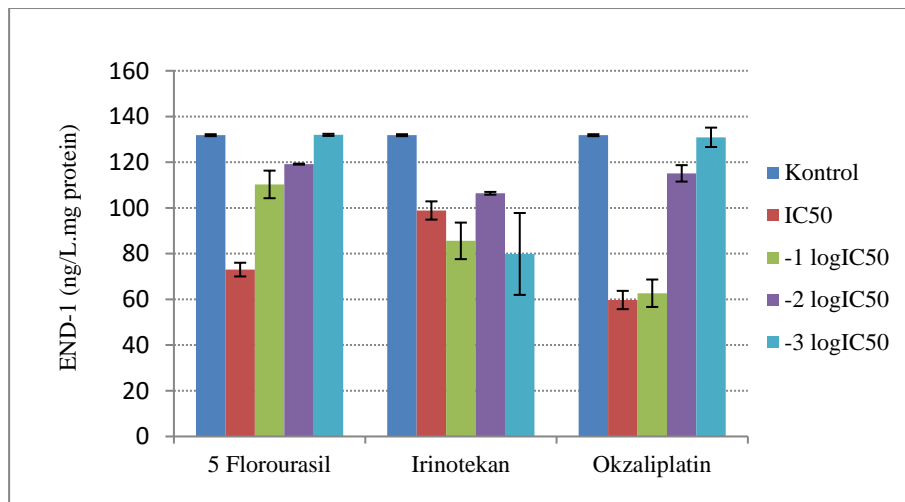
HUVEC hücrelerinde 5-florourasil IC50 dozunda PDGF-BB düzeyini anlamlı olarak azaltırken -1logIC50 dozunda anlamlı olarak arttırdı ($p < 0,05$). Irinotekan ve okzalipatin ise IC50 dışındaki diğer dozlarda PDGF-BB düzeyini anlamlı olarak

arttırdı ($p < 0.05$). 5-Florourasil $-3\log IC_{50}$ ve irinotekan IC_{50} dozları sonrasında hücre kültür vasatında sitokin düzeyi ölçülemeyecek düzeyde idi.



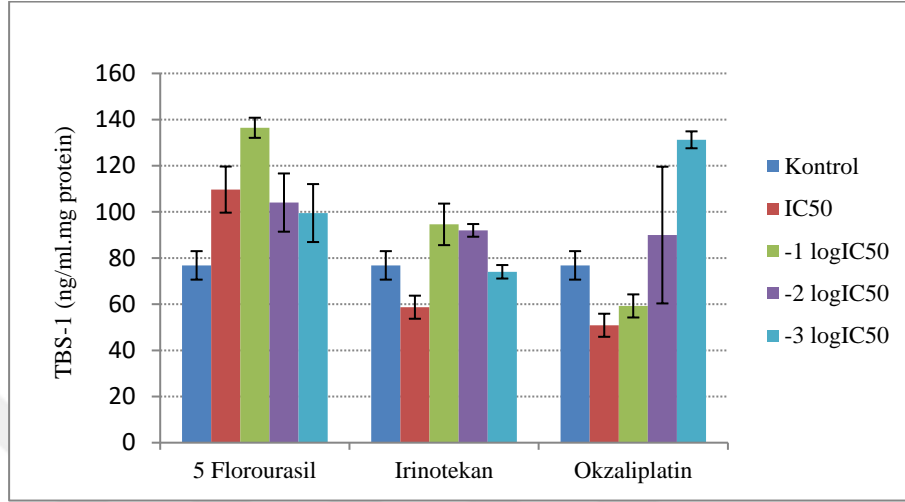
Şekil 3.12. HUVEC Hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzalipatin uygulama sonrası ANG-2 proteini sitokin düzeyleri.

5-florourasil, irinotekan ve okzalipatin 5-Florourasil $-3\log IC_{50}$ dozu hariç diğer dozlarda ANG-2 düzeylerinde anlamlı azalmaya neden oldu ($p < 0,05$). 5-florourasil ve irinotekanın IC_{50} dozlarında ise sitokin düzeyleri ölçülemeyecek düzeyde idi.



Şekil 3.13. HUVEC Hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzalipatin uygulama sonrası END-1 sitokin düzeyleri.

İrinotekan uygulanan tüm dozlarda endotelin-1 düzeyini anlamlı olarak düşürdü ($p<0.05$). 5-Florourasil ve okzaliptatin IC50 ve $-1\log\text{IC}_{50}$ dozlarında sitokin düzeyinde anlamlı azalma yaparken ($p<0.05$) diğer dozlarda değişikliğe yol açmadı.



Şekil 3.14. HUVEC Hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzaliptatin uygulama sonrası TBS-1 sitokin düzeyleri.

HUVEC hücrelerinde 5-florourasil IC50 ve $-1\log\text{IC}_{50}$ dozları trombospodin-1 düzeylerini anlamlı olarak artırırken ($p<0.05$) irinotekanın $-1\log\text{IC}_{50}$ ve $-2\log\text{IC}_{50}$ dozları anlamlı olmamakla birlikte bir artışa yol açtı (Çizelge 3.4 ve Şekil 3.4). Okzaliptatinin ise sadece $-3\log\text{IC}_{50}$ dozu sitokin düzeyini anlamlı olarak arttırmıştır ($p<0.05$). Okzaliptatinin IC50 ve $-1\log\text{IC}_{50}$ dozları ise anlamlı olmamakla birlikte TBS-1 düzeyinde bir azalmaya neden olmuştur.

3.4. HUVEC Hücrelerinde Kemoterapinin Nitrik Oksit Düzeylerine Etkisi

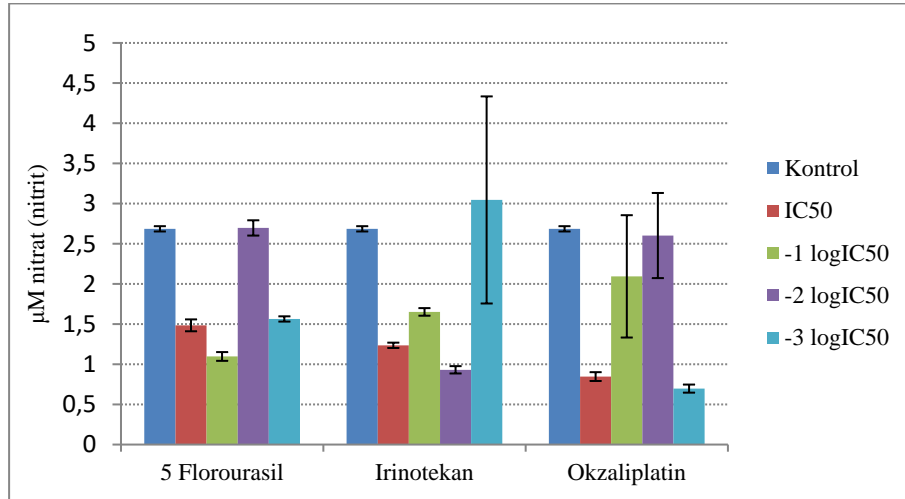
5-Florourasil, irinotekan ve okzaliptatinin farklı dozlarının HUVEC hücrelerinde nitrik oksit sentezi üzerindeki etkileri araştırıldı. Uygulanan ilaç dozları ile ölçülen NO düzeyleri (ortalama \pm standart hataları) Çizelge 3.5’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. HUVEC hücrelerinde 5-Florourasil, irinotekan ve okzaliptatin uygulaması sonrası NO (Nitrat/nitrit) konsantrasyonları (ortalama \pm standart hata).

Örnek Adı	Ortalama NO Konsantrasyonu (μM)
Kontrol	2,69 \pm 0,03
5FU IC50	1,48 \pm 0,07
5FU -1 logIC50	1,1 \pm 0,05
5FU -2 logIC50	2,7 \pm 0,10
5FU -3 logIC50	1,56 \pm 0,03
IR IC50	1,24 \pm 0,03
IR -1 logIC50	1,65 \pm 0,05
IR -2 logIC50	0,93 \pm 0,05
IR -3 logIC50	3,05 \pm 1,29
OX IC50	0,85 \pm 0,05
OX -1 logIC50	2,09 \pm 0,76
OX -2 logIC50	2,6 \pm 0,53
OX -3 logIC50	0,7 \pm 0,05

5FU: 5-florourasil, IR: irinotekan, OX: okzaliptatin

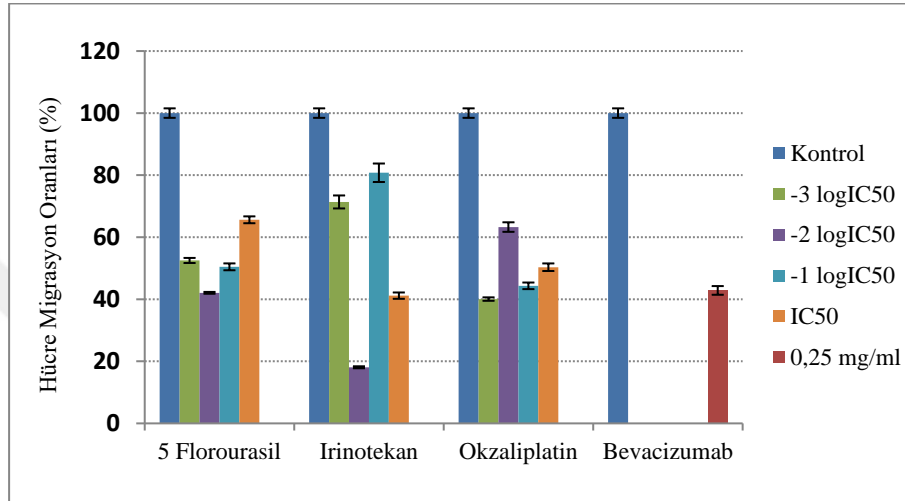
HUVEC hücrelerinde kemoterapi ilaçları uygulaması sonrasında nitrat/nitrit konsantrasyonları 5-florourasil -1logIC50, irinotekan IC50 ve -2logIC50, okzaliptatin ise IC50 ve -3logIC50 dozlarında kontrole göre anlamlı azaltırken diğer dozlarda etkilememiştir ($p < 0,05$).



Şekil 3.15. HUVEC hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan ve okzaliptatin uygulaması sonrası nitrat/nitrit konsantrasyonları.

3.5. HUVEC Hücrelerinde Kemoterapinin Hücre Migrasyonuna Etkisi

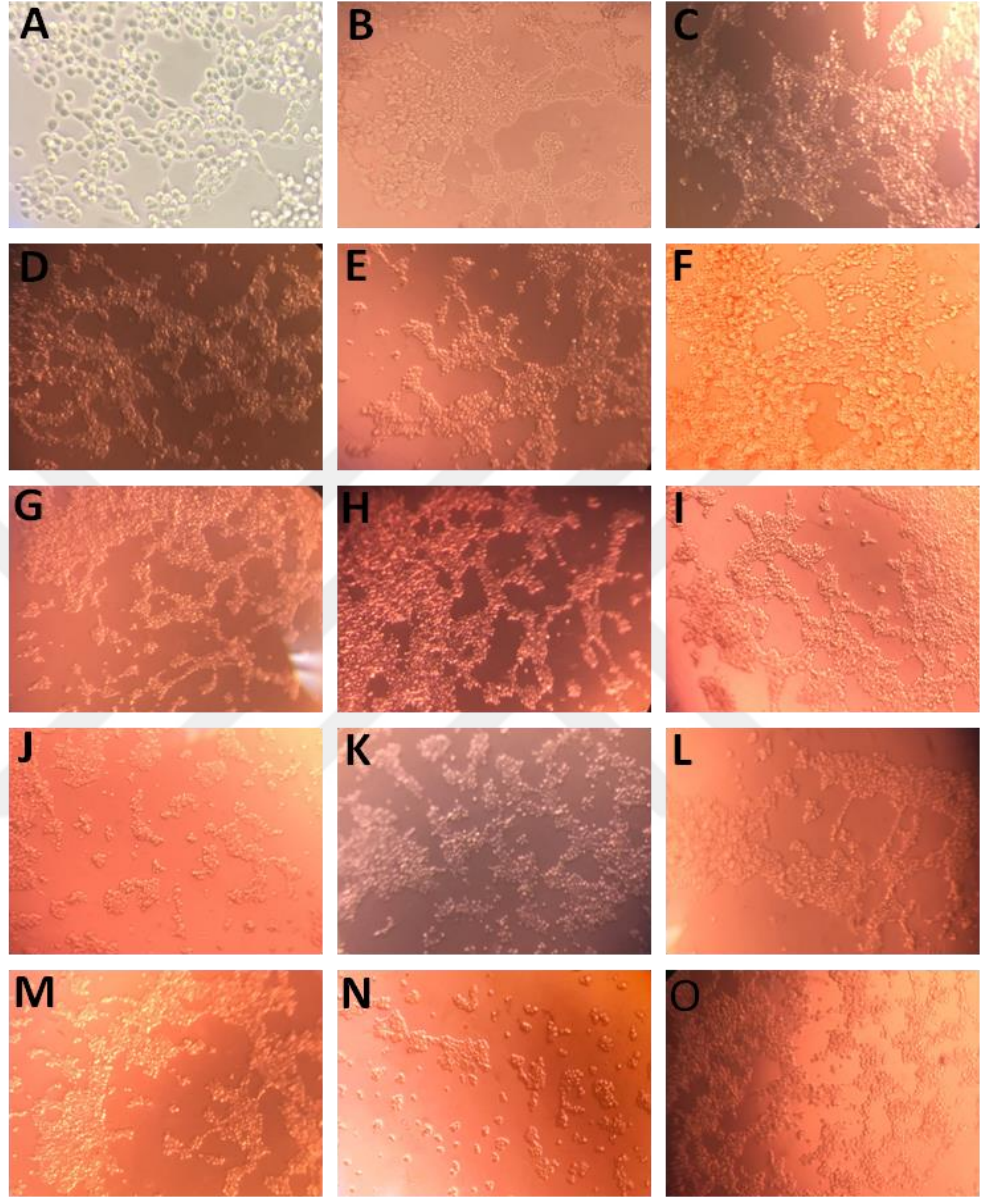
5-Florourasil, irinotekan, okzaliptatin ve bevacizumab uygulamasından sonra hücrelerin migrasyon yeteneklerindeki değişiklikleri gözlemek amacıyla Trans-well migrasyon deneyi yapıldı.



Şekil 3.16. HUVEC hücrelerinde 5-florourasil, irinotekan, okzaliptatin ve bevacizumab uygulaması sonrası hücrelerin migrasyon oranları.

5-Florourasil, irinotekan ve bevacizumab uygulanan tüm dozlarda HUVEC hücrelerinin migrasyon yeteneklerini anlamlı olarak azaltmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 3.16).

3.6. Kemoterapinin *In vitro* Damar Oluşumu Üzerine Etkisi



Şekil 3.17. HUVEC hücrelerinde kemoterapi ilaçlarının *in vitro* damar oluşumuna etkisi. A-Kontrol, B-C-Bevacizumab, D-5FU -3logIC50, E- 5FU -2logIC50, F- 5FU -1logIC50, G- 5FU IC50, H- IR -3logIC50, I- IR -2logIC50, J- IR -1logIC50, K- IR IC50, L-OX -3logIC50, M- OX -2logIC50, N- OX -1logIC50, O-OX IC50

Deneylerde kullanılan kemoterapi ilaç dozları ve bevacizumabın kullanılan dozunda HUVEC hücrelerinde *in vitro* damar oluşturma yeteneği açısından belirgin bir fark izlenmedi.

4. TARTIŞMA

Kanserde uygulanan konvansiyonel kemoterapi ilaçları rutin uygulama dozlarında genellikle kanser hücrelerini öldürürken, endotel hücrelerini fazla etkilememektedir. Son yıllarda özellikle önceden yoğun kemoterapi almış olan solid tümörlü hastalarda daha yaygın olarak uygulanmaya başlanan metronomik kemoterapi, tümör hücrelerinin apoptozu ve özellikle endotel hücreleri üzerindeki etkileri nedeniyle anti-anjiyojenik etkileri olabileceği düşünülmektedir (Bansy-Paluchowski ve ark., 2016; Kerbel ve Kamen, 2004). Konvansiyonel uygulamalara göre daha düşük dozlarda ve daha uzun süre uygulanan metronomik kemoterapi uygulamalarının ise özellikle dolaşımdaki endotel öncü hücrelerini azaltarak tümör anjiyogenezini baskılamada rol oynayabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Shi ve ark., 2014; Stoelting ve ark., 2008; Zeng ve ark., 2016). Kliniğimizde daha önce yaptığımız bir çalışmada metronomik olarak uygulanan kemoterapi ilaçlarının bu dozlarda tümör hücrelerinden VEGF-A salgılanmasını azalttığı gösterilmişti (Winter ve ark., 2016; Aktas ve ark., 2012). Kemoterapi ilaçlarının endotel hücrelerindeki anjiyojenik ve anti-anjiyojenik faktör sentezi üzerindeki etkileri konusundaki çalışmalarda anjiyogenezde rol oynayan gen düzeylerinde değişik etkilerini gösteren az sayıda çalışma bulunmaktadır (Biziota ve ark., 2016b; Biziota ve ark., 2016a; Previs ve ark., 2015). Tümör anjiyogenezinde tümör hücreleri ile tümör mikroçevresinde yer alan tümör asosiye makrofajlar (TAM) ve kanser asosiye fibroblastlar (CAF) ve diğer beniyin hücrelerden salgılanan anjiyogenik faktörlerin yanı sıra endotel hücrelerindeki sitokin salgısı ve VEGF reseptör değişiklikleri de rol oynamaktadır (Kerbel, 2008). Özellikle endotel hücrelerinin migrasyon ve tüp oluşturma potansiyelleri de tümör anjiyogenezinde bu hücrelerin önemli fonksiyonel özellikleridir. Bu tez çalışmamızda, solid tümörlerde yaygın olarak kullanılan 5-florourasil, irinotekan ve okzaliplatinin farklı metronomik dozlarının endotel hücrelerinde anjiyojenik ve anti-anjiyojenik sitokin yapımı üzerindeki etkilerini incelemeyi amaçladık. Yine bu ilaçların endotel hücreleri VEGF reseptör sentezi ve migrasyon ile tüp oluşturma yetenekleri üzerindeki etkilerini araştırdık. Migrasyon ve tüp oluşturma fonksiyonları açısından kemoterapi ilaçları için kontrol olarak bevacizumabın da etkinliğini araştırdık. Kullanılacak kemoterapi ilaçlarının, deneyde

kullanacağımız hücrelerdeki proliferasyon ve migrasyonu üzerindeki etkilerini incelemek için farklı konsantrasyonlarda ilaçlar ile MTT hücre canlılığı deneyi yapıldı. Doz aralıkları laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışma ile saptanmış idi. HUVEC hücrelerinin en çok 5-florourasil ile duyarlı olduğu saptandı (Çizelge 2.1).

Kolon kanseri tedavisinde kullanılan 5-florourasil, irinotekan ve okzaliptatin ilaçlarının tümör anjiyogenezini hangi yollardan etkilediğine dair farklı sonuçlar belirtilmiştir. İrinotekanın TBS-1 ifadesini uyararak endotel hücre çoğalmasımı ve tümör dokusunda mikrodamar yoğunluğunu azalttığı gösterilmiştir. Okzaliptatin ve 5-FU özellikle düşük dozlarda hem anti-anjiyojenik hem de anti-tümöral etkinlik gösterebilmektedir. Yaptığımız deneylerde anti-anjiyojenik faktör olan TBS-1 için ilaç uygulamaları sonrası gen ifade düzeylerinde azalma görülürken, ELIZA deneylerinde özellikle düşük dozlarda endotel hücrelerinden salgılanan TBS-1 protein konsantrasyonunun artmış olduğunu bulduk (Şekil 3.11). Bu sonuçlar düşük dozlarda uygulanan 5-florourasil, irinotekan ve okzaliptatinin endotel hücrelerinde anjiyojenik faktörleri azaltırken anti-anjiyojenik faktör yapımını da uyarabildiğini göstermektedir.

Tümör anjiyogenezinde VEGF-A varlığında Angiopietin-2'nin damar destabilizasyonunu sağladığı ve vasküler filizlenmeyi desteklediği; VEGF-A yokluğunda ise baskılayıcı bir rol oynayarak vasküler regresyonu hızlandırdığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da 5-FU, irinotekan ve okzaliptatinin $-1\log IC_{50}$, ve $-3\log IC_{50}$ dozlarında bu genlerin ifadelerini azalttığı ve benzer olarak da salgılanan VEGF-A ve angiopietin-2 düzeylerini azalttığını bulduk (Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3).

PDGF-B'nin endotel hücre migrasyonunu, proliferasyonunu ve mikrodamarlaşmada tüpsü yapının oluşabilmesi için perisitlerin toplanmasını uyardığı bilinmektedir. Çalışmamızda özellikle gen ifadesi düzeyinde irinotekanın $-1\log IC_{50}$ ve $-2\log IC_{50}$ ve okzaliptatinin incelenen tüm dozlarında PDGF-B'yi baskıladığı 5-florourasilin ise $-2\log IC_{50}$ dozunda ifade artışına neden olurken diğer dozlarda azalttığını bulduk (Çizelge 3.2). İlginç olarak salgılanan PDGF-B düzeyleri

incelendiğinde bu sitokin salgısının genel olarak test edilen kemoterapi dozlarında arttığı gözlemlendi. Gen ifadesi ile salgılanan sitokin düzeyi arasındaki bu çelişkiyi mevcut bulgularla açıklamak zor görünmekle birlikte sitokinin hücre dışına salgılanması üzerinde olası bir etkisinin araştırılmasının konuyu aydınlatılabileceğini düşünüyoruz. Deneylerde kullandığımız 5-florourasil ve irinotekanın endotel hücrelerinde VEGFR2 ifadesini genel olarak artırırken okzaliplatinin ise etkilemediğini bulduk (Çizelge 3.2).

Nitrik oksit endotel hücre proliferasyonunu destekleyerek ve hücrenin apoptoza gidişini engelleyerek sağkalım faktörü gibi görev aldığı bilinmektedir. Yaptığımız deneylerde de iNOS ve eNOS gen ifadesi uygulanan ilaçlar sonrasında azaldığını, nitrik oksit düzeylerinin de bu azalmayı destekler nitelikte olduğunu bulduk (Çizelge 3.3, Çizelge 3.5). NO düzeylerini azaltma yönünden 5-florourasilin $-1\log IC_{50}$, irinotekanın $-2\log IC_{50}$ ve okzaliplatinin $-3\log IC_{50}$ dozları en etkili bulunmuştur (Şekil 3.15).

HUVEC hücrelerine uygulanan 5-florourasil, irinotekan ve okzaliplatinin bu hücrelerin migrasyon yeteneğini hemen bütün dozlarda azalttığını bulduk (Şekil 3.16). Özellikle irinotekan ve 5-florourasilin $-2\log IC_{50}$ dozlarındaki azalma bevacizumabın etkisi ile benzer bulundu. İlaçlar sonrasında migrasyon yeteneklerinde düşme gözlemlenmiştir. Deneylerde kullandığımız ilaçların farklı dozlarının mikrodamar oluşumu açısından deney süresince çok farklılık göstermediği gözlemlendi. Söz konusu ilaçların hücrelerin damar oluşumu fonksiyonu üzerindeki etkilerinin *in vivo* deneylerle değerlendirilmesinin daha uygun olacağı kanaatindeyiz.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5-Florourasil, irinotekan ve okzaliplatin tez çalışmamızda kullandığımız IC50, -1logIC50, -2logIC50, -3logIC50 dozlarında bazı farklılıklar olmakla birlikte genel olarak anjiyojenik genlerin (angiopoietin 2, nitrik oksit sentetaz-2 ve 3, PDGF-B ve VEGF-A) mRNA düzeyinde ifadesini baskımlarken; anti-anjiyojenik Trombospondin-1 sitokin düzeyini arttırmıştır. Test edilen ilaç dozlarında özellikle her 3 ilacın -3logIC50 dozları endotel hücrelerindeki gen ifadesi ve sitokin salgısı üzerindeki etkileri açısından anti-anjiyojenik tedavi modalitesi olarak hayvan modellerinde test edilmeye aday görünmektedir. Bu tez çalışmamızda elde ettiğimiz *in vitro* sonuçlar deneylerde kullanılan ilaç dozlarının bir sonraki aşama olarak hayvan tümör modellerinde test edilmesinin klinikte kullanılan metronomik dozların daha rasyonel bir şekilde klinik çalışmalar bağlamında belirlenmesine yol gösterici olacaktır.

ÖZET

Metronomik Kemoterapinin Endotel Hücre Fonksiyonları Üzerindeki Etkisi

Konvansiyonel kemoterapi ilaçları genellikle sitotoksik etkileri nedeniyle tümör dokusunda küçülmeye neden olmaktadır. Ancak hastaların çoğunda bu ilaçların tümör hücrelerindeki sitotoksik etkilerine karşı direnç gelişmektedir. Klasik kemoterapi ilaçlarının metronomik kemoterapi adı verilen ve düşük dozlarda ve uzun süreli olarak uygulamasıyla tümör hücrelerinde apoptozla birlikte anti-anjiyojenik etkilerin de ortaya çıkması bu hastalarda tedavi direncini yenmede bir seçenek gibi görünmektedir. Kanserde anjiyogenez, hastalığın ilerlemesinde son derece önemli bir süreçtir. Anjiyogenez baskılayarak tümörlerin gerilemesini sağlamaya yönelik tedavi yaklaşımları son yıllarda popülerite kazanmıştır. Yeni geliştirilen anti-anjiyojenik tedavi ajanlarının ciddi yan etkilerinin yanısıra çok pahalı olması alternatif arayışları da gündeme getirmiştir. Metronomik kemoterapinin anti-anjiyojenik tedavi modalitesi olarak kullanılabilmesi ve rasyonel tedavi seçenekleri oluşturabilmek için bu uygulamanın endotel hücreleri üzerindeki etkilerinin ayrıntılı olarak bilinmesi gerekmektedir. Metronomik tedavinin endotel hücre öncüllerinin azalttığına ilişkin çalışmalar bulunmakla birlikte bu ilaçların endotel hücre fonksiyonları ve anjiyogenezde rol oynayan genlerin ifadesi üzerindeki etkilerini araştıran ayrıntılı çalışmalar gerekmektedir. Yine metronomik olarak kullanılacak dozların seçiminde bu dozlardaki anti-anjiyojenik etki potansiyelinin de bilinmesi önem taşımaktadır. Bu tez öncelikle metronomik kemoterapinin endotel hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin yanısıra bu hücrelerin fonksiyonları ve anjiyojenik-antianjiyojenik gen ifadeleri üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, HUVEC endotel hücre hattı kullanıldı. Kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan 5-florourasil, irinotekan ve okzaliptinin HUVEC hücrelerinde sitotoksik etkileri MTT testi ile tayin edilerek IC50 dozları bulundu. Daha sonra bu ilaçların IC50, -1logIC50, -2logIC50 ve -3logIC50 dozlarının endotel hücrelerinin migrasyon ve tüp oluşturma fonksiyonlarına etkisinin yanısıra bu hücrelerde VEGF-A, VEGFR2, PDGF-BB, angiopoietin-2, endotelin-1, trombospondin-1, iNOS, eNOS gen ifadelerine etkileri mRNA düzeyinde gerçek zamanlı PZR yöntemi ile ve hücreler tarafından besli ortamına salgılanan VEGF-A, PDGF-BB, ANG-2, END-1 ve TBS-1 sitokin düzeylerine etkileri sandviç ELIZA, nitrat/nitrit düzeylerine olan etkileri ise ticari kit ile tayin edildi.

HUVEC hücrelerine uygulanan 5-florourasil, irinotekan ve okzaliptinin bu hücrelerin migrasyon yeteneğini hemen bütün dozlarda anlamlı olarak azalttığını bulduk. Ancak mikro damar oluşumu açısından ilaçların kullandığımız dozlarında bir farklılık izlenmedi. 5-Florourasil, irinotekan ve okzaliptin IC50, -1logIC50, -2logIC50, -3logIC50 dozlarında bazı farklılıklar olmakla birlikte genel olarak anjiyojenik genlerin (angiopoietin 2, nitrik oksit sentetaz-2 ve 3, PDGF-B ve VEGF-A) mRNA düzeyinde ifadesini baskılayarak anti-anjiyojenik Trombospondin-1 sitokin düzeyini arttırdığını bulduk. Yine NO düzeylerini azaltma yönünden 5-florourasilin -1logIC50, irinotekanın -2logIC50 ve okzaliptinin -3logIC50 dozlarının en etkili olduğu bulundu.

Tez çalışmasından elde ettiğimiz sonuçlar düşük dozlarda uygulanan 5-florourasil, irinotekan ve okzaliptinin endotel hücrelerinde anjiyojenik faktörleri azaltırken, anti-anjiyojenik faktör yapımını da uyarabildiğini göstermektedir. Ayrıca bu sonuçlar söz konusu ilaçların bu dozlarda daha ileri hayvan modelleri ve klinik çalışmalarda anti-anjiyojenik tedavi seçeneği olarak denenebileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Anjiyogenez, ELIZA, GZ-PZR, Kemoterapi, Metronomik Kemoterapi

SUMMARY

Effects of metronomic chemotherapy on endothelial cell function

Conventional chemotherapeutic drugs usually decrease tumor volume by killing tumor cells. However, the majority of patients develop resistance against cytotoxic effects of those drugs. The lowered doses and prolonged administration of lowered doses of chemotherapeutic drugs, called metronomic chemotherapy, seems to overcome the treatment resistance in solid tumors by increasing tumor cell apoptosis and anti-angiogenic activity. Angiogenesis is one of the basic processes in the progression of tumors. Recently, anti-angiogenic agents have gained popularity in the treatment of advanced staged cancers. However, new alternative modalities are being investigated because of the serious side effects and the cost of the newly developed anti-angiogenic drugs. In order to use metronomic chemotherapy as an alternative anti-angiogenic treatment modality, the detailed effects of those drugs on endothelial cell functions need to be elucidated. Although there are few reports show that metronomic chemotherapy could decrease endothelial precursor cell numbers, no detailed studies regarding the effects of different doses of those drugs on the expression of angiogenic and anti-angiogenic genes, cytokine secretion and cellular functions of endothelial cells are available in the literature. In the current study we especially aimed to investigate the effects of various metronomic doses of 5-fluorouracil, irinotecan and oxaliplatin on the cellular functions, angiogenic and anti-angiogenic gene expression and cytokine secretion levels in endothelial cells.

We used endothelial cell line in the experiments. First, we determined the cytotoxic effects of 5-fluorouracil, irinotecan and oxaliplatin on HUVEC cells by using MTT test and calculated IC₅₀, -1logIC₅₀, -2logIC₅₀ and -3logIC₅₀ doses of those drugs on cell migration and micro vessel formation functions of HUVEC cells. We've also tested the effects of the drugs on the expression levels of VEGF-A, VEGFR2, PDGF-BB, angiopoietin-2, endothelin-1, thrombospondin-1, iNOS, eNOS genes by qPCR and VEGF-A, PDGF-BB, ANG-2, END-1 and TBS-1 cytokine levels by sandwich ELISA and nitrate/nitrite levels by a commercially available NO testing kit.

5-Fluorouracil, irinotecan and oxaliplatin significantly decreased the migration capacity of HUVEC cells at all testing doses. However, no significant efficacy of the drugs are observed on micro vessel formation function of the HUVEC cells. The chemotherapeutic drugs tested in the current study yielded a decrease in the expression levels of angiopoietin 2, nitric oxide synthetase -2 and 3, PDGF-B and VEGF-A genes and an increase in the cytokine secretion levels of thrombospondin-1 at the doses of -1logIC₅₀, -2logIC₅₀ and -3logIC₅₀. The 5-fluorouracil at the dose of -1logIC₅₀, irinotecan of -2logIC₅₀ and oxaliplatin of -3logIC₅₀ efficiently decreased the nitric oxide levels of HUVEC cells.

Our results suggest that the lowered doses of 5-fluorouracil, irinotecan and oxaliplatin decrease angiogenic factor and increase anti-angiogenic factor production in endothelial cells and deserve to be used as an anti-angiogenic treatment modality in animal models and clinical studies.

Keywords: Angiogenesis, Chemotherapy, ELISA, Metronomic Chemotherapy, qRT-PZR

KAYNAKLAR

- AKTAS SH, AKBULUT H, AKGUN N, ICLI F (2012). Low dose chemotherapeutic drugs without overt cytotoxic effects decrease the secretion of VEGF by cultured human tumor cells: a tentative relationship between drug type and tumor cell type response. *Cancer Biomarkers* **12** (3):135-140.
- ALCINDOR T, BEAUGER N (2011). Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Current Oncology* **18** (1):18-25.
- BANYS-PALUCHOWSKI M, SCHÜTZ F, RUCKHÄBERLE E, KRAWCZYK N, FEHM T (2016). Metronomic Chemotherapy for Metastatic Breast Cancer—a Systematic Review of the Literature. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* **76** (05):525-534.
- BIZIOTA E, BRIASOULIS E, MAVROEIDIS L, MARSELOS M, HARRIS AL, PAPPAS P (2016a). Cellular and molecular effects of metronomic vinorelbine and 4-O-deacetylvinorelbine on human umbilical vein endothelial cells. *Anti-cancer drugs* **27** (3):216.
- BIZIOTA E, MAVROEIDIS L, HATZIMICHAEL E, PAPPAS P (2016b). Metronomic chemotherapy: A potent macerator of cancer by inducing angiogenesis suppression and antitumor immune activation. *Cancer Letters*.
- BLANCO R, GERHARDT H (2013). VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **3** (1):a006569.
- BOCCI G, FRANCA G, MAN S, LAWLER J, KERBEL RS (2003). Thrombospondin 1, a mediator of the antiangiogenic effects of low-dose metronomic chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100** (22):12917-12922.
- CARMELIET P, JAIN RK (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *nature* **407** (6801):249-257.
- CHENG H, WANG L, MOLLIKA M, RE AT, WU S, ZUO L (2014). Nitric oxide in cancer metastasis. *Cancer letters* **353** (1):1-7.
- CHOU DHARI SK, CHAUDHARY M, BAGDE S, GADBAIL AR, JOSHI V (2013). Nitric oxide and cancer: a review. *World journal of surgical oncology* **11** (1):1.
- Chun CZ, Sood R, Ramchandran R (2016) Vasculogenesis and Angiogenesis. In: *Vascular Tumors and Developmental Malformations*. Springer, pp 77-99
- CHUNG AS, FERRARA N (2011). Developmental and pathological angiogenesis. *Annual review of cell and developmental biology* **27**:563-584.
- CHUNG AS, LEE J, FERRARA N (2010). Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nature Reviews Cancer* **10** (7):505-514.

- CIOMBOR KK, BERLIN J (2014). Aflibercept—a decoy VEGF receptor. *Current oncology reports* **16** (2):1-7.
- COOKE JP (2003). NO and angiogenesis. *Atherosclerosis Supplements* **4** (4):53-60.
- CORAS B, HAFNER C, REICHLER A, HOHENLEUTNER U, SZEIMIES R-M, LANDTHALER M, VOGT T (2004). Antiangiogenic therapy with pioglitazone, rofecoxib, and trofosamide in a patient with endemic kaposi sarcoma. *Archives of dermatology* **140** (12):1504-1507.
- CRINÒ L, METRO G (2014). Therapeutic options targeting angiogenesis in nonsmall cell lung cancer. *European Respiratory Review* **23** (131):79-91.
- CULLIS ER, KALBER TL, ASHTON SE, CARTWRIGHT JE, GRIFFITHS JR, RYAN AJ, ROBINSON SP (2006). Tumour overexpression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) increases angiogenesis and may modulate the anti-tumour effects of the vascular disrupting agent ZD6126. *Microvascular research* **71** (2):76-84.
- DAENEN LG, SHAKED Y, MAN S, XU P, VOEST EE, HOFFMAN RM, CHAPLIN DJ, KERBEL RS (2009). Low-dose metronomic cyclophosphamide combined with vascular disrupting therapy induces potent antitumor activity in preclinical human tumor xenograft models. *Molecular cancer therapeutics* **8** (10):2872-2881.
- DALY C, EICHTEN A, CASTANARO C, PASNIKOWSKI E, ADLER A, LALANI AS, PAPADOPOULOS N, KYLE AH, MINCHINTON AI, YANCOPOULOS GD (2013). Angiopoietin-2 functions as a Tie2 agonist in tumor models, where it limits the effects of VEGF inhibition. *Cancer research* **73** (1):108-118.
- DE FALCO S (2014). Antiangiogenesis therapy: an update after the first decade. *The Korean journal of internal medicine* **29** (1):1.
- DESANTIS CE, LIN CC, MARIOTTO AB, SIEGEL RL, STEIN KD, KRAMER JL, ALTERI R, ROBBINS AS, JEMAL A (2014). Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians* **64** (4):252-271.
- DVORAK HF (2015). Tumors: wounds that do not heal—redux. *Cancer immunology research* **3** (1):1-11.
- ELLIES LG, FISHMAN M, HARDISON J, KLEEMAN J, MAGLIONE JE, MANNER CK, CARDIFF RD, MACLEOD CL (2003). Mammary tumor latency is increased in mice lacking the inducible nitric oxide synthase. *International journal of cancer* **106** (1):1-7.
- ETIENNE-GRIMALDI MC, BOYER JC, THOMAS F, QUARANTA S, PICARD N, LORIOT MA, NARJOZ C, PONCET D, GAGNIEU MC, GED C (2015). UGT1A1 genotype and irinotecan therapy: general review and implementation in routine practice. *Fundamental & clinical pharmacology* **29** (3):219-237.
- FAGUET GB (2015). A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. *International Journal of Cancer* **136** (9):2022-2036.

- FERRARA N, HILLAN KJ, GERBER H-P, NOVOTNY W (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature reviews Drug discovery* **3** (5):391-400.
- FIEDLER U, SCHARPFENECKER M, KOIDL S, HEGEN A, GRUNOW V, SCHMIDT JM, KRIZ W, THURSTON G, AUGUSTIN HG (2004). The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood* **103** (11):4150-4156.
- FRIIS RH, SELLERS T (2013). *Epidemiology for public health practice*. Jones & Bartlett Publishers.
- GNONI A, SILVESTRI N, LICCHETTA A, SANTINI D, SCARTOZZI M, RIA R, PISCONTI S, PETRELLI F, VACCA A, LORUSSO V (2015). Metronomic chemotherapy from rationale to clinical studies: A dream or reality? *Critical reviews in oncology/hematology* **95** (1):46-61.
- GOTINK KJ, VERHEUL HM (2010). Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis* **13** (1):1-14.
- HANAHAN D, BERGERS G, BERGSLAND E (2000). Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *The Journal of clinical investigation* **105** (8):1045-1047.
- HANAHAN D, FOLKMAN J (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *cell* **86** (3):353-364.
- HANAHAN D, WEINBERG RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell* **144** (5):646-674.
- HAY ED (2013) *Cell biology of extracellular matrix*. Springer Science & Business Media.
- HINDS PW (2016). Commentary on Alfred G. Knudson, Jr.:“Hereditary Cancer, Oncogenes, and Antioncogenes”. *Cancer research* **76** (10):2851-2853.
- HURWITZ H, FEHRENBACHER L, NOVOTNY W, CARTWRIGHT T, HAINSWORTH J, HEIM W, BERLIN J, BARON A, GRIFFING S, HOLMGREN E (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *New England journal of medicine* **350** (23):2335-2342.
- JAIN RK (2008). Lessons from multidisciplinary translational trials on anti-angiogenic therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* **8** (4):309-316.
- KERBEL RS (2008). Tumor angiogenesis. *New England Journal of Medicine* **358** (19):2039-2049.
- KERBEL RS, KAMEN BA (2004). The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nature Reviews Cancer* **4** (6):423-436.
- KITSERA N, SHPARYK Y, HELNER N, LOGUSH S (2016). Detection of Gene Mutation in the 185del AG BRCA1 in Families with Hereditary Breast Cancer. *Hereditary Genet* **5** (171):2161-1041.10001.

- LANKHORST S, KAPPERS MH, VAN ESCH JH, DANSER AJ, VAN DEN MEIRACKER AH (2014). Hypertension during vascular endothelial growth factor inhibition: focus on nitric oxide, endothelin-1, and oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling* **20** (1):135-145.
- LIANG C-C, PARK AY, GUAN J-L (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols* **2** (2):329-333.
- LLOVET JM, RICCI S, MAZZAFERRO V, HILGARD P, GANE E, BLANC J-F, DE OLIVEIRA AC, SANTORO A, RAOUL J-L, FORNER A (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *New England journal of medicine* **359** (4):378-390.
- LOVEN D, LOVEN D, BE'ERY E, LOVEN D, BE'ERY E, YERUSHALMI R, KOREN C, SULKES A, LAVI I, SHAKED Y (2008). Daily low-dose/continuous capecitabine combined with neo-adjuvant irradiation reduces VEGF and PDGF-BB levels in rectal carcinoma patients. *Acta Oncologica* **47** (1):104-109.
- MARCELO KL, GOLDIE LC, HIRSCHI KK (2013). Regulation of endothelial cell differentiation and specification. *Circulation research* **112** (9):1272-1287.
- MERRILL RM (2015) Introduction to epidemiology. Jones & Bartlett Publishers.
- MOORE M, GOLDSTEIN D, HAMM J, KOTECHA J, GALLINGER S, AU H, NOMIKOS D, DING K, PTASZYNSKI M, PARULEKAR W (2005). Erlotinib improves survival when added to gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. A phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group [NCIC-CTG]. *J Clin Oncol* **23** (1).
- MORBIDELLI L, DONNINI S, ZICHE M (2003). Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. *Current pharmaceutical design* **9** (7):521-530.
- MOSQUERA JM, SBONER A, ZHANG L, CHEN CL, SUNG YS, CHEN HW, AGARAM NP, BRISKIN D, BASHA BM, SINGER S (2013). Novel MIR143-NOTCH fusions in benign and malignant glomus tumors. *Genes, Chromosomes and Cancer* **52** (11):1075-1087.
- MUELLER SB, KONTOS CD (2016). Tie1: an orphan receptor provides context for angiopoietin-2/Tie2 signaling. *Journal of Clinical Investigation* **126** (9):3188.
- MUTSAERS AJ (2009). Metronomic chemotherapy. *Topics in companion animal medicine* **24** (3):137-143.
- NISHIDA N, YANO H, NISHIDA T, KAMURA T, KOJIRO M (2006). Angiogenesis in cancer. *Vascular health and risk management* **2** (3):213.
- PANDEY K, DUBEY RS, PRASAD BB (2016). A Critical Review on Clinical Application of Separation Techniques for Selective Recognition of Uracil and 5-Fluorouracil. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* **31** (1):3-12.
- POTENTE M, GERHARDT H, CARMELIET P (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* **146** (6):873-887.

- PREVIS RA, ARMAIZ-PENA GN, LIN YG, DAVIS AN, PRADEEP S, DALTON HJ, HANSEN JM, MERRITT WM, NICK AM, LANGLEY RR (2015). Dual Metronomic Chemotherapy with Nab-Paclitaxel and Topotecan Has Potent Antiangiogenic Activity in Ovarian Cancer. *Molecular cancer therapeutics* **14** (12):2677-2686.
- RAJENDRAN P, RENGARAJAN T, THANGAVEL J, NISHIGAKI Y, SAKTHISEKARAN D, SETHI G, NISHIGAKI I (2013). The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci* **9** (10):1057-1069.
- RATH M, MÜLLER I, KROPF P, CLOSS EI, MUNDER M (2015). Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *M1/M2 Macrophages: The Arginine Fork in the Road to Health and Disease*:13.
- RIBATTI D (2008) History of research on tumor angiogenesis. Springer Science & Business Media.
- SALES KM, SALACINSKI HJ, ALOBAID N, MIKHAIL M, BALAKRISHNAN V, SEIFALIAN AM (2005). Advancing vascular tissue engineering: the role of stem cell technology. *Trends in biotechnology* **23** (9):461-467.
- SALOMON C, RYAN J, SOBREVIA L, KOBAYASHI M, ASHMAN K, MITCHELL M, RICE GE (2013). Exosomal signaling during hypoxia mediates microvascular endothelial cell migration and vasculogenesis. *PloS one* **8** (7):e68451.
- SATCHELL SC, BRAET F (2009). Glomerular endothelial cell fenestrations: an integral component of the glomerular filtration barrier. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **296** (5):F947-F956.
- SCHOLZ D, ZIEGELHOEFFER T, HELISCH A, WAGNER S, FRIEDRICH C, PODZUWEIT T, SCHAPER W (2002). Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice. *Journal of molecular and cellular cardiology* **34** (7):775-787.
- SENNINO B, McDONALD DM (2012). Controlling escape from angiogenesis inhibitors. *Nature Reviews Cancer* **12** (10):699-709.
- SERHAN CN, SAVILL J (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology* **6** (12):1191-1197.
- SHAH A, BENNETT M (2016) Controlling Inflammation Through DNA Damage and Repair. Am Heart Assoc,
- SHAHI PK, PINEDA IF (2008). Tumoral angiogenesis: review of the literature. *Cancer investigation* **26** (1):104-108.
- SHI H, JIANG J, JI J, SHI M, CAI Q, CHEN X, YU Y, LIU B, ZHU Z, ZHANG J (2014). Anti-angiogenesis participates in antitumor effects of metronomic capecitabine on colon cancer. *Cancer letters* **349** (2):128-135.
- SHIBUYA M (2013). Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *Journal of biochemistry* **153** (1):13-19.

- STOELTING S, TREFZER T, KISRO J, STEINKE A, WAGNER T, PETERS SO (2008). Low-dose oral metronomic chemotherapy prevents mobilization of endothelial progenitor cells into the blood of cancer patients. *In Vivo* **22** (6):831-836.
- SZABO C, COLETTA C, CHAO C, MÓDIS K, SZCZESNY B, PAPAPETROPOULOS A, HELLMICH MR (2013). Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathionine- β -synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110** (30):12474-12479.
- TAIT CR, JONES PF (2004). Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch. *The Journal of pathology* **204** (1):1-10.
- TAKUWA Y, DU W, QI X, OKAMOTO Y, TAKUWA N, YOSHIOKA K (2010). Roles of sphingosine-1-phosphate signaling in angiogenesis. *World journal of biological chemistry* **1** (10):298.
- TARALLO V, DE FALCO S (2015). The vascular endothelial growth factors and receptors family: Up to now the only target for anti-angiogenesis therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology* **64**:185-189.
- TAS F, DURANYILDIZ D, SOYDINC HO, CICIN I, SELAM M, UYGUN K, DISCI R, YASASEVER V, TOPUZ E (2008). Effect of maximum-tolerated doses and low-dose metronomic chemotherapy on serum vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 levels in patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **61** (5):721-725.
- TSIMBERIDOU A-M, KURZROCK R, ANDERSON KC (2015). The Role of Angiogenesis in Cancer. *Targeted Therapy in Translational Cancer Research* **5**:64.
- TSUCHIDA R, OSAWA T, WANG F, NISHII R, DAS B, TSUCHIDA S, MURAMATSU M, TAKAHASHI T, INOUE T, WADA Y (2014). BMP4/Thrombospondin-1 loop paracrinically inhibits tumor angiogenesis and suppresses the growth of solid tumors. *Oncogene* **33** (29):3803-3811.
- UPRETI M, JYOTI A, SETHI P (2013). Tumor microenvironment and nanotherapeutics. *Translational cancer research* **2** (4):309.
- VAN MEURS M, KÜMPERS P, LIGTENBERG JJ, MEERTENS JH, MOLEMA G, ZIJLSTRA JG (2009). Bench-to-bedside review: Angiopoietin signalling in critical illness—a future target? *Critical care* **13** (2):1.
- VASUDEV NS, REYNOLDS AR (2014). Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis* **17** (3):471-494.
- VILLANUEVA MT (2015). Angiogenesis: A sudden rush of blood to the tumour. *Nature Reviews Cancer* **15** (3):135-135.
- WANG X, GUO Z, DING Z, KHAIDAKOV M, LIN J, XU Z, SHARMA SG, JIWANI S, MEHTA JL (2015). Endothelin-1 upregulation mediates aging-related cardiac fibrosis. *Journal of molecular and cellular cardiology* **80**:101-109.
- WEINBERG R (2013) The biology of cancer. Garland science.

WINTER U, MENA HA, NEGROTTA S, ARANA E, PASCUAL-PASTO G, LAURENT V, SUÑOL M, CHANTADA GL, CARCABOSO AM, SCHAIQUEVICH P (2016). Schedule-Dependent Antiangiogenic and Cytotoxic Effects of Chemotherapy on Vascular Endothelial and Retinoblastoma Cells. *PloS one* **11** (7):e0160094.

YOO SY, KWON SM (2013). Angiogenesis and its therapeutic opportunities. *Mediators of inflammation* **2013**.

ZENG J, YANG L, HUANG F, HONG T, HE Z, LEI J, SUN H, LU Y, HAO X (2016). The metronomic therapy with prednisone, etoposide, and cyclophosphamide reduces the serum levels of VEGF and circulating endothelial cells and improves response rates and progression-free survival in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **78** (4):801-808.



ÖZGEÇMİŞ



I – Bireysel Bilgiler

Fatma Gizem SONUGÜR

Uyruk: T.C.

Doğum Tarihi ve Yeri: 20/04/1991 – Giresun/Tirebolu

Medeni Hali: Bekar

Adres1: Yukarı Bahçelievler Mah. Azerbaycan Cad. Yardım Apt. 127/1
Çankaya/ANKARA

Adres2: Tersane Mah. 1672/1 Sok. Alaybey Apt. 15/2 Karşıyaka/İZMİR

Tel: 0506 571 01 50

E-mail: gizem.sonugur@hotmail.com

II – Eğitimi

2014 - : Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları ABD, Tıbbi Onkoloji BD, Tümör Biyolojisi Yüksek Lisans Programı, Ankara (*Not Ortalaması: 4.00/4.00*)

2009 - 2014: Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir (*Not Ortalaması: 3.2 /4.00*)

2005 - 2009: İzmir Atatürk Anadolu Lisesi, İzmir (*Not Ortalaması: 82,67/100*)

Yabancı Dil:

İngilizce - İyi Derece

Almanca – Başlangıç Seviyesi

III – Mesleki Deneyimi

Temmuz – Ağustos 2013 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı Gen Tedavileri Araştırma Ünitesi (Zorunlu Staj)

Haziran – Eylül 2012 Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Moleküler Kanser Laboratuvarı (Gönüllü Yaz Stajı)

Eylül – Haziran 2010 Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Algal Biyoteknoloji Laboratuvarı (Gönüllü Staj)

IV – Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Derin Uzay – Bilim ve Teknoloji Lab. Ar-Ge Derneği (Koordinatör, Editör)
TMMOB Kimya Mühendisliği Odası
Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Topluluğu (EBİLTET)

V – Bilimsel İlgi Alanları

Yayınlar:

BABÜR B, SEFEROĞLU N, ÖCAL M, SONUGUR G, AKBULUT H, SEFEROĞLU Z (2016). A novel fluorescence turn-on coumarin-pyrazolone based monomethine probe for biothiol detection. Tetrahedron.

AKBULUT H, OCAL M, SONUGUR G (2015) Cancer Gene Therapy. Gene Therapy - Principles and Challenges.

Posterler:

AKBULUT H, OCAL M, SONUGUR G, AKAY B, BABAHAN C, ABGARMİ SA, DEMIRKAZIK A, ICLİ F (2016). The role of immune system on the efficacy of bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). Annals of Oncology 27 (suppl 6):1553P.

SONUGÜR G, ANIL M, DELİLOGLU GÜRHAN Sİ, ŞENDEMİR ÜRKMEZ A (2014). Besi ortamı bileşiminin osteosarkom kanser kök hücrelerinin farklılaşma kapasitesine etkisinin incelenmesi. II. Biyomühendislik Öğrenci Kongresi, Ege Üniversitesi, İzmir.

VI – Bilimsel Etkinlikleri

Projeler ve aldığı burslar:

2016 - Metronomik kemoterapinin endotel hücre fonksiyonları üzerindeki etkisi (BAP - Ankara Üniversitesi) (Lisansüstü Tez Projesi (Yüksek Lisans))

2015 - Kolorektal kanser tedavisinde anti-anjiyojenik tedavi etkinliğini belirleyen faktörler (TÜBİTAK 1001) (Bursiyer)

2014 - CD133⁺ Osteosarkoma Kanser Kök Hücrelerinin *in vivo* Tümörojenesinin İncelenmesi (TÜBİTAK 1002- Hızlı Destek Programı) (Bursiyer)

Seminer:

VII – Diğer Bilgiler

- Onkolojide Güncel Tedaviler Kongresi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 11-12 Aralık 2015.
- Deneysel Hayvanlar Kullanım Sertifikası Eğitimi, Ankara Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi, 30 Kasım – 09 Aralık 2015.
- 23. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Türk Farmakoloji Derneği, Hacettepe Üniversitesi Ankara, 7-10 Eylül 2015.
- 11. Ankara Biyoteknoloji Günleri – Tedavisel peptidler ve antikorlar, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, 20-22 Mayıs 2015.
- 8. Sigara veya Sağlık Sempozyumu, Ankara Üniversitesi Onkoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Sigara Savaş Grubu, Ankara, 6 Nisan 2015.
- Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Deneysel Hayvan Araştırmalarının Planlanması (Katılımcı), Ege Üniversitesi, İzmir, 30 Nisan 2014.
- GMP (İyi Üretim Uygulamaları) Eğitimi, İzmir, 3 Mayıs 2014.
- 11. Biyomühendislik Günleri (Görevli), Ege Üniversitesi, İzmir, 16 Mart 2014.
- Temel Kök Hücre Eğitim Semineri (Katılımcı), Ege Üniversitesi, İzmir, 25 Ocak 2014.
- Uluslararası Katılımlı 1. Hücre Ölümü Araştırma Kongresi (Katılımcı), Çeşme, 30 Ekim-3 Kasım 2013.
- XIXth International Biomedical Science and Technology Symposium (Katılımcı), Kuşadası, 12-15 Kasım 2013.
- VIth International Bioengineering Congress (Katılımcı), Kuşadası, 12-15 Kasım 2013.
- 10. Biyomühendislik Günleri (Görevli), İzmir, 3-4 Mayıs 2013.
- Uluslararası X. İÜGEN Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu (Katılımcı), İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 8-10 Mart 2013.
- Geleneksel 4. Kök Hücre Sempozyumu (Katılımcı), Ege Üniversitesi, İzmir, 27-29 Nisan 2012.
- Ulusal Calculus Çalıştayı (Katılımcı), Ege Üniversitesi, İzmir, 24-25 Kasım 2011.
- Uluslararası VII. İÜGEN Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu (Katılımcı), Üniversitesi, İstanbul, 2011.