



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KANSER HÜCRELERİNDE ANJİYOGENİK FAKTÖRLERİN
EKSPRESYONUNA KEMOTERAPİNİN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Müge ÖÇAL

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan AKBULUT**

**ANKARA
2017**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KANSER HÜCRELERİNDE ANJİYOGENİK FAKTÖRLERİN
EKSPRESYONUNA KEMOTERAPİNİN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Müge ÖÇAL

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hakan AKBULUT

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
16L0230002 numaralı projesi ve TÜBİTAK 114S496 numaralı projesi ile
desteklenmiştir.**

ANKARA

2017

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Kanser Hücrelerinde Anjiyogenik Faktörlerin Ekspresyonuna Kemoterapinin Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel araştırmalar tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Müge ÖÇAL

Tarih: 18.01.2017

İmza:



Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları Anabilim Dalında Müge ÖÇAL tarafından hazırlanan “Kanser Hücrelerinde Anjiyogenik Faktörlerin Ekspresyonuna Kemoterapinin Etkilerinin İncelenmesi” 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. Ahmet DEMİRKAZIK

Ankara Üniversitesi

Üye

İmza



Prof. Dr. Bülent YALÇIN

Yıldırım Beyazıt Üniversitesi

Üye

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

İmza

Prof. Dr. K. Zafer KARAER

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----------|
| Etik Beyan | ii |
| Kabul ve Onay | iii |
| İçindekiler | iv |
| Önsöz | vi |
| Simgeler ve Kısaltmalar | vii |
| Şekiller | x |
| Çizelgeler | xii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Kanser Epidemiyolojisi | 1 |
| 1.2. Karsinogenez | 2 |
| 1.3. Anjiyogenez | 11 |
| 1.3.1. Anjiyogenez Süreci | 11 |
| 1.3.1.1. Uyarılma | 13 |
| 1.3.1.2. Vazodilatasyon | 14 |
| 1.3.1.3. Bazal Membran ve Ekstraselüler Matriksin Yıkımı | 14 |
| 1.3.1.4. Endotel Hücrelerinin Proliferasyon ve Migrasyonu | 14 |
| 1.3.1.5. Kapiller Kordon Lümen Oluşumu ve Stabilizasyonu | 15 |
| 1.3.2. Anjiyogenez Sürecinde Rol Oynayan Faktörler | 15 |
| 1.3.2.1. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) | 15 |
| 1.3.2.2. Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF) | 16 |
| 1.3.2.3. Platelet Kökenli Büyüme Faktörü - BB (PDGF-BB) | 17 |
| 1.3.2.4. Matriks Metallopeptidaz-9 (MMP-9) | 18 |
| 1.3.2.5. İnterlökin-8 (IL-8) | 19 |
| 1.4. Kanser Tedavisi | 20 |
| 1.5. Amaç | 25 |
| 2. GEREÇ ve YÖNTEM | 26 |
| 2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları | 26 |
| 2.1.1. Tümör Hücreleri | 26 |
| 2.1.2. Sitotoksikite Deneyi | 26 |
| 2.1.3. Belirlenen Dozların Tümör Hücrelerine Uygulanması | 27 |
| 2.2. Moleküler Çalışmalar | 28 |
| 2.2.1. RNA İzolasyonu | 28 |
| 2.2.2. RNA Nicelik ve Nitelik Tayini | 28 |
| 2.2.3. Genomik DNA Eliminasyonu ve cDNA Sentezi | 29 |
| 2.2.4. Primer-Prob Dizaynı | 29 |
| 2.2.5. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu | 30 |
| 2.2.6. Bradford Testi | 30 |
| 2.2.7. Sandviç ELISA Testi | 31 |
| 2.3. İstatistik | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 3. BULGULAR | 32 |
| 3.1. 5-Florourasil, İrinotekan ve Oksaliplatin İlaçlarının In Vitro Sitotoksosite Sonuçları | 32 |
| 3.2. RNA Örneklerinin Saflık ve Konsantrasyonları | 35 |
| 3.3. RNA Nicelik ve Nitelik Tayini | 36 |
| 3.4. Metronomik Dozlarda Kemoterapinin Tümör Hücrelerinde Anjiyogenik Genlerin İfadeleri Üzerindeki Etkileri | 38 |
| 3.4.1. VEGF-A Gen İfadesi | 39 |
| 3.4.2. PDGF-B Gen İfadesi | 41 |
| 3.4.3. bFGF Gen İfadesi | 43 |
| 3.4.4. IL-8 Gen İfadesi | 44 |
| 3.4.5. MMP-9 Gen İfadesi | 46 |
| 3.5. Hücre Besiortamına Salınan Anjiyogenik Faktör Düzeyleri | 48 |
| 3.5.1 VEGF-A Düzeyleri | 48 |
| 3.5.2. PDGF-BB Düzeyleri | 50 |
| 3.5.3. bFGF Düzeyleri | 52 |
| 3.5.4. IL-8 Düzeyleri | 54 |
| 3.5.5. MMP-9 Düzeyleri | 56 |
| 4. TARTIŞMA | 60 |
| 5. SONUÇ ve ÖNERİLER | 64 |
| ÖZET | 65 |
| SUMMARY | 66 |
| KAYNAKLAR | 67 |
| ÖZGEÇMİŞ | 80 |

ÖNSÖZ

Tesadüfen yolumun kesiştiği Tıbbi Onkoloji Bölümü ve çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Hakan AKBULUT'a öncelikle iyi bir bilim insanı olmayı öğrettiği için sonrasında gerek teorik gerekse laboratuvar eğitiminde verdiği desteklerinden ötürü teşekkürlerimi sunarım. Tümör Biyolojisi programında sizin ve bölümümüzün ilk öğrencisi olmaktan gurur duyuyorum.

Yeni açılan bir program olması sebebiyle ders ve tez sürecinde desteklerini esirgemeyen Ankara Üniversitesi Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı ailesine,

Tezimin kantitatif PZR deneyi sürecinde yardımlarından ötürü Sayın Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ ve Sayın Dr. Mohammed Reza DAUTOURI hocalarıma,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca huzurlu bir çalışma ortamı yaratmamızı sağlayan ve her zaman yardımlarıma koşan değerli laboratuvar arkadaşlarım Gizem SONUGÜR, Cansu BABAHAN ve Samira ABDİ ABGARMİ'ye

Yüksek lisans sürecim boyunca hep yanımda olan, karamsarlığa düştüğüm zaman motivasyonumu yükselten canım dostlarım Sevgi KAYNAR, İpek MURATOĞLU, Özlem PARLAR ÜRKER ve Begüm ÖZGENCİL TURSUN'a,

Her zaman yanımda olduğu için, destekleri ve dile getiremediğim birçok şey için sevgili Arınç DEMİRTAŞ'a teşekkür ederim.

Beni her zaman destekleyen maddi yönü bir yana manevi olarak yanımda olan en değerlilerim canım annem ve babama her zaman yanımda oldukları için sonsuz teşekkür ederim.

Beni güçlü ve ayakları üzerinde sağlam duran, açık fikirli ve gelişime açık bir kadın olarak yetiştiren güzel kalpli anneme en büyük destekçim olduğun için bu tez sana ithaf olunur.

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|------------|--|
| °C | Derece celcius |
| λ | Lamda |
| 5-FU | 5-florourasil |
| ACTB | β eta aktin |
| Bcl-2 | B hücre lenfoma 2 |
| bFGF | Bazik fibroblast büyüme faktörü |
| BM | Bazal membran |
| BSA | Sığır serum albumin |
| Cdk | Siklin bağımlı kinaz |
| cDNA | Komplementer DNA |
| C-terminal | Karboksil terminal |
| CXCL8 | C-X-C motif kemokin ligand 8 |
| CXCR1 | C-X-C motif kemokin reseptör 1 |
| CXCR2 | C-X-C motif kemokin reseptör 2 |
| Da | Dalton |
| DACH | 1-2-diaminosislohekzan |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO | Dimetil sülfoksit |
| DNA | Deoksiribo nükleik asit |
| dTMP | Timidin monofosfat |
| dUMP | Deoksiüridin monofosfatı |
| ECM | Ekstraselüler matriks |
| ELISA | Enzim bağımlı immunosorbent deneyi |
| EZ-PZR | Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu |
| FBS | Fetal sığır serumu |
| FDA | Amerikan gıda ve ilaç dairesi |

| | |
|--------------------------------|---|
| FGFR | Fibroblast büyüme faktörü reseptörü |
| FLT1/VEGFR1 | Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 1 |
| FOLFOX | Folinik asit flurourasil oksaliplatin |
| GEL | Jelatinaz |
| HCl | Hidroksi klorür |
| HIF1α | Hipoksi indükleyici faktör 1 alfa |
| HIF2α | Hipoksi indükleyici faktör 2 alfa |
| HRP | Horseradish peroksidaz |
| HT-29 | İnsan kolon adenokarsinom hücre hattı |
| IC50 | Maksimum inhibitör konsantrasyonun yarısı |
| IFNγ | İnterferon gama |
| IL-8 | İnterlökin 8 |
| IR | İrinotekan |
| kDa | Kilo dalton |
| KDR/VEGFR2 | Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 2 |
| KRK | Kolorektal kanser |
| L | Litre |
| LNCaP | İnsan prostat kanser hücre hattı |
| MCF-7 | İnsan Meme Kanseri Hücresi |
| μL | Mikro litre |
| ml | Mililitre |
| MMP | Matriks metallopeptidaz |
| μmol | Mikro mol |
| mRNA | Mesajcı ribo nükleik asit |
| MTT | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide |
| nm | Nanometre |
| NO | Nitrik oksit |
| NRP-1 | Nörofilin |

| | |
|---------------------------------------|---|
| OX | Oksaliplatin |
| PDGF-B | Platelet kökenli büyüme faktörü b |
| PDGFR$\alpha\alpha$ | Platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü alfa alfa |
| PDGFR$\alpha\beta$ | Platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü alfa beta |
| PDGFR$\beta\beta$ | Platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü beta beta |
| PD-L1 | Programlı ölüm ligand 1 |
| pRB | Retinoblastoma proteini |
| PSA | Prostat spesifik antijen |
| RIN | RNA integrity number |
| RNA | Ribo nükleik asit |
| RTK | Reseptör tirozin kinaz |
| RTKI | Reseptör tirozin kinaz inhibitörleri |
| SN-38 | 7-etil-10-hidroksil-kamptotekin |
| TMB | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine |
| TNF-α | Tümör nekroz faktör alfa |
| VEGF-A | Vasküler endotelial büyüme faktörü A |

ŞEKİLLER

| | | |
|--------------------|--|----|
| Şekil 1.1. | Karsinogenez süreci | 4 |
| Şekil 1.2. | Kanserin ayırıcı özellikleri | 4 |
| Şekil 1.3. | Hücre siklusu kontrol noktaları | 6 |
| Şekil 1.4. | Normal hücrenin telomeraz aktivitesi ile kanserli hücreye dönüşümü | 8 |
| Şekil 1.5. | Patolojik anjiyogenez durumları | 12 |
| Şekil 1.6. | Anjiyogenez aktivatörleri ve inhibitörleri | 13 |
| Şekil 1.7. | Kemoterapi ajanlarının etki mekanizmaları | 22 |
| Şekil 3.1. | 5-Fluorourasil ilacının sitotoksosite grafiği | 32 |
| Şekil 3.2. | İrinotekan ilacının sitotoksosite grafiği | 33 |
| Şekil 3.3. | Oksaliplatin ilacının sitotoksosite grafiği | 33 |
| Şekil 3.4. | LNCaP Kontrol RNA bütünlüğü | 37 |
| Şekil 3.5. | HT-29 Kontrol RNA bütünlüğü | 37 |
| Şekil 3.6. | MCF-7 Kontrol RNA bütünlüğü | 38 |
| Şekil 3.7. | Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış LNCaP hücrelerinde VEGF-A ifadesi | 39 |
| Şekil 3.8. | Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış MCF-7 hücrelerinde VEGF-A ifadesi | 40 |
| Şekil 3.9. | Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış HT-29 hücrelerinde VEGF-A ifadesi | 40 |
| Şekil 3.10. | Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış LNCaP hücrelerinde PDGF-B ifadesi | 41 |
| Şekil 3.11. | Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış MCF-7 hücrelerinde PDGF-B ifadesi | 42 |
| Şekil 3.12. | Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış HT-29 hücrelerinde PDGF-B ifadesi | 42 |
| Şekil 3.13. | Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış LNCaP hücrelerinde bFGF ifadesi | 43 |
| Şekil 3.14. | Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış HT-29 hücrelerinde bFGF ifadesi | 44 |
| Şekil 3.15. | Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış LNCaP hücrelerinde IL-8 ifadesi | 45 |
| Şekil 3.16. | Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış MCF-7 hücrelerinde IL-8 ifadesi | 45 |
| Şekil 3.17. | Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış HT-29 hücrelerinde IL-8 ifadesi | 46 |
| Şekil 3.18. | Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış LNCaP hücrelerinde MMP-9 ifadesi | 47 |
| Şekil 3.19. | Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış MCF-7 hücrelerinde MMP-9 ifadesi | 47 |
| Şekil 3.20. | Kemoterapi ilaçlarının LNCaP hücrelerinde VEGF-A düzeylerine etkisi | 49 |
| Şekil 3.21. | Kemoterapi ilaçlarının MCF-7 hücrelerinde VEGF-A düzeylerine etkisi | 49 |

| | |
|---|----|
| Şekil 3.22. Kemoterapi ilaçlarının HT-29 hücrelerinde VEGF-A düzeylerine etkisi | 50 |
| Şekil 3.23. Kemoterapi ilaçlarının LNCaP hücrelerinde PDGF-BB düzeylerine etkisi | 51 |
| Şekil 3.24. Kemoterapi ilaçlarının MCF-7 hücrelerinde PDGF-BB düzeylerine etkisi | 51 |
| Şekil 3.25. Kemoterapi ilaçlarının HT-29 hücrelerinde PDGF-BB düzeylerine etkisi | 52 |
| Şekil 3.26. Kemoterapi ilaçlarının LNCaP hücrelerinde bFGF düzeylerine etkisi | 53 |
| Şekil 3.27. Kemoterapi ilaçlarının MCF-7 hücrelerinde bFGF düzeylerine etkisi | 53 |
| Şekil 3.28. Kemoterapi ilaçlarının HT-29 hücrelerinde bFGF düzeylerine etkisi | 54 |
| Şekil 3.29. Kemoterapi ilaçlarının LNCaP hücrelerinde IL-8 düzeylerine etkisi | 55 |
| Şekil 3.30. Kemoterapi ilaçlarının MCF-7 hücrelerinde IL-8 düzeylerine etkisi | 55 |
| Şekil 3.31. Kemoterapi ilaçlarının HT-29 hücrelerinde IL-8 düzeylerine etkisi | 56 |
| Şekil 3.32. Kemoterapi ilaçlarının LNCaP hücrelerinde MMP-9 düzeylerine etkisi | 57 |
| Şekil 3.33. Kemoterapi ilaçlarının MCF-7 hücrelerinde MMP-9 düzeylerine etkisi | 58 |
| Şekil 3.34. Kemoterapi ilaçlarının HT-29 hücrelerinde MMP-9 düzeylerine etkisi | 58 |

ÇİZELGELER

| | | |
|----------------------|---|----|
| Çizelge 1.1. | 1900-2011 yılları arasındaki her 100 000 popülasyondaki ölüm oranları ve nedenleri | 1 |
| Çizelge 2.1. | Sitotoksikite deneyinde tümör hücrelerine uygulanan ilaç dozları | 27 |
| Çizelge 2.2. | Kullanılan primer-prob setleri | 29 |
| Çizelge 2.3. | EZ-PZR reaksiyonu | 30 |
| Çizelge 3.1. | MTT testi ile belirlenen ilaçların hücrelere göre IC_{50} , $-1\log IC_{50}$, $-2\log IC_{50}$ ve $-3\log IC_{50}$ değerleri | 34 |
| Çizelge 3.2. | LNCaP hücrelerinden izole edilen RNA konsantrasyon ve saflıkları | 35 |
| Çizelge 3.3. | MCF-7 hücrelerinden izole edilen RNA konsantrasyon ve saflıkları | 35 |
| Çizelge 3.4. | HT-29 hücrelerinden izole edilen RNA konsantrasyon ve saflıkları | 36 |
| Çizelge 3.5. | Kemoterapi ilaçları uygulanmış hücrelerin $\Delta\Delta Ct$ metodu ile kontrol gruplarına göre VEGF-A gen düzeyindeki değişimler (Ortalama \pm Standart Hata) | 41 |
| Çizelge 3.6. | Kemoterapi ilaçları uygulanmış hücrelerin $\Delta\Delta Ct$ metodu ile kontrol gruplarına göre PDGF-B gen düzeyindeki değişimler (Ortalama \pm Standart Hata) | 43 |
| Çizelge 3.7. | Kemoterapi ilaçları uygulanmış hücrelerin $\Delta\Delta Ct$ metodu ile kontrol gruplarına göre bFGF gen düzeyindeki değişimler (Ortalama \pm Standart Hata). | 44 |
| Çizelge 3.8. | Kemoterapi ilaçları uygulanmış hücrelerin $\Delta\Delta Ct$ metodu ile kontrol gruplarına göre IL-8 gen düzeyindeki değişimler (Ortalama \pm Standart Hata). | 46 |
| Çizelge 3.9. | Kemoterapi ilaçları uygulanmış hücrelerin $\Delta\Delta Ct$ metodu ile kontrol gruplarına göre MMP-9 gen düzeyindeki değişimler (Ortalama \pm Standart Hata). | 48 |
| Çizelge 3.10. | Kemoterapi ilaçları uygulanmış hücrelerdeki VEGF-A düzeyleri (ng/L.mg protein) (Ortalama \pm Standart Hata). | 50 |
| Çizelge 3.11. | Kemoterapi ilaçları uygulanmış hücrelerdeki PDGF-BB düzeyleri (ng/L.mg protein) (Ortalama \pm Standart Hata). | 52 |
| Çizelge 3.12. | Kemoterapi ilaçları uygulanmış hücrelerdeki bFGF protein düzeyleri (pg/ml.mg protein) (Ortalama \pm Standart Hata). | 54 |
| Çizelge 3.13. | Kemoterapi ilaçları uygulanmış hücrelerdeki IL-8 düzeyleri (ng/L.mg protein) (Ortalama \pm Standart Hata). | 56 |
| Çizelge 3.14. | Kemoterapi ilaçları uygulanmış hücrelerdeki MMP-9 (ng/L.mg protein) (Ortalama \pm Standart Hata). | 59 |

1. GİRİŞ

1.1. Kanser Epidemiyolojisi

Kanser, insidansı ve ölüm oranı günden güne artan bir hastalıktır. 2012 yılı verilerine göre Çizelge 1.1’de gösterildiği gibi kardiyovasküler hastalıklardan sonra kanser, ölüm nedenlerinde ikinci sırada yer almaktadır (Ferlay ve ark., 2015).

Çizelge 1.1. 1900-2011 yılları arasındaki her 100 000 popülasyondaki ölüm oranları ve nedenleri (U.S. Public Health Service, 1900-1970; U.S. National Center for Health Statistics, 1971-2011).

| Yıl | Tüberküloz, tüm formları | Malignant neoplaziler (kanser) | Major kardiyovasküler hastalıklar | Grip ve zatürre | Motorlu taşıt kazaları |
|------|--------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------|------------------------|
| 1900 | 194.4 | 64.0 | 345.2 | 202.2 | - |
| 1910 | 153.8 | 76.2 | 371.9 | 155.9 | 1.8 |
| 1920 | 113.1 | 83.4 | 364.9 | 207.3 | 10.3 |
| 1930 | 71.1 | 97.4 | 414.4 | 102.5 | 26.7 |
| 1940 | 45.9 | 120.3 | 485.7 | 70.3 | 26.2 |
| 1950 | 22.5 | 139.8 | 510.8 | 31.3 | 23.1 |
| 1960 | 6.1 | 149.2 | 521.8 | 37.3 | 21.3 |
| 1970 | 2.6 | 162.8 | 496.0 | 30.9 | 26.9 |
| 1980 | 0.9 | 183.9 | 436.4 | 24.1 | 23.5 |
| 1990 | 0.7 | 203.2 | 368.3 | 32.0 | 18.8 |
| 2000 | 0.3 | 200.5 | 340.4 | 24.3 | 15.2 |
| 2001 | 0.3 | 194.4 | 323.9 | 21.8 | 15.4 |
| 2002 | 0.3 | 193.8 | 318.3 | 22.9 | 15.5 |
| 2003 | 0.2 | 191.5 | 310.3 | 22.4 | 15.4 |
| 2004 | 0.2 | 187.4 | 293.8 | 20.9 | 15.0 |
| 2005 | 0.2 | 188.7 | 288.8 | 21.3 | 15.3 |
| 2011 | 0.2 | 184.6 | 249.8 | 17.2 | 11.1 |

Dünyada kadınlarda en sık görülen ilk üç kanser türü sırasıyla meme, kolorektal ve akciğer iken, erkeklerde akciğer, prostat ve kolorektal kanserlerdir (Ferlay ve ark., 2015). Türkiye de ise durum kadınlarda ilk üç kanser türü için farklılık gösterip, sırasıyla meme, tiroid ve kolorektal; erkeklerde ise dünya geneli ile aynıdır (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2013).

Teşhis edilmiş 1.7 milyon yeni vaka sayısı ile dünya çapında meme kanseri kadınlarda en çok görülen kanser türü olup kadınlardaki tüm yeni kanser vakalarının

%25'ini oluşturur (Ferlay ve ark., 2015). 1975 yılından 2013 yılına kadar yeni vaka sayısında artış olmasına rağmen erken teşhis ve yeni tedavilerin gelişmesi ile ölüm sayısında düşüş görülmektedir (Onur, 2005; Bray ve ark., 2004).

Prostat kanseri, 2012 yılında 1.1 milyon yeni vaka sayısı ile dünya çapında erkeklerde en çok görülen ikinci kanser türüdür (Ferlay ve ark., 2015). İnsidansı bölgelere göre değişiklik gösterir. Kuzey ve Batı Avrupa, Kuzen Amerika, Okyanusya ve bazı Karayip Ada ulusları yüksek insidans gösterirken, Asya'da düşük insidans görülmektedir (Gronberg, 2003). Son 25 yıldan fazladır klinik olarak erken teşhis ile sağkalım oranlarında önemli ölçüde artış olmuştur. İsrail, Kanada, Amerika Birleşik Devletleri, Belçika, Almanya gibi gelir seviyesi yüksek ülkelerde prostat spesifik antijen (PSA) testinin kullanımına bağlı olarak 5 yıllık net sağkalım %90'dan fazla artmıştır (Ferlay ve ark., 2015).

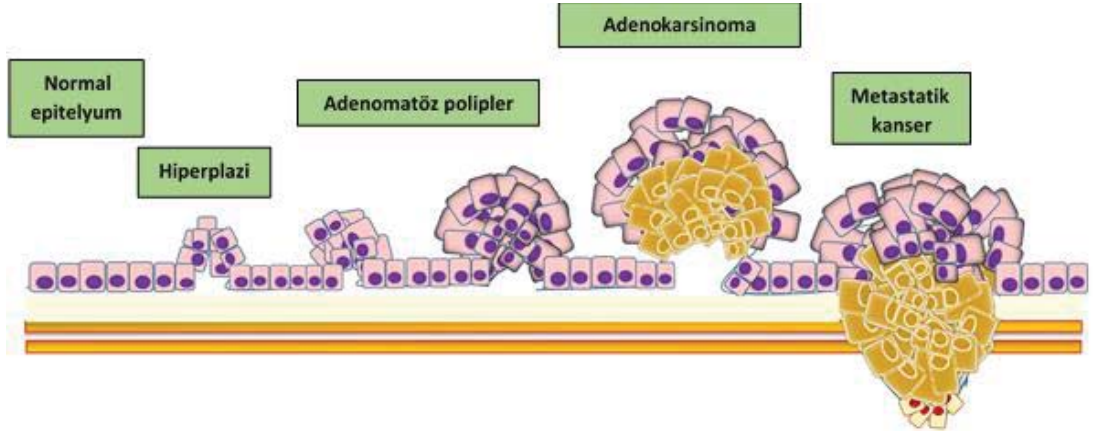
Kolorektal kanser (KRK), 2016 yılına tahmini yeni vaka sayısı 134 490 ile tüm yeni vakalarının %8'lik kısmını oluştururken, tahmini ölüm oranı 49 190 ile kanser nedeniyle gerçekleşen tüm ölümlerin %8,3'ünü oluşturur (National Cancer Institute, Erişim Tarihi: 12.10.2016). KRK hastalarında dünya genelindeki ortalama 5 yıllık sağkalım oranı 1970'li yıllarda %49 civarıyken, 2006-2012 yılları arasında %65'lere yükselmiştir (National Cancer Institute, Erişim Tarihi: 12.10.2016). Sağkalımdaki artışın sebebi, evreleme ve patolojik değerlendirmelerin gelişmesi, yeni cerrahi yöntemlerinin ortaya çıkması ve adjuvan tedavi uygulamalarıdır (Akbulut, 2005).

1.2. Karsinogenez

Kanser, çeşitli mutasyonlar ile hücrelerin kontrolsüz çoğalmasını ve/veya diğer doku ve organları istila etmesini uyaran sinyallerin aktive olması sonucu oluşan genetik bir hastalık olarak tanımlanabilir. Karsinojenlerin etkisiyle anahtar genlerdeki mutasyonların birikmesi, tümör oluşumunu tetikleyen esas güçtür. Her başarılı mutasyon, tümör hücrelerine komşu normal hücrelerinden daha fazla klonal büyümeyi sağlayan avantajlar kazandırır (Nowell, 1976). Normal bir hücrenin kanser

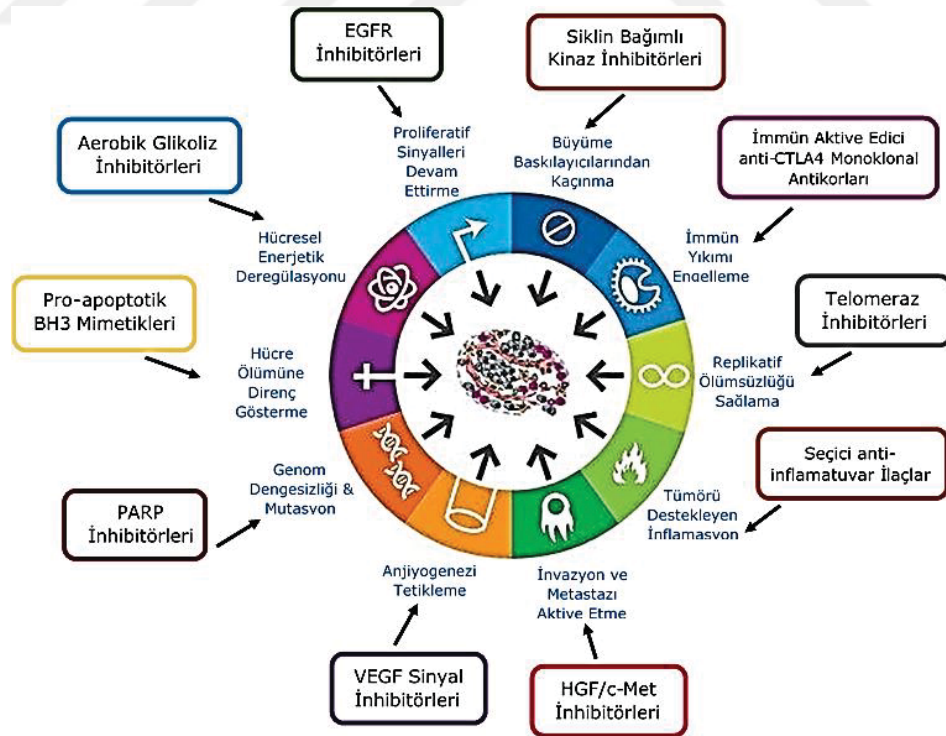
hücrelerine dönüşümü biyolojik, kimyasal ve fiziksel karsinojenlere maruz kalması sonucu kontrolsüz çoğalma kabiliyeti kazanması ile başlar. Viral ajanlar biyolojik karsinojenlerdir. Spesifik viral onkogenlerin ekspresyonu ile viruslar insan karsinogenezine direkt olarak katkı sağlarlar (Hausen, 2009; Butel, 2000; Mesri ve ark., 2014). Hormonlar, yüksek dozda kokanserojenik etki ile tümörlere yol açarlar. Yüksek östrojen salgılayan granuloza hücreli tümörlerin endometriyumda, önce hiperplazi daha sonra kanser gelişimine yol açtığı gösterilmiştir (Ukah ve ark., 2011). Ultraviyole ve iyonize radyasyon fiziksel karsinojenler olup, ultraviyole radyasyona maruz kalan hücre DNA'larında timin dimerleri, tek veya çift iplik kırıkları, proteinlerin DNA ile çapraz bağlanmalarına sebep olurken, iyonize radyasyon sonucu tek veya çift iplik kırıkları, proteinlerin DNA ile çapraz bağlanmaları meydana gelir (Lodish ve ark., 2003). Kimyasal karsinojenler, endüstri sektöründe çalışan işçilerde çeşitli kanserler meydana gelmesi sonucu ortaya çıkmıştır. Sigaranın içerdiği birçok kimyasal karsinojen maddenin de özellikle akciğer kanserine yol açtığı bilinmektedir (Kuper ve ark., 2002; Lipworth ve ark., 2008; Boffetta, 2008; Iodice ve ark., 2008; Vineis ve ark., 2004).

Karsinogenez süreci genel olarak başlama, geliştirme ve ilerletme aşamalarını içerir (Hennings ve ark., 1993). Başlama aşaması, çoğunlukla tek gende bir mutasyonun meydana getirdiği geri döndürülemez genetik değişikliklerden oluşur. Geliştirme, başlangıçta mutasyona uğrayan hücrelerin artmış proliferasyonu ile karakterizedir. İlerleme aşaması ise daha fazla genetik mutasyon birikmesi ile tümör hücrelerinin malignant veya invazif fenotip kazanmalarını sağladığı süreçtir (Devi, 2004).



Şekil 1.1. Karsinogenez süreci (Subramaniam ve ark., 2016)

Normal hücrelerin neoplazmaya daha sonra malignant tümörlere dönüşümü, Şekil 1.2.'de görüldüğü gibi çeşitli moleküler mekanizmalara dayanır (Hanahan ve Weinberg, 2011). Bu moleküler mekanizmalarda rol alan genlerdeki mutasyonların birikmesi sonucunda normal hücreler kanser özelliği kazanır.



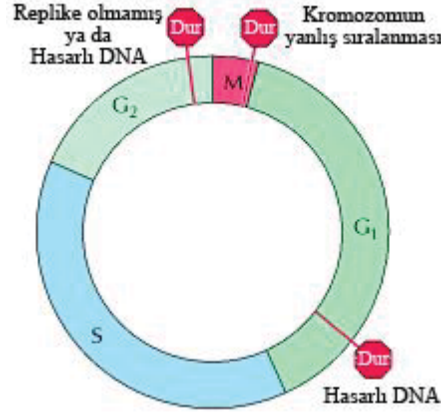
Şekil 1.2. Kanserinin ayırıcı özellikleri (Hanahan ve Weinberg, 2011).

Kanser Hücreleri Proliferasyon Sinyallerini Devam Ettirir: Kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasına fırsat veren sinyaller, tipik olarak hücre içinde genellikle tirozin kinaz domaini içeren hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan büyüme faktörleri tarafından iletilir. Hücre içerisinde bulunan tirozin kinaz domaini ile de hücre büyümesi (hücrenin boyutunun artması) yanı sıra hücre siklusunun ilerlemesini düzenleyen hücre içi sinyal yolları aracılığıyla sinyali iletir. Bu sinyal yolları da genellikle hücre sağkalımı ve enerji metabolizmaları gibi hücrenin diğer biyolojik özelliklerini etkiler (Hanahan ve Weinberg, 2011; Cooper, 2000; Evan ve Vousden, 2001).

Kanser hücreleri çeşitli alternatif yollarla kendi proliferasyon sinyallerini devam ettirebilme kapasitesine sahiptir. (Lemmon ve Schlessinger, 2010; Witsch ve ark., 2010; Hynes ve MacDonald, 2009; Perona, 2006). Tümör hücreleri, büyüme faktörleri ligandları üretir ve bu ligandlar aynı türden reseptörlerin ekspresyonu ile otokrin proliferasyonun uyarılmasına sebep olur. Alternatif olarak, kanser hücreleri, tümör ile ilişkili stroma hücrelerine sinyaller yollayarak kendileri için çeşitli büyüme faktörlerini de sağlayabilir (Bhowmick ve ark., 2004). Kanser hücreleri, yüzeylerinde bulunan reseptör proteinlerin düzeylerini arttırarak ve büyüme faktörü ligandlarının kısıtlı miktarına fazla cevap oluşturarak ligandtan bağımsız uyarılmaya olanak sağlayabilmektedir. Ayrıca reseptör moleküllerinde yapısal değişimlere neden olan mutasyonlar otonomik reseptör sinyalizasyonuna da neden olabilir. Büyüme faktörlerinden bağımsız sinyal yolağı aktivasyonu, sinyalizasyonu başlatacak reseptörlerin sinyal akışının alt tarafında yer alan komponentlerin mutasyona uğrayıp aktive olmasından da kaynaklanabilir (Hanahan ve Weinberg, 2011; Deberardinis ve ark., 2008).

Kanser Hücreleri Çoğalmayı Baskılayan Sinyallerden Kaçar: Normal dokuda, bölünme ve bölünmeyi uyaran sinyaller sıkı bir kontrol altındadır ve hücre döngüsünde yer alan olaylar belli noktalarda denetlenir. Bu kontrol mekanizmaları sayesinde hücre sayısındaki homeostazi ile birlikte normal doku yapısı ve fonksiyonlarının devam ettirilmesi sağlanır (Hartwell ve ark., 1994; Massague, 2004). Kanser hücreleri bu kontrol mekanizmalarının sinyallerini serbestleştirerek

kendi büyüme ve bölünmelerinin kontrolünü ele alırlar (Massague, 2004; Elledge, 1996). Bu kontrol noktaları başlıca G1/S, G2/M ve M/G1 geçişlerinde yer alır (Hartwell ve ark., 1989).

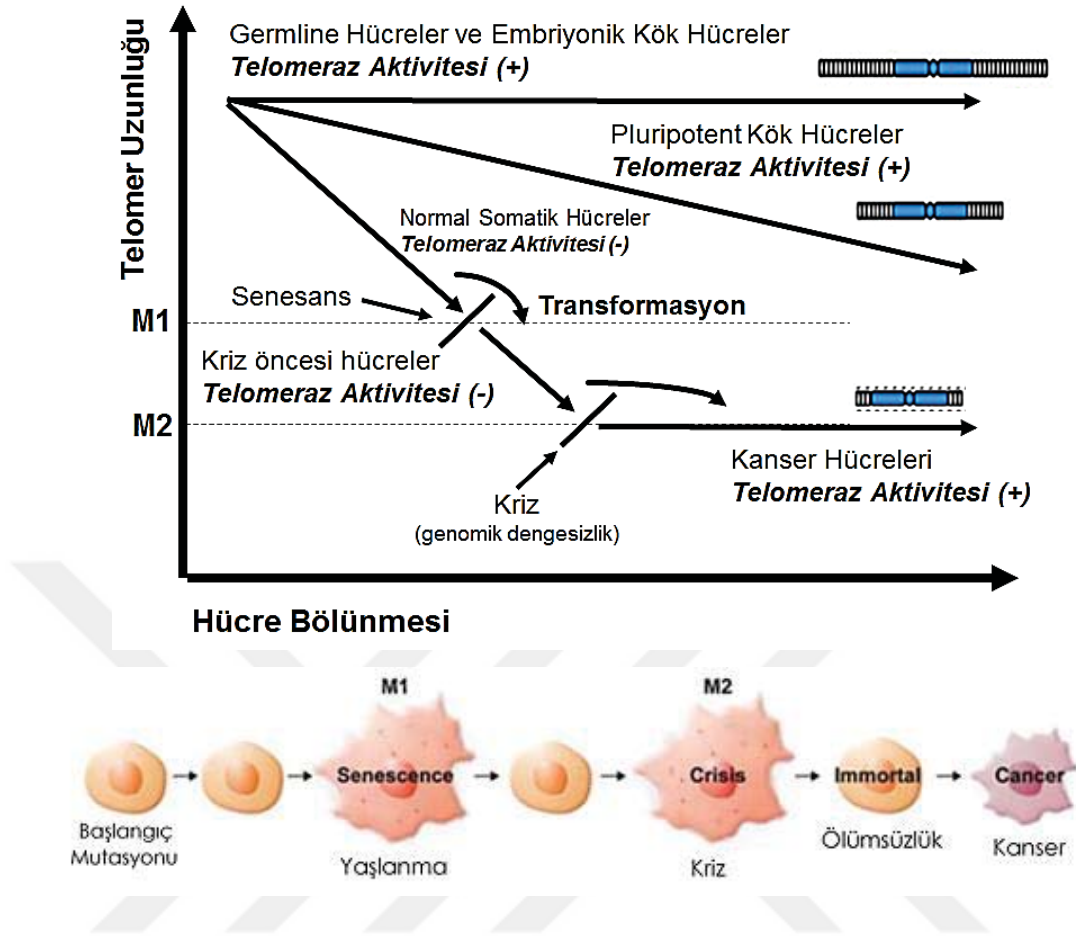


Şekil 1.3. Hücre siklusu kontrol noktaları (Cooper ve Hausman, 2013).

Kanser hücreleri, bazı karsinojenler ile bu döngünün düzenlenmesinde rol alan elemanları veya bunların fonksiyonlarını doğrudan veya diğer bazı genetik yapılar aracılığıyla dolaylı olarak etkileyerek kendi proliferasyonunu yönetebilir. Örneğin malign dönüşümde rol oynayan onkogenlerin bir kısmı siklin bağımlı kinazları (Cdk) ve siklinleri stabilize ederek veya uyararak kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olurken, tümör baskılayıcı genler tarafından kodlanan p21 ve p16 vb. proteinlerde meydana gelen değişiklikler de benzer şekilde karsinogeneze katkıda bulunmaktadır (Deshpande ve ark., 2005). Çoğu insan kanserlerinde hücre siklus gardiyanlarından biri olan p53 tümör baskılayıcı geninin mutasyona uğramış olduğu ve böylece kansere yol açmada önemli rol aldığı birçok çalışma tarafından gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, TP53 geni içermeyen fareler normal bir şekilde gelişimlerini sağlamış, düzgün hücre ve doku homeostazi göstermiş ancak ileri yaşlarda lösemi ve sarkoma şeklinde bozukluklar geliştirmişlerdir (Ghebranius ve Donehower, 1998). G1 fazında, siklusun düzenlenmesinden sorumlu retinoblastoma geninde meydana gelen bozuklukların da genellikle çocuklarda 5 yaşından önce retinada malign tümör gelişimine sebep olduğu bilinmektedir (Ali ve ark., 2010; Lohmann ve Gallie, 2010, Erişim Tarihi: 15.10.2016).

Kanser Hücreleri, Hücre Ölüm Mekanizmalarına Direnç Gösterir: Apoptoz mekanizması, proliferasyon ve hücre ölümü arasındaki dengeyi ayarlayarak doku homeostazisini sağlar. Fakat kanser hücreleri, anti-apoptatik moleküller ile ve/veya pro-apoptatik proteinlerinin bozulmuş veya azalmış fonksiyonları ile hücre ölüm sinyalizasyonunu bloke edebilirler (Fulda, 2008). Örneğin, apoptoz sürecinde önemli olan birçok faktörden biri olan Bcl-2 onkogeni, tümör gelişiminde apoptozun baskılanmasında önemli rol oynar. Bcl-2 onkogeni, hücre proliferasyon kontrolünün de bir parçası olduğu için, bu gende meydana gelen bozukluk hem hücre siklusunun kontrolünde hem de programlı hücre ölümü mekanizmasında bir bozukluğa sebep olarak kanser hücrelerinin sağkalımına yardım eder (Hockenbery ve ark., 1990). Transgenik farelerde yapılan bir çalışmada, Bcl-2 genini yüksek düzeyde ifade eden farelerde lenfoproliferasyon olduğu gösterilmiştir (McDonnell ve ark., 1989). Bunun dışında, apoptozu baskılayan Bcl-x geninin bazı tümörlerde ekspresyonunun arttığı ortaya konulmuştur (Reed, 1998). Apoptozun uyarılmasında görev olan tümör baskılayıcı gen Bax, kolon kanseri ve hemotapoiyetik kanserlerin bazı tiplerinde inaktif olarak tümör gelişimine katkıda bulunur (Rampino ve ark., 1997; Meijerink ve ark., 1998).

Kanser Hücreleri Kendilerine Replikatif Ölümsüzlük Sağlarlar: Replikatif yaşlanma olarak bilinen hücre bölünmesi ile telomer kısalması, organizmaya tümör büyümesi için bir bariyer sağlar. Telomerler, kromozomların uçlarında bulunan, replikasyon sırasında kalıp DNA'dan oluşacak yeni DNA'ların 3' uçlarında kısalma olmaması için bu bölgelere TTAGG nükleotid tekrarları ekleyerek gen kaybının önlenmesini sağlayan mekanizmadır. Hücre bölündükçe tekrar bölgelerinden oluşan telomer bölgeleri de kısalır (Kim ve ark., 1994). Telomerler kritik olarak kısalduğunda, DNA hasar sinyalizasyonu ve hücre yaşlanması uyarılır. Hücrede başka değişiklik yoksa anti-kanser koruma mekanizması olarak yıllarca pasif bir şekilde yaşlılık döneminde kalabilir. Fakat insan karsinom hücreleri, çoğunlukla hücre senesansdan ve DNA hasar sinyal yollarından kurtulurlar (Shay ve Wright, 2011).



Şekil 1.4. Normal hücrenin telomerez aktivitesi ile kanserli hücreye dönüşümü (Shay ve Wright, 2011).

Senesandan kurtulma TP53, p16^{INK4a} ve pRb gibi hücre döngüsünü kontrol eden önemli genlerin ortadan kaldırılması ile gerçekleşir ve sonuçta malign potansiyele sahip hücrelerin çoğalmasına neden olarak hastalık sürecine girer (Wright ve ark., 1989). Kromozom son birleşmelerinden dolayı, genomik dengesizlik, kromozomların yeniden düzenlenmesine ve sonunda telomerazların birleşmesine neden olan kromozom kırılma-füzyon-köprü olayları gerçekleşir (Kim ve ark., 1994). Malign tümörlerin yaklaşık %90'unda telomerez aktivitesi saptanmıştır (Kim ve ark., 1994).

Tümör Hücreleri İnflamasyonu Uyarır: Tümör hücreleri lökositleri etkileyen çeşitli sitokin ve kemokinler salgılayabilir. Gelişen bir neoplazmanın inflamatuvar bileşenleri, nötrofiller, dendritik hücreler, makrofajlar, eozinofiller, mast hücreleri ve lenfositler olabilir. Bu hücreler, sitokinler, reaktif oksijen türevler, serin ve sistein

proteazlar, matriks metalloproteazlar ve membran delici ajanlar içeren sitotoksik araçlar ve TNF- α , interlökinler ve interferonlar gibi çözümler aracılı olarak üreterek tümör gelişimine katkı sağlarlar (Kuper ve ark., 2000; Wahl ve ark., 1998; Coussens ve Werb, 2002).

Kanser Hücreleri Enerji Metabolizmasını Yeniden Programlarlar: Kanser hücreleri, hücre büyümesi ve bölünmesinde kullanmak üzere enerji metabolizmalarında düzenlemeler yaparlar. Normal hücreler oksijenli koşullarda ilk olarak glikoliz yoluyla sitoplazmada glukozu piruvata ve ondan sonra mitokondride karbon dioksit döndürürler. Oksijensiz koşullarda ise, glikoliz tercih edilir ve görece az piruvat, oksijen tüketen mitokondriye gönderilir (Nelson ve Cox, 2008). Tümör hücrelerinde gözlenen tanımlanmış en iyi metabolik fenotip Warburg etkisidir. Kanser hücreleri, ortamda oksijen konsantrasyonu normal olsa bile, glukoz metabolizmalarını yeniden programlayabilirler ve böylece glikoliz ile enerji metabolizmalarını kısıtlayarak enerji üretimlerini “oksijenli glikoliz” adı verilen bir aşamada tutabilirler (Warburg ve ark., 1927; Warburg, 1956). Dönüşüm geçirmiş bu hücreler çoğu normal hücrenin aksine enerjilerinin çoğunu, glukozu laktata döndürerek elde eder (Warburg, 1956). Glikoliz, oksidatif fosforilasyona göre daha hızlı ATP üretimi yapar ancak, her bir ünite glukozun tüketimi ile üretilen ATP açısından yeterli değildir. Tümör hücreleri artan enerji, biyosentez ve redoks ihtiyaçlarını anormal derecede yüksek oranda glukoz alımı ile gerçekleştirirler (Warburg, 1956; Semenza ve ark., 2001).

Kanser Hücreleri İmmün Sistemden Kaçar: Kanser hücreleri, düşük düzeyde immunojenite göstererek, antijen değişimi yaparak, kendileri veya düzenleyici T hücreleri aracılığıyla immün baskılamayı tetikleyerek ya da lenfositlerin apoptoza gitmesini sağlayarak immün yanıtı kurtulmaya çalışırlar (Beatty ve Gladney, 2015). Bu mekanizmalara örnek olarak, tümörde infiltre olmuş lenfositler tarafından üretilen IFN γ , malignan hücrelerin üzerinde immün sistemi inhibe eden PD-L1 molekülünün upregüle olmasını indükleyebilir (Taube ve ark., 2012).

Kanser Hücreleri Anjiyogenez Mekanizmalarını Uyarır: Normal dokularda olduğu gibi tümörler de besin ve oksijen gereksiniminin giderilmesi, metabolik atık ve karbon dioksitin uzaklaştırılmasına ihtiyaç duyarlar. Tümörler genellikle 1–2 mm³ hacme kadar difüzyon ile beslenerek büyüebilirler (Muthukkaruppan ve ark., 1982). Ancak daha fazla büyüebilmeleri, tümörün iç kısmında kalan hücrelere oksijen ve besin gitmesi için kan damarları oluşmasını gerektirir, bu da hastalığın progresif seyretmesine neden olur. Anjiyogenez dönüşümü olarak bilinen bu süreç, tümör hücrelerinden veya tümör hücrelerinin mikroçevredeki diğer hücreleri etkilemesi ile anjiyogenezde anahtar rol oynayan vasküler endotelial büyüme faktörü-A (VEGF-A) molekülünü salgılanması ile gerçekleşir. VEGF-A ekspresyonunun artması, hipoksik ortam veya onkogenler tarafından indüklenebilir (Ferrara, 2009; Mac Gabhann ve Popel, 2008; Carmeliet, 2005). Yapılan birçok çalışmada tümörlerin büyümesi ve yayılmasında anjiyogenez aktivatörlerinin önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Salven ve arkadaşlarının (1998), yaptığı immunohistokimyasal deneyde, VEGF ailesi ve reseptörlerinin insan kanserlerinin yaklaşık olarak yarısında eksprese olduğunu saptamışlardır. Daha sonra bu faktörlerin rahim (Hashimoto ve ark., 2001), endometrium (Hirai ve ark., 2001), ovaryum (Boocook ve ark., 1995; Yokoyama ve ark., 2003; Nishida ve ark., 2004) ve mide (Yonemura ve ark., 1999; Amioka ve ark., 2002) kanserlerinde de prognostik olduğu ortaya konmuştur.

Kanser Hücreleri İnvazyon ve Metastazı Uyarır: İnvazyon ve metastaz çok basamaklı bir süreçtir ve genellikle kanser hastalığının son aşaması olma özelliği ile ilişkilendirilir. İnvazyon ve metastaz kaskadı, tümör bölgesinde bulunan ekstraselüler matriksin yıkımı ile lokal invazyon olarak başlar, sonrasında kan ve lenfatik damarlara intravazasyon yaparak lenfatik ve hematojenik sistemlere giriş yapar. Dolaşımdan kurtulan kanser hücreleri uygun bir bölge bulduğunda dokuların parankiması içindeki damarların lümeninden ekstravazasyon yaparak bu bölgede küçük nodüller (mikrometastaz) oluştururlar. Son olarak mikrometastatik lezyonların büyümesi ile kolonizasyon gerçekleşir (Talmadge ve Fidler, 2010; Fidler, 2003). Metastaz sürecinde önemli bir mekanizma olan epitelyal mezankimal geçişin, kanser hücrelerinin epitelyal morfolojisinin fibroblastik yapıya dönüşerek invazyon ve intravazasyon aşamalarında kolay ilerlemeyi sağlayacağı ve böylece metastazı

kolaylaştırdığı bilinmektedir (Kylmkowsky ve Savagner, 2009; Polyak ve Weinberg, 2009; Thierry ve ark., 2009, Yılmaz ve Christofori, 2009; Barrallo-Gimeno ve Nieto, 2005).

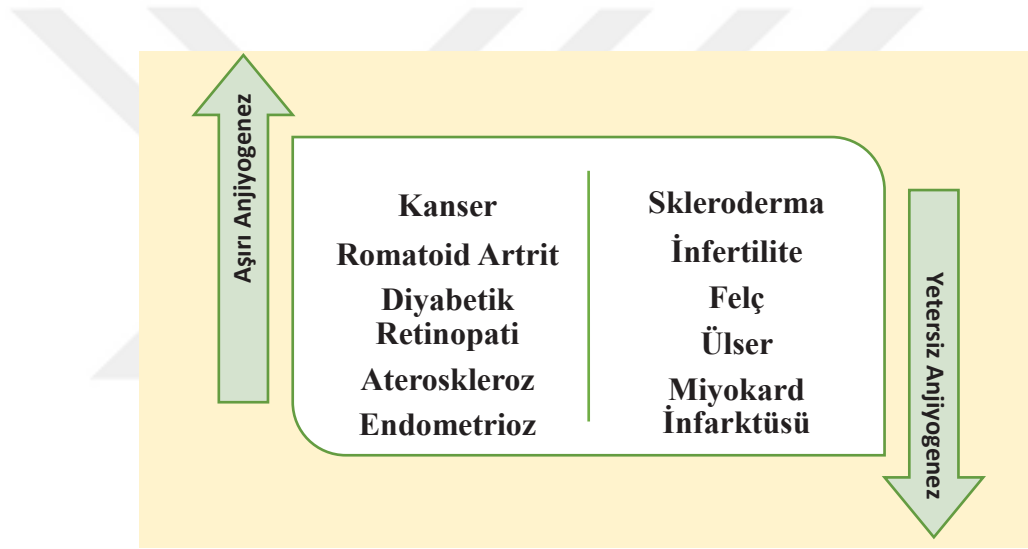
1.3. Anjiyogenez

Anjiyogenez, mevcut vasküler damarlardan yeni kan damarlarının oluşmasıdır (Kut ve ark., 2007; Larsson ve ark., 2002; ve Gozdzikiewicz, 2008). Solid tümörlerde anjiyogenezin önemi ilk kez 1971 yılında Folkman ve arkadaşlarının tümör büyümesinin anjiyogeneze bağlı olduğu hipotezi ile ortaya konmuştur (Folkman, 1971).

1.3.1. Anjiyogenez Süreci

Vücudumuzdaki kan damarları vaskülogenez ve anjiyogenez yolları ile oluşmaktadır. Vaskülogenez, endotel hücre prekürsörleri olan anjiyoblastların çoğalıp birleşerek öncül damar yapıları olan primer kapiller pleksusunu oluşturması olarak tanımlanır. Daha sonra primer kapiller pleksustan anjiyogenez ile yeni damar yapıları filizlenir ve dallanır (Carmeliet, 2003). Vaskülogenez, embriyo gelişimi için hayati önem taşıyan bir süreçtir. Gelişimin ilk haftalarında çevre dokudan difüzyon ile beslenen embriyo, büyüdükçe artan besin ve oksijen talebini karşılayamaz ve bu nedenle erken dönemde (üçüncü haftanın başında) anjiyogenez uyarılır (Ribatti, 2004).

Yetişkinde ise anjiyogenez menstrüel siklus boyunca endometriyumda ve dokularda yara iyileşmesi süreçleri dışında genellikle inaktif durumdadır (Daly ve ark.,2003). Bununla birlikte anjiyogenez tetikleyen ve önleyen faktörler arasındaki denge bozulduğu takdirde dokularda anjiyogenezde eksiklik veya fazlalık görülebilir (Carmeliet, 2003). Örneğin kanserlerde, romatoid artrit, inflamatuvar bağırsak hastalıkları gibi inflamatuvar hastalıklarda, maküler dejenerasyon gibi değişik göz hastalıklarında patolojik olarak artmış anjiyogenez izlenir. Buna karşılık periferik arter hastalıkları, kalp yetmezliği, infertilite ve gecikmiş yara iyileşmesi gibi durumlarda ise anjiyogenezde yetersizlikler saptanmıştır (Li ve ark., 2008; Chung ve Ferrara, 2011).

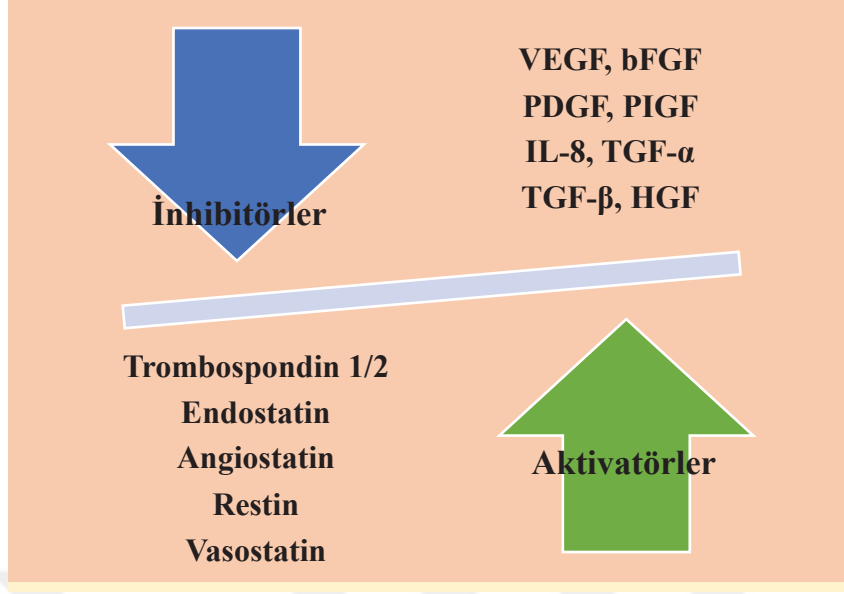


Şekil 1.5. Patolojik anjiyogenez durumları¹

Fizyolojik anjiyogenez ve patolojik anjiyogenez sonucu oluşan damarların yapılarında farklılıklar mevcuttur. Patolojik anjiyogenez ile oluşan kan damarlarında lümen başına düşen endotel sayısında fazlalık izlenirken, sızıntılı, kıvrımlı ve düzensiz bir lümen yapısı göze çarpar (Carmeliet ve Jain, 2011).

Anjiyogenez süreci ile kan damarlarının oluşması anjiyogenik dönüşüm adı verilen anjiyogenez aktivatörleri ve inhibitörleri arasındaki denge ile düzenlenir (Liao ve ark., 2007; Maharaj ve ark., 2006).

¹ Görsel örnekler tarafımızdan düzenlenmiştir.



Şekil 1.6. Anjiyogenez aktivatörleri ve inhibitörleri²

Anjiyogenik dönüşümün önemli düzenleyicisi olan hipoksi, düşük pH, hipoglisemi, inflamasyon, onkogen aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin delesyonu tümör dokularında anjiyogenezi indükleyen etmenler arasında önemli yer tutar (Fidler ve ark., 2001).

Anjiyogenez süreci endotel hücrelerinin uyarılması, mevcut damarların vazodilatasyonu, bazal membran ve ekstraselüler matriksin yıkılması, endotel hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonu, kapiller kordon ve lümen oluşumu ve stabilizasyon basamaklarını içerir (Adair ve Montani, 2010).

1.3.1.1. Uyarılma

Yeterli perfuzyon olan bir dokuda, hipoksi tarafından indüklenen faktörler (HIF) hidroksillenir. Hidroksillenmiş HIF, proteazlar tarafından degradasyon için hedef haline gelirler. Aksine hipoksik ortamdaki endotel hücrelerindeki HIF2 α transkripsiyon faktörü degrade edilemediği için NO, VEGF-A, bFGF gibi

² Görsel örnekler tarafımızdan düzenlenmiştir.

anjyogenezi uyaran genlerin ifadesini tetikler. Bu genlerin sentezlediği faktörler anjyogenez sürecini uyarır (Liao ve Johnson, 2007; Krock ve ark., 2011).

1.3.1.2. Vazodilatasyon

Mevcut kan damarları, VEGF ve nitrik oksit ile uyarıldığında genişler. VEGF, vasküler geçirgenliği de arttırarak vazodilatasyona katkıda bulunur. Vasküler geçirgenliğin artışıyla VEGF ve plazma proteinleri damar dışına çıkar ve endotel hücrelerin göçü için gerekli ekstraselüler matriksin oluşumu sağlanır (Liao ve ark., 2007; Maharaj ve ark., 2006).

1.3.1.3. Bazal Membran ve Ekstraselüler Matriksin Yıkımı

Matriks metallopeptidaz (MMP) adı verilen enzimlerle ekstraselüler matriks proteinleri degrades edilir, dolayısıyla damar stabilizasyonu bozulur ve endotel hücreleri, hücre-hücre temaslarını kaybeder ve onları destekleyen perisit ve düz kas hücrelerinden ayrılırlar. Özellikle MMP-9 ve MMP-2 tarafından ekstraselüler matriksin parçalanması ile ortaya çıkan boşluklarda endotel hücrelerinin göç edebilmesi için alan açılmış olur (Donati ve Gozdzikiewicz, 2008; Liao ve ark., 2007).

1.3.1.4. Endotel Hücrelerinin Proliferasyon ve Migrasyonu

Ekstraselüler matriks (ECM) ve bazal membran (BM) yıkımını takiben bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve platelet kökenli büyüme faktörü-BB (PDGF-BB), interlökin-8 (IL-8) ve VEGF-A gibi faktörlerin etkisi ile endotel hücreler çoğalır ve lümeni oluşturmak için uzak bölgelere doğru hareket ederler. (Liao ve ark., 2007).

1.3.1.5. Kapiller Kordon Lümen Oluşumu ve Stabilizasyonu

Endotel hücrelerinin proliferasyon olarak anjiyogenez uyaranlarının geldiği bölgeye doğru göçü ile kapiller kordonlar oluşur ve daha sonra bu kordonların ortasında boşluklar (lümen) açılır. Lümen oluşuktan sonra yeni oluşturulan kan damarları çevresinde bazal lamina birikir, ortama çekilen perisitler olgunlaşır ve endotel hücreler ile birlik sağlanarak damar yapısı stabil hale getirilir (Liao ve ark., 2007; Carmeliet ve Jain, 2011).

1.3.2. Anjiyogenez Sürecinde Rol Oynayan Faktörler

Çeşitli anjiyogenik faktörler kimyasal olarak anjiyogenez uyarırlar. VEGF sürecin esas elemanıdır ve ortama diğer anjiyogenik faktörleri çağırır, endotel hücrelerin proliferasyonunu uyarır ve damar geçirgenliği artırır (Goto ve ark., 1993; Cross ve Claesson-Welsh, 2001). FGF-2, anjiyogeneze endotel hücrelerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyarır (Goto ve ark., 1993; Cross ve Claesson-Welsh, 2001). PDGF-BB homodimer molekülü ise düz kas hücrelerini anjiyogenez bölgesine toplar (Battagay ve ark., 1994). MMP molekülleri, damar duvarlarındaki proteinleri degrade ederek endotel hücrelerin anjiyogenez dallanmasını gerçekleştirmelerini sağlar (Rundhaug, 2005). IL-8 sitokini ise bu sürece matris metalloproteaz üretimi sağlayarak katkıda bulunur (Li ve ark., 2003).

1.3.2.1. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

Platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ailesi üyesi olan VEGF geni, VEGF-A, MVCD1, VPF isimleri ile de literatürde yer alır. 9 ekzona sahiptir ve insanda 6. kromozomun p21.1 lokusunda bulunur. VEGF geni, disülfid bağlanmış homodimer olarak bulunan, heparin bağlayan \pm 45 kDa protein kodlar. Alternatif uçbirleştirme mekanizması ile transkript varyantlarından farklı izoformlar oluşur (Wynendaele ve ark., 1999; Stefanini ve

ark., 2008). FLT1/VEGFR1 ve KDR/VEGFR2 reseptörleri, heparan sülfat ve heparine bağlanarak sinyalizasyonu başlatırlar. VEGF-165 ve VEGF-145 izoformları nörofiline (NRP1) bağlanırken, VEGF-165B izoformu KDR reseptörüne bağlanır ancak sinyal yolağını aktive edemez. Kodlanan büyüme faktörü, vasküler endotelial hücrelerin proliferasyonunu ve migrasyonunu indükler (Kut ve ark., 2007).

İnsan kolon kanseri fare modelinde karaciğer metastazının VEGF-A aracılığıyla düzenlendiği gösterilmiştir (Warren ve ark., 1995). Daha sonra yapılan çoğu çalışma ile VEGF molekülünün kolon, meme ve prostat kanserlerinin anjiyogenezinde önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Ellis ve ark., 2000; Bendardaf ve ark., 2008; George ve ark., 2001; Weidner ve ark., 1991; Vartanian ve Weidner, 1994; Ferrer ve ark., 1997; Jackson ve ark., 1997).

1.3.2.2. Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF)

Fibroblast büyüme faktörü gen ailesi tarafından kodlanan bir proteindir. Normal dokularda, kan damarlarının bazal membranı ve subendotelial ekstraselüler matriksinde bulunur. Bir uyarı olmadığında membrana heparin aracılığıyla bağlı olarak durur (Ornitz ve Itoh, 2001). Gelişimsel süreçte uvuz ve sinir sistemi gelişimi veya doku yaralanması veya tümör gelişimi gibi durumlarda heparan sülfat degrade edici enzimler ile aktif hale gelir ve anjiyogenez sürecine aracılık eder (Mori ve ark., 2013; Ornitz ve ark., 1996). bFGF (FGF-2) geni insanda 4. kromozomun q28.1 lokusunda yer alır ve 3 ekzonu vardır. Çok sayıda poliadenilasyon bölgesi bulunduran mRNA içerir ve AUG olmayan (CUG) ve AUG başlama kodonlarından alternatif olarak translasyon geçirir. Sonuçta oluşan 5 farklı izoform, değişik özellikler gösterir. CUG ile başlayan izoformlar çekirdekte lokalize olurlar ve hücre içinde etki gösterirler. AUG ile başlayan form ise çoğunlukla sitosoliktir ve parakrin ve otokrin etkilidir (Powers ve ark., 2000; Ornitz ve Itoh, 2015). bFGF, heparan sülfat glikozaminoglikan ko-reseptörü tarafından fibroblast büyüme faktörü reseptör 1 (FGFR1), FGFR2, FGFR3 ve FGFR4 ile interaksiyona girer (Couatts ve Gallagher, 1995; Ornitz ve ark., 1996).

Kolorektal kanserli hastalarda bFGF düzeyinin yüksek olmasının kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Kos ve Dabrowski, 2002). Ancak hastalığın anjiyogenez ile ilişkili net bir şekilde ortaya konmamıştır.

İleri evre meme kanserinde anjiyogenez sürecinde VEGF-A gibi moleküllerle beraber sürece katıldıkları gösterilmiştir (De Jong ve ark., 1998). Hatta yapılan bir çalışmada, insan meme tümörü belli bir boyuta ulaştığında VEGF molekülünden bağımsız olarak yüksek bFGF düzeyde eksprese ettiği saptanmıştır (Yoshiji ve ark., 1997). Yapılan başka bir çalışmada, hastaliksız sağkalım gösteren meme kanseri hastalarının düşük düzeyde bFGF eksprese ettikleri bulunmuş ve meme karsinoması için prognostik biyobelirteç olabileceği düşünülmüştür (Rykala ve ark., 2011; Colomer ve ark., 1997).

Yapılan ELIZA deneylerinde normal prostat dokusuna göre lokalize kanserli dokuda bFGF konsantrasyonunun önemli ölçüde (yaklaşık 2-5 kat) arttığı gösterilmiştir (Giri ve ark., 1999). Genellikle metastatik prostat kanserlerde yüksek bFGF düzeyi saptanmıştır ve tümör anjiyogenezinde rol aldığı düşünülmektedir (Cronauer ve ark., 1997; Kwabi-Addo ve ark., 2004).

1.3.2.3. Platelet Kökenli Büyüme Faktörü - BB (PDGF-BB)

İnsanda 22. kromozomun q13.1 lokusunda bulunan VEGF ve PDGF ailesi tarafından kodlanan PDGF-B, 13 ekzon içerir ve 241 amino asitten oluşan 27288 Da ağırlığında bir peptid kodlar. PDGF-B, homodimer olarak ya da PDGF-A ile heterodimer olarak bulunabilir ve birbirlerine disülfid bağları ile bağlanırlar (Heldin ve Lennartsson, 2013; Bowen-Pope ve Raines, 2011). Tirozin kinaz reseptörü PDGFR $\alpha\alpha$, PDGFR $\alpha\beta$, PDGF $\beta\beta$ 'ya bağlanarak embriyonik gelişim, hücre proliferasyonu, hücre migrasyonu, sağkalımı ve kemotaksisin düzenlenmesinde görev alır. Özellikle PDGF β reseptörü aracılığıyla endotel hücrelerin proliferasyonunu ve anjiyogenezini düzenlediği gösterilmiştir (Battagay ve ark., 1994). Perisitlerin ve vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve ortama

toplanmasında gerekli bir faktördür (Westermarck ve Heldin, 1993; Andrae ve ark., 2008). Yapılan bir çalışmada, FGF-2 ile PDGF-BB faktörlerinin sinerjik olarak fare tümör neovaskülarizasyon ve metastazını uyardığı gösterilmiştir (Nissen ve ark., 2007).

Glioblastoma hastalarında PDGF-B'nin patolojik olarak endotel hücrelerinde otokrin büyümeyi indüklediği bildirilmiştir (Hermansson ve ark., 1998). Kolorektal kanser çalışmalarında, PDGF-BB molekülünü yüksek düzeyde ifade eden hastaların, normal düzeyde ifade edenlere göre vasküler invazyon insidansının yüksek ve sağkalım oranlarının daha düşük olduğu rapor edilmiştir (Nakamura ve ark., 2008). Prostat kanserinde PDGF-BB'nin, mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonunu tetikleyerek kanser büyümesini hızlandırdığı gösterilmiştir (Cheng ve ark., 2013). Meme kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada ise hipoksi indükleyici faktör-1 α ile ilişkili anjiyogenezde bFGF, EGFR ile birlikte PDGF-BB ekspresyonun da arttığı ortaya konmuştur (Bos ve ark., 2005).

1.3.2.4. Matriks Metallopeptidaz-9 (MMP-9)

Matriks metallopeptidazlar, çinko-metalloproteaz ailesine ait 92 kDa tip IV kollajenaz, 92 kDa jelatinaz veya jelatinaz B (GELB) olarak da bilinen enzimlerdir. İnsanda 20. kromozomun q13.12 bölgesinde bulunan ve 13 ekzona sahip olan MMP-9 geni, bir sinyal peptidi, bir propeptid, C-terminal hemopeksine benzeyen domain ve 3 fibronektin tip II domain tekrarı bulunan bir katalitik domain kodlar (Nagase ve Woessner, 1999). Öncelikle 707 aminoasitlik bir prepro-enzim sentezlenir. Daha sonra aktif MMP-3 enzimi ile 92 kDa pro-MMP-9 proteinini keserek enzimatik olarak aktif 82 kDa MMP-9 enzimini oluşturur (Ramos-DeSimone ve ark., 1999). MMP ailesi fizyolojik olarak ekstraselüler matriksi degrades ederek embriyonik gelişim, anjiyogenez, kemik gelişimi, yara iyileşmesi, hücre migrasyonu, öğrenme ve hafıza süreçlerine katılmalarının yanı sıra patolojik olarak kanser metastazı, artrit gibi durumlarda da rol oynar (Van ve ark., 2013). MMP-9 enziminin, anjiyogenez ve neovaskülarizasyonda rol aldığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Örneğin, malign

glioma neovaskularizasyonunun yeniden düzenlenmesinde yer aldığı gösterilmiştir (Forsyth ve ark., 1999). Bunu dışında, tümör mikroçevresinden salgılanan ve tümör hücreleri arasındaki matriks elemanlarınca bağlanmış olan VEGF’i serbest bırakarak anjiyogenezi destekler (Bergers ve ark., 2010; Kessenbrck ve ark., 2010). MMP-9 ayrıca matriksi parçaladığı için açılan boşluklarda endotel hücrelerinin yeni damar tomurcukları ve kapiller tüpleri oluşturmasını da kolaylaştırır (Nakumara ve ark., 2007). MMP-9 inhibitörleri ile yapılan bir çalışmada tümördeki anjiyogenez geçişinin zayıfladığını ve tümör sayı ve büyümesinin azaldığı gösterilmiştir (London ve ark., 2003).

MMP-9 enziminin yüksek düzeyde ifade olmasının kolorektal kanserde lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu ve kötü prognostik bir belirteç olabileceği ortaya konmuştur (Yang ve ark., 2014; Said ve ark., 2014). Ayrıca primer insan meme kanserinin invazyon ve metastazı için potansiyel bir biyobelirteç olduğu gösterilmiştir ((Wu ve ark., 2008; Nanda ve ark., 2013; Merdad ve ark., 2014). İnsan prostat kanseri hücre hattı (LNCaP) ile yapılan bir çalışmada, MMP-9 ekspresyonunun yüksek olmasının invazyonu kolaylaştırdığı ortaya konulmuştur (Aalinkeel ve ark., 2011). Prostat kanseri hastalarında yapılan çalışmalar da in vitro sonuçları desteklemektedir (Schweigert ve ark., 2013; Morgia ve ark., 2005).

1.3.2.5. İnterlökin-8 (IL-8)

C-X-C motif kemokin ligand 8 (CXCL8) olarak da bilinen IL-8 geni, CXC kemokin ailesinin bir üyesidir. İnsanda 4. kromozom üzerinde q13.3 lokusunda bulunur ve 4 ekzona sahiptir. İlk olarak 99 amino asitlik bir öncü protein sentezlenir ve daha sonra kesilerek aktif IL-8 izoformları oluşturulur (Hebert ve Baker, 1993). IL-8 çoğunlukla, hücre yüzeyinde bulunan G-protein bağlı serpantin reseptörleri CXCR1 ve CXCR2’ye bağlanır ve CXCR1 reseptörüne affinitesi daha yüksektir (Russo ve ark., 2014). IL-8, nötrofil, bazofil ve T hücreleri için kemoatraktan faktördür. Epitelyal hücreler, solunum yolunda bulunan düz kas hücreleri, endotelyal hücreler ve makrofajlar gibi birçok hücre tipinden inflamatuvar tetikleyici ajan

olarak salınır. Nötrofil aktivasyonunda ve endotel hücrelere proliferasyon, sağkalım ve matriks metalloproteaz üretimi sağlayarak anjiyogenez sürecinde de görev alır (Baggiolini ve Clark-Lewis, 1992; Li ve ark., 2003; Szekanecz ve ark., 1994).

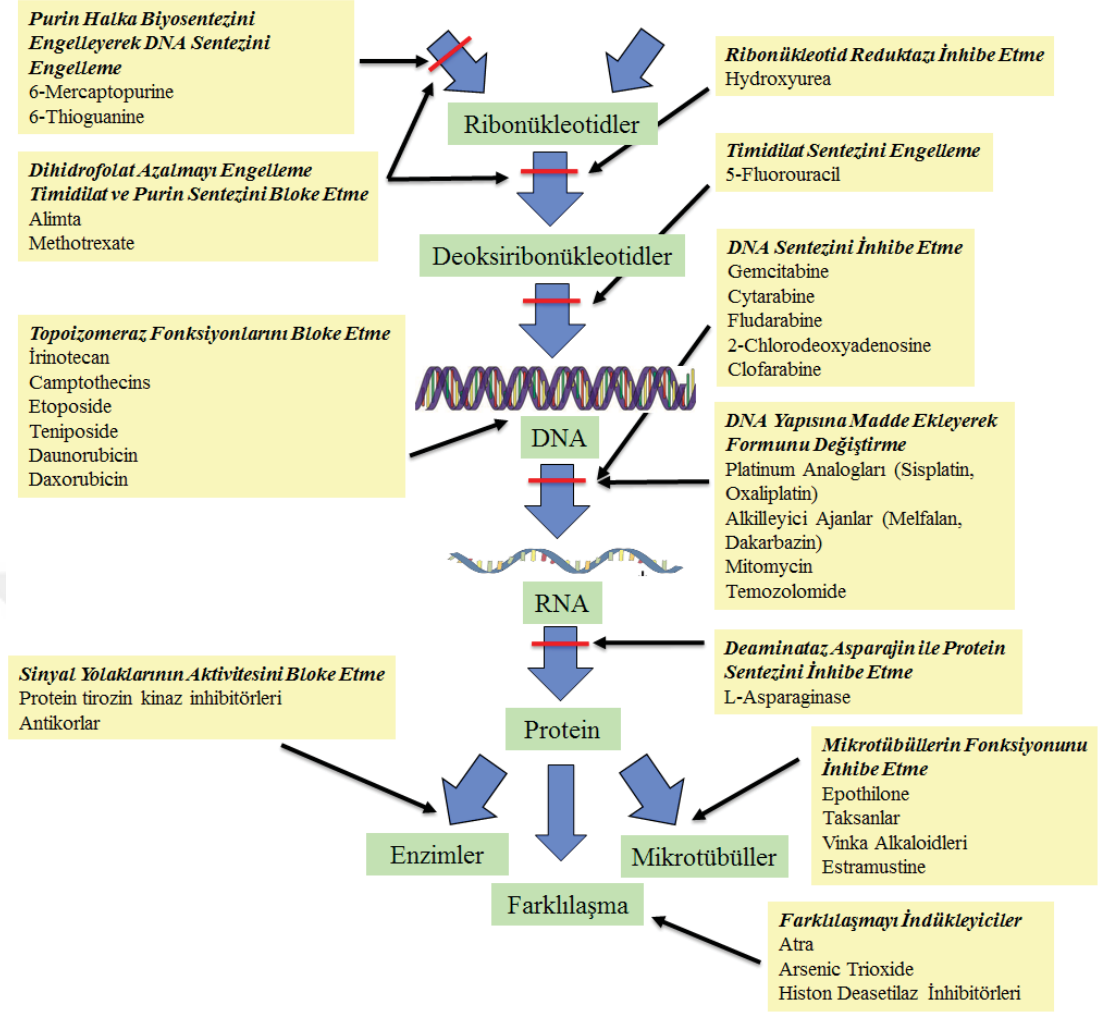
Kanser anjiyogenezinde IL-8 molekülünün rolü birçok çalışmayla ortaya konmuştur (Brat ve ark., 2005; Waugh ve Wilson, 2008). Kolon kanserlerinde otokrin büyüme faktörü olarak (Brew ve ark., 2000) ve metalloproteinaz moleküllerinin aktivasyonu için kesim sürecine katılarak hücrelerin bölünme ve migrasyonunu tetiklediği (Itoh ve ark., 2005) belirtilmiştir. Farelerde yapılan bir çalışmada, IL-8'in prostat kanser hücrelerinin anjiyogenez ve metastazı ile ilişkisi bulunmuştur (Kim ve ark., 2001). Meme kanserli hastalardan alınan doku ve kan serumları ile yapılan çalışmalarda IL-8 ile meme kanseri progresyonun ilişkili olabileceği ve prognoz için bir marker olarak kullanılabilceği gösterilmiştir (Todorovic-Rakovic ve Milovanovic, 2013, Zuccari ve ark., 2012; Snoussi ve ark., 2010; Benoy ve ark., 2004; Kozlowski ve ark., 2003).

1.4. Kanser Tedavisi

Kanser tedavisinde geleneksel olarak cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi olmak üzere 3 tedavi yöntemi vardır. Bu tedavilere ek olarak hormon tedavisi ve hedefe yönelik tedaviler (immünoterapi ve monoklonal antikor tedavileri) son yıllarda rutin kullanıma girmiştir (NCCN Clinical Practice Guidelines, Erişim Tarihi: 05.11.2016; ESMO Clinical Practice Guidelines, Erişim Tarihi: 07.11.2016; Stewart, 2005). Erken evrelerde tanı konulan kanserli hastalarda esas tedavi seçeneği cerrahi olup bu tedavi yöntemi ile kanser türüne göre hastaların %20-100'inde şifa sağlanabilirken, hastalığın bölgesel olarak yayıldığı lokal ileri evrelerdeki hastalarda radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi kombinasyonları ile bu oranlar %0-20 arasında olabilmektedir (Akbulut, 2005). İleri evrelerdeki hastalarda ise ne yazık ki, mevcut tedavi seçenekleri ile şifa sağlamak hemen hemen mümkün olamamaktadır. İleri evrelerdeki hastalarda cerrahi ve radyoterapinin yeri son derece sınırlı iken esas tedavi seçeneğini sistemik bir tedavi yöntemi olan kemoterapi oluşturmaktadır

(Corrie ve Pippa, 2008). Kemoterapi sadece tümör hücrelerine spesifik olmayıp normal hücrelere de zarar vermesi nedeniyle ciddi yan etkilere neden olmaktadır. Son yıllarda kanserin biyolojisinin daha iyi anlaşılması ile kanser gelişiminde önemli rol oynayan hedeflere yönelik tedaviler geliştirilmeye başlanmıştır. Genel olarak hedefe yönelik tedaviler başlığı altında değerlendirilen bu ilaçlardan bazıları rutin tedaviye de girmiş bulunmaktadır. Bu tedavi yöntemlerinde genellikle tümör anjiyogenezi, sinyal iletim yolları, tümör mikroçevresi ve immün sistem tedavi hedefleri olarak alınmıştır (Zhang ve ark., 2009; Gerber, 2008; Chen ve Cleck, 2009). Tümör anjiyogenezi hedefleyen tedaviler arasında başlıca VEGF'yi bağlayan antikolar (bevacizumab) ve proteinler (aflibercept) ve VEGF reseptör yolağındaki tirozin kinaz aktivitesine sahip reseptör ve moleküllerini hedefleyen reseptör tirozin kinaz inhibitörleri (RTKI) (sorafenib, sunitinib, regorafenib vb.) ve reseptörleri bağlayan antikolar (ramicirumab) sayılabilir (Ellis ve Hicklin, 2008; Ferrara ve ark., 2004; Sharma ve ark., 2013; Arora ve Scholar, 2005; Madhusudan ve Ganesan, 2004).

Kemoterapi ilk kez II. Dünya Savaşında hardal gazına maruz kalan askerlerde özellikle lenf nodlarında gerileme ve kemik iliği hipoplazisi saptanması üzerine kanser tedavisinde kullanılması gündeme gelmiş ve nitrojen mustard hematolojik neoplazmlarda rutin kullanıma girmiştir (Chu ve ark., 2001). Alkilleyici bir ajan olan nitrojen mustardan sonra değişik etki mekanizmalarına sahip 200 civarında kemoterapötik ajan geliştirilmiş ve hastaların rutin tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Pamir, 2005). Klasik kemoterapi ajanları, etki mekanizmalarına göre Şekil 1.7'de gösterilmiştir.



Şekil 1.7. Kemoterapi ajanlarının etki mekanizmaları³

Klasik kemoterapi ilaçları ile esas olarak tümör hücrelerinin öldürülmesi (sitotoksik etki) hedeflenirse de tümör hücrelerine spesifik etki göstermeyip hemen hemen çoğalan tüm canlı hücelere benzer şekilde toksik etki gösterirler. Klinikte, kemoterapi uygulamaları hastaların yan etkileri tolere edebileceği maksimum dozlar seçilerek yapılır. Diğer bir uygulama ise sitotoksik etki dışında anjiyogenezi baskılama ve apoptozu uyarma için genellikle düşük doz olarak doz değişikliği yapılmasıdır. Düşük doz ve sık sık kullanım şeklinde olan metronomik kemoterapi, bazı kanser türleri için klinik uygulamalarda yerini almıştır (Salter ve Miller, 2007; Fioravanti ve ark., 2009).

³ Görsel örnekler tarafımızdan düzenlenmiştir.

Oksaliplatin: Yapısında 1-2-diaminosisloheksan (DACH) taşıyıcı ligand bulunan bir platin bazlı kemoterapi ajanıdır. Aktive olmuş oksaliplatin tarafından büyük DACH halkasının tutulması, platin-DNA yapısının oluşmasına neden olur. Özellikle hem zincirler arası hem de zincir üzerinde çapraz bağlanmalar oluşturarak DNA replikasyonunu bloke eder ve hücre ölümüne neden olur (Raymond ve ark., 1998; Graham ve ark., 2004).

Metastatik kolon kanseri tedavisi için, ilk kez 1996 yılında Avrupa’da, 2002 yılında ise Amerika Birleşik Devleti’nde onay almıştır. Birinci basamak tedavisi olarak folinik asit ve 5-florourasil ile birlikte FOLFOX olarak bilinen tedavi şeklinde uygulanmaktadır ve büyük ölçüde sağkalım avantajı sağlamaktadır. Evre 2 ve 3 kolorektal kanserli hastalarda rutin olarak adjuvan tedavi için kullanılmaktadır (Doğan ve Akbulut, 2009). Çeşitli çalışmalar oksaliplatinin kombine tedaviler ile tümör anjiyogenezi üzerinde etkili olduğunu gösterse de (Abu-Lila ve ark., 2009; Hecht ve ark., 2015) tek başına etkili olduğuna dair çalışma bulunmamaktadır.

Oksaliplatin sadece KRK hastaları için ruhsatlandırılmış olsa da, meme, pankreas, mide ve prostat kanseri hastalarında yapılan çalışmalarda az da olsa umut veren sonuçlar alınmıştır (Droz ve ark., 2003; Blesa ve ark., 2011; Delpuech ve ark., 2011; Honecker ve ark., 2006; Njiaju ve ark., 2013).

5-Florourasil (5-FU): Timidilat sentazı geri dönüşümsüz olarak inhibe eden bir antimetabolittir. Timidin sentazın etkisini ortadan kaldırarak, DNA replikasyonu için gerekli olan pirimidin timidin nükleosit sentezini bloke eden bir pirimidin analogudur. Timidilat sentaz, timidin monofosfat (dTMP) oluşturmak için deoksiüridin monofosfatı (dUMP) metiller. 5-FU, dTMP oluşumunu engelleyerek yetersiz timinden dolayı hücrelerin ölmesine sebep olur (Longley ve ark., 2003).

Sistemik olarak kolorektal, meme, anüs, özafagus, mide, pankreas, baş-boyun ve bazı deri kanserlerinde diğer kanser ilaçları veya radyoterapi ile birlikte kullanılır (Rossi ve ark., 2013). Standart olarak erken evre (2, 3) ve metastatik kolorektal kanser tedavisinin asıl ajanlarından (Douillard ve ark., 2000; Giacchetti ve ark., 1999).

Meme kanserinde ise erken ve lokal olarak ilerlemiş hastalarda sislofofomit ve metotreksat ile kombine olarak kullanılır (Jordan, 2016; Curreri ve ark., 1958).

5-FU ajanı, 1990'lı yılların başında prostat kanseri tedavisinde kullanılmış olsa da günümüzde standart tedavi arasında yer almamaktadır (Sundararajan ve Vogelzang, 2014; Berlin ve ark., 1998; Hansen ve ark., 1991).

Yapılan birçok klinik öncesi çalışmada 5-FU'nun anjiyogenezi thrombospondin-1 aracılığı ile inhibe ettiği (Zhao ve ark., 2008), ancak düşük dozlarının VEGF-A aracılı anjiyogenezi uyardığı gösterilmiştir (Albertsson ve ark., 2009).

Irinotekan: Topoizomeraz-I inhibitörüdür. Topoizomeraz I enzimi, DNA replikasyonu sırasında çift zincirin açılması için zinciri keser ve ardından tekrar o zincire bağlanarak zincirin sarılmasına yardım eder. Karboksil esteraz enzimi ile 7-etil-10-hidroksil-kamptotekin (SN-38) aktif metabolitine dönüşerek, DNA replikasyonu ve transkripsiyonu inhibe eder (Pommier ve ark., 2010; Vanhoefer ve ark., 2001).

Kolon kanserinde kullanılmak üzere 1998 yılında FDA onayı almıştır. Genellikle 5-florourasil ve leucovorin kemoterapi ajanları ile kombine olarak birinci basamak tedavide kullanılır (Asmis ve Saltz, 2008; Tebbutt ve ark., 2002; Douillard ve ark., 2000).

Meme kanseri tedavisinde standart kullanıma girmese de yapılan çalışmalar tedavide etkili olabileceğini düşündürmektedir (Hayashi ve ark., 2013; Shigeoka ve ark., 2001).

Prostat kanserinde irinotekan etkisi ile ilgili çok veri olmamakla birlikte, hormona dirençli prostat kanserinde irinotekan ilacının etkisiz (Reese ve ark., 1998-

1999), küçük hücreli prostat karsinomada cisplatin ile birlikte kullanımının etkili olabileceği gösterilmiştir (Tung ve ark., 2011).

Irinotekan ve anjiyogenez ilişkisi, yüksek düzeyde VEGF ekspresyonu gösteren çeşitli kanser türlerinde ilacın etkisinin artması şeklindedir (Bocci ve ark., 2008; Takano ve ark., 2010; Koizumi ve ark., 1996). Ayrıca hipoksiyi indükleyen faktör 1 alfa (HIF-1 α) molekülünü inhibe ederek anjiyogenezi geriletteği gösterilmiştir (Kamiyama ve ark., 2004).

1.5. Amaç

Bu tezde kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan 5-florourasil, oksaliplatin ve irinotekanın tümör hücrelerinde anjiyogenik faktör salgısı üzerindeki etkilerini in vitro olarak tümör hücre hatlarında araştırmayı amaçladık.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

2.1.1. Tümör Hücreleri

MCF-7 (İnsan Meme Kanseri Hücresi), LNCaP (İnsan Prostat Kanseri Hücresi), HT-29 (İnsan Kolon Kanseri Hücresi) hücreleri ticari olarak (ATCC, İngiltere) satın alınmıştır. -86°C dondurucudan alınan hücreler hemen 37°C su banyosuna alınmış, 3/2'si eridikten sonra, %10 fetal sığır serumu (FBS) (Biological Industries, İsrail) ve %1 antibiyotik-antimikotik solüsyonu (Biological Industries, İsrail) içeren hücre kültür besiyerlerine (MCF-7 için Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Biological Industries, İsrail), LNCaP hücreleri için RPMI-1640 (Biological Industries, İsrail), ve HT-29 hücreleri için McCoy's 5A (Biological Industries, İsrail) konulmuş ve %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörde çoğalması için inkübe edilmiştir.

2.1.2. Sitotoksisite Deneyi

Sitotoksisite testi ile piyasadan temin edilen oksaliplatin (Eloxatin® Sanofi Aventis), 5-florourasil (Fluorouracil, Koçak Farma) ve irinotekan (İrontu, Onko İlaç) ilaçlarının tümör hücrelerinin yarısını öldürdüğü letal dozu (IC₅₀) ve metronomik dozları (-1logIC₅₀, -2logIC₅₀ ve -3logIC₅₀) belirlemek için daha önce çoğalmış hücreler 96 kuyucuklu plaklara kuyucuk başına 10⁴ hücre olacak şekilde ekilmiş ve tutunup çoğalabilmeleri için 24 saat boyunca %5 CO₂ ve 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 5-florourasil, irinotekan ve oksaliplatin ilaçları Çizelge 2.1'de belirtilen doz aralıklarında hücrelere verilmiş ve 72 saat boyunca %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörde inkübe edilmiştir.

Çizelge 2.1. Sitotoksosite deneyinde tümör hücrelerine uygulanan ilaç dozları

| | En Yüksek Doz | En Düşük Doz |
|-----------------------|----------------------|---------------------|
| 5-Fluorouracil | 410 µmol/L | 0,00626 µmol/L |
| Oxaliptatin | 500 µmol/L | 0,0076 µmol/L |
| Irinotecan | 1,3 nmol/L | 0,0000195 nmol/L |

72 saatlik inkübasyon sonrasında canlı hücre oranını saptamak amacıyla 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide (MTT) (Chemicon International, ABD) testi yapılmıştır. İlaçlı besiyortamı dikkatli bir şekilde aspire edildikten sonra her kuyucukta son hacim 70 µl olacak şekilde konsantrasyonu 5 mg/ml olan MTT solüsyonundan 20 µl MTT alınarak 50 µl taze mediuma eklenerek %5 CO₂ ve 37°C’de yaklaşık 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası canlı hücrelere giren MTT canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitesi ile koyu mavi renkli formazan ürününe dönüştüğü için renk değişimi ve formazan kristalleri gözlenmiştir.

Oluşan formazanı çözmek için her kuyuya 150 µl dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma, ABD ve Kanada) konulup yaklaşık yarım saat çözünmesi için çalkalayıcıda beklenmiş ve ELIZA plak okuyucuda 590 nm ve 620 nm’de absorbans değerleri okutulmuş ve ilaçların IC₅₀, -1logIC₅₀, -2logIC₅₀ ve -3logIC₅₀ dozları belirlenmiştir.

2.1.3. Belirlenen Dozların Tümör Hücrelerine Uygulanması

MCF-7, HT-29 ve LNCaP hücreleri, her ilaç dozu için 2 tekrar olacak şekilde 6 kuyulu plaklara kuyu başına 5x10⁵ hücre olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat boyunca %5 CO₂ içeren 37°C’de inkübatörde inkübe edildikten sonra besiyortamları aspire edilerek her ilaç için belirlenen IC₅₀, -1logIC₅₀, -2logIC₅₀ ve -3logIC₅₀ dozları taze medium içinde uygulanmıştır. Hücreler, 24 saat süreyle %5 CO₂ ve 37°C’de inkübe edildikten sonra eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda (EZ-PZR) anjiyogenik gen ifadelerini araştırmak için kullanılmak üzere kuyulardan hücreler toplanarak -86°C ye kaldırılmış ve çalışma yapılana kadar saklanmıştır.

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) testi ile besiyerine salgılanan anjiyogenik faktör düzeyini belirlemek için eş zamanlı olarak benzer şekilde hazırlanan plaklar bu defa 72 saat inkübe edildikten sonra besiyerleri toplanarak -86°C de çalışma yapılana kadar saklanmıştır.

2.2. Moleküler Çalışmalar

2.2.1. RNA İzolasyonu

İlaç uygulanan hücrelerden EZ-PZR deneyi için silika tabanlı, seçici özellikteki membran ve santrifüj teknolojisini kullanan kit (Qiagen RNeasy Mini Kit, Almanya) prosedürüne göre RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflıkları spektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür. RNA saflıkları, $2.1 \geq \lambda_{260}/\lambda_{280} \geq 1.85$ arası olan örnekler çalışmaya alınmıştır.

2.2.2. RNA Nicelik ve Nitelik Tayini

İzole edilen RNA örneklerinden Agilent Bioanalyzer cihazı ile RNA moleküllerinin bütünlüğü araştırılmıştır. Agilent kit (Agilent RNA 6000 Nano Assay, ABD-Kanada) prosedürüne göre deney yapılmıştır. Agilent kit çalışmaya başlamadan yarım saat önce oda ısısında bekletilmiştir. Ardından önceden aliquote edilen jel, boya ile karıştırılarak agilent çipine ilgili kuyulara yüklenmiştir. Ardından, jel yüklenen kuyular üzerine Agilent marker yüklenmiştir. RNA örnekleri 1 µl olacak şekilde 0,2 ml'lik tüplere alındıktan sonra ladder ile birlikte 70 C°'de 2 dakika denatüre olmaları için termal cyler cihazında inkübe edilmiştir. Bu işlem sonunda RNA'lar ve ladder ilgili kuyulara 1 µl olacak şekilde yüklenmiştir. Çip çalkalandıktan sonra cihaza konulmuştur. RNA integrity number (RIN) 7 – 10 arasında olan örnekler çalışmaya alınmıştır.

2.2.3. Genomik DNA Eliminasyonu ve cDNA Sentezi

RNA izole edilen örneklerden 250 ng RNA ile kit (Qiagen Quantitect Reverse Transcription, Almaya) prosedürüne göre genomik DNA eliminasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır. Kısaca, ilk basamakta DNaz içerikli solüsyon ile olası DNA kontaminasyonları elimine edilmiştir. Daha sonra random primerler ve oligo-dT primerler aracılığıyla reverse transkriptaz enzimi ile komplementer DNA sentezi yapılmıştır. Reaksiyon sonunda 20 µl cDNA örnekleri RNaz-DNaz içermeyen su (Qiagen, Almanya) ile 100 µl son hacme tamamlanmıştır.

2.2.4. Primer-Prob Dizaynı

Kanser anjiyogenez sürecinde etkili olan vasküler endotelial büyüme faktörü-A (VEGF-A), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), platelet kökenli büyüme faktörü-B (PDGF-B), matris metalloproteinaz-9 (MMP-9), interlökin-8 (IL-8) genleri ve referans olarak β -aktin (ACTB) geni için EZ-PZR deneyinde kullanılmak üzere ileri ve geri primer ve FAM-TAMRA ile boyalı prob dizaynları yapılmıştır. Primer ve prob dizaynında Primer3web (version 4.0.0) sitesinden yararlanılmıştır (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>). Daha sonra dizayn edilen primerler ve problemlerin gen dizileri ile uyumu NCBI/Blast web sayfasından kontrol edilmiştir (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Çizelge 2.2. Kullanılan primer-prob setleri

| Gen | Forward Primer | Reverse Primer | Prob |
|----------------|------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| B-Aktin | 5'-CCCTGGAGAAGAGCTACGAG-3' | 5'-AAGGTAGTTTCGTGGATGCC-3' | 5'-CCAGCCTTCCTCCTGGGCA-3' |
| VEGF-A | 5'-TGTGAATGCAGACCAAGAAAGA-3' | 5'-GCTTCTCCGCTCTGAGCA-3' | 5'-AGAGCAAGACAAGAAAATCCCTGTGGGC-3' |
| bFGF | 5'-ACCCGACGGCCGA-3' | 5'-TCTTCTGCTTGAAGTTGTAGCTTGA-3' | 5'-TCCGGGAGAAGAGCGACCCTCAC-3' |
| PDGF-B | 5'-GGGCACACAGACTGGAGAAA-3' | 5'-CACACCCACCAAGAGGAGTC-3' | 5'-CCCACGGTGCCCAACACCAGTCA-3' |
| IL-8 | 5'-ATCTGGCAACCCCTAGTCTGC-3' | 5'-GTGCTTCCACATGTCTCAC-3' | 5'-TCCTTGTTCCACTGTGCCTTGTT-3' |
| MMP-9 | 5'-GTCTCCCCCTCACCTTCTG-3' | 5'-GAGGAATGATCTAAGCCGAGC-3' | 5'-CACCTCGAAGTTGACAGCGACAAGA-3' |

2.2.5. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Sentezlenen cDNA örneklerinden 384 kuyucuklu derin kuyulu plate içine stok hazırlanmıştır. Daha sonra stok cDNA örneklerinden 384 kuyucuklu platalere 3 µl dağıtılarak öncelikle çalışılacak plataler hazırlanmıştır. Daha sonra çalışılacak her gen için primer-prob seti, prob qPCR karışımı (Solis Biodyne 5x Hot FirePol Probe Mix Plus (No Rox), Estonya) ve RNaz-DNaz içermeyen su (Qiagen, Almanya) bileşenleri ile 'ortak karışım' master miks hazırlanmış ve 7µl olarak plak kuyucuklarına dağıtılmıştır. cDNA içermeyen negatif kontrol kuyucuklarına karışım dağıtıldıktan sonra 3 µl RNaz-DNaz içermeyen su (Qiagen, Almanya) eklenerek son hacim 10 µl'ye tamamlanmıştır. Örnekler kit proserüdündeki gibi Çizelge 2.3.'de belirtilen reaksiyonlarda amplifiye edilmiştir.

Çizelge 2.3. EZ-PZR reaksiyonu

| | Sıcaklık | Süre | Siklus Sayısı |
|------------------------------|----------|-----------|---------------|
| Polimeraz Aktivasyonu | 95°C | 15 dakika | 1 siklus |
| Denatürasyon | 95°C | 20 saniye | 40 siklus |
| Bağlanma-Uzama | 60°C | 60 saniye | |
| Soğuma | 37°C | 10 dakika | 1 siklus |

2.2.6. Bradford Testi

Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış hücre kültüründen toplanan besiyortamlarındaki total protein konsantrasyonları Bradford (coomassie parlak mavi) yöntemi ile tayin edilmiştir. Kısaca daha önce -86° C' de saklanan ilaç uygulanmış ve uygulanmamış hücre besiyortamlarından 5 µl alınarak 96 kuyucuklu mikrolatellere aktarılmıştır. Örneklerdeki protein miktarlarını hesaplamada kullanılacak protein standartları 0.1 – 1.4 mg/ml olacak şekilde BSA (Sigma, ABD) ile hazırlanarak ilgili kuyucuklara 5'er µl dağıtılmıştır. Daha sonra tüm kuyucuklara 250 µl Bradford solüsyonu (Sigma, ABD) eklenerek oda sıcaklığında yaklaşık 45 dakika inkübe

edilmiştir. Kuyucuklarda oluşan renk değişiklikleri, 595 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ile ölçülmüştür. Standart kuyucuklardaki absorbans değerleri referans alınarak örneklerin total protein konsantrasyonları hesaplanmıştır.

2.2.7. Sandviç ELISA Testi

Daha önce -86° C' de saklanan ilaç uygulanmış ve uygulanmamış kontrol hücre besiyortamlarından VEGF-A, bFGF, PDGF-BB, MMP-9 ve IL-8 miktarları, ticari kit (YH Biosearch ELISA Kits, Çin) ile tayin edilmiştir. -86°C de saklanan hücre mediumları oda ısısına getirildikten sonra 40 µl olarak ilgili kuyucuklara konularak üzerlerine ilgili spesifik antikordan 10 µl eklenmiştir. Standart dilüsyonlar kit prosedürüne göre hazırlanmış ve 50 µl olarak standart kuyucuklarına dağıtılmıştır. Daha sonra standart ve örnek kuyucuklarına 50 µl streptavidin-HRP eklenerek antikorun bağlanması için plak 37°C'de inkübe edilmiştir. Bağlanmayan ve spesifik olarak bağlanmayan molekülleri uzaklaştırmak için yıkama işlemleri yapılmıştır. Yıkama işlemini takiben kuyucuklara TMB substrat eklenerek renk oluşumu sağlanmış ve oluşan renk HCl solüsyonu ile durdurularak kuyucuklardaki renk değişimleri için 650 nm referans alınarak 450 nm'de absorbanslar belirlenmiştir. Standart kuyucuklardaki absorbans ve konsantrasyonlar baz alınarak örneklerdeki ilgili faktör düzeyleri tayin edilmiştir.

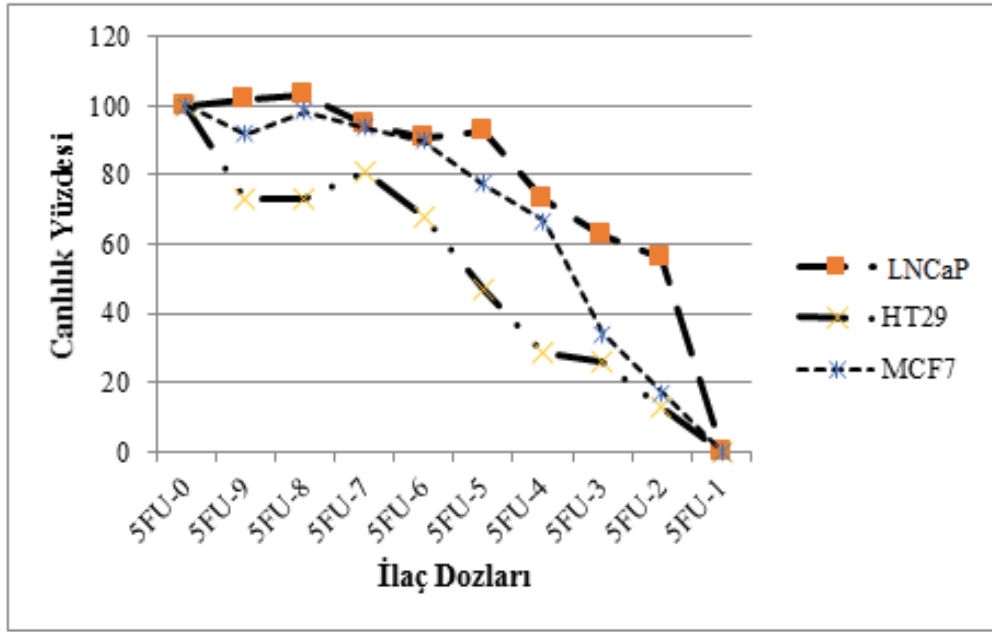
2.3. İstatistik

In vitro sitotoksiste testlerinde IC50 değerlerinin hesaplanmasında non-lineer regresyon analizi kullanılmıştır. Ortalamalar arasındaki karşılaştırmalarda tek yönlü ANOVA testi, T testi ve Mann-Whitney U testleri kullanılmıştır. Gen ifade düzeyleri ile sitokin düzeyleri arasındaki ilişkinin analizinde Pearson ve Spearman korelasyon testleri uygulanmıştır.

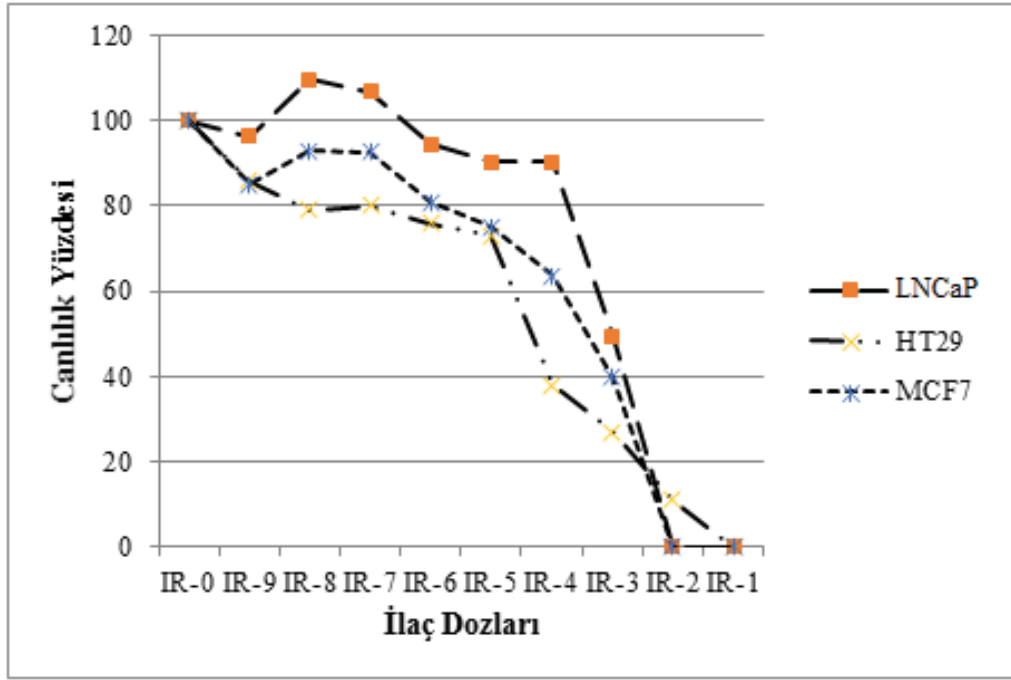
3. BULGULAR

3.1. 5-Fluorourasil, İrinotekan ve Oksaliptatin İlaçlarının In Vitro Sitotoksiste Sonuçları

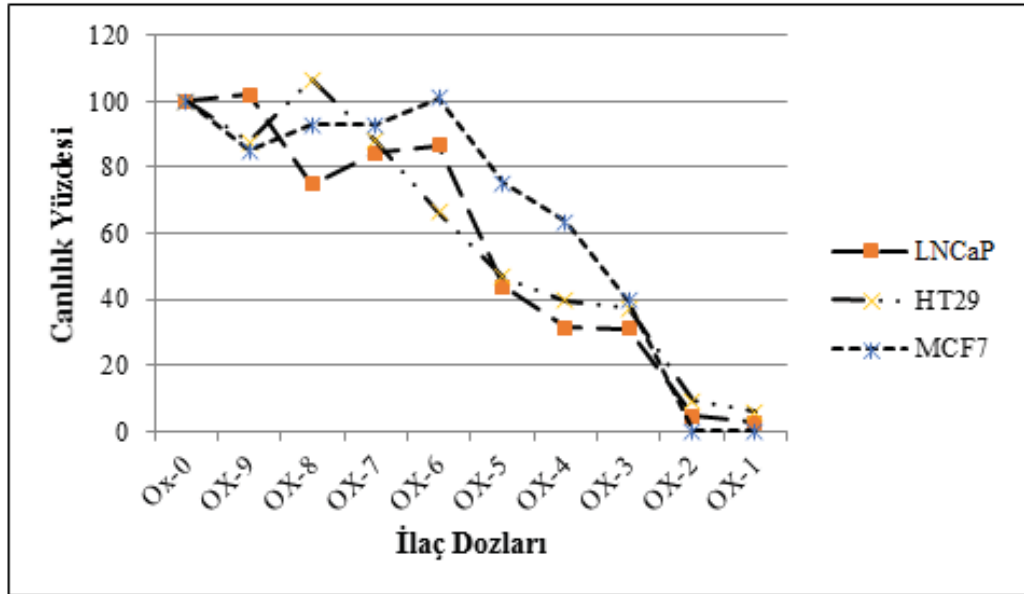
MCF-7, HT-29 ve LNCaP hücrelerine Çizelge 2.1’de verilen konsantrasyon aralıklarında 9 doz olarak uygulanan 5-fluorourasil, irinotekan ve oksaliptatin ilaçlarının in-vitro doza bağlı hücre ölüm eğrileri Şekil 3.1. – 3.3’de gösterilmiştir. İlaç uygulanmayan kuyucukların absorbands değerleri referans olarak kullanılmış ve bu kuyucuklardaki hücrelerin canlılık oranı %100 olarak alınmıştır.



Şekil 3.1. 5-Fluorourasil ilacının sitotoksiste grafiği



Şekil 3.2. İrinotekan ilacının sitotoksosite grafiği



Şekil 3.3. Oksaliplatin ilacının sitotoksosite grafiği

Kemoterapi ilaçların etkinlikleri hücrelerin %50'sini öldüren inhibitör konsantrasyon 50 (IC_{50}) değerleri hesaplanarak belirlenmiştir. Doz-canlı hücre yüzdesi eğrileri lineer dağılım gösteren ilaçlar için;

$$Y = a * X + b, (b: \text{sabit}, a: \text{eğrinin eğimi})$$

$$IC_{50} = (50 - b) / a$$

Sigmoid dağılım gösteren cevap eğrileri için;

$$Y = 100 + ((100 - A) / (1 + 10^{(X - \log IC_{50}) * B}))$$

A: minimum değer; IC_{50} : %50 inhibisyon yapan doz, B: Eğrinin tepe eğimi

formülleri kullanılarak ilaçların hücre tiplerine göre IC_{50} değerleri hesaplanmıştır.

Her bir ilaç için belirlenen IC_{50} değerleri esas alınarak, $-1\log IC_{50}$, $-2\log IC_{50}$ ve $-3\log IC_{50}$ değerleri sonraki deneylerde metronomik dozlar olarak test edilmiştir.

Çizelge 3.1. MTT testi ile belirlenen ilaçların hücrelere göre IC_{50} , $-1\log IC_{50}$, $-2\log IC_{50}$ ve $-3\log IC_{50}$ değerleri

| | | IC50 | -1logIC50 | -2logIC50 | -3logIC50 |
|--------------|--------------------------------------|-------------|------------------|------------------|------------------|
| HT-29 | 5-Fluorouracil ($\mu\text{mol/L}$) | 8,9646 | 0,8965 | 0,0897 | 0,0090 |
| | Irinotecan (mmol/L) | 0,0974 | 0,0097 | 0,0010 | 9,7354E-05 |
| | Oxaliplatin ($\mu\text{mol/L}$) | 16,2348 | 1,6235 | 0,1624 | 0,0162 |
| LNCaP | 5-Fluorouracil ($\mu\text{mol/L}$) | 56,2678 | 5,6268 | 0,5627 | 0,0563 |
| | Irinotecan (mmol/L) | 0,0583 | 0,0058 | 0,0006 | 5,8334E-05 |
| | Oxaliplatin ($\mu\text{mol/L}$) | 5,4792 | 0,5479 | 0,0548 | 0,0055 |
| MCF-7 | 5-Fluorouracil ($\mu\text{mol/L}$) | 673,9457 | 67,3946 | 6,7395 | 0,6740 |
| | Irinotecan (mmol/L) | 0,0488 | 0,0049 | 0,0005 | 4,8795E-05 |
| | Oxaliplatin ($\mu\text{mol/L}$) | 21,2269 | 2,1227 | 0,2123 | 0,0212 |

Deneylerde kullandığımız hücrelerden 5-fluorourasile en duyarlı kolon kanseri hücreleri bulunurken, oksalipatine en duyarlı olan prostat kanseridir. İrinotekanın her üç hücrede de benzer etkinlikte olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.1.). Meme kanseri hücrelerinin 5-fluorourasil ilacına oldukça direnç gösterdiği saptanmıştır

3.2. RNA Örneklerinin Saflık ve Konsantrasyonları

İzole edilen RNA örneklerinin spektrofotometrede ölçülen saflık ve konsantrasyonları Çizelge 3.2. – 3.4.‘de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. LNCaP hücrelerinden izole edilen RNA konsantrasyon ve safıkları

| LNCaP Örnekleri | Saflık (260/280) | Konsantrasyon (ng/µl) |
|-----------------|------------------|-----------------------|
| 5FU IC50 | 2.1 | 684,63 |
| 5FU -1logIC50 | 1.99 | 1194,7 |
| 5FU -2logIC50 | 1.97 | 1008,8 |
| 5FU -3logIC50 | 1.97 | 1219,1 |
| IR IC50 | 2.1 | 698,47 |
| IR -1logIC50 | 1.95 | 979,22 |
| IR -2logIC50 | 2.1 | 1159,28 |
| IR -3logIC50 | 1.97 | 1222,8 |
| OX IC50 | 2.1 | 288,87 |
| OX -1logIC50 | 1.95 | 797 |
| OX -2logIC50 | 2.1 | 1045,22 |
| OX -3logIC50 | 1.93 | 1395,7 |
| Kontrol | 1.95 | 1366,7 |

Çizelge 3.3. MCF-7 hücrelerinden izole edilen RNA konsantrasyon ve safıkları

| MCF-7 Örnekleri | Saflık (260/280) | Konsantrasyon (ng/µl) |
|-----------------|------------------|-----------------------|
| 5FU IC50 | 2.04 | 116,49 |
| 5FU -1logIC50 | 2.02 | 283,54 |
| 5FU -2logIC50 | 1.98 | 364,74 |
| 5FU -3logIC50 | 1.98 | 472,51 |
| IR IC50 | 1.90 | 493,41 |
| IR -1logIC50 | 1.90 | 269,15 |
| IR -2logIC50 | 1.97 | 290,51 |
| IR -3logIC50 | 2.04 | 334,64 |
| OX IC50 | 2.07 | 154,55 |
| OX -1logIC50 | 2.09 | 168,37 |
| OX -2logIC50 | 2.00 | 148,67 |
| OX -3logIC50 | 2.02 | 376,08 |
| Kontrol | 2.00 | 497,56 |

Çizelge 3.4. HT-29 hücrelerinden izole edilen RNA konsantrasyon ve saflıkları

| HT-29 Örnekleri | Saflık (260/280) | Konsantrasyon (ng/µl) |
|-----------------|------------------|-----------------------|
| 5FU IC50 | 1.92 | 631,65 |
| 5FU -1logIC50 | 1.96 | 721,01 |
| 5FU -2logIC50 | 1.96 | 737,69 |
| 5FU -3logIC50 | 1.98 | 731,92 |
| IR IC50 | 1.86 | 832,43 |
| IR -1logIC50 | 2.03 | 342,57 |
| IR -2logIC50 | 1.85 | 171,7 |
| IR -3logIC50 | 1.96 | 587,67 |
| OX IC50 | 1.96 | 412,97 |
| OX -1logIC50 | 1.95 | 333,46 |
| OX -2logIC50 | 1.91 | 792,79 |
| OX -3logIC50 | 1.98 | 371,56 |
| Kontrol | 2.00 | 229,69 |

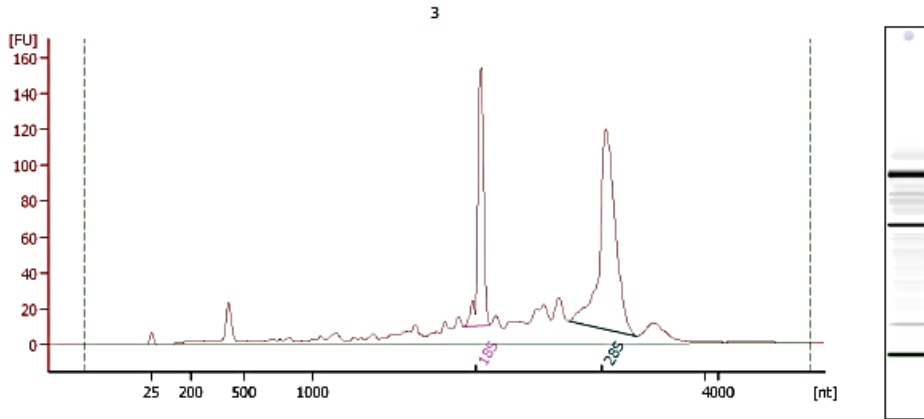
3.3. RNA Nicelik ve Nitelik Tayini

RNA örneklerinin bütünlükleri 7.30 ve 9.70 RIN değerleri arasında değişmektedir Şekil 3.4 - 3.6 sırasıyla LNCaP, HT-29 ve MCF-7 hücrelerinden izole edilen kontrol grubu RNA örneklerinin bütünlüğü görülmektedir.

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano_DE72902359_2015-11-25_16-06-53.xad

Created: 11/25/2015 4:06:52 PM
 Modified: 11/25/2015 4:30:44 PM

Electropherogram Summary Continued ...

Overall Results for sample 3 : 3

| | | | |
|-------------------------|-------------|-----------------------------|--|
| RNA Area: | 926.0 | RNA Integrity Number (RIN): | 8.4 (B.02.08) |
| RNA Concentration: | 1,416 ng/µl | Result Flagging Color: | |
| rRNA Ratio [28s / 18s]: | 1.9 | Result Flagging Label: | RIN: 8.40 |

Fragment table for sample 3 : 3

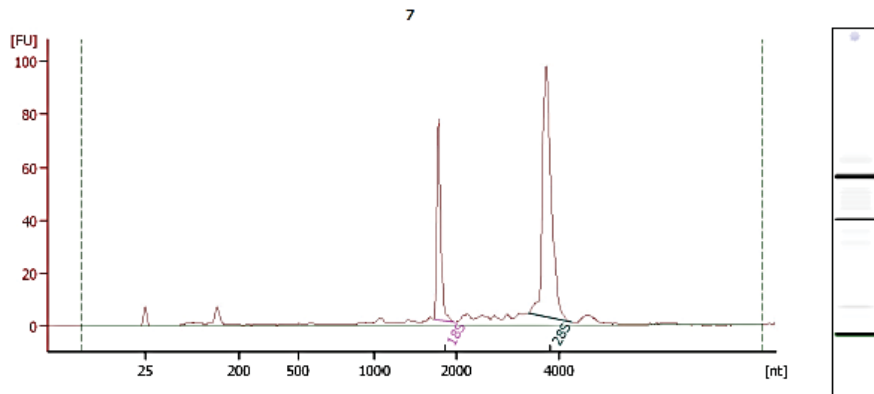
| Name | Start Size [nt] | End Size [nt] | Area | % of total Area |
|------|-----------------|---------------|-------|-----------------|
| 18S | 1,382 | 1,450 | 137.3 | 14.8 |
| 28S | 1,651 | 1,825 | 257.0 | 27.8 |

Şekil 3.4. LNCaP Kontrol RNA bütünlüğü

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano_DE72902359_2016-03-07_15-25-12.xad

Created: 3/7/2016 3:25:11 PM
 Modified: 3/7/2016 3:49:02 PM

Electropherogram Summary Continued ...

Overall Results for sample 7 : 7

| | | | |
|-------------------------|-----------|-----------------------------|--|
| RNA Area: | 301.4 | RNA Integrity Number (RIN): | 9.7 (B.02.08) |
| RNA Concentration: | 247 ng/µl | Result Flagging Color: | |
| rRNA Ratio [28s / 18s]: | 2.2 | Result Flagging Label: | RIN: 9.70 |

Fragment table for sample 7 : 7

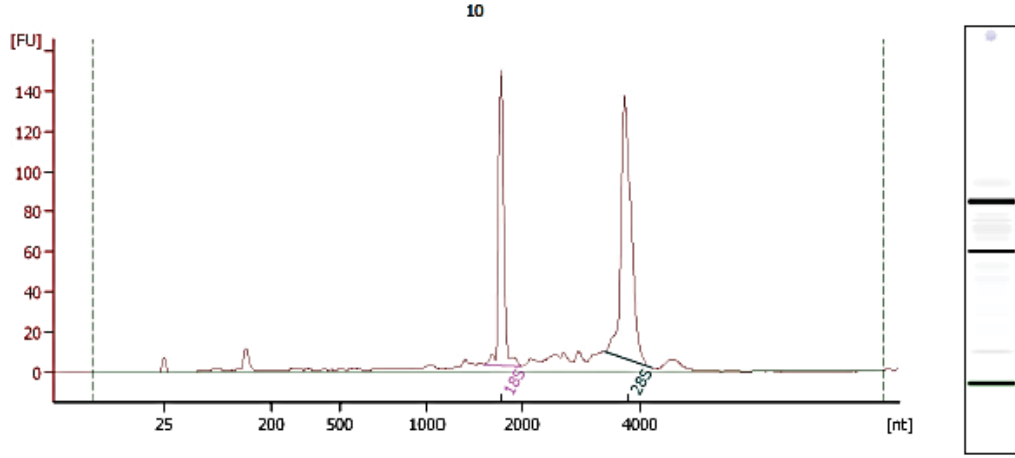
| Name | Start Size [nt] | End Size [nt] | Area | % of total Area |
|------|-----------------|---------------|-------|-----------------|
| 18S | 1,727 | 1,982 | 60.7 | 20.1 |
| 28S | 3,406 | 4,256 | 132.5 | 43.9 |

Şekil 3.5. HT-29 Kontrol RNA bütünlüğü

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano
Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano_DE72902359_2016-03-07_15-25-12.xad

Created: 3/7/2016 3:25:11 PM
Modified: 3/7/2016 3:49:02 PM

Electropherogram Summary Continued ...

Overall Results for sample 10 : 10

RNA Area: 522.2
RNA Concentration: 427 ng/μl
rRNA Ratio [28S / 18S]: 1.8
RNA Integrity Number (RIN): 9.3 (B.02.08)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 9.30

Fragment table for sample 10 : 10

| Name | Start Size [nt] | End Size [nt] | Area | % of total Area |
|------|-----------------|---------------|-------|-----------------|
| 18S | 1,594 | 1,997 | 119.9 | 23.0 |
| 28S | 3,401 | 4,191 | 189.8 | 36.3 |

Şekil 3.6. MCF-7 Kontrol RNA bütünlüğü

3.4. Metronomik Dozlarda Kemoterapinin Tümör Hücrelerinde Anjiyogenik Genlerin İfadeleri Üzerindeki Etkileri

Hücrelerdeki gen ifade değişimleri, referans gen olarak insan β -aktin geni kullanılarak $\Delta\Delta C_t$ metodu (yaklaşım methodu) ile hesaplanmıştır. Bu tez çalışmasında in vitro sitotoksiste deneylerinde kemoterapi ilaçları için belirlenen IC50 dozları ile birlikte $-1\log IC_{50}$, $-2\log IC_{50}$ ve $-3\log IC_{50}$ dozlarının VEGF-A, PDGF-B, bFGF, IL-8 ve MMP9 genlerinin ifadeleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Gen ifade değişimleri Şekil 3.7 – 3.19 ve Çizelge 3.5 – 3.9’da gösterilmiştir.

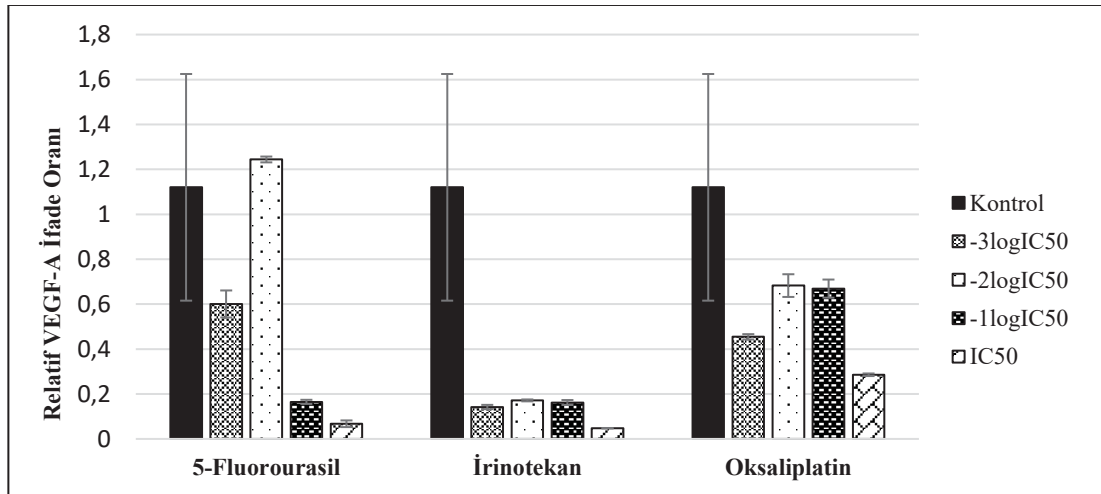
3.4.1. VEGF-A Gen İfadesi

İlaç uygulanmamış ve değişik dozlarda kemoterapi ilaçları uygulanmış LNCaP, MCF-7 ve HT-29 hücrelerindeki VEGF gen ifade değişimleri Şekil 3.7 - 3.9'da gösterilmiştir.

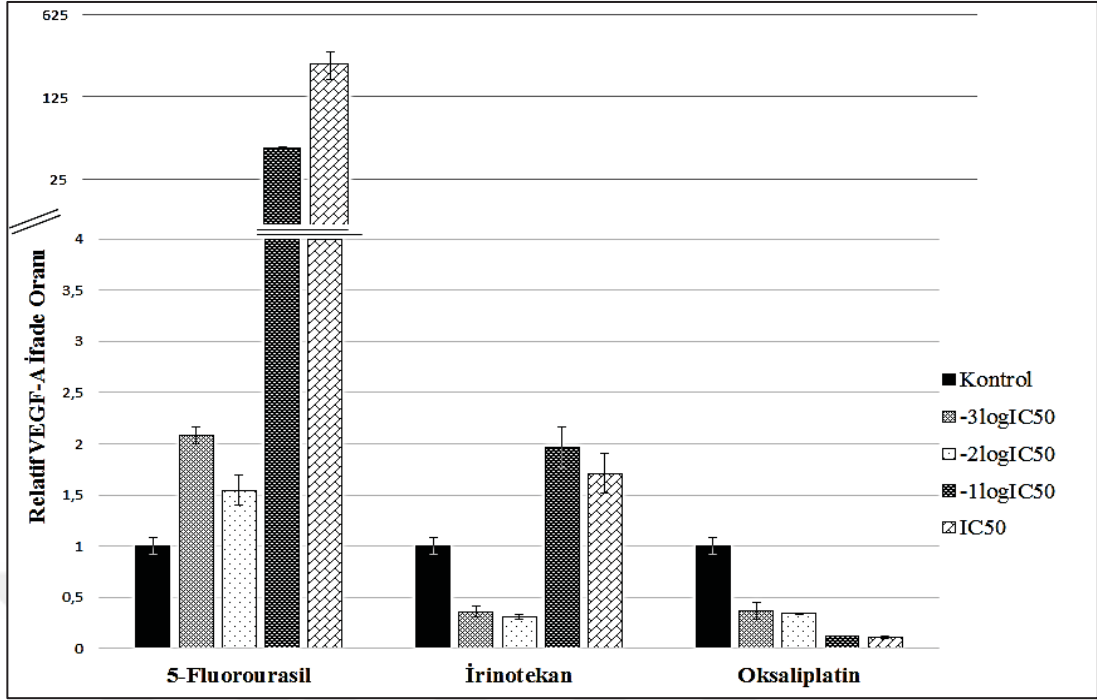
LNCaP hücrelerinde 5-fluorourasil ilacının $-1\log IC_{50}$ ve IC_{50} dozları, irinotekan ilacının tüm dozları ve oksaliplatin ilacının $-3\log IC_{50}$ ve IC_{50} dozları kontrole göre VEGF-A ifadesinde anlamlı azalma göstermiştir. Düşük kemoterapi dozlarına bakıldığında ise irinotekan ilaç dozları, LNCaP hücrelerinde VEGF-A ifadesinde, en fazla azalmaya neden olmuştur (Çizelge 3.5; Şekil 3.7).

MCF-7 hücrelerinde ise uygulanan ilaçlar VEGF-A düzeyini farklı şekilde etkilemiştir. 5-fluorourasil ifade artışına neden olurken oksaliplatin dozları anlamlı şekilde azaltmıştır. Buna karşılık irinotekan ise $-2\log IC_{50}$ ve $-3\log IC_{50}$ dozlarında anlamlı azalmaya yol açarken $-1\log IC_{50}$ ve IC_{50} dozlarında artışa neden olmuştur (Çizelge 3.5; Şekil 3.8).

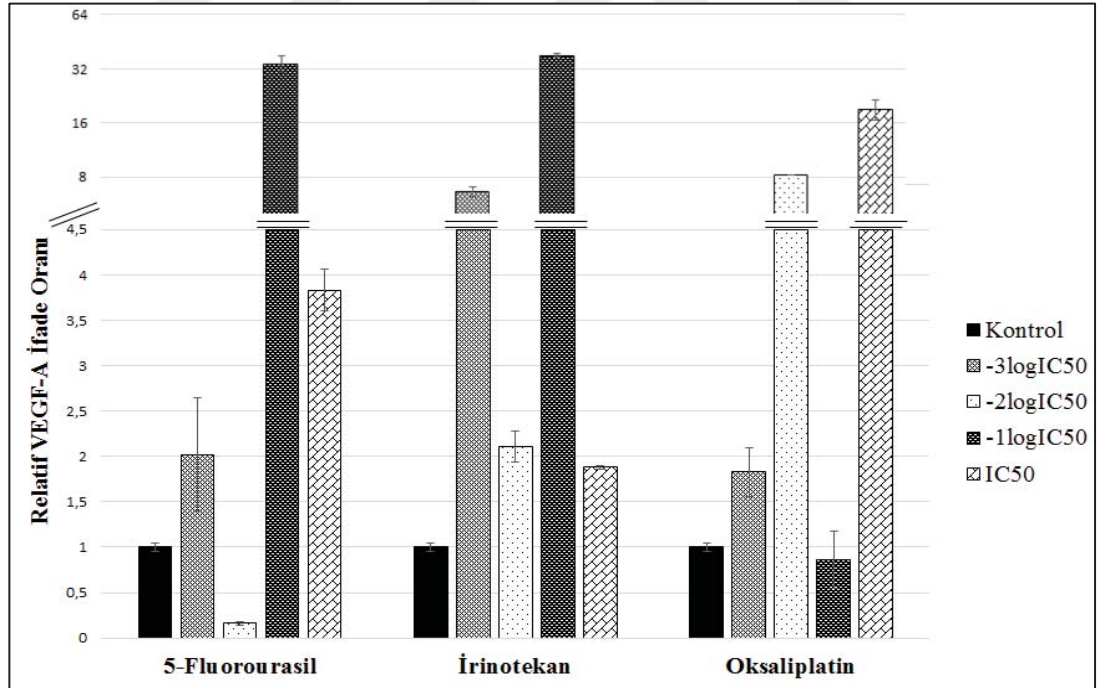
HT-29 hücrelerinde kemoterapi ilaçları genel olarak VEGF-A ifadesini kontrole göre anlamlı olarak arttırmıştır (Çizelge 3.5; Şekil 3.9). 5-FU $-2\log IC_{50}$ dozunda VEGF-A ifadesi anlamlı olarak azalmıştır (Çizelge 3.5; Şekil 3.9).



Şekil 3.7. Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış LNCaP hücrelerinde VEGF-A ifadesi



Şekil 3.8. Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış MCF-7 hücrelerinde VEGF-A ifadesi



Şekil 3.9. Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış HT-29 hücrelerinde VEGF-A ifadesi

Çizelge 3.5. Kemoterapi ilaçları uygulanmış hücrelerin $\Delta\Delta C_t$ metodu ile kontrol gruplarına göre VEGF-A gen düzeyindeki değişimler (Ortalama \pm Standart Hata)

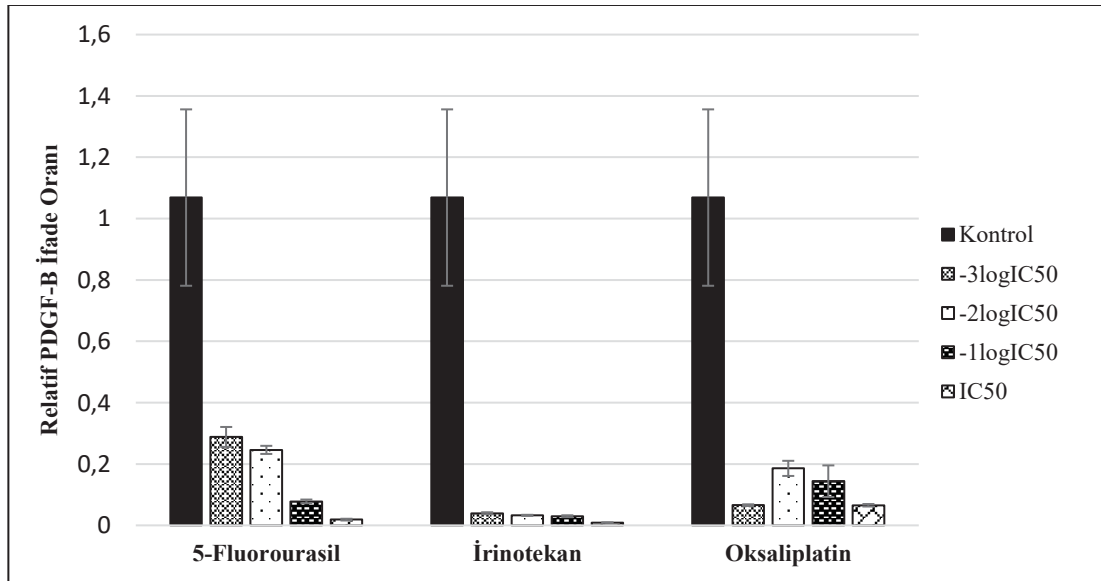
| | | Kontrol | -3logIC50 | -2logIC50 | -1logIC50 | IC50 |
|-------|-----------------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|---------------------|
| LNCaP | <i>5-fluorourasil</i> | 1,12 \pm 0,51 | 0,60 \pm 0,06 | 1,24 \pm 0,01 | 0,17 \pm 0,01* | 0,07 \pm 0,02* |
| | <i>İrinotekan</i> | 1,12 \pm 0,51 | 0,14 \pm 0,01* | 0,17 \pm 0,01* | 0,16 \pm 0,01* | 0,05 \pm 0,01* |
| | <i>Oksaliptain</i> | 1,12 \pm 0,51 | 0,45 \pm 0,01* | 0,68 \pm 0,05 | 0,67 \pm 0,04 | 0,29 \pm 0,01* |
| MCF-7 | <i>5-fluorourasil</i> | 1,00 \pm 0,08 | 2,08 \pm 0,09* | 1,55 \pm 0,15* | 46,16 \pm 0,48* | 240,02 \pm 62,47* |
| | <i>İrinotekan</i> | 1,00 \pm 0,08 | 0,36 \pm 0,05* | 0,31 \pm 0,03* | 1,96 \pm 0,20* | 1,71 \pm 0,19* |
| | <i>Oksaliptain</i> | 1,00 \pm 0,08 | 0,36 \pm 0,09* | 0,34 \pm 0,01* | 0,12 \pm 0,01* | 0,11 \pm 0,01* |
| HT-29 | <i>5-fluorourasil</i> | 1,00 \pm 0,05 | 2,02 \pm 0,62 | 0,16 \pm 0,02* | 34,15 \pm 3,64* | 3,83 \pm 0,22* |
| | <i>İrinotekan</i> | 1,00 \pm 0,05 | 6,63 \pm 0,41* | 2,11 \pm 0,17* | 38,06 \pm 0,79* | 1,88 \pm 0,02* |
| | <i>Oksaliptain</i> | 1,00 \pm 0,05 | 1,83 \pm 0,27* | 8,18 \pm 0,03* | 0,86 \pm 0,32 | 19,01 \pm 2,54* |

* p<0.05.

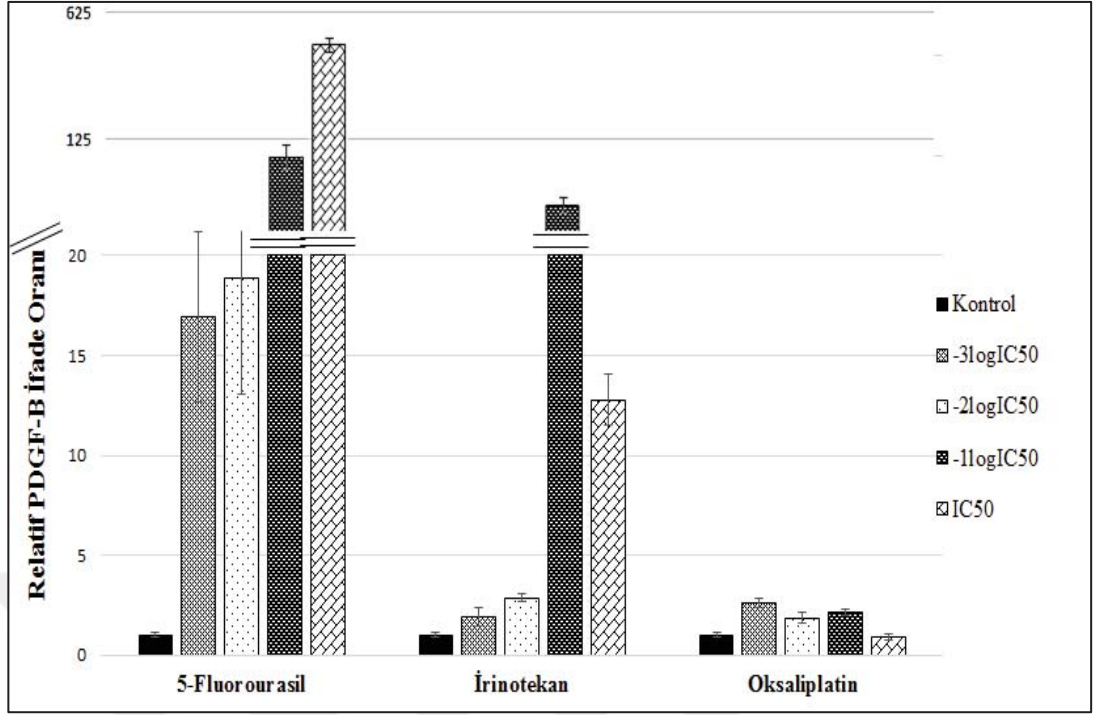
3.4.2. PDGF-B Gen İfadesi

LNCaP hücrelerinde uygulanan tüm kemoterapi ilaç dozları kontrole göre PDGF-B gen ifade seviyesini anlamlı derecede azaltmıştır buna karşılık MCF-7 hücrelerinde ise arttırmıştır (Çizelge 3.6; Şekil 3.10-3.11).

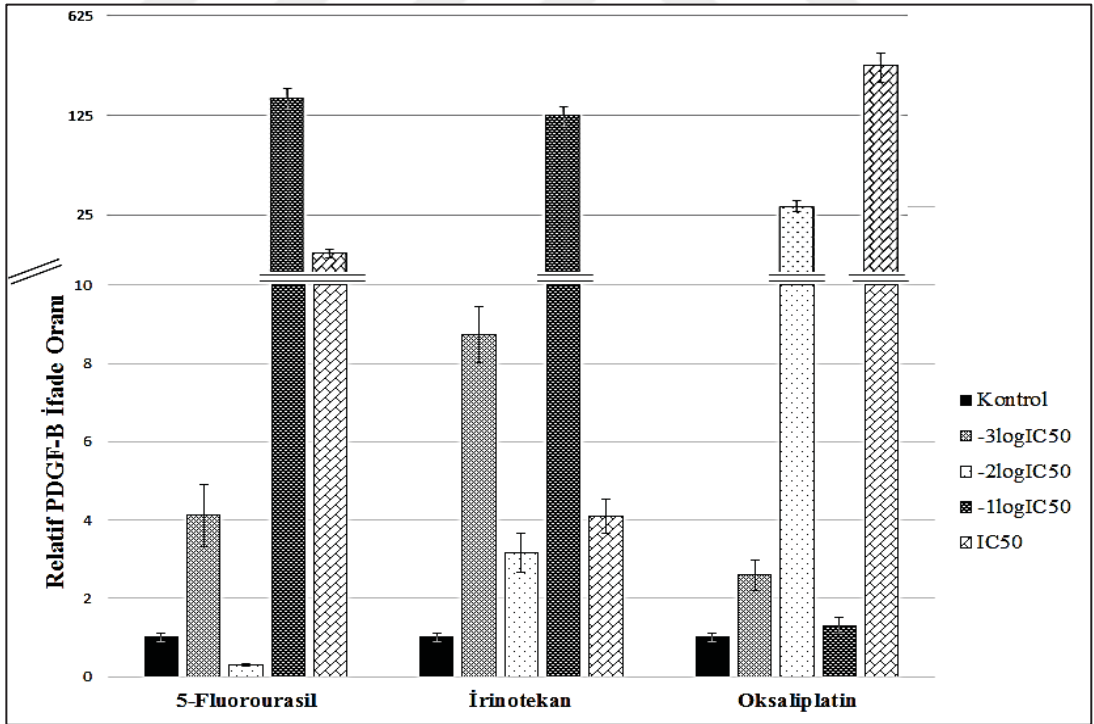
HT-29 hücrelerinde ise 5-FU -2logIC50 dozunda PDGF-B gen ifadesinde anlamlı azalmaya neden olurken diğer dozlarda ve irinotekan ve oksaliptain dozlarında gen ifadesinde artışa neden olmuştur (Çizelge 3.6; Şekil 3.12).



Şekil 3.10. Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış LNCaP hücrelerinde PDGF-B ifadesi



Şekil 3.11. Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış MCF-7 hücrelerinde PDGF-B ifadesi



Şekil 3.12. Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış HT-29 hücrelerinde PDGF-B ifadesi

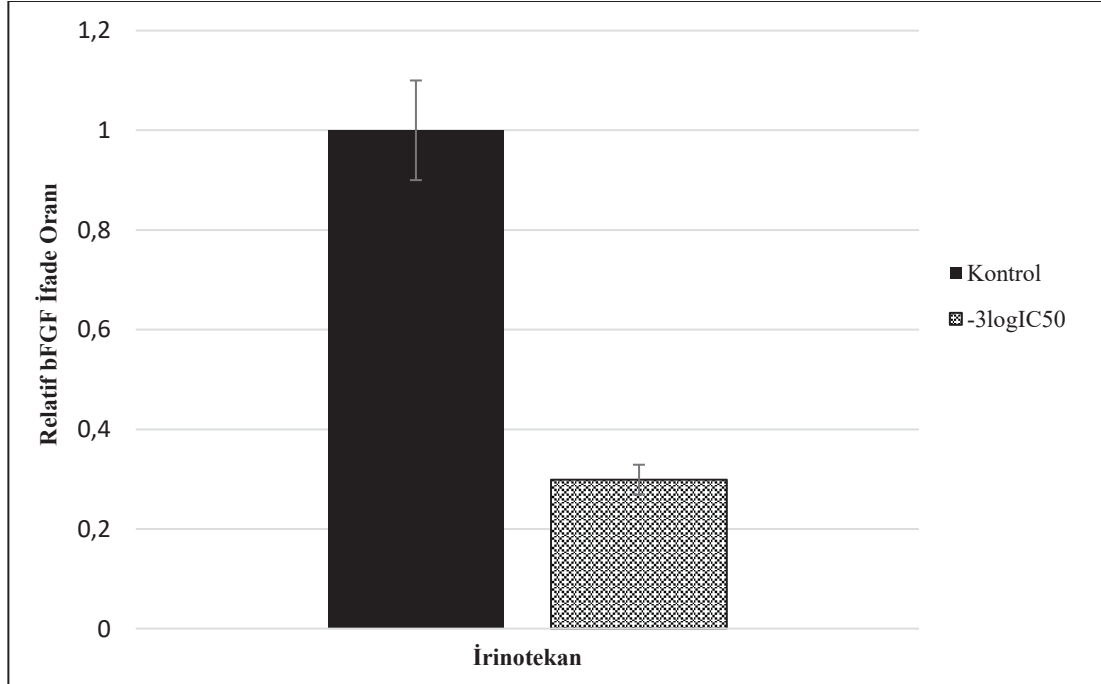
Çizelge 3.6. Kemoterapi ilaçları uygulanmış hücrelerin $\Delta\Delta C_t$ metodu ile kontrol gruplarına göre PDGF-B gen düzeyindeki değişimler (Ortalama \pm Standart Hata)

| | | Kontrol | -3logIC50 | -2logIC50 | -1logIC50 | IC50 |
|-------|-----------------------|-----------------|-------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| LNCaP | <i>5-fluorourasil</i> | 1,07 \pm 0,29 | 0,29 \pm 0,03 | 0,25 \pm 0,01* | 0,08 \pm 0,01* | 0,02 \pm 0,01* |
| | <i>İrinotekan</i> | 1,07 \pm 0,29 | 0,04 \pm 0,01* | 0,03 \pm 0,01* | 0,03 \pm 0,01* | 0,01 \pm 0,01* |
| | <i>Oksaliptatin</i> | 1,07 \pm 0,29 | 0,07 \pm 0,01* | 0,19 \pm 0,03* | 0,14 \pm 0,05* | 0,07 \pm 0,01* |
| MCF-7 | <i>5-fluorourasil</i> | 1,01 \pm 0,10 | 16,92 \pm 4,25* | 18,87 \pm 5,82* | 99,96 \pm 14,75* | 414,31 \pm 36,37* |
| | <i>İrinotekan</i> | 1,01 \pm 0,10 | 1,94 \pm 0,46 | 2,86 \pm 0,21* | 53,82 \pm 5,38* | 12,79 \pm 1,28* |
| | <i>Oksaliptatin</i> | 1,01 \pm 0,10 | 2,62 \pm 0,26* | 1,85 \pm 0,27* | 2,16 \pm 0,16* | 0,92 \pm 0,17 |
| HT-29 | <i>5-fluorourasil</i> | 1,00 \pm 0,1 | 4,11 \pm 0,81* | 0,29 \pm 0,03* | 165,31 \pm 27,81* | 13,55 \pm 0,94* |
| | <i>İrinotekan</i> | 1,00 \pm 0,1 | 8,74 \pm 0,73* | 3,17 \pm 0,50* | 124,45 \pm 18,98* | 4,10 \pm 0,44* |
| | <i>Oksaliptatin</i> | 1,00 \pm 0,1 | 2,59 \pm 0,39* | 28,80 \pm 2,58* | 1,30 \pm 0,20 | 279,15 \pm 64,49* |

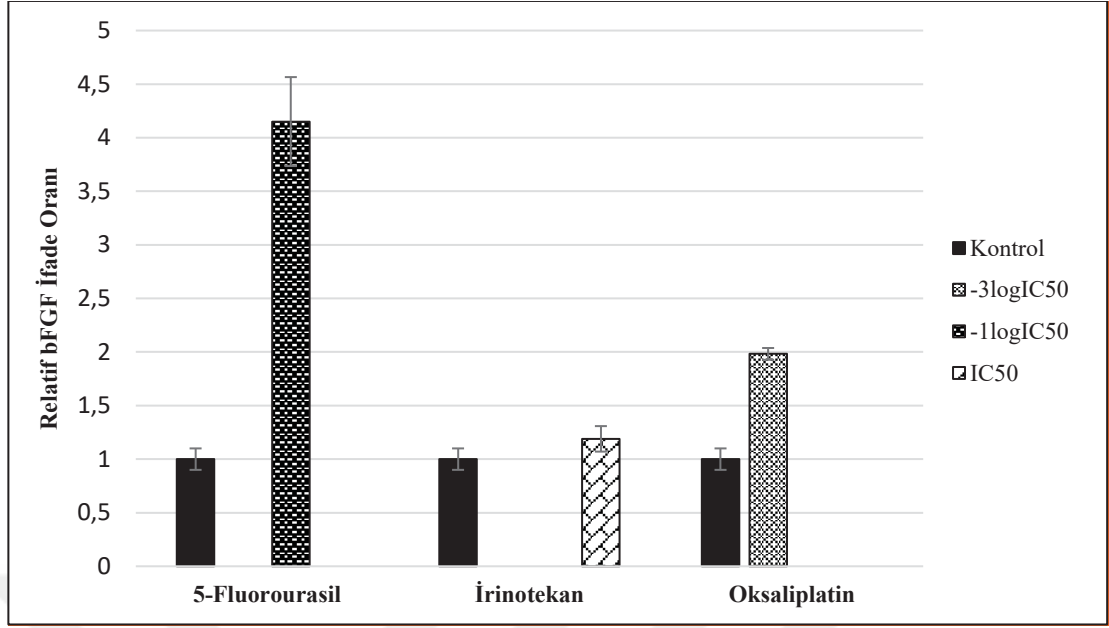
* p<0.05.

3.4.3. bFGF Gen İfadesi

LNCaP hücrelerinde 5-FU, irinotekan ve oksaliptatin ile bFGF ifadesinde belirgin bir baskılanma izlenmiştir (Çizelge 3.7). MCF-7 hücrelerinde bFGF gen ifadesi gözlenmemiştir. HT-29 hücrelerinde ise her üç ilaç ile genel olarak bFGF ifadesinde baskılanma izlenirken 5-FU -1logIC50 ve oksaliptatin -3logIC50 dozlarında gen ifadesinde bir artış gözlenmiştir (Çizelge 3.7; Şekil 3.14).



Şekil 3.13. Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış LNCaP hücrelerinde bFGF ifadesi



Şekil 3.14. Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış HT-29 hücrelerinde bFGF ifadesi

Çizelge 3.7. Kemoterapi ilaçları uygulanmış hücrelerin $\Delta\Delta C_t$ metodu ile kontrol gruplarına göre bFGF gen düzeyindeki değişimler (Ortalama \pm Standart Hata).

| | | Kontrol | -3logIC50 | -2logIC50 | -1logIC50 | IC50 |
|-------|----------------|-------------|-----------------|-----------|-----------------|-----------------|
| LNCaP | 5-fluorourasil | 1 \pm 0,1 | - | - | - | - |
| | Irinotekan | 1 \pm 0,1 | 0,30 \pm 0,03 | - | - | - |
| | Oksaliptatin | 1 \pm 0,1 | - | - | - | - |
| MCF-7 | 5-fluorourasil | - | - | - | - | - |
| | Irinotekan | - | - | - | - | - |
| | Oksaliptatin | - | - | - | - | - |
| HT-29 | 5-fluorourasil | 1 \pm 0,1 | - | - | 4,15 \pm 0,42 | - |
| | Irinotekan | 1 \pm 0,1 | - | - | - | 1,19 \pm 0,12 |
| | Oksaliptatin | 1 \pm 0,1 | 1,98 \pm 0,06 | - | - | - |

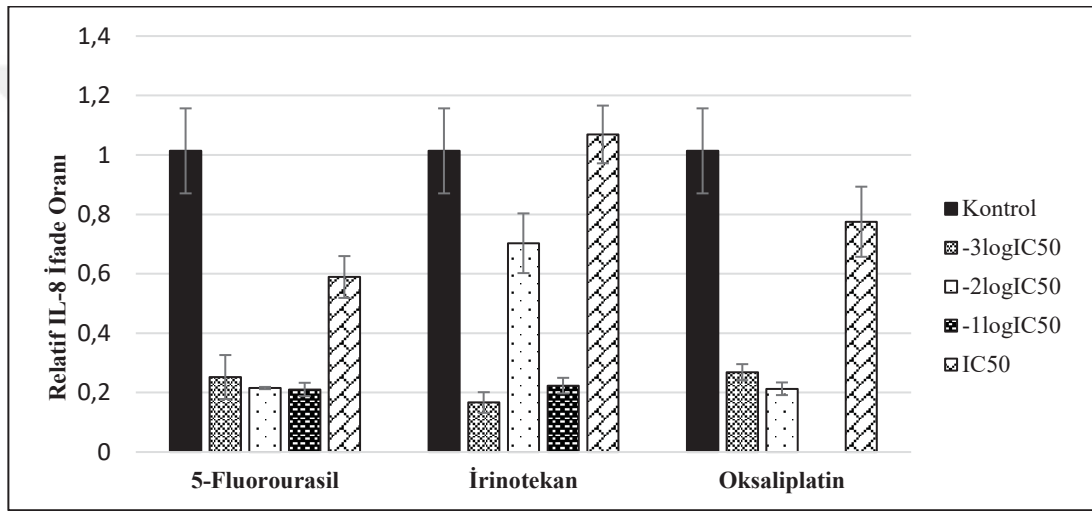
* p<0.05.

3.4.4. IL-8 Gen İfadesi

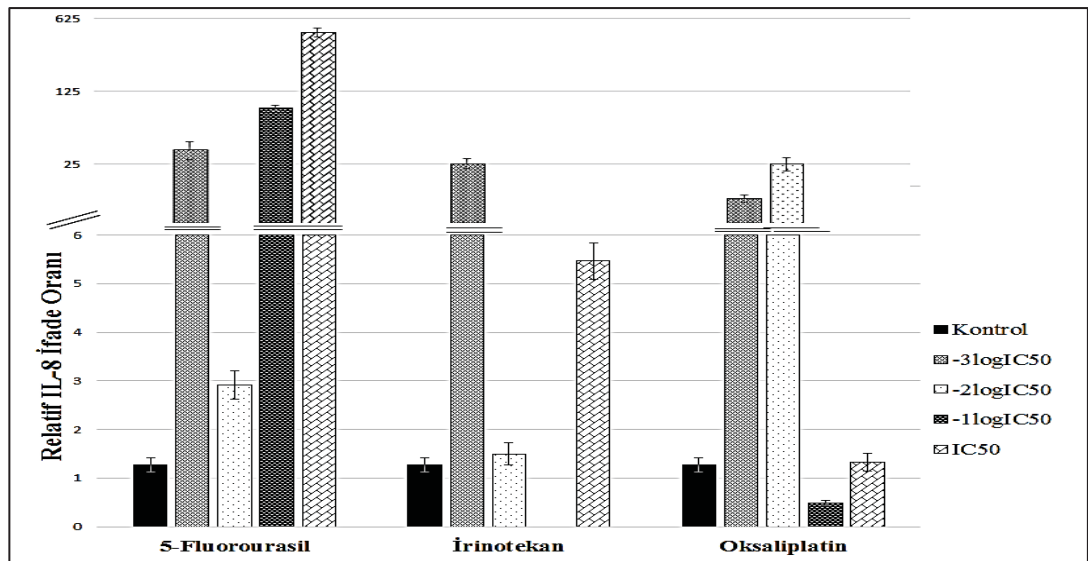
LNCaP hücrelerinde 5-fluorourasil uygulanan tüm dozlarda kontrole göre IL-8 geni ifadesinde belirgin azalmaya neden olmuştur (Çizelge 3.8; Şekil 3.15). Irinotekan ve oksaliptatin ise IC50 dozlarında IL-8 gen ifadesinde anlamlı bir değişiklik yapmazken düşük dozlarda (-3logIC50, -2logIC50, -1logIC50) anlamlı bir azalmaya neden olmuştur (Çizelge 3.8; Şekil 3.15).

MCF-7 hücrelerinde 5-FU tüm dozlarda IL-8 ifadesini arttırırken irinotekan ve oksaliplatin ilaçları -1logIC50 dışındaki dozlarda arttırmıştır (Çizelge 3.8; Şekil 3.16). Oksaliplatin -1logIC50 dozunda ise IL-8 gen ifadesi anlamlı olarak baskılanmıştır (Çizelge 3.8).

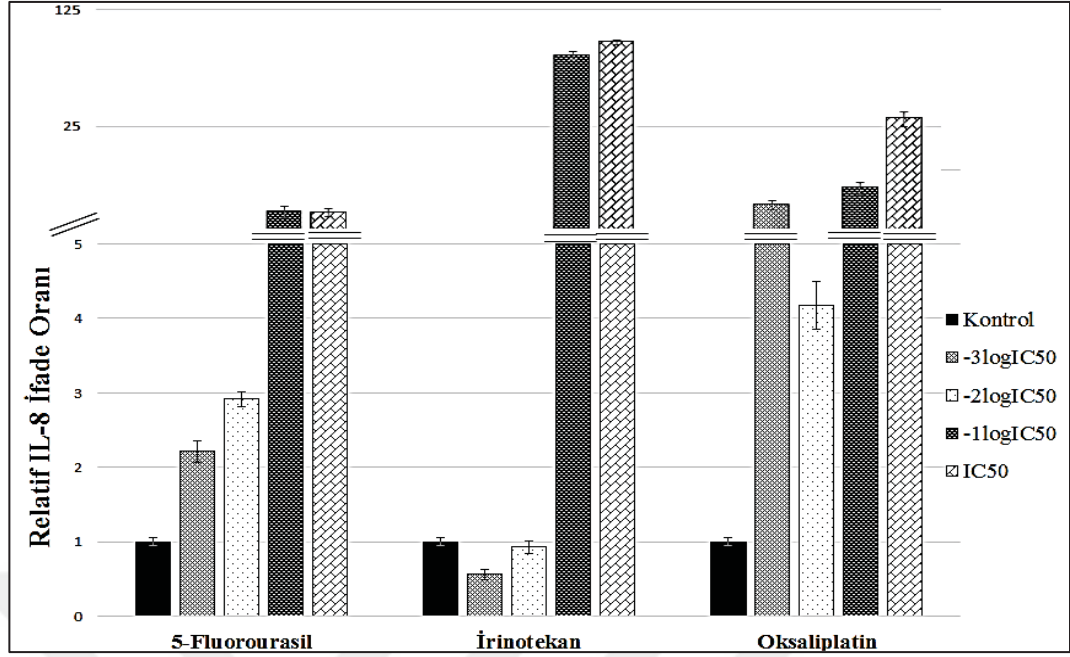
HT-29 hücrelerinde 5-FU ve oksaliplatin tüm dozlarda IL-8 gen ifadesini anlamlı olarak arttırırken sadece irinotekan -3logIC50 dozunda belirgin olarak IL-8 ifadesi azalmıştır (Çizelge 3.8; Şekil 3.17).



Şekil 3.15. Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış LNCaP hücrelerinde IL-8 ifadesi



Şekil 3.16. Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış MCF-7 hücrelerinde IL-8 ifadesi



Şekil 3.17. Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış HT-29 hücrelerinde IL-8 ifadesi

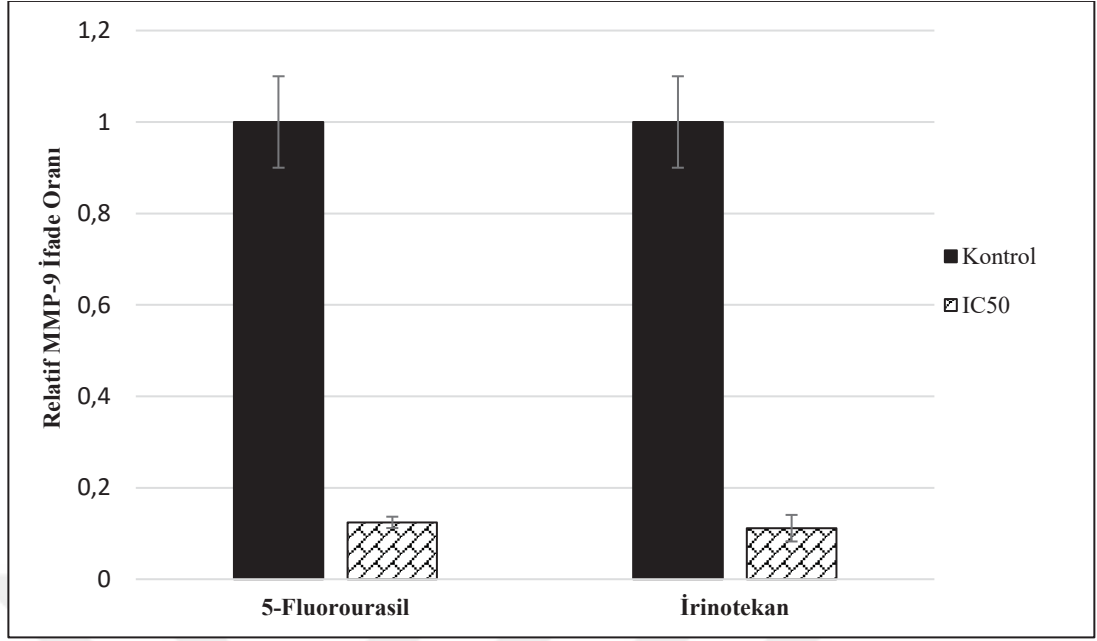
Çizelge 3.8. Kemoterapi ilaçları uygulanmış hücrelerin $\Delta\Delta Ct$ metodu ile kontrol gruplarına göre IL-8 gen düzeyindeki değişimler (Ortalama \pm Standart Hata).

| | | Kontrol | -3logIC50 | -2logIC50 | -1logIC50 | IC50 |
|-------|----------------|-----------|-------------|-------------|-------------|---------------|
| LNCaP | 5-fluorourasil | 1,01±0,14 | 0,25±0,07* | 0,22±0,01* | 0,21±0,02* | 0,59±0,07* |
| | İrinotekan | 1,01±0,14 | 0,17±0,04* | 0,70±0,10* | 0,22±0,03* | 1,07±0,10 |
| | Oksaliptatin | 1,01±0,14 | 0,27±0,03* | 0,21±0,02* | - | 0,78±0,12 |
| MCF-7 | 5-fluorourasil | 1,27±0,14 | 34,24±6,66* | 2,91±0,29* | 86,05±4,47* | 459,33±45,93* |
| | İrinotekan | 1,27±0,14 | 25,26±2,54* | 1,49±0,23 | - | 5,46±0,38* |
| | Oksaliptatin | 1,27±0,14 | 11,55±0,95* | 24,87±3,70* | 0,48±0,05* | 1,33±0,19 |
| HT-29 | 5-fluorourasil | 1,00±0,05 | 2,21±0,14* | 2,92±0,10* | 7,60±0,61* | 7,55±0,39* |
| | İrinotekan | 1,00±0,05 | 0,56±0,07* | 0,93±0,08 | 66,50±3,96* | 79,78±2,34* |
| | Oksaliptatin | 1,00±0,05 | 8,39±0,48* | 4,17±0,32* | 10,59±0,92* | 27,63±2,70* |

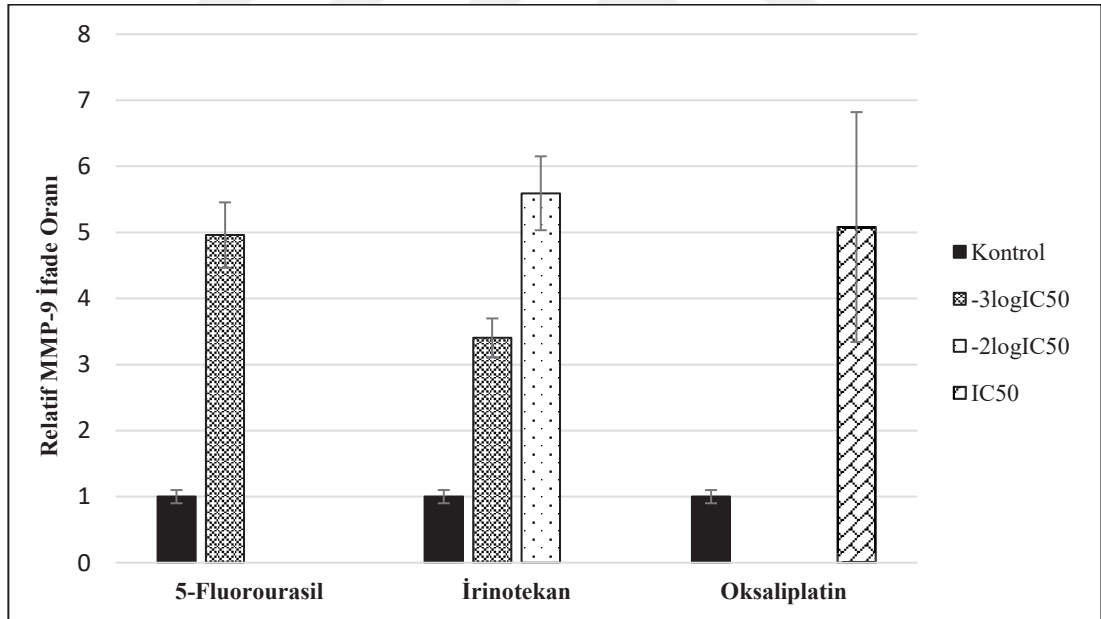
* p<0.05.

3.4.5. MMP-9 Gen İfadesi

Uygulanan kemoterapi ilaçları LNCaP hücrelerinde MMP-9 ifadesini belirgin olarak baskılamıştır (Çizelge 3.9; Şekil 3.18). MCF-7 hücrelerinde ise 5-FU ve irinotekan düşük dozlarda (-3logIC50) MMP-9 ifadesini arttırmıştır (Çizelge 3.9; Şekil 3.19). HT-29 hücrelerinde ise MMP-9 geninde kontrol ve ilaç uygulanmış örneklerde ifade gözlenmemiştir (Çizelge 3.9).



Şekil 3.18. Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış LNCaP hücrelerinde MMP-9 ifadesi



Şekil 3.19. Kemoterapi ilaçları uygulanmış ve uygulanmamış MCF-7 hücrelerinde MMP-9 ifadesi

Çizelge 3.9. Kemoterapi ilaçları uygulanmış hücrelerin $\Delta\Delta Ct$ metodu ile kontrol gruplarına göre MMP-9 gen düzeyindeki değişimler (Ortalama \pm Standart Hata).

| | | Kontrol | -3logIC50 | -2logIC50 | -1logIC50 | IC50 |
|-------|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------|-----------------|
| LNCaP | <i>5-fluorourasil</i> | 1,00 \pm 0,10 | - | - | - | 0,12 \pm 0,01 |
| | <i>İrinotekan</i> | 1,00 \pm 0,10 | - | - | - | 0,11 \pm 0,03 |
| | <i>Oksaliptatin</i> | 1,00 \pm 0,10 | - | - | - | - |
| MCF-7 | <i>5-fluorourasil</i> | 1,00 \pm 0,10 | 4,96 \pm 0,50 | - | - | - |
| | <i>İrinotekan</i> | 1,00 \pm 0,10 | 3,40 \pm 0,29 | 5,59 \pm 0,56 | - | - |
| | <i>Oksaliptatin</i> | 1,00 \pm 0,10 | - | - | - | 5,08 \pm 1,74 |
| HT-29 | <i>5-fluorourasil</i> | - | - | - | - | - |
| | <i>İrinotekan</i> | - | - | - | - | - |
| | <i>Oksaliptatin</i> | - | - | - | - | - |

* p<0.05.

3.5. Hücre Besiortamına Salınan Anjiyogenik Faktör Düzeyleri

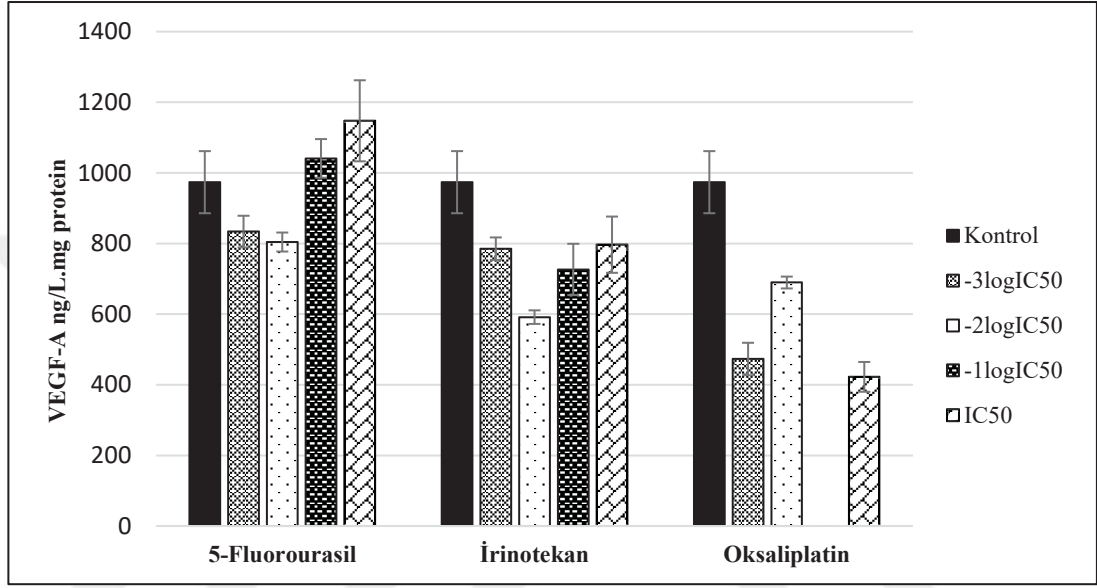
Tez çalışmasında ELISA yöntemiyle 5-FU, irinotekan ve oksaliptatinin farklı dozlarının LNCaP, MCF-7 ve HT-29 hücrelerinden salgılanan VEGF-A, PDGF-B, bFGF, IL-8 ve MMP-9 sitokin düzeylerine etkisi araştırılmıştır. Sitokin düzeyleri Bradford yöntemiyle hücre vasatında mg protein başına düşen miktarları olarak standardize edilmiştir. Hücre vasatlarındaki sitokin konsantrasyonları, her proteinin kendi standartları ile kalibrasyon eğrisi oluşturularak hesaplanmıştır. Sitokin konsantrasyonları Şekil 3.20 – 3.34 ve Çizelge 3.10 – 3.14’de gösterilmiştir.

3.5.1 VEGF-A Düzeyleri

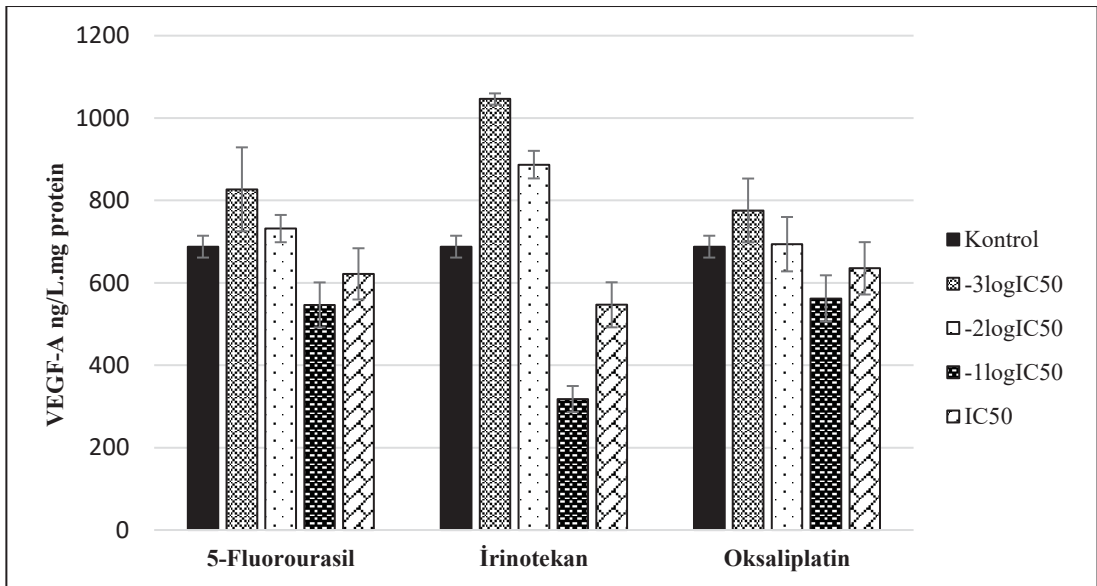
LNCaP hücrelerinde VEGF-A düzeyleri irinotekan ve oksaliptatin ilaç dozları uygulandığında kontrol örneklerine göre anlamlı olarak düşmüştür. 5-fluorourasil ise -3logIC50 ve -2logIC50 dozlarında VEGF-A düzeyleri anlamlı olarak azalırken, IC50 dozunda anlamlı bir şekilde artmıştır (Çizelge 3.10; Şekil 3.20).

MCF-7 hücrelerinde kemoterapi ilaçlarının -3logIC50 ve -2logIC50 dozlarında VEGF-A düzeyleri artış gösterirken, -1logIC50 ve IC50 dozlarında ise azalmaya neden olmuştur (Çizelge 3.10; Şekil 3.21). MCF-7 hücrelerinde en belirgin azalma irinotekan -1logIC50 dozunda izlenmiştir (Çizelge 3.10; Şekil 3.20).

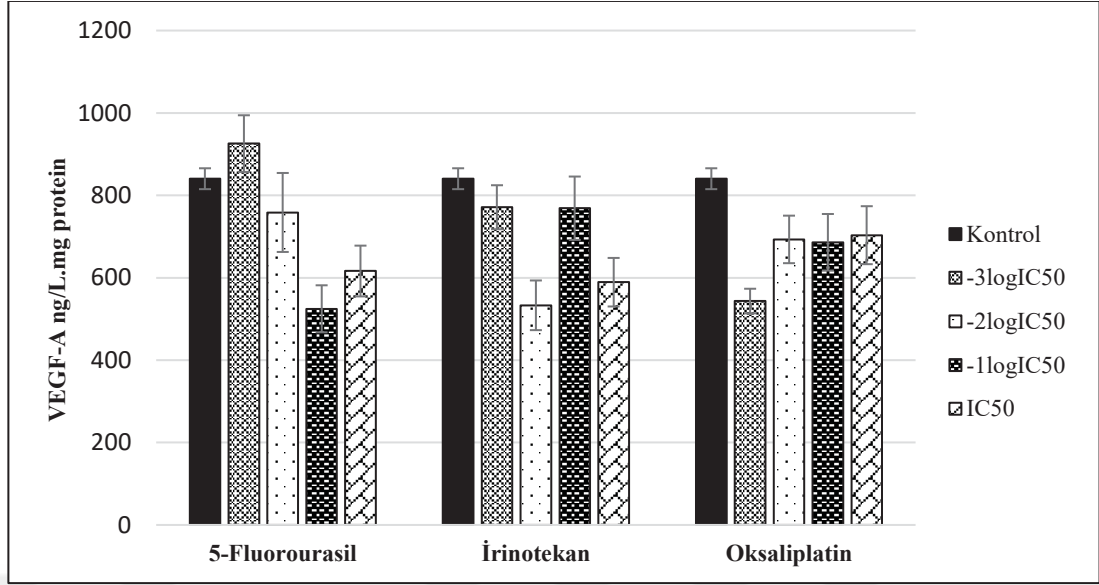
HT-29 hücrelerinde ise 5-FU sadece $-1\log IC_{50}$ ve IC_{50} dozlarında VEGF-A düzeylerinde anlamlı azalmaya neden olurken, irinotekan $-2\log IC_{50}$ ve IC_{50} dozlarında, oksaliplatin de ise her üç düşük dozda da ($-3\log IC_{50}$, $-2\log IC_{50}$ ve $-1\log IC_{50}$) istatistiksel olarak anlamlı azalmaya neden olmuştur (Çizelge 3.10; Şekil 3.22).



Şekil 3.20. Kemoterapi ilaçlarının LNCaP hücrelerinde VEGF-A düzeylerine etkisi



Şekil 3.21. Kemoterapi ilaçlarının MCF-7 hücrelerinde VEGF-A düzeylerine etkisi



Şekil 3.22. Kemoterapi ilaçlarının HT-29 hücrelerinde VEGF-A düzeylerine etkisi

Çizelge 3.10. Kemoterapi ilaçları uygulanmış hücrelerdeki VEGF-A düzeyleri (ng/L.mg protein) (Ortalama ± Standart Hata).

| | | Kontrol | -3logIC50 | -2logIC50 | -1logIC50 | IC50 |
|-------|----------------|--------------|----------------|---------------|---------------|-----------------|
| LNCaP | 5-fluorourasil | 973,68±87,93 | 833,79±44,83* | 804,20±26,90* | 1040,97±54,77 | 1147,51±114,75* |
| | İrinotekan | 973,68±87,93 | 785,50±31,75* | 591,51±19,24* | 726,51±72,65* | 796,64±79,66* |
| | Oksaliptatin | 973,68±87,93 | 472,94±45,94* | 689,52±16,80* | 0,00* | 422,33±42,23* |
| MCF-7 | 5-fluorourasil | 687,85±26,52 | 827,03±101,85* | 731,68±33,14 | 546,42±54,64* | 621,76±62,18 |
| | İrinotekan | 687,85±26,52 | 1046,22±13,66* | 886,91±33,47* | 317,82±31,78* | 546,70±54,67* |
| | Oksaliptatin | 687,85±26,52 | 775,70±77,51 | 693,85±65,99 | 562,08±56,21 | 635,22±63,52 |
| HT-29 | 5-fluorourasil | 840,39±25,36 | 925,63±68,75 | 758,47±95,87 | 524,58±57,07* | 616,35±61,64* |
| | İrinotekan | 840,39±25,36 | 771,12±53,42 | 533,12±60,30* | 768,78±76,89 | 589,21±58,92* |
| | Oksaliptatin | 840,39±25,36 | 543,46±29,87* | 693,05±57,71* | 686,14±68,61* | 703,32±70,33 |

* p<0.05.

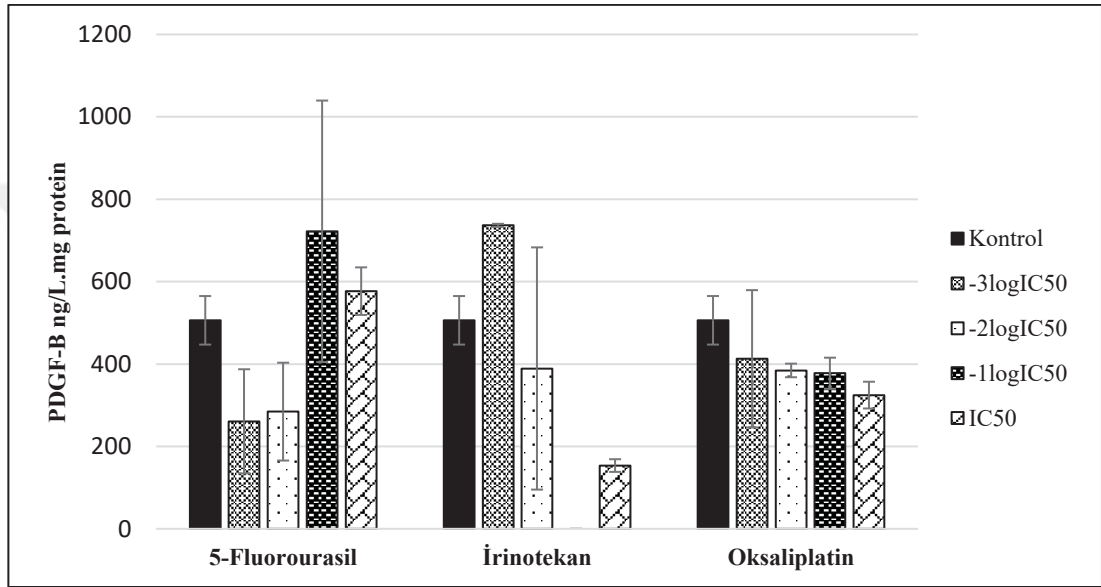
3.5.2. PDGF-BB Düzeyleri

LNCaP hücrelerinde kemoterapi ilaçları genel olarak PDGF-BB düzeyini azaltmış olsa da bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 3.11; Şekil 3.23). İrinotekan -1logIC50 dozunda PDGF-BB düzeyi ölçülemeyecek düzeylerde bulunmuştur.

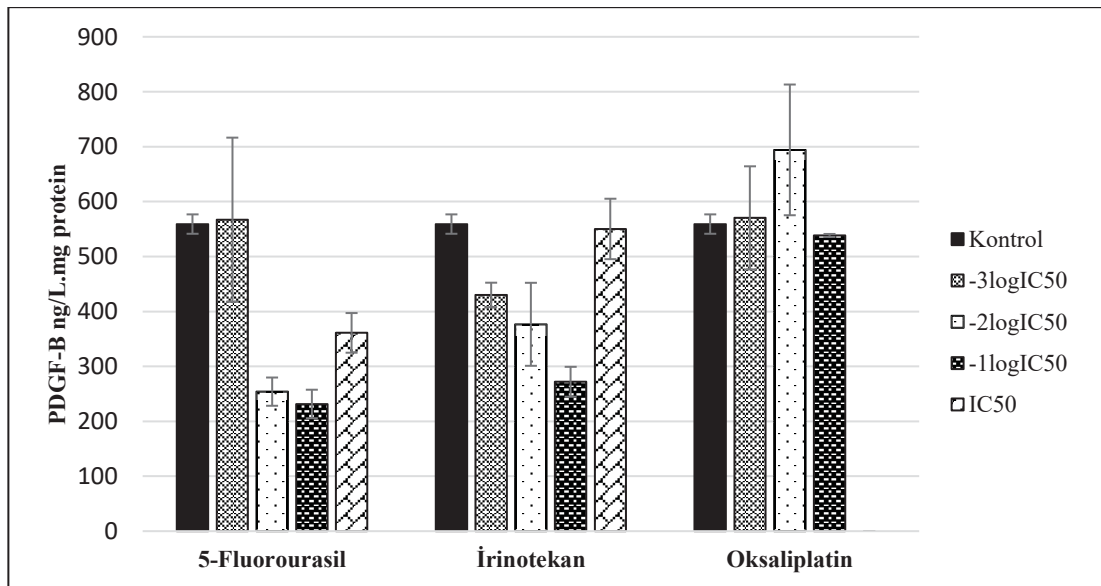
5-fluorourasil -2logIC50, -1logIC50 ve IC50, irinotekan -1logIC50 dozlarında MCF-7 hücrelerinde PDGF-BB düzeylerini anlamlı olarak azaltmıştır (Çizelge 3.11;

Şekil 3.24). MCF-7 hücrelerinde oksaliplatin PDGF-BB düzeylerini anlamlı olarak değiştirmezken sadece IC50 dozunda ölçülemeyecek düzeylerde bulunmuştur.

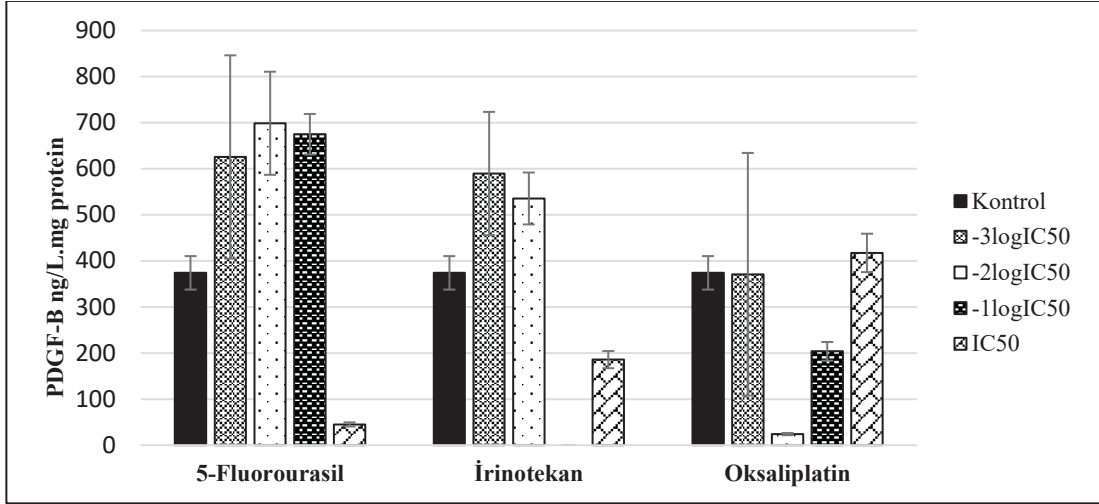
HT-29 hücrelerinde genel olarak kontrol örneklerine göre PDGF-BB düzeylerinde artış gözlenirken, sadece irinotekan -1logIC50 ve oksaliplatin -2logIC50 dozlarında anlamlı azalma izlenmiştir (Çizelge 3.11; Şekil 3.25).



Şekil 3.23. Kemoterapi ilaçlarının LNCaP hücrelerinde PDGF-BB düzeylerine etkisi



Şekil 3.24. Kemoterapi ilaçlarının MCF-7 hücrelerinde PDGF-BB düzeylerine etkisi



Şekil 3.25. Kemoterapi ilaçlarının HT-29 hücrelerinde PDGF-BB düzeylerine etkisi

Çizelge 3.11. Kemoterapi ilaçları uygulanmış hücrelerdeki PDGF-BB düzeyleri (ng/L.mg protein) (Ortalama ± Standart Hata).

| | | Kontrol | -3logIC50 | -2logIC50 | -1logIC50 | IC50 |
|-------|----------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| LNCaP | 5-fluorourasil | 506,14±58,91 | 260,92±126,39 | 284,49±118,73 | 722,14±317,35 | 576,93±57,69 |
| | İrinotekan | 506,14±58,91 | 736,62±3,74 | 389,19±293,97 | 0,00* | 153,62±15,36 |
| | Oksaliplatin | 506,14±58,91 | 412,76±166,61 | 384,47±16,50 | 377,64±37,76 | 324,63±42,46 |
| MCF-7 | 5-fluorourasil | 559,06±17,64 | 566,98±149,43 | 254,03±25,71* | 231,54±25,99* | 361,00±36,10* |
| | İrinotekan | 559,06±17,64 | 430,13±22,24 | 376,59±75,56 | 271,98±27,20* | 550,21±55,02 |
| | Oksaliplatin | 559,06±17,64 | 570,36±93,88 | 694,15±118,98 | 538,36±2,72 | 0,00* |
| HT-29 | 5-fluorourasil | 374,09±36,33 | 625,53±220,68 | 698,75±111,89 | 674,97±44,04 | 44,99±4,50 |
| | İrinotekan | 374,09±36,33 | 589,72±133,73 | 535,48±56,38 | 0,00* | 185,69±18,57 |
| | Oksaliplatin | 374,09±36,33 | 371,02±263,38 | 24,09±2,41* | 203,71±20,37 | 417,31±41,73 |

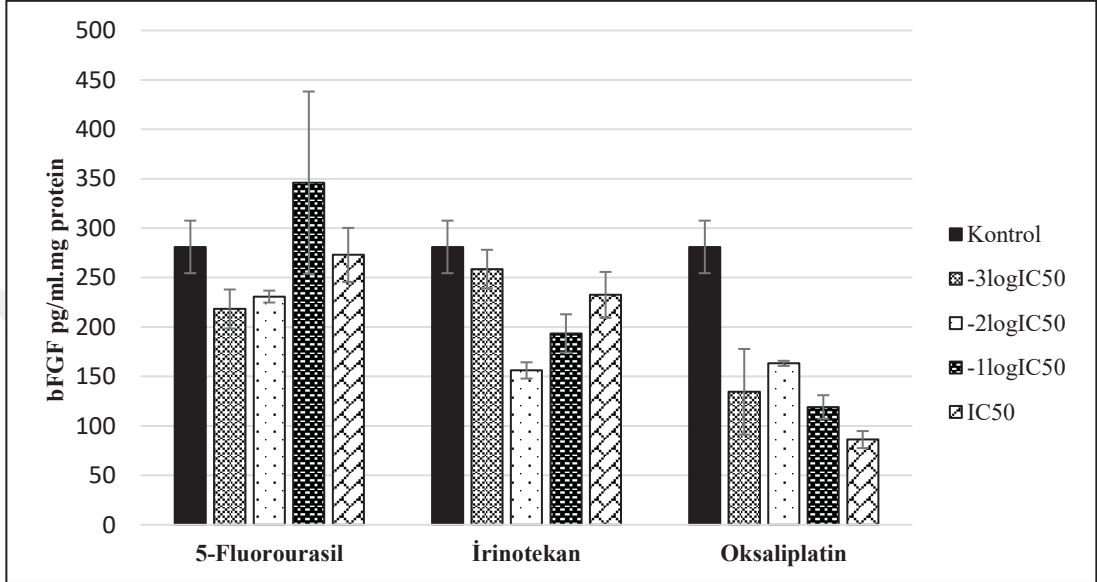
* p<0.05.

3.5.3. bFGF Düzeyleri

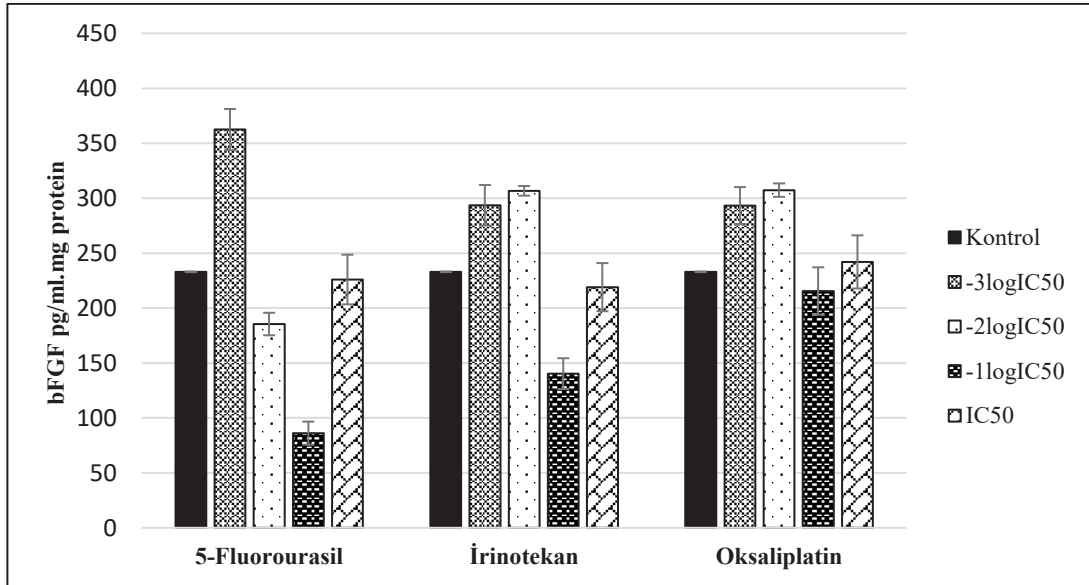
LNCaP hücrelerinde 5-fluorourasil uygulanan dozlarda bFGF düzeylerinde bir değişikliğe yol açmazken irinotekan sadece -2logIC50 dozunda anlamlı azalmaya neden olmuştur (Çizelge 3.12; Şekil 3.26). Oksaliplatin ise uygulanan tüm dozlarda bFGF düzeylerinde anlamlı azalmaya neden olmuştur (Çizelge 3.12; Şekil 3.26).

MCF-7 hücrelerinde ilaçların genellikle -3logIC50 ve -2logIC50 dozları bFGF düzeylerinde anlamlı artışa yol açarken sadece 5-FU -2logIC50 ve -1logIC50 ve irinotekan -1logIC50 dozları azalmaya neden olmuştur (Çizelge 3.12; Şekil 3.27).

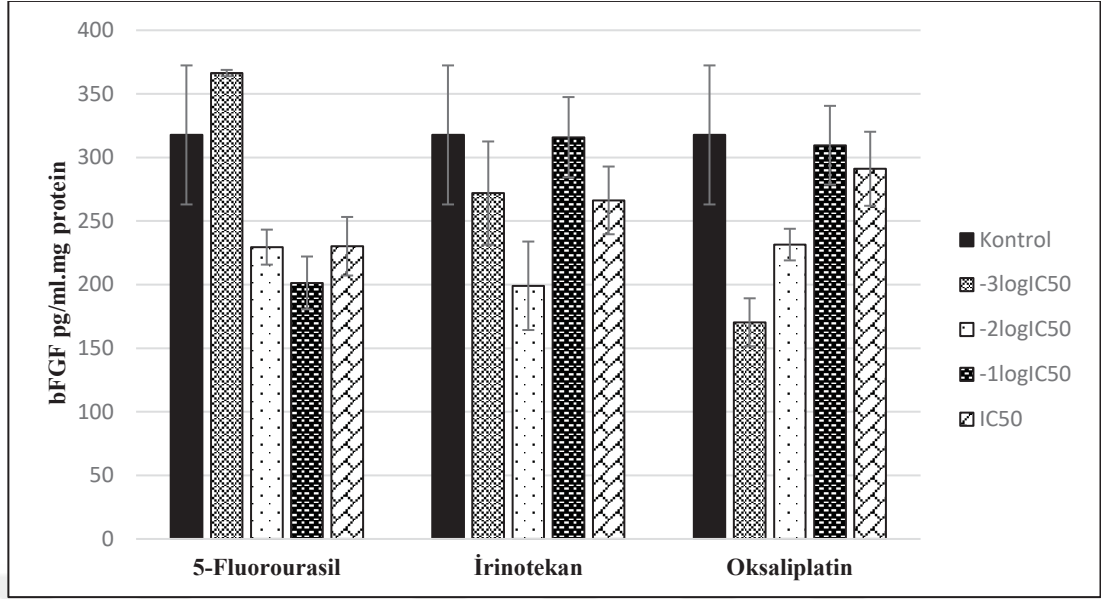
HT-29 hücrelerinde ise uygulanan 3 ilacın $-2\log IC_{50}$ dozları bFGF düzeylerinde anlamlı azalmaya neden olmuştur (Çizelge 3.12; Şekil 3.28). Ayrıca oksaliplatin $-3\log IC_{50}$ ve 5-FU $-1\log IC_{50}$ ve IC_{50} dozları da anlamlı azalmaya yol açmıştır (Çizelge 3.12; Şekil 3.28).



Şekil 3.26. Kemoterapi ilaçlarının LNCaP hücrelerinde bFGF düzeylerine etkisi



Şekil 3.27. Kemoterapi ilaçlarının MCF-7 hücrelerinde bFGF düzeylerine etkisi



Şekil 3.28. Kemoterapi ilaçlarının HT-29 hücrelerinde bFGF düzeylerine etkisi

Çizelge 3.12. Kemoterapi ilaçları uygulanmış hücrelerdeki bFGF protein düzeyleri (pg/ml.mg protein) (Ortalama \pm Standart Hata).

| | | Kontrol | -3logIC50 | -2logIC50 | -1logIC50 | IC50 |
|-------|----------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| LNCaP | 5-fluorourasil | 281,04 \pm 26,57 | 218,27 \pm 19,72 | 230,83 \pm 6,01 | 346,02 \pm 92,20 | 272,99 \pm 27,30 |
| | İrinotekan | 281,04 \pm 26,57 | 258,59 \pm 19,56 | 156,15 \pm 8,21* | 193,56 \pm 19,36 | 232,51 \pm 23,25 |
| | Oksaliptatin | 281,04 \pm 26,57 | 134,55 \pm 43,30* | 163,29 \pm 2,58* | 119,16 \pm 11,92* | 86,17 \pm 8,62* |
| MCF-7 | 5-fluorourasil | 233,10 \pm 0,28 | 362,48 \pm 18,73* | 185,49 \pm 10,24* | 86,18 \pm 10,51* | 226,01 \pm 22,60 |
| | İrinotekan | 233,10 \pm 0,28 | 293,54 \pm 18,48* | 306,73 \pm 4,38* | 140,33 \pm 14,03* | 219,05 \pm 21,91 |
| | Oksaliptatin | 233,10 \pm 0,28 | 293,35 \pm 16,83* | 307,38 \pm 6,13* | 215,58 \pm 21,56 | 242,01 \pm 24,20 |
| HT-29 | 5-fluorourasil | 317,71 \pm 54,66 | 366,36 \pm 2,50 | 229,48 \pm 13,76* | 201,35 \pm 20,76* | 230,18 \pm 20,02* |
| | İrinotekan | 317,71 \pm 54,66 | 272,01 \pm 40,57 | 199,08 \pm 34,78* | 315,88 \pm 31,59 | 266,22 \pm 26,62 |
| | Oksaliptatin | 317,71 \pm 54,66 | 170,38 \pm 18,85* | 231,47 \pm 12,43* | 309,61 \pm 30,96 | 291,09 \pm 29,11 |

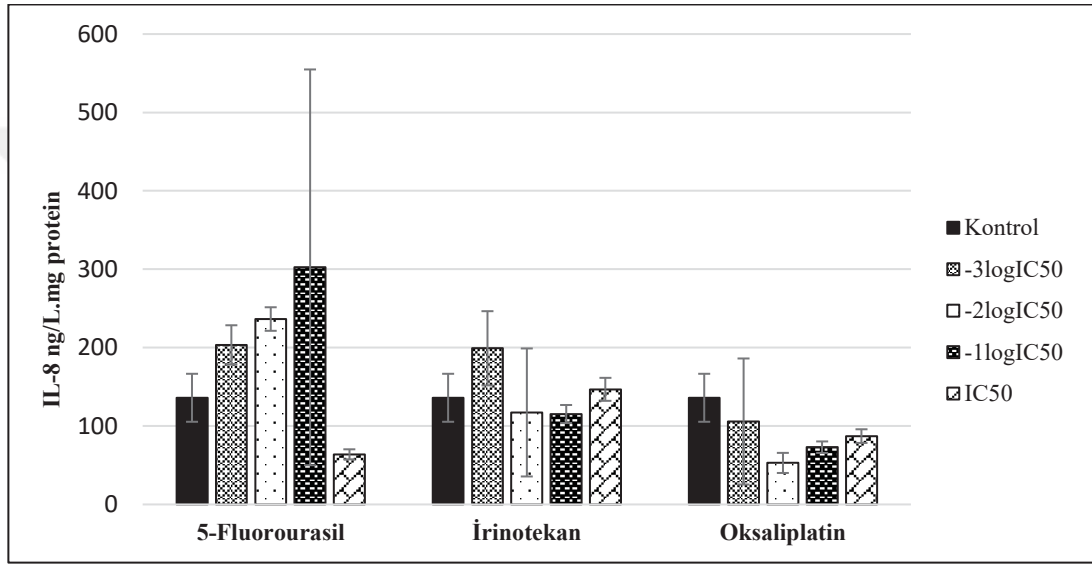
* p<0.05.

3.5.4. IL-8 Düzeyleri

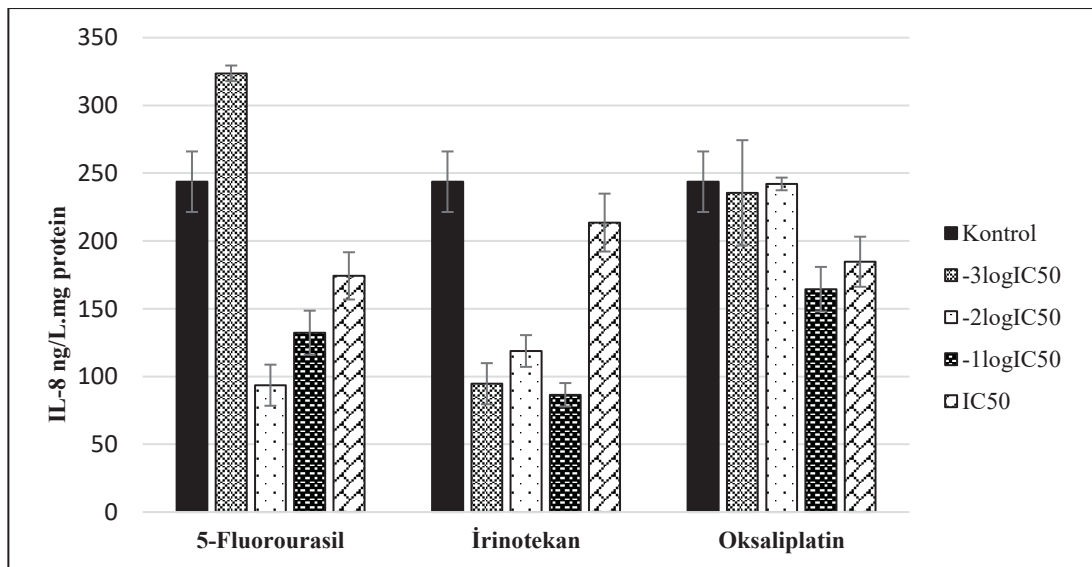
LNCaP hücrelerinde 3 kemoterapi ilacı uygulanan dozlarda IL-8 düzeyinde anlamlı değişikliğe yol açmamıştır (Çizelge 3.13; Şekil 3.29).

MCF-7 hücrelerinde 5-FU -3logIC50 dozunda kontrole göre IL-8 düzeyinde anlamlı bir artış izlenirken diğer ilaç dozlarında sitokin düzeyinde azalma izlenmiş olup, en fazla azalma 5-FU -2logIC50, irinotekan -3logIC50 ve -1logIC50 dozlarında gözlenmiştir (Çizelge 3.13; Şekil 3.30).

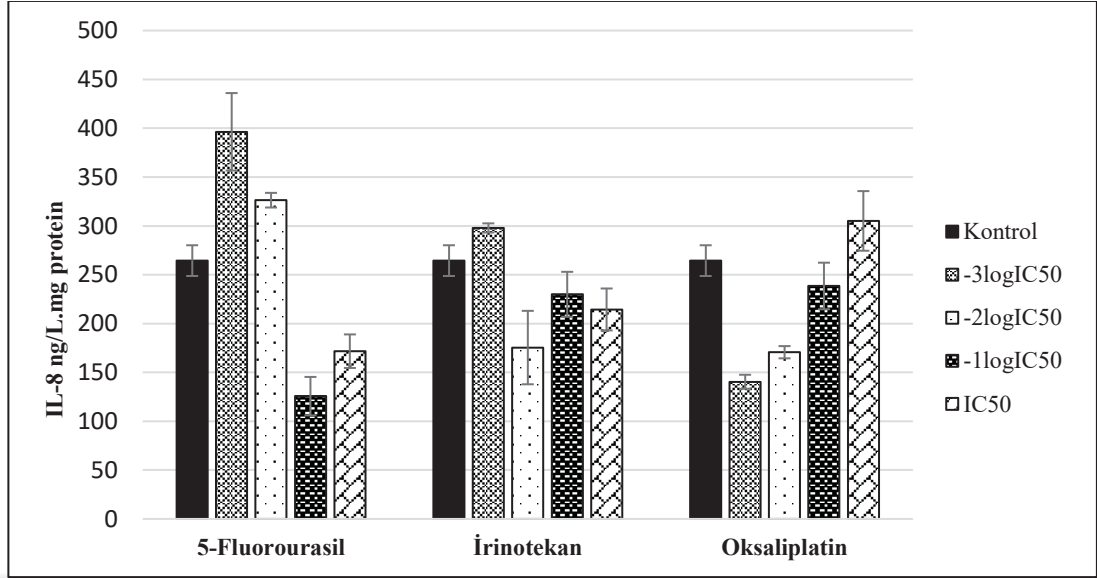
HT-29 hücrelerinde de, MCF-7 hücrelerine benzer şekilde 5-FU -3logIC50 ve -2logIC50 dozlarında kontrole göre IL-8 düzeyinde anlamlı artış gözlenmiştir (Çizelge 3.13; Şekil 3.31). Oksaliplatin ise IC50 dozunda anlamlı bir artışa yol açarken -3logIC50 ve -2logIC50 dozlarında kontrole göre IL-8 düzeyini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır (Çizelge 3.13; Şekil 3.31). İrinotekan ise -2logIC50 ve IC50 dozlarında IL-8 düzeylerini azaltırken diğer dozlarda etkilememiştir (Çizelge 3.13; Şekil 3.31).



Şekil 3.29. Kemoterapi ilaçlarının LNCaP hücrelerinde IL-8 düzeylerine etkisi



Şekil 3.30. Kemoterapi ilaçlarının MCF-7 hücrelerinde IL-8 düzeylerine etkisi



Şekil 3.31. Kemoterapi ilaçlarının HT-29 hücrelerinde IL-8 düzeylerine etkisi

Çizelge 3.13. Kemoterapi ilaçları uygulanmış hücrelerdeki IL-8 düzeyleri (ng/L.mg protein) (Ortalama ± Standart Hata).

| | | Kontrol | -3logIC50 | -2logIC50 | -1logIC50 | IC50 |
|-------|----------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| LNCaP | 5-fluorourasil | 136,03±30,60 | 203,52±25,03 | 236,49±15,01 | 302,44±252,42 | 63,93±6,39 |
| | İrinotekan | 136,03±30,60 | 199,16±47,34 | 117,33±81,63 | 115,31±11,53 | 146,81±14,68 |
| | Oksaliptatin | 136,03±30,60 | 105,82±80,37 | 52,95±12,82 | 73,04±7,30 | 87,15±8,72 |
| MCF-7 | 5-fluorourasil | 243,71±22,34 | 323,67±5,78* | 93,57±15,16* | 132,32±16,25* | 174,25±17,43* |
| | İrinotekan | 243,71±22,34 | 94,68±15,18* | 118,82±11,70 | 86,51±8,65* | 213,56±21,36 |
| | Oksaliptatin | 243,71±22,34 | 235,52±38,83 | 242,07±4,66 | 164,41±16,44* | 184,67±18,47* |
| HT-29 | 5-fluorourasil | 264,47±15,73 | 396,37±39,64* | 326,33±7,50* | 125,70±19,68* | 171,74±17,17* |
| | İrinotekan | 264,47±15,73 | 297,91±4,70 | 175,43±37,59* | 229,98±23,00 | 214,48±21,45* |
| | Oksaliptatin | 264,47±15,73 | 140,41±7,18* | 170,69±6,25* | 238,50±23,85 | 305,12±30,51* |

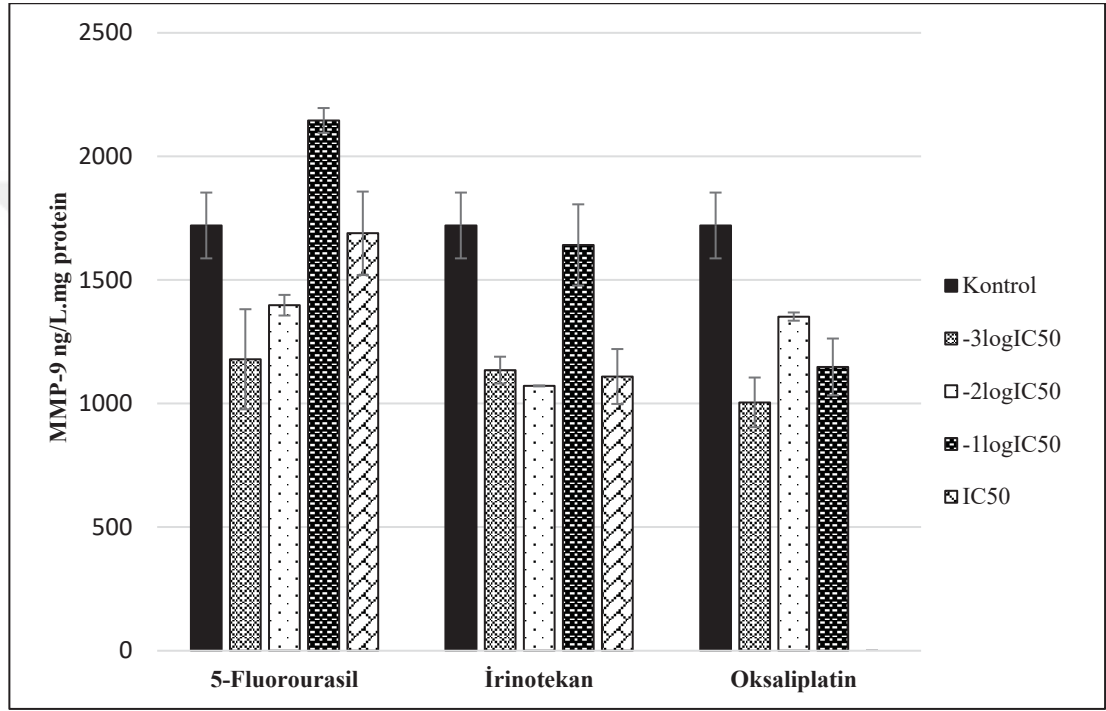
* p<0.05.

3.5.5. MMP-9 Düzeyleri

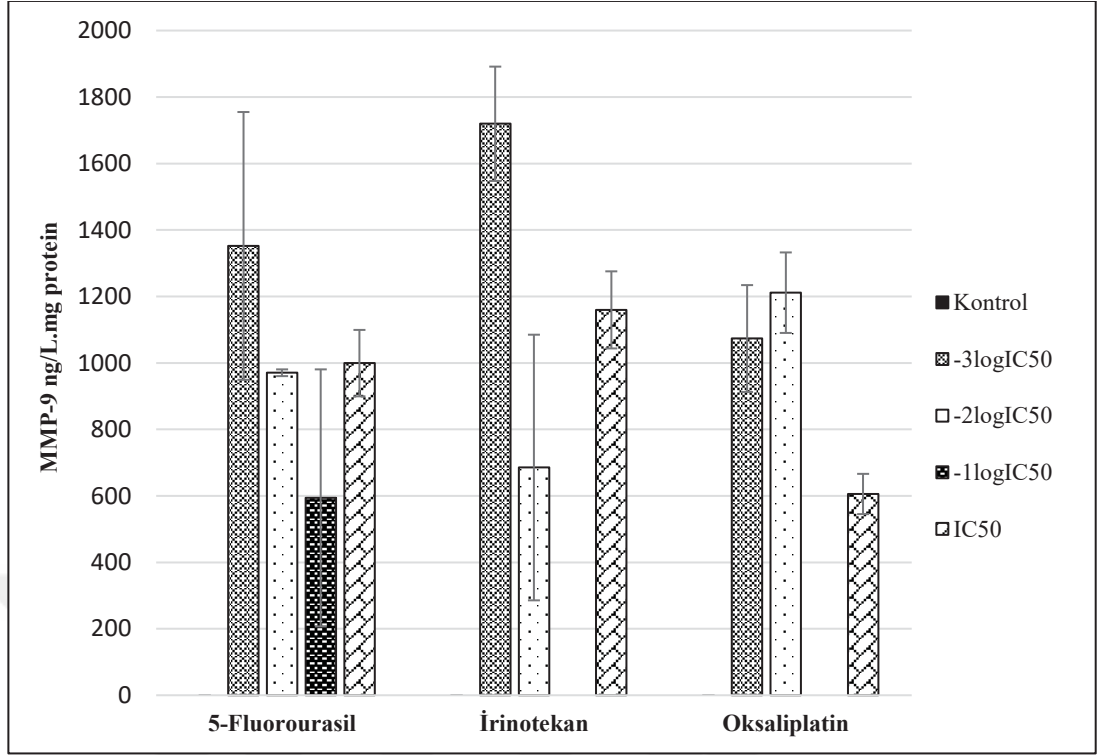
LNCaP hücrelerinde 5-fluorourasil ve irinotekan -3logIC50 ve -2logIC50 dozlarında MMP-9 düzeylerini anlamlı olarak azaltmıştır (Çizelge 3.14; Şekil 3.32). Oksaliptatin ise uygulanan tüm dozlarda MMP-9 düzeyini belirgin olarak azaltmıştır (Çizelge 3.14; Şekil 3.32).

MCF-7 kontrol hücrelerinde MMP-9 düzeyleri ölçülemeyecek düzeylerde iken kemoterapi uygulanan hücrelerde genel olarak artış gözlenmiştir (Şekil 3.33).

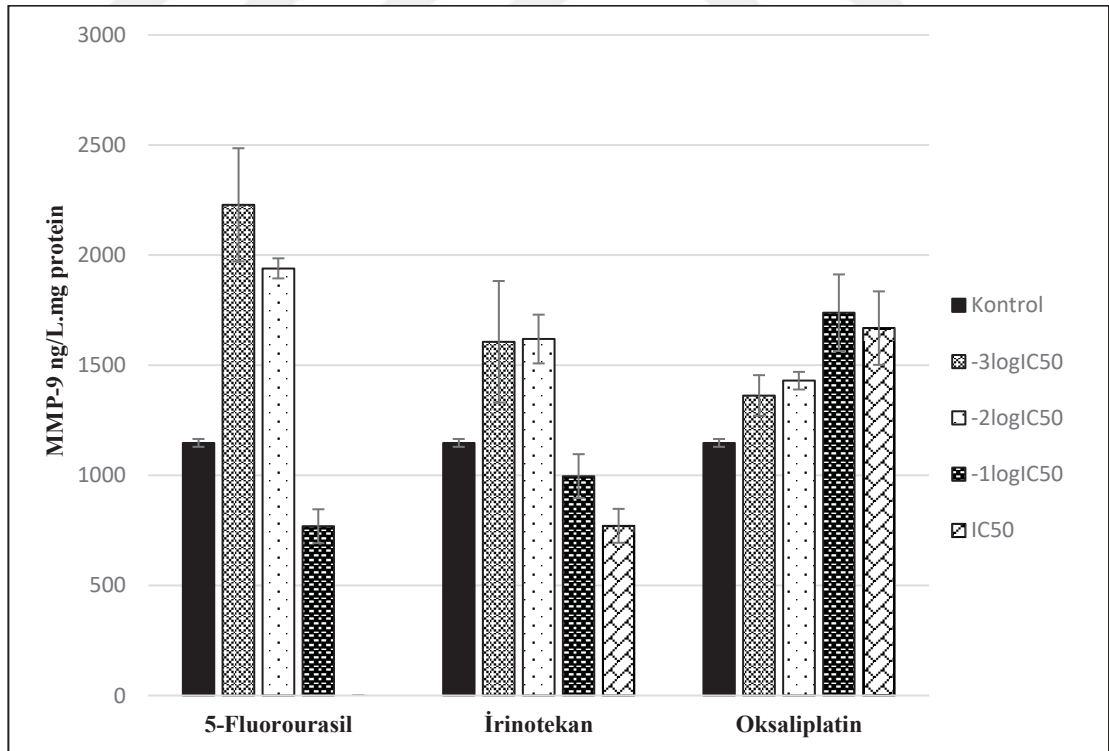
HT-29 hücrelerinde 5-florourasil ve irinotekan -3logIC50 ve -2logIC50 dozlarında MMP-9 düzeylerini anlamlı olarak arttırmıştır (Çizelge 3.14; Şekil 3.34). 5-FU -1logIC50 ve IC50 dozlarında belirgin azalma izlenmiştir (Çizelge 3.14; Şekil 3.34). Oksaliptatin ise IC50 ve -1logIC50 dozlarında MMP-9 düzeylerini anlamlı olarak arttırırken diğer dozlarda anlamlı değişikliğe sebep olmamıştır (Çizelge 3.14; Şekil 3.34).



Şekil 3.32. Kemoterapi ilaçlarının LNCaP hücrelerinde MMP-9 düzeylerine etkisi



Şekil 3.33. Kemoterapi ilaçlarının MCF-7 hücrelerinde MMP-9 düzeylerine etkisi



Şekil 3.34. Kemoterapi ilaçlarının HT-29 hücrelerinde MMP-9 düzeylerine etkisi

Çizelge 3.14. Kemoterapi ilaçları uygulanmış hücrelerdeki MMP-9 (ng/L.mg protein) (Ortalama ± Standart Hata).

| | | Kontrol | -3logIC50 | -2logIC50 | -1logIC50 | IC50 |
|-------|-----------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| LNCaP | <i>5-fluorourasil</i> | 1720,64±133,14 | 1179,31±202,52* | 1398,01±41,72* | 2145,69±50,10* | 1688,90±168,89 |
| | <i>İrinotekan</i> | 1720,64±133,14 | 1135,41±54,24* | 1071,40±1,89* | 1641,96±164,20 | 1109,65±110,97* |
| | <i>Oksaliplatin</i> | 1720,64±133,14 | 1004,86±100,49* | 1352,00±16,61* | 1148,31±114,83* | 0,00* |
| MCF-7 | <i>5-fluorourasil</i> | 0,00 | 1352,08±402,81* | 970,40±10,19* | 593,78±386,80 | 999,33±99,93* |
| | <i>İrinotekan</i> | 0,00 | 1719,59±171,96* | 685,22±399,63* | 0,00 | 1159,52±115,95* |
| | <i>Oksaliplatin</i> | 0,00 | 1073,32±160,79* | 1211,27±121,13* | 0,00 | 605,61±60,56* |
| HT-29 | <i>5-fluorourasil</i> | 1147,23±17,84 | 2228,60±256,98* | 1939,88±45,56* | 769,00±76,90* | 0,00* |
| | <i>İrinotekan</i> | 1147,23±17,84 | 1606,66±275,86* | 1618,98±110,76* | 996,35±99,64 | 770,59±77,06* |
| | <i>Oksaliplatin</i> | 1147,23±17,84 | 1362,61±92,41 | 1429,82±40,03 | 1738,59±173,86* | 1668,58±166,86* |

* p<0.05.

Eş zamanlı PZR ile anjiyogenik gen ifadeleri ile hücre kültür ortamına salgılanan sitokin düzeyleri arasındaki ilişki açısından sonuçlar değerlendirildiğinde VEGF-A sitokin düzeyleri ile mRNA düzeyleri açısından LNCaP ve HT-29 hücrelerinde anlamlı bir korelasyon izlenmiştir (p<0.05). MCF-7 hücrelerinde ise anlamlı bir korelasyon gözlenmemiştir. PDGF-B, bFGF ve MMP-9 sitokin düzeyleri ile bu genlerin mRNA düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır. IL-8 sitokin düzeyleri ile mRNA düzeyleri arasında özellikle her 3 ilacın düşük konsantrasyonlarında LNCaP, HT-29 ve MCF-7 hücrelerinde anlamlı korelasyon izlenmiştir (p<0.05).

4. TARTIŞMA

Konvansiyonel kemoterapi şemaları genel olarak kanser hücrelerinin öldürülmesi (sitotoksisite) esasına dayanır. Tümör hücrelerinin öldürülmesi işlemi genel olarak nonspesifiktir. Klasik kemoterapi uygulamalarında tümör hücrelerinin yanı sıra vücuttaki normal hücreler de zarar görmektedir. Tümör dışındaki hücrelerin gördüğü zarar genel olarak kemoterapi ilaçlarının doz ve kullanım sıklığını belirleyen en önemli faktördür. Rutin uygulamalarda genel olarak hastaların tolere edebileceği maksimum dozlar seçilerek tedavi ajanları uygulanmaktadır. Son yıllarda konvansiyonel kemoterapi ilaçlarının daha düşük dozlarda ve sık aralıklarla uygulanmasının da klinik yarar sağlayabileceğinin gösterilmesi ile bu uygulama şekli popülarite kazanmıştır. Metronomik kemoterapi olarak adlandırılan bu uygulama şeklinde, ilaçlar genellikle standart alışılmış dozların yaklaşık olarak %60-95 oranında azaltılarak sık aralıklarla (günlük sürekli ya da haftada en az 4-5 kez) kullanılmaktadır (Scharovsky ve ark., 2009; Norrby, 2014). Metronomik dozların ne kadar olması gerektiği konusunda klinik veri olmasına karşın bu dozların biyolojik etkinliği konusunda yeterli veri bulunmamaktadır. Bu tez çalışmamızda klinikte gastrointestinal tümörlerin tedavisinde sıklıkla kullanılan 5-florourasil, irinotekan ve oksaliptatin kemoterapi ilaçlarının metronomik olarak kullanılabilmesi dozlarda in vitro etkinlik açısından değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Metronomik kemoterapi uygulamasının tümör hücrelerinde uzun dönemde apoptozisi uyarmasının yanı sıra tümör damarlarında endotel hücrelerinde apoptozu uyurabileceği ve dolayısıyla anjiyogenezi baskılayabileceği bildirilmiştir (Allegrini ve ark., 2008; Fioravanti ve ark., 2009). Ancak metronomik kemoterapi uygulamasının anjiyogenezde rol alan sitokinler üzerindeki etkisi net olarak bilinmemektedir. Kliniğimizde daha önce yaptığımız bir çalışmada kemoterapi ilaçlarının tümör hücrelerinden VEGF salgısını azalttığı gösterilmiştir (Aktas ve ark., 2012/2013). Metronomik kemoterapinin VEGF dışında diğer anjiyogenik faktör salgısı üzerindeki etkisi pek çalışılmamıştır. Gliomalı hastalarda yapılan bir çalışmada, metronomik dozda kemoterapi uygulamasında tedavi etkinliği ile VEGF, bFGF, endostatin ve trombospondin-1 düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Kesari ve ark., 2007). Bununla

birlikte metronomik tedavi uygulamasının anti-anjiyogenik sitokin düzeylerini arttırdığını gösteren az sayıda çalışma vardır (Damber ve ark., 2006). Bu çalışmamızda öncelikle gastrointestinal sistem kanserleri tedavisinde kullanılan 5-FU, irinotekan ve oksaliplatinin IC50 dozları belirlenerek bu dozların %10, %1 ve %0,1'lik dozların tümör hücrelerinde anjiyogenik faktör yapımı üzerindeki etkilerini hem mRNA düzeyinde hem de besiyerine salgılanan sitokin düzeyinde araştırılmıştır. Anjiyogenik faktörler olarak VEGF-A, bFGF, MMP-9, PDGF-B, IL-8 hem mRNA ve hem de salgılanan sitokin düzeyinde incelenmiştir.

Kemoterapi ilaçlarının VEGF-A yapımı üzerindeki etkisi tümör hücresi tipine ve ilaç dozlarına göre göstermiştir. Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar bildirilmiştir (Albertsson ve ark., 2012; Duyndam ve ark., 2007; Albertsson ve ark., 2009). LNCaP ve MCF-7 hücrelerinde genellikle $-3\log IC_{50}$ ve $-2\log IC_{50}$ düzeyinde uygulanan 5-FU, irinotekan ve oksaliplatin VEGF-A yapımını mRNA düzeyinde belirgin olarak baskılamıştır (Çizelge 3.5). Benzer olarak bFGF, PDGF-B ve IL-8 sentezinde de her 3 ilacın düşük dozlarında ($-2\log IC_{50}$ ve $-3\log IC_{50}$) LNCaP hücrelerinde baskılanırken benzer etki diğer hücrelerde izlenmemiştir (Çizelge 3.6-3.7-3.8). Kolon kanseri hücrelerinde (HT-29) 5-FU $-2\log IC_{50}$ dozunda genel olarak anjiyogenik faktörleri baskımlarken diğer dozlarda genel olarak arttırdığı bulunmuştur (Çizelge 3.5-3.6-3.7-3.8-3.9). Gen ifade düzeyleri açısından bakıldığında 5-FU ilacının $-3\log IC_{50}$ ve $-2\log IC_{50}$ dozlarının incelenen her 3 tümör tipinde de en fazla anti-anjiyogenik etki gösterebileceği düşünülmektedir. LNCaP hücrelerinde ise çalışmamızda incelenen her 3 kemoterapi ilacının da $-1\log IC_{50}$, $-2\log IC_{50}$ ve $-3\log IC_{50}$ dozlarının gen ifadesi düzeyinde anti-anjiyogenik etki gösterebileceği bulunmuştur (Çizelge 3.5-3.6-3.7-3.8-3.9). Gen ifadesi üzerindeki etkileri açısından kolon kanseri hücrelerinde (HT-29) irinotekan ve oksaliplatinin $-2\log IC_{50}$ dozları anti-anjiyogenik tedavi dozu olarak önerilebilir.

MCF-7 hücreleri için anti-anjiyogenik doz olarak, ilaç türüne bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte $-2\log IC_{50}$ dozu düşünülmektedir.

Kolon kanseri hücreleri 5-FU ve irinotekanın $-2\log IC_{50}$ dozunda salgılanan VEGF-A ve bFGF anjiyogenik faktör düzeylerini anlamlı olarak azaltmıştır (Çizelge 3.10-3.12). Buna karşılık PDGF-BB, IL-8 ve MMP-9 düzeylerinde benzer bir etki bulunamamıştır (Çizelge 3.11-3.13-3.14). Aynı hücrelerde oksaliplatin ise $-2\log IC_{50}$ dozunda genel olarak anjiyogenik faktör düzeyinde azalmaya neden olurken diğer dozlarda farklı sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 3.10-3.11-3.12-3.13-3.14). Anjiyogenik faktör salgısı üzerindeki etkileri açısından dikkate alındığında kolon kanseri hücreleri için oksaliplatinin $-2\log IC_{50}$ dozu anti-anjiyogenik tedavi dozu olarak düşünülmektedir.

LNCaP hücrelerinde 5-FU $-3\log IC_{50}$ ve $-2\log IC_{50}$ dozlarında VEGF-A ve MMP-9 düzeylerini azaltırken diğer dozlarda anlamlı bir etki göstermemiştir (Çizelge 3.10-3.14). Bu hücrelerde irinotekan da benzer olarak $-2\log IC_{50}$ dozunda VEGFA, MMP-9 ve bFGF düzeylerini anlamlı olarak azaltmıştır (Çizelge 3.10-3.12-3.14). Oksaliplatin ise her 3 dozda da ($-1\log IC_{50}$, $-2\log IC_{50}$ ve $-3\log IC_{50}$) genel olarak salgılanan sitokin düzeyinde anjiyogenik faktörleri belirgin olarak baskılamıştır (Çizelge 3.10-3.11-3.12-3.13-3.14).

VEGF-A, PDGF-BB ve bFGF düzeyleri açısından 5-FU ve irinotekanın $-1\log IC_{50}$ dozları azalmaya neden olmuştur (Çizelge 3.10-3.11-3.12). Oksaliplatin ise $-1\log IC_{50}$ dozunda VEGF-A düzeyinde anlamlı azalmaya neden olmuştur (Çizelge 3.10). MCF-7 hücrelerinde uygulanan kemoterapi ilaçları ile MMP-9 düzeylerinde bir artış izlenmiştir (Çizelge 3.14). Buna karşılık IL-8 düzeylerinde her 3 ilacın $-3\log IC_{50}$ ve $-2\log IC_{50}$ dozlarında ve irinotekanın $-1\log IC_{50}$ dozunda azalma gözlenmiştir (Çizelge 3.13).

Gen ifadesi ve sitokin salgısı olarak birlikte ele alındığında LNCaP hücrelerinde 5-FU için $-3\log IC_{50}$ ve $-2\log IC_{50}$ dozları anti-anjiyogenik dozlar olarak önerilebileceği görülmektedir. Yine LNCaP hücrelerinde irinotekan ve oksaliplatin için her 3 doz ($-3\log IC_{50}$, $-2\log IC_{50}$ ve $-1\log IC_{50}$) da uygun anti-anjiyogenik tedavi dozu olarak önerilebilir.

Benzer olarak kolon kanseri hücreleri (HT-29) için hem gen ifadesi hem de sitokin salgısı açısından 5-FU için $-3\log IC_{50}$ ve $-2\log IC_{50}$, oksaliplatin ve irinotekan için ise $-2\log IC_{50}$ dozu en uygun anti-anjiyogenik tedavi dozları olarak önerilebilir.

MCF-7 hücreleri için 5-FU, irinotekan ve oksaliplatin için $-1\log IC_{50}$ dozu en uygun anti-anjiyogenik tedavi dozu olarak görülmektedir.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar bu ilaçların hastalarda yan etki oluşturmayacak düşük dozlarda anti-anjiyogenik etki potansiyeline sahip olabileceğini ve kanserli hastalarda bu amaçla güvenle kullanılabilceğini düşündürmektedir. Ancak sonuçlarımız, bu ilaçların in-vitro hücre kültür ortamındaki etkilerini yansıtmaktadır. Klinik çalışmalara geçilmeden önce belirlenen bu dozların hayvan çalışmalarında in-vivo etkinliğinin de test edilmesi gerekmektedir. Yine bu ilaçların belirlenen dozlarda kombine olarak kullanılması ve diğer anti-anjiyogenik ilaçlarla (anti-VEGF monoklonal antikor, tirozin kinaz inhibitörü) kombine olarak test edilmesi daha etkili anti-anjiyogenik tedavi stratejileri geliştirme açısından önem taşımaktadır.

ÖZET

Kanser Hücrelerinde Anjiyogenik Faktörlerin Ekspresyonuna Kemoterapinin Etkilerinin İncelenmesi

Konvansiyonel kemoterapi uygulamalarında tümör hücrelerinin yanı sıra vücuttaki normal hücreler de zarar görmektedir. Tümör dışındaki hücrelerin gördüğü zarar genel olarak kemoterapi ilaçlarının doz ve kullanım sıklığını belirleyen en önemli faktördür. Rutin uygulamalarda genel olarak hastaların tolere edebileceği maksimum dozlar seçilerek tedavi ajanları uygulanmaktadır. Metronomik dozların ne kadar olması gerektiği konusunda klinik veri olmasına karşın bu dozların biyolojik etkinliği konusunda yeterli veri bulunmamaktadır. Bu tez çalışmamızda klinikte gastrointestinal tümörlerin tedavisinde sıklıkla kullanılan 5-florourasil, irinotekan ve oksaliplatin kemoterapi ilaçlarının metronomik olarak kullanılabileceği dozları in vitro etkinlik açısından değerlendirmek amaçlanmıştır.

Bu amaçla, solid tümör tedavisinde sıklıkla kullanılan 5-fluorourasil, irinotekan ve oksaliplatinin insan kanser hücre hatlarında (HT-29: kolon kanser hücresi, MCF-7: meme kanseri hücresi ve LNCaP: prostat kanseri hücresi) öncelikle MTT testi ile IC50 dozları belirlenmiştir. Daha sonra söz konusu ilaçların IC50 dozları ve bu dozların %10, %1 ve %0,1 lik dozlarının tümör hücrelerinde VEGF-A, bFGF, MMP-9, PDGF-B, IL-8 gibi anjiyogenik faktörlerin yapımı üzerindeki etkileri hem mRNA düzeyinde eş zamanlı PZR hem de besiyerine salgılanan sitokin düzeyinde ELIZA yöntemleri ile araştırılmıştır.

5-florourasil, irinotekan ve oksaliplatinin tümör hücrelerinde anjiyogenik faktör yapımı üzerindeki etkileri farklılık göstermiştir. 5-florourasil ilacının incelenen tümör hücrelerinde genel olarak $-3\log IC_{50}$ ve $-2\log IC_{50}$ dozlarında anjiyogenik faktörlerin yapımını etkili bir şekilde baskıladığı buna karşılık irinotekan ve oksaliplatin ise $-2\log IC_{50}$ ve $-1\log IC_{50}$ dozlarında anjiyogenik faktör salgısını azalttığı bulunmuştur ($p < 0.05$).

Sonuçlarımız, konvansiyonel kemoterapi ilaçlarının normal hücrelere zarar vermeyecek çok düşük dozlarda anti-anjiyogenik ajan olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Yine çalışmamızda test ettiğimiz kemoterapi ilaçlarının $-2\log IC_{50}$ ve $-3\log IC_{50}$ dozlarının bevacizumab ve anti-VGFR1-2 tirozin kinaz inhibitörleri ile kombine olarak kullanılmasının güvenle test edilebileceğini düşündürmektedir. Fakat bu tez çalışmasından elde ettiğimiz in vitro sonuçların klinik geçerliliği olabilmesi için hayvan modellerindeki denemeleri takiben mutlaka klinik çalışmalarda test edilmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hücre Kültürü, Kanser, Metronomik Kemoterapi, Tümör Anjiyogenezi.

SUMMARY

The Effects of Chemotherapeutic Drugs on Angiogenic Factor Expression in Cancer Cells

Conventional chemotherapy regimens damage tumor cells as well as normal cells in the body. The damage to normal cells including bone-marrow cells usually limits the dose and frequency of conventional chemotherapy regimens. Maximum tolerated dose levels are usually preferred in conventional regimens. Recently, metronomic chemotherapy which defined as the use of chemotherapy drugs at the lowered doses with prolonged schedule has been widely used especially in heavily pre-treated patients. Metronomic use of chemotherapeutic drugs mainly induce apoptosis of tumor and endothelial cells. However, there is no consensus on the doses of metronomic use of conventional drugs based on their mechanisms of action. In the current study we aimed to assess the in vitro efficacy of different low doses of 5-FU, irinotecan and oxaliplatin, which are the widely used drugs in solid tumors with regard to their effects on angiogenic factor production in tumor cells.

We first determined the IC₅₀ doses of the drugs by using MTT test in human tumor cell lines including the HT-29 (colon cancer cell line), the MCF-7 (breast cancer cell line) and the LNCaP (prostatic carcinoma cell line) cell lines. Then we tested the doses of IC₅₀ and 10%, 1% and 0,1% of IC₅₀ of the drugs in order to determine their effects on VEGF-A, bFGF, MMP-9, PDGF-B, IL-8 production in tumor cell lines by using qPCR and sandwich ELISA methods.

5-fluorouracil, irinotecan and oxaliplatin revealed different results on angiogenic factor production in tumor cells. While, 5-fluorouracil has efficiently decreased the production of angiogenic factors at the doses of $-3\log\text{IC}_{50}$ and $-2\log\text{IC}_{50}$ in all three cell lines, the $-2\log\text{IC}_{50}$ and $-1\log\text{IC}_{50}$ doses of irinotecan and oxaliplatin significantly decreased the angiogenic factor production in tumor cell lines ($p < 0.05$).

Our results suggest that the conventional chemotherapeutic drugs could be used as anti-angiogenic agents at the very low doses that non-toxic to normal cells. Likewise, the $-2\log\text{IC}_{50}$ and $-3\log\text{IC}_{50}$ doses of conventional chemotherapeutic drugs may be tested in addition to new anti-angiogenic drugs such as bevacizumab and anti-VEGFR1-2 tyrosine kinase inhibitors. However, the clinical utility of those lowered doses found our in vitro studies needs to be tested in clinical trials following the testing in animal tumor models.

Key Words: Cancer, Cell Culture, Metronomic Chemoterapy, Tumor Angiogenesis.

KAYNAKLAR

- AALBERTSSON P, LENNERNAS B, NORRBY K (2009). Low-dose continuous 5-fluorouracil infusion stimulates VEGF-A-mediated angiogenesis. *Acta Oncologica*, **48**, 3, s: 418-425.
- AALINKEEL R, NAIR BB, REYNOLDS JL, SYKES DE, MAHAJAN SD, CHADHA KC, SCHWARTZ SA (2011). Overexpression of MMP-9 contributes to invasiveness of prostate cancer cell line LNCaP. *Immunol Invest*, **40**, 5, s: 447-464.
- ABU-LILA A, SUZUKI T, DOI Y, ISHIDA T, KIWADA H (2008). Oxaliplatin targeting to angiogenic vessels by PEGylated cationic liposomes suppresses the angiogenesis in a dorsal air sac mouse model. *Journal of Controlled Release*, **134**, 1, s: 18-25.
- ADAIR TH, MONTANI JP, Angiogenesis (2010). GRANGER DN, GRANGER JP, *Integrated Systems Physiology: from molecule to function to disease*, First Edition, p: 1-84.
- AKBULUT H, Kolorektal Kanserler (2005). *Tıbbi Onkoloji*, İÇLİ F, AKBULUT H, Antıp Yayınları, 1. Baskı, s: 281-291.
- AKTAS SH, AKBULUT H, AKGÜN N, İÇLİ F (2012/2013). 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**, s: 135-140.
- ALBERTSSON P, LENNERNAS B, NORRBY K (2009). 5-fluorouracil infusion stimulates VEGF-A mediated angiogenesis. *Acta Oncol*, **48**, s: 418-425.
- ALBERTSSON P, LENNERNAS B, NORRBY K (2012). Low dosage metronomic chemotherapy and angiogenesis: topoisomerase inhibitors irinotecan and mitoxantrone stimulate VEGF-A mediated angiogenesis. *Apmis*, **120**, s: 147-156.
- ALİ MJ, PARSAM VL, HONAVAR SG, KANNABIRAN C, VEMUGANTI GK, REDDY VAP (2010). RB1 gene mutations in retinoblastoma and its clinical correlation. *Saudi J Ophthalmol*, **24**, 4, s: 119-123.
- ALLGRINI G, FALCONE A, FIORAVANTI A, BARLETTA MT, ORLANDI P, LOUPAKIS F, CERRI E, MASI G, DI PAOLO A, KERBEL RS, DANESI R, DEL TACCA M, BOCCI G (2008). A pharmacokinetic and pharmacodynamics study on metronomic irinotecan in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer*, **98**, s: 1312-1319.
- AMIOKA T, KITADAI Y, TANAKA S, HARUMA K, YOSHIHARA M, YASUI W, CHAYAMA K (2002). Vascular endothelial growth factor-C expression predicts lymph node metastasis of human gastric carcinomas invading the submucosa. *Eur J Cancer*, **38**, 10, s: 1413-1419.
- ANDRAE J, GALLINI R, BETSHOLTZ C (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & Dev*, **22**, s: 1276-1312.
- ARORA A, SCHOLAR EM (2005). Role of tyrosine kinase İnhibitors in cancer therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **315**, 3, s: 971-979.
- ASMIS TR, SALTZ L (2008). Systemic Therapy for Colon Cancer. *Gastroenterol Clin N Am*, **37**, s: 287-295.
- AUSTRALIAN MEDICINE HANDBOOK, Erişim Adresi: [http://research.omicsgroup.org/index.php/Australian_Medicines_Handbook]. Erişim Tarihi: 10.11.2016.
- BAGGIOLINI M, CLARK-LEWIS I (1992). Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Letters*, **307**, 1, s: 97-101.

- BARRALLO-GIMENO A, NIETO MA (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*, **132**, s: 3151-3161.
- BATTEGAY EJ, RUPP J, IRUELA-ARISPE L, SAGE EH, PECH M (1994). PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. *J Cell Biol*, **125**, 4, s: 917-928.
- BEATTY GL, GLADNEY WL (2015). Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*, **21**, 4, s: 687-692.
- BENDARDAF R, BUHMEIDA A, HILSKA M, LAATO M, SYRJANEN S, SYRJANEN K, COLLAN Y, PYRHONEN S (2008). VEGF-1 expression in colorectal cancer is associated with disease localization, stage and long-term disease-specific survival. *Anticancer Res*, **28**, 6B, s: 3865-3870.
- BENOY IH, SALGADO R, VAN DAM P, GEBOERS K, VAN MARCK E, SCHARPE S, VERMEULEN PB, DIRIX LY (2004). Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. *Clin Cancer Res*, **10**, 21, s: 7157-7162.
- BERGERS G, BREKKEN R, MCMAHON G, VU TH, ITOH T, TAMAKI K, TANZAWA K, THORPE P, ITOHARA S, WERB Z, HANAHAN D (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol*, **2**, 10, s: 737-744.
- BERLIN JD, PROPERT KJ, TRUMP D, WILDING G, HUDES G, GLICK J, BURCH P, KELLER A, LOEHRER P (1998). 5-Fluorouracil and leucovorin therapy in patients with hormone refractory prostate cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group phase II study (E1889). *Am J Clin Oncol*, **21**, 2, s: 171-176.
- BHOWMICK NA, NEILSON EG, MOSES HL (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, **432**, 7017, s: 332-337.
- BLESA JMG, MARCO VG, GINER-BOSCH V, CEREZUELA FP, CANDEL VA (2011). Phase II trial of oxaliplatin and capecitabine after progression to first-line chemotherapy in androgen-independent prostate cancer patients. *American Journal of Clinical Oncology*, **34**, 2, s: 155-159.
- BOCCI G, FALCONE A, FIORAVANTI A, ORLANDI P, DI PAOLO A, FANELLI G, VIACAVA P, NACCARATO AG, KERBEL RS, DANESI R, DEL TACCA M, ALLEGRINI G (2008). Antiangiogenic and anticolorrectal cancer effects of metronomic irinotecan chemotherapy alone and in combination with semaxinib. *British Journal of Cancer*, **98**, s: 1619-1629.
- BOFFETTA P (2008). Tobacco smoking and risk of bladder cancer. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology Supplementum*, **42**, 218, s: 45-54.
- BOOCOCK CA, CHARNOCK-JONES DS, SHARKEY AM, MCLAREN J, BARKER PJ, WRIGHT KA, TWENTYMAN PR, SMITH SK (1995). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **87**, 7, s: 506-516.
- BOS R, VAN DIEST PJ, DE JONG JS, VAN DER GROEP P, VAN DER VALK P, VAN DER WALL E (2005). Hypoxia-inducible factor-1 α is associated with angiogenesis, and expression of bFGF, PDGF-BB, and EGFR in invasive breast cancer. *Histopathology*, **46**, s: 31-36.
- BOWEN-POPE DF, RAINES EW (2011). History of discovery: platelet-derived growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **31**, 11, s: 2397-2401.
- BRAT DJ, BELLAIL AC, VAN MEIR EG (2005). The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncology*, **7**, 2, s: 122-133.
- BRAY F, MCCARRON P, PARKIN DM (2004). The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Res.*, **6**: 229-239.

- BREW R, ERIKSON JS, WEST DC, KINSELLA AR, SLAVIN J, CHRISTMAS SE (2000). Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. *Cytokine*, **12**, 1, s: 78-85.
- BUTEL JS (2000). Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis*, **21**, 3, s: 405-426.
- CARMELIET P (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, **69**, s: 4-10.
- CARMELIET P (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, **9**, 6, s: 653-660.
- CARMELIET P, JAIN RK (2011). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Disc*, **10**, s: 417-427.
- CHEN HX, CLECK JN (2009). Adverse effects of anticancer agents that target the VEGF pathway. *Nature Reviews Clinical Oncology*, **6**, 8, s: 465-477.
- CHENG J, YE H, LIU Z, XU C, ZHANG Z, LIU Y, SUN Y (2013). Platelet-derived growth factor-BB accelerated prostate cancer growth by promoting the proliferation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*, **114**, 7, s: 1510-1518.
- CHU E, VINCENT T, DEVITA JR (2001). *Cancer Principles & Practice of Oncology*, VINCENT T, DEVITA JR, HELLMAN S, ROSENBERG SA, 6th Edition, p: 289.
- CHUNG AS, FERRARA N (2011). Developmental and pathological angiogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **27**, s: 563-584.
- COLOMER R, APARICIO J, MONTERO S, GUZMAN C, LARRODERA L, CORTES-FUNES H (1997). Low levels of bFGF are associated with poor prognosis in human breast carcinoma. *Br J Cancer*, **76**, s: 1215-1220.
- COOPER GM, (2000). *The cell: a molecular approach*, 2th edition, p: 665-675.
- COOPER GM, HAUSMANN RE (2013). *The cell: a molecular approach*, 6th edition, p: 807-819.
- CORRIE PG, PIPPA G (2008). Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine*, **36**, 1, s: 24-28.
- COUSSENS LM, WERB Z (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, **420**, 6917, s: 860-867.
- COUTTS JC, GALLAGHER JT (1995). Receptors for fibroblast growth factors. *Immunol Cell Biol*, **73**, 6, s: 584-589.
- CRONAURE MW, HITTMAIR A, EDER IE, HOBISCH A, CULIG Z, RAMONER R, ZHANG J, BARTSCH G, REISSIGL A, RADMAYR C, THURNHER M, KLOCKER H (1997). Basic fibroblast growth factor levels in cancer cells and in sera of patients suffering from proliferative disorders of the prostate. *Prostate*, **31**, s: 223-233.
- CROSS MJ, CLAEISSON-WELSH L (2001). FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci*, **22**, 4, s: 201-207.
- CURRERI AR, ANSFIELD FJ, MCIVER FA, WAISMAN HA, HEIDELBERGER C (1958). Clinical studies with 5-fluorouracil. *Cancer Res*, **18**, s: 478-484.
- DALY ME MAKRIS A, REED M, LEWIS CE (2003). Hemostatic regulators of tumor angiogenesis: a source of antiangiogenic agents for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*, **95**, 22, s: 1660-1673.
- DAMBER JE, VALLBO C, ALBERTSSON P, LENNERNAS B, NORRBY K (2006). The anti-tumour effect of low dose continuous chemotherapy may partly be mediated by thrombospondin. *Cancer Chemother Pharmacol*, **58**, 3, s: 354-360.

- DE JONG JS, VAN DIEST PJ, VAN DER VALK P, BAAK JP (1998). Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II: correlations with proliferation and angiogenesis. *J Pathol*, **184**, 1, s: 53-57.
- DEBERARDINIS RJ, LUM JJ, HATZIVASSILIOU G, THOMPSON CB (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*, **7**, s: 11-20.
- DELPEUCH A, LEVEGUE D, ROB L, BERGERAT JP (2011). Off-label use of oxaliplatin in patients with metastatic breast cancer. *Anticancer Res*, **31**, 5, s: 1765-1677.
- DESHOANDE A, SICINSJI P, HINDS PW (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene*, **24**, s: 2909-2915.
- DEVI PU (2004). Basics of carcinogenesis. *Health Administrator*, **16**,1, s: 16-24.
- DOĞAN M, AKBULUT H (2009). Kolorektal kanserde adjuvan tedavi. *Türkiye Klinikleri Tıbbi Onkoloji Özel Dergisi*, **2**, 3, s: 49-57.
- DONATI MB, GOZDZIKIEWICZ J (2008). Angiogenesis and the progress of vascular and tumor biology: A tribute to Judah Folkman. *Thromb Haemost*, **99**, s: 647-650.
- DOUILLARD JY, CUNNINGHAM D, ROTH AD, NAVARRO M, JAMES RD, KARASEK P, JANDIK P, IVESON T, CARMICHAEL J, ALAKL M, AWAD L, ROUGIER P (2000). Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *The Lancet*, **355**, 9209, s: 1041-1047.
- DOUILLARD JY, CUNNINGHAM D, ROTH AD, NAVARRO M, JAMES RD, KARASEK P, JANDIK P, IVESON T, CARMICHAEL J, ALAKL M, GRUIA G, AWAD L, ROUGIER P (2000). Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *The Lancet*, **355**, 9209, s: 1041-1047.
- DROZ JP, MURACCIOLE X, MOTTET N, OULD KACI M, VANNETZEL JM, ALBIN N, CULINE S, RODIER JM, MISSET JL, MACKENZIE S, CVITKOVIC E, BENOIT G (2003). Phase II study of oxaliplatin versus oxaliplatin combined with infusional 5-fluorouracil in hormone refractory metastatic prostate cancer patients. *Ann Oncol*, **14**, 8, s: 1291-1298.
- DUYNDAM MCA, VAN BERKEL MPA, DORSMAN JC, ROCKX DAP, PINEDO HM, BOVEN E (2007). Cisplatin and doxorubicin repress vascular endothelial growth factor expression and differentially down regulate hypoxia inducible factor 1 activity in human ovarian cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, **74**, s: 191-201.
- ELLEDGE SJ (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science*, **274**, 5293, s: 1664-1672.
- ELLIS LM, HICKLIN DJ (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer*, **8**, 8, s: 579-591.
- ELLIS LM, TAKAHASHI Y, LIU W, SHAHEEN RM (2000). Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: biology and therapeutic implications. *Oncologist*, **1**, s: 11-15.
- ENSEMBL. Erişim Adresi: [<http://www.ensembl.org/index.html>]. Erişim Tarihi: 12.02.2015.
- ESMO Clinical Practice Guidelines (2016). Erişim Adresi: [<http://www.esmo.org/Guidelines>]. Erişim Tarihi: 07.11.2016.
- EVAN GI, VOUSDEN KH (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, **411**, s:342-438.
- FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, ESER S, MATHERS C, REBELO M, PARKIN D, FORMAN D, BRAY F (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in Globocan 2012. *International Journal of Cancer*, **136**: E359-386.

- Ferrara N (2009). Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **29**, s: 789–791.
- FERRARA N, HILLAN KJ, GERBER HP, NOVOTNY W (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, **3**, s: 391-400.
- FERRER FA, MILLER LJ, ANDRAWIS RI, KURTZMAN SH, ALBERTSEN PC, LAUDONE VP, KREUTZER DL (1997). vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human prostate cancer: In situ and in vitro expression of vegf by human prostate cancer cells. *The Journal of Urology*, **157**, 6, s: 2329-2333.
- FIDLER IJ (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the seed and soil hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, **3**, s: 453-458.
- FIDLER IJ, KERBEL RS, ELLIS LM, VINCENT TD, JR HELLMAN S, ROSENBERG SA (2001). *Cancer Principles & Practice of Oncology*, 6th Edition, p: 138-141.
- FIORAVANTI A, CANU B, ALI G, ORLANDI P, ALLEGRINI G, DI DESIDERO T, EMMENEGGER U, FONTANINI G, DANESI R, DEL TACCA M, FALCONE A, BOCCI G (2009). Metronomic 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan in colorectal cancer. *Eur J Pharmacol*, **619**, 1-3, s: 8-14.
- FIORAVANTI A, CANU B, ALI G, ORLANDI P, ALLEGRINI G, DI DESIDERO T, EMMENEGGER U, FONTANINI G, DANESI R, DEL TACCA M, FALCONE A, BOCCI G (2009). Metronomic 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan in colorectal cancer. *Eur J Pharmacol*, **619**, s: 8-14.
- FOLKMAN J (1971). Tumor angiogenesis. Therapeutic implications. *N Engl J Med*, **285**, s: 1181-1971.
- FORSYTH PA, WONG H, LAING TD, REWCASTLE NB, MORRIS DG, MUZIK H, LECO KJ, JOHNSTON RN, BRASHER PM, SUTHERLAND G, EDWARDS DR (1999). Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *British Journal of Cancer*, **79**, 11-12, s: 1828-1835.
- FULDA S (2008). Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer*, **124**, 3, s: 511-515.
- GABHANN FM, POPEL AS (2008). Systems biology of vascular endothelial growth factors. *Microcirculation*, **15**, s: 715-738.
- GEORGE ML, TUTTON MG, JEANSSEN F, ARNAOUTZ A, ABULAFI AM, ECCLES SA, SWIFT RI (2001). VEGF-D in colorectal cancer progression. *Neoplasia*, **3**, 5, s: 420-427.
- GERBER DE (2008). Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *American Family Physician*, **77**, 3, s: 311-319.
- GHEBRANIOUS N, DONEHOWER LA (1998). Mouse models in tumor suppression. *Oncogene*, **17**, 25, s: 3385-3400.
- GIACCHETTI S, ITZHAKI M, GRUIA G, ADAM R, ZIDANI R, KUNSTLINGER F, BRIENZA S, ALAFACI E, BERTHEAULT-CVITKOVIC F, JASMIN C REYNES M, BISMUTH H, MISSET JL, LEVI F (1999). Long-term survival of patients with unresectable colorectal cancer liver metastases following infusional chemotherapy with 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin and surgery. *Ann Oncol*, **10**, 6, s: 663-669.
- GIRI D, ROPIQUET F, ITTMANN M (1999). Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, **5**, s: 1063-1071.
- GOTO F, GOTO K, WEINDEL K, FOLKMAN J (1993). Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of

- bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Laboratory Investigation*, **69**, 5, s: 508-517.
- GRAHAM J, MUSHIN M, KIRKPATRICK P (2004). Oxaliplatin. *Nature Reviews Drug Discovery*, **3**, 1, s: 11-12.
- GRONBERG H (2003). Prostate cancer epidemiology. *The Lancet*, **361**, 9360, s: 859-864.
- HANAHAHAN D, WEINBERG RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**, 5, s: 646-674.
- HANSEN R, MOYNIHAN T, BEATTY P, QUEBBEMAN E, LIBNOCH J, SCHULTE W, ANDERSON T (1991). Continuous systemic 5-fluorouracil infusion in refractory prostatic cancer. *Urology*, **37**, 4, s: 358-361.
- HARTWELL LH, KASTAN MB (1994). Cell cycle control and cancer. *Science*, **266**, 5192, s: 1821-1828.
- HASHIMOTO I, KODAMA J, SEKI N, HONGO A, YOSHINOUCHI M, OKUDA H, KUDO T (2001). Vascular endothelial growth factor-C expression and its relationship to pelvic lymph node status in invasive cervical cancer. *Br J Cancer*, **85**, 1, s: 93-97.
- HAUSEN ZH (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virology*, **374**, 2, s: 260-265.
- HAYASHI H, TSURUTANI J, SATOH T, MASUDA N, OKAMOTO W, MORINAGA R, TERASHIMA M, MIYAZAKI M, OKAMOTO I, NISHIDA Y, TOMINAGA S, TOKUNAGA Y, YAMAGUCHI M, SAKAMOTO J, NAKAYAMA T, NAKAGAWA K (2013). Phase II study of bi-weekly irinotecan for patients with previously treated HER2-negative metastatic breast cancer: KMBOG0610B. *Breast Cancer*, **20**, 2, s: 131-136.
- HEBERT CA, BAKER JB (1993). Interleukin-8: a review. *Cancer Investigation*, **11**, 5.
- HECHT JR, MUTCHELL EP, YOSHINO T, WELSLAU M, LIN X, CHOW MANEVAL E, PAOLINI J, LECHUGA MJ, KRETZSCHMAR A (2015). 5-Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) plus sunitinib or bevacizumab as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a randomized phase IIb study. *Cancer Manag Res*, **15**, 7, s: 165-173.
- HELDIN CH (2013). Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Commun Signal*, **11**, 97.
- HELDIN CH, LENNARTSSON J (2013). Structural and functional properties of platelet-derived growth factor and stem cell factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **5**, a009100.
- HENNINGS H, GLICK AB, LOWRY DT, KRSMANOVIC LS, SLY LM, YUSPA SH (1993). FVB/N mice: An inbred strain sensitive to the chemical induction of squamous cell carcinomas in the skin. *Carcinogenesis*, **14**, s:2353–2358.
- HERMANSSON M, NISTER M, BETSHOLTZ C, HELDIN CH, WESTERMARK B, FUNA K (1988). Endothelial cell hyperplasia in human glioblastoma: coexpression of mRNA for platelet-derived growth factor (PDGF) B chain and PDGF receptor suggests autocrine growth stimulation. *Proc Nat Acad Sci*, **85**, s: 7748-7752.
- HIRAI M, NAKAGAWARA A, OOSAKI T, HAYASHI Y, HIRONO M, YOSHIHARA T (2001). Expression of vascular endothelial growth factors (VEGF-A/VEGF-1 and VEGF-C/VEGF-2) in postmenopausal uterine endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*, **80**, 2, s: 181-188.
- HOCKENBERY D, NUNEZ G, MILLIMAN C, SCHREIBER RD, KORSMEYER SJ (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, **348**, s: 334–336.

- HONECKER FU, BRUMMENDORF TH, KLEIN O, BOKEMEYER C (2006). Safe Use of oxaliplatin in a patient with metastatic breast cancer and combined renal and hepatic failure. *Onkologie*, **29**, 6, s: 273-275.
- HYNES NE, MACDONALD G (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol*, **21**, 2, s: 177-184.
- IODICE S, GANDINI S, MAISONNEUVE P, LOWENFELS AB (2008). Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta analysis. *Langenbeck's Archives of Surgery*, **393**, 4, s: 535-545.
- ITOH Y, JOH T, TANIDA S, SASAKI M, KATAOKA H, ITOH K, OSHIMA T, OGASAWARA N, TOGAWA S, WADA T, KUBOTA H, MORI Y, OHARA H, NOMURA T, HIGASHIYAMA S, ITOH M (2005). IL-8 promotes cell proliferation and migration through metalloproteinase cleavage proHB-EGF in human colon carcinoma. *Cytokine*, **29**, 6.
- JACKSON MW, BENTEL JM, TILLEY WD (1997). Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *J Urol*, **157**, 6, s: 2323-2328.
- JORDAN VC (2016). A retrospective: on clinical studies with 5-fluorouracil. *Cancer Res*, **76**, 4.
- KAMIYAMA H, TAKANO S, TSUBOI K, MATSUMURA A (2004). Anti-angiogenic effects of SN38 (active metabolite of irinotecan): inhibition of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha)/vascular endothelial growth factor (VEGF) expression of glioma and growth of endothelial cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, **131**, 4, s: 205-213.
- KERBEL RS, KAMEN BA (2004). The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, **4**, s: 423-436.
- KESARI S, SCHIFF D, DOHERTY L, GIGAS DC, BATCHELOR TT, MUZIKANSKY A, O'NEIL A, DRAPPATZ J, CHEN-PLOTKIN AS, RAMAKRISHNA N, WEISS SE, LEVY B, BRADSHAW J, KRACHER J, LAFORME A, BLACK PM, FOLKMAN J, KIERAN M, WEN PY (2007). Phase II study of metronomic chemotherapy for recurrent malignant gliomas in adults. *Neuro Oncol*, **9**, 3, s: 354-363.
- KESSENBROCK K, PLAKS V, WERB Z (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, **141**, 1, s: 52-67.
- KIM SJ, UEHARA H, KARASHIMA T, MCCARTY M, SHIH N, FIDLER IJ (2001). Expression of interleukin-8 correlates with angiogenesis, tumorigenicity and metastasis of human prostate cancer cells implanted orthotopically in nude mice. *Neoplasia*, **3**, 1, s: 33-42.
- KIM NW, PIATYSZEK MA, PROWSE KR, HARLEY CB, WEST MD, HO PL, COVIELLO GM, WRIGHT WE, WEINRICH SL, SHAY JW (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, **266**, 5193, s:2011-2015.
- KLYMKOWSKY MW, SAVAGNER P (2009). Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol*, **174**, s: 1588-1593.
- KOIZUMI F, KITAGAWA M, NEGISHI T, ONDA T, MATSUMOTO S, HAMAGUCHI T, MATSUMURA T (1996). Novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, eradicate vascular endothelial growth factor-secreting bulky tumors. *Cancer Research*, **66**, 10048.
- KOS M, DABROWSKI A (2002). Tumor's angiogenesis-the function of VEGF and bFGF in colorectal cancer. *Ann Univ Mariae Cruie Sklodowska Med*, **57**, 2, s: 556-561.
- KOZLOWSKI L, ZAKRZEWSKA I, TOKAJUK P, WOJTUKIEWICZ MZ (2003). Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. *Rocz Akad Med Bialymst*, **48**, s: 82-84.
- KUPER H, ADAMI HO, TRICHOPOULOS D (2000). Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med*, **248**, 3, s: 171-183.

- KUPER H, BOFFETTA P, ADAMI HO (2002). Tobacco use and cancer causation: association by tumour type. *Journal of Internal Medicine*, **252**, 3, s: 206-224.
- KUT C, GABHANN FM, POPEL A (2007). Where is VEGF in the body? A meta-analysis of VEGF distribution in cancer. *British Journal of Cancer*, **97**, s: 978-985.
- KWABI-ADDO B, OZEN M, ITTMANN M (2004). The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*, **11**, s: 709-724.
- LARSSON A, SKOLDENBERG E, ERICSON H (2002). Serum and plasma levels of FGF-2 and VEGF in healthy blood donors. *Angiogenesis*, **5**, s: 107-110.
- LEMMON MA, SCHLESSINGER J (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, **141**, 7, s: 1117-1134.
- LI A, DUBEY S, VARNEY ML, DAVE BJ, SINGH RK (2003). IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *Journal of immunology*, **170**, 6, s: 3369-3376.
- LI WW, HUTNIK M, GEHR G (2008). Antiangiogenesis in haematological malignancies. *Br J Haematol*, **143**, 5, s: 622-631.
- LIAO D, JOHNSON RS (2007). Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, **26**, s: 281-290.
- LIPWORTH L, TARONE RE, MCLAUGHLIN JK (2006). The epidemiology of renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*, **176**, 6, s: 2353-2358.
- LODISH H, BERK A, ZIPURSKY SL, MATSUDAIRA P, BALTIMORE D, DARNELL J, The Role of Carcinogenesis and DNA Repair in Cancer (2003). *Molecular Cell Biology*, Freeman WH, 5th Edition, p: 961-970.
- LOHMANN DR, GALLIE BL (2010). Retinoblastoma. Gene Reviews, Erişim Adresi: [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1452/>]. Erişim Tarihi: 15.10.2016.
- LONDON CA, SEKHON HS, ARORA V, STEIN DA, IVERSEN PL, DEVI GR (2003). A novel antisense inhibitor of MMP-9 attenuates angiogenesis, human prostate cancer cell invasion and tumorigenicity. *Cancer Gene Therapy*, **10**, s: 823-832.
- LONGLEY DB, HARKIN DP, JOHNSTON PG (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, **3**, s: 330-338.
- MADHUSUDAN S, GANESAN TS (2004). Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Clinical Biochemistry*, **37**, 7, s: 618-635.
- MAHARAJ ASR, SENT-GENIEZ M, MALDONAO AE, D'AMORE PA (2006). Vascular endothelial growth factor localization in the adult. *American Journal of Pathology*, **168**, 2.
- MASSAGUÉ J (2004). G1 cell cycle control and cancer. *Nature*, **432**, s: 298-306.
- MCDONNELL TJ, DEANE N, PLATT FM, NUNEZ G, JAEGER U, MCKEARN JP, KORSMEYER SJ (1989). BCL-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*, **57**, s: 79-88.
- MEIJERINK JP, MENSINK EJ, WANG K, SEDLAK TW, SLOETJES AW, DE WITTE T, WAKSMAN G, KORSMEYER SJ (1998). Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood*, **91**, s: 2991-2997.
- MERDAD A, KARIM S, SCHULTEN HJ, DALLOL A, BUHMEIDA A, AL-THUBAITY F, GARI MA, CHAUDHARY AG, ABUZENADAH AM, AL-QAHTANI MH (2014). Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer: MMP-9 as a potential biomarker for cancer invasion and metastasis. *Anticancer Res*, **34**, 3, s: 1355-1366.

- MESRI EA, FEITELSON MA, MUNGER K (2014). Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host & Microbe*, **15**, 3, s: 266-282.
- MORGIA G, FALSAPERLA M, MALAPONTE G, MADONIA M, INDELICATO M, TRAVALI S, MAZZARINO MC (2005). Matrix metalloproteinases as diagnostic (MMP-13) and prognostic (MMP-2, MMP-9) markers of prostate cancer. *Urol Res*, **33**, s: 44
- MORU S, TRAN V, NISHIKAWA K, KANEDA T, HAMADA Y, KAWAGUCHI N, FUJITA M, SAEGUSA J, TAKADA YK, MATSUURA N, ZHAO M, TAKADA Y (2013). A dominant-negative FGF1 mutant (the R50E mutant) suppresses tumorigenesis and angiogenesis. *Plos One*, **8**, s: 7927.
- MUTHUKKARUPPAN VR, KUBAI L, AUERBACH R (1982). Tumor-induced neovascularization in the mouse eye. *J Natl Cancer Inst*, **69**, 3, s: 699-708.
- NAGASE H, WOESSNER JF (1999). Matrix metalloproteinases. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 31, s: 21491-21494.
- NAKAMURA T, KUWAI T, KIM JS, FAN D, KIM SJ, FIDLER IJ (2007). Stromal metalloproteinase-9 is essential to angiogenesis and progressive growth of orthotopic human pancreatic cancer in parabiont nude mice. *Neoplasia*, **9**, 11, s: 979-986.
- NAKAMURA Y, TANAKA F, YOSHIKAWA Y, MIMORI K, INOUE H, YANAGA K, MORI M (2008). PDGF-BB is a novel prognostic factor in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*, **15**, 2129.
- NANDA DP, SIL H, MOULIK S, BISWAS J, MANDAL SS, CHATTERJEE A (2013). Matrix metalloproteinase-9 as a potential tumor marker in breast cancer. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, **32**, 2, s: 115-129.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE, Surveillance, Epidemiology and End Results Program. Erişim Adresi: [<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>]. Erişim Tarihi: 12.10.2016.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Erişim Adresi: [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]. Erişim Tarihi: 12.02.2015.
- NCBI BLAST. Erişim Adresi: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch]. Erişim Tarihi: 12.02.2015.
- NCCN Clinical Practise Guidelines (2016). Erişim Adresi: [https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp]. Erişim Tarihi: 05.11.2016.
- NELSON DL, COX MM (2008). *Principles of Biochemistry*, 5th Edition.
- NIJAJU UO, TEVAARWERK AJ, KIM K, CHANG JE, HANSEN RM, CHAMPENY TL, TRAYNOR AM, MEADOWS S, VAN UMMERSEN L, POWERS K, STEWART JA (2013). Capecitabine and oxaliplatin in combination as first or second line therapy for metastatic breast cancer: a Wisconsin oncology network trial. *Cancer Chemother Pharmacol*, **71**, 3, s: 613-618.
- NISHIDA N, YANO H, KOMAI K, NISHIDA T, KAMURA T, KOJIRO M (2004). Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 2 are related closely to the prognosis of patients with ovarian carcinoma. *Cancer*, **101**, 6, s: 1364-1374.
- NISSEN LJ, CAO R, HEDLUND EM, WANG Z, ZHAO X, WETERSKOG D, FUNA K, BRAKENHJELM E, CAO Y (2007). Angiogenic factors FGF2 and PDGF-BB synergistically promote murine tumor neovascularization and metastasis. *J Clin Invest*, **117**, 10, s: 2766-2777.
- NORRBY K (2014). Metronomic chemotherapy and anti-angiogenesis: can upgraded pre-clinical assays improve clinical trials aimed at controlling tumor growth. *Apmis*, **122**, 7, s: 565-579.
- NOWELL PC (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, **194**, 4260, s: 23-28.

- ONUR H, Meme Kanseri (2005). *Tıbbi Onkoloji*, İÇLİ F, AKBULUT H, Antip Yayınları, 1. Baskı, s: 247-265.
- ORNITZ DM, ITOH N (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol*, **2**, 3.
- ORNITZ DM, ITOH N (2015). The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, **4**, 3, s: 215-266.
- ORNITZ DM, XU J, COLVIN JS, MCEWEN DG, MACARTHUR CA, COULIR F, GAO G, GOLDFARB M (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem*, **271**, s: 15292-12297.
- PAMIR A, Kanser Kemoterapisi ve Sitotoksik İlaçlar (2005). *Tıbbi Onkoloji*, İÇLİ F, AKBULUT H, 1. Baskı, s: 145.
- PERONA R (2006). Cell signalling growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin Transl Oncol*, **8**, 2, s: 77-82.
- POLYAK K, WEINBERG RA (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*, **9**, s: 265-273.
- POMMIER Y, LEO E, ZHANG H, MARCHANH C (2010). DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol*, **17**, s: 421-433.
- POWERS CJ, MCLESKEY SW, WELLSTEIN A (2000). Fibroblast growth factors, their receptors and signalling. *Endocr Relat Cancer*, **7**, 3, s: 165-197.
- PRIMER3WEB. Version 4.0.0. Erişim Adresi: [<http://primer3.ut.ee/>]. Erişim Tarihi: 07.06.2015.
- RAMOS-DESIMONE N, HAHN-DANTONA E, SIPLEY J, NAGASE H, FRENCH DL, QUIGLEY JP (1999). Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 19, s: 13066-13076.
- RAMPİNO N, YAMAMOTO H, IONOV Y, Lİ Y, SAWAİ H, REED JC, PERUCHO M (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*, **275**, s: 967-969.
- RAUNDHAUG JE (2005). Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*, **9**, 2, s: 267-285.
- RAYMOND E, FAIVRE S, WOYNAROWSKI JM, CHANEY SG (1998). Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin Oncol*, **25**, s: 4-12.
- REED JC (1998). Bcl-2 family proteins. *Oncogene*, **17**, s: 3225-3236.
- REESE DM, TCHEKMEDYIAN S, CHAPMAN Y, PRAGER D, ROSEN PJ (1998-1999). A phase II trial of irinotecan in hormone-refractory prostate cancer. *Invest New Drugs*, **16**, 4, s: 353-359.
- RIBATTI D (2004). The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *BJH*, **128**, s: 303-309.
- RUSSO RC, GARCIA CC, TEIXEIRA MM, AMARAL FA (2014). The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol*, **10**, 5, s: 593-619.
- RYKALA J, PRZYBYŁOWSKA K, MAJSTEREK I, PASZ-WALCZAK G, SYGUT A, DZIKI A, KRUK-JEROMIN J (2011). Angiogenesis markers quantification in breast cancer and their correlation with clinicopathological prognostic variables. *Pathol Oncol Res*, **17**, 4, s: 809-817.
- SAID AH, RAUFMAN JP, XIE G (2014). The Role of Matrix Metalloproteinases in Colorectal Cancer. *Cancers*, **6**, 1, s: 366-375.
- SALTER JT, MILLER KD (2007). Antiangiogenic agents in breast cancer. *Cancer Investigations*, **25**, s: 518-526.

- SALVEN P, LYMBOUSSAKI A, HEIKKILA P, JAASKELA-SAARI H, ENHOLM B, AASE K, VON EULER G, ERIKSSON U, ALITALO K, JOENSUU H (1998). Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol*, **153**, 1, s: 103-108.
- SCHAROVSKY OG, MAINETTI LE, ROZADOS VR (2009). Metronomic chemotherapy: changing the paradigm that more is better. *Curr Oncol*, **16**, 2, s: 7-15.
- SCHVEIGERT D, VALUCKAS KP, KOVALCIS V, ULYS A, CHVATOVIC G, DIDZIAPETRIENE J (2013). Significance of MMP-9 expression and MMP-9 polymorphism in prostate cancer. *Tumori*, **99**, 4, s: 523-529.
- SEMENZA GL, ARTEMOV D, BEDI A, BHUJWALLA Z, CHILES K, FELDSEER D, LAUGHNER E, RAVI R, SIMONS J, TAGHAVI P, ZHONG H (2001). The metabolism of tumours: 70 years later. *Novartis Found Symp*, **240**, s: 251–260.
- SHARMA T, DHINGRA R, SINGH S, SHARMA S, TOMAR P, MALHOTRA M, BHARDWAJ TR (2013). Aflibercept: a novel VEGF targeted agent to explore the future perspectives of anti-angiogenic therapy for the treatment of multiple tumors. *Mini Rev Med Chem*, **13**, 4, s: 530-540.
- SHAY JW, WOODRING EW (2011). Role of telomeres and telomerase in cancer. *Semin Cancer Biol*, **21**, 6, s: 349-353.
- SHIGEOKA Y, ITOH K, IGARASHI T, ISHIZAWA K, SAEKI T, FUJII H, MINAMI H, IMOTO S, SASAKI Y (2001). Clinical effect of irinotecan in advanced and metastatic breast cancer patients previously treated with doxorubicin- and docetaxel-containing regimens. *Jpn J Clin Oncol*, **31**, 8, s: 370-374.
- SNOUSSI K, MAHFOUDH W, BOUAOUINA N, FEKIH M, KHAIRI H, HELAL AN, CHOUCANE L (2010). Combined effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and aggressiveness. *BMC Cancer*, **10**, s: 283.
- STEFANINI MO, WU FTH, GABHANN FM, POPEL AS (2008). A compartment model of VEGF distribution in blood, healthy and diseased tissues. *BMC Systems Biology*, **2**, 77.
- STEWART JA (2005). Cancer Management: A multidisciplinary approach, 9th Edition. *Oncology*, s: 1272.
- SUBRAMANIAM R, MIZOGUCHI A, MIZOGUCHI E (2016). Mechanistic roles of epithelial and immune cell signaling during the development of colitis-associated cancer. *Cancer Res. Front*, **2**, 1, s: 1-21.
- SUNDARARAJAN S, VOGELZANG N (2014). Chemotherapy in the treatment of prostate cancer – the past, the present and the future. *AJHO*, **10**, 6.
- SZEKANECZ Z, SHAH MR, HARLOW LA, PEARCE WH, KOCK AE (1994). Interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha are involved in human aortic endothelial cell migration. The possible role of these cytokines in human aortic aneurysmal blood vessel growth. *Pathobiology*, **62**, 3, s: 134-139.
- T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU (2016). Türkiye Kanser İstatistikleri, Kanser Daire Başkanlığı Raporu.
- TAKANO S, KAMIYAMA H, MASHIKO R, OSUKA S, ISHIKAWA E, MATSUMURA A (2010). Metronomic treatment of malignant glioma xenografts with irinotecan (CPT-11) inhibits angiogenesis and tumor growth. *J Neurooncol*, **99**, 2, s: 177-185.
- TALMADGE JE, FIDLER IJ (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res*, **70**, s: 5649-5669.
- TAUBE JM, ANDERS RA, YOUNG GD, XU H, SHARMA R, MCMILLER TL, CHEN S, KLEIN AP, PARDOLL DM, TOPALIAN SL, CHEN L (2012). Colocalization of inflammatory

- response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med*, **4**, 127, s: 127-137.
- TEBBUTT NC, CATTELL E, MIDGLEY R, CUNNINGHAM D, KERR D (2002). Systemic treatment of colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, **38**, s: 1000-1015.
- THIERY JP, ACLOQUE H, HUANG RY, NIETO MA (2009). Epithelial mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, **139**, s: 871-890.
- TODOROVIC-RAKOVIC N, MILOVANOVIC J (2013). Interleukin-8 in breast cancer progression. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, **33**, 10 s: 563-570.
- TUNG WL, WANG Y, GOUT PW, LIU DM, GLEAVE M, WANG Y (2011). Use of irinotecan for treatment of small cell carcinoma of the prostate. *Prostate*, **71**, 7, s: 675-681.
- U.S. NATIONAL CENTER FOR HEALTH STATISTICS (1971-2001). Vital statistics of the United States. *Annual*, National Vital Statistics Report (NVSR).
- U.S. PUBLIC HEALTH SERVICE (1900-1970). Vital statistics of the United States. *Annual*, **1-2**.
- UKAH CO, IKPEZE OC, ELEJE GU, EKE AC (2011). Adult granulosa cell tumor associated with endometrial carcinoma: a case report. *J Med Case Reports*, **5**, 340.
- VAN VJ, DEN STEEN PE, OPDENAKKER G (2013). Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)-the next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **48**, 3, s: 222-272.
- VANHOEFER U, HARSTRICK A, ACHTERRATH W, CAO S, SEEBER S, RUSTUM YM (2001). Irinotecan in the Treatment of Colorectal Cancer: Clinical Overview. *Journal of Clinical Oncology*, **19**, 5, s: 1501-1518.
- VARTANIAN RK, WEIDNER N (1994). Correlation of intratumoral endothelial cell proliferation with microvessel density (tumor angiogenesis) and tumor cell proliferation in breast carcinoma. *Am J Pathol*, **144**, 6, s: 1188-1194.
- VINEIS P, ALAVANJA M, BUFFLER P, FONTHAM E, FRANCESCHI S, GAO YT, GUPTA PC, HACKSHAW A, MATOS E, SAMET J, SITAS F, SMITH J, STAYNER L, STRAIF K, THUN MJ, WICHMANN HE, WU AH, ZARIDZE D, PETO R, DOLL R (2004). Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *Journal of the National Cancer Institute*, **96**, 2, s: 99-106.
- WAHL LM, KLEINMAN HK (1998). Tumor-associated macrophages as targets for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst*, **90**, 21, s: 1583-1584.
- WARBURG O (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, **123**, s: 309-314.
- WARBURG O, WIND F, NEGELEIN E (1927). The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol*, **8**, 6, s: 519-530.
- WAUGH DJJ, WILSON C (2008). The Interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, **14**, 21, s: 6735-6741.
- WEIDNER N, SEMPLE JP, WELCH WR, FOLKMAN J (1991). Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*, **324**, 1, s: 1-8.
- WESTERMARK B, HELDIN CH (1993). Platelet-derived growth factor: structure, function and implications in normal and malignant cell growth. *Acta Oncol*, **32**, 2, s: 101-105.
- WITSCH E, SELA M, YARDEN Y (2010). Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology*, **25**, s: 85-101.
- WRIGHT WE, PEREIRA-SMITH OM, SHAY JW (1989). Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **9**, 7, s: 3088-3092.

- WU ZS, WU Q, YANG JH, WANG HQ, DING XD, YANG F, XU XC (2008). Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *Int J Cancer*, **122**, s: 2050–2056.
- WYNENDAELE W, DERUA R, HOYLAERTS MF, PAWINSKI A, WAELKENS E, DE BRUIJN EA (1999). Vascular endothelial growth factor measured in platelet poor plasma allows optimal separation between cancer patients and volunteers: A key study an angiogenic marker in vivo. *Annals of Oncology*, **10**, s: 965-971.
- YANG B, TANG F, ZHANG B, ZHAO Y, FENG J, RAO Z (2014). Matrix metalloproteinase-9 overexpression is closely related to poor prognosis in patients with colon cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, **12**, 1, s: 1
- YILMAZ M, CHRISTOFORI G (2009). EMT, the cytoskeleton and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*, **28**, s: 15-33.
- YOKOYAMA Y, CHARNOCK-JONES DS, LICENCE D, YANAIHARA A, HASTINGS JM, HOLLAND CM, EMOTO M, UMEMOTO M, SAKAMOTO T, SATO S, MIZUNUMA H, SMITH SK (2003). Vascular endothelial growth factor-D is an independent prognostic factor in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer*, **88**, 2, s: 237-244.
- YONEMURA Y, ENDO Y, FUJITA H, FUSHIDA S, NINOMIYA I, BANDO E, TANIGUCHI K, MIWA K, OHYAMA S, SUGIYAMA K, SASAKI T (1999). Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer. *Clin Cancer Res*, **5**, 7, s: 1823-1829.
- YOSHIJI H, HARRIS SR, THORGEIRSSON UP (1997). Vascular endothelial growth factor is essential for initial but not continued in vivo growth of human breast carcinoma cells. *Cancer Res*, **57**, 18, s: 3925-3928.
- ZHANG J, YANG PL, GRAY NS (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, **9**, 1, s: 28-39.
- ZHAO Y, OYAMA A, YAMAMOTO M, IKEDA R, UCHI MH, TABATA S, FURUKAWA T, CHE XF, ZHANG S, OKA T, FUKUSHIMA M, NAHAGAWA MU, ONO M, KUWANO M, AKIYAMA SI (2008). Molecular basis for the induction of an angiogenesis inhibitor, thrombospondin-1 by 5-fluorouracil. *Experimental Therapeutics Molecular Targets and Chemical Biology*, **68**, 17.
- ZUCCARI DAPDC, LEONEL C, CASTRO R, GELALETI GB, JARDIM BV, MOSCHETA MB, REGIANI VF, FERREIRA LC, LOPES JR, NETO DDS. An immunohistochemical study of interleukin-8 (IL-8) in breast cancer. *Acta Histochem*, **114**, 6, s: 571–576.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Müge

Soyadı: ÖÇAL

Doğum Yeri: Samsun

Doğum Tarihi: 14.01.1990

Uyruğu: TC

Medeni Durumu: Bekar

İletişim Adresi: 35. Sokak Köşk Apt. 6/4 1. Etap Eryaman/Ankara

Telefon: 05068420968

E-mail Adresi: mugeocall@gmail.com

II- Eğitimi

Lise: Batıkent (YDA) Lisesi

Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Lisans: Anadolu Üniversitesi Uluslararası İlişkiler Bölümü

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Yabancı Dil: İngilizce

III- Ünvanları

2012: Biyolog

2015: MSc

IV- Mesleki Deneyimi

2010: Ankara Adli Tıp Kurumu

2011: Dinçsa İlaç Fabrikası

2011: Ekad Su Kaplumbağaları Araştırma Projesi

2013: Türkiye Halk Sağlığı Kurumu

2014: İzmir Körfezi'nin Yunusları Projesi

2014: TÜBİTAK 114S496 Numaralı 1001 Projesi

2015: Intech Yayın Firması

2016: Ankara Üniversitesi 16L0230002 Numaralı BAP Projesi

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Natura Doğa ve Kültür Koruma Derneği

Ekolojik Araştırmalar Derneği

Sualtı Araştırmaları Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınlar: **1. Kitap Adı:** Gene Therapy – Principles and Challenges / Cancer Gene Therapy Chapter

Yayınlanan Site: InTech

Yayınlanma Tarihi: 26.11.2015

DOI: 10.5772/59824

2. Makale Adı: A novel fluorescence turn-on coumarin-pyrazolone based monomethine probe for biothiol detection

Yayınlandığı Dergi: Tetrahedron

Yayınlanma Tarihi: 03.06.2016

DOI: 10.1016/j.tet.2016.06.008

3. Bildiri ve Poster Adı: The role of immune system on the efficacy of bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC)

Yayınlandığı Kongre: ESMO

Yayınlandığı Dergi: Annals of Oncology

Yayınlanma Tarihi: 06.06.2016

Poster Numarası: 1553P

DOI: 10.1093/annonc/mdw392.34

VII- Bilimsel Etkinlikler

Burslar: 1. TÜBİTAK 1001 Proje Bursu (2014-2017)

Projeler: 1. TÜBİTAK 114S496 Numaralı 1001 Projesi

2. Ankara Üniversitesi 16L0230002 Numaralı BAP Projesi

Seminerler: 1. Kemoterapinin kanser anjiyogenezi üzerine etkisi