

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**4T1 VE 4THMpc FARE MEME KANSER HÜCRE HATLARINDA
ANTIANGİOGENİK ANTİTÜMORAL İLAÇ OLAN
ENDOSTATİN'İN
TEK BAŞINA VE RADYOTERAPİ İLE KOMBİNE OLARAK
ANGİOGENİK FAKTÖRLERDEN P MADDESİ İLE P MADDESİNİ
PARÇALAYAN NEPRİLİZİN VE ADAM-10 ENZİMLERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Esra ARSLAN AYDEMİR

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2010

**4T1 VE 4THM_{pc} FARE MEME KANSER HÜCRE HATLARINDA
ANTIANGİOGENİK ANTİTÜMORAL İLAÇ OLAN
ENDOSTATİN'İN
TEK BAŞINA VE RADYOTERAPİ İLE KOMBİNE OLARAK
ANGİOGENİK FAKTÖRLERDEN P MADDESİ İLE P MADDESİNİ
PARÇALAYAN NEPRİLİZİN VE ADAM-10 ENZİMLERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Esra ARSLAN AYDEMİR

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2010

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**4T1 VE 4THMpc FARE MEME KANSER HÜCRE HATLARINDA
ANTIANGİOGENİK ANTİTÜMORAL İLAÇ OLAN
ENDOSTATİN'İN
TEK BAŞINA VE RADYOTERAPİ İLE KOMBİNE OLARAK
ANGİOGENİK FAKTÖRLERDEN P MADDESİ İLE P MADDESİNİ
PARÇALAYAN NEPRİLİZİN VE ADAM-10 ENZİMLERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Esra ARSLAN AYDEMİR

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Bu tez Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından
107T204 proje numarası ile desteklenmiştir.**

2010

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**4T1 VE 4THM_{pc} FARE MEME KANSER HÜCRE HATLARINDA
ANTIANGİOGENİK ANTİTÜMORAL İLAÇ OLAN
ENDOSTATİN'İN
TEK BAŞINA VE RADYOTERAPİ İLE KOMBİNE OLARAK
ANGİOGENİK FAKTÖRLERDEN P MADDESİ İLE P MADDESİNİ
PARÇALAYAN NEPRİLİZİN VE ADAM-10 ENZİMLERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Esra ARSLAN AYDEMİR

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 01/06/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Kayahan FIŞKIN (Danışman)

Prof.Dr. Zafer EREN

Prof.Dr. Atila YANIKOĞLU

Prof.Dr. Bülent KAYA

Doç.Dr. Aylin Fidan KORCUM

ÖZET

**4T1 VE 4THMpc FARE MEME KANSER HÜCRE HATLARINDA
ANTİANJİOGENİK ANTİTÜMORAL İLAÇ OLAN
ENDOSTATİN'İN
TEK BAŞINA VE RADYOTERAPİ İLE KOMBİNE OLARAK ANJİOGENİK
FAKTÖRLERDEN P MADDESİ İLE P MADDESİNİ PARÇALAYAN
NEPRİLİZİN VE ADAM-10 ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Esra ARSLAN AYDEMİR

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Haziran 2010, 157 Sayfa

Var olan damarlardan yeni kan damarlarının oluşumu olarak adlandırılan anjiogeneze, günümüzde antikanser araştırmalarının temel taşı olarak kabul edilmektedir. Potansiyel bir antianjiogenik ajan olan endostatin, diğer kanser tedavileri ile birlikte kombine edilerek kullanılmaktadır. Bu çalışmada 24, 48, 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda endostatinin, tek başına ve radyoterapi ile birlikte, 4T1 ve 4THMpc fare meme kanser hücreleri üzerinde sergilediği sitotoksik etkiler araştırılmıştır. Bunun yanı sıra, endostatinin ve/veya radyoterapinin belirlenen sitotoksik dozlarda ADAM-10, Neprilizin enzim aktiviteleri ile P maddesi miktarları üzerindeki etkileri de incelenmiştir.

Yapılan dört farklı sitotoksikite testinin sonuçlarına göre, 4 µg/ml endostatin dozu ve 45 Gy Co⁶⁰ ışınlanması 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermiştir. Belirlenen dozlarda endostatin ve radyoterapinin birlikte, kaspaz-3'ü aktive ettiği, 4T1 ve 4THMpc hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği, ADAM 10 ve Neprilizin enzim aktivitelerindeki artışa bağlı olarak, P maddesi seviyelerinin kontrol gruplarına oranla düşmesine yol açtığı *in vitro* bir çalışmada ilk kez gösterilmiştir.

Sonuç olarak, endostatin ve radyoterapi kombinasyonu 4T1 ve 4THMpc fare meme kanser hücre hatlarında tedavilerin tek başına denendiğinde yarattığından daha fazla

sitotoksik etkiler yaratmıştır. Elde ettiğimiz veriler, tumor hücrelerinde her iki tedavinin de etkinliğini artırmayı hedef alan yeni kombinasyon stratejileri için zemin oluşturabilir.

ANAHTAR KELİMELER: 4T1, 4THMpc, ADAM-10, Endostatin, Neprilizin

JÜRİ: Prof.Dr. Kayahan FIŞKIN (Danışman)

Prof.Dr. Zafer EREN

Prof.Dr. Atila YANIKOĞLU

Prof.Dr. Bülent KAYA

Doç.Dr. Aylin Fidan KORCUM

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ENDOSTATIN AN ANTIANGIOGENIC AND ANTITUMORAL DRUG, ALONE AND IN COMBINATION WITH RADIOTHERAPY ON SUBSTANCE P LEVEL AS WELL AS SUBSTANCE P DEGRADING ENZYMES; ADAM 10 AND NEPRILYSIN IN 4T1 AND 4THMpc MOUSE BREAST CANCER CELL LINES

Esra ARSLAN AYDEMİR

PhD Thesis in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

June 2010, 157 Pages

Nowadays, formation of new blood vessels from the pre-existing vasculature, named as angiogenesis, is adopted as the cornerstone of anticancer researches. Endostatin, as a potential antiangiogenic agent, is being implemented in combination with other cancer treatments. Here in, we combined endostatin with irradiation and examined the possible interplay between these two treatment modalities on mouse breast tumor cells and their more metastatic phenotypes.

According to four different cytotoxicity test results, at the end of the 72 hour, 4 µg/ml endostatin and 45 Gy Co⁶⁰ irradiation alone showed significant cytotoxic effects on 4T1 and 4THMpc mouse breast cancer cell line. We demonstrate for the first time that at specified doses, endostatin and irradiation together activates caspase-3, inhibits *in vitro* proliferation of 4T1 and 4THMpc breast cancer cells directly, potentiates the activity of ADAM 10 and Neprilysin enzymes. Moreover, as the result of changes in ADAM 10 and Neprilysin activity, measured SP levels were decreased when compared to the relative controls.

We suggest that endostatin and radiation together, lead hydrolysis of SP to its bioactive fragments and thus induce apoptosis. These data may provide the basis for strategies, in which it is possible to use endostatin and irradiation together to enhance the apoptosis of tumor cells for improving the efficiency of each independent therapy..

KEY WORDS: 4T1, 4THMpc, ADAM-10, Endostatin, Neprilysin

COMMITTEE: Prof.Dr. Kayahan FIŞKIN (Supervisor)

Prof.Dr. Zafer EREN

Prof.Dr. Atila YANIKOĞLU

Prof.Dr. Bülent KAYA

Doç.Dr. Aylin Fidan KORCUM

ÖNSÖZ

Kompleks yaşam evrimleştiğinden bu yana tüm canlılar gibi insanlarda kanserden etkilenmiştir. İnsanlarda kanserin en eski tanımlanması, milattan önce 3000-1500 yıllarında bir mısır papirüs kâğıdında yazmakta ve meme kanserini anlatmaktadır. Tıp tarihinin önde gelen ismi Hipokrat, milattan önce 400 yılında iyi ve kötü huylu tümörler için ilk tanımlamayı yapmıştır. O yıllardan günümüze kadar varlığını devam ettiren bu amansız hastalık ile mücadele sağlık alanında yapılan çalışmaların başını çekmektedir.

Hücre biyolojisinde sağlanan gelişmelere paralel olarak, kanserin moleküler temeli de aydınlatılmaya başlanmıştır. Kanser, normal hücrelerin mutasyona uğraması, bu mutantların hücrede var olan tamir mekanizmalarından kaçarak bağımsız şekilde çoğalmaları sonucu ortaya çıkmaktadır. Moleküler biyolojide kullanılan teknikler geliştikçe kanser hücrelerini normal hücreden ayıran özellikler de birer birer aydınlatılmaya başlanmıştır. Hücreye ait hiçbir sinyale bağlı kalmadan başına-buyruk hareket edebildiği, kontrolsüz bir şekilde çoğalabildiği, hasarlı hücreleri tanıyıp öldüren mekanizmaları alt ederek canlı kalmayı başardığı, kendisi için gerekli tüm besin ve oksijeni karşılayabilecek yeni damarların oluşmasını sağladığı, saldırgan kimliğini gizlemeden çevre dokulara atak yaptığı ve seyahat için de kan ve lenf sistemini kendine tahsis ettiği için kanser, yüzyılın amansız hastalığı olarak tanımlanmaktadır.

Kanser hücresi geçirdiği mutasyonlar sonrasında çok farklı özellikler kazanmış olsa da, tüm canlılar gibi besin ve oksijen olmadan canlı kalamaz. Başka bir deyişle, kanser hücresinin çoğalması ve başka dokulara taşınması için, normalden daha fazla kan damarına ihtiyacı vardır. Var olan damarlardan yeni damarların oluşmasını yani anjiogenezi, tetikleyerek bu sorunu da ortadan kaldırmayı başarır. Bilim adamlarının anjiogenezi ve kanser arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmalarının hemen ardından, kanser hücrelerinde anjiogenezi tetikleyen mekanizmaları baskılamak ve bu sayede alternatif tedaviler oluşturmak fikri gündeme gelmiştir. Antianjiogenezi olarak isimlendirilen bu mekanizma, anjiogenezi baskılamak ve bu sayede metastazı da önemli ölçüde engellemek için kullanılır. Bu bağlamda anjiyogenezi inhibitörleri olarak adlandırılan birçok ajan prelinik denemelerde kullanılmaktadır. Bevacizumab, Thalidomide, Macugen, Lucentis ve Endostar prelinik denemelerden başarı ile geçip kanser

tedavisinde kullanılan antianjiogenik ilaçlardan bazılarıdır. Ancak bu ilaçların etki mekanizması tam anlamı ile aydınlatılamamıştır.

Endostatin, ticari formda Endostar, etkili bir antianjiogenik ajandır. Hücre tipine ve kullanılan doza bağlı olarak tedavide farklı sonuçlar verdiği yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. Tek başına kullanıldığında beklenen etkiyi yaratmadığı ancak klasik tedaviler ile birlikte uygulandığında oldukça başarılı sonuçlar verdiği göz önüne alınarak, bu çalışmada fare meme kanser hücrelerinde, radyoterapi ile kombine edilerek kullanılmıştır.

Kanser ve merkezi sinir sistemi arasındaki ilişki son yıllarda oldukça dikkat çekmektedir. Fizyolojik stres ile tetiklenen nöropeptitler anjiogenezi tetikleyerek kanserin ilerlemesine katkı sağlamaktadır. Kanserle en çok ilişkilendirilen nöropeptit is P Maddesidir. Endojen opioid bir peptit olan P maddesi, anjiogenik özelliğinin keşfedilmesi ile kanser çalışmalarına sıkça konu olmaktadır.

Tez kapsamında Endostatin'in tek başına ve radyoterapi ile birlikte, P maddesi ve onu parçalama yeteneğindeki iki enzim üzerindeki etkilerini araştırdık. Elde ettiğimiz şaşırtıcı ve aynı zamanda düşündürücü olan bulguların, kanser tedavisi için durmadan çalışan değerli bilim insanlarına katkı sağlayacağını umut etmekteyiz.

Bu denli kapsamlı bir çalışma ile doktora yapabilme fırsatını sunan Türkiye Bilimsel Araştırma ve Geliştirme Kurumu (TÜBİTAK)'na, çalıştığım konunun duayeni olarak kabul edilen Judah Folkman'ın **“Bilim, hayal edebildiklerinizdir”** sözünü destekler nitelikte; bana hayal kurabilmeyi, yanlış yapmaktan korkmamayı, cesareti, inanmayı, mücadeleyi öğreten; sadece akademik değil hayata dair pek çok konuyu danışabildiğim, sorularıma sabırla yanıt arayan, bildiği her şeyi benimle paylaşan, bana güç veren, önüme çıkan engellerde hemen yanı başımda olan, desteğini ve şefkatini hep hissettiğim, tanımaktan onur ve gurur duyduğum sevgili büyüğüm, sayın danışmanım, biricik hocam Sayın Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN'a, tez çalışmalarımın büyük bir bölümünü yürüttüğüm Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma Uygulama Merkezinden Doç.Dr. Nuray ERİN önderliğinde bu birimde görev yapan tüm merkez

alışanlarına, tezimle ilgili sorunlarda bilgisinden ve tecrubesinden yararlandığım Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Hüseyin SÜMBÜL'e, her daim yanımda olan Sayın Hocam Doç. Dr. R. Süleyman GÖKTÜRK'e, Radyasyon Onkolojisi Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Aylin Fidan KORCUM'a, meslektaşım Araştırma Görevlisi Ece ŞİMŞEK ÖZ'e, Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nün Öğretim Üyelerine, bölüm arkadaşlarıma ve idari konularda her zaman yardıma koşan Biyoloji Bölümü Sekreteri Selda ÇİVRİL'e, canım oğlum Demir AYDEMİR'e ve doktora süresinin her anında yanımda olan, desteğini ve sevgisini hep hissettiğim sevgili hayat arkadaşım Serdar AYDEMİR'e, uzakta olsalar da her an yanımda olan CANIM AİLEME sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI.....	5
2.1 Kanser.....	5
2.1.1. Meme kanseri.....	8
2.2 Apoptoz.....	12
2.3 Anjiogenez.....	19
2.3.1. Anjiogenezde rol oynayan enzimler.....	26
2.3.1.1. Disintegrin ve metalloproteazlar (ADAM'lar).....	28
2.3.2.2. Neprilizin.....	30
2.3.2. Anjiogenez modülatörleri.....	32
2.3.2.1. Endostatin.....	35
2.4 Klasik kanser tedavileri	40
2.4.1. Cerrahi müdahale ile tümörün uzaklaştırılması	40
2.4.2. Kemoterapi	40
2.4.3. Radyoterapi	41
2.4.4. Anti-anjiogenik terapi.....	43
2.4.5. Kombine kanser tedavileri.....	45
2.5 Anjiogenez ve kanserle ilişki bir nöropeptit (P maddesi).....	46
3.MATERYAL VE METOT.....	51
3.1. Hücre Kültürü Şartlarının belirlenmesi	51
3.2. Radyoterapi Dozunun Belirlenmesi.....	51
3.3. Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi	51
3.3.1. Endostatin dozlarının optimizasyonu ve standardizasyonu.....	52
3.3.2. MTT hücre canlılık testi	52

3.3.3. Live-Dead canlılık/sitotoksosite testi	54
3.3.4. <i>Trian mavis</i> i testi	55
3.3.5. Kaspaz-3 enzim aktivitesi	56
3.4. Endostatin'in P Maddesi Üzerine Etkileri	57
3.4.1. P maddesi ölçümleri için optimizasyon.....	57
3.4.2. P maddesi ölçümleri için besi yeri ve hücrelerin hazırlanması.....	58
3.4.2.1. Hücre içerisinde bulunan P maddesi miktarının saptanması...	58
3.4.2.2. Hücre içerisinde bulunan P maddesi miktarının saptanması...	59
3.4.3. P maddesi ölçüm protokolü.....	59
3.4.4 P maddesi miktarının tespiti.....	59
3.5. ADAM 10 ve Neprilizin Enzim Aktiviteleri Üzerine etkilerin belirlenmesi.....	60
3.5.1 ADAM 10 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	60
3.5.2.Neprilizin Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	61
3.6.ADAM 10 ve Neprilizin Enzim Aktivitelerinin western-blot ile gösterilmesi.....	62
3.6.1. Western blotta kullanılan solüsyonların içerikleri	62
3.6.2. Hücrelerin Hazırlanması.....	63
3.6.3. Jellerin hazırlanması	64
3.6.4. SDS-PAGE.....	64
3.6.5.Antikorlarla işaretleme	65
3.6.6. Membranın görüntülenmesi	65
3.7. İstatistiksel Analiz.....	65
4. BULGULAR	67
4.1 Radyoterapinin 4T1 ve 4THMpc Hücre Hatları Üzerine Etkisi	67
4.1.1. Radyoterapinin 4T1 hücre hattı üzerine etkisi	67
4.1.1.1. Farklı dozlarda radyoterapi uygulamasının 4T1 hücre hattı üzerine etkisi.....	67
4.1.2. Radyoterapinin 4THMpc hücre hattı üzerine etkisi.....	70
4.1.2.1. Farklı dozlarda radyoterapi uygulamasının 4THMpc hücre hattı üzerine etkisi.....	70
4.2 Endostatin'in Sitotoksik Etkileri.....	73
4.2.1. MTT test sonuçları	73

4.2.2.Live/Dead test sonuçları	92
4.2.3. <i>Tripán Mavi</i> test sonuçları	98
4.2.4. Kaspaz-3 enzim aktivitesi test sonuçları	99
4.3. Endostatin'in ADAM 10 Enzimi Üzerine Etkisi.....	101
4.4 Endostatin'in Neprilizin enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	103
4.5 Endostatin'in P Maddesi Miktarları Üzerine Etkileri.....	105
4.5.1. 4T1 hücre hattında Endostatin'in P Maddesi Miktarları Üzerine Etkileri.	105
4.5.2.4THM hücre hattında Endostatin'in P Maddesi Miktarları Üzerine Etkileri	106
4.6.Endostatin'in Western blot sonuçları.....	107
4.6.1. Endostatin'in ADAM 10 enzimi Western blot sonuçları	107
4.6.2. Endostatin'in Neprilizin enzimi Western blot sonuçları	108
5. TARTIŞMA.....	109
5.1 Radyoterapinin 4T1 ve 4THMpc Hücre Hattı Üzerine Etkisi.....	109
5.2 Endostatin'in Sitotoksik etkileri.....	110
5.3 Endostatin'in ADAM-10 ve Neprilizin Enzim Aktiviteleri ile P maddesi Üzerine Etkileri.....	120
6. SONUÇ	127
7. KAYNAKLAR.....	129
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrad Derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
ml	Mililitre
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

Kısaltmalar

4THMpc:	4T1 Heart Metastases Post Capsaicin
⁶⁰ Co:	Kobalt 60
ACE:	Angiotensin Dönüştürücü Enzim
ADAM:	A Disintegrin and A metalloproteaz
ANP:	Atrial Natriüretik Peptit
APP:	Amiloyid Öncül Protein
APS:	Amonyum per Sülfat
Arg:	Arjinin
Asp:	Aspartik asit
Aβ:	Amiloyid Beta
bFGF:	Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
BSA:	Bovin-Serum-Albumin
CAM:	Koryoallantoik Membran
DAG:	Dansil-D-Ala-Gly
DAGPNG:	Dansil-D-Ala-Gly-p-nitro-Phe-Gly
ddH ₂ O:	Çift Distile Su

DMSO:	Dimetilsülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
ECM:	Ekstraselüler Matriks
EDTA:	EtilenDiamin Tetra Asetik Asit
EIA:	Eliza-Immun-Assay
FGF:	Fibroblast Büyüme Faktörü
Gln:	Glisin
Gy:	Gray
HIF 1- α :	Hipoksi İndükleyici Faktör
IL-6:	İnterlökin 6
kDa:	Kilo Dalton
Leu:	Lösin
Lys:	Lizin
MAPK:	Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinaz
MDR:	Çoklu İlaç Direnci
Met:	Metiyonin Aminoasidi
MMP:	Matriks Metallo Proteaz
mRNA:	Mesajcı Ribonükleik Asit
MTT:	3-(4,5)-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NaCl:	Sodyum Klorür
NEP:	Neprilizin
NEP:	Neprilizin Enzimi
NF- κ B:	Nüklear faktör Kappa-B
NK-1R:	Nörokinin-1 Reseptörü
PAGE:	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PBS:	Fosfat-Tuz- Tamponu
PD-ECGF:	Platelet-Kökenli Endotel Hücre Büyüme Faktörü
pH:	Bir Solüsyonun Asitlik yada Bazlık Değeri
Phe:	Fenil alanin
PPT-A:	PreProTakikinin-A
Pro:	Prolin
PVDF:	Poliviniliden Florid

rpm:	Dakikadaki Devir Sayısı
RT:	Radyoterapi
sAPP:	Salınabilir form APP
SDS:	Sodyum Dodesil Sülfat
TACE:	TNF- α Dönüştürücü Enzim
TAL:	Talidomit
TAPI:	Tace İnhibitörü
TBS:	Tris-Tuz-Tamponu
TBST:	TBS+ Tween 20
TEMED:	Tetra Etil MetilenDiamid
TFA:	TriFloroAsetik Asit
TGF- β :	Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta
TIMP:	Metallo Proteazların Doku İnhibitörü
TNF- α :	Tümör Nekroz Faktör- alfa
Val:	Valin
VEGF:	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
VIP:	Vasoaktif İntestinal peptit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Tez çalışmasında aydınlatılmak istenen noktalar	4
Şekil 2.1. Kanser gelişimi.....	5
Şekil 2.2 Malignansinin ortaya çıkışı.....	7
Şekil 2.3 Kanser hücrelerinin altı temel özelliği.....	8
Şekil 2.4. Meme kanserinin cerrahi tedavisi.....	9
Şekil 2.5 Meme kanserinin alt türlerini açıklayan model.....	10
Şekil 2.6 4T1 (A) ve 4THMpc (B) hücrelerinin mikroskop görüntüleri (400 X).....	11
Şekil 2.7 Apoptoz ve nekrozda meydana gelen yapısal değişiklikler.....	12
Şekil 2.8 Apoptotik bir hücrenin beyaz kan hücresi tarafından fagositozu.....	14
Şekil 2.9 Apoptotik mekanizmanın şematik gösterimi	15
Şekil 2.10 Biyolojik fonksiyonlarına göre kaspaz enzimleri.....	16
Şekil 2.11 Kanser ve Normal hücreler arasındaki temel morfolojik değişiklikler.....	19
Şekil 2.12 İn situ bir tümörün anjiogenez ile in vaziv form kazanması.....	20
Şekil 2 .13 Ünlü ressam Leonardo da Vinci'nin anjiogenez mekanizmasını çözebilmek için yaptığı eskizlerden örnekler.....	21
Şekil 2.14 Leonardo da Vinci'nin anjiogenez mekanizmasının çözülmesine büyük katkılar sağlayan çizimleri.....	22
Şekil 2 .15 Tümörde meydana gelen anjiogenezin ilk in vivo görüntüsü.....	23
Şekil 2.16 MMP' lerin yapısal bölgeleri.....	27
Şekil 2.17. ADAM'lardaki yapısal bölgeler ve fonksiyonları.....	29
Şekil 2.18. Neprilizin enziminin yapısı.....	31
Şekil 2.19. Endostatin oluşumu.....	36
Şekil 2.20. Endostatin'in antianjiogenik mekanizması.....	37
Şekil 2.21. Endostatinin aktivasyonu ve anjiogenez üzerine etkisi.....	38
Şekil 2.22. P maddesinin yapısı.....	47
Şekil 2.23. P maddesi, inflamatuvar hücreleri uyarıp histamin salınımını tetikleyerek.....	48
ağrının hissedilmesini sağlar	
Şekil 3.1. MTS ve oluşturduğu formazanın yapısı.....	53
Şekil 3.2. Işık mikroskopunda canlı (A) ve ölü (B) hücrelerin görüntüsü.....	56
Şekil 4.1. 5 Gray radyoterapinin 4T1 hücre hattı üzerine gösterdiği etki	69
Şekil 4.2. 10 Gray radyoterapinin 4T1 hücre hattı üzerine gösterdiği etki.....	69

Şekil 4.3. 20 Gray radyoterapinin 4T1 hücre hattı üzerine gösterdiği etki	70
Şekil 4.4. 45 Gray radyoterapinin 4T1 hücre hattı üzerine gösterdiği etki	71
Şekil 4.5. 5 Gray radyoterapinin 4THMpc hücre hattı üzerine gösterdiği etki	72
Şekil 4.6. 10 Gray radyoterapinin 4THMpc hücre hattı üzerine gösterdiği etki	72
Şekil 4.7. 20 Gray radyoterapinin 4THMpc hücre hattı üzerine gösterdiği etki	73
Şekil 4.8. 45 Gray radyoterapinin 4THMpc hücre hattı üzerine gösterdiği etki	73
Şekil 4.9. Endostatinin (%1 serumlu besiyeri içerisinde) tek başına 4T1 hücreleri (1000 hücre/kuyucuk) üzerindeki etkisi	74
Şekil 4.10. 4T1 hücreleri (1000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan radyoterapi grubu deney sonuçları.....	75
Şekil 4.11. 4T1 hücreleri (3000 hücre) ile serumsuz besiyeri kullanılarak yapılan Endostatin grubu deney sonuçları.....	75
Şekil 4.12. 4T1 hücreleri (3000 hücre) ile serumsuz besiyeri kullanılarak yapılan radyoterapi grubu deney sonuçları.....	76
Şekil 4.13. 4THMpc hücreleri (1000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan Endostatin grubu deney sonuçları.....	76
Şekil4.14. 4THMpc hücreleri (1000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan radyoterapi grubu deney sonuçları.....	77
Şekil 4.15. 4THMpc hücreleri (3000 hücre) ile serumsuz besiyeri kullanılarak yapılan kontrol grubu deney sonuçları.....	77
Şekil 4.16. 4THMpc hücreleri (3000 hücre) ile serumsuz besiyeri kullanılarak yapılan radyoterapi grubu deney sonuçları.....	78
Şekil 4.17. 4T1 hücreleri (2500 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan Endostatin grubu deney sonuçları.....	79
Şekil 4.18. 4T1 hücreleri (2500 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan radyoterapi grubu deney sonuçları	79
Şekil 4.19. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile serumsuz besiyeri kullanılarak yapılan Endostatin grubu deney sonuçları.....	80
Şekil 4.20. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile serumsuz besiyeri kullanılarak yapılan radyoterapi grubu deney sonuçları.....	80
Şekil 4.21. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan Endostatin grubu deney sonuçları	81

Şekil 4.22. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan radyoterapi grubu deney sonuçları	81
Şekil 4.23. 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan kontrol grubu deney sonuçları.....	82
Şekil 4.24. 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan radyoterapi grubu deney sonuçları.....	82
Şekil 4.25. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 24 saat,Endostatin grubu	83
Şekil 4.26. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 24 saat, radyoterapi grubu	84
Şekil 4.27. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 48 saat, Endostatin grubu	84
Şekil 4.28 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 48 saat, radyoterapi grubu.....	85
Şekil 4.29. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 72 saat, Endostatin grubu	85
Şekil 4.30. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 72 saat, radyoterapi grubu	86
Şekil 4.31. Tek başına radyoterapinin, 4T1 hücreleri (5000 hücre) üzerine 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası gözlenen etkisi.....	87
Şekil 4.32. Tek başına radyoterapinin, 4T1 hücreleri (5000 hücre) üzerine 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası gözlenen etkisi	87
Şekil 4.33. Tek başına radyoterapinin, 4T1 hücreleri (5000 hücre) üzerine 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası gözlenen etkisi	88
Şekil 4.34. 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 24 saat, Endostatin grubu	89
Şekil 4.35. 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 24 saat, radyoterapi grubu	89
Şekil 4.36. 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 48 saat, Endostatin grubu	90
Şekil 4.37. 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 48 saat, radyoterapi grubu	90

Şekil 4.38. 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 72 saat, Endostatin grubu	91
Şekil 4.39. 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 72 saat, radyoterapi grubu	91
Şekil 4.40. Tek başına radyoterapinin 4THMpc hücreleri (5000 hücre) üzerine, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda gözlenen etkisi.....	92
Şekil 4.41. Tek başına radyoterapinin 4THMpc hücreleri (5000 hücre) üzerine, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda gözlenen etkisi	92
Şekil 4.42. Tek başına radyoterapinin 4THMpc hücreleri (5000 hücre) üzerine, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda gözlenen etkisi.....	93
Şekil 4.43. Tek başına radyoterapinin endostatinin ve ikili kombinasyonun 4T1 ve 4THMpc hücreleri (5000 hücre) üzerine, 72 saat, gözlenen etkisi.....	93
Şekil 4.44. 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 24 saat, Endostatin grubu	94
Şekil 4.45. 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 24 saat, radyoterapi grubu	95
Şekil 4.46. 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 48 saat, Endostatin grubu.....	95
Şekil 4.47. 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besi yeri kullanılarak yapılan 48 saat, radyoterapi grubu.....	96
Şekil 4.48. 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 72 saat, Endostatin grubu.....	96
Şekil 4.49. 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 72 saat, radyoterapi grubu.....	97
Şekil 4.50. 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 24 saat, Endostatin grubu.....	97
Şekil 4.51. 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 24 saat, radyoterapi grubu.....	98
Şekil 4.52. 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 48 saat, Endostatin grubu.....	98

Şekil 4.53. 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 48 saat, radyoterapi grubu.....	99
Şekil 4.54. 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 72 saat, Endostatin grubu.....	99
Şekil 4.55. 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 72 saat, radyoterapi grubu	100
Şekil 4.56. 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde tripan mavisi testinden elde edilen canlı hücre sayılarının karşılaştırılması	101
Şekil 4.57 4T1 hücreleri (1x10 ⁶) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan deneylerde, 72 saat sonrası kaspaz-3 enzim aktivitesindeki artış.....	102
Şekil 4.58. 4T1 hücreleri (1x10 ⁶) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan deneylerde, 72 saat sonrası kaspaz-3 enzim aktivitesindeki artış	103
Şekil 4.59. Endostatin'in 4T1 hücrelerinde ADAM-10 enzim aktivitesi üzerine etkileri...	104
Şekil 4.60. Endostatin'in, 4THMpc hücrelerinde ADAM-10 enzim aktivitesi üzerine etkileri.....	105
Şekil 4.61. Endostatin'in, 4T1 hücrelerinde 24 saat sonunda Neprilizin enzim aktivitesi üzerine etkileri.....	105
Şekil 4.62. Endostatin'in 4THMpc hücrelerinde 24 saat sonunda Neprilizin enzim aktivitesi üzerine etkileri	106
Şekil 4.63. Endostatin'in 4T1 hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda P maddesi miktarları üzerine etkisi.....	107
Şekil 4.64. Endostatin'in 4THMpc hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda P maddesi miktarlarına üzerine etkisi.....	108
Şekil 4.65. Endostatin'in ADAM 10 enzimi üzerine etkilerinin western blot ile gösterilmesi	109
Şekil 4.66. Endostatin'in Neprilizin enzimi üzerine olan etkilerinin western blot ile gösterilmesi.....	110

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Apoptozun rolleri.....	16
Çizelge 2.2. Anjiogenezin artması sonucu gelişen bazı hastalıklar.....	22
Çizelge 2.3. Yetersiz anjiogenez (damar regresyonu) sonucu gelişen bazı hastalıklar..	23
Çizelge 2.4. Pro-anjiogenik ve Anti-anjiogenik faktörler.....	31
Çizelge 4.1. 4T1 ve 4THMpc hücreleri üzerine etki göstermeyen radyoterapi dozları.	68
Çizelge 4.2. 4T1 ve 4THMpc hücre hatlarının farklı endostatin dozları ve inkübasyon sürelerindeki canlılık oranları.....	99

1. GİRİŞ

Kansere neden olan genetik değişiklerin çoğu, bu hücrelerin büyüme veya ölümü kontrol eden ekstraselüler sinyalleri görmezden gelmelerini sağlamaktadır. Hücre bölünmesi, hücre döngüsünde yer alan ve günümüzde ayrıntılı bir biçimde tanımlanmış olan kontrol noktaları tarafından titizlikle düzenlenir. Benzer şekilde, hücrenin ölüme yönlendirilmesi de ancak bazı sinyaller ile aktive olabilen, genetik olarak programlanmış bir mekanizma sayesinde gerçekleşebilir. Apoptoz olarak adlandırılan bu mekanizma sayesinde mutasyona uğramış, gereğinden fazla çoğalmış ya da artık organizma için gerekli olmayan hücreler ölüme yönlendirilir. Apoptoz mekanizmasının aktivasyonunu sağlamak, var olan tümörü yok etmek için kaçınılmazdır (Bunz 2005).

Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesi için gerekli olan özellikler aynı zamanda bu hücreleri yok edebilmek için hedef almak gereken biyolojik hedeflerdir. Bunlar arasından, son yıllarda en fazla dikkat çeken, var olan damarlardan yeni kan damarları oluşumu olarak tanımlanan anjiogeneiz mekanizmasıdır. Tümörün büyümesi için gerek duyduğu besin ve oksijen, tümörü çevreleyen kan damarlarından sağlanır. O halde, kanser hücresi anjiogeneiz mekanizması olmadan ancak belirli bir büyüklüğe ulaşabilir (Connolly vd 2002).

Son 20 yıldır, anjiogenezi hedef alan tedavilerde oldukça önemli bir yol katedilmiştir. Anjiogeneiz inhibitörlerinden bazıları günümüzde kanser tedavisinde kullanılmakta ve birçoğu da klinik denemelerin son basamağında denenmektedir. Bu bileşiklerin çoğu dolaşımda var olan anjiogenik büyüme faktörlerini ortadan kaldırır ya da söz konusu büyüme faktörlerinin reseptör/sinyal yollarını bloke eder. Bu gruba ait diğer ajanlar doğrudan endotel hücreleri düzenleyen yolları etkilemek koşulu ile anjiostatik etkiler sergilemektedir; Genetik açıdan oldukça kararlı olan endotel hücreleri hedef aldığı için, antianjiogenik tedavilerde kullanılan ajana karşı direnç gelişim olasılığı da yok denecek kadar azdır. Böyle önemli bir avantaja sahip olmasına karşın, antianjiogenik terapinin kullanımı ne yazık ki yaygınlaştıramamıştır. Bunun temel nedeni ise kullanılan antianjiogenik bileşiklerin etki mekanizmalarının hala tam anlamıyla aydınlatılamamış olmasıdır (Sebastien ve Arjan 2007).

Bu gün bilinmektedir ki, kansere bağılı ölümlerin çoğu primer tümörlerden çok, primer tümörün uzak noktalara göç etmesi olarak tanımlanan “metastaz” nedeni ile gerçekleşmektedir. Metastazın gerçekleşebilmesi için, kanser hücresi primer tümörden ayrılmalı, konak stromasını işgal etmeli, lenf kanallarından lenf dolaşımına ya da kan damarlarından kan dolaşımına geçebilmeli, bu yollarla farklı organların kapiller damar ağına yayılmalı ve ulaştığı organın parankim dokusuna geçip orada çoğalabilmelidir. Ayrıca, kanser hücrelerine ait mikroçevrede bulunan stromal, epitel, endotel ve immün hücreler, mitojenik faktörler salgılayarak anjiogenezi tetiklemekte ve tümör hücrelerinin çoğalmasına neden olmaktadır (Kopfstein ve Christofori 2006). Metastaz basamaklarından en önemlisi kanser hücresinin etrafını çevreleyen ekstraselüler matriks (ECM)’in parçalanmasıdır. ECM ve hücreler arasında önemli bir sinyal iletimi mevcuttur. Kanser hücresinin ihtiyaç duyduğu besinler, hormonlar ve sitokinler, kan damarlarından öncelikle ECM’e geçer ve sonra hücreye ulaşır. Ayrıca, hücreler diğer dokuları istila edebilmek için mutlaka ECM’yi parçalamalı, bu sayede de hareketli hale geçebilmelidirler (Garcia vd 2006). ECM’nin parçalanması anjiogenez için de oldukça önemlidir. ECM’nin bilinen tüm bileşenlerini parçalama özelliğine sahip enzimler metalloproteaz (MP)’lar olarak adlandırılır (Foda ve Zucker 2001).

Matriks metalloproteazlar (MMPs) ve metalloproteaz-disintegrinler (ADAMs), birbirleriyle yakın ilişkili olduğu bilinen iki metalloproteaz enzim ailesidir. MMP’lar proteolitik aktivitelerini Zn^{+2} ’ye bağımlı olarak gerçekleştiren ve ECM’i parçalayabilen yirmiden fazla enzimin yer aldığı geniş bir ailedir. ADAM’lar ise disintegrin, metalloproteaz ve sistince zengin olan bölgelere sahip transmembran proteinlerdir (Chang ve Werb 2001).

ADAM-10 ya da diğer adı ile Kuzbanian (Kuz) omurgalıların nöronal gelişimi boyunca önemli roller üstlenir. ADAM-10’un kollajenaz aktivitesi ile morfogenez sürecinde hücre göçü ve invazyonunda görev aldığına dair kanıtlar vardır. ADAM-10 ve aynı enzim ailesinin diğer bir üyesi olan ADAM-17 (TACE), amiloid öncül protein (APP)’in parçalanarak amiloidojenik peptitlere dönüşmesini sağlayan -sekretaz aktivitesine sahiptir. Bu sayede, APP’nin hücre içinde birikmesi ve Alzheimer hastalığı engellenir (Fahrenhoiz vd 2000).

Son yıllarda, sinir sistemi ve bağışıklık sistemine ait proteinlerden oluşan nöroimmün mekanizmanın kanser gelişimine ve ilerleyişine karşı savaştığı bilinmektedir. Vagus sinirine ait duyuşal nöronların inaktivasyonu ile daha saldırgan özellikteki kanser hücrelerinin oluşumu sayesinde metastazın tetiklendiğı gösterilmiştir (Mravec vd 2008).

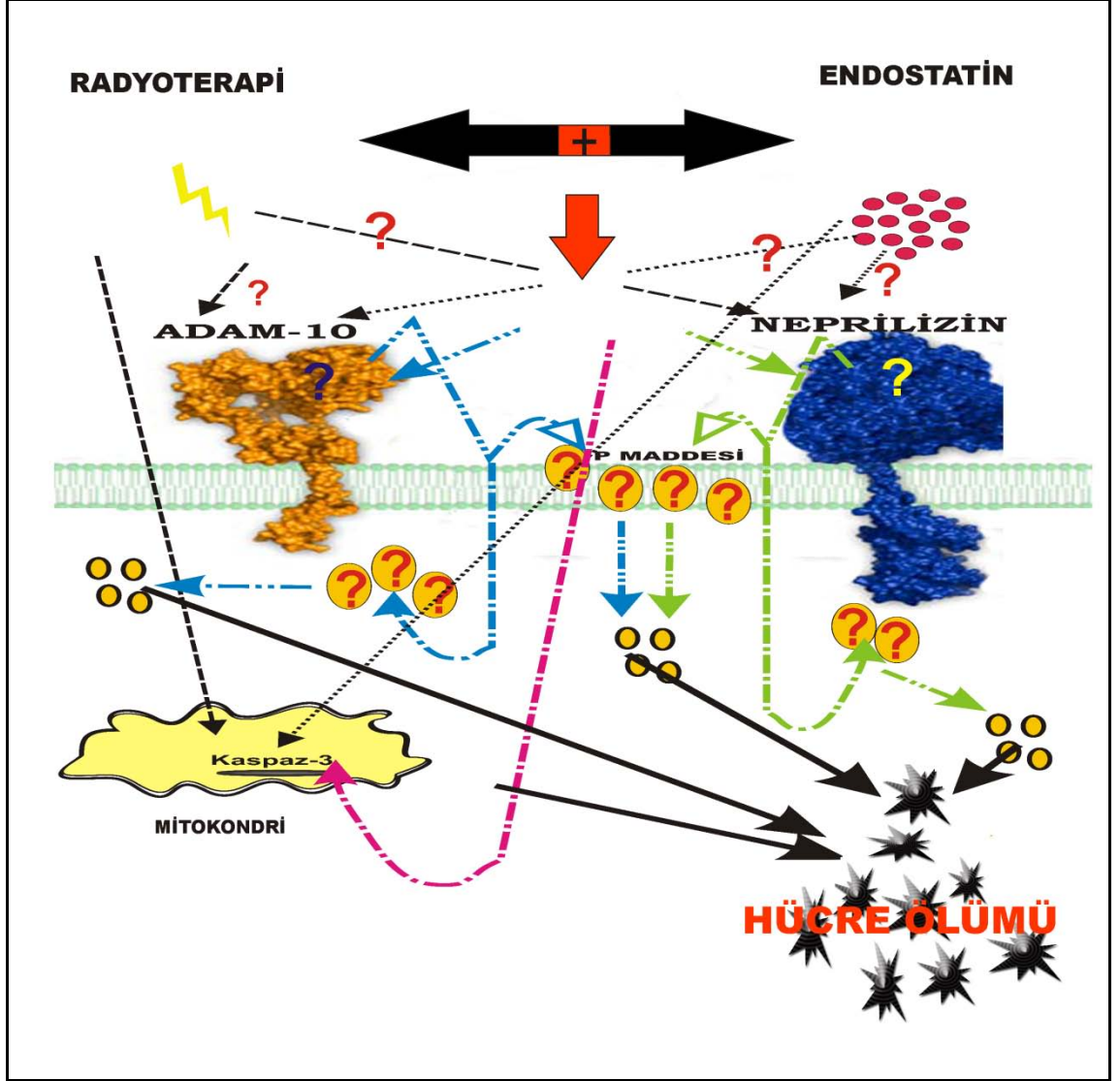
Kanser ile en çok ilişkilendiren nöropeptit P maddesidir. Opioid karaktere sahip, takikinin nöropeptid familyasına ait, kapsaisine duyarlı duyuşal sinir uçlarından salgılanan, kısa zincirli bir peptit olan P maddesinin nörotransmitter fonksiyonu vardır. Bu sayede, ağrıyı periferel reseptörlerden merkezi sinir sistemine iletir. Mitojenik ve anjiogenik özelliklere sahip olan on iki aminoasitlik bu peptitin tümör gelişimini hızlandırdığı, yeni damar oluşumunu artırdığı ve bu yolla metastazı kolaylaştırdığı ileri sürölmektedir (Herrison ve Geppetti 2001). Ayrıca P maddesinin hidrolizi sonucu ortaya çıkan kısa peptitlerin anti-tümörel etkiye sahip olduğı bilinmektedir (Rosati vd 1998, Heasley 2001). P maddesinin parçalanmasından sorumlu enzim ise Neprilizin olarak adlandırılan membrana bağılı, çinkoyu kofaktör olarak kullanan bir metalloendopeptidazdır. P maddesinin yanı sıra bombesin, kalsitonin geni ile ilişkili peptit, bradikinin ve nörotensin gibi nöropeptitleri de parçalar ve bunların hücre üzerindeki etkilerini ortadan kaldırır (Skidgel ve Erdös 2004).

Endostatin, endojen anti-anjiogenik faktörlerden biridir (O'reilly vd 1997). Pre-klinik denemelerde oldukça başarılı sonuçlar elde edilmesine rağmen, endostatin klinik denemelerde beklenen başarıyı sağlayamamıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda endostatinin bifazik etkili olduğı yani ya çok düşük dozlarda ya da oldukça yüksek dozlarda etki gösterdiği saptanmıştır (Calfa vd 2006, Quesada vd 2006).

Yetmişbeşden fazla anjiogeneze inhibitörü klinik denemelere girmiş ancak bunlardan yalnızca oniki tanesi faz III deneylerini başarı ile geçebilmiştir. Bir ajanın ticari formda hizmete sunulan bir ilaç haline gelmesi uzun, yorucu bir süreç sonunda gerçekleşir ve maliyeti oldukça fazladır. Bu nedenle yeni ilaçların keşfi yerine var olanların etkinliğini arttırmak maddi ve manevi açıdan büyük yararlar sağlar. Bu nedenle, son yıllarda tasarlanan kombine tedaviler ile Endostatin'in antianjiogenik ve antitümörel etkisini

artırarak kanser tedavisinde daha etkin olarak kullanılması umut edilmektedir (Gasparini vd 2005).

Bu çalışma için belirlediğimiz hedefler Şekil 1.1’de sunulmuştur.

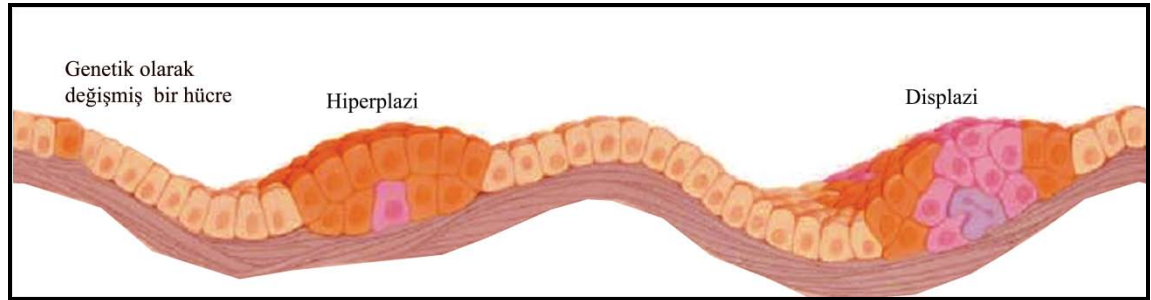


Şekil 1.1. Tez çalışmasında aydınlatılmak istenen noktalar

2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

2.1. Kanser

Kanser, hücrede meydana gelen genetik ve/veya epigenetik değişikliklerin birikimi sonrasında ortaya çıkan bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (Ponder 2001). Hücrede meydana gelen değişiklikler, var olan tamir mekanizmaları tarafından düzeltilmezse, normal vücut hücreleri için kaçınılmaz son, ölümdür. Ancak kanser hücreleri, geçirdikleri mutasyonlar sayesinde bu sona karşı gelerek, sınırsız bir biçimde bölünüp çoğalmaktadırlar. Kanser araştırmalarından son 25 yılda elde edilen bulgular, hücrede meydana gelen genetik değişikliklerin tümör oluşumunu tetiklediğini açık bir şekilde ortaya koymaktadır. Söz konusu olan genetik değişikliklerin birçoğu, kalıtsal olarak aktarılmayan, vücut hücrelerinde hücre içi veya hücre dışı herhangi bir sebeple oluşan ve sadece o bireyi etkileyen “spontan mutasyonlar” nedeni ile oluşmaktadır. Günümüzde, kanser oluşumu ile doğrudan ilişkilendirilen genlerin sayısı üç yüzün üzerindedir. Söz konusu genlerin mutasyona uğraması veya regülasyonlarının bozulması normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesine yol açmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Kanser gelişimi. Normal bir popülasyonundaki herhangi bir hücrenin (turuncu renkli) geçirdiği bir mutasyon sayesinde sürekli bölünme eğilimi kazanması, hiperplazi olarak adlandırılır. Hiperplazik hücrelerde (pembe renkli) meydana gelecek yeni bir mutasyon sayesinde displazik hücreler (mavi renkli) gelişir. Displazik hücrelerde hücre bölünmesinin kontrolü önemli ölçüde kaybedilmiş olduğu için kanser hücrelerine benzetilir. Bu hücrelerin şekillerinde ve oryantasyonlarında önemli farklılıklar gözlenir. Ancak displazik hücre, kanser hücresi gibi çevre dokuların içine girme ve uzak organlara sıçrama yeteneğine sahip değildir (Weinberg 1996'dan alınmıştır).

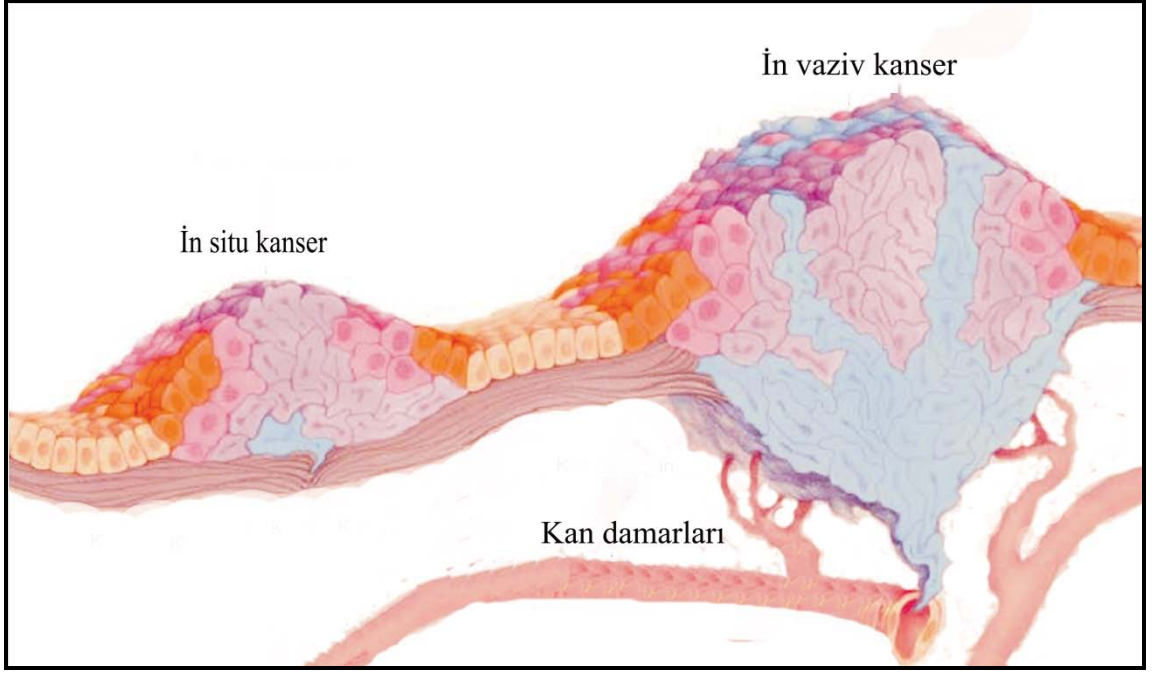
Hem tümör oluşumunda hem de var olan tümörün büyümesinde rol oynadıkları için, tümör baskılayıcı genler ve onkogenler kanserle en çok ilişkilendirilen genlerdir. Tümör baskılayıcı genlerde fonksiyon kaybı ya da onkogenlerde aktivasyon ile sonuçlanan mutasyonlar, kanserleşme sürecini yani karsinogenezi başlatmaktadır. İnsan kanserlerinin hemen her tipinde tümör baskılayıcı genler ve/veya onkogenlerde mutasyon saptanmış olması, bu genlerin tümör gelişimi açısından başlangıç noktası olarak kabul edilmelerine yol açmıştır (Fearon 1997, Weir 2004).

Hücre proliferasyonunda artışa ya da ölümünde azalmaya neden olan mutasyonların veya bu mutasyonların işbirliğinin, hücrenin malignant özellikler kazanmasına neden olduğunu ileri süren en eski embriyonel kanser teorisi, Rudolf Virchow ve Julius Conheim tarafından 19. Yüzyılın ortalarında önerilmiştir. Karsinogez için kabul edilen bu teorinin temelini, somatik gen mutasyonlarının çeşitliliği oluşturmaktadır. Uzun yıllardır birçok bilim adamına ışık tutan bu teori, günümüzde kanserin moleküler mekanizmasının aydınlatılabilmesi için yapılan çalışmalar sonucunda ortaya çıkan bir çok deneysel soruyu, ne yazık ki, cevaplamaya yetmemektedir (Erenpreisa ve Cragg 2007).

Kanser, bir organizmada içerisindeki tüm organların, organlarda var olan tüm dokuların ve dokuları oluşturan tüm hücrelerin, muhteşem bir titizlikle organize olmasını sağlayan temel kuralların yıkımı sonrasında ortaya çıktığı için, gelişimsel bir hastalık olarak değerlendirilmektedir. Kanser oluşumu için, kontrolsüz hücre büyümesi tek başına yeterli değildir (Şekil 2.2).

Kanser, hastalığın 100'e yakın formu için ortak olarak kullanılan bir tanımdır. Sağlıklı bir insanda bulunan yaklaşık 30 trilyon hücre, hem kendi fonksiyonlarını hem de birbirleri ile olan ilişkilerini, düzenli işleyen, karmaşık bir mekanizma sayesinde, titizlikle düzenler. Öyle ki, normal hücreler ancak çevrelerinden gelen talep üzerine çoğalabilir ve bu sayede, dokunun o muhteşem mimarisi asla bozulmaz. Normal hücrelerin aksine kanser hücreleri, bu müthiş düzenin oluşmasını ve devamını sağlayan, olağan kontrol mekanizmalarının denetimi olmadan üremeyi başarmakla kalmayıp aynı zamanda normal hücrelerde bulunmayan bazı özellikleri de kazanırlar. Kanser

hücrelerinin genomlarında var olan bazı özelliklerin ortak olduğunun tespit edilmesi üzerine malignant fenotipin oluşması için gerekli olan temel özellikler belirlenmiştir (Weinberg 1996).

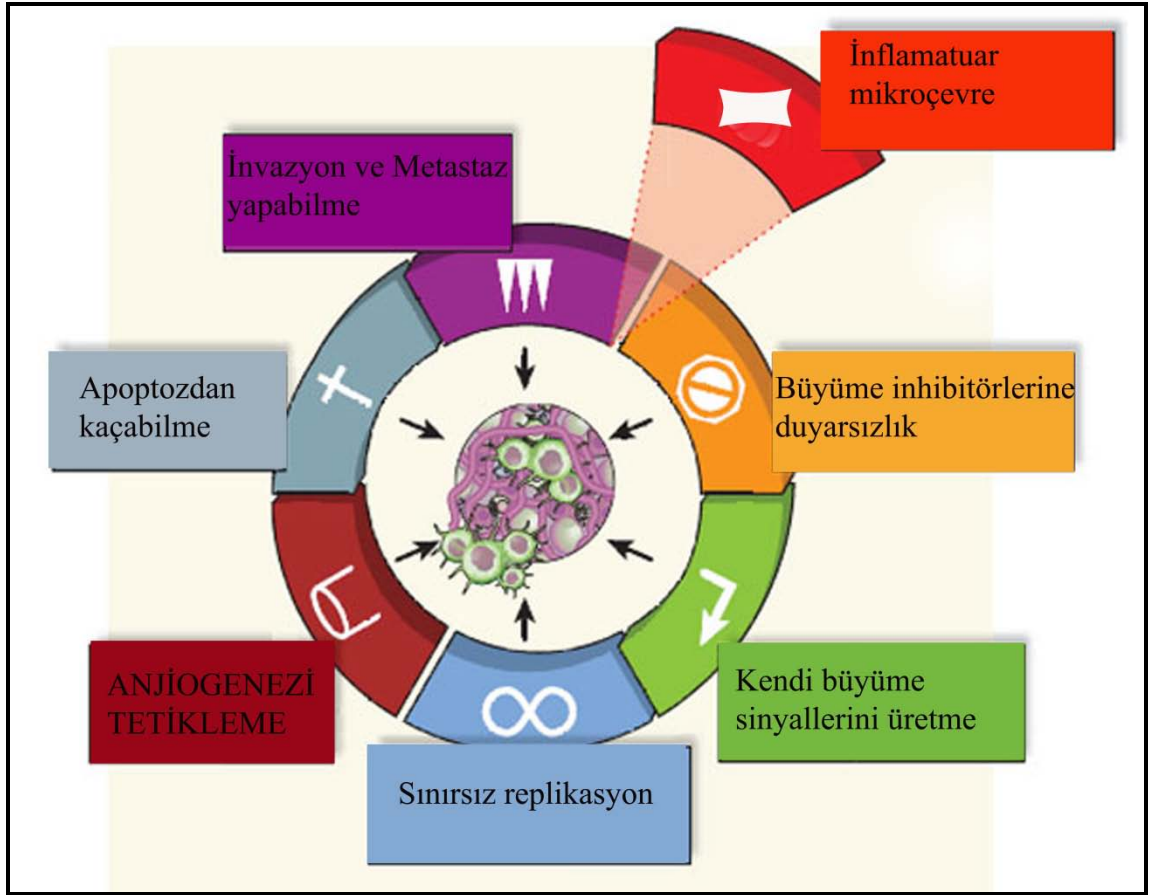


Şekil 2.2. Malignansinin ortaya çıkışı. Henüz tümör dokular arasındaki sınırı aşmamış ise in situ kanser olarak adlandırılır. Meydana gelen genetik değişiklikler, tümörün çevre dokulara saldırmasını ve tümör hücrelerinin kan yada lenf dolaşımına geçerek taşınmasını (metastaz) sağlıyor ise, invaziv kanser olarak adlandırılan bu durumda, hücreler tamamen malignant özellikler kazanmıştır (Weinberg 1996'dan alınmıştır).

Uzun yıllardır devam eden çalışmalar sonucunda bilim adamları, kanser tipine bağlı olmaksızın, tüm malignant hücrelerde var olan altı temel özelliği ortaya çıkardı. Bu özellikler:

- 1-Dış kaynaklı büyüme sinyallerine ihtiyaç duymama,
- 2-Büyüme durdurucu sinyallere karşı duyarlı olmama,
- 3-Programlı hücre ölümünden kaçabilme,
- 4-Yaşlanmaya direnç gösterme ve sınırsız üreme potansiyeline sahip olma,
- 5-Yeni kan damarları oluşturabilme,
- 6-Farklı dokulara saldırabilme ve bir bölgeden diğerine taşınabilme (metastaz)

Kanserin fizyolojik belirteçleri olarak belirlenen bu özelliklerin her biri, kanser tedavisi için farklı hedefler olarak kabul edilmekte (Hanahan ve Weinberg 2000) ve kanser ile olan savaşın seyrini de tamamen değiştirmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Kanser hücrelerinin altı temel özelliği (Hanahan ve Weinberg 2000’den alınarak uyarlanmıştır)

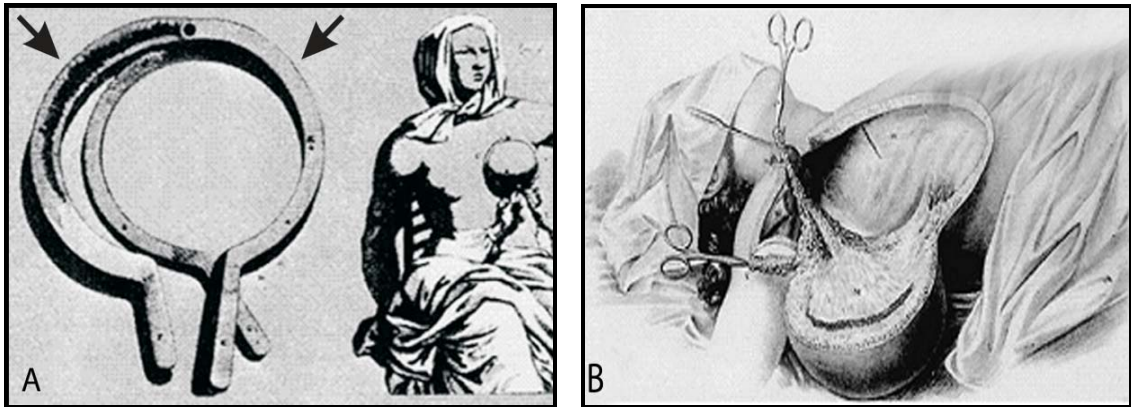
Son yıllarda yapılan çalışmalar kanser hücrelerini öldürülmenin yanı sıra, yeni kan damarlarının oluşumu, dokulara saldırma ve metastaz yetenekleri gibi diğer fizyolojik olayları hedefler niteliktedir. Değişik mekanizmaları hedef alan tedaviler, kanser hücresine ait farklı özellikler ile savaşmayı sağlayacağı için, bu amansız hastalıkla bir çok şekilde mücadele edilebileceğini ortaya koymaktadır.

2.1.1. Meme Kanseri

Meme kanseri bilinen en eski kanser türlerinden biridir. İlk kez Mısır’da milattan önce 1600’lü yıllarda tanımlanmış ve Antik Mısır Döneminden günümüze kadar, kökeni

ve oluşum nedenleri ayrıntılı bir şekilde araştırılmıştır. 19. yy' ın sonlarında, hastalığın hücresel kökeni ortaya konmuş ve oluşumuna sebep olan hücrelerin karakterizasyonu da başarı ile yapılmıştır.

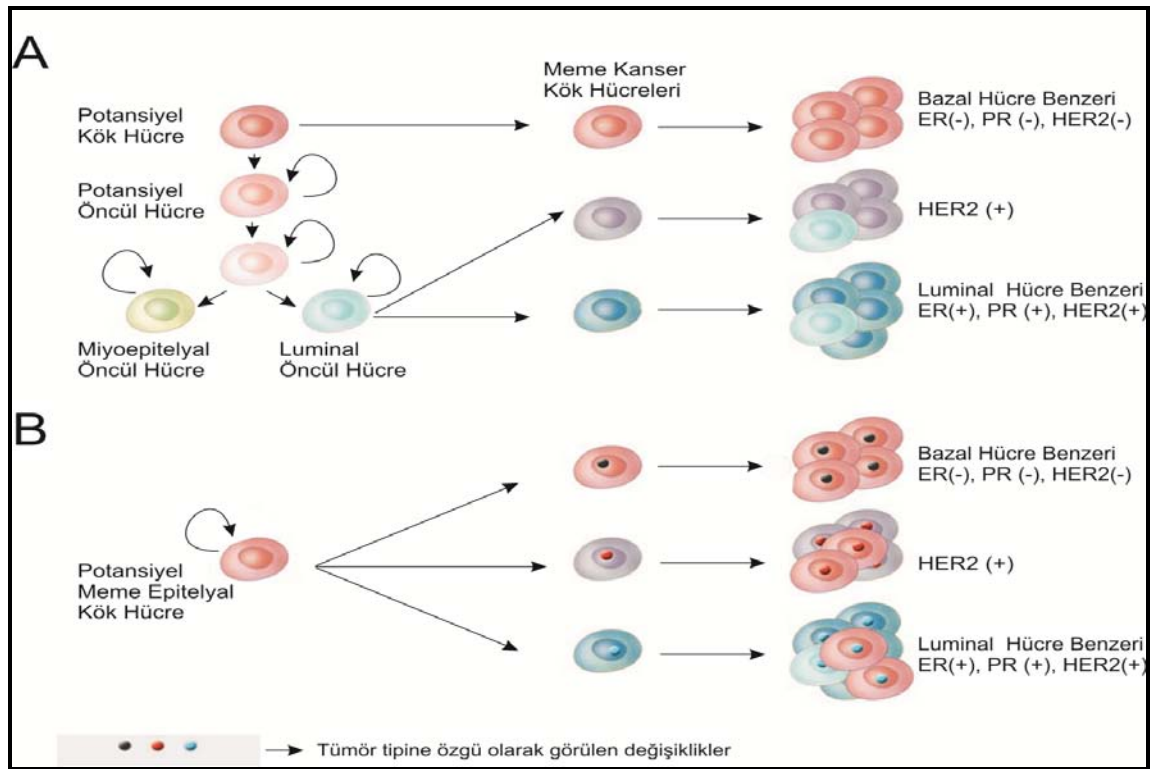
Tıp biliminin babası olarak bilinen Hippocrates, M.Ö. 460-377 yıllarında benign (iyi huylu) ve malignant (kötü huylu) tümörler arasındaki farklılığı tasvir etmiştir. Tümör hücrelerinin, bir gövde ve bu gövdenin merkezinden dışarı doğru uzanan çıkıntılarını bir yengece benzetmiştir. Benzettiği yengeç görüntüsüne itafen, hastalığı “karkinoma” olarak adlandırmıştır. Hippocrates’in kullandığı bu tanımlama, günümüz tıp sözlüğünde “karsinoma” olarak hala yer almaktadır. Aulus Cornelius Celsus, M.S 25-50 yıllarında, günümüzde bilinen metastatik meme kanserinin karakteristik özelliklerinden pek çoğunu tanımlamış ve cerrahi girişim ile meme dokudan kitlenin uzaklaştırılmasının meme kanseri için bir tedavi yöntemi olabileceğini bildirmiştir. Bu tarihten sonra, birçok bilim adamı, meme kanserine cerrahi müdahalenin yapılıp yapılmaması konusunda fikir ayrılıkları yaşamıştır. Ünlü Türk Bilgini İbni Sina (981–1037), meme kanserinin gelişimi ve invazyonu açısından masektomi olarak adlandırılan cerrahi girişimi önermediğini bildirmiştir. Gerard Tabor, 1721 yılında operasyonu kolaylaştırabilecek cerrahi bir aleti tıp dünyasına tanıtmıştır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Meme kanserinin cerrahi tedavisi (A) Meme kanser tedavisinde masektomi olarak adlandırılan cerrahi girişim için Tabor tarafından 1721 yılında tasarlanan cerrahi alet (B) Radikal masektomi olarak bilinen ve meme kanser tedavisinde, günümüzde hala kullanılan cerrahi girişim (Ekmektzoglou vd 2009’den alınmıştır)

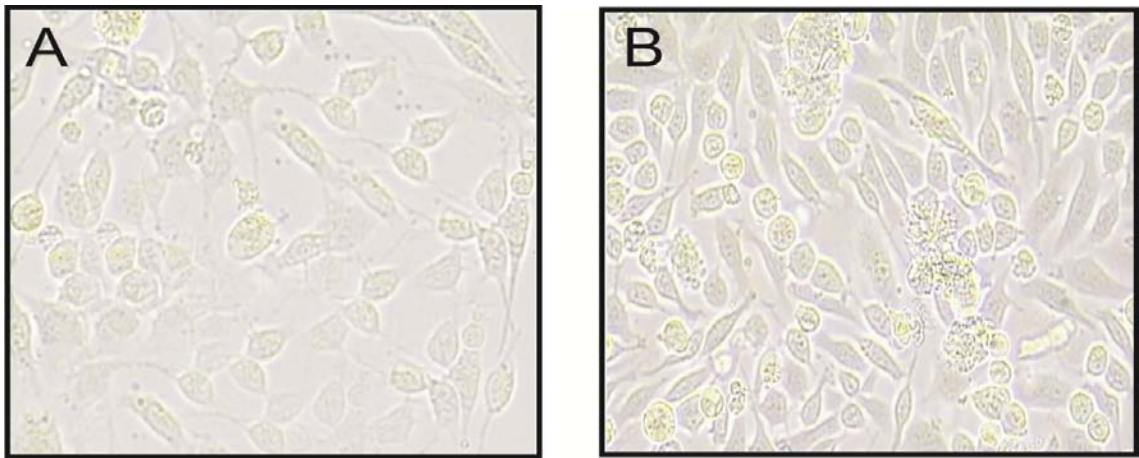
William Stewart Halsted and Willy Meyer (1852–1922) aynı dönemde yayımladıkları bireysel çalışmalarında, günümüzde “radikal masektomi” olarak bilinen, cerrahi müdahaleyi ilk kez kapsamlı bir biçimde tanımlamışlardır. Bu teknik yetmiş yılı aşkın süredir meme kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır.

Meme kanseri epitel kökenli hücrelerin kanserleşmesi sonucu oluşun ve kadınlarda en sık görülen malign tümör olarak bilinmektedir (Şekil 2.5). 2010 yılında tüm dünyada 1,4 milyonun üzerinde yeni invaziv meme kanseri olgusu beklenmektedir Ülkemizdeki görülen kanser vakaları arasında meme kanseri, akciğer kanserinden sonra % 24,1 oranla ikinci sırada yer almaktadır (Ekici ve Utkualp 2007, Aslan ve Gürkan 2007).



Meme kanserinin dört genel evresi vardır ve bu evrelerden dördüncüsünde, kanser artık meme dışındaki diğer bölgelere yayılmıştır. Meme kanseri metastazının en sık görüldüğü bölgeler; lenf düğümleri, kemik dokusu, akciğer, karaciğer, beyin ve böbrek üstü bezleridir. Genel anestezi tekniklerinin gelişmesi sonucunda cerrahi müdahale, doz ölçümünün yapılabilmesine bağlı olarak da radyoterapi meme kanserinin tedavisinde kullanılabilir yöntemler arasında yerini almıştır. Meme kanserinin biyolojisi aydınlatıldıkça alternatif tedaviler de peşi sıra tasarlanmış; kemoterapi ve hormonal terapi meme kanserli vakalarda ölüm oranını azaltmayı başarmıştır. Ancak kullanılan hiçbir tedavi tek başına, bu kanseri tamamen ortadan kaldırmayı başaramamıştır. Bunun yanı sıra, hastalarda tedavi şekline bağlı olarak gelişen birçok toksik yan etki tedavi başarısının önemli ölçüde azalmasına yol açmaktadır (Ekmektzoglou vd 2009).

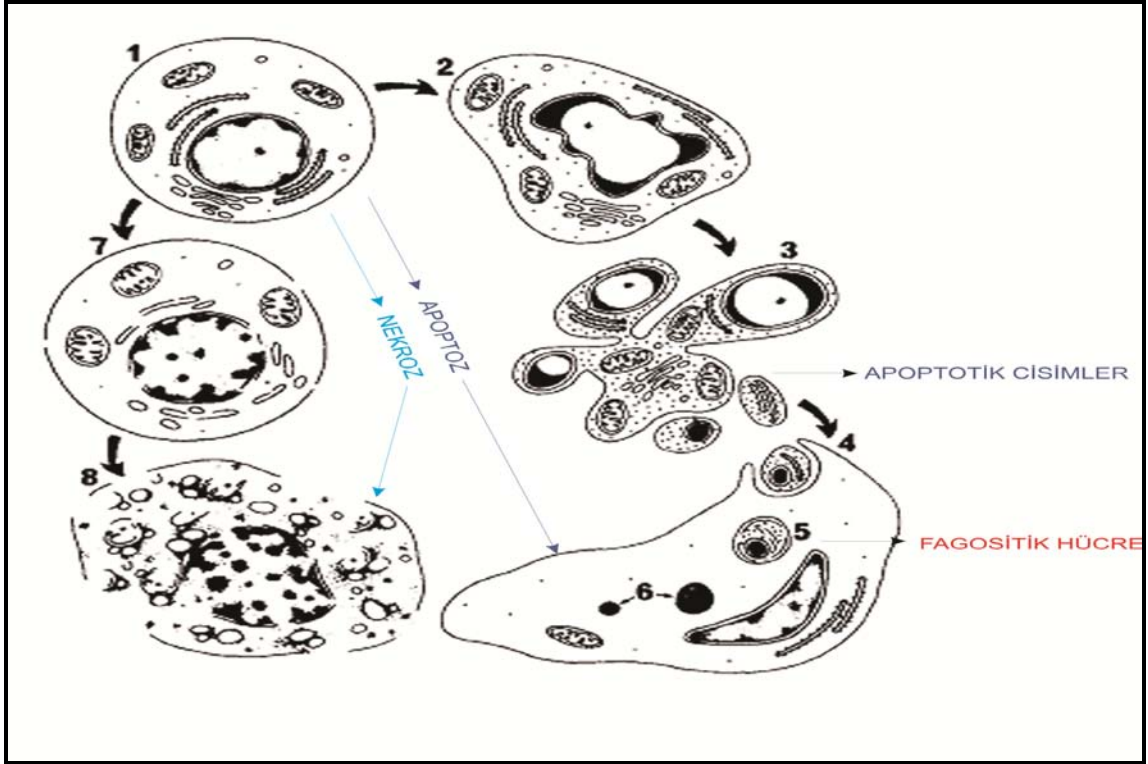
Tez çalışması kapsamında kullanılan 4T1 hücreleri, Balb/c farelerde kendiliğinden oluşan meme kanser hücreleridir. 4THMpc (**4T1 Heart Metastases Post Capsaicin**) hücreleri ise, kapsaisin uygulaması sonrasında farelerde oluşan kalp metastazlarından elde edilmiştir (Şekil 2.6). 4T1 hücreleri ile karşılaştırıldığında, 4THMpc hücrelerinde dokuz genin ifadesi artarken iki yüz kırk beş genin ekspresyonu baskılanmıştır. Hücreler arası sıkı (Klaudin 4 ve 7) ve yapışma (gama-katenin) bağlantı bölgelerinde görev alan proteinlerin genlerinin ekspresyonlarının azalması sonucu kanser hücresi meme dokudan ayrılarak kalbe metastaz yapmış ve bu sayede öncülü olan 4T1 hücresine oranla daha “saldırgan” bir kimlik kazanmıştır (Erin vd 2009).



Şekil 2.6. 4T1 (A) ve 4THMpc (B) hücrelerinin mikroskop görüntüleri (400x)

2.2. Apoptoz (Programlı Hücre Ölümü)

Hücre ölümüyle ilgili ilk bilgiler 1920 yılında ışık mikroskopunun ve yeni boya yöntemlerinin keşfedilmesi ile elde edilmiştir. Hücrede ilk tanımlanan ölüm tipi “nekroz”dur. Patolojik hücre ölümü olarak bilinen nekrozda, enerjinin birden azalması sonucunda hücre zarının geçirgenliği değişir, hücre içerisine su ve sodyum girişi nedeni ile hücre şişer. Ve sonunda hücre buna direnemez, hücre zarı patlar ve proteolitik enzimler içeren plazma hücreler arası boşluğa sızarak inflamasyonun oluşmasına yol açar (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Apoptoz (2-6) ve nekrozda (7 ve 8) meydana gelen yapısal değişiklikler. (1) Normal hücre. Apoptoz başlangıcı (2) nuclear kromatinin belirginleşmesi, sitoplazmanın yoğunlaşması ile karakterize edilir. Daha ileriki basamaklarda (3) çekirdek parçalara ayrılır ve bu sayede apoptotic cisimler oluşur. Oluşan bu cisimcikler daha sonra fagositik hücreler tarafından fagosit edilir (4) ve bu hücrelerin lizozomlarında parçalanır (5 and 6). Nekroz ise hücre membranında meydana gelen hasara bağlı olarak gelişen iyon dengesinin değişimi nedeni ile (7) hücrenin su alarak şişmesi ile karakterize edilir. Membrane parçalanmaya başlasa da fagosit edilinceye dek hücrenin şekli değişmez (8) (Kerr vd 1994’den alınmıştır).

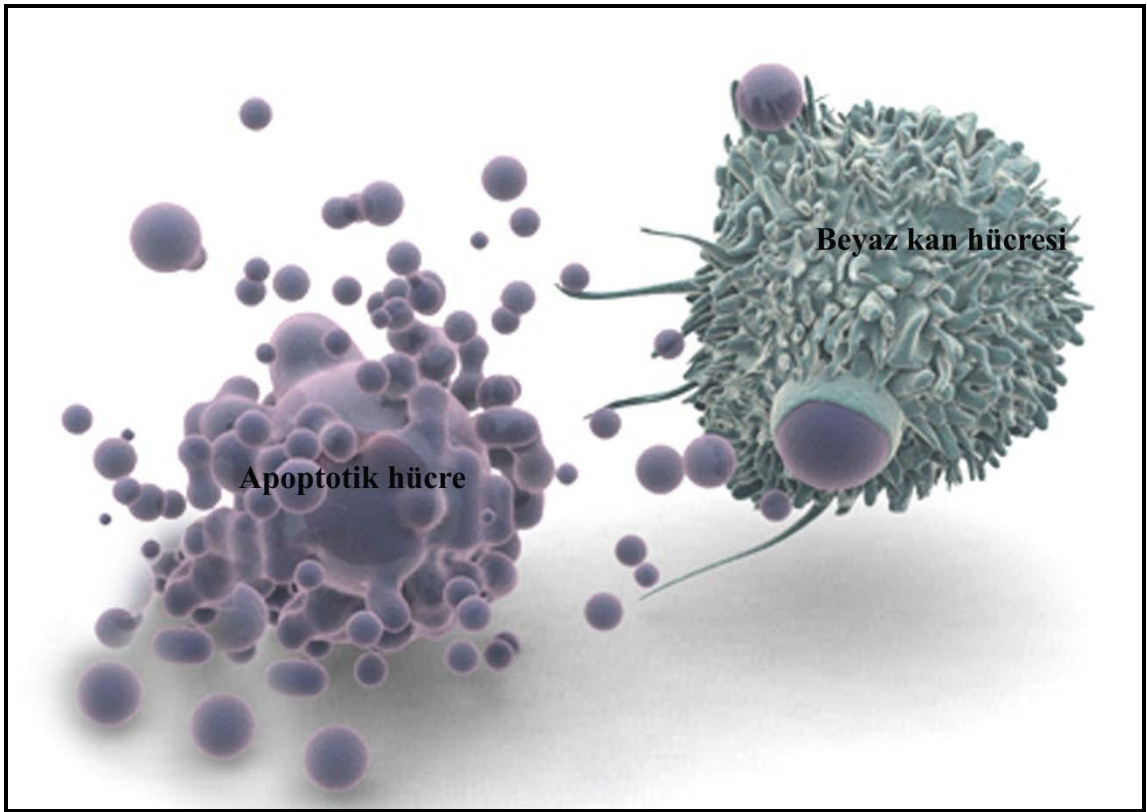
1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie adlı araştırmacılar, iskemiye maruz kalmış bir dokuda gözledikleri hücre ölümünün nekrozdan oldukça farklı olduğunu belirterek, bu yeni ölüm tipini “fizyolojik hücre ölümü” olarak adlandırmışlardır. Daha sonra yaptıkları bir çalışmada, timus hücrelerini glukokortikoidler ile muamele ettikten sonra hücrelerde gözlenen ölümün nekrozdan farklı olduğunu bir kez daha ortaya koymuşlardır. Bilim adamları, bu yeni hücre ölüm tipini “Apoptoz” olarak adlandırmışlardır (Elmore 2007).

Apoptoz, Yunanca apo(=ayrı) ve ptozis(=düşen) kelimelerinin birleştirilmesiyle elde edilmiştir. Sonbaharda yaprak dökümünü anlamına gelmektedir. Apoptoz, *Caenorhabditis elegans*’tan insana kadar tüm çok hücreli canlılarda görülen, evrimsel olarak çok iyi korunmuş bir mekanizmadır (Cummings vd 2004, Heemst vd 2007). Gelişmiş organizmalarda gereksinim duyulmayan, fonksiyonları bozulmuş hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı bir biçimde ölmesi olarak tanımlanan apoptoz, embriyonel dönemden başlayarak tüm yaşam boyunca devam etmektedir (Zornig vd 2001). Embriyogenez sırasında bazı canlıların parmak aralarında görülen perdenin, damak oluşumu sonrasında kalıntı olarak biriken epitellerin yada organ oluşumu sırasında fazla üretilen hücrelerin ortadan kaldırılması apoptoz mekanizması sayesinde gerçekleşmektedir (Cohen 1998).

Apoptozun erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder, plazma membranında bulunan iyon kanallarının ve pompalarının aktivasyonunun bozulmasına bağlı olarak belirgin şekilde büzülür. Hücreler, birkaç dakika içerisinde hacimlerinin 1/3’ünü kaybederler. Daha sonra hücre nükleusu kondense olur ve ardından parçalara ayrılır. Floresan boyama teknikleri sayesinde apoptotik bir hücrenin DNA’sı minik boncuklar şeklinde görülür çünkü DNA endonükleaz ile oldukça özgül bir biçimde, 180-200 baz çifti büyüklüğünde parçalara ayrılmıştır. Normalde bir hücre DNA’sında birbiri ardına meydana gelen yedi kırılma onarılabılırken, apoptoziste yaklaşık olarak 300.000 kırılma meydana geldiği için onarım yapılması söz konusu değildir. DNA fragmentasyonunun ardından, plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, sitoplazma ile çevrili kromatin

parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır (Chinnaiyan vd 1996, Narula vd 1997, Öktem vd 2001).

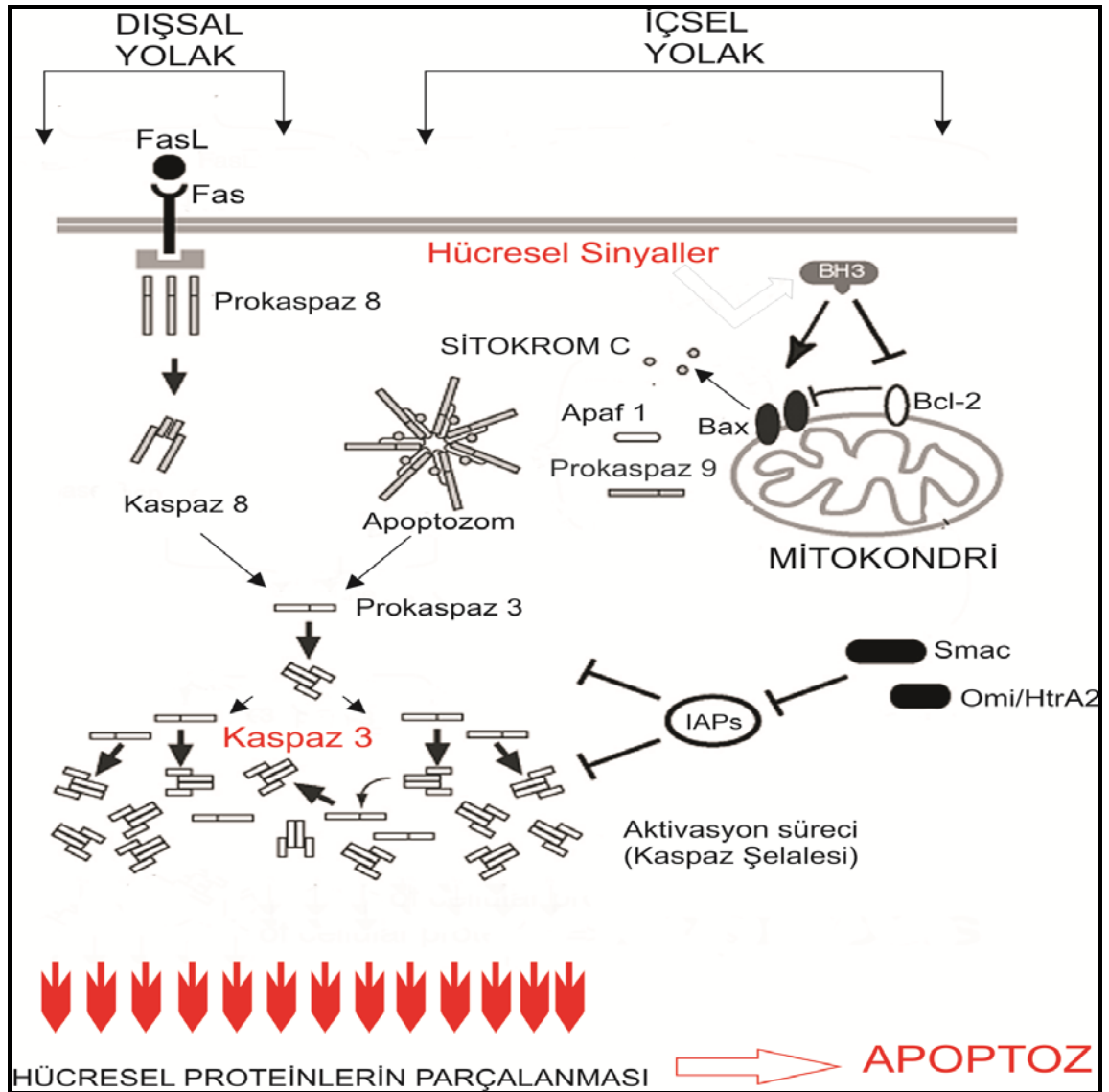
Tüm bu fizyolojik süreç sonucunda, hücre membranı asimetrisini kaybeder ve fosfatidilserin hücre yüzeyinden salınmaya başlar. Bu, makrofajlara gönderilen “beni ye!” sinyali. Oluşan apoptotik cisimlerdeki fosfatidil serin, fagositik hücrelerde bulunan vitronektin ya da lektin yapıdaki reseptörlere tutunur ve yok edilir. Bu nedenle çevre dokularda inflamasyona yol açmaz (Cohen 1998, Fadok vd 2000) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Apoptotik bir hücrenin beyaz kan hücresi tarafından fagositozu. Nekrozun aksine, apoptoz sonrasında çevre dokularda bir inflamasyon görülmez.

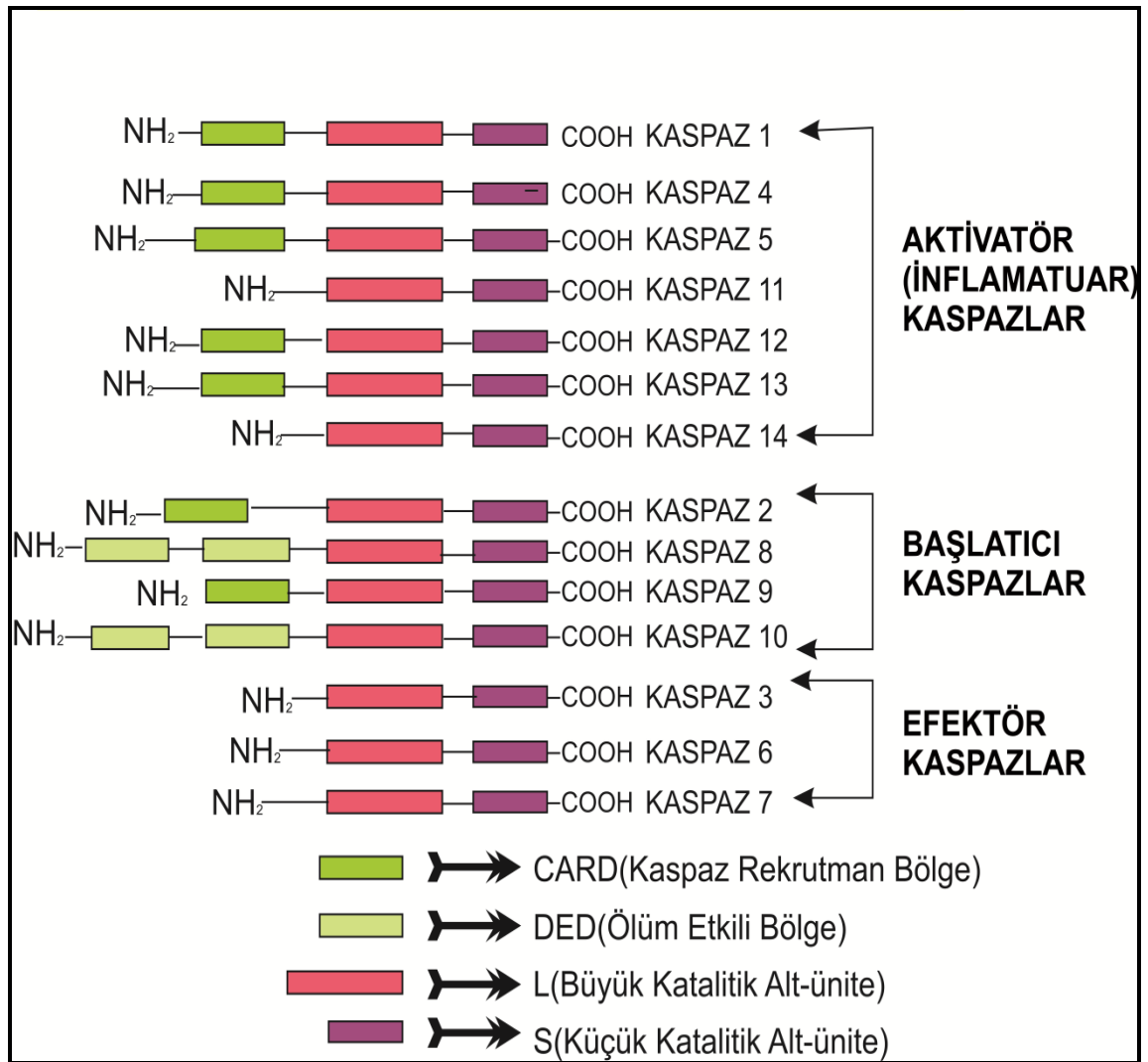
Apoptoz hücre içi ve hücre dışı birçok sinyal tarafından kontrol edilebilir. Apoptoz için gerekli sinyal, reseptör aracılığı ile hücreye iletildiğinde, apoptozun intrinsik (mitokondriyel) ya da ekstrinsik (ölüm reseptörleri) yollarından biri aktive olur (Şekil 2.9). Ekstrinsik yolak dışarıdan gelen sinyaller sonucunda başlar ve membranda bulunan Fas gibi ölüm reseptörlerini aktive eder. Aktive olan ölüm reseptörü kaspaz 8'i, kaspaz 8 ise kaspaz 3'ü aktive eder ve tBid'in parçalanması sonucunda, mitokondriden

sitokrom C salınımı gerçekleşir. Sitokrom C'nin salınımı sadece mitokondri membranının parçalanmasına değil, bu aşamadan sonra kaspazların peş peşe aktive olmasına da yol açar. İntrinsik yolak ise; DNA hasarı, onkogen aktivasyonu, büyüme faktörlerinin salınımında azalma ve reaktif oksijen türevleri gibi hücreyi strese sokan içsel olaylar sonrasında tetiklenir ve p53 geninin aktivasyonuna yol açar. p53 geninin aktive olması ise Bax gibi pro-apoptotik faktörlerin ekspresyonlarının artmasına neden olur (Heemst vd 2007).



Şekil 2.9. Apoptotik mekanizmanın şematik gösterimi. Hem içsel hem de dışsal yollar efektör kaspazları aktive ederek hücrel proteinlerin parçalanmasına neden olur (Jager 2007'den alınarak uyarlanmıştır).

Apoptoz mekanizmasında anahtar rol alan proteinler; ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ve proteolitik enzimler (kaspazlar) olmak üzere üç temel gruba ayrılmaktadır. CD95 (APO-1/Fas), TRAIL-R1 (TNF ile ilişkili apoptoz uyarıcı faktör), TRAIL-R2, TNF-R1, DR3 ve DR6 gibi ölüm reseptörleri, sitoplazmik kısımlarında adaptör proteinlere bağlanabilen özel aminoasit dizileri taşıyan ve TNF (Tümör Nekroz Faktör) reseptör gen ailesinde yer alan proteinlerdir. Adaptör proteinler (TNFR1 ve Fas) ise, ölüm reseptörü ile gelen sinyali proteolitik enzimlere iletmek ile görevlidir. Apoptoz mekanizmasının temel bileşenleri olarak kabul edilen proteolitik enzimler, substratlarını aspartik asit (Asp) uçlarından kestikleri için; kaspazlar (sistein-aspartil spesifik proteazlar) olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Biyolojik fonksiyonlarına göre kaspaz enzimleri

Kaspaz ailesinin bilinen 14 üyesi vardır. Biyolojik fonksiyonları göz önüne alınarak üç sınıfa ayrılır:

1-Sitokin aktivatörleri: Kaspaz-1,-4,-5,-11,-12,13 ve -14,

2-Apoptoz başlatıcıları: Kaspaz-2,-8,-9 ve -10,

3-Apoptoz cellatları: Kaspaz-3, -6 ve -7.

Önce inaktif zimojenler halinde sentezlenip, daha sonra hepsinde korunmuş olan Asp bölgelerinden proteolitik olarak kesilerek aktifleşirler. Aktif hale geçen kaspaz, kendinden sonra gelen başka bir pro-kaspazı keserek aktifleştirir ve bu sayede “kaspaz şelalesi” olarak adlandırılan bir süreç başlatılmış olur.

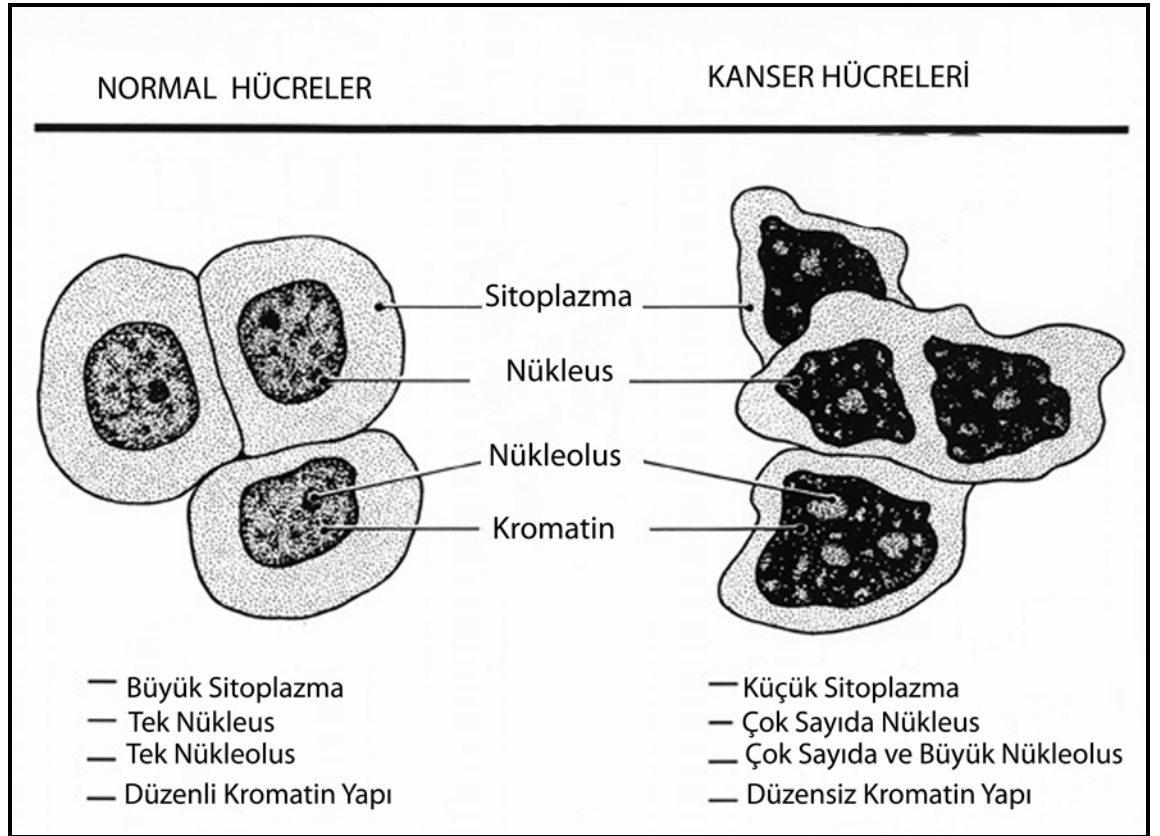
Apoptoz sürecinde, pek çok hücrel ve/veya yapısal protein, kaspazlar tarafından parçalanabilir. Kaspazlar tarafından parçalanmak koşulu ile aktifleşen nükleazlar ise, DNA fragmentasyonunu ve RNA degradasyonunu gerçekleştirmektedir (Zheng vd 1998). Apoptoz, tümör hücrelerinin yaşayabilmek ve çoğalabilmek için aşmak zorunda oldukları temel bir bariyerdır. Tümör hücrelerinde bulunan antiapoptotik proteinler, bu bariyerin kolayca aşılmasını mümkün kılmaktadır. Apoptoz mekanizmasında oluşacak hatalar; proto-onkogenlerin aktive olmasına (Green ve Evan 2002), hücrelerin hipoksiden (oksijen miktarında azalma) ve oksidatif strese zarar görmemelerine (Reed 1999) ve ekstraselüler matrikse bağlı olmadan serbest hareket etmelerine (Frisch ve Screaton 2001) neden olduğu için immün sisteme dirençli ve uzun süre canlı kalabilen hücre topluluklarının oluşmasına yol açmaktadır (Tschopp vd 1999). Tüm bu bilgiler ışığında, apoptoz mekanizmasının hücrede bazı fizyolojik ve patolojik roller üstlendiği söylenebilir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Apoptozun rolleri (Wyllie 1986, Gavrieli 1992, Carson 1993, Soini 1998).

Apoptozun Fizyolojik Roller	Apoptozun Patolojik Roller
Embriyogenez sırasında bazı canlılarda parmaklar arasındaki perdenin ve damak gelişimi sonrası epitel hücre kalıntılarının ortadan kaldırılması	Tümörlerde, büyümede ve regresyonda hücre ölümü (örn., kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi ve spontan olarak)
Organ gelişimi sırasında fazla üretilen hücrelerin ortadan kaldırılması	Hormona bağımlı olarak dokularda görülen körelme
Metamorfoza uğramış veya yaşlanmış ve bu yüzden fonksiyonlarını kaybetmiş hücrelerin ortadan kaldırılması	Sitotoksik T lenfositleri ile oluşturulan hücre ölümü
Hormona bağımlı bir şekilde görülen organ gerilemeleri (örn., prostat, endometrium ve meme dokusu hücrelerinde)	Karaciğer gibi parenkimatöz organlarda patolojik körelme
Sürekli bölünen dokularda hücre sayısının azaltılması (örn., gastrointestinal sistem ve deri hücreleri)	Bazı viral hastalıklarda hücre ölümü (örn., HIV-1, HCV, adenovirüs enfeksiyonlarında)
İmmün hücrelerin yok edilmesi (örn., sitokinlerin azalmasına bağlı olarak B ve T lenfositlerin, timüsteki oto reaktif hücrelerin ortadan kaldırılması)	Çeşitli zararlı etkenler sonucu hücre ölümü (örn., yüksek ısı, radyasyon, sitotoksik kemoterapi, hipoksi)

2.3. Anjiogenez

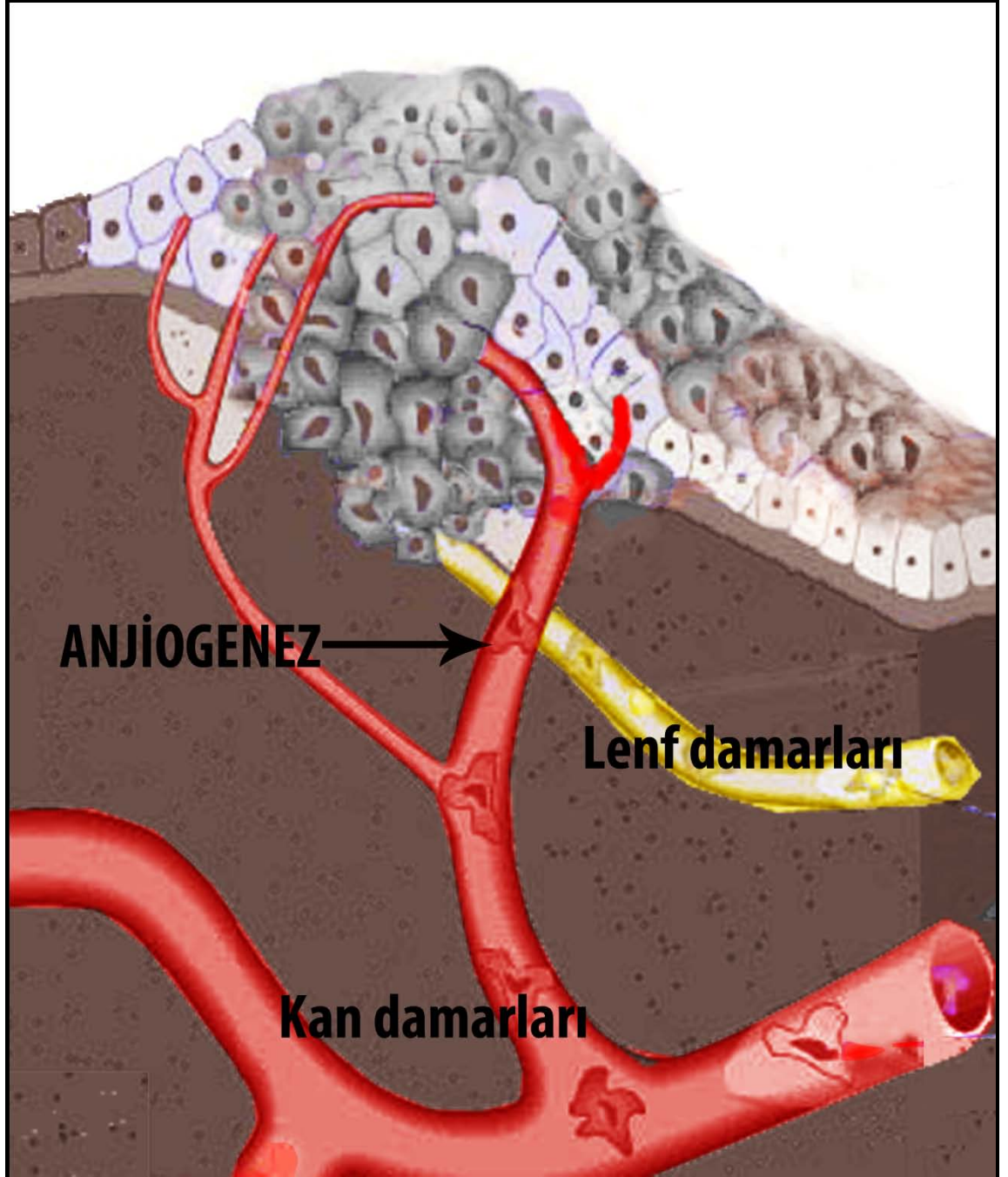
Normal bir hücre, karsinogenez ya da tümörigenez olarak tanımlanan çok basamaklı ve karmaşık bir süreç sonucunda malignant özellikler kazanmaktadır (Şekil 2.11). Bu süreç içerisinde meydana gelen onkogenik mutasyonlar birçok biyolojik özelliğin değişmesine neden olmaktadır (Hanahan ve Weinberg 2000).



Şekil.2.11. Kanser ve Normal hücreler arasındaki temel morfolojik değişiklikler

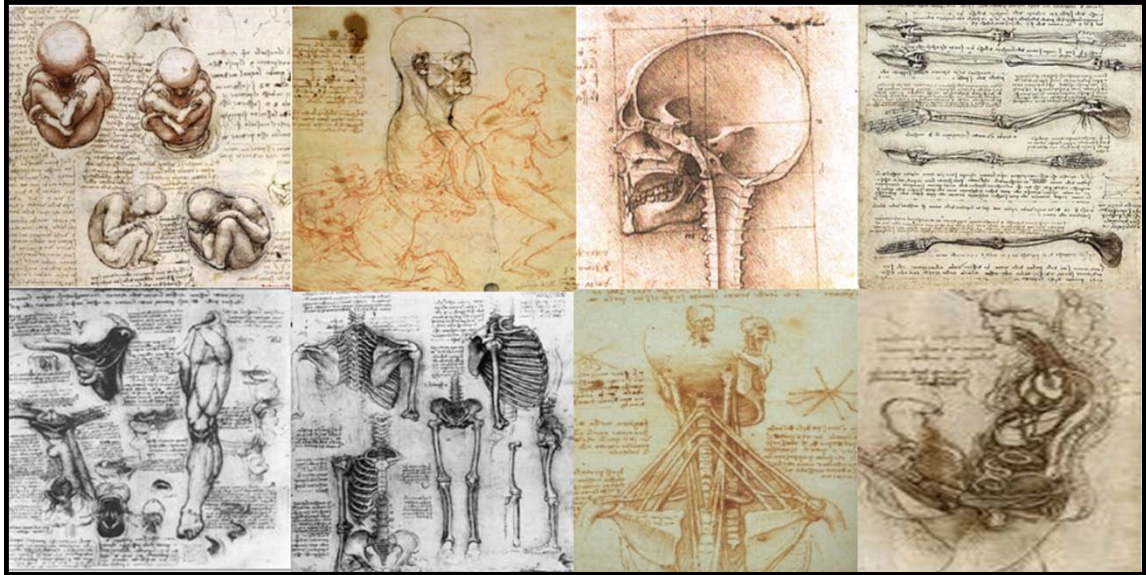
Ancak hiçbir mutasyon, hücrenin besin ve oksijene duyduğu ihtiyacı ve atık maddelerin uzaklaştırılması gerekliliğini değiştiremez. Kanser hücreleri, büyümek ve farklılaşmak için, besin ve oksijeni 150–200 μm uzaklıktaki kılcal damarlardan difüzyon yoluyla temin edebilir. Besin ve oksijen ihtiyacını difüzyon ile sağlayan kanser hücresi ise ancak 2 mm^3 'lük boyuta ulaşabilir (Folkman ve Ingber 1992, Folkman 1996). Ancak, tümör hücresinin çoğalmaya devam edebilmesi için daha fazla oksijen ve besin gerekmektedir. Oksijen ve besin ihtiyacını karşılayamayan tümör hücresi daha fazla büyüyemez ve durgun fazda kalır. Başka bir ifade ile tümör hücresi

varlığını devam ettirmek ve çoğalabilmek için, çevresindeki kan damarlarının da gelişimini sağlamak zorundadır. Var olan damarlardan yeni kan damarlarının gelişimi “Anjiogenez” olarak tanımlanır (Şekil 2.12).



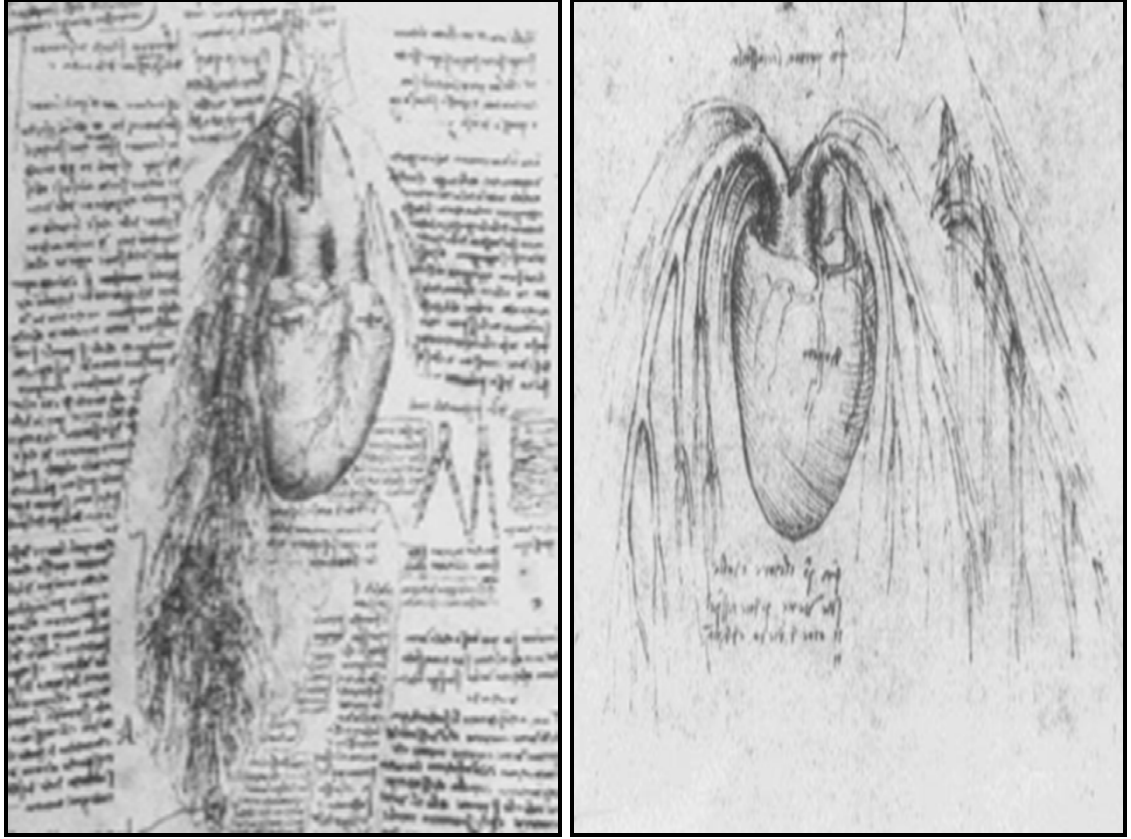
Şekil 2.12. İn situ bir tümörün anjiogenez ile in vaziv form kazanması

Anjiogenez mekanizması ile oluşturulan yeni damarlar sayesinde besin ve oksijen ihtiyacı karşılanan tümör, hızla büyümeye başlar. (Bamias ve Dimopoulos 2003, Fidler ve Ellis 2004, Castro- Junior vd 2006, Neal ve Berry 2006). Leonardo da Vinci, 1508 yılında vücudu saran bir damar ağı bulunduğunu bildirmiştir (Şekil 2.13). 1616 yılında İngiliz Fizikçi William Harvey, sistemik dolaşımı tanımlamış ve kalbin vücudun diğer organlarına kan pompalamakla görevli olduğunu belirtmiştir. İtalyan bir doktor olan Marcello Malphigi, 1661 yılında farklı damarların (arterler ve venler), dolaşımda rol aldığını ve bu damarlar arasında kan dolaşımının döngüsel olarak gerçekleştiğini ifade etmiştir.



Şekil 2.13. Ünlü ressam Leonardo da Vinci'nin anjiogenez mekanizmasını çözebilmek için yaptığı eksizlerden örnekler.

1700'lü yıllarda Leonardo da Vinci, tıpkı tohumdan bir ağacın gelişmesi gibi, dolaşım sisteminin de kalpten merkez olarak geliştiğini ileri sürmüştür. Ağacın gövdesini aort ve arterlere, kök ve dallarını ise damar ağına benzetmiş, damar ağının fonksiyonunu ve gerekliliğini özellikle vurgulamıştır. Çizdiği eksizlerin daha sonra kanser tedavisi için gündeme geleceğini bilmeseyse de, ünlü ressamın bulguları birçok bilim adamına ışık tutmuştur. (Şekil 2.14) (Risau 1997). 1721 yılında, Frederik Ruysch bronşiyal dolaşımı tanımlayarak, anatomi bilimine önemli bir katkı sağlamıştır (Mitzner ve Wagner 1992). İngiliz bir cerrah olan Dr. John Hunter, 1787 yılında büyüyen kan damarlarını ifade etmek üzere; ilk kez, "Anjiogenez" terimini kullanmıştır (Turk 1994).



Şekil 2.14. Leonardo da Vinci'nin anjiogenez mekanizmasının çözülmesine büyük katkılar sağlayan çizimleri. Mitzner ve Wagner adlı araştırmacıların 1992 yılında yayınladıkları çalışmalarında detaylı bir şekilde tartışılmıştır. Leonardo'nun ancak ayna görüntüsü ile okunabilen yazıları bilim adamlarını bir hayli zorlamış olsa da, ileri sürdüğü teori geçen zaman içerisinde anlaşılmış ve birçok araştırmacı tarafından kabul görmüştür (Mitzner ve Wagner 1992'den alınmıştır).

1939 yılında Ide ve arkadaşlarının yaptığı in vivo denemelerde, tümörde meydana gelen anjiogenez mekanizması ilk kez görüntülenebilmiştir (Ide vd 1939) (Şekil 2.15). Bu görüntü, bilim dünyasını harekete geçirmiş ve bu alanda yapılan çalışmaların sayısında önemli bir artışa neden olmuştur. 1945 yılında Algire ve Chalkley adlı bilim adamları, vasküler büyümeyi ilk kez nicel olarak değerlendirmeyi başararak, tümör büyümesi ile damar gelişimi arasındaki ilişkiyi net bir biçimde ortaya koymuşlardır (Algire vd 1945).

1971 yılında Judah Folkman, yeni kan damarları olmaksızın tümörün ancak 1 veya 2 mm büyüklüğe ulaşabileceğini saptamış ve buradan yola çıkarak tümör büyümesinin

anjiogeneze bağlı olduğu hipotezini gündeme getirmiştir (Folkman 1971). Folkman tarafından ortaya atılan bu hipotez bilim adamlarının anjiogenez mekanizmasını detaylı bir şekilde incelemesini sağlamıştır.



şekil 2.15. Tumorde meydana gelen anjiogenezin ilk in vivo görüntüsü (Ide vd 1939’dan alınmıştır)

Var olan kan damarlarından yeni damarların filizlenmesi olarak tanımlanan anjiogeneze, çözülebilir faktörler, ekstraselüler matriks (ECM) bileşenleri ve hücreler arasında gerçekleşen karmaşık bir mekanizmadır. Embriyoda damar gelişimi  basamakta oluşur; vaskulogeneze, anjiogeneze ve arteriogeneze. Endotel hücre öncülleri tarafından kan damarlarının oluşumu vaskulogeneze olarak adlandırılır. Vaskulogeneze iki basamaklı bir süreçtir. İlk olarak endotel hücreler primer vaskular ağı oluşturmak için bir araya gelirler. İkinci basamakta düz kas hücreleri ve perisitler ile iç birliği yaparak kan damarlarını oluştururlar. Hem vaskulogeneze hem de anjiogeneze endotel hücreler ve düz kas hücreleri birlikte iç görür. Arteriogeneze ise vaskular aę daha büyük kolleteral arterlerin oluşumu için yeniden şekillenir. Bu süreçte damar boyunca gerçekleşen hücre gleri, yeni filizlerin oluşumu ve hücrelerin çoğalmaları gözlenir

(Carmeliet 2000, Calfa vd 2006). Olgun damar ağlarının oluşumundaki bu üç basamağın her birisi, birbiri ile ilişkili ve titizlikle düzenlenen farklı faktörler ve/veya faktör grupları ile sıkı bir şekilde kontrol edilir (Lyden vd 2001).

Anjiogenezin gerçekleşebilmesi için ilk olarak bazal membran proteazlar tarafından yıkılmalıdır. Bu sayede endotel hücreler, hücreler arası boşluğa göç eder ve çoğalmaya başlar. Çoğalan endoteller yan yana dizilerek bir lümen oluşturur. Buraya akın eden perisitler sayesinde, yeni bazal membran yapılanmaya ve anastomazlar oluşturmaya başlar. Yeni oluşan bu damar, eski bir damara tutunur ve kan akışı sağlanır (Bussolino vd 1997).

Embriyonik gelişim, yara iyileşmesi, organ hipertrofisi, menstural dönemin kontrolü gibi hayati öneme sahip bazı fizyolojik olaylarda, anjiogenez önemli roller üstlenir. Fizyolojik anjiogenezin kontrolü oldukça önemlidir ve uyarıldığında; sedef hastalığı, arterit, obezite, astım, damar tıkanıklığı, bazı bulaşıcı hastalıklar ve kanser gibi patolojik sonuçlar ortaya çıkabilir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Anjiogenezin artması sonucu gelişen bazı hastalıklar .

Hedef Organ	Fare ya da İnsanda Oluşan Hastalıklar
Kan Damarları	Vaskular malformasyonlar, arterioskleroz, Di George sendromu, HHT, büyük hemangiomalar, farklı bir bölgede oluşan arteriopati
Adipoz Doku	Obezite
Deri	Sedef, siğil, alerjik dermatit, skar keloidler, piyojenik granulomalar, AIDS hastalarında Kaposi sarkomaları, deride kabarcıkların oluşumu
Göz	Diabetik retinopati,
Akciğer	Primer pulmoner hipertansiyon, astım, nazal polipler
Bağırsak	Inflamatuar periodontal hastalık, karında su toplanması, peritonel adezyon
Üreme Sistemi	Endometriozis, rahim kanamaları, yumurtalık kistleri, yumurtalıkların hiperstimülasyonu
Kemik, eklemler	Artirit, sinovit, osteomyelit, osteofit oluşumu
Farklı Organlar	Kanser, infeksiyon hastalıkları, oto immün bozukluklar

Aksine anjiogenez baskılanırsa, yeni damar oluşumu gerçekleşemeyeceği için; Alzhemier, amyotrofik lateral skleroz (ALS), diabetik nöropati, felç, damar tıkanıklığı, hipertansiyon, diabet, restenoz, gastrik ya da oral ülserler, crohn hastalığı, purpura, saç kaybı, rahim kanamaları, neonatal solunum bozukluğu, nefropati, osteoporoz ve kemik kırıklarında geç iyileşme gibi patolojik olaylar ortaya çıkabilir (Çizelge 2.3) (Carmeliet 2003).

Çizelge 2.3. Yetersiz anjiogenez (damar regresyonu) sonucu gelişen bazı hastalılar.

Hedef Organ	Hastalık	Anjiogenik Mekanizma
SİNİR SİSTEMİ	Alzhemier hastalığı Amyotrofik lateral skleroz(ALS); diabetik nöropati Felç	Vasokonstrüksiyon, mikrodamar dejenerasyonu, serebral angiopati Yetersiz VEGF salınımı nedeni ile motor nöronların ya da aksonların dejenerasyonu Beyinde anjiogenezin azalmasına bağlı olarak arteriopati oluşumu
KAN DAMARLARI	Damar tıkanıklığı Hipertansiyon Diabet Restenoz	Kolarektal damar gelişiminin bozulması Yetersiz anjiogenez ya da kan damarı dağılımı nedeni ile mikrodamarların azalması İskemik uzuvlarda kolorektal büyüme ya da anjiogenezin azalması, perisit kaybı sonucu retinal neovaskularizasyon Yaşlılıkta arteriyal yaralanmalar sonrasında endotellerin yenilenmemesi
GASTROİNTESTİNAL SİSTEM	Gastrik ya da oral ülserler	Patojenlerin ürettiği anjiogenez inhibitörleri nedeni ile yaranın geç iyileşmesi
DERİ	Crohn hastalığı Purpura, telangiektazia, venöz birikimi Saç kaybı	Mukozal iskemi Yaşlılığa bağlı olarak endotellerin telomerlerinin kısalması Anjiogenez inhibitörleri nedeni ile saçın uzamasının gecikmesi
ÜREME SİSTEMİ	Pre-eklampzi Rahim kanamaları	VEGF nin eksikliği nedeni ile tromboz ve hipertansiyon oluşması Damarların anjiogenik faktörlerden Ang-1 yokluğunda hassaslaşması
AKCİĞER	Neonatal solunum bozukluğu Pulmonar fibroz,emfisemi	VEGF ve HIF-2α miktarının azalması sonucunda akciğer gelişimindeki bozukluk VEGF inhibisyonu nedeni ile alveolar endotellerin apoptozu
BÖBREK	Nefropati	TSP-1 yokluğu nedeni ile yaşa bağlı damar kaybı
KEMİK	Osteoporoz,kemik kırıklarında geç iyileşme	VEGF ye bağlı olarak anjiogenezin bozulması ile kemik oluşumunun gecikmesi

2.3.1. Anjiogenez rol oynayan enzimler

Tümör, büyümek ve komşu hücreleri istila etmek için ekstraselüler matriksi (ECM) parçalamak zorundadır. ECM ve hücreler arasında önemli bir sinyal iletimi mevcuttur. Bütün besinler, hormonlar ve sitokinler damardan hücreye ECM'yi aşarak ulaşır. Hücreler hareket edebilmek için, mutlaka ECM ile bağlantılarını kesmek ve ECM'yi parçalamak zorundadırlar. Hücrelerin bunu başarabilmesi için, bazı proteolitik enzimleri salgılaması gerekmektedir (Roy vd 2006). ECM'nin parçalanması sadece hücre göçü, istilas ve metastaz oluşumunu kolaylaştırmaz, aynı zamanda pek çok yoldan hücre davranışını da doğrudan etkiler. ECM'nin parçalanması ile, ECM'ye bağlı büyüme faktörlerinin salınmasına yol açarken, aynı zamanda bazı endojen anjiogenez inhibitörleri de serbest kalmaktadır (Nyberg vd 2006).

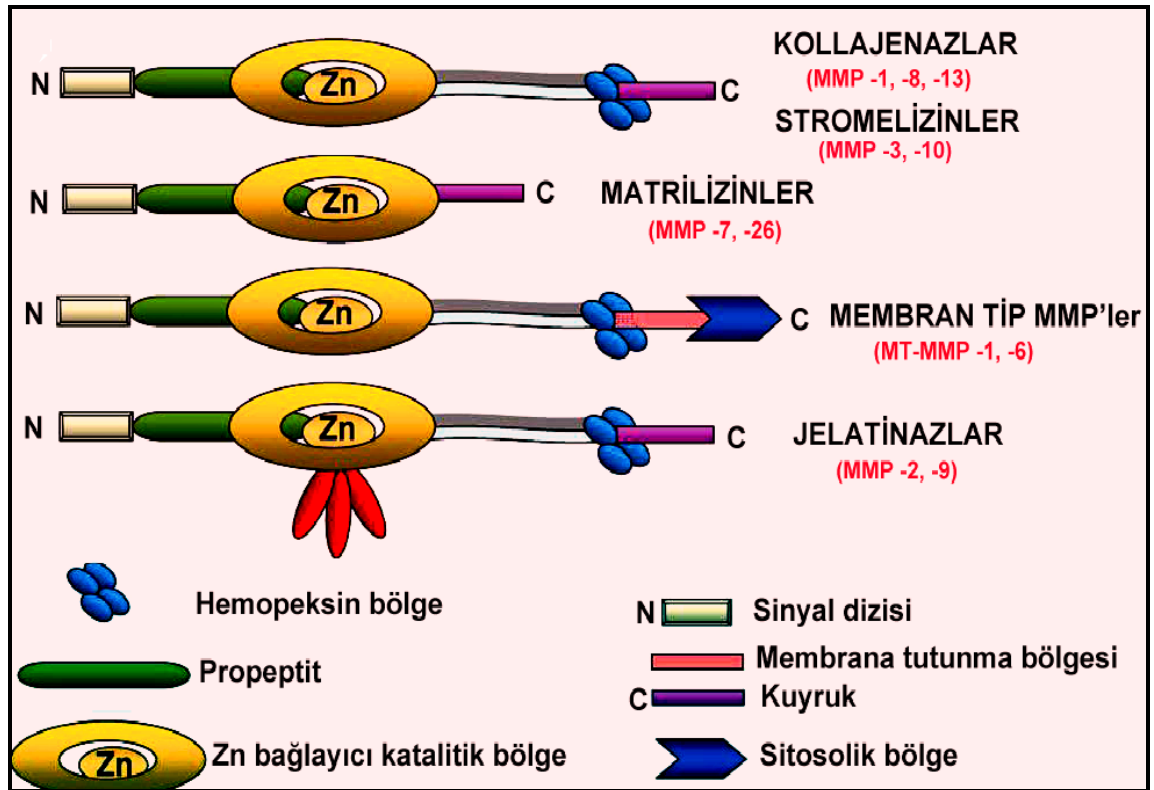
Kan damarının bazal membranındaki en önemli ECM bileşenleri; Tip IV- kollajen, Tip XV-kollajen, Tip XVIII kollajen, laminin'ler, nidogen/entaktin, heparin/sülfat proteoglukan'lar ve perlekan'lardır. Bu bileşenlerin tümü proteolitik enzimler için birer substrattır. *İn vivo* ve *in vitro* yeni damar oluşumunda, damar yenilenmesinde bu bariyerlerin aşılması için görevli olan beş önemli enzim ailesi bulunmaktadır (Roy vd 2006). Bunlar;

- 1-Matriks metalloproteazlar (MMP),
- 2-Disintegrin ve metalloproteazlar (ADAM),
- 3-Trombospondin motifli disintegrin ve metalloproteazlar (ADAMT),
- 4-Serin proteazlar,
- 5-Katepsin proteazlardır.

Proteazlar ya da peptidazlar, peptit bağlarının parçalanmasını katalizler. Kataliz mekanizmalarına göre proteazlar; serin, treonin, sistein, aspartat ve metallo proteazlar olmak üzere 5 gruba ayrılırlar. Proteolitik parçalanmalar, pek çok biyolojik sürecin başlangıcını oluşturur ve bu nedenle, sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir. Hücre büyümesi, hücre ölümü, kanın pıhtılaşması, apoptoz, matriksin yeniden şekillendirilmesi ve immün savunmada, proteaz aktivitesi oldukça önemlidir. Bu yüzden

proteazlar, pek çok hastalığın tedavisi için belirlenen hedef moleküller arasında yer almaktadır (Vandeputte-Rutten ve Gros 2002).

Matriksinler, omurgalı kollejenazlar ve matriks metalloproteinazlar (MMP) olarak adlandırılan enzimler, çinko bağımlı endopeptidazlardan oluşan geniş bir ailedir ve ECM'nin parçalanmasında, hız sınırlayıcı basamakta aktivite göstermektedir. MMP'ler, ilk kez 47 yıl önce Gross ve Lapiere tarafından, larva kuyruğunda tanımlanmıştır (Foda ve Zucker 2001). O tarihten günümüze kadar bu enzim ailesi, ECM bileşenlerinin temel işleyicileri olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.16) (Tallant vd 2010).



Şekil 2.16. MMP'lerin yapısal bölgeleri. Tüm MMP'lerde benzer şekilde bir organizasyon görülür. N-terminal bölgeleri bir sinyal peptittir (pro-peptit). Katalitik bölgelerinde korunmuş bir Zn bağlama bölgesi bulunur. Jelatinazlarda jelatine bağlanabilmek için 3 adet fibronektin tekrarı bulunur. Farklı uzunlukta olan bağlayıcı kısım N-terminal bölgeyi hemopeksinin C-terminaline bağlar (bu durum MMP7 de yoktur). MMP'ler membrana, membran bağlanma bölgesinin C-terminalinden tutunur (Sela 2009'dan alınmıştır)

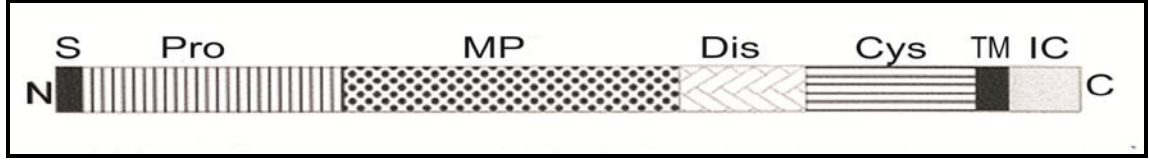
MMP'ler, ECM, bazal lamina ve endotel hücrelerdeki sıkı bağlantı bölgelerine saldırarak kan-beyin bariyeri geçirgenliğini artırır ve bu yolla, akut nöro-

inflamasyona neden olurlar (Rosenberg 2009). Bu proteolitik enzimler benzer yapılara sahiptirler ve ECM'nin bilinen tüm bileşenlerini parçalayabilme yeteneğindedirler. MMP aktivitesi transkripsiyonel seviyede ya da metalloproteazların doku inhibitörleri (TIMP) olarak bilinen bir grup endojen inhibitör tarafından düzenlenebilir (Moses 1997, Ala-Aho ve Kahari 2005). ECM'nin MMP'ler tarafından parçalanması, ECM'de depolanan, vaskular endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve bazik-fibroblast büyüme faktörü (bFGF) gibi anjiogenik faktörlerin salınımını da sağlayarak anjiogenezi kolaylaştırmaktadır. MMP'lerin aktivitesindeki değişimler, anjiogenezin düzenlenmesinde oldukça önemlidir. Bu yüzden doğal ya da sentetik MMP inhibitörleri kullanılarak tümör anjiogenezi baskılanmaya çalışılmaktadır (VanWart ve Birkedal-Hansen 1990).

2.3.1.1. Disintegrin ve metalloproteazlar (ADAM'lar)

ADAM'lar, disintegrin ve metalloproteaz bölgelerine sahip tip-1 membran gluko-proteinleridir. ADAM'lar endoplazmik retikulum'da sentezlenir ve golginin trans bölgesinin son kısmında olgunlaşır. Proteinin katlanması ve disülfid bağlarının oluşumu, proteinin şaperon özelliği gösteren N-terminal propeptiti tarafından gerçekleştirilir. Translasyon sonrası geniş çaplı glikolizasyona uğradıkları için, hücrede farklı moleküler ağırlıklarda bulunur (Murphy 2008).

ADAM'lar protozoalardan memelilere kadar pek çok canlıda bulunanmaktadır. Metalloproteazların metsizin alt ailesine ait olan ADAM ailesinin bütün üyeleri proteolitik özelliğe sahip değildir çünkü bazı ADAM'lar katalitik aktivite için esas olan aminoasitleri içermez. ADAM'lar genel olarak propeptit, metalloproteaz, disintegrin benzeri bölge, sisteince zengin bölge ve epidermal büyüme faktörü benzeri bölge olmak üzere beş kısımdan oluşmaktadır (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. ADAM’lardaki yapısal bölgeler ve fonksiyonları. S, sinyal dizi; Pro, probölge; MP, metalloproteaz bölgesi (proteolizi gerçekleştirir); Dis, disintegrin bölgesi (adezyonu gerçekleştirir); Cys; sisteince zengin bölge (füzyonu sağlar); TM, transmembran bölgesi; IC, intraselular bölge (sinyal iletimini sağlar). Her bölgenin uzunluğu o bölgede bulunan aminoasit sayısını yansıtmaktadır (Fahrenhoiz vd 2000’den alınmıştır)

ADAM’lar disintegrin bölgeleriyle integrinlere bağlanırken, sisteince zengin bölgeleri aracılığıyla proteoglikanlarla etkileşir. ADAM’ların katalitik bölgesi, ECM’ye ya da hücre membranına bağlı proteinlerin salınmasını sağlar. Membrana bağlı ADAM proteinlerinde farklı fonksiyonel ve yapısal rollere sahip olan transmembran ve sitoplazmik bölgeler bulunur.

Bu güne kadar ADAM ailesine ait 29 üye tanımlanmıştır (Seals ve Courtneidge 2003, Rosenberg 2009). ADAM’lar mayoz bölünme, üreme ve nörogenez gibi normal gelişim boyunca ve Alzheimer, artrit, kanser ve kardiyak hipertrofisi gibi bazı patolojik durumlarda, ayrıca hücre yüzeyinin yeniden şekillenmesinde, büyüme faktörü salınmasında ve hücre-hücre ile hücre-matriks etkileşimlerinde farklı roller sergilemektedirler (Chubinskaya vd 2001).

ADAM-17, TNF- α dönüştürücü enzim (TACE) olarak da bilinir. ADAM-17’ye özgül bir inhibitör, GL129471, kullanılarak endotel hücrelerin göçü, yapışması ve çoğalması inhibe edilmiştir (Trochon vd 1998). Bu çalışmanın ardından ADAM’ların gelişimsel ve patolojik anjiogenezdeki rolleri araştırılmaya başlanmıştır (Apte 2004).

Tez kapsamında yer alan ADAM-10, TNF-alfa değiştirici enzim (TACE) ile homoloji gösteren bir enzimdir (Yamazaki vd 1997). ADAM-10 ve ADAM-17 (TACE) enzimlerinde bulunan α -sekretaz aktivitesi sayesinde amiloyid öncül protein (APP)’den, salınabilir formda olan APP (sAPP) oluşturulmaktadır. Bu sayede hücrede APP birikimi engellenmektedir. ADAM-10’un α -sekretaz aktivitesine sahip olduğu, bu aktivitenin enzimin prodomain bölgesinden kaynaklandığı ve ekspresyonundaki artışa bağlı olarak

hücrede sAPP miktarının da arttığı birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (Lammich vd 1999, Fahrenholz vd 2000, Lopez-Perez vd 2001, Colciaghi vd 2002).

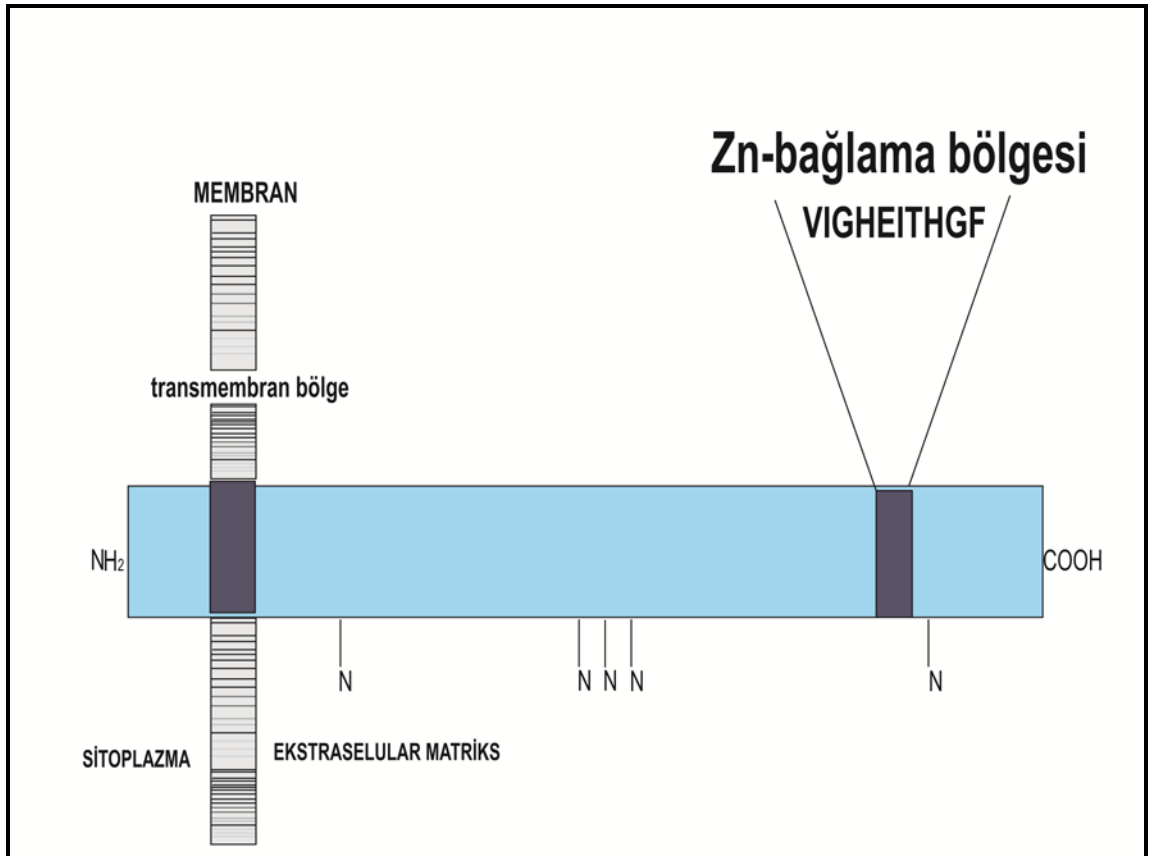
ADAM-10 ekspresyonu, böbrek, dalak, lenf nodu, timus, karaciğer, kemik iliği ve beyinde gösterilmiştir (Rosendahl vd 1997, Millichip vd 1998). ADAM-10 ekspresyonunun pek çok kanser tipinde, özellikle de meme kanserinde artması enziminin tümörigenezde, invazyonda ve metastazda önemli roller üstlenebileceğini düşündürmektedir (Mochizuki ve Okada 2007). ADAM-10 yada diğer ismi ile Kuzbanian (Kuz) enziminin omurgalı canlılardaki sinirsel gelişim mekanizması ile ilişkili olduğu ve beyindeki bazı fizyolojik olayların düzenlenmesinde önemli roller üstlendiği artık bilinmektedir. Hücresel birçok sinyal iletim yolağında görev alan ADAM-10, membran proteinlerini parçalayarak çözülebilir olgun formlara dönüştürür. ADAM-10 için tanımlanmış biyolojik substratlar arasında epidermal büyüme faktörü, beta-sellulin, Notch proteini, amiloid öncül protein ve P maddesi bulunmaktadır (Hall ve Erickson 2003).

2.3.1.2. Neprilizin

Nötral endopeptidaz 24.11 (Neprilizin, NEP, CALLA, Enkefalinaz, CD-10, Ec 3.4.24.11) membrana bağlı bir çinko metalloendopeptidazdır. M13 peptidaz ailesi içinde glusizinler olarak bilinen gruba aittir. İlk kez tavşan böbreğinden izole edilen neprilizin, major bir antijen olarak tanımlanmıştır (Turner ve Hooper 2002). Saflaştırılmasının ardından, tip II integral membran proteini olarak hücre yüzeyinde yer aldığı saptanmıştır. Diğer ekto-enzimler gibi, plazma membranının ekstraselüler yüzünde bulunan peptitlerin hidrolizini katalizler (Şekil 2.18).

Streptomyces'den elde edilen fosforamidon adlı bileşik ile tamamen inhibe edilebilir. NEP'in tanımlanan ilk substratları arasında enkefalinler ve P maddesi yer almaktadır. Bu substratlar enzimin beyinde nöropeptit sinyal iletimindeki rolünü ortaya koymaktadır. Neprilizin sentezlemeyen farelerin beyinlerindeki beta-amiloid (A β) birikimi, enzimin A β degradasyonundaki önemini işaret etmektedir (Fukami vd 2002).

NEP; lenfoid öncülleri ve granulositler, normal ve malignant böbrek, hepatik, meme, mide, pulmoner ve prostat hücreleri gibi pek çok farklı hücre tarafından eksprese edilmektedir. NEP'in benign prostatik hiperplazi patogenezi ve hepatoselüler karsinomlar ile ilişkili olduğu, inflamasyonun düzenlenmesinde, yara iyileşmesi ve immün sistem aktivasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir (Dragovic vd 1997, Shipp v d 1998, Gohring vd 1998).



Şekil 2.18. Neprilizin enziminin yapısı

Nöropeptitler duyuşal sinirlerden salınırlar ve mast hücreleri ile makrofajların fonksiyonlarını düzenler. NEP, nöropeptitleri parçalama özelliğinin yanı sıra, inflamasyonun regülasyonunda da önemli bir role sahiptir (Albrecht vd 2004). NEP nöroiletimde, inflamasyon, ağrı fizyolojisi, kan basıncı, hücre büyümesi gibi biyolojik olaylarda ve Alzheimer, kardiovaskular, neoplastik hastalıklarda önemli roller üstlenmektedir. Daha sonra yapılan araştırmalar NEP'in bombesin, bradikinin, kalsitonin, endotelin-1, nörotensin ve vasoaktif intestinal peptit (VIP) gibi mitojenik peptitleri inaktive ederek özellikle akciğer ve prostat kanserinde tümör büyümesinin

kontrolünde rol oynadığını ortaya çıkarmıştır (Sato vd 1996, Bunn vd 1998, Burns vd 1999, Chu ve Arber 2000, Renneberg vd 2001, Usmani vd 2002).

2.3.2. Anjiogenez modölatörleri

Fizyolojik olarak vücutta anjiogenez bir “şalter” ile kontrol altında tutulur. Bu şalterin “açılması” ya da “kapanması” bazı özgül moleküller tarafından kontrol edilmektedir. Anjiogenez şalterini açarak anjiogenezin tetiklenmesini sağlayan moleküller, anjiogenik ya da pro-anjiogenik ajanlar, bunun aksine şalteri kapatmak koşulu ile anjiogenezi inhibe eden moleküller ise anti-anjiogenik ajanlar ya da anjiogenez inhibitörleri olarak adlandırılır (Çizelge 2.4). Pro-anjiogenik ajanlar herhangi bir nedenle anti-anjiogenik ajanlardan daha fazla üretildiğinde, şalter açılır ve hızla yeni kan damarları oluşur (Pandya vd 2006). Anjiogenik şalterin açılması veya kapanması, tümör büyümesini doğrudan etkiler. Pek çok tümörde bu şalterin işleyiş mekanizması detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Malignant (kötü huylu) tümörler büyümek için bu şalteri açık tutmak zorundadır. Hipoksi (yetersiz oksijen), hipoglisemi, mekanik stres gibi uyarılara karşı tümör hücresi, anjiogenik faktörler salgılar ve bu sayede yeni kan damar oluşumu tetiklenerek tümör büyümeye devam edebilir (Rosen 2002, Bamias ve Dimopoulos 2003, Gupta ve Ren-Yi 2003).

Anjiogenik uyarımın gerçekleşmesini sağlayan pro-anjiogenik faktörler 1980’lerin başında tanımlanmaya başlanmıştır. O zamandan bu yana kabul edilen en önemli anjiogenik faktörler; vaskular endotelyal büyüme faktörü (VEGF), asidik ya da bazik fibroblast büyüme faktörü (aFGF, bFGF), platelet kökenli endotel hücre büyüme faktörüdür (PD-ECGF). Bu faktörlerden bazıları endotel hücrelerin yüzeyinde bulunan tirozin kinaz reseptörlerine bağlanarak onları aktive etmek koşulu ile anjiogenezin uyarımında doğrudan etki gösterirken, bazıları da hücre içinde farklı mekanizmaların tetiklenmesine yol açarak anjiogenez uyarımını dolaylı yoldan tetikler. Farklı anjiogenik faktörler tek bir mekanizmayı kullanarak anjiogenezi tetiklerken, bazen tek bir anjiogenik faktör birden çok mekanizmayı devreye sokabilmektedir (Gupta ve Ren-Yi 2003, Papaiakevou vd 2004).

Birçok deneysel çalışma primer tümörün, uzakta bulunan sekonder bir tümörün büyümesini baskılayabildiğini göstermiştir. Bu sonuca dayanarak primer tümörden salınan bazı faktörlerin metastazı inhibe ettiği söylenebilir. O halde tümör hücreleri pro-anjiogenik faktörlerin yanı sıra anti-anjiogenik faktörler de salgılar (Prehn 1991, Prehn 1993). Tümör hücresinin anjiogenik olabilmesi için, anjiogenik faktörlerin ekspresyonlarındaki artış tek başına yeterli değildir, aynı zamanda var olan anti-anjiogenik faktörlerin ekspresyonları da baskılanmalıdır. Anti-anjiogenik faktörlerin bilinen hedefleri arasında; endotel hücrelerin çoğalmasını teşvik eden büyüme faktörlerini inhibe etmek, endotel hücrelerin bazal membranı geçmesini sağlayan proteazları inhibe etmek, hücre içi sinyal iletim yolağını bozmak, endotel hücrelerin apoptoza yönelmesini sağlamak ya da onları hücre döngüsünde hapsetmek, endotelleri oluşturan kemik iliği öncüllerini inhibe etmek ve yeni damar oluşumu sırasında endotellerin ekstraselüler matrikse tutunmasını sağlayan $\alpha_5\beta_1$ -integrin-vitronektin etkileşimini ortadan kaldırmak, yer almaktadır (Eckhardt 1999, Oehler ve Bicknell 2000).

İnterferonlar, bazı interleükinler, proteaz inhibitörleri, angiostatin ve endostatin gibi endojen bazı peptitler, hücre içerisinde var olan doğal (endojen) anti-anjiogenik faktörlerden bazılarıdır. Hücreye dışarıdan verilen ve endojen anti-anjiogenik faktörlere benzer fonksiyonlar göstererek anjiogenezi inhibe eden ajanlar ise ekzojen anti-anjiogenik faktörler olarak adlandırılır (Friesel vd 1987, Singh vd 1995, Strieter vd 1995, Fernandez vd 1999, Hajitou vd 2002, Gupta ve Ren-Yi 2003).

Anti-anjiogenik ajanlar, etki ettikleri hücre tipine bağlı olarak üç farklı sınıfa ayrılır (Gupta ve Ren-Yi 2003):

- 1-Doğrudan etki gösteren ajanlar: Endotel hücreleri ve onların anjiogenezdaki rollerini hedef alır,
- 2-Dolaylı etki gösteren ajanlar: Tümör hücrelerinin anjiogenik faktörler üretmelerine engel olur ve/veya ekstraselüler mekanizma ile ilgili rol oynar,
- 3-Karışık etki gösterenler: Hem endotel hem de kanser hücrelerini hedef alır.

Çizelge 2.4. Pro-anjiogenik ve Anti-anjiogenik faktörler

Pro-anjiogenik Faktörler	Anti-anjiogenik Faktörler
Adenozin	Alfastatin
AC133	Angiostatin
Anjiogenin	Anti-anjiogenik antitrombin III
Angiopoietin-1	Arrestin
Angiopoietin-2	CD 59 komplemanı fragmenti
Angiotropin	Çinko
Asidik fibroblast büyüme faktörü (aFGF)	Endostatin
Bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF)	Fibronektin fragmenti
c-myc (onkogen)	Gro-beta
Ras (onkogen)	Heparinazlar
Del-1	Heparin heksasakkarit fragmenti
Efirin-B2	Histidine zengin glikoprotein parçası
Endotelin	İnsan koryonik gonodotropin (hCG)
Epidermal büyüme faktörü (EGF)	İnterferon alfa, beta, gama
Eritropoietin	İnterferon indükleyici protein (IP-10)
Fibronektin	İnterlökin-1,2 (IL-1,2)
Follistatin	Kanstatin
Granülosit koloni-stimüle edici büyüme faktörü (G-CSF)	Kartilaj kökenli inhibitör (CDI)
Hepatosit büyüme faktörü (HGF)	Krigle-5
İnterlökin-1,6, 8 (IL-1,6,8)	Maspin
İntegrinler	Metalloproteazların doku inhibitörleri (TIMP)
Jelatinaz	2-Metoksiöstro
Leptin	Osteopontin
Midkin	Pigment epitel kökenli büyüme faktörü (PEDF)
Matriks metalloproteazlar	Plasental ribonükleaz inhibitörü
Nitrik oksit sentezi	Plazminojen aktivatörü inhibitörü (PAI-1)
Plasental büyüme faktörü (PiGF)	Platelet faktör 4 (PF4)
Platelet kökenli endotel hücre büyüme faktörü (PD-ECGF)	Retinoidler
Platelet kökenli büyüme faktörü-BB (PDGF-BB)	Prolaktin fragmenti
Pleiotropin (PTN)	Tetrahidroksikortizol-S
Proliferin	Trombospondin-1 (TSP-1)
Prostaglandin- E1 ve E2	Transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-β)
Transforme edici büyüme faktörü-alfa (TGF-α)	Tumstatin
Transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-β)	Vaskulostatin
Trombopoietin	Vasostatin
Tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α)	
Urokinaz-tip plazminojen aktivatörü (uPA)	
Vaskular endotelial büyüme faktörü (VEGF)	
Vaskular endotelial kaderin	

Gerçekleştirdikleri fonksiyonlar göz önüne alındığında anjiogenez inhibitörleri dört gruba ayrılır (Gupta ve Ren-Yi 2003):

1-Anjiogenik büyüme faktörlerini inhibe eden endojen ve ekzojen anti-anjiogenik faktörler: Bu grup içerisinde doğrudan anjiogenik büyüme faktörüne ya da onun reseptörüne bağlanan antikorlar, sitokinler yer alır. Trombospondin bu grup için verilebilecek en güzel örnektir. Bu proteinler oldukça büyüktür ve bu nedenle de proteolize açıktır. Proteindeki anti-anjiogenik özelliği oluşturan aminoasit dizisi saptanır ve sadece bu dizinin sentezlenmesi ile, daha küçük ekzojen anti-anjiogenik ajanlar tasarlanır.

2- Endotel hücrelerin canlılığını veya büyümesini etkileyen anti-anjiogenik faktörler: Endotel hücrelerin canlılığını ya da büyümesini etkileyen bu faktörler, etkilerini doğrudan ya da dolaylı bir mekanizma ile sergileyebilir. Doğrudan endotelleri hedef alan inhibitörler arasında angiostatin, endostatin, arrestin ve 2-metoksiöstradiol yer almaktadır. Bu ajanlar endotel hücrelerde bazı değişikliklere yol açarak, onları öldürür ya da bölünmelerini engeller. Dolaylı etki gösteren herseptin gibi ajanlar ise, bazı büyüme faktörlerinin reseptörlerini bloke etmek sureti ile etki gösterir.

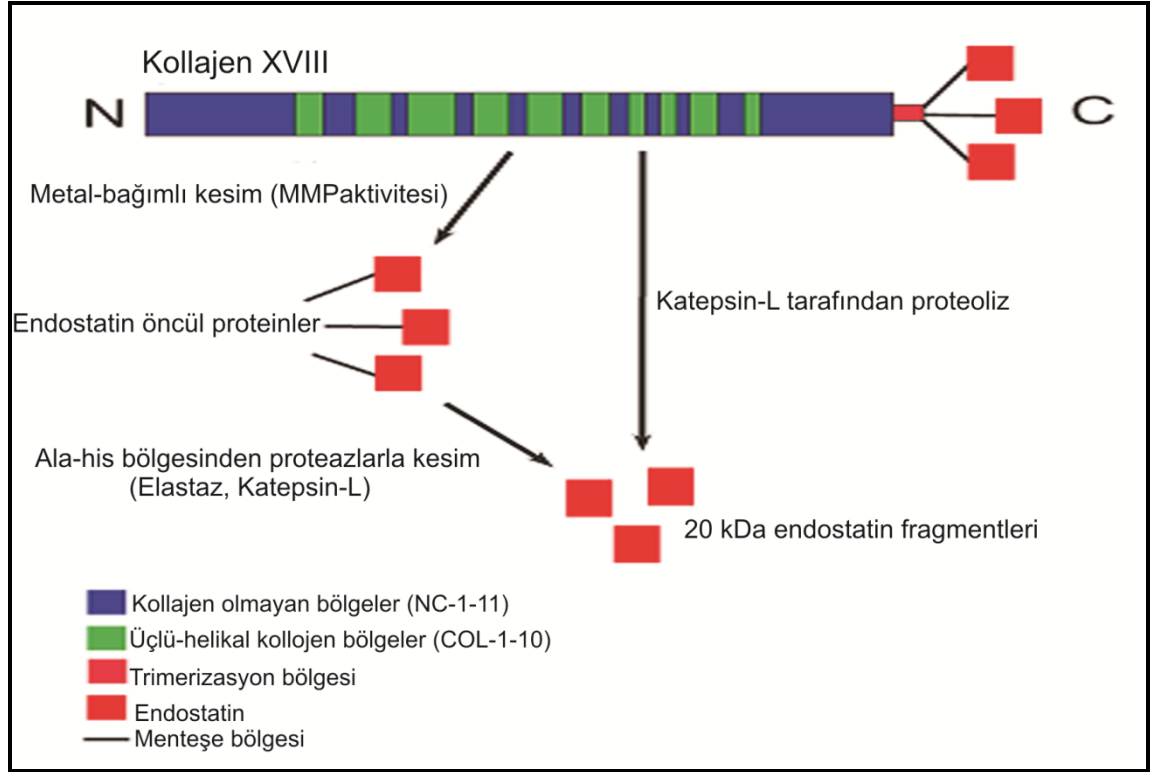
3-Bazal membranı ve ekstraselüler matriksi hedef alan anti-anjiogenik faktörler: Endotel hücrelerin ekstraselüler matriks ile etkileşimini sağlayan moleküller arasında en önemlisi integrinlerdir. Bu grupta yer alan kanstatin, tumstatin ve vitaksin gibi inhibitörler, integrin fonksiyonlarının bozulmasına neden olur.

4-Anjiogenik sinyal yolağını bozan anti-anjiogenik faktörler: Anjiogenik sinyal yolağında tirozin kinaz (PTK), MAPK/ERK, Akt, Bcl-2 ve p53 gibi proteinlerin fonksiyonel oldukları bilinmektedir. Bu proteinleri ve dolayısı ile bu proteinlerin yer aldığı yolağı baskılayan anti-anjiogenik ajanlardan bazıları; gleevec, SU5416, PTK787 ve ZD6474'dür. Düşük molekül ağırlığına sahip bu inhibitörler, etkilerini hücrede immünolojik bir yanıt oluşturmada sergilemektedir.

2.3.2.1. Endostatin

Endostatin, ilk kez hemangioendotelioma hücrelerinin besiyerlerinden izole edilmiş, endotel hücrelerinin proliferasyonunu önleyen, 20 kDa moleküler ağırlığa sahip endojen bir anti-anjiogenik proteindir. Proteinin mikro analizi sonucunda, amino asit

dizisinin kollajen XVIII içerisinde bulunan bir fragmentin amino asit dizisine çok benzediği saptanmıştır (Şekil 2.19). Daha sonra yapılan çalışmalar, endostatinin, bazal membran bileşenlerinden biri olan kollajen XVIII in C-terminal nonkollajen domaininden, elastaz veya katepsin-L enzimleri ile elde edildiğini göstermiştir.

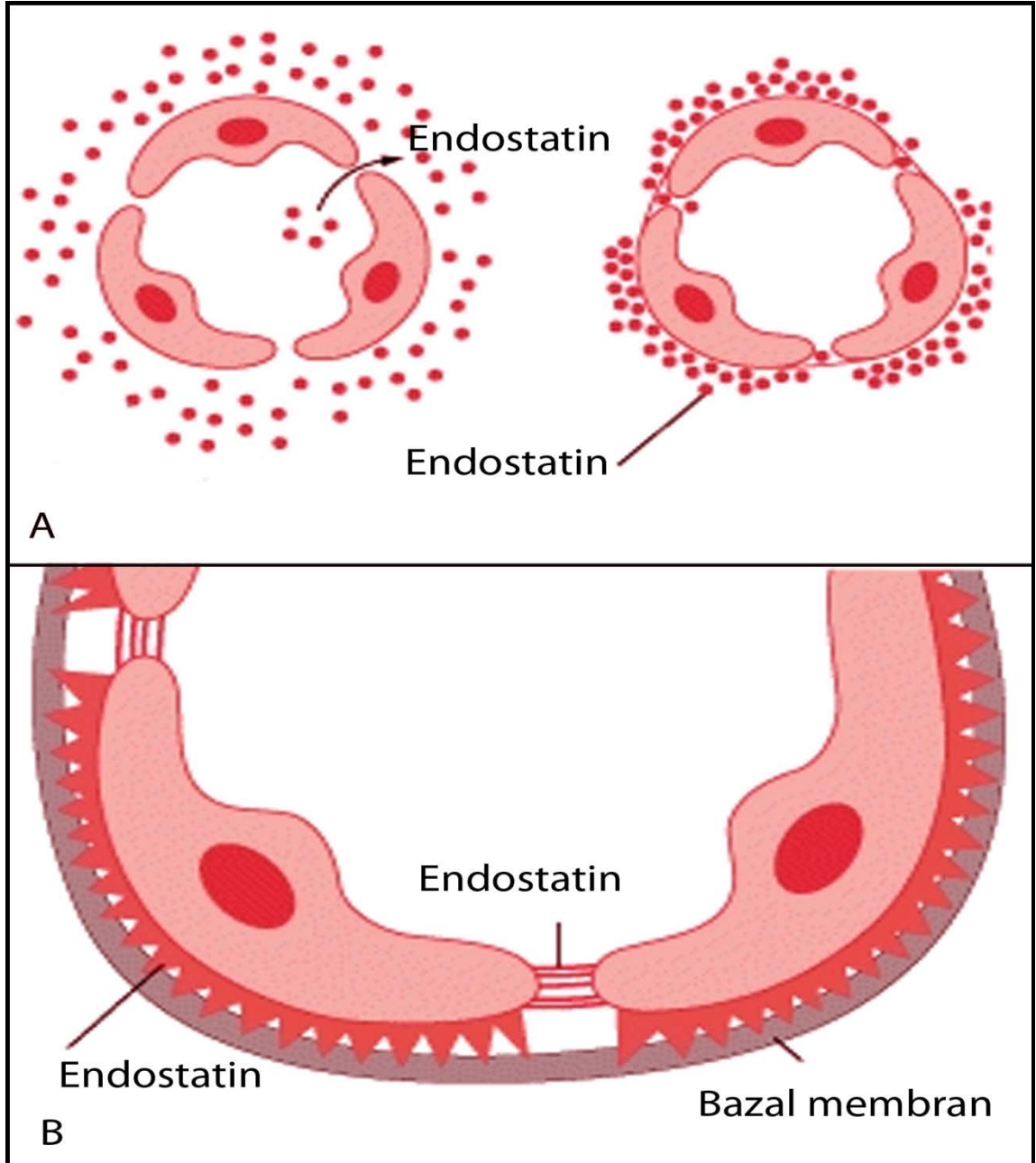


Şekil 2.19. Endostatin oluşumu (Rege vd 2005’den alınmıştır)

Endotel hücre göçünü inhibe ederken apoptozu indükler ve bu sayede tümörün yeni damar oluşturmasını engeller (O’reilly vd 1997, Saarela vd 1998, Wen vd 1999, Ferrerasa vd 2000, Kalluri 2003). Endostatinin anjiogenezi inhibe ettiği hem korneal hem de koryoallantoyik membran deneyleri ile gösterilmiştir (Stadler ve Wilding 2003).

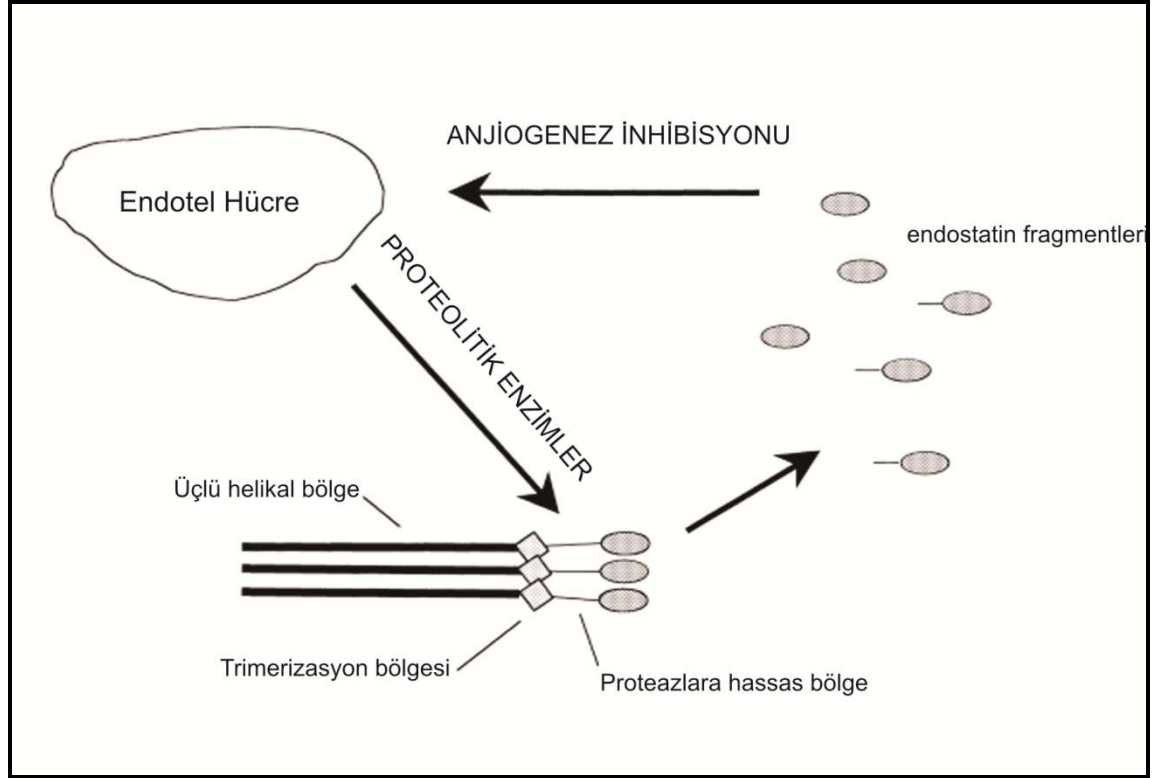
Bakteriler tarafından ekspre edilen endostatin oldukça yavaş çözündüğü için, proteinin saflaştırılma basamağında önemli sorunlar ile karşılaşmıştır. Proteinin çözünürlüğü zamana bağlı olarak artmıştır. Endostatin’in bu özelliği, başta araştırmacıları memnun etmese de, Folkman ve arkadaşları bu özellikten yola çıkarak endostatin biyolojik depo olarak kullanmışlardır. *İn vivo* denemelerde, çözünebilmesini sağlamak amacı ile endostatin yavaş yavaş implante etmişler ve bu sayede dolaşıma

oldukça yavaş bir şekilde katılması sağlanmıştır. Böyle bir deneme sonucunda, endostatin akciğer kanserinin hem primer hem de sekonder formlarında inhibisyon sağlamayı başarmıştır. Benzer şekilde uygulanan endostatin, farklı histolojik özellikteki tümörlerde, büyümeyi önemli ölçüde baskılamıştır (Şekil 2.20).



Şekil 2.20. Endostatin'in antianjiogenik mekanizması. Damar olgunlaşma sürecinde endostatin endotel hücreler arasına, özellikle endotellerin bağlantı bölgelerine yayılır. (A) Yeni oluşan kan damarlarının stabilizasyonunu sağlar. (B) Anjiogenik kan damarlarının durgun faza geçişi sağlanır (Ergün vd 20012den alınmıştır)

Endotel hücrelerden salınan endostatin, anjiogenezi baskılamak üzere proteolitik enzimler tarafından aktifleştirilir (Şekil 2.21) (Zatterstrom vd 2000).



Şekil 2.21. Endostatin aktivasyonu ve anjiogenezi üzerine etkisi (Zatterstrom vd 2000’den alınmıştır)

Endostatinin hem primer tümörler hem de onların gelişmiş formları üzerinde etkili olması ve bu etkiyi hücreye spesifik olmadan gerçekleştirebilmesi üzerine, bu protein ile yapılan çalışmalar hızla artmıştır (Folkman 2006). Endostatinin etki mekanizması uzun yıllardan bu yana pek çok farklı araştırmacı tarafından araştırılmaktadır. Bilinen bazı fonksiyonları şöyledir;

1-Pek çok hücre yüzey proteini ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ ve glipikan-1, -4) ile etkileşir. Bu etkileşim sonucunda hücrelerin adezyon ve migrasyon yetenekleri değişir (Rehn vd 2001),

2-VEGF reseptörlerinden biri olan VEGF-R2 (KDR/FLK1)’nin fonksiyonunu bloke ederek hücrenin hareketini, proliferasyonunu ve canlılığını etkilemeyi başarır (Kim vd 2002),

3-Matriks metalloproteaz 2 (MMP2) ile dayanıklı kompleksler oluşturur. MMP-2’ nin katalitik bölgesini maskeleyerek aktivitesini baskılar (Kim vd 2000, Lee vd 2002),

- 4-Fokal adezyon kinaz ve paksillin proteinlerindeki tirozinlerin fosforilasyonunu indükleyerek hücre göçünü ve dolayısıyla hücre matrisi etkileşimini bozar (Dixelius vd 2002).
- 5-Cylin D1 promotorunun transkripsiyonel aktivitesinde değişiklik yaratarak hücre döngüsünün ilerleyişini durdurur (Hanai vd 2002),
- 6- MAPK1, MAPK2 ya da c-myc genlerinin mRNA seviyelerini azaltarak proliferasyonu etkiler (Shichiri ve Hirata 2001),
- 7-Fosfotidilinozitol 3 kinaz (PI-3 kinaz)/ protein kinaz B (PKB) yolağının indüklenmesi ile oluşan anti-apoptotik sinyalleri inhibe eder. PKB'nin fosforilasyonunu indükleyerek yaşam-ölüm arasındaki hassas dengeyi bozar (Kang vd 2006),
- 8-Kaspaz 9 aktivasyonuna ve Bcl-2, Bcl-XL, Bad gibi anti-apoptotik proteinlerin seviyelerinin azalmasına neden olarak apoptozu indükler (Dhanabal vd 1999),
- 9-Endotelial nitrit oksit sentazın (eNOS), VEGF indüklü fosforilasyonunu baskılayarak metastazı engelleyici etki yaratır (Urbich vd 2002),
- 10-Mitojenik büyüme faktör sinyal yolağını bozan hücre yüzey heparan sülfat proteoglikanlara bağlanmak için bFGF ile yarışarak anti-proliferatif ve anti-anjiogenik etkisini sergiler (Hohenester vd 1998),
- 11-Nöropeptit Y ve bombesin ile stimüle edilen endotel hücre proliferasyonunda önemli ölçüde azalmaya yol açar (Marion-Audibert vd 2000).
- 12-Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu artırır ancak hücre içi Wnt sinyalini güçlü bir şekilde inhibe eder (Hanai vd 2002).

Tümörün sürekli artan bir şekilde kan kaynaklarına ihtiyacı olduğunu keşfetmek, tümörün kendi ipini çekmesine neden olmuştur. Bilindiği gibi tümörün metastaz yapmasını proteazlar sağlar. Ancak Endostatin de bir proteaz tarafından kollajen XVIII in parçalanması sonucu açığa çıkar. Bu noktada muhteşem gizem ortaya çıkmaktadır. Tümör kendi malignant özelliğinin oluşmasını sağlayan proteazlar salgılar ancak bu proteazlar anti anjiogenik moleküllerin oluşumuna da yol açabilir. Buradan ortaya çıkan gerçek ise, vücudun kendi malignant hasmı ile kendisinin mücadele ettiğidir. Tümörden salınan proteazlar bir yandan agresifliği artırırken öte yandan tümörün kendisine karşı kullanılabilecek farklı silahların da yaratılmasını destekler (Hart ve Saini 1992, O'reilly 1997).

2.4. Kanser Tedavileri

Klasik kanser tedavileri olarak cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyoterapi 40 yılı aşkın süredir uygulanmaktadır (Kvols 2005).

2.4.1. Cerrahi müdahale

Kanser için bilinen en eski tedavilerden birisi cerrahi müdahale ile tümörün uzaklaştırılmasıdır. Tümörün tamamı alınarak başarılı bir sonuç elde edilebilir. Ancak primer tümörden ayrılan hücreler kana ya da lenfe geçmiş ise, primer tümör alındıktan sonra da vücudun herhangi bir bölgesinde tümör gelişimi gözlenebilir. Bu nedenle cerrahi müdahale yapılacaksa genellikle kanserin henüz yayılmamış olması tercih edilir. Bunun dışında araştırmalar göstermektedir ki primer tümörün alınması, tümör hücreleri kalmışsa, residual kanser gelişiminin hızlanmasına neden olmaktadır. Bunun nedeni tümörün uzaklaştırılması nedeni ile neoplastik hücrelerin proliferasyon, apoptoz ve metastaz gibi biyolojik özelliklerinin değişmesidir. Primer tümör uzaklaştırıldıktan sonra, vücutta kalan residual kanser hücrelerinde apoptozun azaldığı ve proliferasyonun arttığı saptanmıştır. Farklı araştırmacılar ise primer tümörün uzaklaştırılmasının, hem primer hem de metastazik tümör hücrelerinde DNA sentezini artırdığını göstermişlerdir. Primer tümör uzaklaştırıldıktan sonra, TNF- α , IL-6 ve VEGF gibi bazı faktörlerin salınımı hızlanmaktadır. Bu durum tümörün büyümesine katkı sağlamaktadır. Eğer kanser çok fazla yayılmışsa, cerrahi müdahale tedavide etkisiz olabilir (Coffey vd 2003).

2.4.2. Kemoterapi

Kemoterapi, özellikle çoğalan hücrelere karşı seçici öldürücü etkileri olan, doğal veya sentetik kimyasal, biyolojik ajanlar ve hormonlarla yapılan tedavi şeklidir. 1960'lı yıllardan bu yana kullanıldığı bilinmektedir. Kemoterapide kullanılan ajanlar sitostatik ya da sitotoksik etkili olabilir. Sitostatik ajanlar hücre gelişimini büyüme siklusunun spesifik fazında durdurmak, sitotoksik ajanlar ise hücreleri öldürmek için kullanılırlar.

Kemoterapi etkili bir tedavi olsa da bazı olumsuz sonuçlar doğurmaktadır. Kemoterapide kullanılan ilaçlara karşı, kanser hücrelerinde direnç gelişimi söz konusu olabilir. Bu direncin iç direnç (intrinsic resistance) veya kazanılmış direnç (acquired resistance) olabileceği düşünülmüştür. Bu direnç mekanizması hücre membranında yer alan ve bir protein olan 'P glikoproteini'nin ekspresyonuna bağlı olarak gelişir. P glikoproteini, tıpkı bir pompa gibi çalışarak hücre içerisinden kemoterapötik ajanları hızla dışarı atmaktadır. Çoklu ilaç direnci (multiple drug resistance-MDR) olan hücrelerde, MDR geninin çoğalmış olması P glikoproteininin bu hücrelerde fazlaca ekspre edildiğini işaret etmektedir. Bazı ajanların bu proteine daha fazla duyarlı olduğu bilinmektedir. Bunlar içerisinde antitümör antibiyotikler, epipodophylotoxinler, doxorubicine, bleomycine ve vinca alkaloidleri yer almaktadır.

Kemoterapatik ajanların seçici olmayan etkileşimlerinden tümör hücreleri kadar normal hücrelerde etkilenebilir ve toksisite gözlenebilir. Oluşan toksik yanıtlar sıklıkla ilaçlarda kullanılacak dozu sınırlar, bazı durumlarda hasta yaşamını tehdit edebilir ya da yaşam kalitesini bozabilir. Klinik uygulamalarda en sık gözlenen toksik yanıtlar; kemik iliğinde baskılanmaya bağlı lökopeni, trombositopeni, gastrointestinal sistemde mukozit, stomatit, bulantı, kusma, diyare ya da saç dökülmesidir (Akyol 2004).

2.4.3. Radyoterapi

1895 yılında Roentgen tarafından X-ray tanımlanmış hemen ardından 1898 yılında Marie ve Pierre Curie radyumu keşfetmişlerdir. Bu tarihten sonra iyonize radyasyonun etkileri, hızla araştırılmaya başlanmış ve pek çok fizikçi cerrahi müdahaleye alternatif olması için iyonize radyasyonu kanser tedavisine adapte etmeye çalışmıştır. Radyasyon tedavileri, ilk zamanlarda tek ve yüksek doz şeklinde uygulanmış ancak tümörlerde beklenen inhibisyon sağlanamamıştır. 20.yy'ın başlarında Claude Regaud, tekrarlanan küçük dozlar şeklinde uyguladığı radyoterapinin deride hasar yaratmadan etki gösterdiğini bildirmiştir (Connell vd 2004).

Radyoterapi tedavisi palyatif ve küratif olmak üzere iki şekilde uygulanır. Palyatif tedavi tümörün yol açtığı hasarları azaltmak ya da ortadan kaldırmak amacı ile

uygulanmaktadır. Bunun için düşük radyasyon dozları (tipik olarak 30 Gray (Gy), en az 2 hafta) yeterlidir ve normal dokulara zarar verme riski oldukça azdır. Küratif tedavide tümörün yok edilmesi amaçlanır ve bu nedenle daha yüksek dozlar kullanılır (66–75 Gy ve 6–8 hafta). Dozdaki artış, normal dokularda hasar meydana gelme riskini de beraberinde artırmaktadır. Komplikasyonlar; uygulanan fraksiyonun büyüklüğüne, radyasyon uygulanan doku tipine, toplamda uygulanan doza ve organın hangi kısmına uygulandığına bağlı olarak gelişir. Radyoterapinin yol açtığı yan etkiler, bazen hemen bazen ise uzun bir süre sonra ortaya çıkabilir (Emami vd 1991).

Normal hücreler, belirli zaman aralıkları ile tekrarlanarak uygulanan düşük dozdaki radyasyonu daha iyi tolere edebilmektedir. Bu nedenle radyoterapide standart olarak kullanılan uygulama şekli, haftada beş kez düşük dozlar kullanılarak (1.2–3 Gy) yapılmaktadır. Ancak, bu dozların tümör hücrelerini yok etmek için yeterli olmadığı da bilinmektedir. Normal hücrelerde hasar yaratma riski % 5'in altında tutulmaya çalışıldığı için bu dozlar ve süre standardize edilmiştir (Connell vd 2004).

1955 yılında Thomlinson ve Gray, tümörlerde hipoksinin olduğunu gösteren çalışmalarını yayımlamışlardır. Bu tarihten sonra pek çok çalışmadan elde edilen ortak sonuç; malignant beyin tümörlerinde, yumuşak doku sarkomalarında, melanomalarda, prostat, rahim, meme ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde hücrenin hipoksik olduğudur (Wouters vd 2007). Solid tümörlerin fizyolojisi ve mikro çevresi normal dokularinkinden oldukça farklıdır. Normal dokularda dokunun tipine bağlı olarak oksijen basıncı 10 ile 80 mmHg arasında değişirken solid tümörlerde ortalama 5 mm Hg'dır (Fyles vd 2002). Oksijen miktarının tümör üzerinde yarattığı etkiler uzun yıllardır araştırılmaktadır (Nordsmark vd 1996, Brizel vd 1996). Tümördeki oksijen azalması akut ya da kronik sebeplerden ortaya çıkmış olabilir. Hipoksi tümör biyolojisi ve fizyolojisi üzerinde zıt etkiler yaratır; hipoksi hücreler için sitotoksiktir ve farklı birçok mekanizma ile apoptozu uyarır (Wouters vd 2007). Diğer yandan hücrelerde pro-angiogenik ajanların salınımını tetikler (Semenza 2001). Kanser hastalarında aneminin gözlemlendiği bir gerçektir (Obralic vd 1990, Littlewood 2001, Harrison vd 2002). Anemi hastalığın kendisinden kaynaklanıyor olabileceği gibi kanser tedavileri sonrasında da gelişmiş olabilir. Aneminin varlığı radyoterapi ve kemoterapiden alınacak sonuçları

önemli ölçüde etkilemektedir (Harrison ve Blacwell 2004). Solid tümörlerde anemiye bağlı olarak (hemogloblin miktarının azalımı) hipoksinin arttığı gösterilmiştir (Hockel vd 1993). Aneminin düzeltilmesi ile birlikte solid tümör çevresindeki hipoksi ortadan kalkar ve radyoterapiye karşı duyarlılık artar. Birçok çalışmada radyoterapi öncesinde oksijen miktarı artırılmış ve tümörün radyoterapiye karşı hassaslaştığı saptanmıştır (Overgaard ve Horsman 1996, Stuben vd 2003).

Yukarıda bahsedildiği gibi hipoksik koşullar, tümörlerde hipoksi indükleyici faktörün (HIF-1 α) ve buna bağlı olarak VEGF ekspresyonunun artmasına neden olur (Semenza 2001). Radyoterapi sonrasında VEGF'nin miktarındaki artışa bağlı olarak tetiklenen anjiogenez mekanizması, tümör büyüklüğünde artmaya yol açabilir (Ellis vd 1998, Gidley 1998).

2.4.4. Anti-anjiogenik terapi

Anti-anjiogenik ajanların anjiogenez mekanizmasını önemli derecede baskılayabilmesi, bu ajanları kullanarak kansere alternatif bir tedavi yaratma fikrini doğurmuştur. Bu amaçla günümüze kadar pek çok çalışma yapılmıştır. Anti-anjiogenik ajanlar kullanılarak tasarlanan terapiler, doğrudan kanseri hedef alır çünkü her ne kadar heterojen yapıda olsalar da tüm kanser hücreleri anjiogenez mutlak suretle tetiklemek zorundadır. Bu bağlamda anti-anjiogenik terapiler, anjiogenezin inhibe ettiği için, kanser tedavisi için önemli avantajlar sağlar:

- 1-Tek bir damarın binlerce tümör hücresi için gerekli besin ve oksijeni sağladığı düşünülürse, bu damarın baskılanması tümör hücrelerinin besin ve oksijensiz kalmasına dolayısıyla ya ölmelerine ya da dormant hale geçmelerine neden olur,
- 2-Bu terapi ile kan pıhtılaşmasının lokal başlangıç şeklinin değişimi sağlanabilir,
- 3-Endotel hücreler normal diploit hücrelerdir ve genetik mutasyonlara açık değildir dolayısıyla oldukça dayanıklıdır. Bu nedenle sitotoksik ilaçlara karşı kısa sürede direnç geliştirirler,
- 4-Biyolojik aktiviteyi gösteren en önemli özellik olan kan akışı klinikte ölçülebilir bir kriterdir,

5-Damarların fonksiyonlarında geçici de olsa meydana getirilebilen etkiler endotellerin ölümüne neden olur.

Anti-anjiogenik ajanlar henüz tümörün damara ihtiyacı yokken uygulanacak olursa, tümörün büyümesini engelleyen aşılar gibi rol oynar. Anti-anjiogenik terapilerde temel olan anjiogenezi bloklamaktır. Anti-anjiogenik terapiler tümör oluşumunu değil tümörün büyümesini ve metastazını baskılamayı ya da inhibe etmeyi hedeflemelidir. Unutulmamalıdır ki, anti-anjiogenik terapi, kanser için bir tedavi şeklidir; bir kür değildir. Kanser için bir kürden bahsedilmek istenirse, kullanılacak ajan hücrelerin tümörijenik özellik kazanmasını engelleyebilecek nitelikte olmalıdır.

Klasik antikanser tedavilerindeki en önemli sorun olarak kabul edilen hücre heterojenitesi, anti-anjiogenik uygulamalar için de göz ardı edilemeyecek bir konudur. Anti-anjiogenik terapide hedef endotel hücrelerdir ve farklı öncüllerden köken aldıkları düşünüldüğünde endoteller arasında bir heterojenitenin olması kaçınılmazdır. Bu durumda ajan endotel hücrelerindeki farklılığa bağlı olarak değişen etkilerin ortaya çıkmasına neden olabilir (Bamias ve Dimopoulos 2003).

Metastazik tümörlerde bulunan hücreler birbirlerinden oldukça farklıdır. Bu nedenle, salgıladıkları pro-anjiogenik ajanların hem yapıları hem de miktarları arasında değişiklikler gözlenebilir. Tümör hücrelerinin aynı anjiogenik faktörü ürettiyor olmaları, tedaviye aynı yanıt vermelerini sağlamaz. eceklerini garantile verilmesini garantilemez (Kim vd 2001, Durand ve Raleigh 1998). Tümörün mikro çevresinin, anjiogeneze karşı oluşturulacak yanıtı doğrudan etkilediği son yıllarda bazı çalışmalarla gösterilmiştir. Tümör mikro çevresi endotelial kompartmanları korur, bazı yaşamsal sinyallerin endotellere iletiminde rol oynar. Tümör büyümesi için kritik bir önem taşıyan diğer faktör ise, ekstraselüler matriksin bütünlüğünün korunmasıdır. Birçok pro ve anti-anjiogenik ajan ekstraselüler matrikste depolanır ve parçalanması ile salınır. Ekstraselüler matriksin ve depoladığı modülatörlerin içeriği tümöre bağlı olarak değişir. Bu nedenle her tümör tek bir ajana karşı, aynı yanıt vermez. Ajan uygulandıktan sonra elde edilen yanıt ajanın, tümörün hangi bölgesine uygulandığına bağlı olarak değişmektedir. Buna ilave olarak mikroçevre, ajanın vücuda dağılımını da etkiler. Bazı

klirik denemelerde erken fazda uygulanan anti-anjiogenik ajan akciğer metastazını durdururken karaciğerde metastaz gelişimine neden olmuştur (Sood vd 2001, Miller vd 2001, Thomas vd 2003). Bu farklılığın temel nedeni henüz çözülememiş olsa da bilim adamları tümöre ait mikroçevrenin burada önemli bir kriter olduğu konusunda hemfikirdir.

2.4.5. Kombine kanser tedavileri

Kanseri tedavi etmek için kullanılan klasik terapilerin hastalarda yarattığı yan etkiler göz önüne alındığında, bu tedavilerin geliştirilerek daha etkili hale getirilmesi gerektiği yadsınmayacak bir gerçektir. Bu nedenle bilim adamları, var olan tedavileri farklı şekillerde kombine ederek, tedavi başarısını arttırmayı, yan etkileri de azaltmayı hedeflemektedirler.

Bu amaçla ilk kez Heidelberg yaptığı preklirik çalışmada, radyasyon terapisini takiben kemoterapik ilaçlar uygulamış ve radyoterapinin tek başına sağladığı etkinin, ilaçla birlikte uygulandığında önemli ölçüde arttığını saptayarak, kombine tedavilerin uygulanması için ilk umut verici sonucu bilim dünyasına açıklamıştır. 1960'lı yıllarda Moertel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada radyoterapi ve kemoterapi birlikte kullanılmış, mide ve pankreas kanseri olan hastalarda tedavi başarısı önemli ölçüde artmıştır. 1974 yılında, 5-florourasil ve mitomisin C kombinasyonu radyasyon ile birlikte uygulamış ve elde edilen başarılı sonuçlar hem medikal hem de radyasyon onkologlarının dikkatini çekmiştir (Kvols 2005). Bu tarihten sonra baş ve boyun, özafagus, akciğer, mide, pankreas, anal kanal ve rahim kanserleri gibi pek çok kanser üzerinde kombine tedavilerin etkileri araştırılmıştır (Herskovic vd 1992, Adelstein 1998, Cooper vd 1999, Cooper vd 2004 Furuse vd 1999, Thomas 1999, Ryan vd 2000, Evans vd 2001; Macdonald vd 2001, Penberthy vd 2001).

Klasik kanser tedavilerinde amaç tümör hücrelerini öldürmektir. Buna alternatif bir yaklaşım olan anti-anjiogenik terapilerde ise hedef, tümör yatağında toplanan ve bölünmekte olan endotelleri yok etmek ve bu sayede tümörü anjiogenezdten yoksun bırakmaktır. Kemoterapi ve radyoterapi gibi klasik kanser tedavilerinin yarattığı yan

etkiler göz önüne alındığında anti-anjiogenik terapinin, kanser tedavilerine sağlayacağı avantaj göz ardı edilemez. Anti-anjiogenik terapide kullanılan ajanın tümör hücrelerine girme ya da kan beyin bariyerini geçme gibi bir zorunluluğu yoktur. Bu nedenle ajan düşük dozlarda kısa aralıklarla, sık sık uygulanabilir. Eğer bir ilaç sitotoksik etki yarattığı dozdan daha düşük konsantrasyonlarda damar üzerine etki yaratıyorsa anti-anjiogenik özelliğe sahiptir denebilir (Bamias ve Dimopoulos 2003, Miller vd 2001).

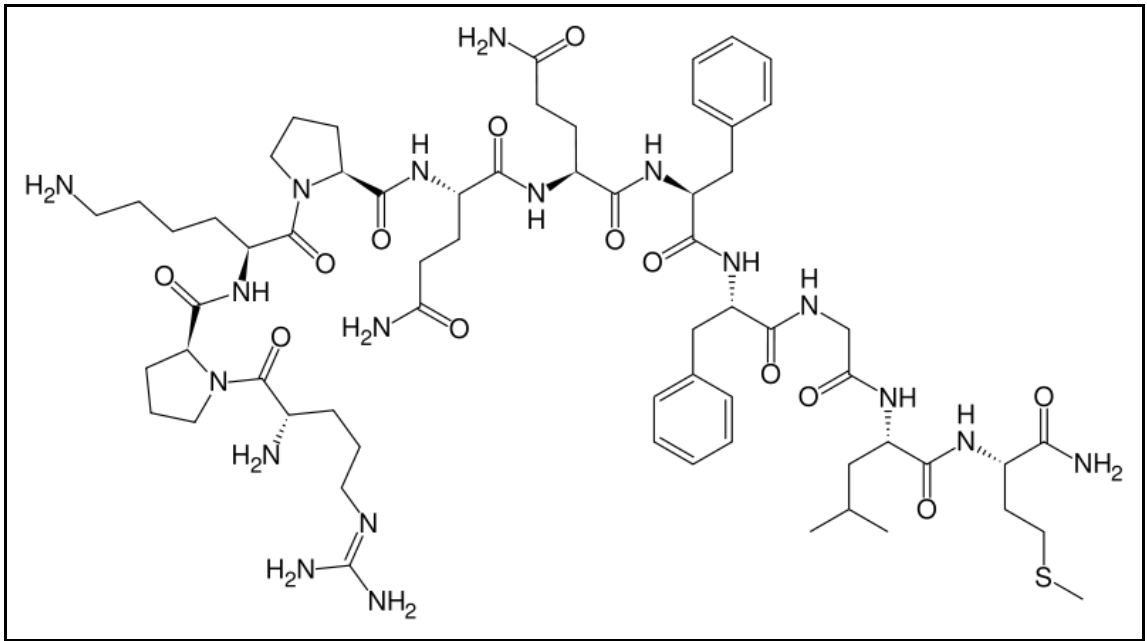
Teicher ve arkadaşları 1995 yılında yaptıkları çalışmalarında ilk kez anti-anjiogenik bir ajanı düşük-tek doz radyoterapi ile birlikte uygulamışlar ve radyoterapinin etkisinin arttığını göstermişlerdir (Teicher vd 1995). Daha sonraki yıllarda bu kombinasyon pek çok araştırmacı tarafından uygulanmış ve anti-anjiogenik ajanın, tümörü radyasyona karşı hassaslaştırdığı saptanmıştır (Murata vd 1997, Gorski vd 1999, Lee vd 2000, Lund vd 2000, Hess vd 2001, Kozin vd 2001, Griffin vd 2002, Huang vd 2002). Ancak elde edilen bulguları karşılaştırmak ve kombine tedavinin etkisini tam olarak ortaya çıkarmak zordur çünkü yapılan çalışmalarda kullanılan tümör modeli, başlangıçtaki tümör boyutu, uygulanan doz ve uygulama şekli gibi pek çok faktör değişkendir. Tahmin edilebileceği gibi farklı tümörler anti-anjiogenik tedaviye farklı yanıtlar verir. Tümörlerde saptanan bu farklılık, değişken anjiogenik büyüme faktörlerinin seviyesine bağlıdır (Wachsberger vd 2003).

Radyoterapi tümörün merkezindeki hücreleri öldürülmeye hedeflenmiştir. Radyoterapide kullanılan radyoaktif madde hipoksi yaratır ve bu sayede başta VEGF olmak üzere birçok anjiogenik faktörün salınımı tetiklenir. Antianjiogenik ajanlar ile kombine edildiğinde, tümör hücrelerinin radyoterapiye karşı hassaslaştığı saptanmıştır. Aynı zamanda kullanılan antianjiogenik ajan, radyasyonun tümörün merkezine kadar ulaşmasını da kolaylaştırmaktadır (Gorski vd 1999).

2.5. Anjiogenez ve kanserle ilişkili bir nöropeptit (P maddesi)

P maddesi ilk defa geçen yüzyılın ilk yarısında at beyni ve bağırsağından toz olarak elde edilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda P maddesinin tansiyon düşürücü özelliğinin olduğu ve düz kas hücrelerinin kasılmasına yol açtığı belirtilmiştir. Goddum ve Schild

bu yeni maddeyi “P maddesi” olarak tanımlamışlardır. “P” harfi maddenin ekstraksiyon protokolü sonucu toz (Powder) olarak elde edilmesine itafen verilmiştir. Lembeck bu maddenin omuriliğin dorsal kökünde çok miktarda bulunduğunu tespit etmiş ve ağrı iletimi ile ilgili bir fonksiyonu olabileceğini öne sürmüştür. P maddesinin rolü ile ilgili daha geniş bilgiler Otsuka ve Konishi’nin çalışmalarından elde edilmiştir (Otsuka ve Konishi 1976). 1971’de Chang ve arkadaşları P maddesinin aminoasit yapısını “H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂” olarak belirlemişlerdir (Şekil 2.22) (Harrison ve Geppetti 2001).



Şekil 2.22. P maddesinin yapısı

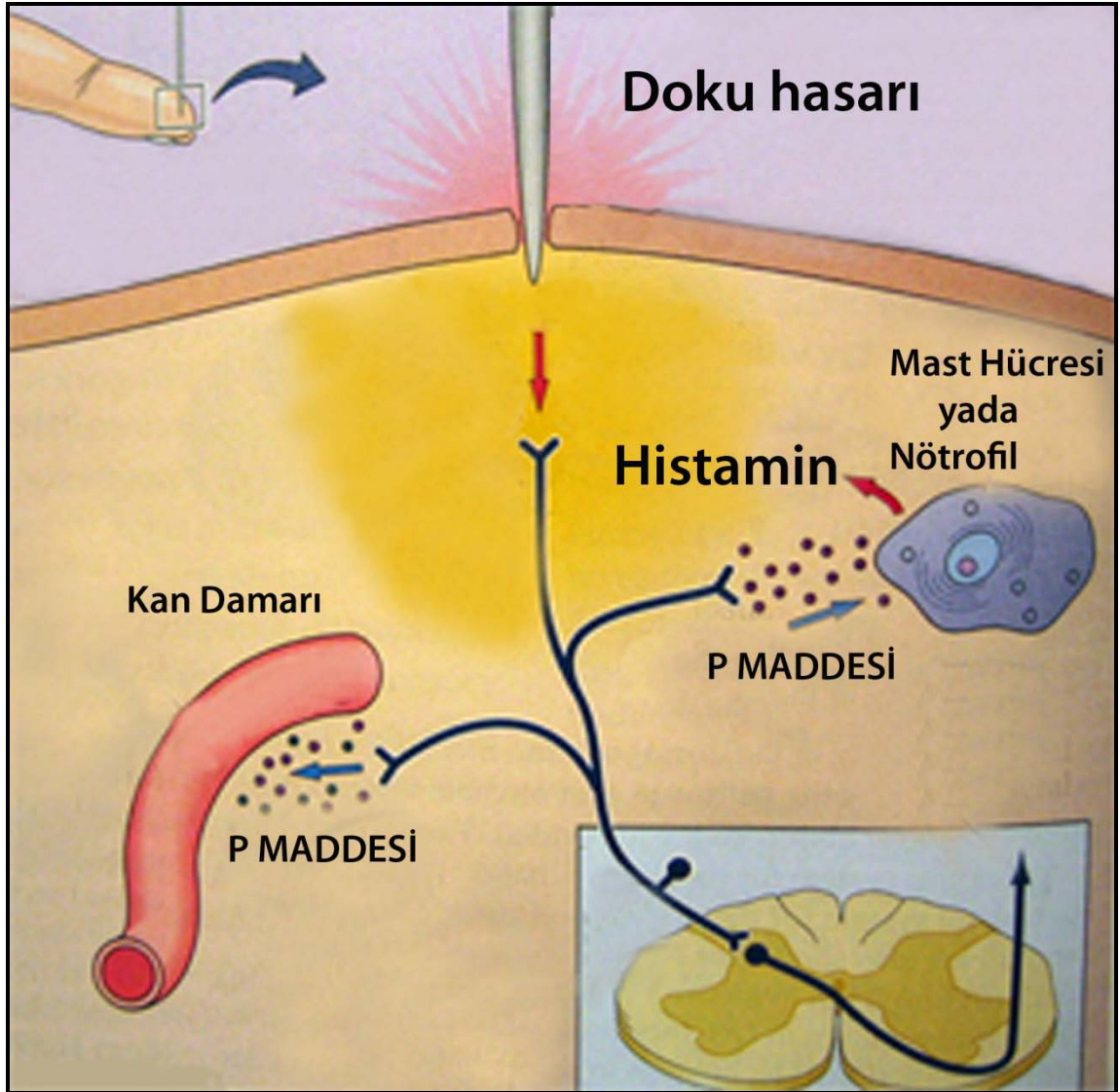
1981 yılında, P maddesi nörokinin A ve B ile birlikte, takikinin ailesinin bir üyesi olarak tanıtılmıştır. Her üçü de aynı karboksil terminal diziye sahiptir: “Phe-X-gly-Leu-Met- NH₂” (X; Phe veya Val olabilir). P maddesinin konformasyonu tamamen kullanılan çözücüye ve içinde bulunduğu lipid çevresine bağlıdır; örneğin, P maddesi metanolde beta-dönüş konformasyonuna sahipken suda düz zincir şeklinde bir yapısı vardır (Sumner vd 1990).

Yeni doğan ratlara elektrik akımı verildikten sonra omuriliklerinde P maddesinin immün reaktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Buna bağlı olarak da P maddesi ekspresyonu merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemi ile ilişkilendirilmiştir. Bugün çok iyi

bilinmektedir ki P maddesi primer afferent nöronların merkezi ve periferel uçlarından salgılanan bir nörotransmitterdir. Memelilerdeki P maddesi preprotakikinin A (PPT-A) geninden eksprese edilir. PPT-A yaygın atasal bir genin duplikasyonundan orijinlenir ve aynı zamanda nörokinin A, nöropeptit K ve nöropeptit-gama'yı da kodlar. PPTA geninin mRNA modifikasyonları sonucu alfa, beta ve gama olmak üzere üç adet P maddesi öncülü kodlanır. P maddesi öncül moleküllerinden konvertazlar olarak adlandırılan proteazlar tarafından kopartılır (Carter ve Krause 1990). Deneysel olarak duyuusal sinirlerin inaktive edilmesi var olan P maddesinin ancak %50 azalmasına yol açmıştır. Bu sonuca dayanarak P maddesinin yalnız duyuusal nöronlardan değil monositler, makrofajlar ve tümör hücreleri gibi farklı hücre tiplerinden de salındığı ileri sürülmüştür. Bu hücrelerde PTT-A geninin ve bu genin mRNA'sının varlığı gösterilerek hipotez doğrulanmıştır. Yapılan farklı çalışmalarda, hangi hücreden sentezlendiğine bağılı olarak, P maddesinin kanser ve anjiogenez üzerinde farklı roller üstlendiği gösterilmiştir

Periferel dokularda ve merkezi sinir sisteminde, nörojenik inflamasyon ve immün yanıtın oluşturulmasında, ağrının algılanmasında rol aldığı bilinmektedir (Şekil 2.23). P maddesinin ras onkogenini aktive ettiği ve reseptöre bağılandığında TAPI-duyarlı matriks metalloproteazları özellikle de TACE'i (ADAM-17) aktive ederek membrana bağılı TGF- α 'nın aktif formda salınmasına neden olur. TGF- α mitojen bağımlı protein kinaz (MAPK) yolağını aktive ederek hücre proliferasyonunu artırır (Palma vd 1993, Singh vd 2000, Friess vd 2003, Munoz vd 2004).

P maddesi kanserle en fazla ilişkilendirilen nöropeptittir. P maddesinin kanser gelişimindeki rolü ile ilgili çalışmaların sonuçları, birbirleriyle çelişkilidir. Çalışmaların bir kısmı P maddesinin tümör gelişimini hızlandırdığını, yeni damar oluşumunu arttırdığını ve bu yolla metastazı kolaylaştırdığını göstermektedir. Diğer yandan P maddesinin üretiminden sorumlu genin kaybı ise kolon kanserinin gelişimine neden olmuştur. Benzer şekilde farelerin P maddesi ile önceden tedavi edilmesinin tümöre karşı immün yanıtı arttırarak, melanoma gelişimini yavaşlattığı gösterilmiştir. Sonuçlar ne kadar çelişkili olursa olsun bu bulgular duyuusal sinirlerden salınan nöropeptitlerin kanser gelişimini etkileyeceğini göstermektedir.



Şekil 2.23. Doku yaralanmaları sonucu omuriliğin dorsal kökünden salınan P maddesi, inflamatuvar hücreleri uyarıp histamin salınımını tetikleyerek ağrının hissedilmesini sağlar.

P maddesi metabolizmasında rol oynayan pek çok enzim vardır. Ancak bunlardan en önemlileri neprilizin (NEP) ve angiotensin dönüştürücü enzim (ACE) dir. Neprilizin beyinde, omurilikte ve periferel dokularda, ACE ise plazmada P maddesini parçalar. Hem NEP hem de ACE, P maddesini $\text{Phe}^8\text{-Gly}^9$ ya da $\text{Gly}^9\text{-Leu}^{10}$ bağları arasından keser (Harrison ve Geppetti 2001).

Neprilizin enzimin diğer bir substratı β -amiloid peptittir. Bu peptiti parçalayabilen diğer bir enzim ise ADAM-10 dur (Iwata 2004). β -amiloid peptidi benzer şekilde parçaladıkları için ADAM -10'un P maddesini de parçalama potansiyeline sahip

olabileceği düşünölmüş ve yapılan çalışmalar sonucunda ADAM-10 enziminin P maddesini, neprilizin ile aynı bölgelerden kestiğı gösterilmiştir (Erin vd 2006). P maddesinin hidrolizi sonucu oluşan fragmentlerin tümör hücrelerinin büyümesini azalttığı gösterilmiştir (Heasley 2001).

P maddesi ve diğer takikininlerin kapsaisine duyarlı duyusal nöronların periferik uçlarından salınması nörojenik inflamasyona işaret eder. Duyusal nöropeptitler genellikle damar sistemi üzerine etkilidir ve arterlerin genişlemesine neden olur (Harrison ve Geppetti 2001). Fizyolojik stres durumu ile ilişkili olarak malignansinin gelişiminde merkezi sinir sisteminin potansiyel bir rolü olabileceğı düşünülmektedir. Özellikle stres ile tetiklenmiş nöroendokrin ve immün fonksiyonların kansere bağılı ölümlerde payı olduğu düşünülmektedir. Duyusal nöropatilere sahip hastalarda farklı tipte kanserlerin görülme sıklığının arttığı da bilinen bir gerçektir. Stres sonucunda salgılanan nöropeptitlerin damar üzerine yaptıkları etkiler göze alındığında, bu peptitlerin anjiogeneiz mekanizması üzerinde de etkili olabileceğine inanılmaktadır (Erin vd 2004). Daha sonra yapılan çalışmalar nöropeptitlerin in vitro koşullarda fibroblast ve endotel hücrelerinin çoğalmasını, in vivo koşullarda ise anjiogenezi uyardığını göstermektedir (Salo vd 2007).

3. MATERİYAL VE METOT

Tez kapsamında yapılan çalışmalar;

1-Hücre kültürü şartlarının belirlenmesi,

2-Radyoterapi dozunun belirlenmesi,

3-Sitotoksik etkinin belirlenmesi,

4-Endostatinin P maddesi üzerine olan etkisinin araştırılması,

5-Endostatinin ADAM-10 ve Neprilizin enzim aktiviteleri üzerine sergileyebileceği etkilerin araştırılması,

6-Enzimlerde kaydedilen aktivite değişikliğinin protein miktarlarına bağlı olup olmadığının western blot tekniği ile gösterilmesi olmak üzere altı başlık altında toplanabilir. Tüm çalışmalarda endostatin tek başına denendikten sonra 45 Gy radyoterapi uygulaması ile kombine edilerek kullanılmıştır.

3.1 Hücre Kültürü Şartlarının Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan 4T1 ve 4THMpc fare meme kanser hücre hatları Doç. Dr. Nuray Erin'den (Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi) temin edildi. Hücreler % 5 fetal bovin serum (FBS), 0.02 mM esansiyel olmayan amino asit karışımı, 1 mM sodyum-pirüvat, 4 mM L-glutamin ve 80 mg gentamisin ilave edilmiş DMEM-F12 besi yeri kullanılarak, 37 °C'de % 5 CO₂'li etüvde kültüre edildi. Petrilerdeki doluluk oranı % 80-90 olunca, hücreler, deney için optimize edilen sayılarda, steril petri veya kuyucuklu plaklara bölündü. Tüm denemelerden önce, mikoplazma tarama kiti kullanılarak (İnvivo Gen, #rep-pt2) kontaminasyonunun olup olmadığı test edildi (Sugapriya vd 2008).

3.2 Radyoterapi Dozunun belirlenmesi

4T1 ve 4THMpc hücreleri % 5 serumlu besi yeri içerisinde, 1000, 2500, 3000, 5000 ve 10000 hücre/ kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara bölündü. 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında, hücrelerin üzerindeki besi yerleri uzaklaştırıldı ve yerine %1 serum içeren besi yeri eklendi. Dört saat sonra 2 cm kalınlığındaki plate'ler Kobalt

60 (^{60}Co) teleterapi cihazı kullanılarak 100 cm uzaklıktan 5, 10, 20 ve 45 Gy ile ışınladı. Plate'ler, homojen bir etki sağlanabilmesi için suya eşdeğer özellikte bir dolgu maddesi ile hazırlanan 0,5 cm kalınlığındaki kalıplar içerisine yerleştirilerek ışınladı. Deneyler 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonrasında sonlandırıldı. Hücrelerin canlılığı aşağıda anlatılan MTT testi ile belirlendi. Deneyler 5 kez tekrarlandı.

3.3 Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

3.3.1. Endostatin dozlarının optimizasyonu ve standardizasyonu

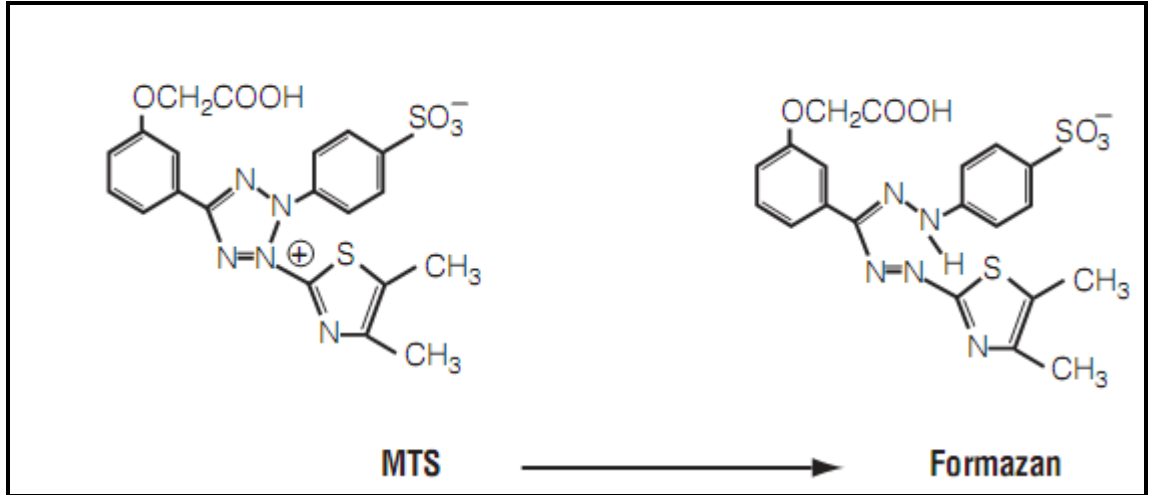
Endostatin (4 $\mu\text{g/ml}$), 17 mM sitrik asit-fosfat tamponu içerisinde çözünmüş olarak satın alındı ve 10'ar μl olacak şekilde steril ependorf tüpler içerisine bölünerek -80°C'de muhafaza edildi. Tüm deneylerde, 17 mM sitrik asit fosfat tamponu (pH:6,2) kontrol olarak kullanıldı.

Endostatin dozları, önce 1, 5x10⁻¹, 5x10⁻², 5x10⁻³, 5x10⁻⁴, 5x10⁻⁵, 5x10⁻⁶ ve 5x10⁻⁷ $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlendi (Taddei ve Chiarungi 1999). Ancak, yapılan beş bağımsız deney sonucunda, endostatinin bu dozlarda 4T1 ve 4THMpc hücreleri üzerinde sergilediği sitotoksik etkinin oldukça değişik olduğu saptandı. Kapsamlı bir literatür taraması sonucunda, tez çalışmasında kullanılan dozların, diğer çalışmalarda sitotoksik olduğu belirlenmiş olan endostatin dozlarına oranla oldukça düşük olduğu, endostatinin *in vitro* sitotoksik etkisinin hücre tipine bağlı olarak önemli ölçüde değiştiği belirlendi (Macpherson ve Sylvia 2003). Bu bilgiler ışığında belirlenen 4, 2, 1, 0,5 ve 0,25 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlar, sitotoksikite testlerinde kullanılarak deneyler tekrarlandı.

3.3.2. MTT hücre canlılık testi

Hücrelerin canlılığı hücre proliferasyon testi (Promega, G5430) kullanılarak değerlendirildi. Bu test tetrazolyum tuzu olan MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyumium ve elektron eşleştirme ajanı olarak kullanılan fenazin metosülfat (PMS)'dan oluşmaktadır. MTS, metabolik olarak aktif olan canlı hücrelerdeki dehidrogenaz enzimleri tarafından, besi yerinde

çözünebilen bir formazana dönüştürülür (Şekil 3.1) Spektrofotometre cihazında (490 nm dalga boyunda) ölçülerek elde edilen absorbans değerleri, oluşan formazan miktarına bağlı olarak değişmektedir. Bu bağlamda, elde edilen absorbans değeri canlı hücre sayısını işaret etmektedir.



Şekil 3.1. MTS ve oluşturduğu formazanın yapısı

4T1 ve 4THMpc hücreleri 1000, 2500, 3000, 5000 ve 10 000 hücre/kuyucuk olacak şekilde bölünen hücreler ile yapılan deneylerden elde edilen bulgular, MTT hücre canlılık testi için en uygun olan sayının 5000 hücre/kuyucuk olduğunu gösterdi.

Besi yeri içerisine eklenen fetal bovin serumun ilaçlarla etkileşime girme olasılığı göz önüne alınarak deneylerde öncelikle serumsuz besi yerinin kullanılması planlanmıştır. Ancak 24 saatten daha uzun inkübasyon sürelerinde hücrelerin canlı kalmadığının saptanması üzerine, tez kapsamındaki tüm deneylerde, % 1 serumlu besi yeri kullanılmasına karar verildi.

4T1 ve 4THMpc hücreleri, steril 96 kuyucuklu plaklara 5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde bölündü. Yirmidört saatlik inkübasyon sonrasında, besi yerleri uzaklaştırılarak; 4, 2, 1, 0,5 ve 0,25 $\mu\text{g/ml}$ endostatin içeren 200 μl %1 serumlu besiyerleri uygulandı. Kontrol grubu olarak kullanılacak olan iki farklı kuyuğa sırasıyla % 1 serumlu besi yeri ve 17 mM (pH:6.2) sitrik asit- fosfat tamponu eklendi. Endostatin uygulamasını takip eden dördüncü saatin sonunda, radyoterapi grubu olarak etiketlenen plaklar, 45 Gray

Cobalt⁶⁰ (Co⁶⁰) ile ışınladı. Işınlamanın ardından, deneyler 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda sonlandırıldı ve besi yerleri uzaklaştırıldı. Kuyucuklara 180 µl serumsuz besiyeri ve kit içerisinde bulunan MTS+PMS solüsyonundan karışımından 20 µl eklenerek 37°C de 2 saat inkübe edildi. Inkübasyon süresi sonunda örneklerin absorbansları, spektrofotometre cihazında 490 nm dalga boyunda okunarak kaydedildi (Haugen vd 2004).

3.3.3. Live-Dead canlılık/sitotoksite testi

MTT hücre canlılık testinden elde edilen sonuçları desteklemek amacı ile aynı dozların hücreler üzerindeki etkisi, Live-Dead testi (Molecular Probes, L3224) ile bir kez daha değerlendirildi. Bu test içerisinde yer alan kalsein-AM floresan özelliğe sahip olmayan bir bileşiktir ve canlı hücrelerdeki hücre içi esteraz aktivitesi sayesinde floresan bir madde olan kalseine dönüştürülür. Polianiyonik bir madde olan kalsein, eğer canlı hücrelerin içerisinde bulunursa, 495 nm eksitasyon ve 515 nm emisyon dalga boylarında yeşil, güçlü bir floresan ışımaya yaratır. Öte yandan test içerisindeki diğer bileşik, etidyum bromid (EthD-1) ölü olan hücrenin membranından içeri girerek nükleik asitlere bağlanmak koşulu ile, 495 nm eksitasyon ve 635 nm emisyon dalga boylarında parlak kırmızı bir ışımaya yaratmaktadır. Hücrenin canlılığı henüz sona ermemiş ise kalsein, aksine sitotoksik ajan hücreleri öldürmüş ise etidyum bromid uygun dalga boylarında ışımaya verecektir. Elde edilen bağıl floresan değerleri (RFU), kitin içerisinde verilen özel formüllere yerleştirildiğinde, canlı ve ölü hücrelerin toplam hücre sayısına oranı elde edilmektedir. Kullanılan formüller aşağıda gösterilmiştir:

$$\begin{aligned} \% \text{ Canlı Hücre} &= \frac{\text{RFU}(530)_{\text{örnek}} - \text{RFU}(530)_{\text{minimum}}}{\text{RFU}(530)_{\text{maksimum}} - \text{RFU}(530)_{\text{minimum}}} \times 100 \\ \% \text{ Ölü Hücre} &= \frac{\text{RFU}(645)_{\text{örnek}} - \text{RFU}(645)_{\text{minimum}}}{\text{RFU}(645)_{\text{maksimum}} - \text{RFU}(645)_{\text{minimum}}} \times 100 \end{aligned}$$

Hücreler 1x10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde 12 kuyucuklu plaklara bölündü. 24 saatlik inkübasyon sonrasında besi yerleri uzaklaştırılarak; 4, 2, 1, 0,5 ve 0,25 µg/ml

endostatin içeren 1 ml %1 serumlu besi yerleri uygulandı. Kontrol grubu olarak kullanılacak kuyucuklara yalnızca %1 serumlu besi yeri uygulandı. Tedaviden 4 saat sonra radyoterapi grubu olarak etiketlenen plaklar, 45 Gy ^{60}Co ile ışınladı. Işınlamanın ardından deneyler 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, sonlandırıldı. Florimetre cihazında örneklerin bağıl floresan değerleri ölçülüp kaydedildi (Yee vd 2006).

3.3.4. Tripan mavisi testi

Yukarıda belirtilen test sonuçlarını desteklemek amacı ile hücre canlılığını doğrudan mikroskopik olarak belirleyebilmeyi sağlayan tripan mavisi (0.4 % ; Hanks tuz-fosfat tamponu içerisinde) testi kullanıldı. Hücrelerin canlılığı, hücre içine tripan mavisi alınıp alınmadığına bağlı olarak gözlenen renk ile değerlendirildi. Membran hasarı olan hücreler boyayı aldıkları için mavi renkte gözlenirken canlı hücreler içerisine boyanın girmesi söz konusu olmadığından şeffaf renkte gözlendi. Canlı hücrelerin miktarı aşağıda verilen formüller ile hesaplandı.

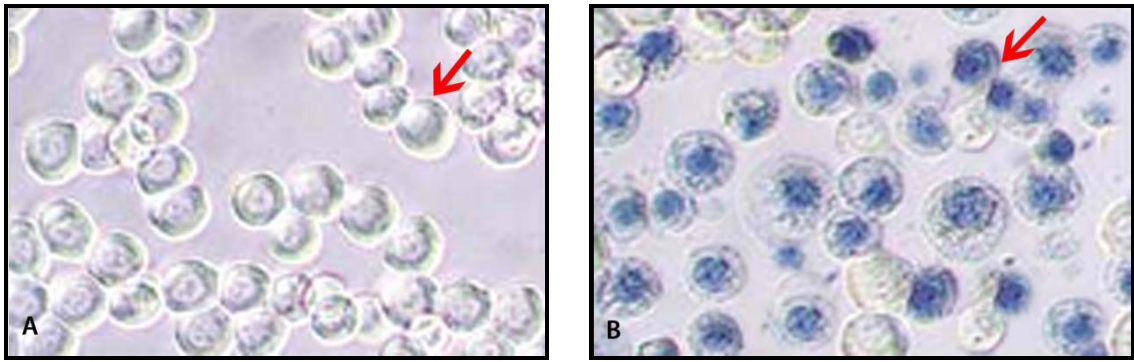
$$\text{Toplam Hücre Sayısı / ml} = (\text{Toplam Hücre Sayısı / n}) \times \text{Sulandırma Faktörü} \times 10^4$$

(n: Hemositometredeki karelerden kaç tanesinin sayıldığını göstermektedir)

$$\% \text{ Canlı Hücre} = \frac{\text{Canlı Hücre Sayısı}}{\text{Toplam Hücre Sayısı}} \times 100$$

Hücreler 1×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 12 kuyucuklu plaklara bölündü. Yirmidört saatlik inkübasyon sonrasında besi yerleri uzaklaştırılarak; 4, 2, 1, 0,5 ve 0,25 $\mu\text{g/ml}$ endostatin içeren 1 ml %1 serumlu besi yerleri uygulandı. Kontrol grubu olarak kullanılacak kuyucuklara yalnızca %1 serumlu besi yeri uygulandı. Tedaviden 4 saat sonra radyoterapi grubu olarak etiketlenen plaklar, 45 Gray ^{60}Co ile ışınladı.

Işınlamanın ardından deneyler; 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, sonlandırıldı. Besiyerleri toplanarak 1000 rpm’de 2 dakika döndürülerek çöktürüldü, dökelti uzaklaştırıldı. Kuyucukların üzerine 500µl, EDTA-Versen eklenerek hücreler plaklardan ayrıldı ve tüpteki çökeltinin üzerine eklendi. Karışım, 1500 rpm’de 2 dakika daha döndürülerek çöktürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldı ve üzerlerine 300µl Hanks-tuz solüsyonu eklenerek peletler çözöldü. Örnekler buz içerisinde alındı. Örnekler, hücre konsantrasyonuna bağlı olarak sulandırılarak, canlı ve ölü hücre sayıları ışık mikroskop altında hemositometre kullanılarak belirlendi (Lin ve Maiese 2001).



Şekil 3.2. Işık mikroskopunda canlı (A) ve ölü (B) hücrelerin görüntüsü

3.3.5. Kaspaz-3 enzim aktivitesi

Kaspaz -3 (CPP 32), “Asp-Glu-Val-Asp” amino asit dizisindeki substratları (DEVD), özgül olarak kesebilen bir enzimdir. Tez çalışmasında kullanılan Enzchek Kaspaz-3 aktivite testi (Molecular Probes, E13183), 7-amino-4-metilkumarin (AMC)’ den köken alan substratların (Z-DEVD-AMC; Z, bir benziloksikarbonil grubunu temsil etmektedir) oldukça güçsüz florimetrik ışığa verirken, aksine, bu bileşiğin kaspaz-3 enzimi tarafından parçalanması ile oluşan florimetrik ürünlerin şiddetli, mavi bir floresan ışığa yaratması esasına dayanmaktadır. Elde edilen bağıl florimetrik değerlerin kaspaz-3 enziminin aktivitesinden kaynaklandığı, kit içerisinde verilen Ac-DEVD-CHO adlı enzim inhibitörünü kullanarak kanıtlanmaktadır. Kaspaz-3 standardı olarak, kit içerisinde sunulmuş olan, AMC seri dilüsyonlar ile seyreltilerek kullanılır. Standart kullanarak, örneklerdeki AMC miktarı ve buna bağlı olarak kaspaz-3 enzim aktivitesi hakkında değerlendirme yapılabilir.

Kaspaz-3 enzim aktivitesinin belirlenebilmesi için hücreler, 1×10^6 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu plaklara bölündü. 24 saatlik inkübasyon sonrasında besi yerleri uzaklaştırılarak, sitotoksikite testlerinde etkili olduğu saptanan 4 µg/ml endostatin içeren %1 serumlu besiyerleri (2 ml) uygulandı. Kontrol grubu olarak kullanılacak kuyucuklara yalnızca %1 serumlu besi yeri (2 ml) uygulandı. Tedaviden 4 saat sonra, radyoterapi grubu olarak etiketlenen plaklar, 45 Gy ^{60}Co kaynağı ile ışınıldı. Diğer testlerde endostatin, 72 saatlik inkübasyon süresinde etkili bulunduğu için, 72 saat sonunda deneyler sonlandırıldı. Besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine 500 µl EDTA-Versen eklenerek hücreler yapışmış halde bulundukları plaklardan ayrıldı. Toplanan hücreler 1500 rpm'de 2 dakika döndürülerek çöktürüldü. Süpernatant atıldı ve pelet üzerine 500 µl PBS eklendi ve bu kez hücreler 5000 rpm'de 5 dakika döndürülerek çöktürüldü. Süpernatant atıldı ve pelet üzerine 100 µl kit içerisinde bulunan 1X liziz tamponu eklendi. Optimizasyon çalışmaları sırasında hücreler sonifikasyon metodu kullanılarak parçalanmıştı ancak bu tekniğin enzim aktivitesini değiştirdiği düşünüldüğü için, bunun yerine farklı bir yöntem olan etanol-kuru buz tekniği kullanılarak hücreler parçalandı. Bu teknikte; hücreler üç kez, 5 dakika ara ile etanol-kuru buz içerisinde bekletilip oda ısısına alındı ve son uygulamanın ardından 5000 rpm'de 5 dakika döndürülerek çöktürüldü. Enzim aktivitesi tayini için süpernatantlardaki toplam protein miktarı, Bradford esasına dayanan protein tespit kiti kullanılarak (Bio-rad, 1-800-424-6723) belirlendi. Kuyucuklara 100 µg örnek eklendi. Test protokolü takip edilerek son basmakta, florimetre cihazında 342 nm eksitasyon ve 441 nm emisyon olacak şekilde ayarlanan dalga boylarında bağlı floresan miktarları ölçülerek kaydedildi (Lu vd 2008).

3.4. Endostatin'in P Maddesi Üzerine Etkileri

3.4.1. P maddesi ölçümleri için optimizasyon

Besi yerlerine salınan ve hücre içinde bulunan P maddesi miktarlarının ölçülmesi için hücreler 100x20 mm ebatındaki steril petrilere, 3×10^6 hücre/10ml olacak şekilde bölündü. Hücrelerin petri kabına yapışıp yayılmaları beklendi (ortalama 5-6 saat). Hücrelerde yapışma ve yayılma süresince, tespit edilebilecek düzeyde P maddesi olup

olmadığını belirlemek amacıyla, yayılma süresi biter bitmez birinci petri kabındaki besi yerleri alındı ve hücreler 1 ml fosfat-tuz tamponu (PBS) ile kazınarak toplandı. Hücreler 1500 rpm’de 2 dakika döndürülerek çöktürüldü ve üzerlerindeki PBS uzaklaştırıldı. Bu petri kabı sıfırıncı zaman örneği olarak adlandırıldı. Bunu takiben diğer dokuz petri kabındaki örnekler altışar saat ara ile aynı şekilde toplandı.

Yapılan ön denemelerde P maddesi ölçümü için besi yerlerinin Oasis-ekstraksiyon (ayırma) kolunundan geçirilip yoğunlaştırılması gerektiği saptanmıştı. Bu nedenle besi yerleri ve hücreler aşağıda verilen protokoller izlenerek P maddesi miktarı ölçümü için hazırlandı. Bu aşamaya getirilen örnekler hemen çalışılmayacaksa sıvı azotta dondurularak -80 °C’de saklandı.

3.4.2. P maddesi ölçümleri için besi yeri ve hücrelerin hazırlanması

3.4.2.1. Oasis protein ekstraksiyon protokolü (besi yerine salınan P maddesi miktarının ölçülebilmesi için)

1 ml’lik kolonlar (Oasis, 186000383) ekstraksiyon aletine yerleştirildi. 1 ml metanol hızlı bir şekilde kolondan geçirildi. Ardından, 1 ml steril ddH₂O (iki kere distile edilmiş su) yine hızlı bir şekilde kolondan geçirildi. Besi yeri örneklerinden 500 µl alınıp 500 µl asetik asitle karıştırıldı. Toplam hacmi 1 ml olan örnekler, kolondan yavaş bir şekilde ve hemen ardından 1 ml steril ddH₂O (iki kere distile edilmiş su) hızlı bir şekilde kolonlardan geçirildi. Örneklerin toplanması için ekstraksiyon aletine temiz ependorf tüpleri yerleştirildi ve kolondan 1 ml elüsyon solusyonu (6 ml Asetonitril + 4 ml ddH₂O + 40 µl TFA) geçirilerek kolona bağlı proteinlerin çözünmesi sağlandı. Toplanan örneklerden TFA ve asetonitrilin uzaklaştırılması için örnekler hızlı kurutma (speed-vac) cihazında kurutuldu. Sıvı kısım uçurularak proteinlerin toz halde ependorf tüplerinin dip kısmına çökmesi sağlandı. Örnekler P maddesi EIA kiti içerisinde bulunan 100 µl 1X EIA tamponu içerisinde çözülerek, 1 gece +4 ° C’de bekletildi.

3.4.2.2. Hücre içerisinde bulunan P maddesi miktarının saptanması

Yukarıda anlatıldığı şekilde PBS (fosfat tamponu) ile toplanan hücreleri parçalamak amacıyla ile üzerlerine 500 µl % 2'lik asetik asit eklenerek, ısı ile bloklama (Thermo Block) cihazında +95°C'd e 1 saat bekletildi. Örnekler 7000 rpm'de 2 dakika döndürülerek çöktürüldü. Süpernatantlar temiz ependorf tüplere aktarıldı ve hızlı kurutma (speed-vac) cihazında kurutuldu. Örnekler P maddesi EIA kiti içerisinde bulunan 100 µl 1X EIA tamponu içerisinde çözülerek 1 gece +4° C'de bekletildi. Her örnekten 50 µl alınarak, P maddesi ELISA (Cayman, 583751) kiti ile çalışıldı.

3.4.3. P maddesi ölçüm protokolü

P maddesi ölçümleri için kolondan geçirilen her örnekten 50 µl alınarak Cayman Marka P maddesi EIA kiti ile çalışıldı. Kit protokolüne göre; kit içerisinde bulunan özel antikor kaplı 96 kuyucuklu plaklara, her örnekten 50 µl eklendi. Örneklerin üzerine 50 µl belirteç ve 50 µl anti serum eklenerek, plakların üzeri kapatıldı ve +4 ° C'de 1 gece inkübe edildi. Bütün kuyucuklar, kit içindeki yıkama tamponu ile 4 kez yıkandıktan sonra her kuyucuğun üzerine, kit içerisindeki Elman solusyonundan 200 µl eklenerek karanlıkta 2 saat inkübe edildi. Örneklerin absorbsansları, spektrofotometre cihazında 412 nm dalga boyunda ölçüldü. Kalan örnekler 50'şer µl olacak şekilde ependorf tüplere aktararak - 80° C'de saklandı.

3.4.4. Besi yerinine salınan ve hücre içinde bulunan P maddesi miktarlarının tespiti

Endostatinin tek başına ve radyoterapi ile kombine olarak besi yerine salınan ve hücre içinde bulunan P maddesi miktarları üzerine etkisinin ölçülmesi için, hücreler steril küçük petrilere 3×10^6 hücre/ 10 ml olacak şekilde % 5'lik serumlu besi yeri ile bölündü. Hücrelerin yapışmalarını ve yayılmalarını takiben, kontrol olarak kullanılacak petri kaplarına sadece %1 serumlu besi yeri diğer petri kaplarına ise 4 µg/ml endostatin içeren % 1 serumlu besi yerleri uygulandı. Optimizasyon çalışmalarında, P maddesi 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda tespit edilebildiği için, bu süre sonunda deneyler

sonlandırıldı ve örnekler Cayman Marka P maddesi EIA kit protokolü izlenerek çalışıldı (Ursino vd 2009).

3.5 ADAM 10 ve Neprilizin Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

3.5.1. ADAM 10 enzim aktivitesinin belirlenmesi

ADAM-10 enzim aktivitesi, α -sekretaz aktivite ölçüm kiti (Anaspec,) kullanılarak değerlendirildi. Bu enzimin aktivitesi ile P maddesi miktarını ilişkilendirmeyi hedeflediğimiz için, P maddesi optimizasyon deneylerinde tespit edilen hücre sayısı (3×10^6 hücre/ 10 ml %1 serumlu besi yeri), doz (4 μ g/ml endostatin) ve inkübasyon süresinde (24 saat) enzim aktivitesinin belirlenmesine karar verildi. Hücreler 3×10^6 hücre/ 10 ml %1 serumlu besi yeri olacak şekilde steril küçük petri kaplarına bölündü. Yapışma ve yayılmalarını takiben, besi yerleri uzaklaştırıldı ve kontrol grubu olarak kullanılacak petri kaplarına %1 serumlu taze besiyeri (1,5 ml) ve diğer petri kaplarına 4 μ g/ml endostatin içeren % 1 serumlu besiyeri (1,5 ml) eklendi. İlaç uygulamalarından 4 saat sonra radyoterapi olarak etiketlenen petri kapları 45 Gray ^{60}Co kaynağı ile ışınladı. Hücreler 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda besi yerleri uzaklaştırılarak üzerlerine 1 ml PBS eklenerek kaldırılan hücreler, 1500 rpm'de 2 dakika döndürülerek çöktürüldü ve dökelti uzaklaştırıldı. Pelet üzerine kit içerisindeki liziz tamponundan (% 0,1 triton X-100) 200 μ l eklendi. Hücreler +4 °C'de 10 dakika bekletildi. Süre sonunda örnekler 5000 rpm'de 10 dakika döndürülerek çöktürüldü. Süpernatantlar, ependorf tüplere aktarıldı. Enzim aktivitesi tayini için süpernatantlardaki toplam protein miktarı, Bradford esasına dayanan protein tespit kiti kullanılarak (Bio-rad, 1-800-424-6723) belirlendi. Tüm örnekler için, 100 μ g/ml protein içeren hacim hesaplandı. Hemen çalışılmayacaksa örnekler 50 μ l olacak şekilde ependorflara bölünerek -80 °C'de saklandı. Her örnekten, 100 μ g/ml protein içerdiği saptanan hacim kadar alınıp reaksiyon tamponu eklenerek 50 μ l'ye tamamlandı ve siyah opak 96 kuyucuklu-plaklara pipetlendi. Kit protokolü gereğince, üzerlerine kit içerisinde bulunan reaksiyon tamponundan 50 μ l (seçilen bazı kuyucuklara 10 μ M inhibitör içerecek şekilde hazırlanan 50 μ l reaksiyon tamponu) eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Süre sonunda üzerlerine 50 μ l substrat eklenerek karanlıkta 30 ile

60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 50 µl reaksiyon-sonlandırma solüsyonu eklenerek, eksitasyon 495 nm ve emisyon 510 nm dalga boylarında florimetrik değerler ölçülerek kaydedildi (Tanahashi ve Yoshioka 2008).

3.5.2. Neprilizin enzim aktivitesinin belirlenmesi

Neprilizin enzim aktivitesi de ADAM 10 enzim aktivitesinde olduğu gibi P maddesi miktarı ile ilişkili olduğu için, P maddesi optimizasyon deneylerinde tespit edilen hücre sayısı (3×10^6 hücre/ 10 ml %1 serumlu besi yeri) doz (4 µg/ml endostatin) ve inkübasyon süresinde (24 saat) Neprilizin enzim aktivitesinin belirlenmesine karar verildi. Hücreler 3×10^6 hücre/10 ml %1 serumlu besi yeri olacak şekilde steril küçük petri kaplarına bölündü. Yapışma ve yayılmalarını takiben, besi yerleri uzaklaştırıldı ve kontrol grubu olarak kullanılacak petri kaplarına %1 serumlu taze besiyeri (1,5 ml) ve diğer petri kaplarına 4 µg/ml endostatin içeren % 1 serumlu besiyeri (1,5 ml) eklendi. İlaç uygulamalarından 4 saat sonra, radyoterapi olarak etiketlenen petri kapları 45 Gray ^{60}Co kaynağı ile ışınıldı. Hücreler 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda besiyerleri uzaklaştırılarak üzerlerine 1 ml PBS eklenerek hücre kazıyıcısı yardımı ile dikkatli bir şekilde petrilere ayrılan hücreler, ependorf tüplere alınarak 1500 rpm’de 2 dakika döndürülerek çöktürüldü. Süpernatantlar temiz ependorf tüplere aktarıldı. Enzim aktivitesi tayini için süpernatantlardaki toplam protein miktarı, Bradford esasına dayanan protein tespit kiti kullanılarak (Bio-rad, 1-800-424-6723) belirlendi. Tüm örnekler için, 100 µg/ml protein içeren hacim hesaplandı. Hemen çalışılmayacaksa örnekler 50 µl olacak şekilde ependorflara bölünerek -80 °C’de saklandı.

Her örnekten, 100 µg/ml protein içerecek kadar hacim alınıp ependorf tüplere aktarıldı. Tüplerin üzerine 250 50 mM Tris -HCl (pH:7.4) eklendi. Örnekler sonifikasyon yöntemi ile parçalandı ve 4°C’de 14 000 rpm’de 10 dakika döndürülerek çöktürüldü. Fosforamidon adlı inhibitör içeren ve içermeyen iki farklı substrat solüsyonu hazırlandı (Solusyon 1: 1 mM N-Dansyl-D-Ala-Gly-p-nitro-Phe-Gly (DAGPNG) + 10 µM enalapril + 50 mM Tris-HCl, Solusyon 2: 1 mM DAGPNG + 10 µM enalapril + 50 mM Tris-Hcl+ 10 mM fosforamidon). Hazırlanan substrat solusyonları 37°C’ de 10 dakika bekletildi. 50 µl süpernatant ve 100 µl substrat

solusyonu, ayrı ayrı ependorflara pipetlendi ve 37 °C' de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüpler 90°C su banyosunda kaynatılarak reaksiyon sonlan dırıldı. Her bir örnek 1/10 oranında Tris-HCl ile sulandırıldı ve 10 000 rpm'de 5 dakika çevrildi. Süpernatantlar'dan 100 µl alınarak okumanın yapılacağı siyah, opak plaklara pipetlendi. Eksitasyon için 342 ve emisyon için 562 nm dalga boylarında filtreler kullanılarak flourimetrik ölçümler yapıldı (Carpenter ve Stenmark 2001).

3.6 Endostatin'in ADAM 10 ve Neprilizin enzim aktiviteleri üzerine etkisinin Western-Blot ile gösterilmesi

3.6.1. Western-blot deneylerinde kullanılan solüsyonların içerikleri

Western blot deneylerin kullanılan tüm kimyasallar için Sigma markası tercih edilmiştir.

i) Liziz tampon

150 mM NaCl, % 1 lik Triton-X, 50 mM Tris baz ve 2µl/ml proteaz inhibitör kokteyli pH:8 olacak şekilde istenilen hacimde hazırlandı.

ii) 10 X Tris baz solüsyonu (TBS)

24.2 gr tris baz ve 80 gr NaCl 800 ml distile suda çözülür, pH 7.6'ya ayarlanır ve hacim distile su ile 1 l'ye tamamlandı.

iii) Tris baz solüsyonu-tween 20 (TBST)

50 ml 10X TBS, 450 ml distile su, 500 µl Tween 20 karıştırılarak hazırlandı.

iv) 2X Sodyum dodesil sülfat (SDS) yükleme tamponu

% 10 gliserol,% 5 merkaptetanol, % 3 SDS ve % 0.02 bromfenolmavisi pH: 6.8 olan 62,5 mM tris baz solüsyonu ile karıştırıldı. 1 ml ependorf tüplere bölünerek -20°C' de saklandı.

v) 4X Alt jel hazırlama tamponu

18.7 gr tris baz, 80 ml distile su ile karıştırıldı. % 20'lik SDS solüsyonundan 2 ml eklendi, pH:8.8 olacak şekilde ayarlandı ve hacim distile su ile 100 ml ye tamamlandı.

v) 4X Üst jel hazırlama tamponu

6 gr tris baz, 65 ml distile su ile karıştırıldı. % 20'lik SDS solüsyonundan 2 ml eklendi, pH: 6,8 olacak şekilde ayarlandı ve hacim distile su ile 100 ml ye tamamlandı.

vi) 10X yürütme tamponu

30 gr tris baz, 144 gr glisin 600 ml distile suda çözüldü ve hacim yine distile su ile 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan bu solüsyon stok olarak saklandı. Kullanılırken stok solüsyon 10 kez seyreltilerek içerisinde 5 ml % 20'lik SDS eklendi.

vii) Transfer tamponu

2.1 gr tris-baz, 10.08 gr glisin, 0.7 gr SDS, 140 ml metanol karıştırıldı. 500 ml distile su ile çözülerek hacim 700 ml'ye tamamlandı.

viii) % 5'lik süt tozu

5 gr yağsız süt tozu 100 ml 1X TBS'de çözüldü.

ix) % 10'luk Amonyum per sülfat (APS)

10 gr APS 100 ml distile suda çözüldü.

3.6.2. 4T1 ve 4THMpc hücrelerinin western-blot için hazırlanması

4T1 ve 4THMpc hücreleri 3×10^6 hücre/ 10 ml %1 serumlu besiyeri olacak şekilde steril küçük petri kaplarına bölündü. Yapışma ve yayılmalarını takiben, besiyerleri uzaklaştırıldı ve kontrol grubu olarak kullanılacak petri kaplarına %1 serumlu taze besiyeri (1,5 ml) ve diğer petri kaplarına 4 µg/ml endostatin içeren, % 1 serumlu besiyeri (1,5 ml) eklendi. İlaç uygulamalarından 4 saat sonra radyoterapi olarak etiketlenen petri kapları 45 Gy ^{60}Co kaynağı ile ışınladı. Hücreler 24 saat inkübe edildi.

Her iki enzimde membrana bağlı enzimler olduğu için, inkübasyon süresi sonunda hücreler üzerine, enzimlerin çözülebilir hale gelmelerini sağlayacak, triton X-100 içeren liziz tamponundan 300 µl eklenerek hücreler kaldırıldı. Ependorflara alınan hücreler buz içerisinde yarım saat inkübe edildi. Daha sonra örnekler 12 000 rpm'de 20 dakika döndürülerek çöktürüldü. Örneklerdeki protein miktarları, Bradford esasına dayanan protein tespit kiti kullanılarak (Bio-rad, 1-800-424-6723) belirlendi. Western-blot deneylerinden elde edilecek bantların karşılaştırılabilmesi için, jel kuyucuklarına yüklenen örneklerin eşit miktarda protein içermesi gerekmektedir. Bu nedenle, örneklerden her birinin 25 µg protein içeren miktarları hesaplanarak, son hacimleri 20 µl olacak şekilde 2X SDS örnek yükleme tamponlarıyla karıştırıldı. Örnekler 95 °C'de 5 dakika kaynatılarak, jele yüklemeye hazır hale getirildi.

3.6.3. Jellerin hazırlanması

Jellerin döküleceği camlar alkol ile silinerek temizlendi ve jel dökme aparatına yerleştirildi. Her iki enzim içinde % 4'lük ayırma jeli (üst jel) ve %1 0'luk yürütme jeli (alt jel) kullanıldı.

i) % 10'luk Alt jelin hazırlanması

2.5 ml distile su, 1.25 ml 4X Alt jel hazırlama tamponu, 1.25 ml %40 akrilamid-bisakrilamid, 30 µl %10'luk APS, 5 µl Tetraetilmetilendiamid (TEMED) karıştırıldı.

ii) % 4'lük Üst jelin hazırlanması

1,625 ml distile su, 625 µl 4X Üst jel hazırlama tamponu, 250 µl %40 akrilamid - bisakrilamid, 15 µl %10'luk APS, 5 µl Tetraetilmetilendiamid (TEMED) karıştırıldı.

Jeller 15 ml'lik falkonlarda hazırlandı ve ilk önce alt jel, içerisine TEMED dökülür dökülmez, camlar arasına pipetlendi. Üst yüzeyin düzgün olması için jelin üst kısmına su ile doyurulmuş bütanol eklendi. Alt jel polimerize olmadan üst jelin içerisine TEMED eklenmedi. Alt jel polimerize olduktan hemen sonra, bütanol uzaklaştırıldı ve üst jele TEMED eklenerek alt jelin üzerine pipetlendi ve polimerize olması beklendi.

3.6.4 Örneklerin jele yüklenmesi ve SDS-PAGE

Jeller polimerize olduktan sonra, toplam hacmi 20 µl olan 2X SDS yükleme tamponuyla karıştırılan örnekler ve 15 µl m oleküler ağırlık standartları (161-0324 BioRad, Kaleidoscope standarts) jel kuyucuklarına yüklendi. Jeller, elektroforez tankına yerleştirildi ve tank 1X yürütme tamponuyla doldurularak, sistem 20 mA'de çalıştırıldı. Örnekler alt jele geçer geçmez, akım 40 mA'e yükseltildi. Yükleme tamponu jelin en altına ulaştığında sistem kapatıldı.

SDS-PAGE devam ederken membrana transfer için uygun boyutlarda kesilmiş PVDF membranlar, transferde kullanılacak watman kagıtları ve süngerler, transfer tamponunda ıslatıldı. Sistem kapatıldıktan sonra jeller kurutma kagıtları yardımıyla camlardan ayrıldı. Islatılmış süngerlerden biri transfer aparatına yerleştirildi. Üzerine kuru watman kagıdı yardımıyla alınmış jel (jelin üst yüzü yukarı bakacak şekilde) yerleştirildi. Üzerine sırasıyla ıslatılmış membran, ıslatılmış watman ve ıslatılmış sünger koyularak

aparat kapatıldı. Transfer tamponuyla doldurulan tank içerisine yerleştirilerek, 40 V'da 2 saat elektroforez uygulanarak, membrana transfer gerçekleştirildi. Transfer işlemi bitince, sistem kapatıldı ve membran % 5'lik süt tozuna alınarak +4° C'de bir gece bekletildi (Yalçın vd 2008).

3.6.5. Antikorlarla işaretleme

Süt tozundan alınan membranlar 4 kez, TBST ile 15 dakika, yıkandı. Bu arada primer antikor solüsyonları hazırlandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra membranlar primer antikor (ADAM 10 için Milipor AB19026 katalog numaralı tavşan poliklonal Anti-ADAM 10.C bölgesi 1:1000 ve Neprilizin için Milipor AB5458 katalog numaralı tavşan poliklonal Anti-neprilizin 1:2000 oranında seyreltilerek) ile bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda membranlar TBST ile 15 dakika aralıklarla, 4 kez yıkandı. Yıkama sonunda membran ADAM 10 için 1:10000 ve neprilizin için 1:20000 oranında seyreltilerek hazırlanan sekonder antikor (SANTA CRUZ, hrp –bağlı immünoglobulin G) ile 1 saat süresince inkübe edildi. İnkübasyon sonunda membranlar son kez TBST ile 15' şer dakika aralıklar ile 4 kez yıkandı.

3.6.6. Membranın görüntülenmesi

Membranlar **ECL plus western blot görüntüleme kiti** (Amersham, Bioscience RPN2132) ile görünür hale getirilip, Sigma C4729-1EA katalog numaralı Kodak 20.3x25.4 8x10 inc. biomax kaset ve Sigma Z363006-50 katalog numaralı Kodak 20.3x25.4 8x10 inc. biomax bilimsel görüntüleme filmi kullanılarak fotoğraflandı.

3.7 İstatistiksel Analiz

Sitotoksosite testlerinden elde edilen deney sonuçlarındaki kontrol ve diğer gruplar arasındaki farklılık Graph-pad InStat istatistik programında, Tek Yönlü Anova Testi ve ardından Dunnet Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak değerlendirildi. Enzim aktiviteleri ve P maddesi miktarları ile ilgili deneylerden elde edilen veriler ise Graph-pad InStat istatistik programında, Tek Yönlü Anova Testi ve Mann-Whitney Testi

kullanılarak değerlendirildi. Tüm veriler ortalama $\pm$ SEM değerleri halinde, Sigma Plot 10.0 programı kullanarak grafik haline getirildi.

4. BULGULAR

4.1 Radyoterapinin 4T1 ve 4THMpc Hücre Hatları Üzerine Etkisi

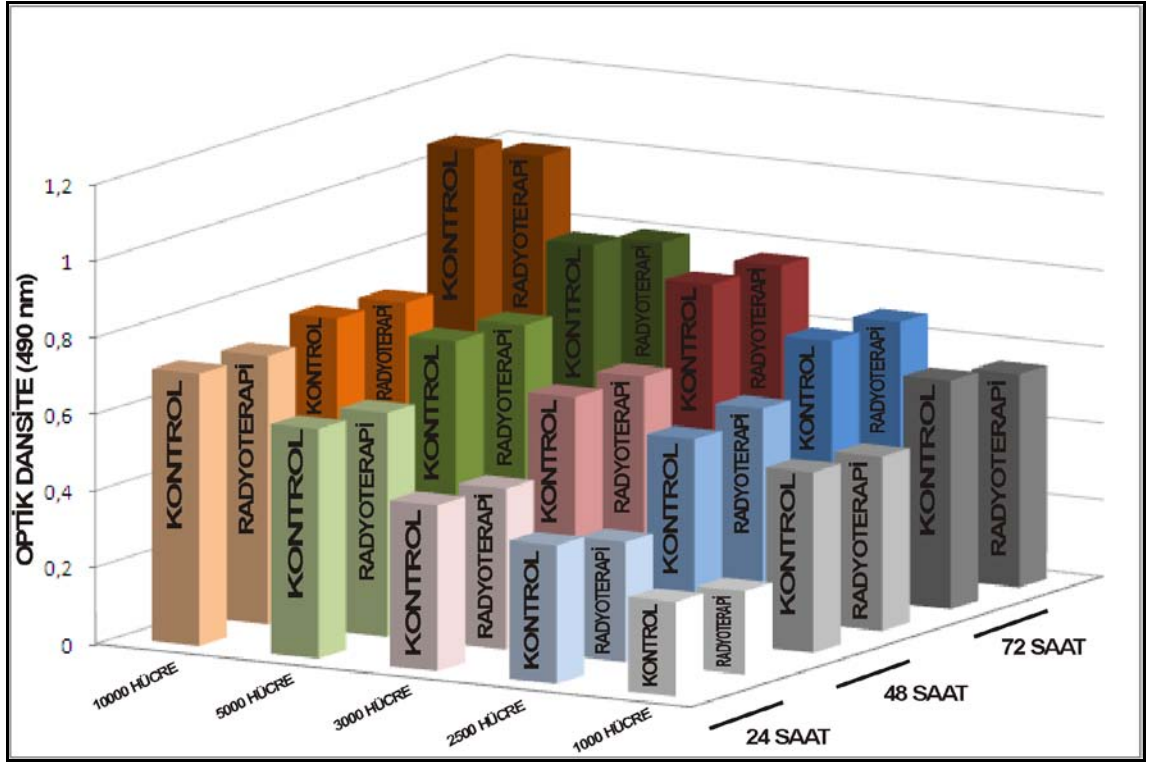
Endostatin'in radyoterapi ile kombine etkisinin araştırılabilmesi için, öncelikle radyoterapinin etkili dozu saptandı.

4.1.1. Radyoterapinin 4T1 hücre hattı üzerine etkisi

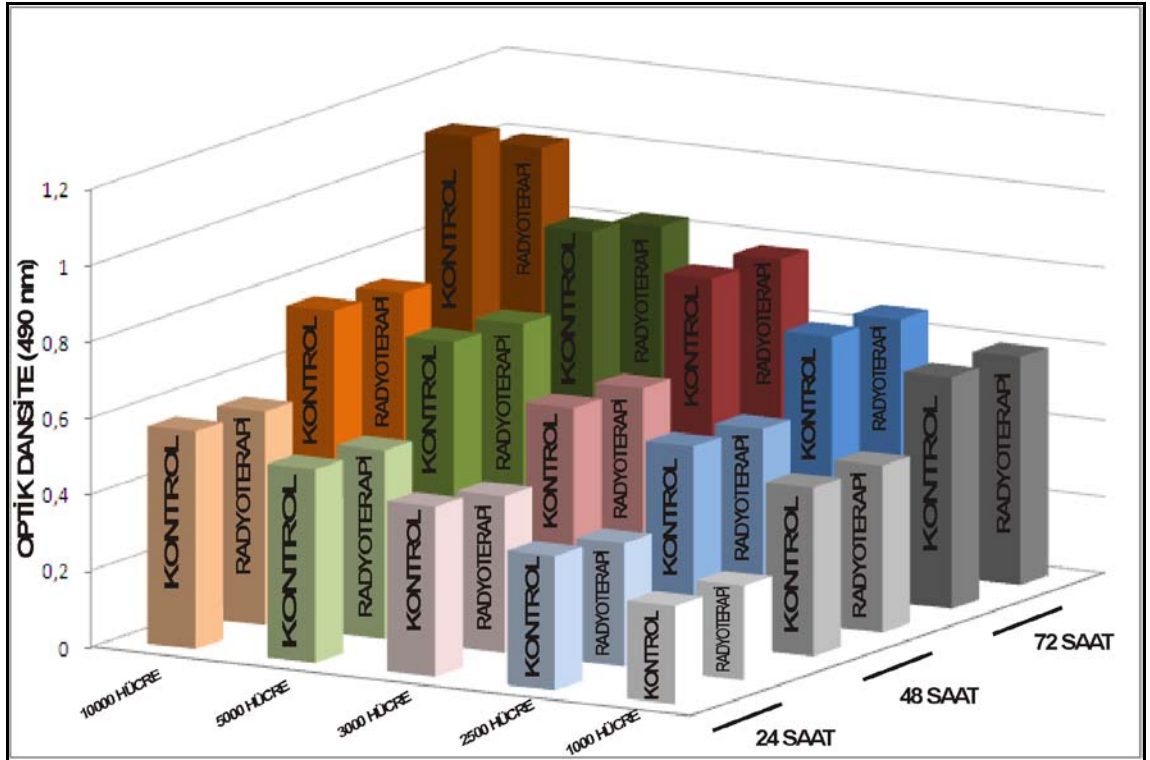
4.1.1.1. Farklı dozlarda radyoterapi uygulamasının 4T1 hücre hattı üzerine etkisi

Farklı hücre sayılarıyla (1000, 2500, 3000, 5000 ve 10 000) yapılan MTT hücre canlılık testi sonuçlarına göre; 5, 10 ve 20 Gy radyoterapi uygulamalarının 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonrasında, 4T1 hücrelerinin canlılıkları üzerine istatistiksel anlamda önemli kabul edilebilecek bir etki göstermediği saptandı. Dört bağımsız deneyden elde edilen absorbans değerlerinin ortalamaları ile bu ortalamaların standart hataları aşağıda çizelge halinde sunulmuştur (Çizelge 4.1). (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3).

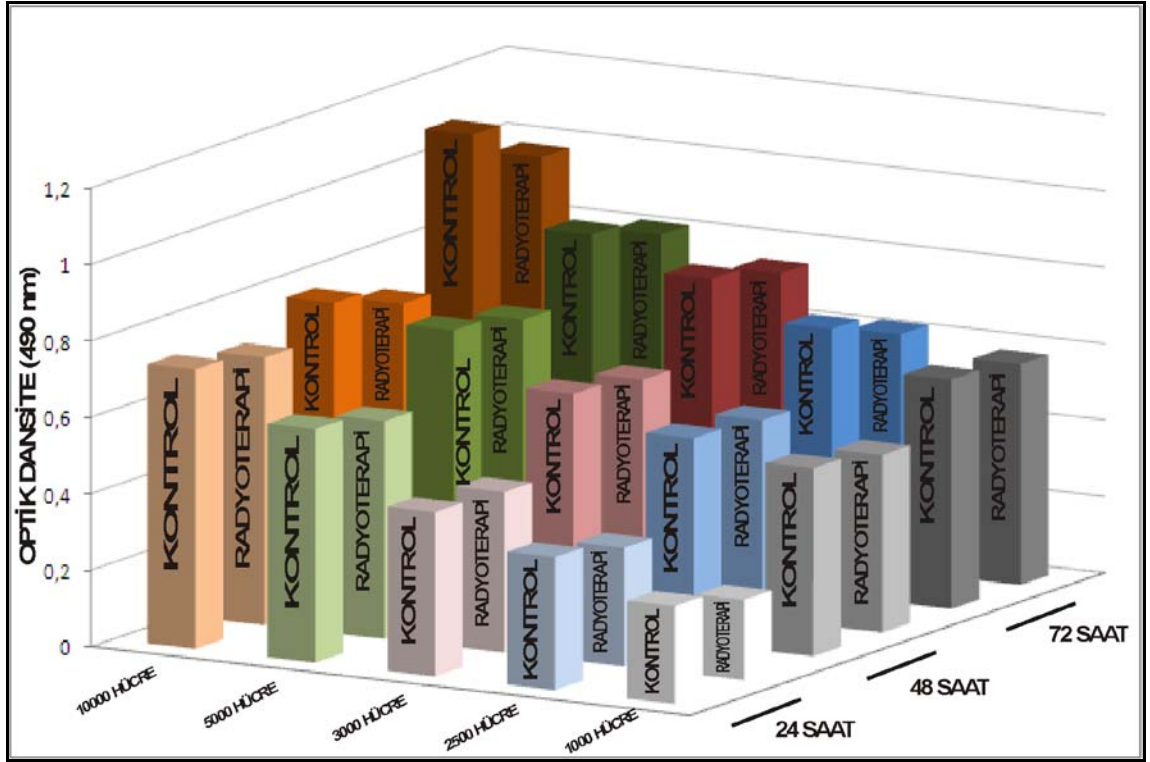
45 Gy radyoterapi uygulamasını takip eden 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonrasında, 4T1 hücrelerinin canlılıkları üzerine istatistiksel anlamda önemli kabul edilebilecek (*; $p<0.05$, **; $p<0.01$) bir etki gösterdi. İnkübasyon süreleri sonunda, kontrol gruplarındaki hücre sayılarının artışı, görülen etkinin radyoterapiden kaynaklandığını doğrulamaktadır. Her üç inkübasyon süresinde de 45 Gy radyoterapi uygulamasının etkisi hücre sayısına bağlı olarak değişmektedir ve en çok etkiyi 5000 hücre ve 10000 hücre üzerinde göstermiştir. Yapılan tüm tekrarlarında, 45 Gy radyoterapi uygulaması anlamlı derecede etkili bulunduğu için, tez kapsamında gerçekleştirilen tüm deneylerde, 45 Gy radyoterapi uygulamasının kullanılmasına karar verildi. Elde edilen veriler aşağıdaki grafiklerde sunulmuştur (Şekil 4.4)



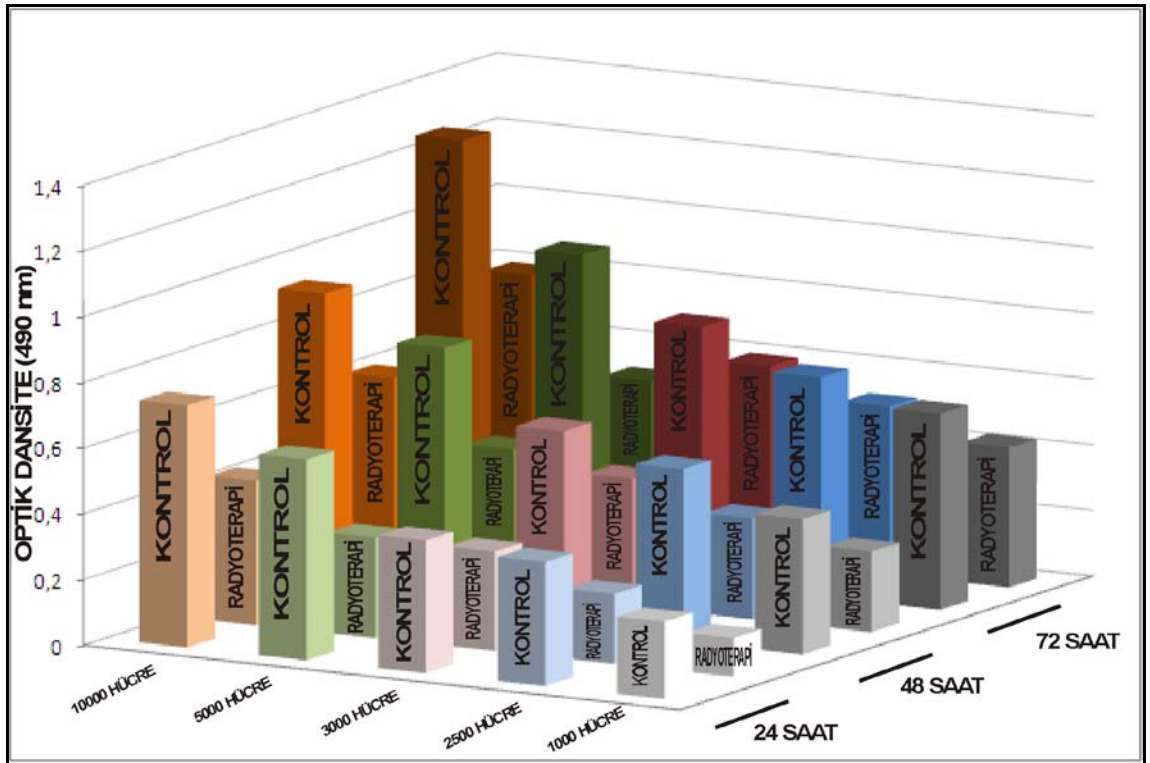
Şekil 4.1. 5 Gray radyoterapinin 4T1 hücre hattı üzerine gösterdiği etki



Şekil 4.2. 10 Gray radyoterapinin 4T1 hücre hattı üzerine gösterdiği etki



Şekil 4.3. 20 Gray radyoterapinin 4T1 hücre hattı üzerine gösterdiği etki



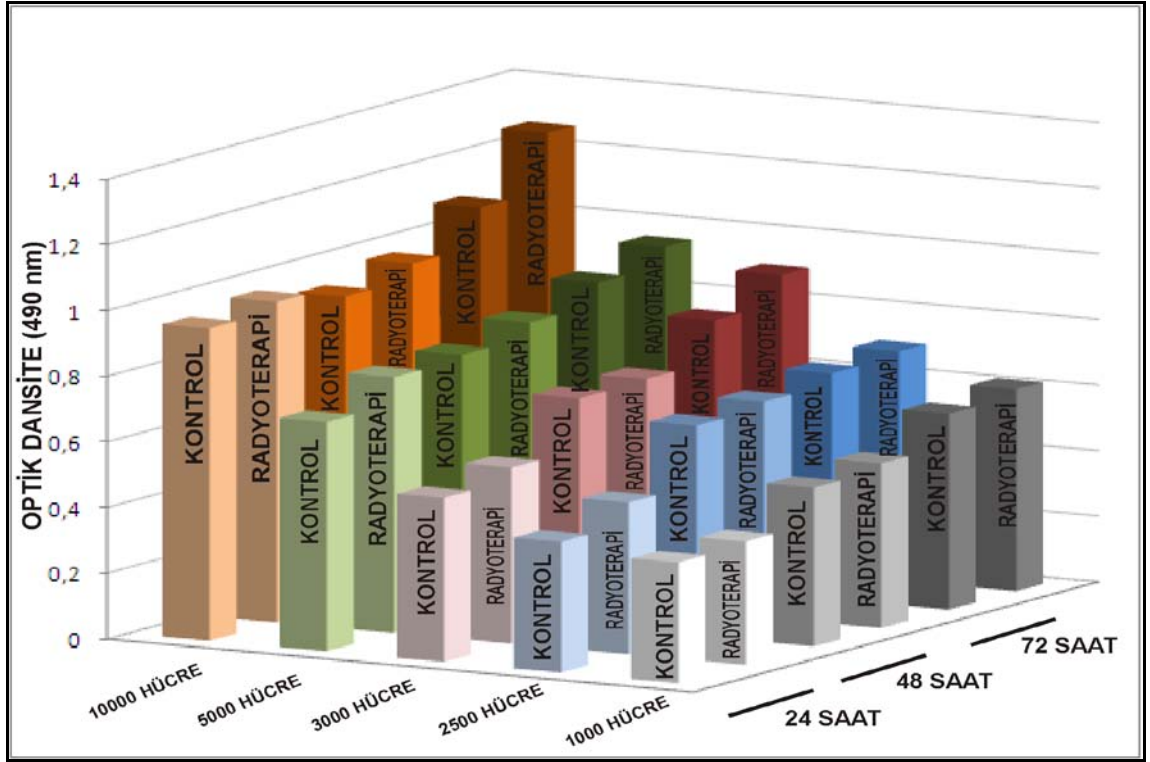
Şekil 4.4. 45 Gray radyoterapinin 4T1 hücre hattı üzerine gösterdiği etki

4.1.2 Radyoterapinin 4THMpc Hücre Hattı Üzerine Etkisi

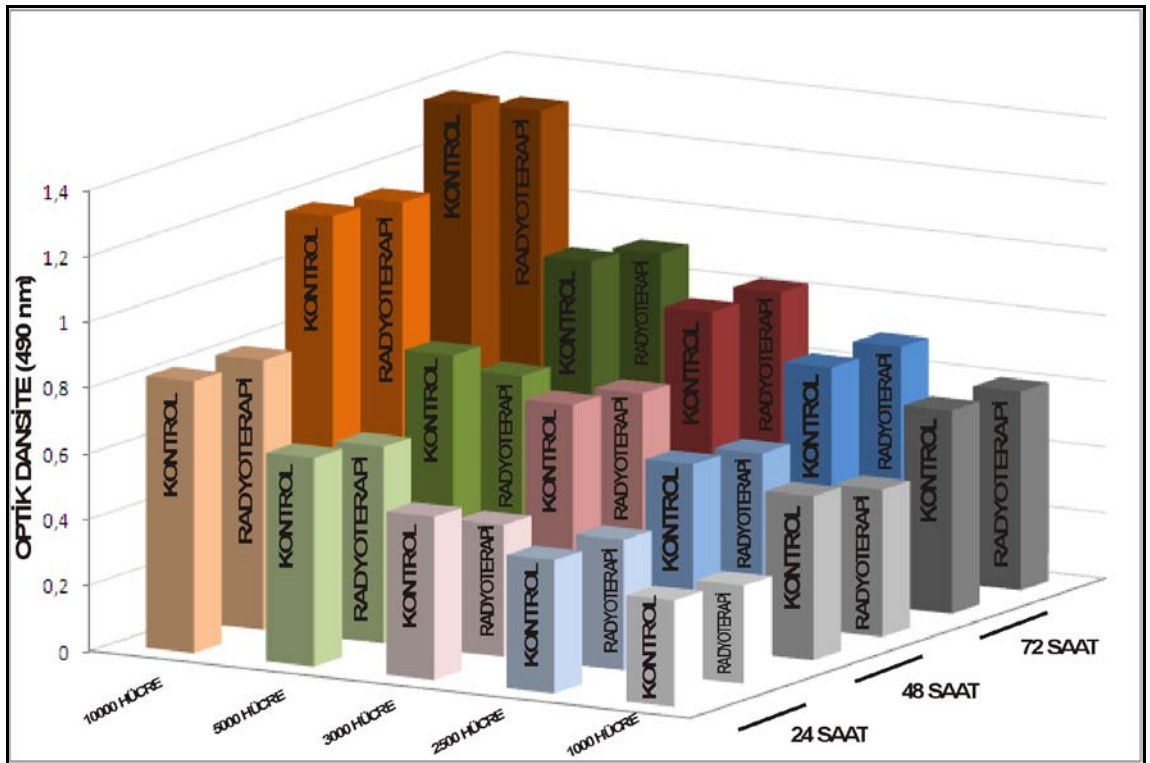
4.1.2.1. Farklı dozlarda radyoterapi uygulamasının 4THMpc hücre hattı üzerine etkisi

Farklı hücre sayılarıyla (1000, 2500, 3000, 5000 ve 10 000) yapılan deneylerde, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 5, 10 ve 20 Gy radyoterapi uygulamalarının 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonrasında, 4THMpc hücrelerinin canlılıkları üzerine istatistiksel anlamda önemli kabul edilebilecek bir etki göstermediği saptandı. Dört bağımsız deneyden elde edilen absorbans değerlerinin ortalamaları ile bu ortalamaların standart hataları Çizelge 4.1’de sunulmuştur (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7).

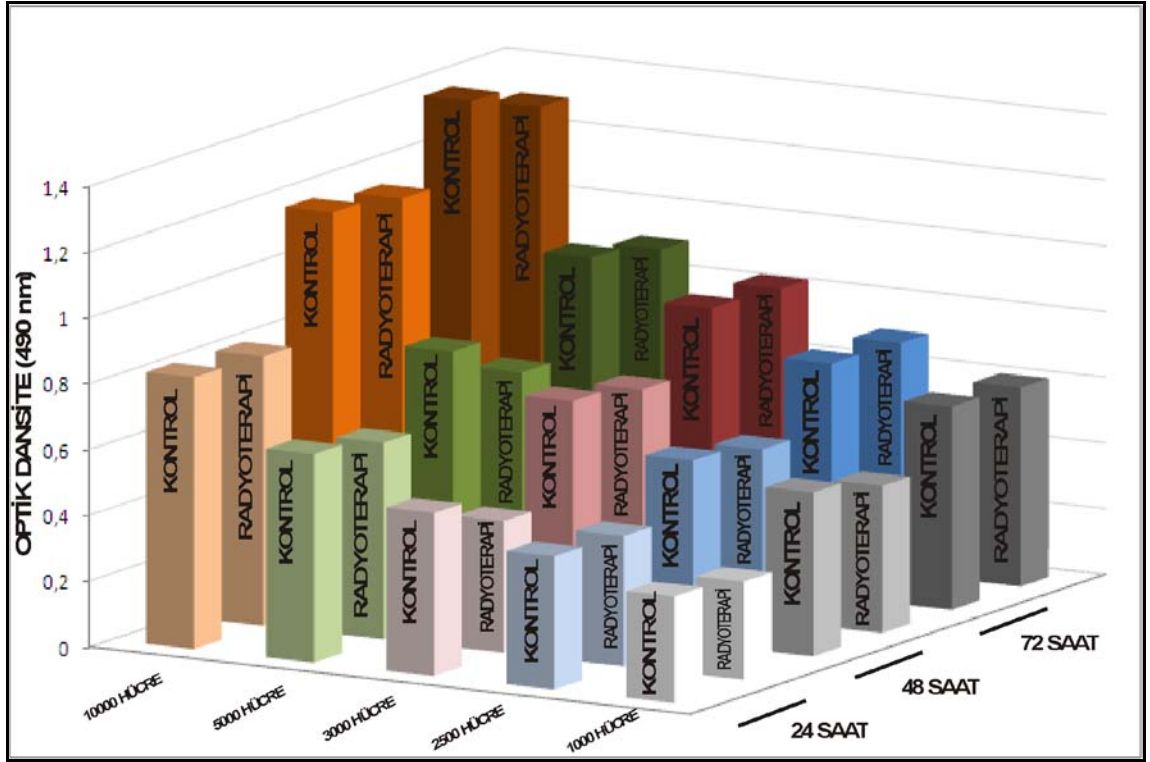
Farklı hücre sayılarıyla yapılan deneylerde, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 45 Gy Radyoterapi uygulaması ise, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonrasında, 4THMpc hücrelerinin canlılıkları üzerine istatistiksel anlamda önemli kabul edilebilecek (*; $p<0.05$, **; $p<0.01$) bir etki gösterdi. İnkübasyon süreleri sonunda, kontrol gruplarındaki hücre sayılarının artışı, görülen etkinin radyoterapiden kaynaklandığını doğrulamaktadır. Her üç inkübasyon süresinde de 45 Gy radyoterapi uygulamasının etkisi hücre sayısına bağlı olarak değişmektedir ve en çok etkiyi 5000 hücre ve 10000 hücre üzerinde göstermiştir. Yapılan tüm tekrarlarında, 45 Gy radyoterapi uygulaması anlamlı derecede etkili bulunduğu için, tez kapsamında gerçekleştirilen tüm deneylerde, 45 Gy radyoterapi uygulamasının kullanılmasına karar verildi. Elde edilen veriler aşağıdaki grafiklerde sunulmuştur (Şekil 4.8).



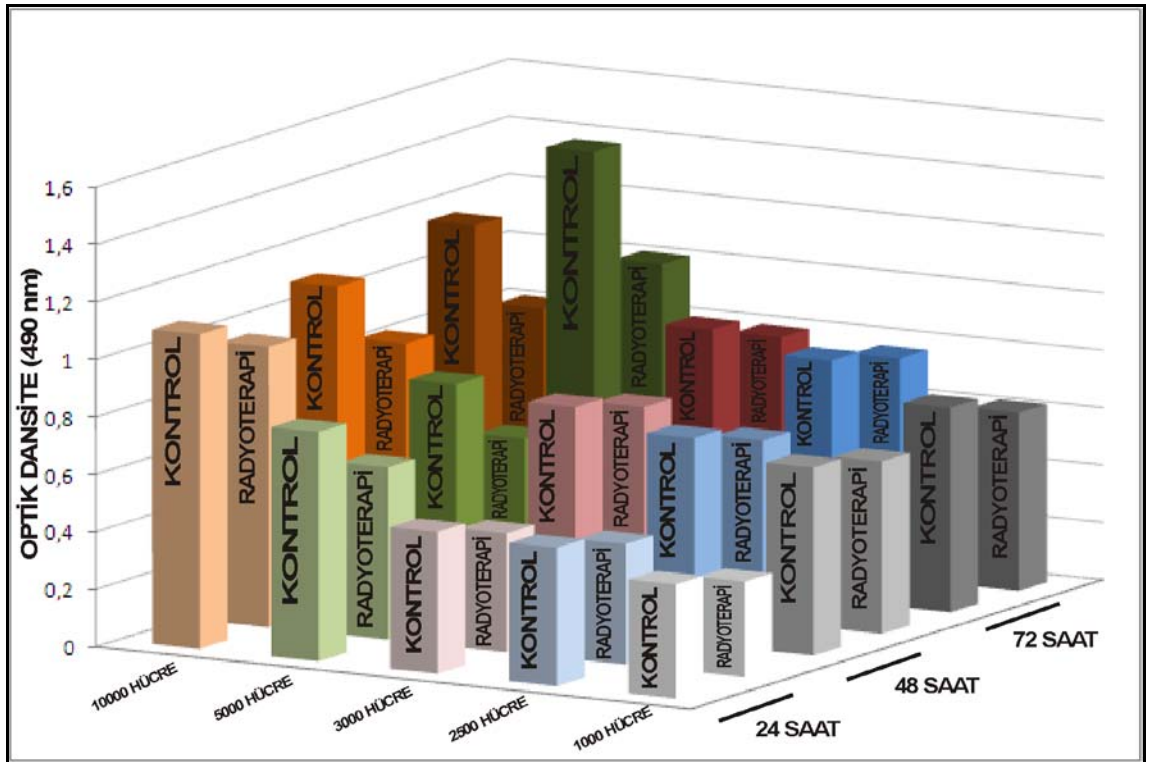
Şekil 4.5. 5 Gray radyoterapinin 4THMpc hücre hattı üzerine gösterdiği etki



Şekil 4.6. 10 Gray radyoterapinin 4THMpc hücre hattı üzerine gösterdiği etki



Şekil 4.7. 20 Gray radyoterapinin 4THMpc hücre hattı üzerine gösterdiği etki

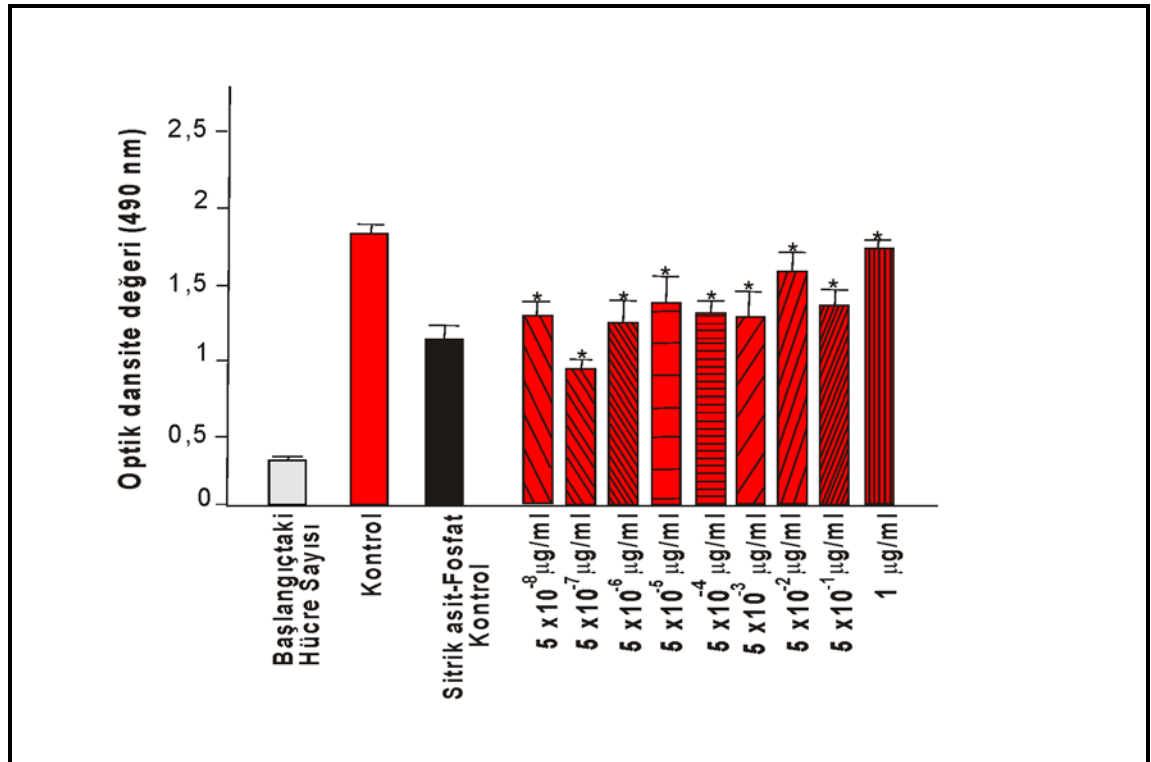


Şekil 4.8. 45 Gray radyoterapinin 4THMpc hücre hattı üzerine gösterdiği etki

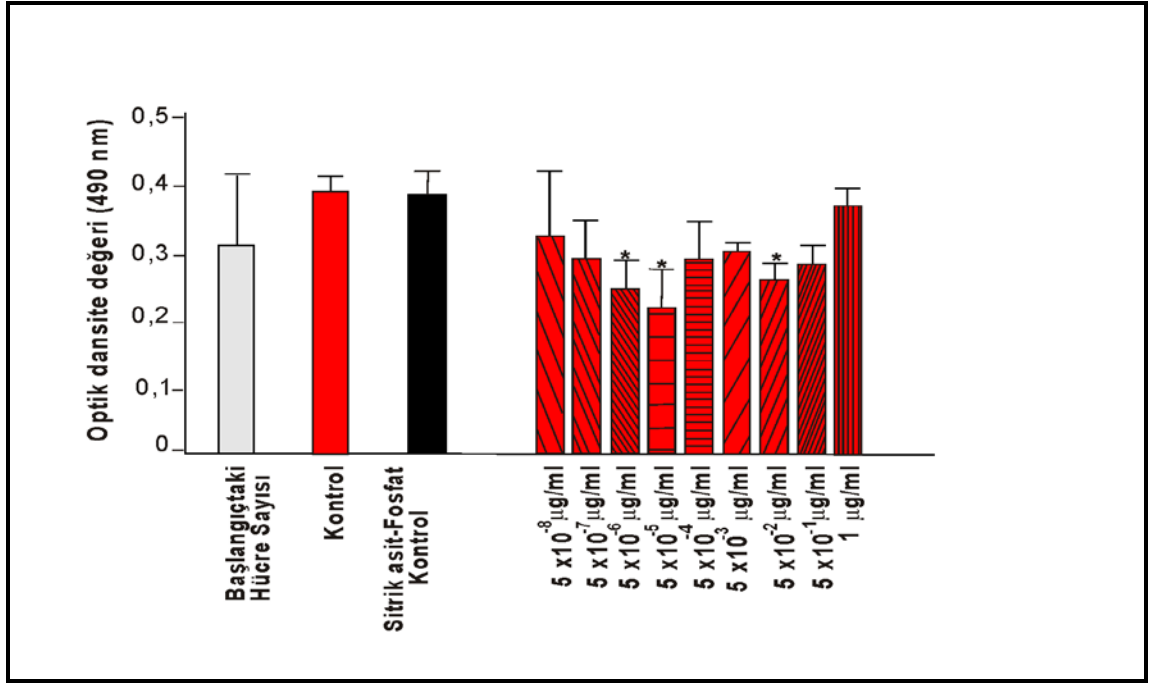
4.2. Endostatin'in Tek Başına ve Radyoterapi ile Kombine Olarak 4T1 ve 4THMpc Hücre Hatları Üzerine Gösterdiği Sitotoksik Etkiler

4.2.1. MTT test sonuçları

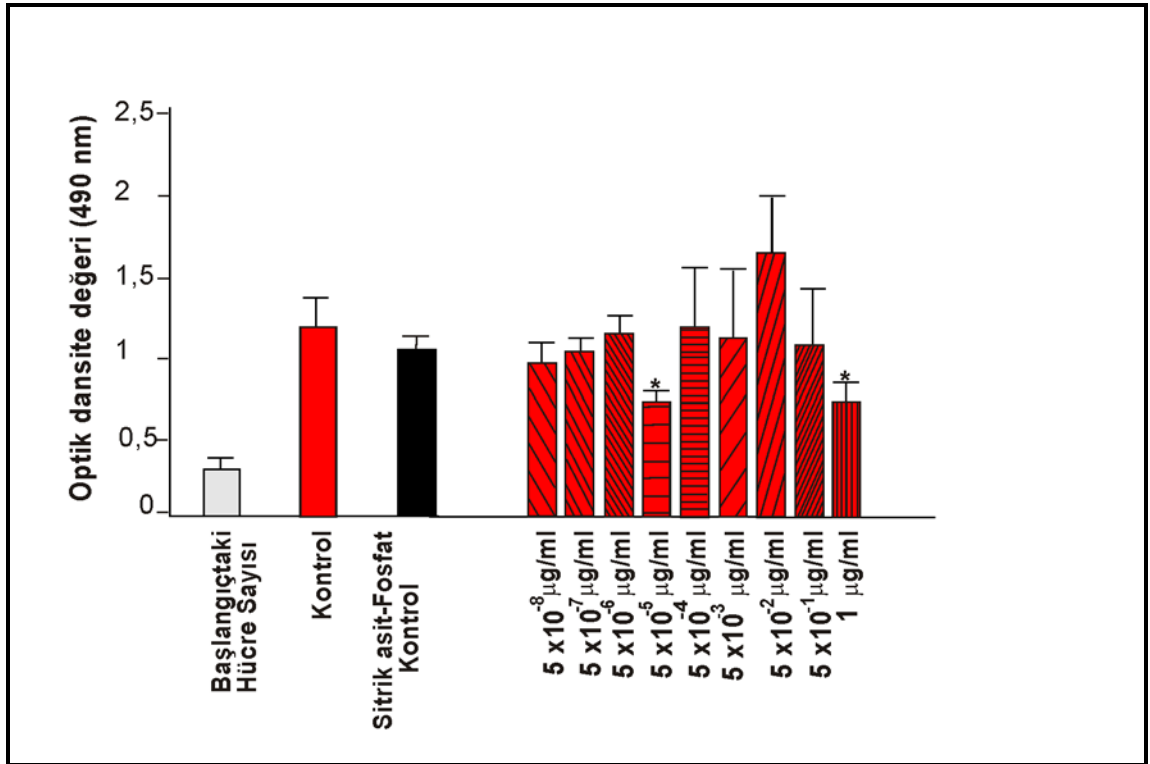
Endostatin'in sitotoksik etkisinin belirlenmesi için, farklı hücre sayılarında (1000 ve 3000 hücre/kuyucuk) farklı serum içerikli besiyerleri kullanılarak denemeler yapıldı. Aşağıda verilen grafiklerden de görülebileceği gibi endostatinin, 4T1 (Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12) ve 4THMpc (Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15) hücre hatlarının her ikisinde de, hücre sayısına bağlı olarak değişik sitotoksik etkiler gösterdiği belirlendi.



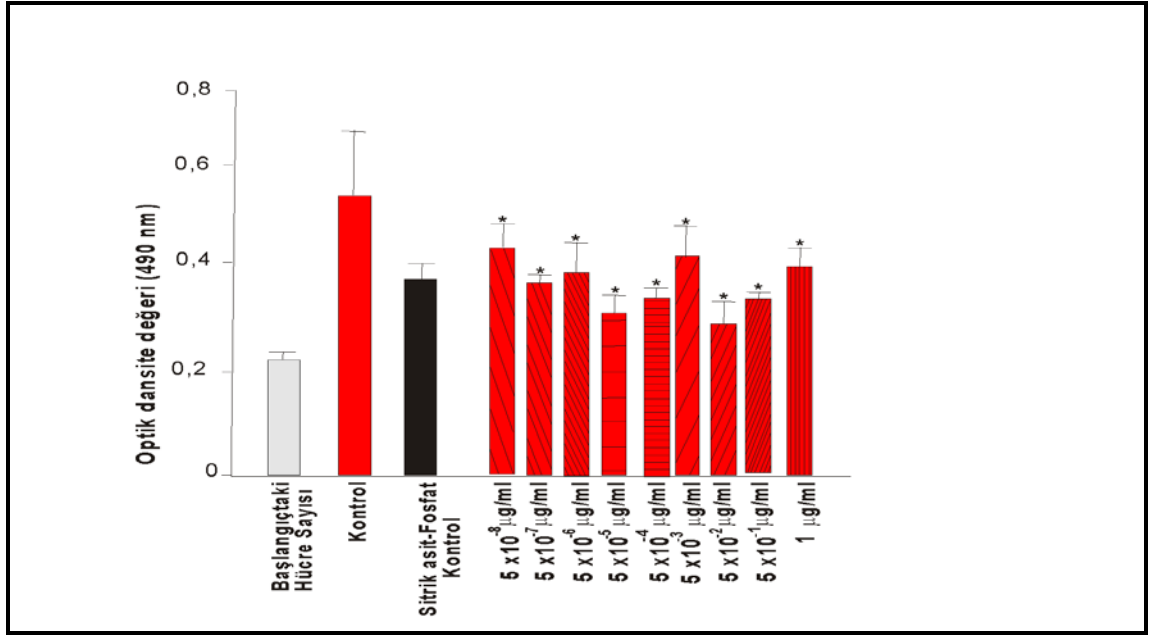
Şekil 4.9. Endostatinin (%1 serumlu besiyeri içerisinde) tek başına 4T1 hücreleri (1000 hücre/kuyucuk) üzerindeki etkisi



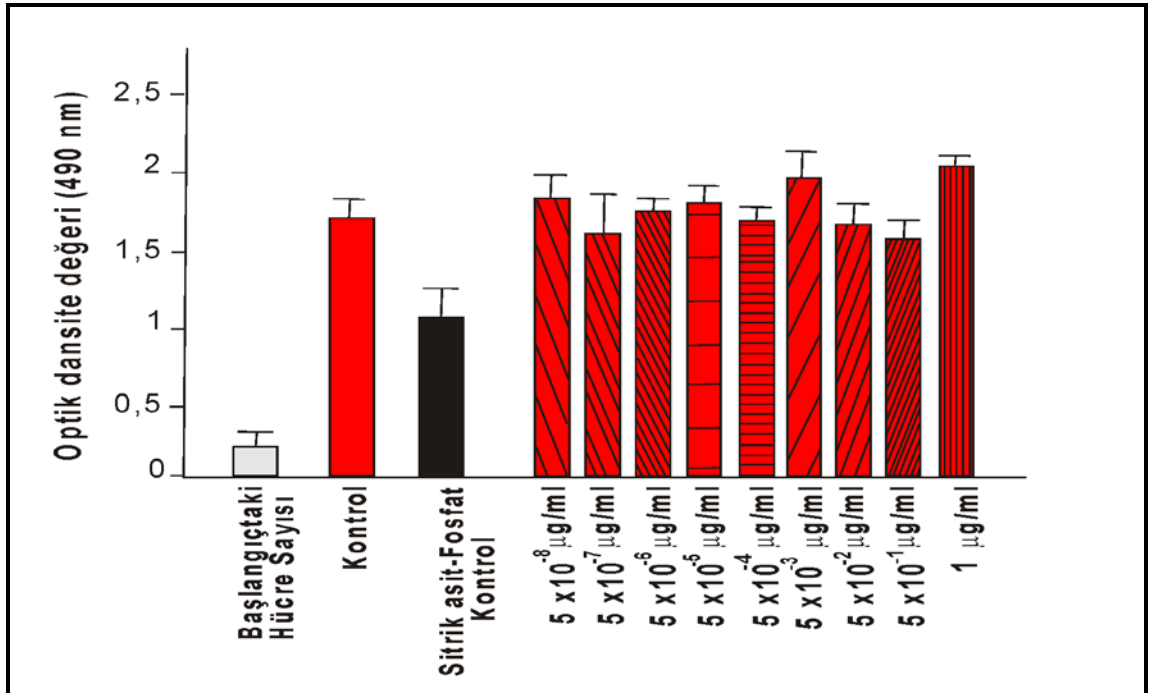
Şekil 4.10. Endostatin (%1 serumlu besiyeri içerisinde) ve radyoterapinin 4T1 hücreleri (1000 hücre/kuyucuk) üzerindeki etkisi



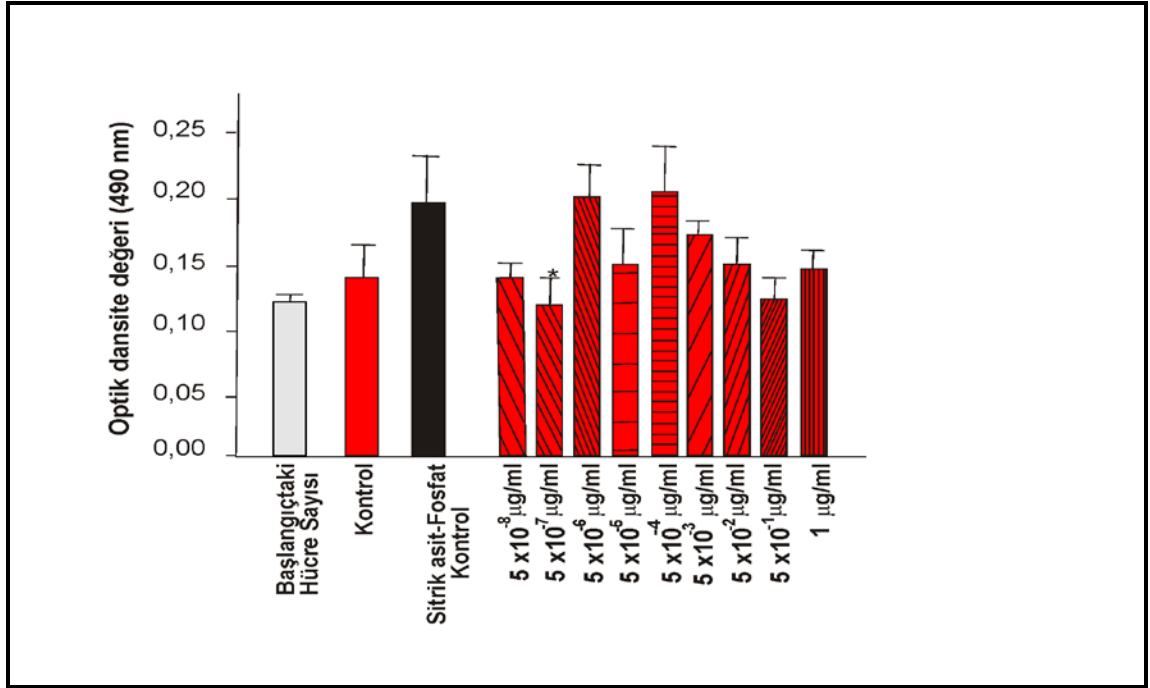
Şekil 4.11. Endostatinin (%1 serumlu besiyeri içerisinde) tek başına 4T1 hücreleri (3000 hücre/kuyucuk) üzerindeki etkisi



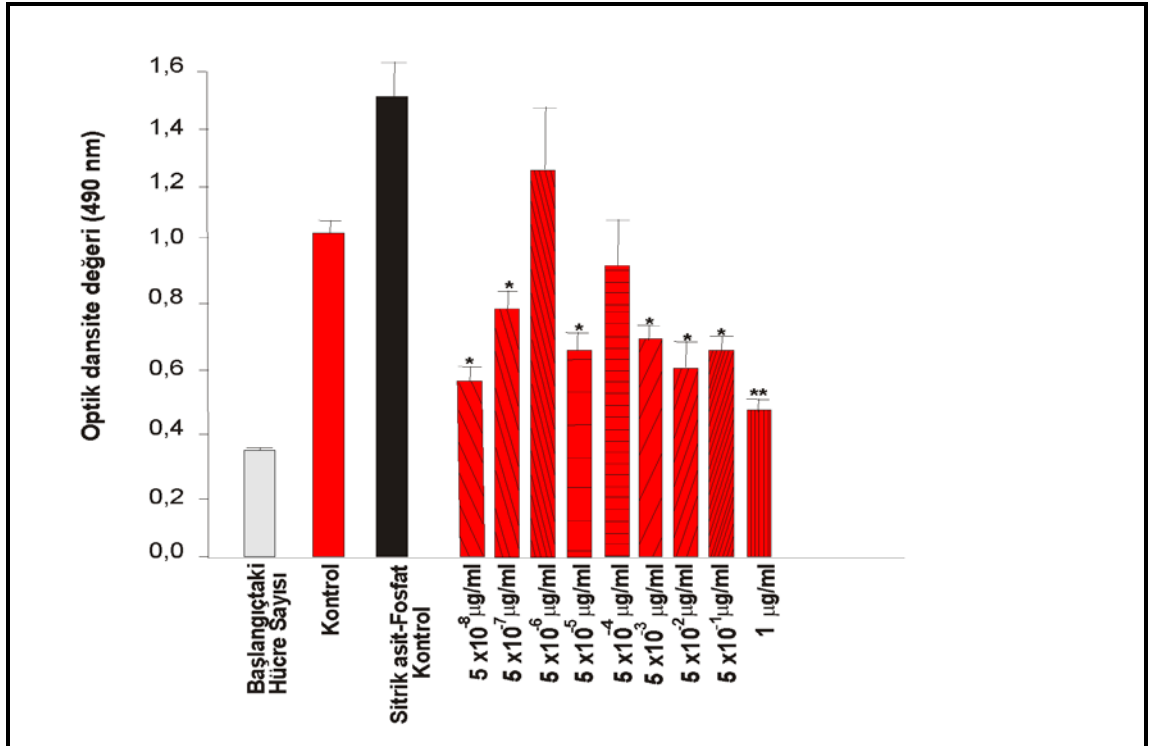
Şekil 4.12. Endostatin (%1 serumlu besiyeri içerisinde) ve radyoterapinin 4T1 hücreleri (3000 hücre/kuyucuk) üzerindeki etkisi



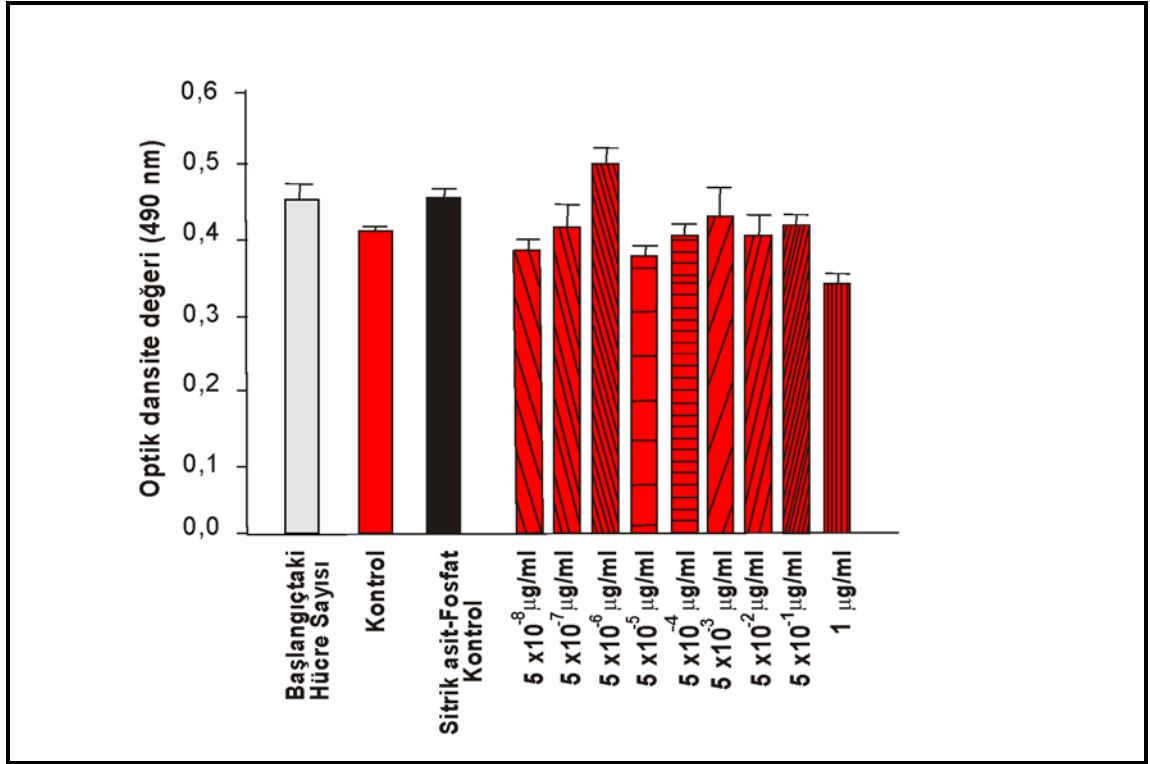
Şekil 4.13. Endostatinin (%1 serumlu besiyeri içerisinde) tek başına 4THMpc hücreleri (1000 hücre/kuyucuk) üzerindeki etkisi



Şekil 4.14. Endostatin (%1 serumlu besiyeri içerisinde) ve radyoterapinin 4THMpc hücreleri (3000 hücre/kuyucuk) üzerindeki etkisi

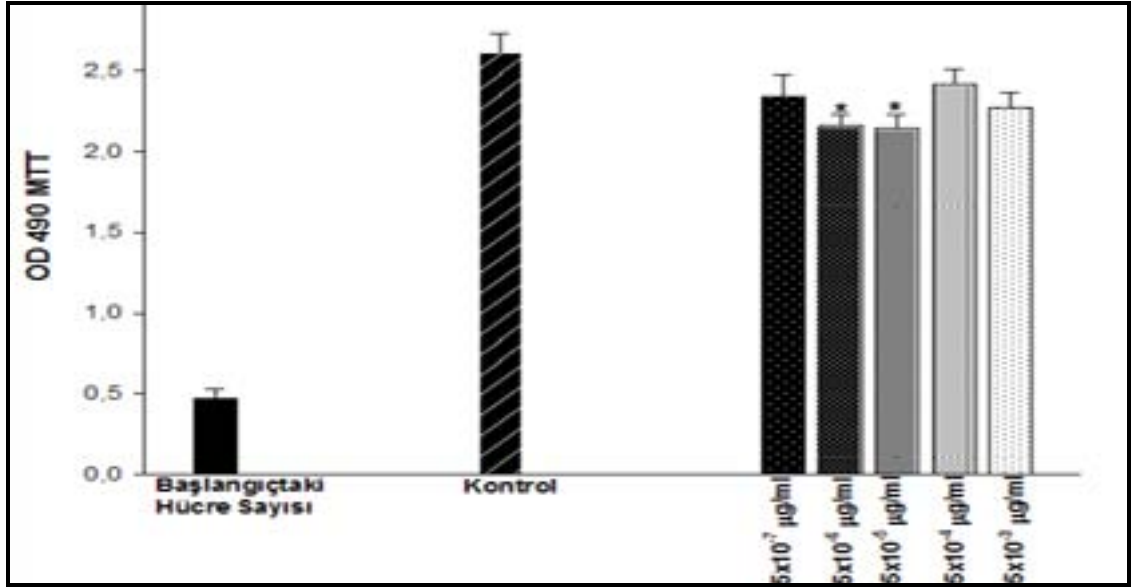


Şekil 4.15. Endostatinin (serumsuz besiyeri içerisinde) tek başına 4THMpc hücreleri (3000 hücre/kuyucuk) üzerindeki etkisi

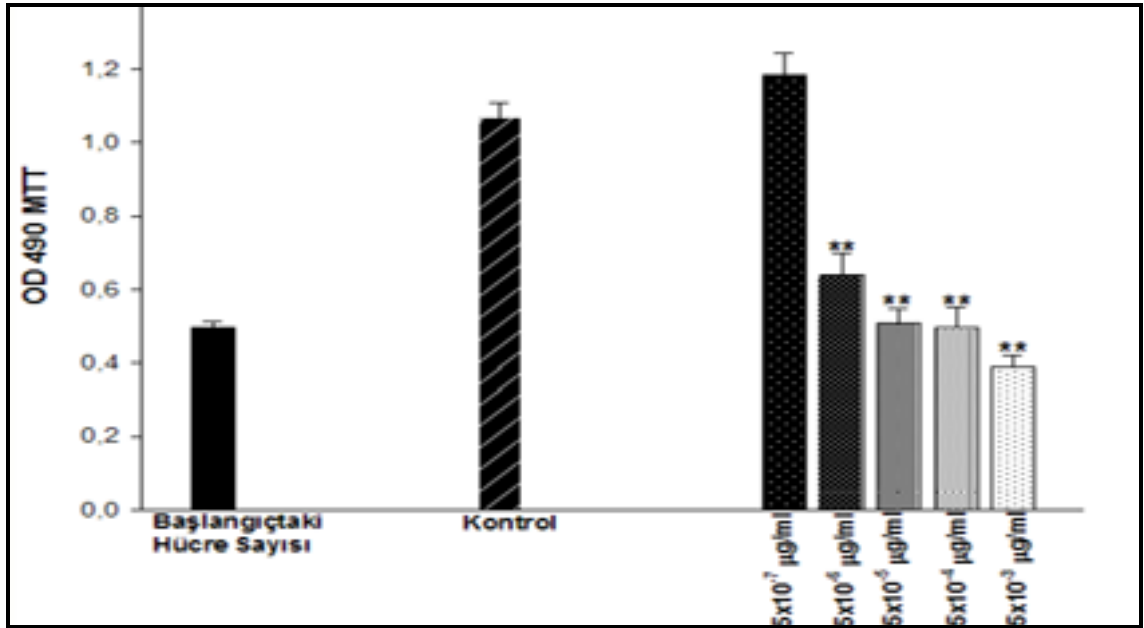


Şekil 4.16 . Endostatin (serumsuz besiyeri içerisinde) ve radyoterapinin 4THMpc hücreleri (3000 hücre/kuyucuk) üzerindeki etkisi

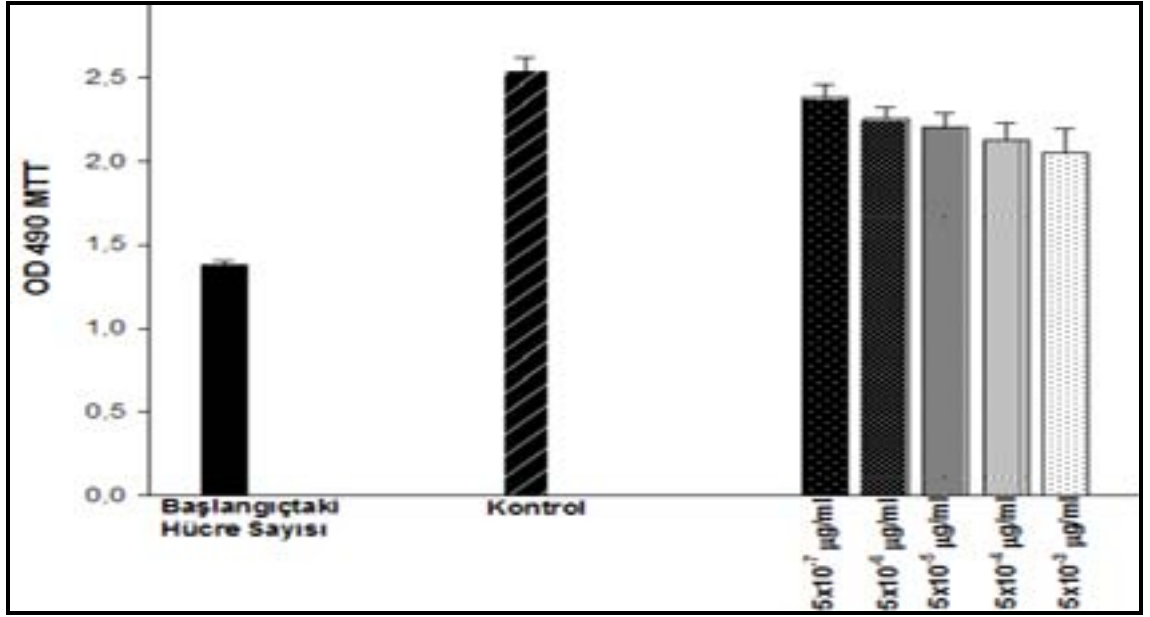
Deney sonuçlarına göre, hücre sayıları ve inkübasyon süresine bağlı olarak, Endostatin'in etkisinin değiştiği belirlendi. Bu yüzden hücre sayıları, ve endostatin dozları ile ilgili tekrar optimizasyon deneyleri yapıldı. 4T1 (Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22) ve 4THMpc (Şekil 4.23, Şekil 4.24) ayrı ayrı grafiklendirilen sonuçlar, aşağıda sunuldu.



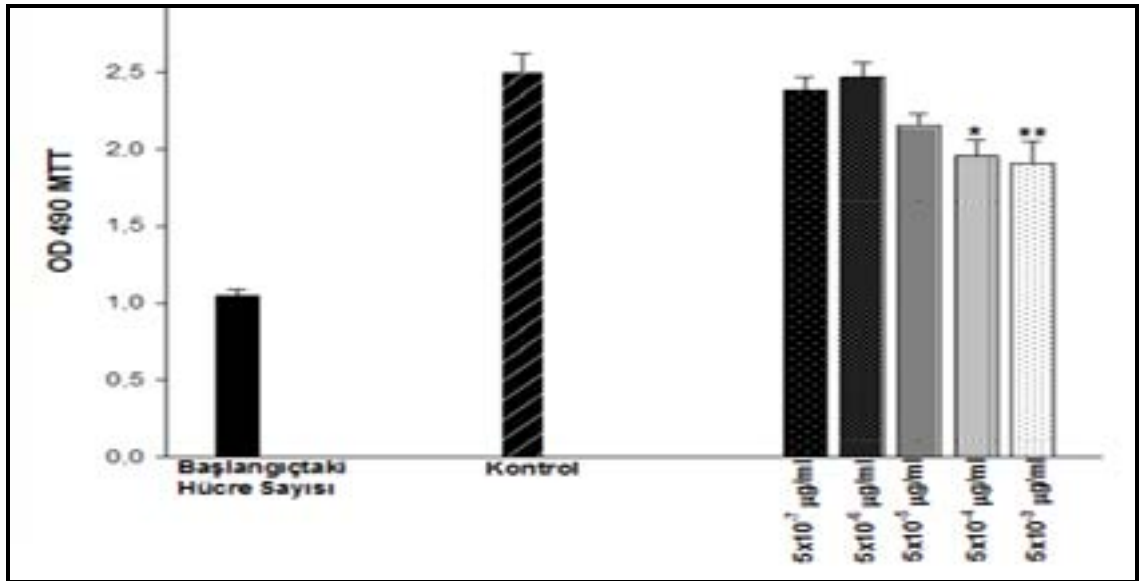
Şekil 4.17. Endostatinin (%1 serumlu besiyeri kullanılarak) tek başına 4T1 hücreleri (2500 hücre) üzerindeki etkisi



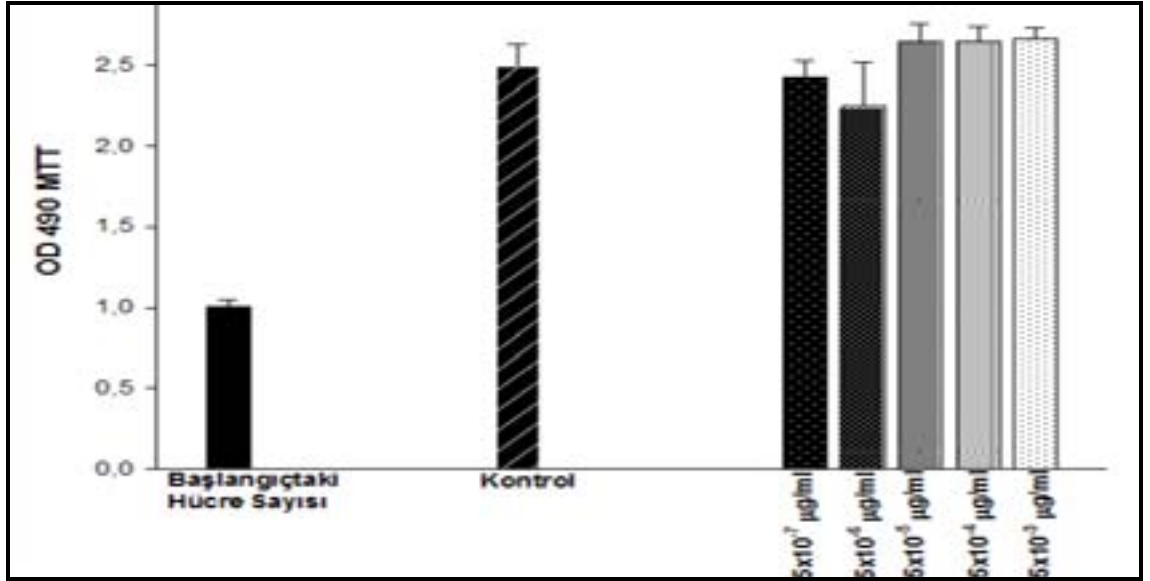
Şekil 4.18. Endostatin (%1 serumlu besiyeri kullanılarak) ve radyoterapinin birlikte 4T1 hücreleri (2500 hücre) üzerindeki etkisi



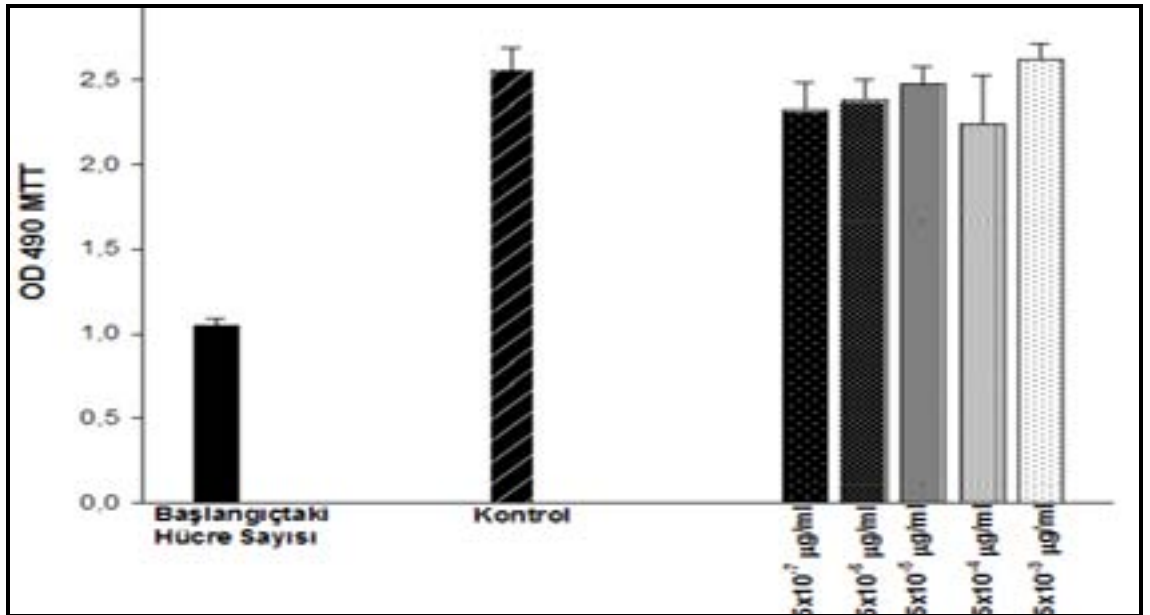
Şekil 4.19. Endostatinin (serumsuz besiyeri kullanılarak) tek başına 4T1 hücreleri (5000 hücre) üzerindeki etkisi



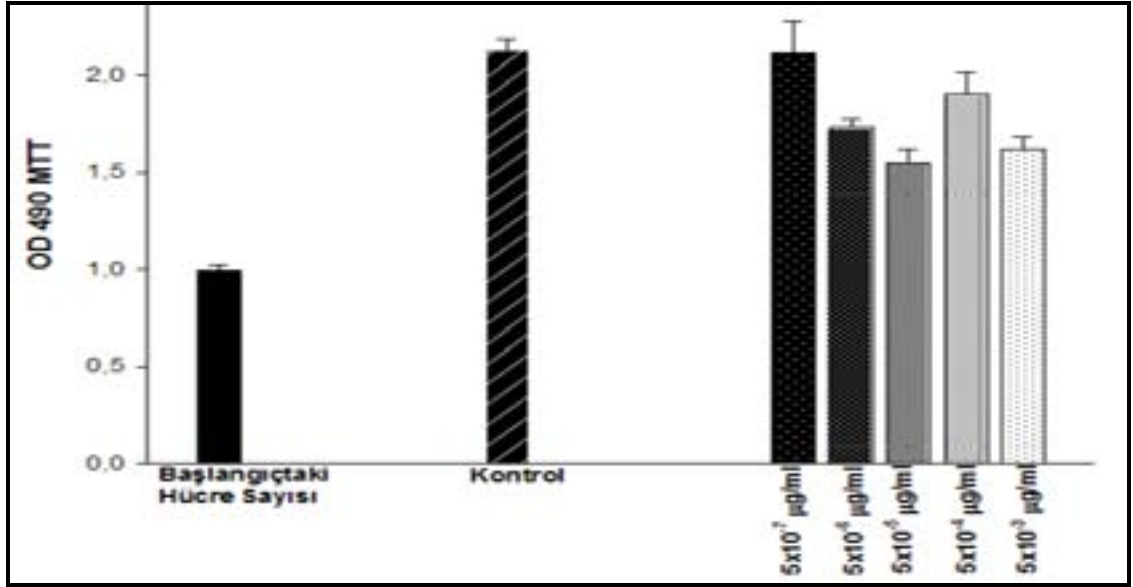
Şekil 4.20. Endostatin (serumsuz besiyeri kullanılarak) ve radyoterapinin 4T1 hücreleri (5000 hücre) üzerindeki etkisi



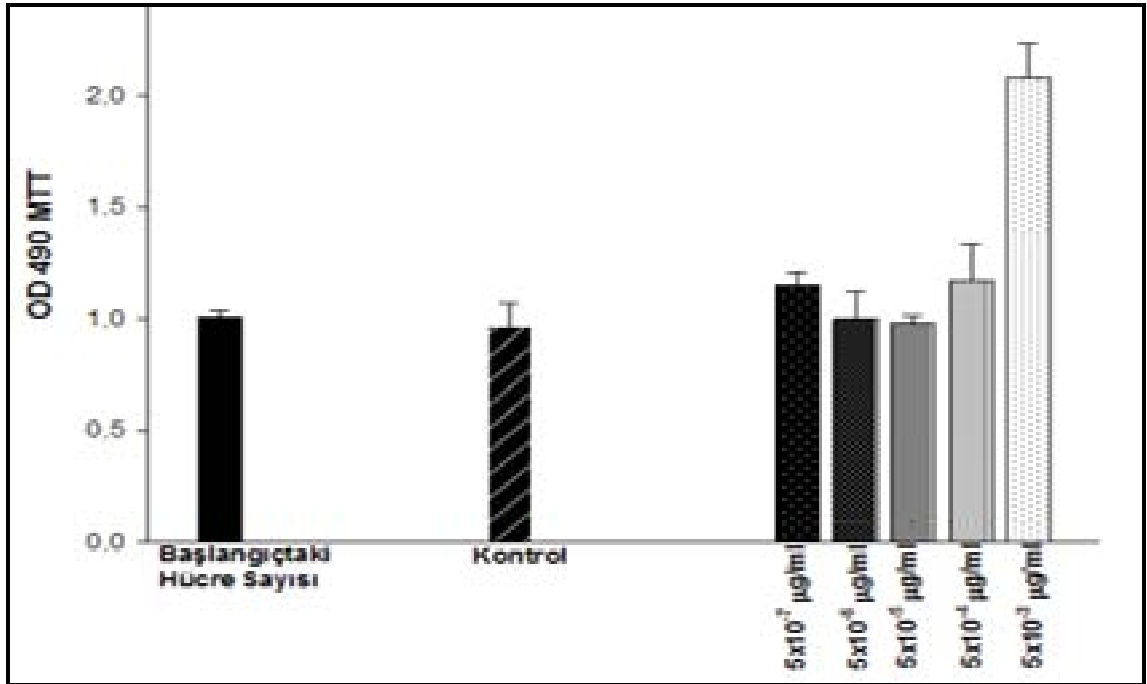
Şekil 4.21. Endostatinin (%1 serumlu besiyeri kullanılarak) tek başına 4T1 hücreleri (5000 hücre) üzerindeki etkisi



Şekil 4.22. Endostatin (%1 serumlu besiyeri kullanılarak) ve radyoterapinin 4T1 hücreleri (5000 hücre) üzerindeki etkisi



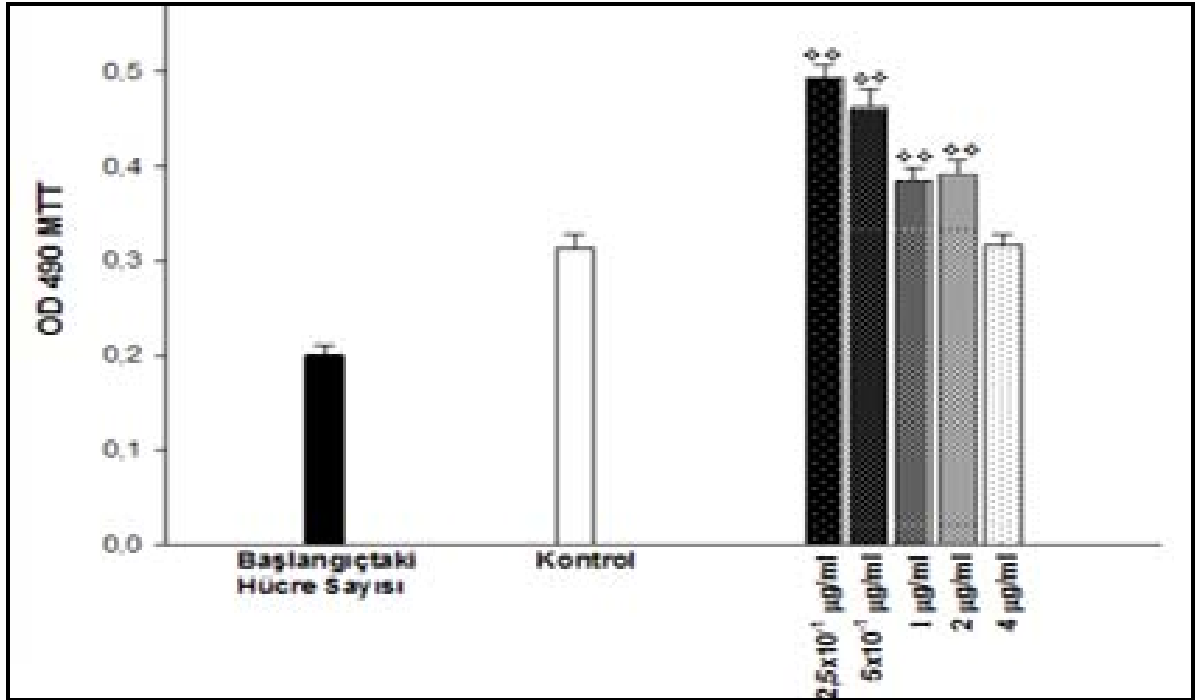
Şekil 4.23. Endostatinin (%1 serumlu besiyeri kullanılarak) tek başına 4THMpc hücreleri (5000 hücre) üzerindeki etkisi



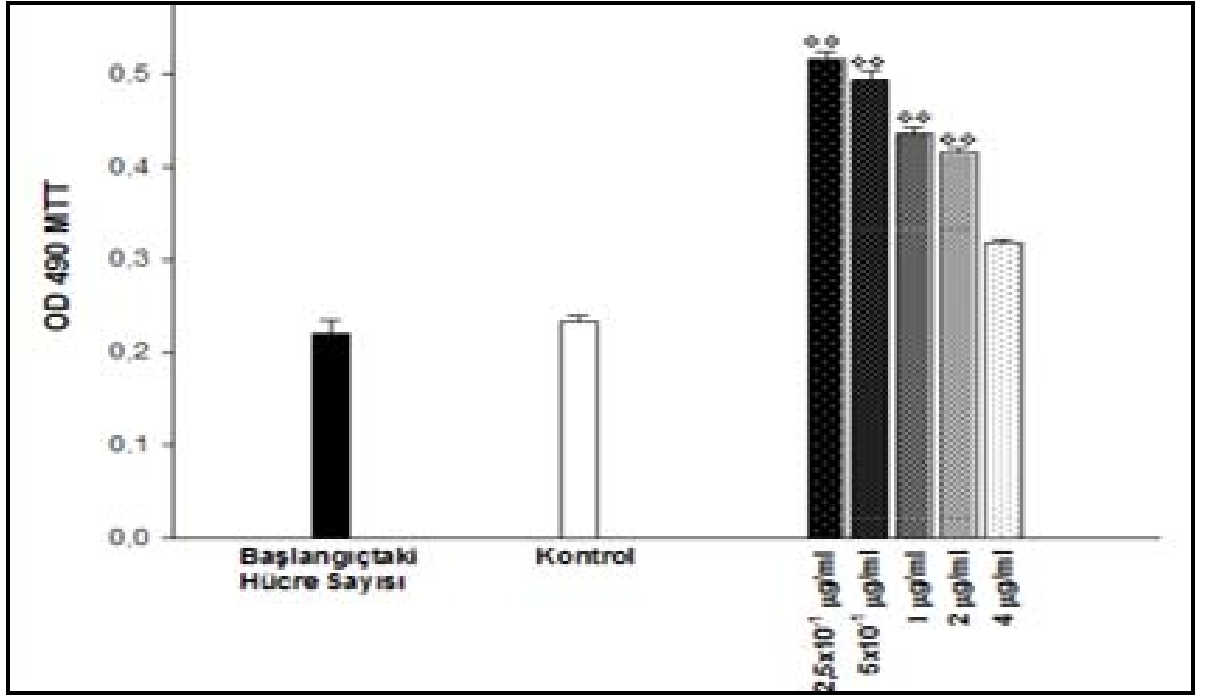
Şekil 4.24. Endostatin (%1 serumlu besiyeri kullanılarak) ve radyoterapinin 4THMpc hücreleri (5000 hücre) üzerindeki etkisi

Tüm koşullar sabit tutulsada, bu dozlar ile tekrarlanan denemelerden benzer sonuçlar elde edilemedi. Bu nedenle, kullanılan dozların değiştirilerek deneylerin tekrarlanmasına karar verildi.

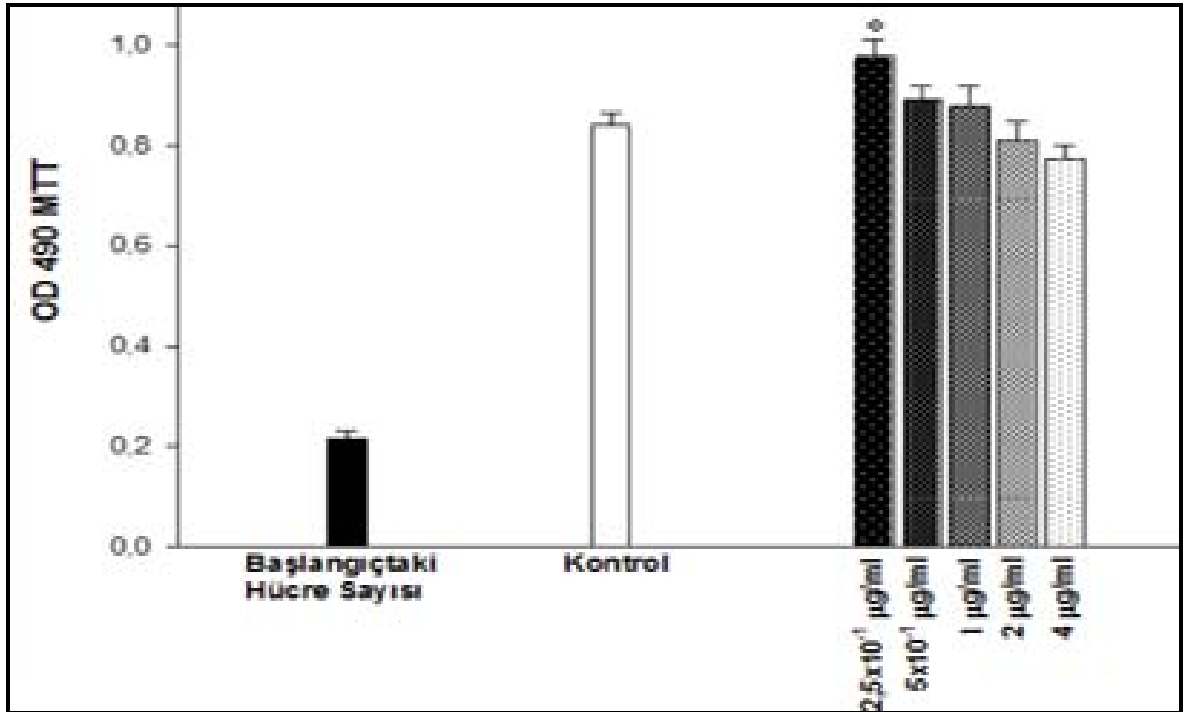
Yeni belirlenen doz aralığında endostatin, her iki hücre hattı için, birbiri ile tutarlı sonuçlar elde etmemizi sağladı. Böylece, alınan farklı deney sonuçlarının uygulama hatalarından kaynaklanmadığı tespit edildi. 4T1 hücrelerinde yeni belirlenen dozlar kullanılarak yapılan 4 bağımsız tekrardan elde edilen sonuçlar Şekil 4.25 Şekil 4.26 Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29, Şekil 4.30’da sunulmuştur.



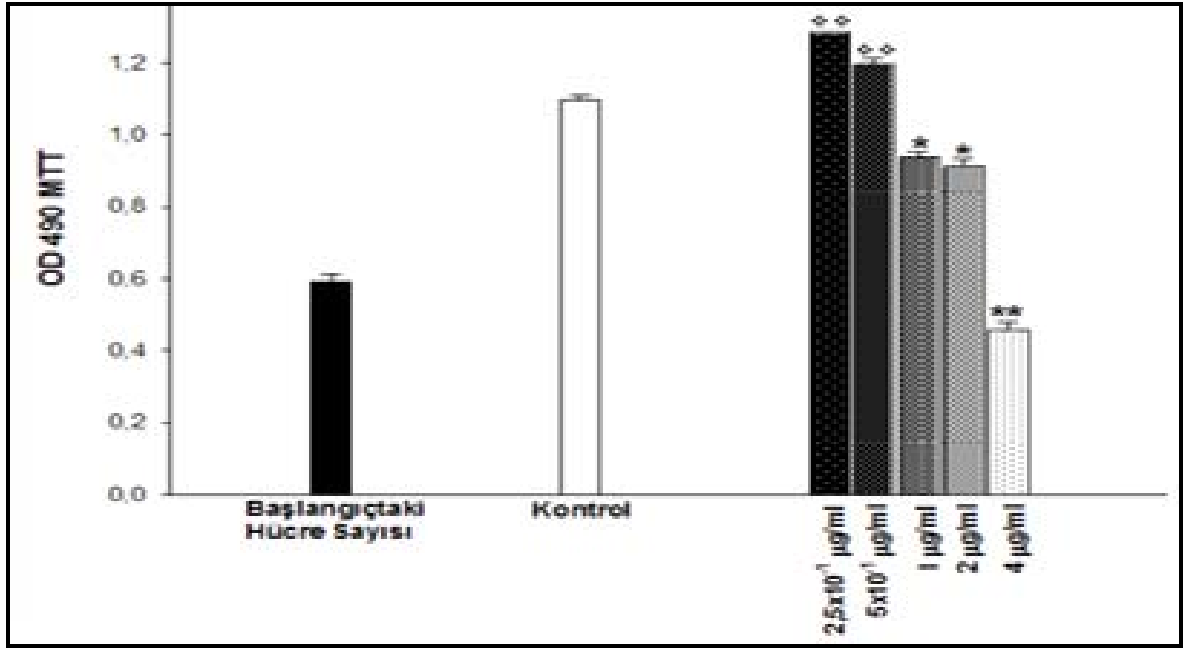
Şekil 4.25. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Endostatin grubu deney sonuçları.



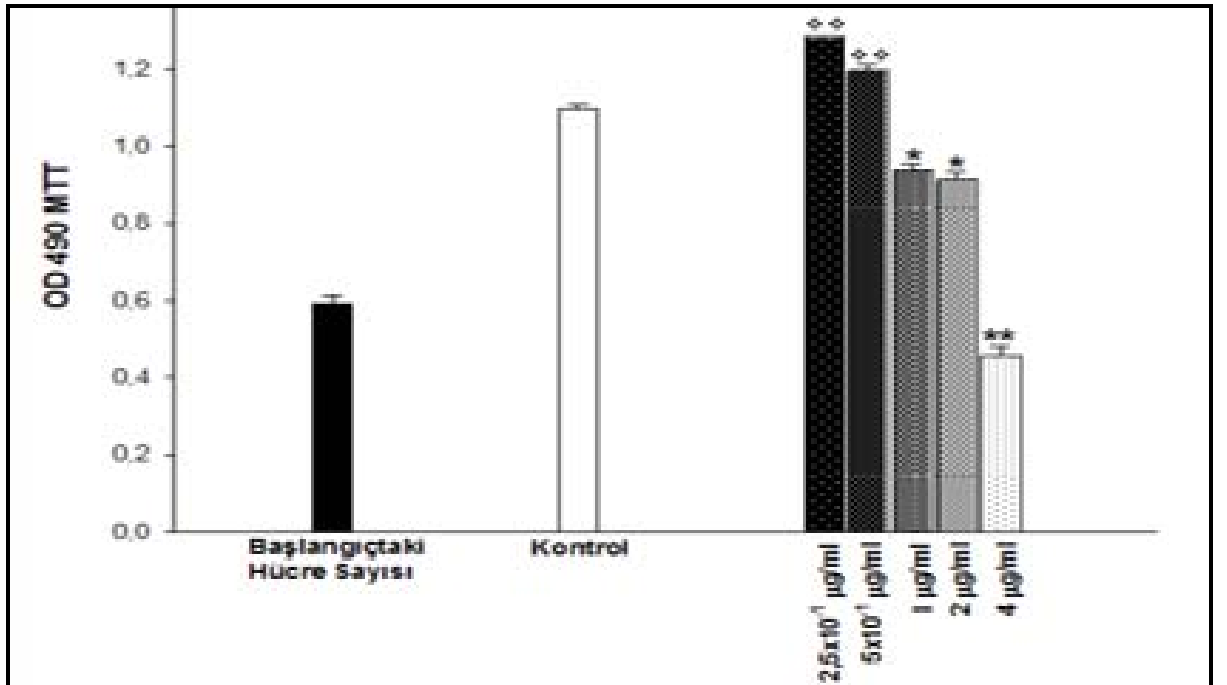
Şekil 4.26. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu deney sonuçları



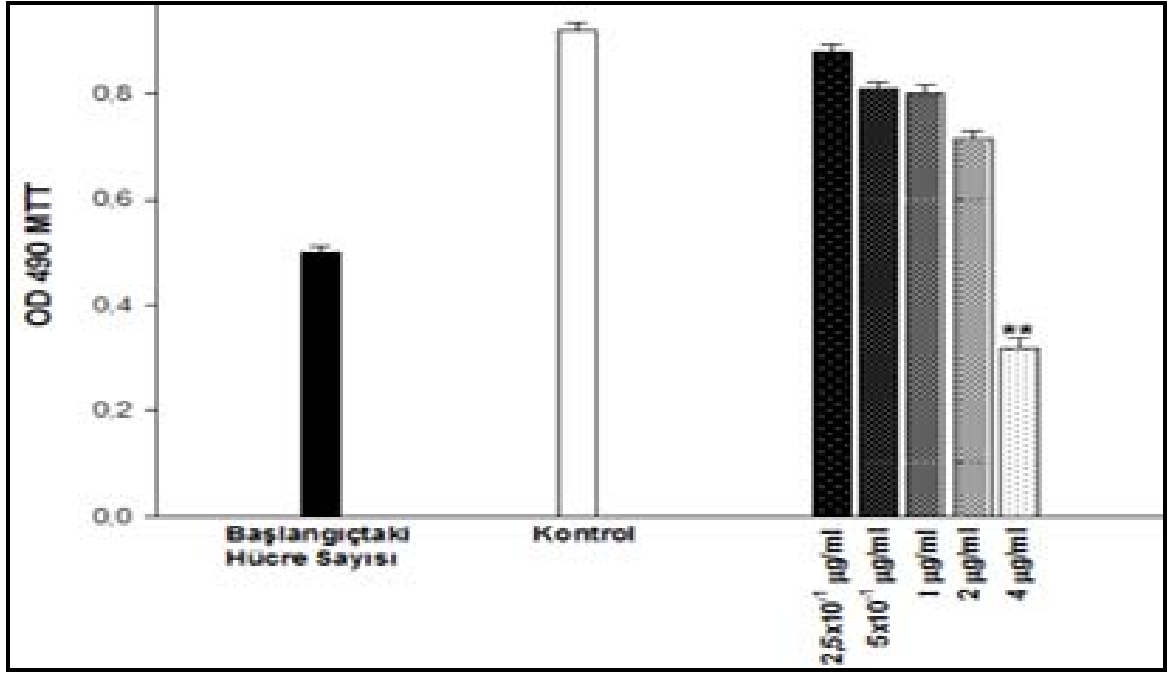
Şekil 4.27. 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Endostatin grubu deney sonuçları.



Şekil 4.28. Endostatin, 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu deney sonuçları.



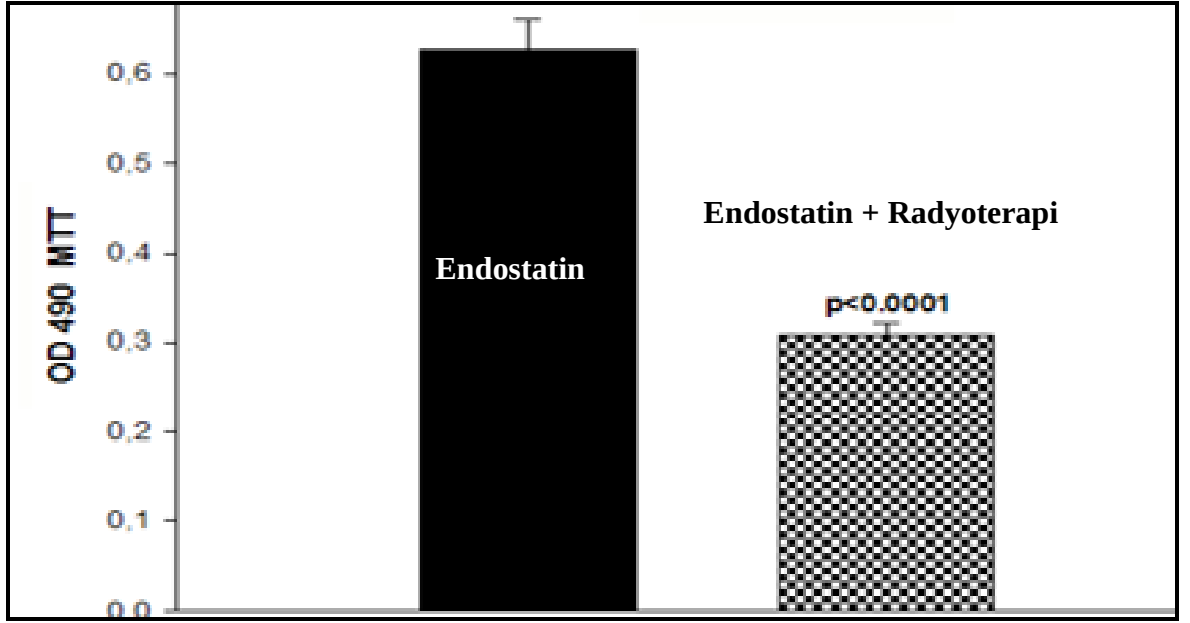
Şekil 4.29. Endostatin, 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen deney sonuçları.



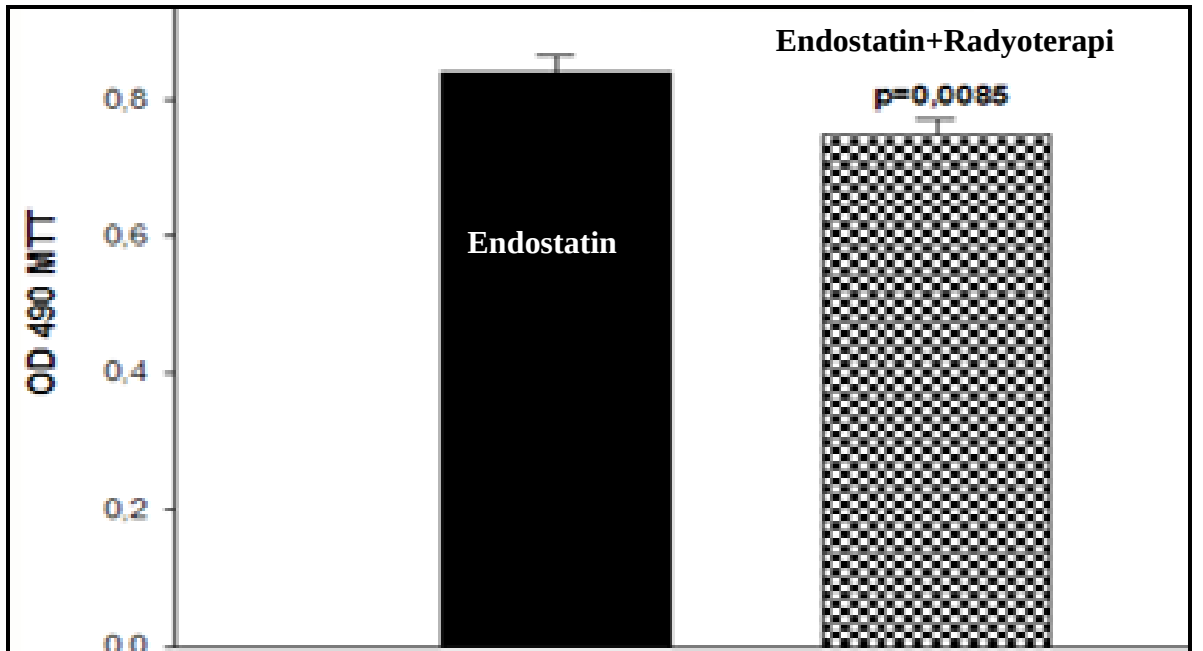
Şekil 4.30. Endostatin, 4T1 hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu deney sonuçları.

Yukarıdaki grafiklerden de görüldüğü gibi, 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonunda tek başına Endostatin uygulamasının kontrol grubuna oranla hücrelerde sitotoksik bir etki göstermediği aksine canlı hücre sayısında istatistiksel olarak anlam ifade edecek kadar bir artma olduğu saptandı (❖: $p < 0,01$ ve ❖❖ $p < 0,001$). 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda Kontrol grubunda Endostatin'in en düşük iki dozu kontrol kuyucuğuna oranla hala canlı hücre sayısını arttırırken (❖❖, $p < 0,001$) 1,2 ve 4 µg/ml 'lik dozlar canlılığı azaltmaktadır. Kontrol grubunda 4 µg/ml 'lik doz sitotoksik etki gösterdi (**, $p < 0,001$). 24 ve 48 saatte gözlenenin aksine radyoterapi ve Endostatin kombine tedavisindeki hiçbir doz, canlılığı kontrol kuyucuğuna oranla artırmadı. 72 saatlik kombine tedavi sonunda da 4 µg/ml'lik dozun sitotoksik etki gösterdiği saptandı.

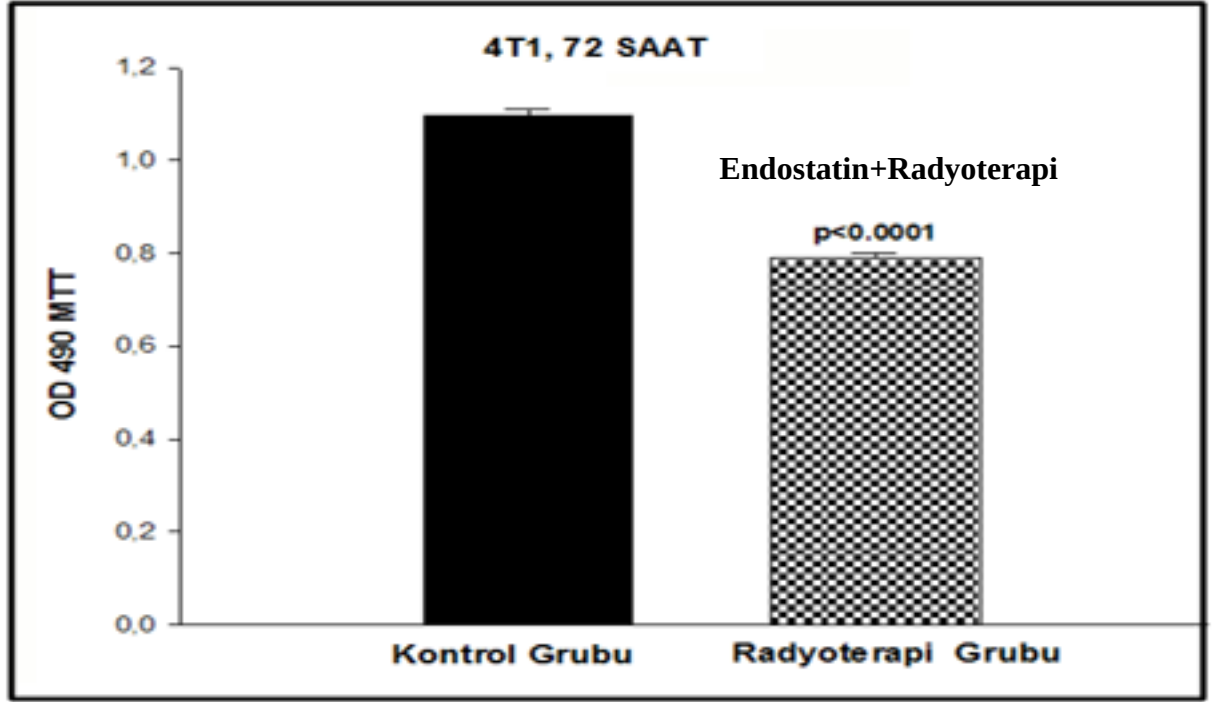
Endostatin radyoterapi ile kombine edildiğinde, canlı sayısındaki artış daha dikkat çekicidir. Bu etkinin, radyoterapi ile Endostatin 'in etkileşimi sonucunda ortaya çıktığı düşünülmektedir çünkü tek başına radyoterapi uygulamasının kontrol grubundaki hücre canlılığını 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde azalttığı gösterildi. (Mann-Whitney testi $p < 0,0001$). Tek başına radyoterapinin 4T1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi aşağıda grafiklenerek (Şekil 4.31, Şekil 4.32, Şekil 4.33) gösterildi.



Şekil 4.31. Tek başına radyoterapinin, 4T1 hücreleri (5000 hücre) üzerine 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası gözlenen etkisi

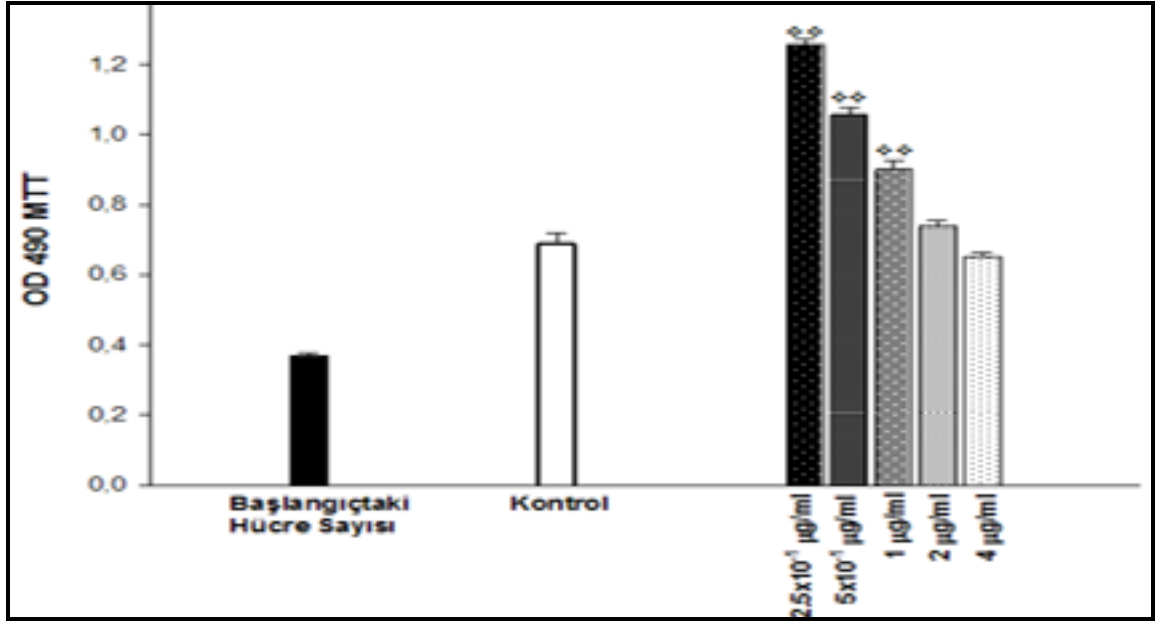


Şekil 4.32.. Tek başına radyoterapinin, 4T1 hücreleri (5000 hücre) üzerine 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası gözlenen etkisi

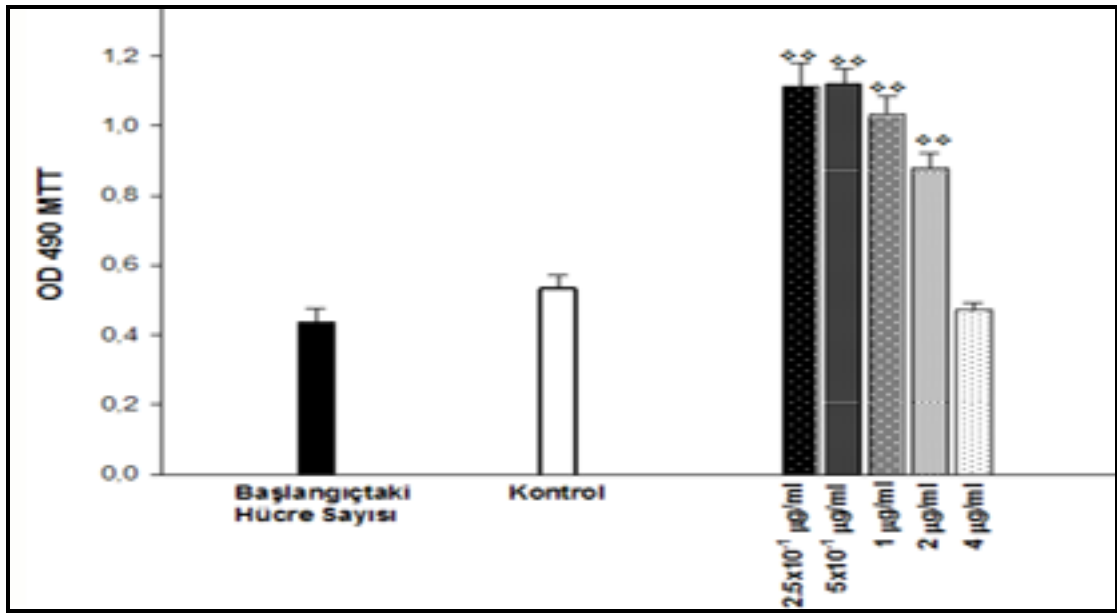


Şekil 4.33. Tek başına radyoterapinin, 4T1 hücreleri (5000 hücre) üzerine 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası gözlenen etkisi

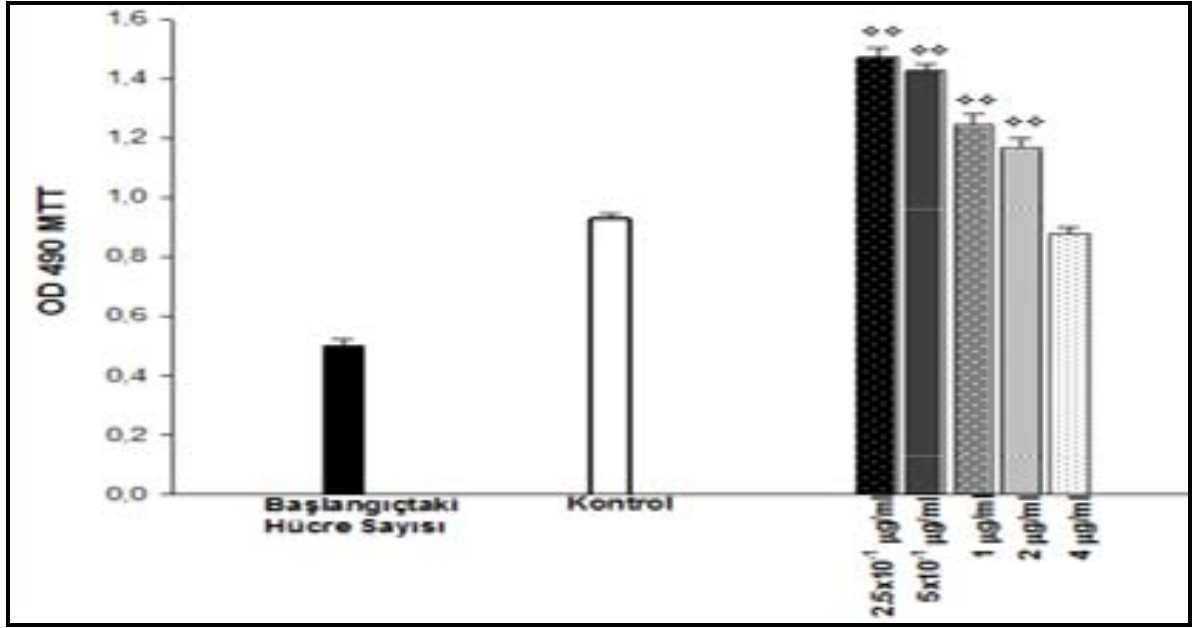
4THMpc hücre hattında ise, 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonunda tek başına Endostatin uygulamasının kontrol grubuna oranla hücrelerde sitotoksik bir etki göstermediği aksine canlı hücre sayısında istatistiksel olarak anlam ifade edecek kadar bir artma olduğu saptandı (❖: $p < 0,01$ ve ❖❖ $p < 0.001$) (Şekil 4.34, Şekil 4.35, Şekil 4.36, Şekil 4.37, Şekil 4.38, Şekil 4.39) Bu artış 4T1 hücrelerinde belirlenenden de fazladır. Endostatin radyoterapi ile kombine edildiğinde, canlı sayısındaki artış 4T1 hücrelerinde olduğu kadar dikkat çekici değildir.



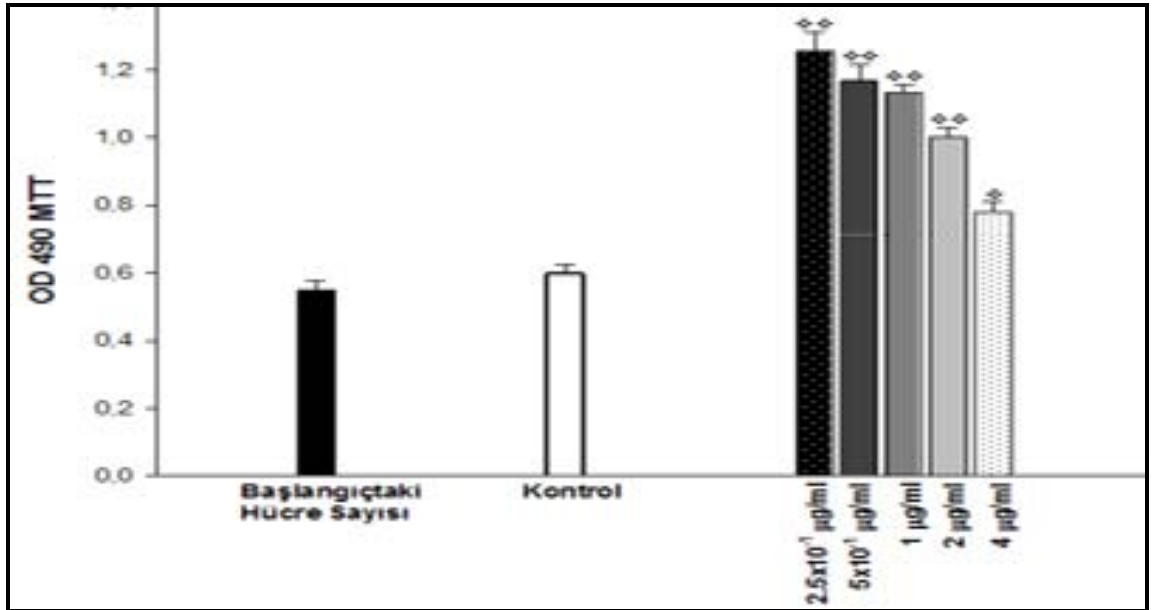
Şekil 4.34. Endostatin, 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen deney sonuçları.



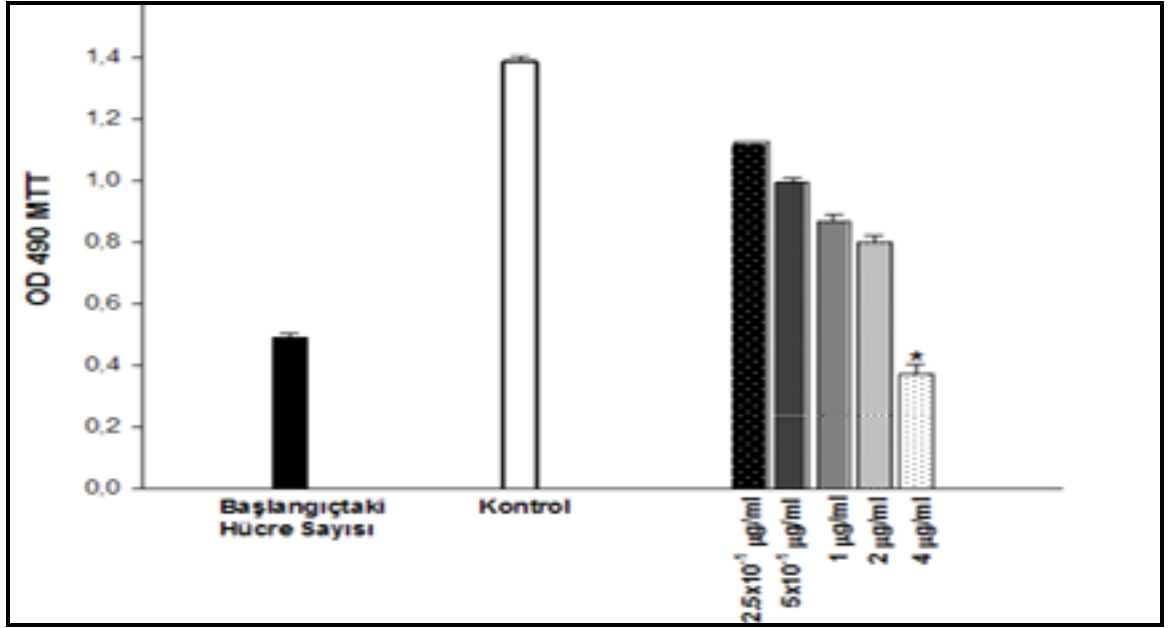
Şekil 4.35. Endostatin, 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu deney sonuçları.



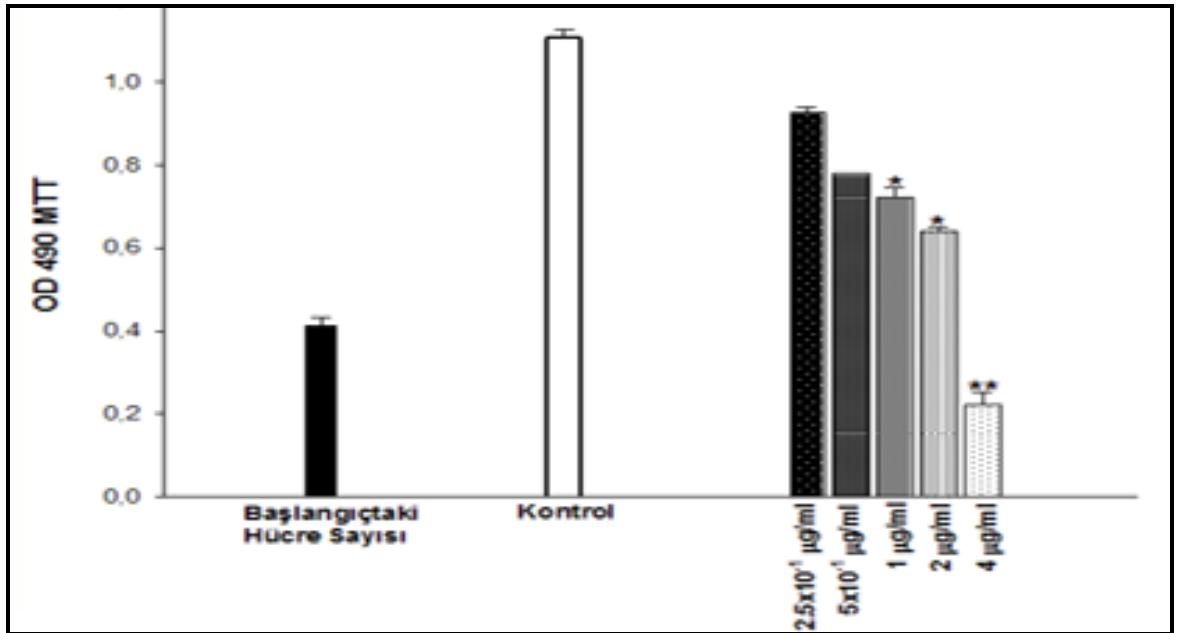
Şekil 4.36. Endostatin, 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen deney sonuçları.



Şekil 4.37. Endostatin, 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu deney sonuçları.



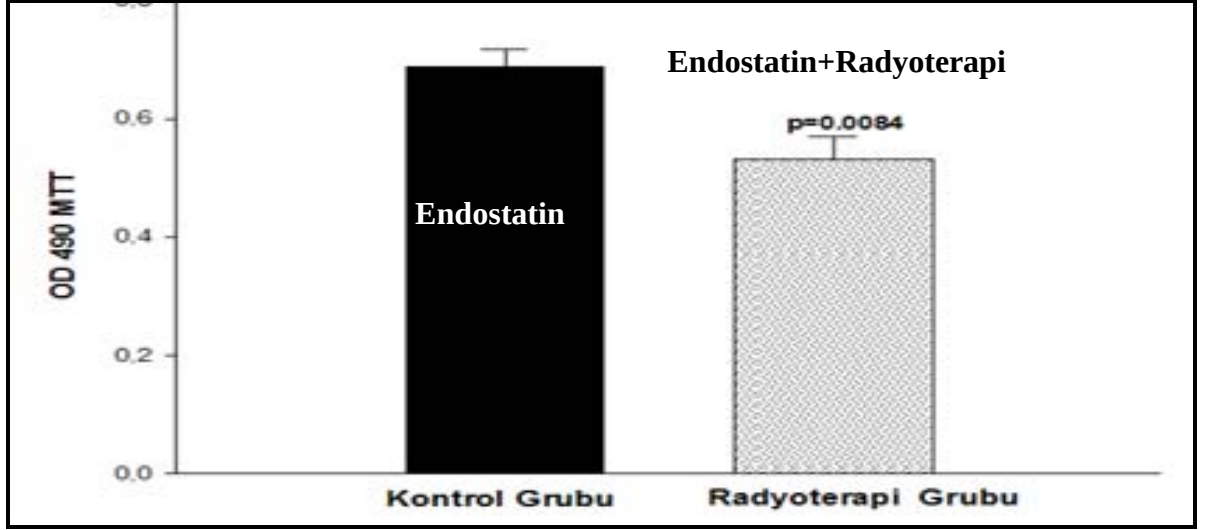
Şekil 4.38. Endostatin, 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen deney sonuçları.



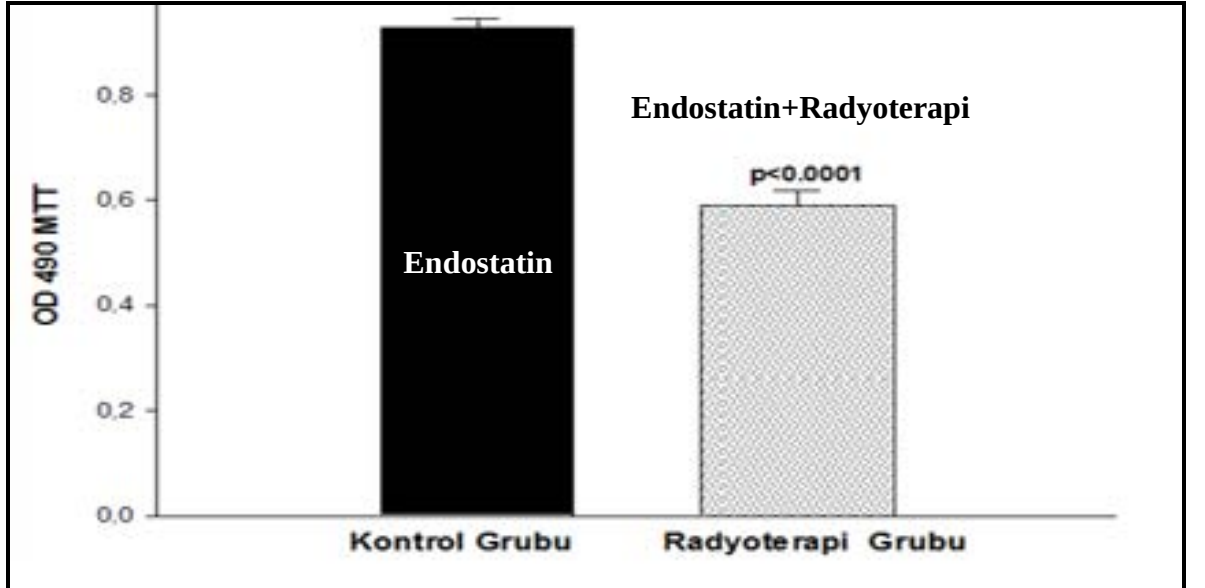
Şekil 4.39. Endostatin, 4THMpc hücreleri (5000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu deney sonuçları.

Tek başına radyoterapi uygulamasının kontrol grubundaki hücre canlılığını 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde azalttığı gösterildi (Mann-Whitney testi, $p < 0,0001$). Tek başına radyoterapinin 4THM hücre canlılığı üzerindeki etkisi aşağıdaki grafiklerde

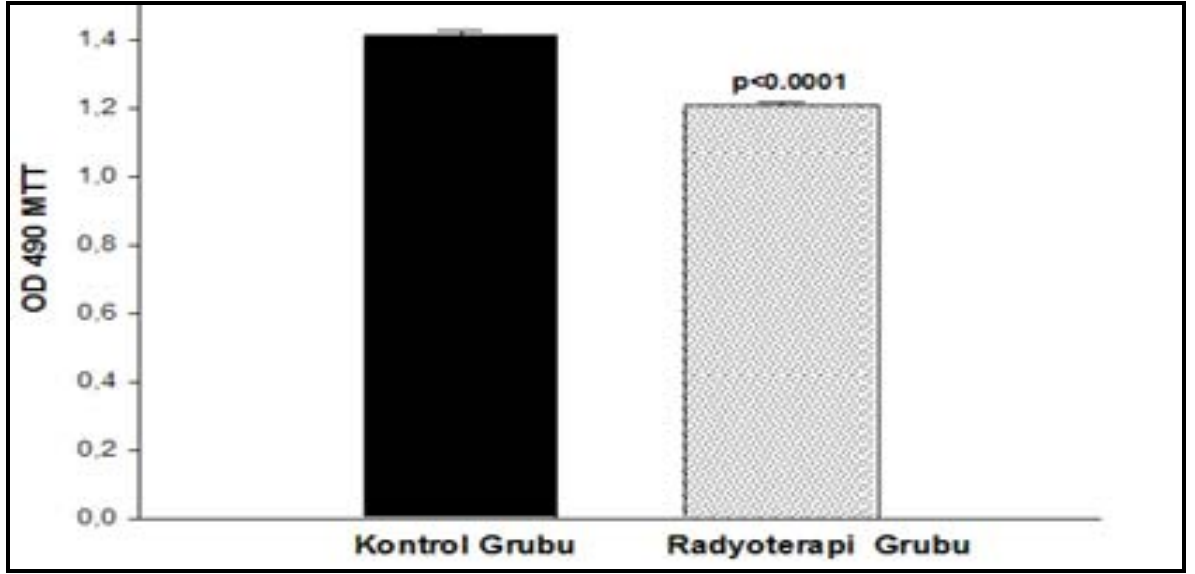
(Şekil 4.40, Şekil 4.41, Şekil 4.42) gösterildi. Tek başına radyoterapinin , endostatinin ve ikili kombinasyonun 4T1 ve 4THMpc hücreleri, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda gözlenen etkisi Şekil 4.43’de gösterildi.



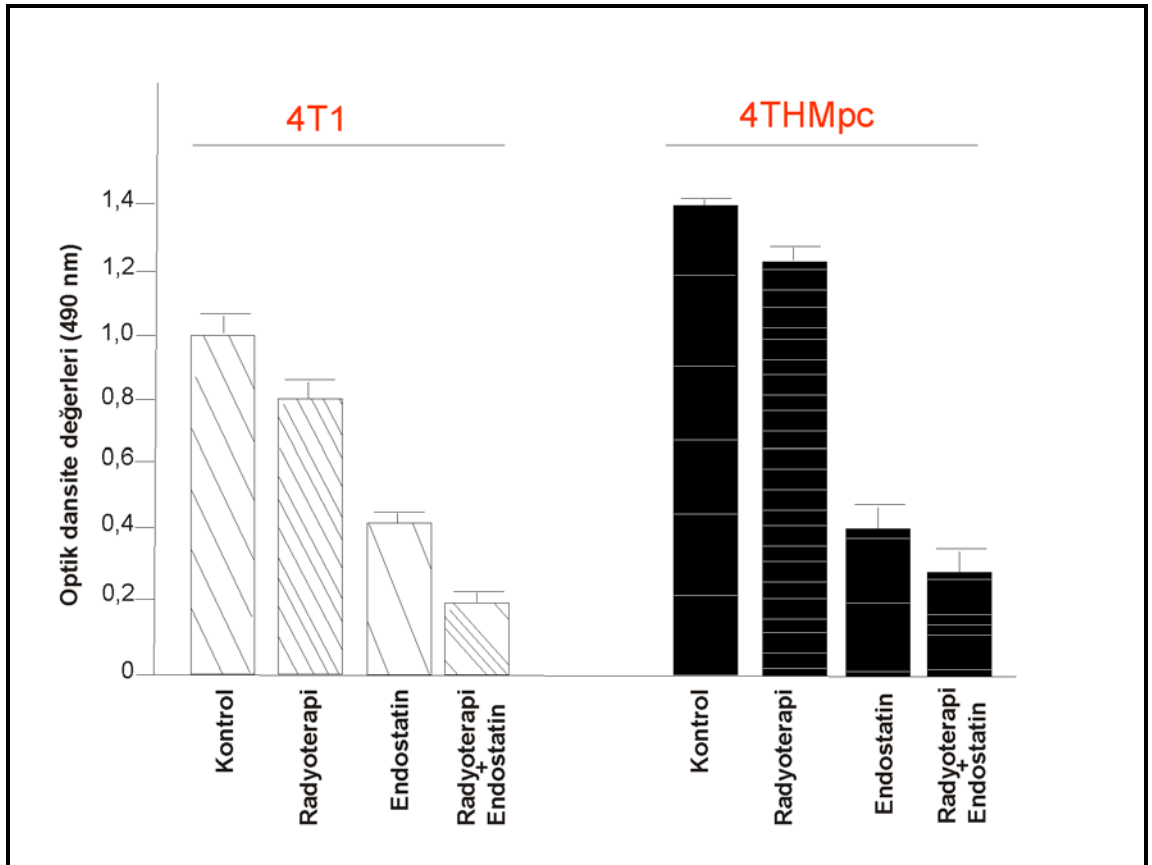
Şekil 4.40. Tek başına radyoterapinin 4THMpc hücreleri (5000 hücre) üzerine, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda gözlenen etkisi



Şekil 4.41 Tek başına radyoterapinin 4THMpc hücreleri (5000 hücre) üzerine, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda gözlenen etkisi



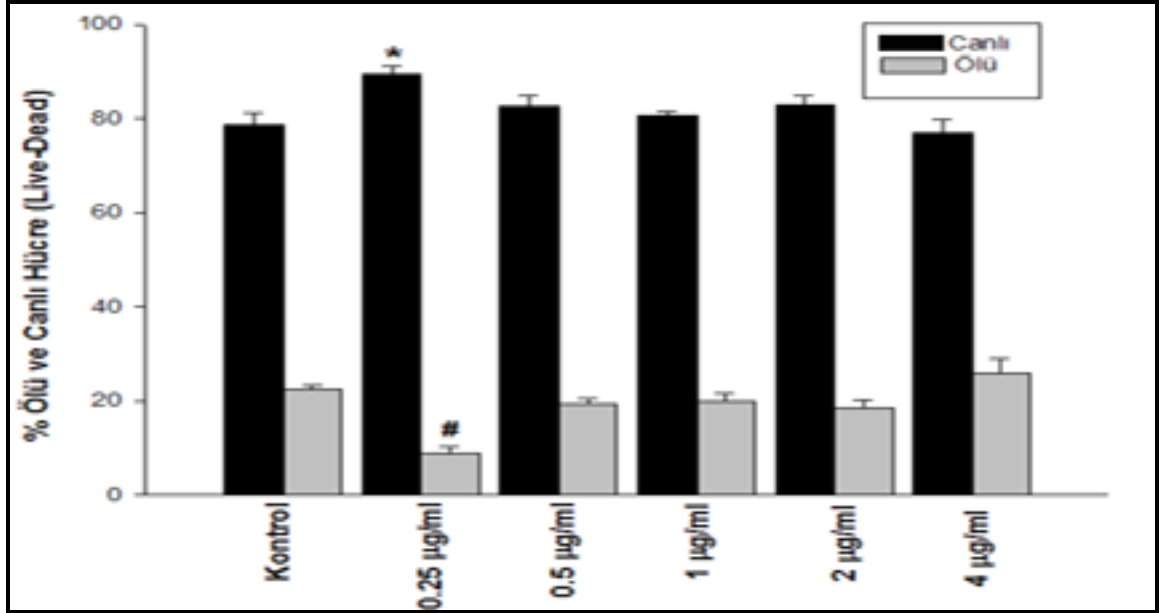
Şekil 4.42. Tek başına radyoterapinin 4THMpc hücreleri (5000 hücre) üzerine, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda gözlenen etkisi



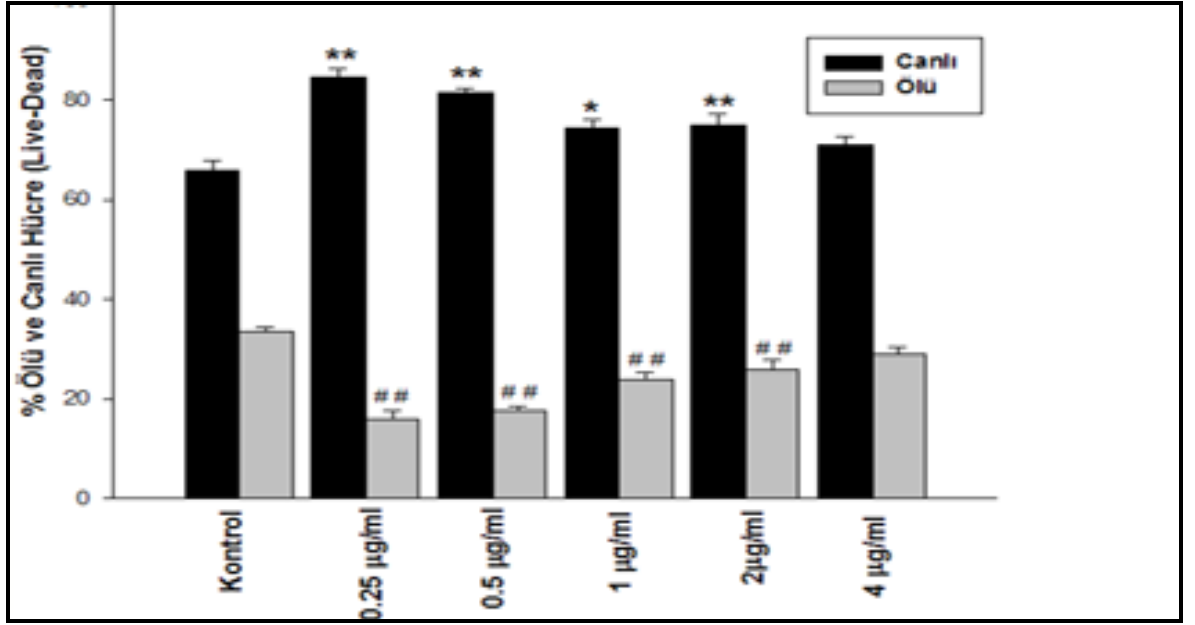
Şekil 4.43. Tek başına radyoterapinin , endostatinin ve ikili kombinasyonun 4T1 ve 4THMpc hücreleri (5000 hücre) üzerine, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda gözlenen etkisi

4.2.2. Live/Dead test sonuçları

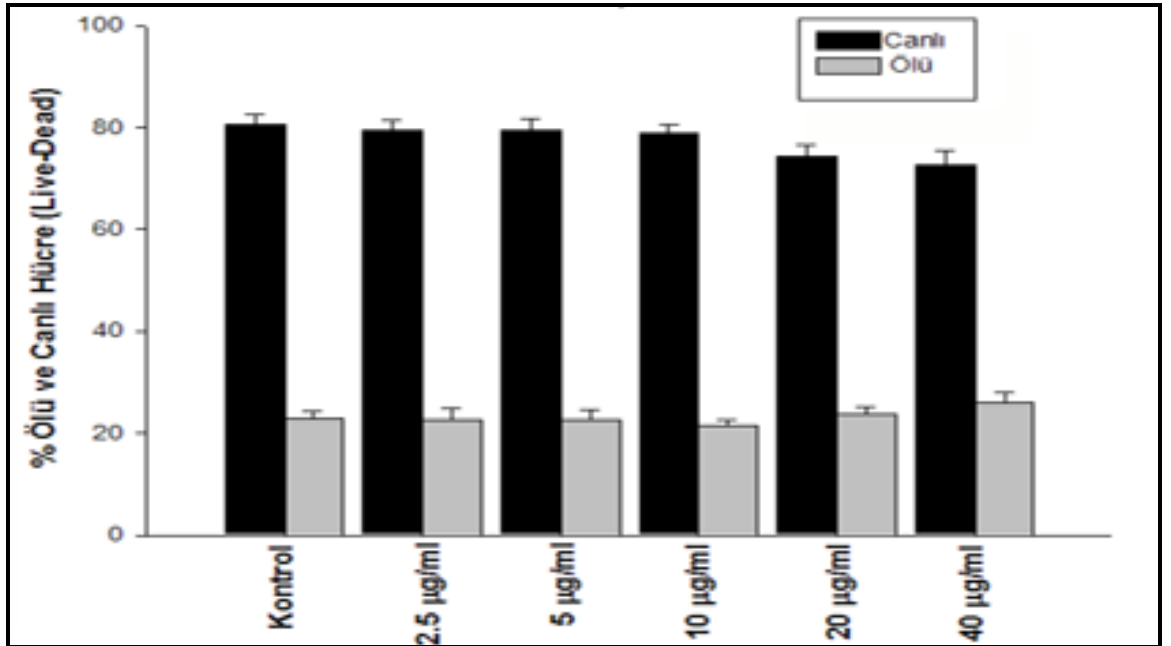
Daha önceki dozlarla yapılan deneylerde sitotoksik etki görülmediği için Live-Dead testi yapılmadı. Yeni belirlenen dozlarla yapılan MTT hücre canlılık testi sonucunda sitotoksik etki saptandı. Bu bulguyu desteklemek amacı ile aynı dozların hücreler üzerindeki etkisi Live-Dead testi ile de değerlendirildi. Dört bağımsız deneyden elde edilen veriler aşağıdaki grafiklerde sunuldu (Şekil 4.44, Şekil 4.45, Şekil 4.45, Şekil 4.47, Şekil 4.48, Şekil 4.49).



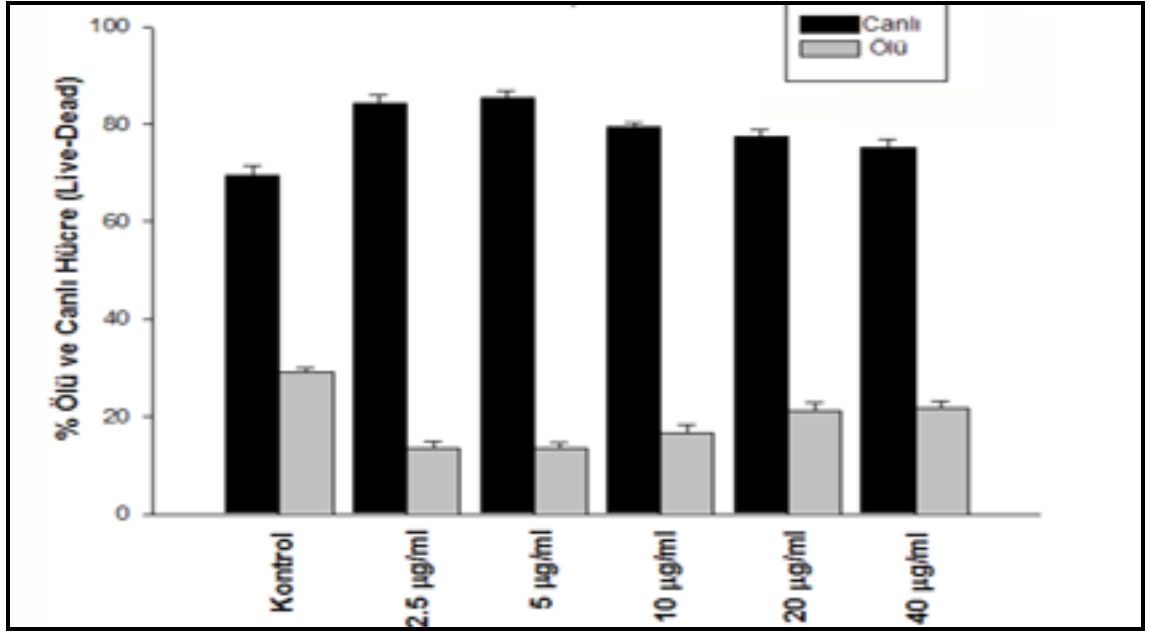
Şekil 4.44. Endostatin, 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen % canlı ve ölü hücre oranları



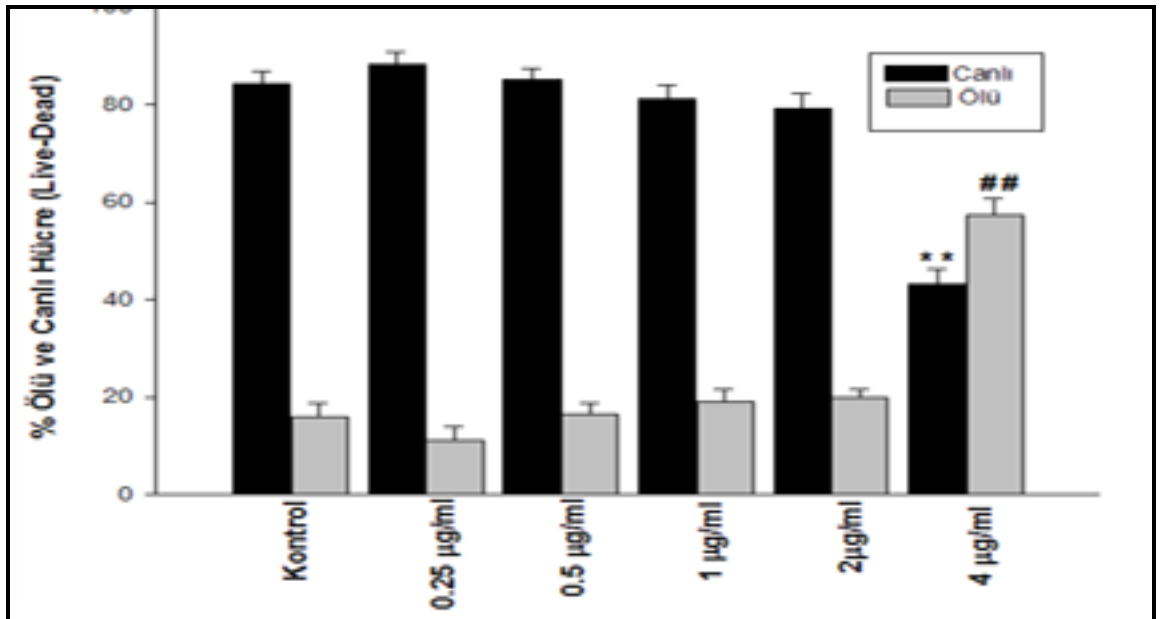
Şekil 4.45. 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu % canlı ve ölü hücre oranı



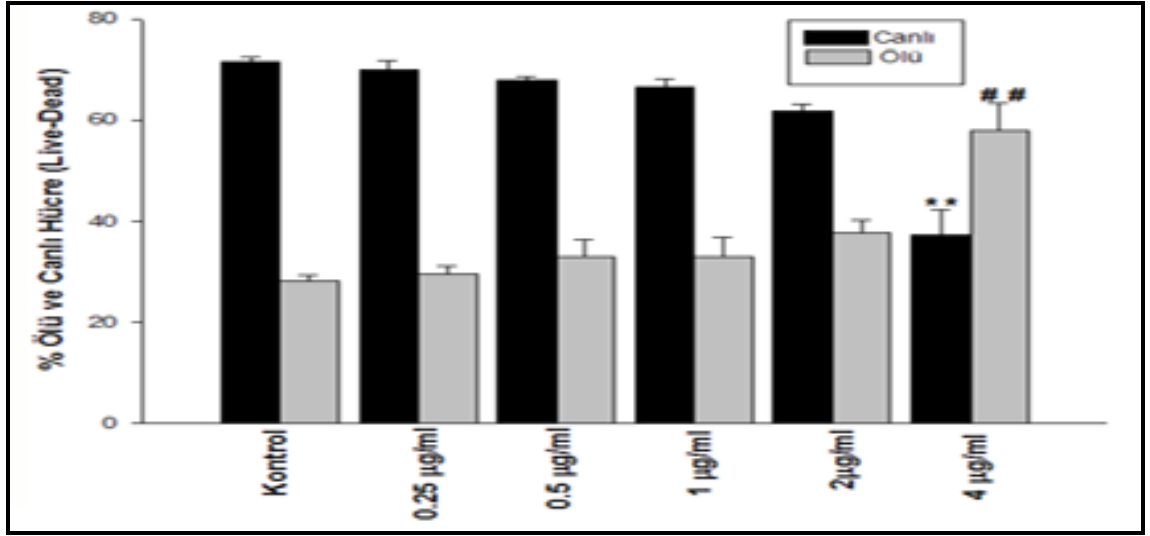
Şekil 4.46. 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Endostatin grubu % canlı ve ölü hücre oranları



Şekil 4.47. 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu % canlı ve ölü hücre oranları



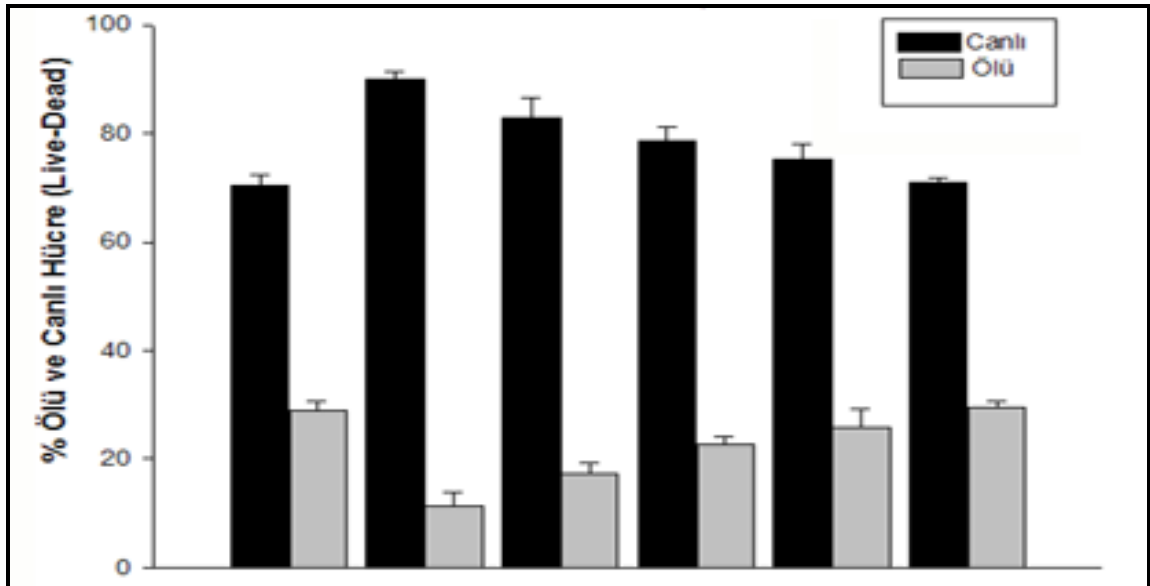
Şekil 4.48. 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Endostatin grubu % canlı ve ölü hücre oranları



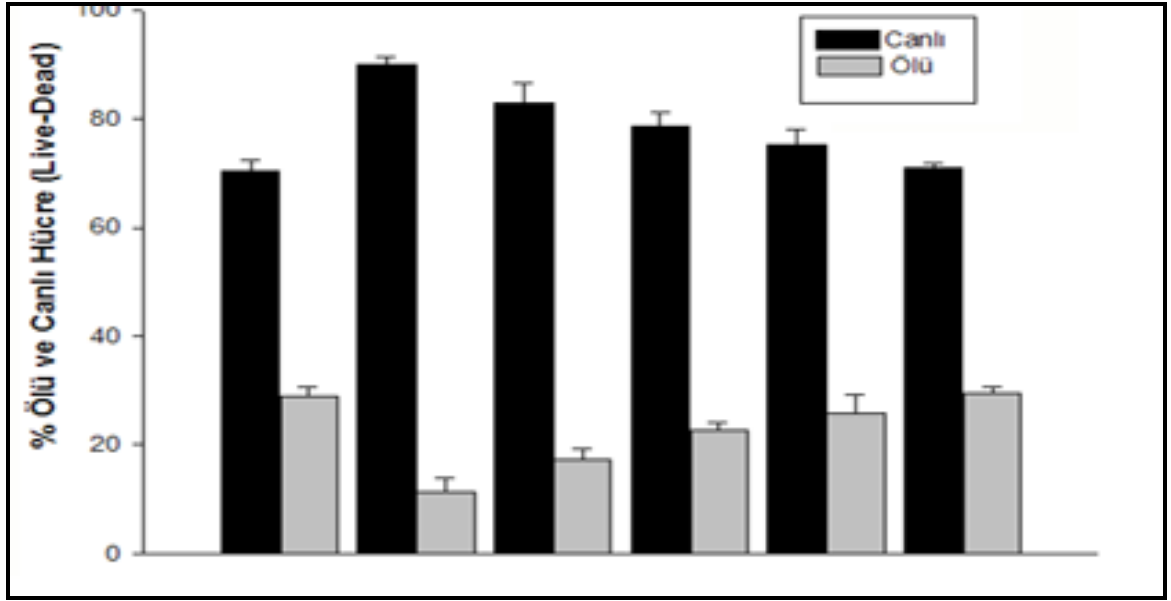
Şekil 4.49. Endostatin, 4T1 hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu % canlı ve ölü hücre oranları

Sadece 72 saatlik inkübasyon sonucunda hem kontrol hem de radyoterapi grubunda istatistiksel anlamda 4µg/ml lik doz sitotoksik etki gösterdi (canlı hücre için, *: $p < 0,01$, **: $p < 0,001$ ve ölü hücre için #: $p < 0,01$, ###: $p < 0,001$). Bu bulgu MTT test sonuçlarını desteklemektedir.

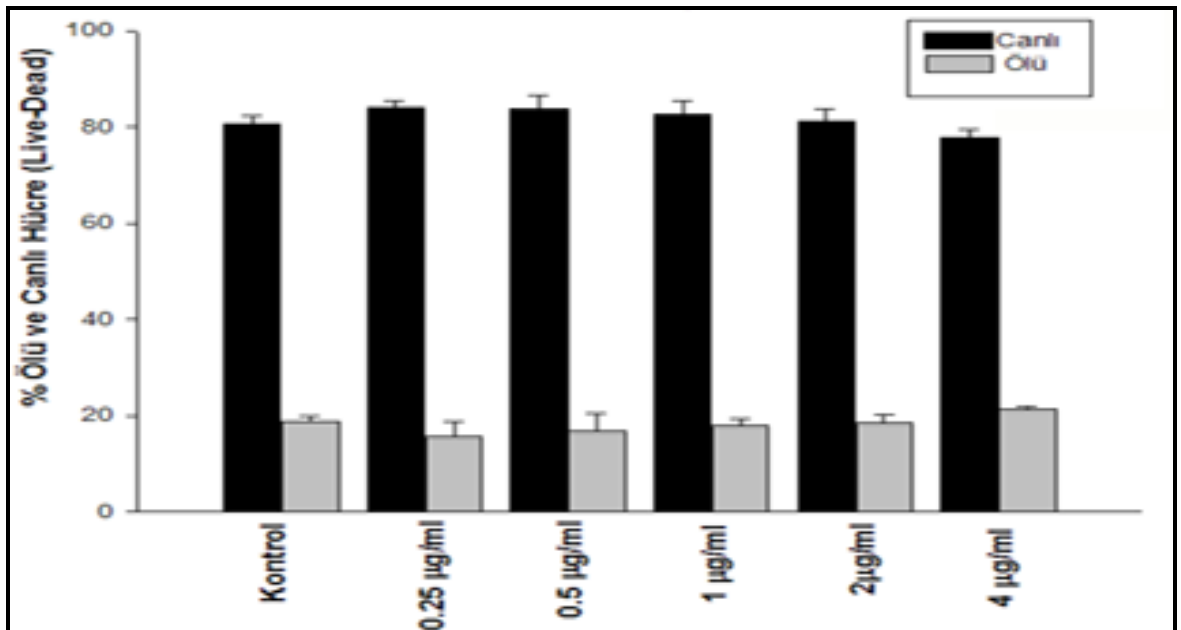
4THMpc hücrelerinde elde edilen live dead test sonuçları aşağıda verildi (Şekil 4.50, Şekil 4.51, Şekil 4.52, Şekil 4.53, Şekil 4.54, Şekil 4.55).



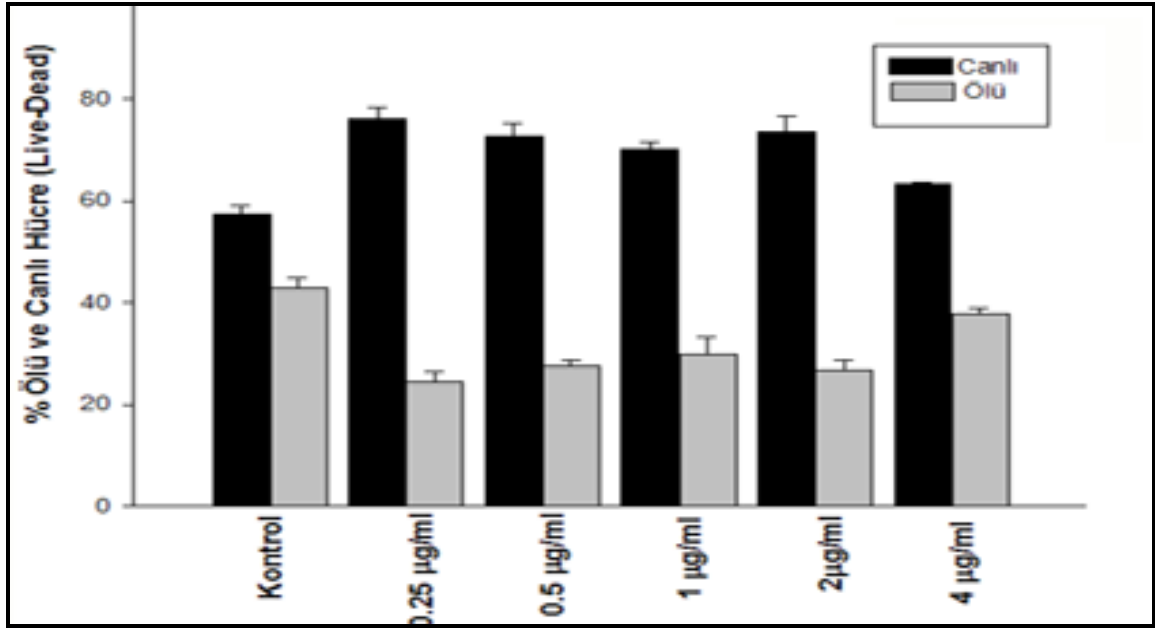
Şekil 4.50 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Endostatin grubu % canlı ve ölü hücre oranları



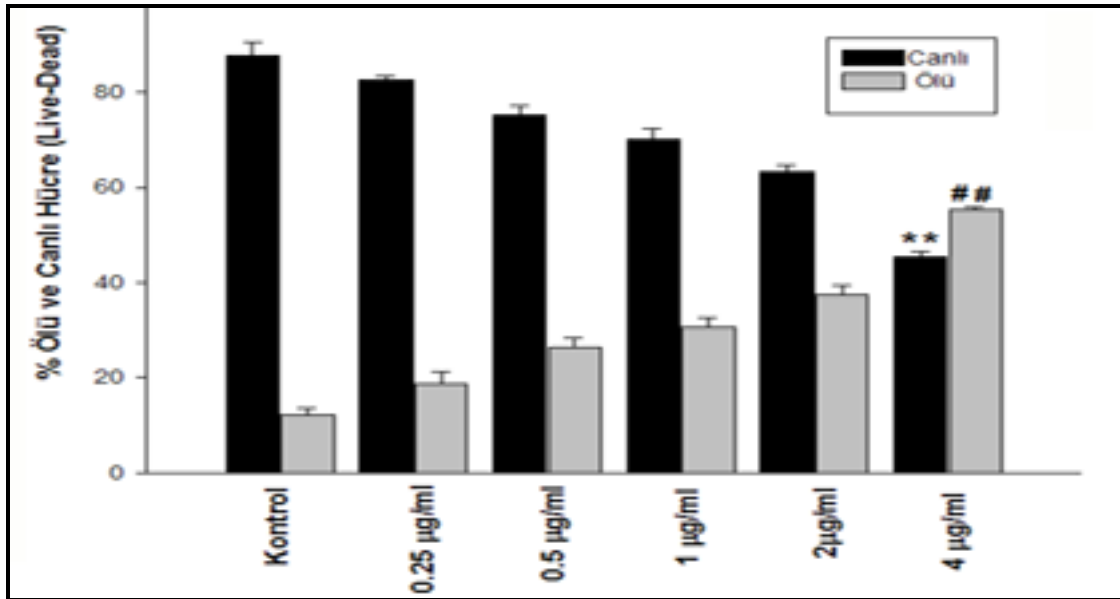
Şekil 4.51. 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu % canlı ve ölü hücre oranları



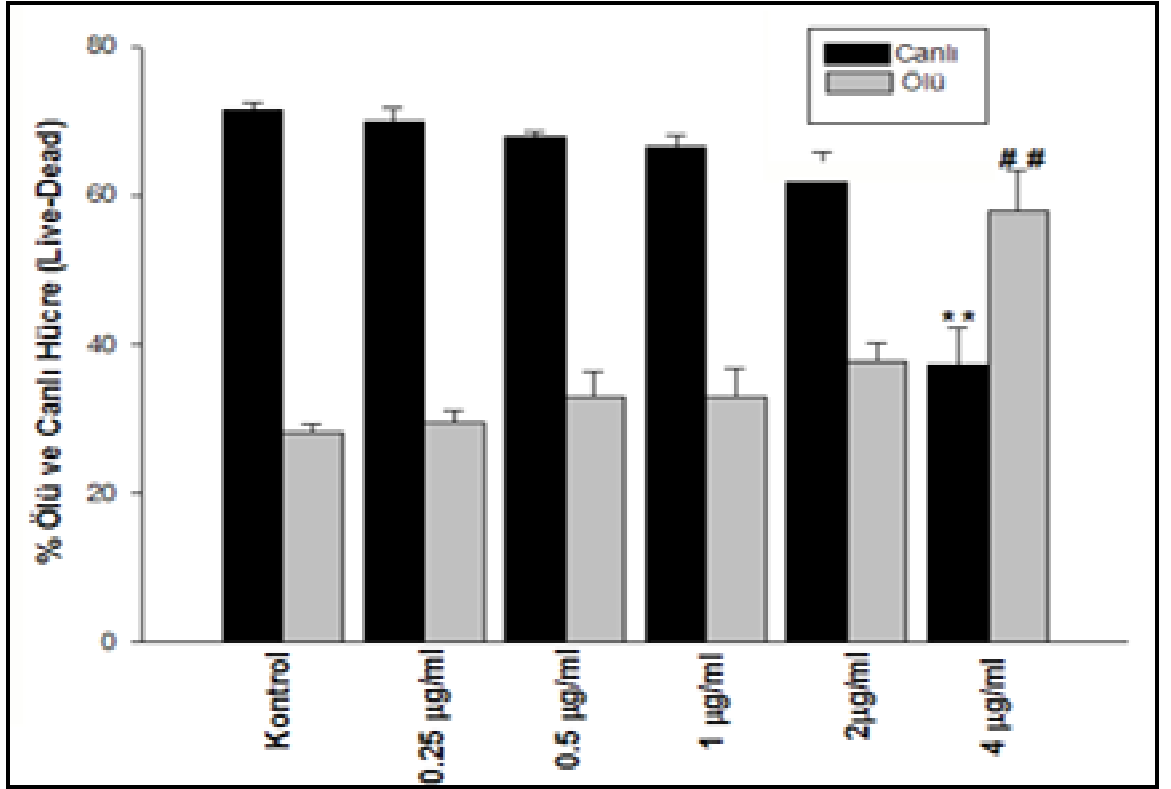
Şekil 4.52. 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Endostatin grubu % canlı ve ölü hücre oranları



Şekil 4.53. 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 48 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu % canlı ve ölü hücre oranları



Şekil 4.54. 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen Endostatin grubu canlı ve ölü hücre oranları



Şekil 4.55. 4THMpc hücreleri (10000 hücre) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası elde edilen radyoterapi grubu % canlı ve ölü hücre oranları

Grafiklerden de anlaşılabileceği gibi 4THMpc hücrelerinde de, Endostatin'in en yüksek dozu hariç diğer dozlarının hiçbirinde sitotoksik etki saptanamadı. Sadece 72 saatlik inkübasyon sonucunda hem kontrol hem de radyoterapi grubunda istatistiksel anlamda 4µg/ml lik doz sitotoksik etki gösterdi (canlı hücre için, *: $p < 0,01$, **: $p < 0,001$ ve ölü hücre için #: $p < 0,01$, ##: $p < 0,001$). Bu bulgu MTT test sonuçlarını desteklemektedir.

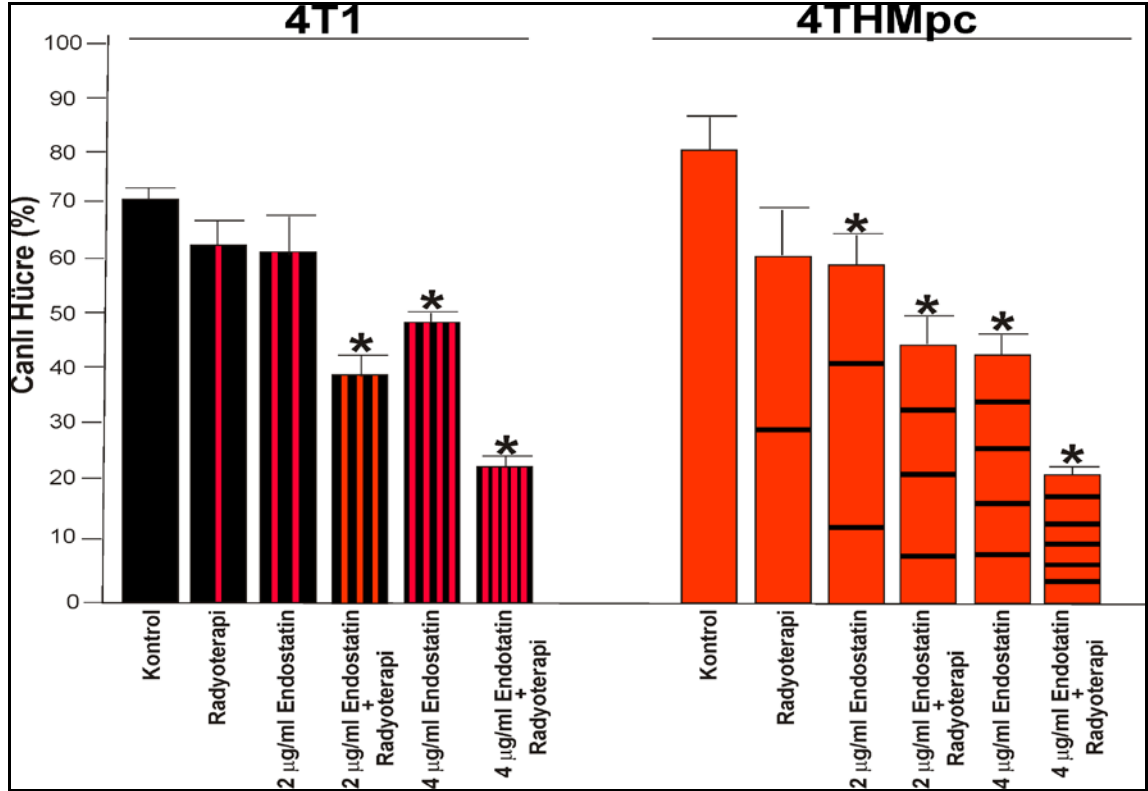
4.2.3. Tripan Mavisi test sonuçları

Dört bağımsız deneyden elde edilen veriler Tablo 4.1'de sunuldu. Tripan mavisi testinden elde edilen sonuçlar, diğer toksisite testlerine benzer şekilde; Endostatin için sitotoksik etkili dozun 4µg/ml olduğunu göstermektedir (Şekil 4.56).

Çizelge 4.1. 4T1 ve 4THM hücre hatlarının Farklı Endostatin Dozları ve İnkübasyon Sürelerindeki Canlılık Oranları

	Doz (µg/ml)	4T1			4THM		
		24 saat	48 saat	72 saat	24 saat	48 saat	72 saat
Endostatin Grubu	Kontrol	79±1.307	75,25± 3.569	70±1.357	88,75±2,423	85,5±2,619	80,75±3.005
	0,25	91,25±2.443	80,75± 2,820	81,5±3.739	92,5±1..552	88.25±2.730	76,25±2.304
	0,5	83,5±3.045	74,5± 2,043	79,75±1,887	92,25±2,733	85,5±2.529	72±3.166
	1	79,75±3,711	76,75± 3,15	75,25±2,041	87±2.934	82.75±3.335	67,5±4.290
	2	85,25±3.624	79± 2,378	62,5±3,509	85,5±2.826	80±1.2.190	60±2.444*
	4	73.75±2.837	71± 2,574	39,5±1.102 *	90,75±2.502	76.25±2.119	41,75±1.438 *
Radyoterapi Grubu	Kontrol	63,75±2.673	63,5±3.715	62.75±2.709	56,5±1.217	49,75±1.742	60.5±3.631
	0,25	85,5±1.712	70,25±3.003	60,5±3.275	69,25±2.258	68,25±3.309	55.75±2.657
	0,5	87,25±2.136	74.75±1.877	55.25±1,941	71±2. 883	68.75±2.234	52,75±1.780
	1	83±2.816	76.5±1.325	51±3,385	67,75±1,629	62,25±1.670	49±2.426*
	2	87,75±3.478	79±3.256	49,75±2.569*	70,25±2,667	60,75±1.266	42±2.957*
	4	78,5±0.938	75.75±2.744	23.5±1.347 *	62,5±1.198	56±1.251	22,75±0.816 *

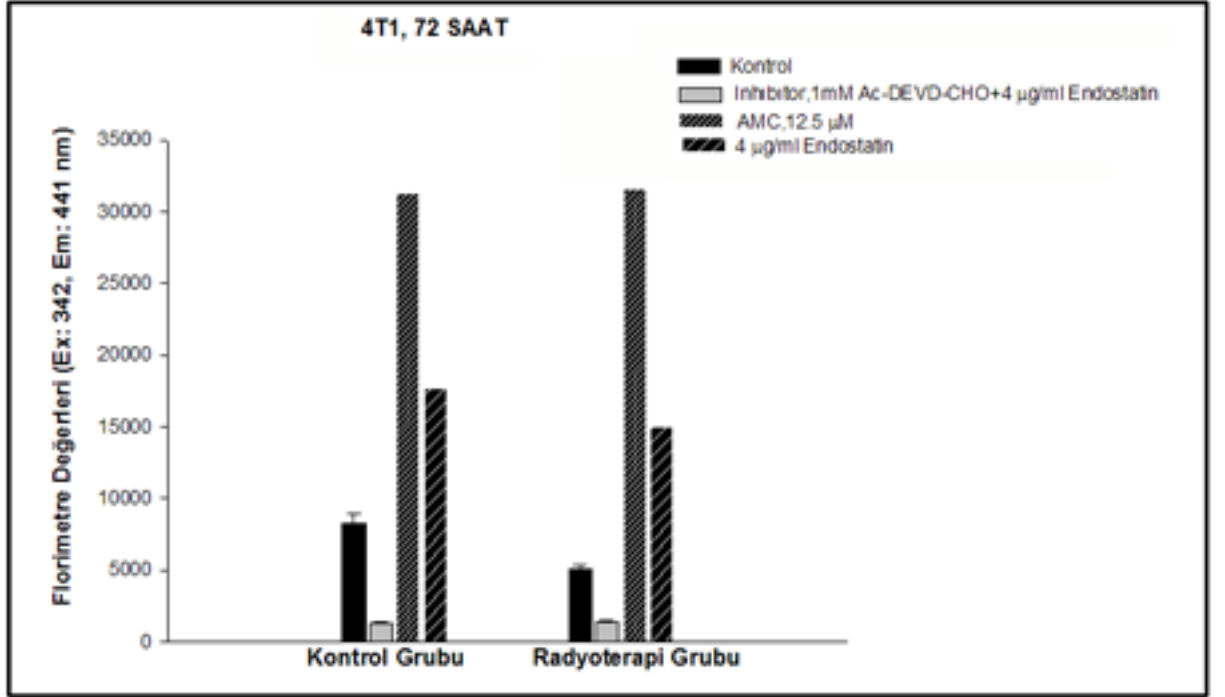
4 Farklı deneyden elde edilen verilerin ortalamaları ve standart deviasyonları (ort±SD)(*: p<0.05)



Şekil 4.56. 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde tripan mavisi testinden elde edilen canlı hücre sayılarının karşılaştırılması

4.2.4. Kaspaz-3 enzim aktivitesi test sonuçları

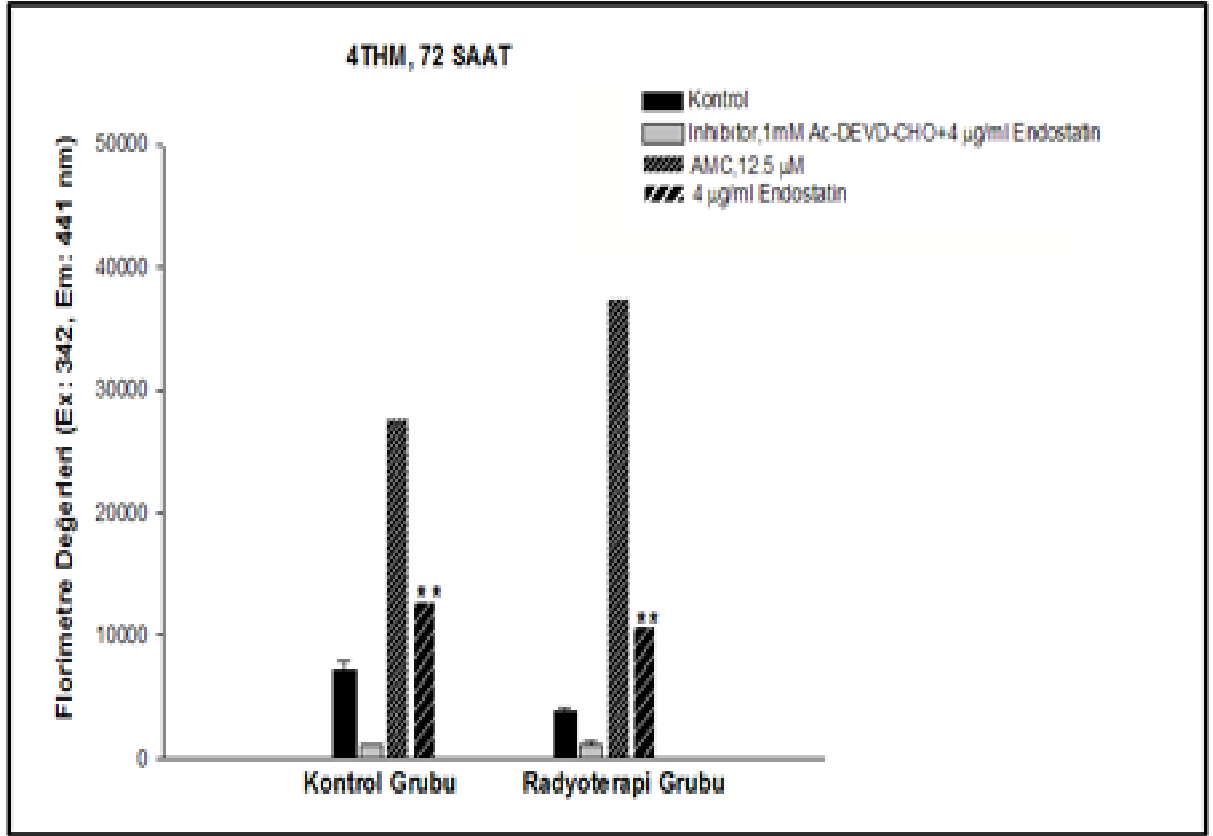
4T1 ve 4THM hücreleri için, sitotoksite testleri sonucunda 24 ve 48 saatte etkili bir doz saptanamadı. 72 saatlik inkübasyon sonunda ise her iki hücre hattında 4 µg/ml'lik Endostatin sitotoksik bulundu. Bu nedenle Kaspaz-3 Enzim aktivite testinin bu dozda ve bu inkübasyon süresi sonunda yapılmasına karar verildi.



Şekil 4.57. 4T1 hücreleri (1x 10⁶) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan deneylerde, 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası Kaspaz-3 enzim aktivitesindeki artış

4T1 Hücre hattında, 4 µg/ml Endostatin uygulamasının 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, kaspaz 3 enzim aktivitesinde kontrol grubuna oranla bir artış saptanmadı. Bu bulgu diğer tüm sitotoksite testlerinden elde edilen sonuçlarla oldukça uyumludur. 72 saatlik inkübasyon sonunda kontrol grubunda 4 µg/ml Endostatin uygulanan hücrelerde hiç ilaç uygulanmayan kontrol hücrelerine oranla, kaspaz 3 enzim aktivitesinin 2, 15 kat artırdığı saptandı (Şekil 4.57) (**: p< 0.001).

Radyoterapi grubunda ise, 72 saatlik inkübasyon sonunda 4 µg/ml Endostatin uygulanan hücrelerde hiç ilaç uygulanmayan kontrol hücrelerine oranla, kaspaz 3 enzim aktivitesinin 2,98 kat artırdığı saptandı (Şekil 4.57). (**: $p < 0.001$).



Şekil 4.58. 4THMpc hücreleri (1×10^6) ile %1 serumlu besiyeri kullanılarak yapılan deneylerde, 72 saatlik inkübasyon süresi sonrası Kaspaz-3 enzim aktivitesindeki artış.

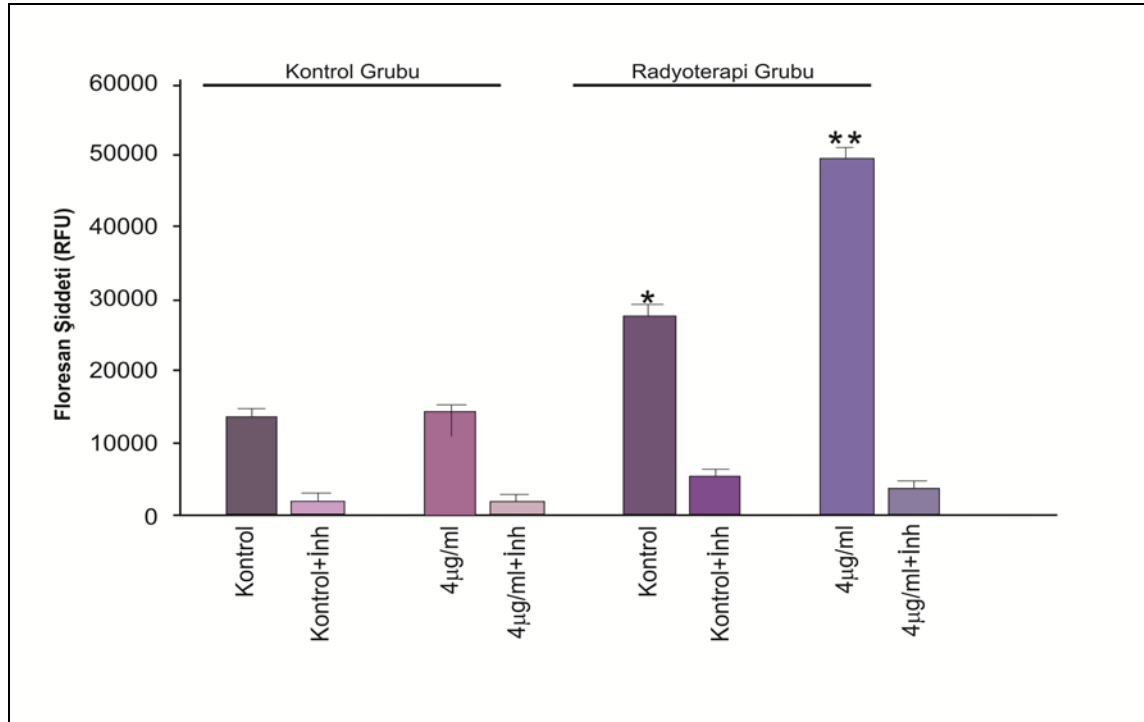
4THM Hücre hattında, 4 µg/ml Endostatin uygulamasının 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, kaspaz 3 enzim aktivitesinde kontrol grubuna oranla bir artış saptanmadı. Bu bulgu diğer tüm sitotoksisite testlerinden elde edilen sonuçlarla oldukça uyumludur. 72 saatlik inkübasyon sonunda kontrol grubunda 4 µg/ml Endostatin uygulanan hücrelerde hiç ilaç uygulanmayan kontrol hücrelerine oranla, kaspaz 3 enzim aktivitesinin 1.76 kat artırdığı saptandı (Şekil 4.58). (**: $p < 0.001$).

Radyoterapi grubunda ise, 72 saatlik inkübasyon sonunda 4 µg/ml Endostatin uygulanan hücrelerde hiç ilaç uygulanmayan kontrol hücrelerine oranla, kaspaz 3 enzim aktivitesinin 2,525 kat artırdığı saptandı (Şekil 4.58). (**: $p < 0.001$).

4.3. Endostatin'in ADAM-10 enzim aktivitesi üzerine etkisi

Endostatin tek başına, 4T1 hücrelerinde bazal seviyede bulunan ADAM-10 enzim miktarını kontrol grubunda değıştirmedir. Buna karşılık, 45 gray radyoterapi uygulaması sonucu, tek başına radyoterapi ADAM-10 enzim aktivitesini istatistiksel açıdan anlamlı bir şekilde artırırken, bu etki Endostatin-Radyoterapi kombine tedavi uygulanmasıyla net bir biçimde ve istatistiksel anlamda oldukça önemli derecede ($p<0,001$) (Şekil 4.59) artırdı.

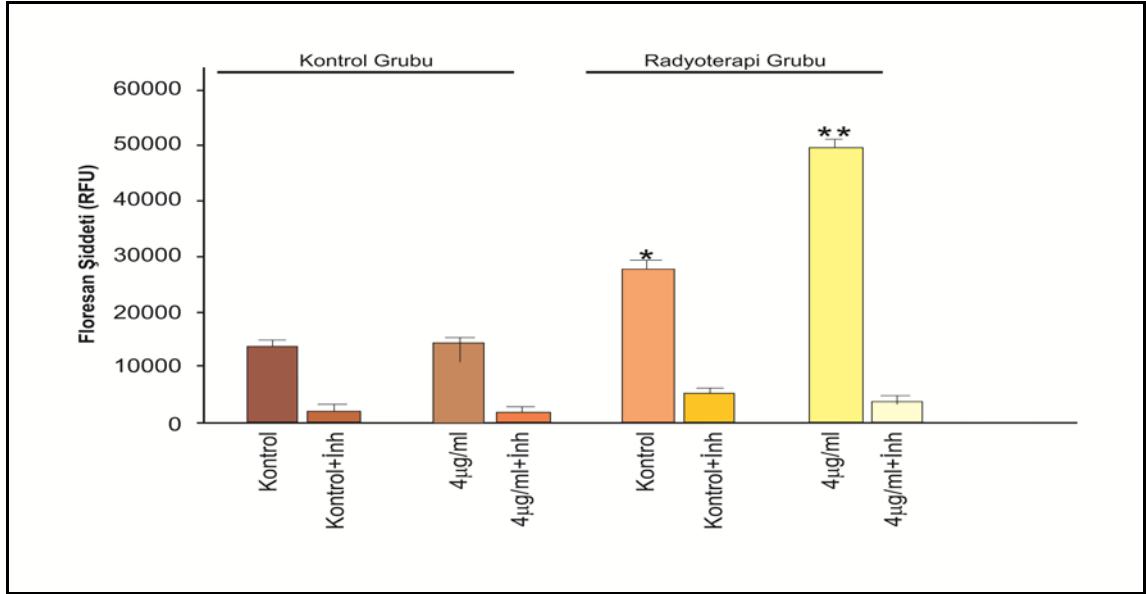
Bununla birlikte, 4T1 hücrelerinin kalp metastazı olan agresif 4THMpc hücrelerinde, 4T1 hücrelerine oranla bazal seviyede daha yüksek olan ADAM-10 enzim aktivitesinin tek başına ve radyoterapi ile kombine olarak uygulanan Endostatin'e bağılı olarak oldukça anlamlı derece de arttığı belirlendi.



Şekil 4.59. Endostatin'in 4T1 hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda ADAM-10 enzim aktivitesi üzerine etkisi

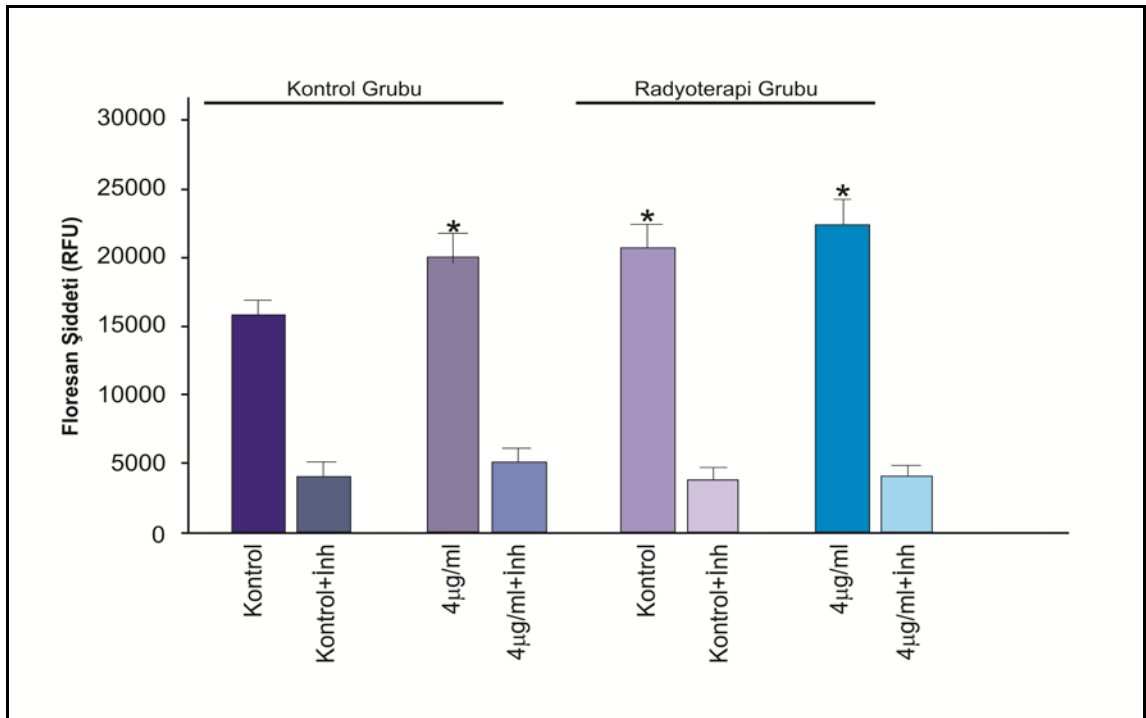
4THMpc hücrelerinde, Endostatin ve radyoterapi tek başlarına bazal seviyedeki ADAM-10 enzim aktivitesini anlamlı derecede arttırdı (Şekil 4.60). Ayrıca, Endostatin-

Radyoterapi kombine tedavisi de aynı şekilde ADAM-10 enzim aktivitesinde oldukça anlamlı bir artışa neden oldu.



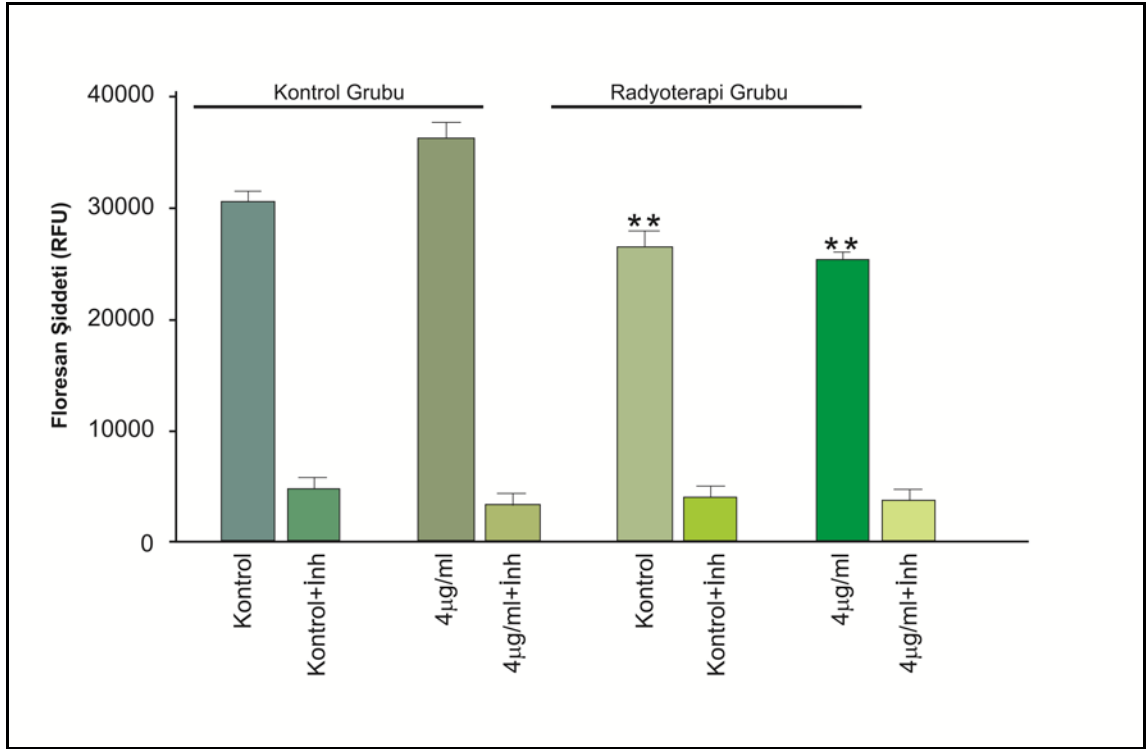
Şekil 4.60. Endostatin'in 4THMpc hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda ADAM-10 enzim aktivitesi üzerine etkisi.

4.4. Endostatin'in Neprilizin enzim aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 4.61. Endostatin'in 4T1 hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda Neprilizin enzim aktivitesi üzerine etkisi

Grafikten de görüleceği gibi, 4T1 hücrelerinde Endostatin tek başına Neprilizin enzim aktivitesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadı. Bununla birlikte, tek başına 45 gray radyoterapi uygulaması anlamlı bir şekilde enzim aktivitesini azaltırken, Endostatin-radyoterapi kombine tedavisi ise neprilizin enzim aktivitesini oldukça anlamlı bir şekilde artırdı (Şekil 4.61).



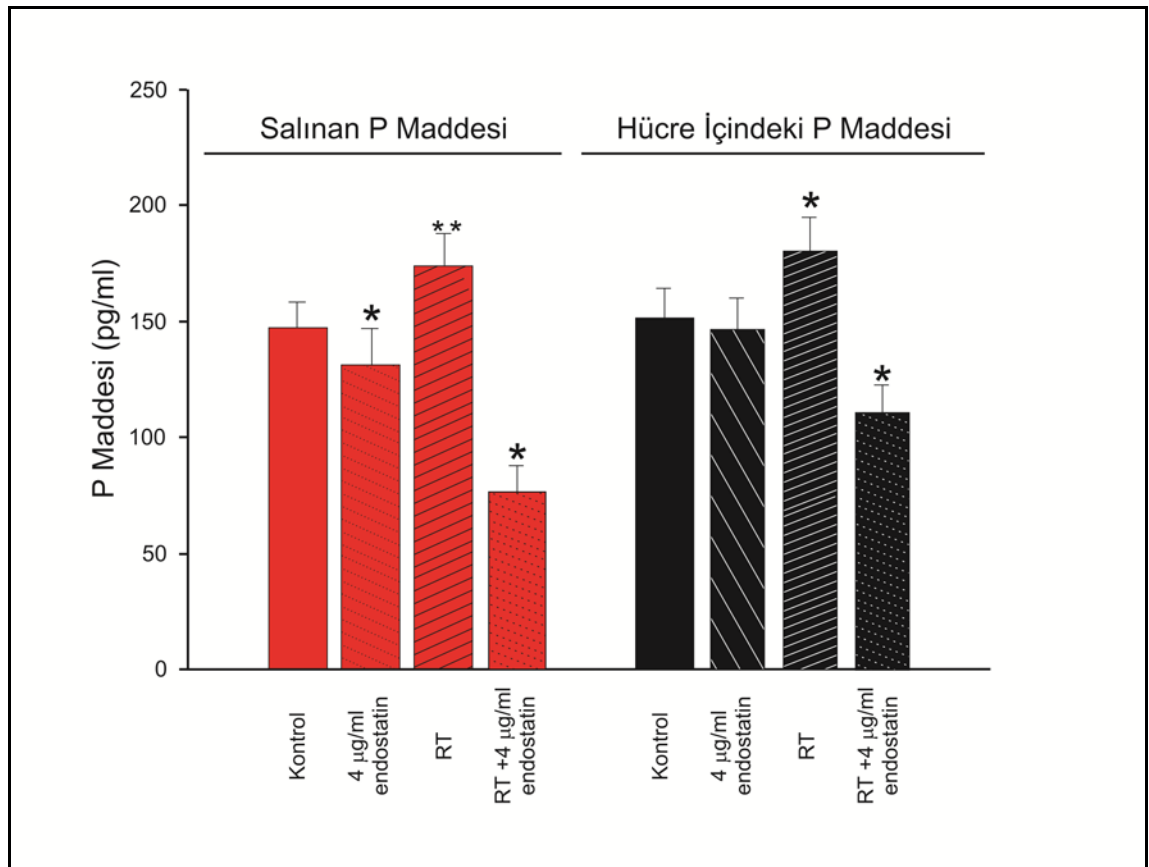
Şekil 4.62. Endostatin'in 4THMpc hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda Neprilizin enzim aktivitesi üzerine etkisi.

Endostatin 4T1 hücrelerindeki etkisine benzer şekilde Neprilizin enzim aktivitesini kontrol grubunda tek başına çok az artırırken, hem 45 gray radyoterapi uygulaması hemde Endostatin-radyoterapi kombine tedavi 4THMpc hücrelerinde Neprilizin enzim aktivitesini anlamlı derece de azaltmıştır (Şekil 4.62).

4.5. Endostatin'in P maddesi miktarları üzerine etkileri

4.5.1. 4T1 hücre hattında Endostatin'in P maddesi miktarları üzerine etkileri

4T1 hücre hattında endostatin'in tek başına ve radyoterapi ile kombine olarak hücre içinde bulunan ve besiyeria salınan P maddesi miktarları üzerine etkileri aşağıdaki grafikte gösterildi (Şekil 4.63).



Şekil 4.63. Endostatin'in 4T1 hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre içindeki ve besiyeria salınan P maddesi miktarları üzerine etkisi

Yukarıdaki grafikten de anlaşılabileceği gibi, endostatin 4T1 hücre hattında besiyeria salınan P maddesini tek başına anlamlı bir şekilde azalttı. 45 gray radyoterapi uygulaması ise tek başına besiyeria salınan P maddesi miktarını kontrole oranla anlamlı bir şekilde artırdı ($p<0,01$). Endostatin ve radyoterapi kombine tedavi ise tek başına

radıyoterapi uygulamasının tersine besiyeria salınan P maddesi miktarını anlamlı bir şekilde azalttı. tek başına endostatin uygulaması hücre içindeki P maddesi miktarı üzerine etki göstermezken tek başına radyoterapi uygulaması hücre içi P maddesi miktarını artırdı. endostatin-radyoterapi kombine tedavisi ise hücre içindeki P maddesi miktarını anlamlı derece de azalttı.

4.5.2. 4THMpc hücre hattında Endostatin'in P maddesi miktarları üzerine etkileri

4THMpc hücre hattında endostatin'in tek başına ve radyoterapi ile kombine olarak hücre içinde bulunan ve besiyeria salınan P maddesi miktarları üzerine etkileri aşağıdaki grafikte gösterildi (Şekil 4.64).

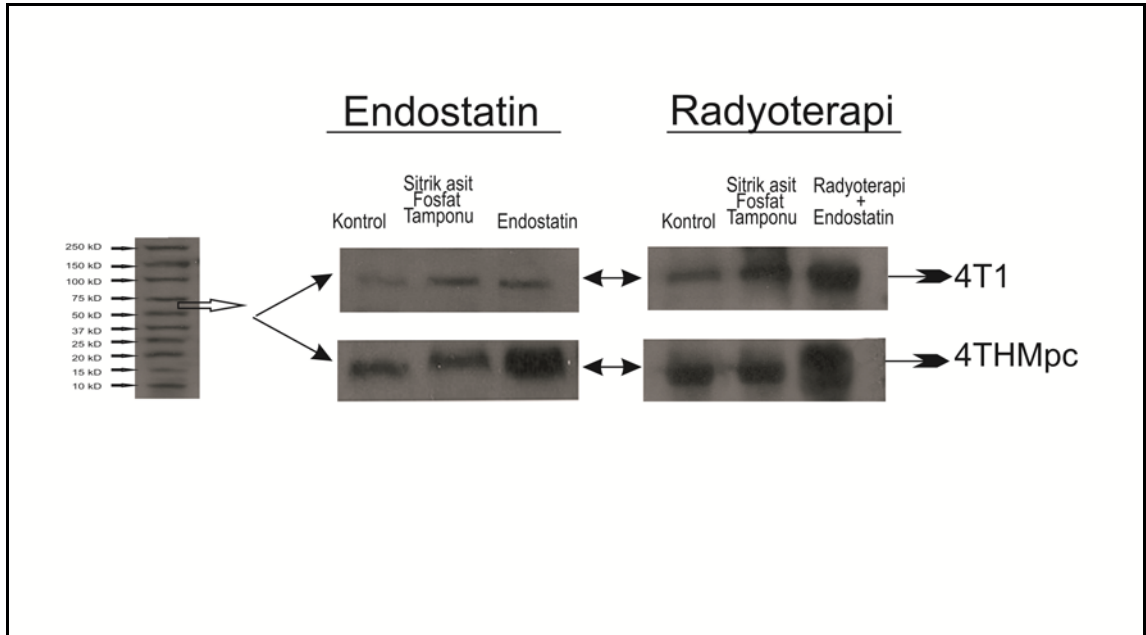


Şekil 4.64. Endostatin'in 4THMpc hücre hattında, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre içindeki ve besiyeria salınan P maddesi miktarları üzerine etkisi.

Grafikten anlaşıldığı gibi, endostatin 4T1 hücre hattında besiyeria salınan P maddesini miktarı üzerine anlamlı bir etki göstermedi. Tek başına radyoterapi uygulaması ve Endostatin-radyoterapi kombine tedavi, besiyeria salınan P maddesi miktarını anlamlı derece de azalttı ($p<0,05$). Tek başına Endostatin ve tek başına radyoterapi uygulamaları hücre içindeki P maddesi miktarı üzerine anlamlı bir etki göstermezken, Endostatin-radyoterapi kombine tedavisi hücre içindeki P maddesi miktarını önemli derece de azalttı ($p<0,01$)

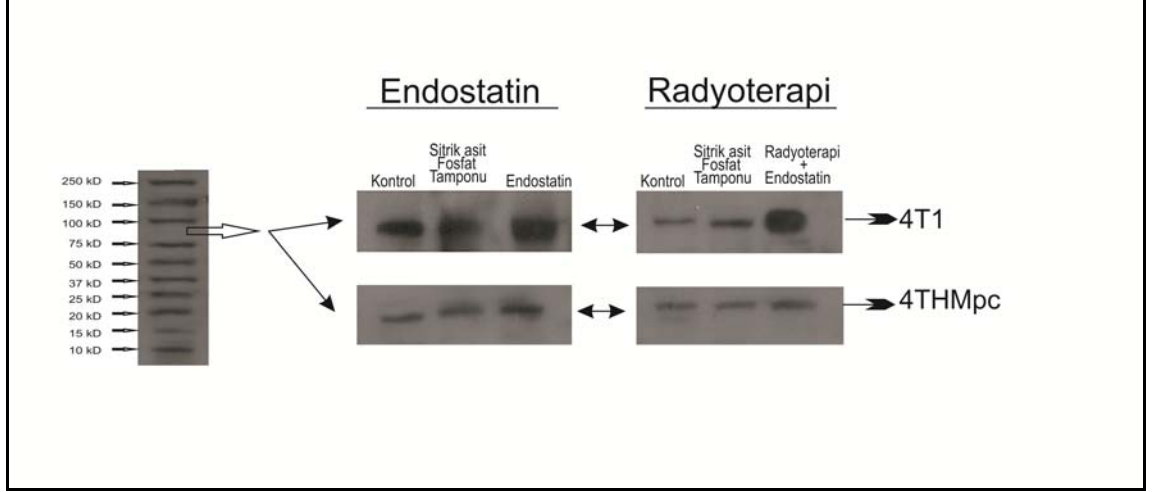
4.6. Endostatin'in Western-Blot Sonuçları

4.6.1. Endostatin'in ADAM 10 enzimi Western blot sonuçları



Şekil 4.65. Endostatin'in tek başına ve radyoterapi ile kombine olarak ADAM-10 enzim aktivitesi üzerine etkilerinin western-blot ile gösterilmesi

4.6.2. Endostatin'in Neprilizin enzimi Western blot sonuçları



Şekil 4.66. Endostatin'in tek başına ve radyoterapi ile kombine olarak Neprilizin enzim aktivitesi üzerine etkilerinin western-blot ile gösterilmesi

5. TARTIŞMA

5.1 Radyoterapinin 4T1 ve 4THMpc Hücre Hatları Üzerine Etkisi

Klasik kanser tedavileri arasında yer alan radyoterapi, tümörün sadece dış yüzeyine etki edebildiği için, beklenildiği kadar başarı sağlamamaktadır. Aksine, tümörde yüksek radyasyon nedeni ile oluşan hipoksik ortam korkunç bir mekanizmayı tetiklemekle görevli olan bazı büyüme faktörlerinin salınımını uyarmaktadır. Kısaca, yüksek radyasyon dokunun oksijensizleşmesine neden olur. Oksijenin konsantrasyonuna bağlı olarak aktive olan HIF-1 tetiklenir ve vasküler endotel büyüme faktörü olan VEGF'in salınımını sağlar (Zheng vd 2005). O halde, tedavi beklenirken radyoterapi, aslında, yüksek dozlarda kullanılır ise, tümör büyümesini teşvik eder. Bu nedenle tüm dünyadaki radyasyon onkologları, radyoterapiyi küçük doz ve fraksiyonlar halinde uygulayarak kısmen bu hazin sona engel olmaya çalışırlar (Connell vd 2004).

Anjiogenik faktörler, bir kez tetiklenince tümörün büyümesi, invazyonu ve metastazı kaçınılmazdır. Bu nedenle radyoterapi, antianjiogenik terapiler ile uygulanmaktadır. Bu sayede hipoksik koşulların tetikleyeceği anjiogenik faktörler, baştan, ya inhibe edilir ya da salınmaları engellenir. Bu bağlamda, çalışmamızda 4T1 ve 4THMpc hücre hatları üzerine düşük fraksiyonlu (5, 10 ve 20 Gy) ışınlamalar uygulanmıştır. Tüm meme kanser hücreleri gibi, 4T1 fare meme kanser hücreleri de oldukça metastazik özelliğe sahiptir. Metastazik özelliklerin tamamen tümör hücresinin lehine olduğu düşünülürse, uygulanan düşük fraksiyonlardaki radyasyona dirençli olmaları beklenen bir sonuçtur. 4THMpc hücrelerini daha saldırgan yapan genetik özellikler, doğal olarak, tedaviye daha fazla direnç göstermelerine de neden olabilir. Bu direnç, radyoterapi tek başına kullanılacak ise doz artışı ile kırılabilir.

Düşük dozlarda uygulanan ⁶⁰Cobalt, hücrelerde sitotoksik etki yaratmamıştır. Kullanılan dozlar kadar, hücre sayısı da tedavinin sonuçlarını etkilemiştir. Farklı hücre sayılarında denenen radyoterapi farklı sonuçlara yol açmıştır. Hücre sayısı artırıldığında, ⁶⁰Cobalt'ın yol açtığı hücre ölüm oranı azalmıştır. Bu noktada, radyoterapinin başarısının tümör büyüklüğüne bağlı olarak nasıl değiştiği net bir şekilde

anlaşılmaktadır. Tümör büyüklüğündeki artış, radyasyonun hücreye ulaşma olasılığını azaltmakta ve beklenen etki sağlanamamaktadır.

Palyatif tedaviler düşük dozlar kullanılarak yapılan ve küratif bir tedavi kadar etki sağlayamayan radyoterapi şekilleridir. Ancak, palyatif radyoterapi normal dokuların çok daha az zarar görmesine neden olduğu için daha sıklıkla tercih edilir(Emami vd 1991). 45 Gy ışınlama, ilk bakışta oldukça yüksek bir dozmuş gibi algılansa da, küratif tedavilerde kullanılan dozdan daha düşüktür.

5.2. Endostatin'in Tek Başına ve Radyoterapi ile Kombine Olarak 4T1 ve 4THMpc Üzerine Gösterdiği Sitotoksik Etkiler

Bazal membrana ait kollajen XVIII'in internal bir fragmenti olan Endostatin son yıllarda potansiyel bir antianjiogenik ajan olarak kabul edilmektedir. Rekombinant Endostatin kullanılarak yapılan sistemik terapiler, anjiogenezin inhibisyonu ile, tümörde küçülme sağlamaktadır. Endostatin tümör hücrelerinin proliferasyonunu etkilemeden apoptoz oranını artırır. Yapılan pek çok çalışmada Endostatinin anti-tümoral etkisi in vivo gösterilse de, in vitro koşullarda tümör hücrelerinde sitotoksik etki yaratmadığı genel geçer bir teori olarak pek çok bilim adamı tarafından kabul edilmekte ve desteklenmektedir.

1971 yılında keşfedilen bu peptit ile ilgili o yıllardan bu yana pek çok araştırma yapılmış olsada Endostatin etki mekanizması hala gizemini korumaktadır. Endostatin anti anjiogenik bir peptit olduğu için doğrudan hedefleri arasında tümör hücreleri değil tümör için yeni damar oluşumunu sağlayacak olan endoteller yer almaktadır (Shichiri ve Hirata 2001).Endostatin'in neden endotel hücrelere spesifik olduğu, başka bir deyişle kanser hücrelerinde neden sitotoksik bir yanıt oluşturmadığı henüz aydınlatılamamıştır.

Yapılan bir çok çalışmada Endostatinin in vitro ve in vivo aktivitesi bifazik doz yanıt eğrisi ile gösterilmektedir. Endostatinin anti-tümoral etkisi düşük dozlarda ve uzun süreli uygulamalarda ortaya çıkmaktadır. Belirli bir doz aralığında tümör hücrelerinde inhibisyon sağlayan peptit, eşik değerin üstünde hiçbir etki yaratmamaktadır. Tüm anti-kanser tedavilerinin başarısının tümör boyuna bağlı olduğuda bir gerçektir. Bu bilgi ışığında çalışmamızda Endostatinin 4T1 ve 4THMpc fare meme kanser hücreleri

üzerine göstereceği olası etkiler, öncelikle düşük dozlarda, olabildiğince uzun inkübasyon sürelerinde ve farklı hücre sayıları kullanılarak değerlendirilmiştir.

Endostatin her iki hücre hattında da 10^{-8} -1µg/ml lik doz aralığında, tek başına ve 45 Gy Cobalt 60 kaynağı ile birlikte ışınlanarak, kullanılmıştır. Endostatin 4T1 hücrelerinde bu doz aralığında istatistiksel açıdan önemli kabul edilebilecek sitotoksik etkiler sergilemiştir ancak tekrarlanan denemelerden hiçbirinde hiçbir doz için benzer sonuçlar alınamamıştır. Örneğin 1000 hücre kullanılarak gerçekleştirilen denemelerden bir tanesinde Endostatin en yüksek dozu olan 1µg/ml de hücre canlılığını % 25.52 oranında azaltırken, aynı koşulların kullanıldığı tekrar denemelerinde 1µg/ml hücre canlılığını % 2.5, % 67.9, %15.7 ve % 9 oranında azaltmıştır. 1000 hücre ile yapılan endostatin ve radyoterapinin birlikte uygulandığı denemelerde ise radyoterapi ve endostatin etkisinin kıyaslanabileceği tutarlı sonuçlar alınamamıştır. Radyoterapi her denemede farklı endostatin dozu ile sinerjizm yaratmıştır. Hücre sayısı 3000 olarak değiştirildiğinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir.

4THMpc hücre hattında 1000 hücrede 1µg/ml dozdaki endostatin hücrelerin canlılığını azaltmamış, ancak % 11.38 oranında arttırmıştır. 4THMpc hücrelerinin 4T1 hücrelerinin kalp metastazı olduğu düşünülürse sonuç şaşırtıcı olmaz, beklenildiği gibi 4THMpc hücreleri endostatin tedavisine direnç göstereceklerdir. Ancak bazı tekrar denemelerinde 4THMpc hücre hattında canlılığın %17, %54 ve % 35.60 oranında azaldığı saptanmıştır. Yapılan beşinci tekrarda canlı hücre sayısının % 41.25 oranında arttığı tespit edilmiştir. Değerler arasındaki önemli fark endostatinin doğru doz aralığında kullanılmadığını açıkça göstermektedir. 1µg/ml endostatin ve 4 gy radyoterapinin kombine olarak uygulanması sonrasında, radyoterapi tek başına canlı hücre sayısında % 18 azalmaya neden olmuştur. Endostatin ile radyoterapi birlikte ters bir etki yaratarak canlı hücre sayısında % 4.5'luk bir artışa yol açmıştır. 3000 hücrede yapılan denemelerde ise 1µg/ml Endostatin tek başına canlı hücre sayısını % 40 oranında azaltırken, 45 Gy radyoterapi tek başına canlı 4THMpc hücre sayısını % 57 oranında azaltmış ve kombine tedavileri ise % 61 oranında hücre sayısında azalmaya yol açmıştır. Her iki tedavi tipinin tek başına hücreler üzerindeki etkisi kombine uygulamadan daha etkilidir.

Her iki hücre hattında da elde edilen değişik bulgular, endostatinin bu hücrelerde de bifazik doz-yanıt eğrisi oluşumuna neden olduğunu düşündürmektedir. Yukarıda da

belirtildiği gibi Endostatin etkisi doz ve zamana hassas şekilde bağlıdır. Ayrıca yapılan çalışmalarda besiyerine eklenen serum miktarının, endostatinin hücreler üzerinde gösterdiği sitotoksik etkiyi değiştirdiği gözlenmiş ve besiyerine eklenen serum hücrelerin canlı kalması için gerekli olan minimum seviyede tutulmuştur (%1).

Her ne kadar Endostatin olabildiğince düşük konsantrasyonlarda kullanılmak istense de elde edilen bulgular Endostatin konsantrasyonunun değiştirilmesi gerektiğini göstermektedir. Bu nedenle 4 µg/ml ve 2.5×10^{-1} µg/ml arasında, yarı yarıya dilüsyon ile hazırlanan yeni dozlarda Endostatinin etkisi tekrar araştırılmıştır.

4T1 hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonucunda Endostatin tek başına canlı hücre sayısını azaltmamış aksine istatistiksel açıdan önemli kabul edilecek kadar arttırmıştır. En düşük dozda (2.5×10^{-1} µg/ml) canlı hücre sayısında % 57 oranında, en yüksek dozda ise (4 µg/ml) % 1.2 oranında bir artış saptanmıştır. 45 Gy radyoterapi uygulaması ise tek başına canlı hücre sayısını % 25 oranında azaltmaktadır. 4 µg/ml Endostatin ve radyoterapi uygulaması ise şaşırtıcı bir şekilde canlı hücre sayısında % 64 oranında bir artmaya neden olmuştur. İnkübasyon süresi 48 saate çıktığında ise, Endostatin tek başına en düşük dozda (2.5×10^{-1} µg/ml) canlı hücre sayısında % 16 oranında artışa yol açarken, en yüksek dozda ise (4 µg/ml) bu kez % 8.052 oranında bir azalmaya neden olmuştur. Zamana bağlı olarak en düşük dozda görülen değişiklik dikkat çekicidir. 45 Gy radyoterapi uygulaması ise tek başına canlı hücre sayısını % 10.96 oranında azaltmaktadır. Radyoterapinin tek başına gösterdiği etki de zamana bağlı olarak değişmektedir. 4 µg/ml Endostatin ve radyoterapi birlikte uygulaması ise canlı hücre sayısında % 12.85 oranında bir azalmaya neden olmaktadır. 72 saatlik inkübasyon süresinden sonra Endostatin tek başına en düşük dozda (2.5×10^{-1} µg/ml) canlı hücre sayısında % 17.22 oranında artışa yol açarken en yüksek dozda ise (4 µg/ml) bu kez % 58.47 oranında bir azalma saptanmıştır. Zaman dilimi arttıkça Endostatinin düşük dozlarında, canlı hücre sayısının da arttığı dikkat çekmektedir. 45 Gy radyoterapi uygulaması ise tek başına canlı hücre sayısını % 16.13 oranında azaltmaktadır. İnkübasyon süresi arttıkça radyoterapinin tek başına gösterdiği etki de artmaktadır. 4 µg/ml Endostatin ve radyoterapi uygulaması ise canlı hücre sayısında % 71.05 oranında bir azalmaya neden olmaktadır.

4THMpc hücrelerinde ise 24 saatlik inkübasyon sonucunda Endostatin tek başına canlı hücre sayısını azaltmamış aksine istatistiksel açıdan önemli kabul edilecek kadar

artırmıştır. En düşük dozda (2.5×10^{-1} µg/ml) canlı hücre sayısında % 82 oranında artış, en yüksek dozda ise (4 µg/ml) % 5.73 oranında bir azalma saptanmıştır. 45 Gy radyoterapi uygulaması ise tek başına canlı hücre sayısını % 22.8 azaltmaktadır. 4 µg/ml Endostatin ve radyoterapi uygulaması ise şaşırtıcı bir şekilde canlı hücre sayısında % 31.72 oranında azaltmıştır. İnkübasyon süresi 48 saate çıktığında ise, Endostatin tek başına en düşük dozda (2.5×10^{-1} µg/ml) canlı hücre sayısında % 58 oranında artışa yol açarken , en yüksek dozda ise (4 µg/ml) bu kez % 5.695 oranında bir azalmaya neden olmuştur. 45 Gy radyoterapi uygulaması ise tek başına canlı hücre sayısını % 35.75 oranında azaltmaktadır. Radyoterapinin tek başına gösterdiği etki de zamana bağlı olarak değişmektedir. 4 µg/ml Endostatin ve radyoterapi uygulaması ise canlı hücre sayısında % 15.90 oranında bir azalmaya neden olmaktadır. 72 saatlik inkübasyon süresinden sonra Endostatin tek başına en düşük dozda (2.5×10^{-1} µg/ml) canlı hücre sayısında % 18.81 oranında azalma, en yüksek dozda ise (4 µg/ml) bu kez % 73.12 bir azalma saptanmıştır. İnkübasyon süresindeki artış ile birlikte düşük dozların hücre üzerinde sitotoksik etki yarattığını göstermektedir. 45 Gy radyoterapi uygulaması ise tek başına canlı hücre sayısını % 23.57 oranında azaltmaktadır. İnkübasyon süresi arttıkça radyoterapinin tek başına gösterdiği etki de artmaktadır. 4 µg/ml Endostatin ve radyoterapi uygulaması ise canlı hücre sayısında % 84.02 oranında bir azalmaya neden olmaktadır.

Teorik olarak 4THMpc hücrelerinin anti kanser tedavilere daha dirençli olması beklenirken, Endostatin bir kez daha kafa karıştırıcı bir özelliği ile karşımıza çıkmaktadır.

Sonuçlardan da görülebileceği gibi 2.5µg/ml lik Endostatin 24 saat sonunda her iki hücrede de canlı hücre sayısını arttırmış, hatta bu etki beklenildiği gibi 4THMpc hücrelerinde daha da dikkat çekici bir hal almıştır. En yüksek doz ise 4T1 hücrelerinde canlı hücre sayısında artış sağlarken 4THMpc metastazik meme hücrelerinin canlılığında önemli bir azalma meydana gelmiştir. Bu süre sonunda iki hücre hattı da radyoterapiye benzer yanıtlar vermiştir. Kombine tedavi uygulaması sonrasında ise canlı 4T1 hücre sayısında artış saptanırken, 4THMpc hücreleri kombine tedaviye olumlu yanıt vererek canlı hücre sayısında azalmaya yol açmıştır. İnkübasyon süresindeki artış

4T1 ve 4THMpc hücrelerinde düşük dozlarda farklı etkiler yaratmıştır. Beklenenin tam aksine 4T1 hücrelerinin artan inkübasyon süresi ile birlikte Endostatine daha dirençli oldukları açık bir şekilde görülmektedir. Benzer şekilde 4THMpc hücrelerinin kombine tedaviye daha hassas oldukları da saptanmıştır.

Elde edilen veriler farklı sitotoksik testlerle de doğrulanmıştır. Live dead testi ile Endostatin uygulaması sonrasında hem canlı hem de ölü hücre sayıları tespit edilmiştir. 4T1 hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonucunda Endostatin tek başına canlı hücre sayısını azaltmamış aksine istatistiksel açıdan önemli kabul edilecek kadar artırmıştır. Kontrol grubunda canlı hücre sayısı % 78.5 iken Endostatinin denenen doz aralığında (en düşük-en yüksek) hesaplanan canlı hücre sayısı sırasıyla % 89.5, % 82.75, % 80.5, % 83.5 ve % 77'dir. 45 Gy radyoterapi uygulaması ise tek başına canlı hücre sayısını % 78.5'den % 66'ya azaltmıştır. 4 µg/ml Endostatin ve radyoterapi uygulaması birlikte canlı hücre sayısını % 78.5'den % 71'e indirmiştir. Tek başına radyoterapi ile kombine tedavi kıyaslandığında ise canlı hücre sayısında artış olduğu saptanmıştır. Inkübasyon süresi 48 saate çıktığında ise, kontrol grubunda canlı hücre sayısı % 80.5 iken Endostatinin denenen doz aralığında (en düşük-en yüksek) hesaplanan canlı hücre sayısı sırasıyla % 79.5, % 79.5, % 78.75, % 74.25 ve % 72.75'dir. 45 Gy radyoterapi uygulaması ise tek başına canlı hücre sayısını % 80.5'den % 69.5'e azaltmıştır. 4 µg/ml Endostatin ve radyoterapi uygulaması birlikte canlı hücre sayısını % 80.5'den % 75.25'e indirmiştir. Tek başına radyoterapi ve kombine tedavi kıyaslandığında ise canlı hücre sayısında artış olduğu saptanmıştır.

72 saatlik inkübasyon süresinden sonra kontrol grubunda canlı hücre sayısı % 84.25 iken Endostatinin denenen doz aralığında (en düşük-en yüksek) hesaplanan canlı hücre sayısı sırasıyla % 88.25, % 85.25, % 81.25, % 79.25 ve % 43.25'dir. Görüldüğü gibi Endostatin 4 µg/ml lik dozda canlı hücre sayısını dramatik bir şekilde azaltmıştır. 45 Gy radyoterapi uygulaması ise tek başına canlı hücre sayısını % 88.25'den % 71.5'e azaltmıştır. 4 µg/ml Endostatin ve radyoterapi uygulaması birlikte canlı hücre sayısını % 80.5'den % 37.25'e indirmiştir. Tek başına radyoterapi ve kombine tedavi kıyaslandığında ise canlı hücre sayısında önemli bir azalma meydana gelmiştir.

4THMpc hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonucunda kontrol grubunda canlı hücre sayısı % 70.5 iken Endostatinin denenen doz aralığında (en düşük-en yüksek) hesaplanan canlı hücre sayısı sırasıyla % 90.0, % 82,75, % 78.5, % 75,25 ve % 71dir. 45 Gy radyoterapi uygulaması ise tek başına canlı hücre sayısını % 70.5'den % 65.75'e azaltmıştır. 4 µg/ml Endostatin ve radyoterapi uygulaması birlikte canlı hücre sayısını % 70.5'den % 62'ye indirmiştir. Tek başına radyoterapi ile kombine tedavi kıyaslandığında ise canlı hücre sayısında azalma olduğu saptanmıştır.

İnkübasyon süresi 48 saate çıktığında ise, kontrol grubunda canlı hücre sayısı % 80,5 iken Endostatinin denenen doz aralığında (en düşük-en yüksek) hesaplanan canlı hücre sayısı sırasıyla % 84 , % 83.75, % 82.5, % 81.25ve % 77.75 dir. 45 Gy radyoterapi uygulaması ise tek başına canlı hücre sayısını % 80.5'den % 57.25'e azaltmıştır. 4 µg/ml Endostatin ve radyoterapi uygulaması birlikte canlı hücre sayısını % 80.5'den % 63.25 'e indirmiştir. Tek başına radyoterapi ve kombine tedavi kıyaslandığında ise canlı hücre sayısında artış olduğu saptanmıştır.

72 saatlik inkübasyon süresinden sonra kontrol grubunda canlı hücre sayısı % 87,75 iken Endostatinin denenen doz aralığında (en düşük-en yüksek) hesaplanan canlı hücre sayısı sırasıyla % 82,5 , % 75.25, % 70, % 63.25ve % 45.5 dir. Görüldüğü gibi Endostatin 4 µg /ml lik dozda canlı hücre sayısının ı dramatik bir şekilde azaltmıştır. 45 Gy radyoterapi uygulaması ise tek başına canlı hücre sayısını % 88.25'den % 71.5'e azaltmıştır. 4 µg/ml Endostatin ve radyoterapi uygulaması birlikte canlı hücre sayısını % 80.5'den % 37.25 'e indirmiştir. Tek başına radyoterapi ve kombine tedavi kıyaslandığında ise canlı hücre sayısında önemli bir azalma meydana gelmiştir. Her iki test sonunda Endostatin hücreler üzerinde benzer etkiler sergilemiş ve yapılan tripan mavisi ile bu ön iki bulgu desteklenmiştir (Bulgular kısmında tablo halinde sunulmuştur).

Bugüne kadar yapılan bir çok çalışmada, Endostatin'in invitro koşullarda tümör hücrelerinin proliferasyonu üzerine herhangi bir etki yaratmadığı belirtilmiştir. Jing ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Endostatinin kolon kanser (CD26) ve damar endotel hücrelerinin (HUVEC) proliferasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Endostatin geni

CD26 hücrelerine klonlanmış, Endostatin ekspre eden CD26 hücrelerinin büyümesinde dört gün sonunda bile bir inhibisyon saptanamamıştır. Endostatin geninin klonlandığı CD 26 kolon kanser hücrelerinin büyütüldüğü besiyeri toplanıp HUVEC hücreleri üzerine eklenmiş ve HUVEC hücrelerinin proliferasyonunun önemli ölçüde inhibe ettiği saptanmıştır. Tümör hücrelerinin köken aldıkları dokuya bağlı olarak anti-anjiogenik terapiye vereceği yanıt değişir. Indraccolo ve arkadaşları Endostatin'in in vitro şartlarda, MCF7 ve MDA-MB435, insan meme kanser hücre hatlarının proliferasyonu üzerinde önemli bir etki yaratmadığını saptamışlardır (Indraccolo vd 2002). 293 T böbrek epitelyum hücrelerinden sentezlenen Endostatin hücrelerin besiyerinden toplanmış ve daha sonra BT4C sıçan glioma hücrelerine uygulanmıştır. Endostatin bu hücre hattında da in vitro koşullarda büyümeyi durdurucu ya da sitotoksik bir etki yaratmamıştır. İn vitro hücre canlılık testleri Endostatinin tümör hücreleri üzerine doğrudan bir etki yaratmadığını göstermektedir. Tümör hücrelerinde apoptoz ya da nekrozun, tümör kan dolaşımında meydana gelen azaltma sonucunda ortaya çıkan ikincil bir etki olduğu düşünülmektedir. Endostatinin tümör hücreleri üzerinde proliferasyonu inhibe etmediği ortaya konmuştur. bu bulguyu ortaya koyan çalışmalarda Endostatin rekombinant olarak kullanılmıştır ve rekombinant proteinlerin *in vitro* koşullarada oldukça dayanıksız olduğu ve antitümör etkinin ortaya çıkması için oldukça yüksek dozlarda kullanılması gerektiği bilinmektedir. Endostatin gibi antianjiogenik ajanlar direk tümörün hedef almadığı için kronik olarak yapılacak uygulamalar etkiyi artırabilir (Bergers vd 1999, Blezinger vd 1999, O'reilly 1997). Endostatin geninin ökaryotik hücrelere transferi sonucunda hücrelerin in vitro koşullarda büyümelerinde bir inhibisyon saptanamamıştır. Ancak bu genin ekspresyonu sonucu oluşan Endostatin *in vivo* koşullarda tümör büyümesini inhibe etmiştir (Dhanabal 1999, Feldman vd 2001,

Çalışmamız Endostatin'in 4 µg/ml lik dozda ve 72 saatlik inkübasyonda hem tek başına hem de radyoterapi ile kombine olarak in vitro fare meme kanser hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiğini farklı testler ile ortaya koymaktadır. Endostatin anti-anjiogenik bir ajandır ve *in vivo* da bu özelliği ile anti-tümoral etki yaratmaktadır. *In vitro* koşullarda ise bu çalışmada kullanılan fare rekombinant endostatin 4 µg/ml lik dozda oldukça önemli sitotoksik aktivite sergilemiştir.

Benzer şekilde Hajitou ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında Endostatin'in *in vitro* koşullarda EF43.fgf-4 fare meme kanser hücre hattında VEGF ekspresyonunu baskıladığını ortaya koymuşlardır. Bu sonuç Endostatin'in yalnızca endotel hücreler üzerine değil doğrudan kanser hücrelerine de etki edebileceğini göstermektedir. Endostatinin tümör hücreleri üzerine doğrudan yaptığı bu etki VEGF'nin transkripsiyonel regülasyonu sayesinde ortaya çıkmaktadır. Endostatin tümör hücrelerinde yalnızca VEGF ekspresyonunu düzenlerken endotel hücrelerde hücre döngüsü ile ilgili ve apoptozu düzenleyici birçok genin ekspresyonunu etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle de endotel hücreler üzerinde daha fazla etki göstermektedir (Hajitou vd 2002). İki çalışmadaki ortak nokta Endostatin'in sitotoksik etkisinin fare meme kanser hücreleri üzerinde gösterilmiş olmasıdır. Bu noktada düşünülmesi ve tartışılması gereken meme kanser hücrelerinde hangi mekanizma ile sitotoksikite yarattığıdır. Meme kanser hücrelerinin oldukça metastazik olduğu gerçeği ile yola çıkılınca Endostatin bir çok farklı yoldan hücre üzerinde sitotoksik etki yaratmış olabilir.

Radyoterapi solid tümörlerin tedavisinde en çok kullanılan yöntemlerden birisidir. Günümüzde kanser tanısı konan hastaların yaklaşık % 45-50 si tamamen tedavi olabilmektedir. Bu grubun içerisinde yer alan hastaların %70'i ise radyoterapiyi tek başına ya da farklı tedaviler ile kombine halde kullanmışlardır. Ancak pek tabii ki radyoterapiden hiçbir pozitif sonuç alınamadığı, bazı durumlarda istenmeyen sonuçlar yarattığı da bilinmektedir. Bunun nedeni radyoterapi uygulamasının lokal olarak yapılması ya da radyoterpinin tümör hücrelerinin dolaşımına etki etmemesinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle radyoterapi ve anti-anjiogenik ajan kombinasyonları dikkat çekmektedir. Radyasyon tedavisi ile Endostatin kombinasyonu, radyoterapinin etkisini arttırmaktadır. Endostatin uygulaması kullanılan radyasyon dozunun azalmasını sağlamış ve ortaya çıkan radyasyon kaynaklı hasarları aza indirmeyi başarmıştır. Ancak Endostatin uygulamasının her aşamasında bahsedildiği gibi burada da kombine edilecek doz çok önemlidir.

15 Gray ışınlama yapılan A431 insan epidermoid kanserlerinde Endostatin radyasyona olan hassaslığı arttırmıştır (Itasaka vd 2007) . Endostatin radyoterapi ile

kombine olarak HT29 kolon kanser hücreleri üzerinde denenmiş ve kombine tedavinin proliferasyonu, hücre döngüsünü, apoptoz özelliklerini ve radyoterapiye olan hassaslığı değiştirmedeği gösterilmiştir. Ancak farklı araştırmacılar HT29 hücrelerine uygulanan Endostatin dozunu azaltarak kullandıklarında aynı hücrelerde radyoterapiye karşı hassaslık artmaktadır. Bu noktada endostatinin etki mekanizmasında kullanılacak dozun ne denli önemli olduğu ortaya çıkmaktadır, **Kombine tedavilerden elde edilecek başarı, iki farklı tedaviyi doğru sıralamaya ve uygun dozlarda uygulamaya bağlıdır.** Bu bağlamda test edilen ajanların ya da terapilerin hücre üzerinde ne gibi etkiler yaratabileceği önceden düşünülmeli ve ardından tedavi kombinasyonu düzenlenmelidir.

Çalışmamızda kullanılan radyoterapi fraksiyonu ve Endostatin dozu birbirleri üzerinde sinerjistik etkiler yaratmıştır. Endostatin *in vitro* fare meme kanserlerinde ilk kez radyoterapi ile kombine kullanılmış ve radyoterapinin etkisini önemli ölçüde arttırmıştır. Bir çok araştırmacının aksine, bulgularımız Endostatinin 4T1 ve 4THMpc fare meme kanser hücre hatlarında önemli bir sitotoksik etki yarattığını net bir şekilde ortaya koymaktadır.

Endostatin hücre içi bazı mineralleri (Ca^{+2} ve Mg^{+2}) değiştirerek, p53 yada Bcl-2 gibi genlerin aktivitesini düzenleyerek endotel hücrelerde apoptozu tetikler (Qesada vd 2006). Bu noktadan yola çıkarak 4T1 ve 4THMpc meme kanser hücreleri üzerinde yarattığı sitotoksik etkinin apoptoz yolu ile olup olmadığı araştırılmıştır.

Endostatinin sitotoksik aktivitesini apoptoz indüksiyonu ile gerçekleştirip gerçekleştirmediği Kaspaz-3 enzimindeki artış ile tespit edilmiştir. Kaspazlar apoptoz mekanizmasında çok önemli roller üstlenen bir enzim grubudur. Kaspazlar hücreden alınan içsel ve dışsal sinyallere bağlı olarak koordineli bir şekilde aktive olur. Ancak hücrenin ölüm emrini son olarak ilten Kaspaz-3'dür ve bu nedenle ekspresyonundaki artış hücrenin mutlak suretle apoptoza uğramasına neden olur. (Heemst vd 2007).

Endostatin'in sitotoksik etki yaratan 4 µg/ml lik dozu ve 72 saatlik inkübasyon periyodu kullanılarak 4T1 ve 4THMpc hücrelerindeki Kaspaz-3 enzimin aktivitesi araştırılmıştır.

4T1 Hücre hattında, 4 µg/ml Endostatin uygulamasının 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, kaspaz 3 enzim aktivitesinde kontrol grubuna oranla bir artış saptanmadı. Bu bulgu diğ r tüm sitotoksisite testlerinden elde edilen sonuçlarla oldukça uyumludur. 72 saatlik inkübasyon sonunda yalnızca 4 µg/ml Endostatin uygulanan hücrelerde kaspaz 3 enzim aktivitesinin, Endostatin uygulanmayan hücrelere oranla 2, 15 kat arttığı saptanmıştır (**: $p < 0.001$). Radyoterapi grubunda ise, 72 saatlik inkübasyon sonunda 4 µg/ml Endostatin uygulanan hücrelerde kaspaz 3 enzim aktivitesinin, Endostatin uygulanmayan hücrelere oranla 2, 98 kat arttığı saptanmıştır (**: $p < 0.001$).

4THMpc hücre hattında ise 4 µg/ml Endostatin tek başına 72 saatlik inkübasyon sonunda kaspaz 3 enzim aktivitesini 1.76 kat artırırken (**: $p < 0.001$), radyoterapi ile kombine edildiğinde kaspaz 3 enzim aktivitesini 2,525 kat artırdığı saptanmıştır (**: $p < 0.001$).

Deneylerde kullanılan inhibitörler ortaya çıkan aktivitenin kaspaz 3'den kaynaklandığını göstermektedir. Deneylerimizde Endostatin, hem 4T1 hem de 4THMpc fare meme kanser hücreleri üzerinde gösterdiği sitotoksik etkisini bu hücrelerde apoptoz mekanizmasını tetikleyerek gerçekleştirdiğini kaspaz 3 enzim miktarındaki artışla göstermiştir.

Dhanabal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada NIH3T3 fibroblast ,A10 düz kas, H9c2 (2-1) miyoblast hücrelerinde Endostatin hiçbir etki sergilememiştir. Renal kanser hücreleri (786-0), fibroblastlar (NIH3T3), akciğ r fibroblastlar (IMR-90), düz kas hücreleri (A10) ve miyoblastlar (H9c2 (2-1)) 10 µg/ml Endostatin ile muamele edilmiş ve hiçbir apoptotik özellikte değışme gözlenmemiştir. Aynı çalışmada apoptoz mekanizmasının önemli bir bileşeni olan Kaspaz 3 aktivitesi de incelenmiştir. 2, 4, 8, 14 saatlik inkübasyon sonucunda yukarıda belirtilen hücrelerde kaspaz 3 enzim aktivitesinde hiçbir değışiklik saptanmamış ancak 24 saat sonunda endotel hücrelerde kaspaz 3 miktarı artarken, NIH3T3 fibroblastları dışındaki diğ r endotel olmayan tüm hücrelerde kaspaz 3 aktivasyonunda bir fark saptanamamıştır. Yalnızca NIH3T3 fibroblastlarında kaspaz 3 aktivitesi önemli şekilde değışmiştir (Dhanabal vd 1999). Bu

çalışmada da Endostatin endotel olmayan hücrelerde kaspaz enzim aktivitesinde artışa neden olmuştur.

Dhanabal ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile bizim çalışmamız arasındaki en önemli fark Endostatin dozudur. Pek çok ajanın aksine Endostatin doza ve zamana bağlı olarak etki gösterir. Çalışmamızda 4 µg/ml'lik doz etkili olarak saptandıktan sonra, Endostatinin doz yanıt eğrisinin bifazik olduğu düşünülerek, artan dozlarda (5, 7,5, 10 µg/ml) sitotoksik etkisi tekrar araştırılmıştır. Endostatin 4 µg/ml lik dozda sergilediği sitotoksik etkiyi artan doz skalasındaki hiçbir dozda sergilememiştir.

Günümüze kadar yapılan birçok çalışmada Endostatin'in anti-anjiogenik etkisini doğrudan tümör hücreleri üzerine etki ederek değil, tümörün etrafında yeni damar oluşturmak üzere toplanan endotellerin proliferasyonu, invazyonu üzerinde apoptotik etki sağlayarak gerçekleştirdiği ortaya konmuştur. Ancak proje kapsamında titizlikle yürütülen çalışmalar sonucunda, Endostatinin 4T1 ve 4THMpc meme kanser hücreleri üzerine doğrudan sitotoksik etki yarattığı ortaya çıkarılmıştır.

5.3 Endostatin'in ADAM-10 ve Neprilizin Enzim Aktivileri ile P Maddesi Miktarı Üzerine Gösterdiği Etkiler

Anjiogenez tümör hücrelerinin kendine olan güvenlerini en aza indiren oldukça karmaşık ve pek çok faktör tarafından etkilenen bir mekanizmadır. Bu mekanizma içerisinde her iki ilaç farklı yollar üzerinden aktivite göstermektedir. Antianjiogenik ajanlar tümör büyümesini kontrol etmek üzere belirli bazı biyolojik olayları hedef alırlar. Bu hedeflerin en başında kanser hücresinden salınan proteazları inhibe etmek gelmektedir.

Proteazlar ve proteolitik enzimler endo ve ekzo peptitazlardan oluşur. Bu enzimler proteinleri hidroliz ederek peptit ve amino asitlerin oluşmasını sağlar. Metastazik tümör hücrelerinin etrafında bağ doku oluşturan ekstraselular matriks, tümör hücrelerin geçmesi için bir bariyerdir. Tümör hücreleri, hareketlerini kolaylaştırmak için bazı proteazlar salarak ekstraselular matriksin protein bileşenlerini hidrolizler. Metastaz

sürecinde ise ekstraselular matriksin parçalanması kontrolsüz bir şekilde gerçekleşmektedir. Kanseri hücrelerinin kendi proteazlarını salarak mı yoksa diğer hücrelerden proteaz salınmasını tetikleyerek mi ya da her ikisini de gerçekleştirerek mi metastaz yeteneğini elde ettikleri henüz tam anlamı ile açıklığa kavuşmamıştır (Duffy 1992).

Proteazlar, invazyon ve metastazda çok önemli rol oynarlar. Hücreden salınan proteaz miktarındaki artışın, metastazdaki artış ile doğru orantılı olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Proteazların inhibe edilmesi tümör hücrelerinin invazyon ve metastazını engellediği kadar, endotel hücrelerinin çevre doku ile ilişkisini bozarak migrasyonunu önlemekte ve sonuçta anjiogenezi de inhibe etmektedir. Sitotoksik ilaçlar ile kıyaslandığında proteaz inhibitörleri, tıpkı antianjiogenik bileşikler gibi, toksik etki yaratmadığından kanser tedavisinde kullanılmaları mümkündür (Vandeputte-rutten ve Gros 2002).

Proteazların en geniş üyeli ailesi olan matriks metalloproteazların fazla salınması ve tümör gelişimi arasındaki bağlantı anlaşıldığından bu yana, bu enzimlerin proteolitik aktivitelerini inhibe etmek amacıyla pek çok strateji geliştirilmiştir. Ancak MMP'lerin inhibitörleri pek çok klinik çalışmada hayal kırıklığı yaratmıştır.

ADAM'lar protozoalardan memelilere kadar pek çok canlıda bulunmaktadır. Metalloproteazların metsozin alt ailesine ait olan ADAM'lar, pek çok hücreli sinyal iletim yollarında görev alır. ADAM üyeleri membran proteinlerini parçalayarak çözülebilir olgun formlara dönüştürürler. ADAM ailesinin bütün üyeleri proteolitik özelliğe sahip değildir çünkü katalitik aktivite için esas olan aminoasitleri içermezler. ADAM ailesine ait en önemli üye ADAM-10'dur (Chubinskaya vd 2001). Prostat, lösemi, meme ve skuamöz kanser hücrelerinde ADAM-10 ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Ancak ADAM'ların kanser mekanizması üzerindeki etkisi tam olarak aydınlatılamamıştır ADAM-10'un biyokimyasal ve biyolojik özelliklerinin detaylı bir şekilde araştırılması, bu enzimin kanser tedavilerinde kullanılmasını sağlayabilir (Mochizuki Ve Okada 2007).

4T1 hücrelerinde, tek başına 4 µg/ml Endostatin uygulamasının ADAM-10 enzim aktivitesi üzerine herhangi bir etkisi olmamıştır. Radyoterapi tek başına enzim aktivitesinde % 55’lik bir inhibisyona neden olurken, 4 µg/ml Endostatin radyoterapi ile kombine edildiğinde enzim miktarında %74,5’lik bir inhibisyon saptanmıştır. 4THMpc hücre hattında ise tek başına tek başına 4 µg/ml Endostatin uygulaması sonucu enzim miktarı % 43, 3 oranında artmıştır. Tek başına radyoterapi uygulaması enzim miktarını % 70,9 oranında artırırken, Endostatin ve radyoterapi kombine tedavi uygulaması sonrasında enzim miktarı %72,5 oranında artmıştır.

Anti-anjiyogenik iki ilaç, proteaz aktivitesi üzerinde birbirlerinden oldukça farklı etkiler sergilemiştir. Talidomit ve radyoterapi kombinasyonu her iki hücre hattında da ADAM 10 enzim aktivitesinde inhibisyona neden olurken, Endostatin kombine tedavisine iki hücre farklı yanıtlar vermiştir. Endostatin ve radyoterapi 4T1 hücrelerinde ADAM 10 aktivitesini baskımlarken Talidomidin aksine 4THMpc hücrelerinde enzim aktivitesinde dramatik bir artış saptanmıştır. Bu noktada kanser hücrelerinin özelliklerinin uygulanan tedavinin başarısını ne denli önemli olduğu açıkça görülmektedir. 4T1 meme kanser hücrelerinin kalp metastazı olan ve yapılan çalışmalarda 4T1’e oranla daha agresif özellikler sergileyen 4THMpc hücre hattı sitotoksik dozlarda uygulanan Talidomit ve Endostatine farklı yanıtlar vermiştir.

Metastazik tümörlerde radyoterapiye hassaslığı arttırmak amaçlı yapılan kombine tedaviler öncesinde, kombinasyonun öncelikle in vitro etkisinin araştırılması gerektiği 4THMpc hücreleri tarafından bizlere bir kez daha hatırlatılmaktadır.

Tez kapsamında aktivitesi araştırılan bir diğer enzim ise, Neprilazindir (NEP). Tavşan böbreğinde fırça kenarlı membrandan izole edilen NEP (nötral endopeptidaz, NEP, Ec 3.4.24.11) enzimi insülinin B zincirini hidroliz ettiği saptanan ilk enzimdir. 30 yılı aşkın bir süredir aktivitesi detaylı bir şekilde araştırılmaktadır. Saflaştırılmasının ardından tip II integral membran proteini olduğu saptanmıştır. NEP çinko bağlanma motifine sahip tipik bir metallopeptidazdır ve M13 peptidaz ailesi içinde glusizinler olarak bilinen gruba aittir. Streptomyces’den elde edilen fosforamidon adlı bileşik ile güçlü bir şekilde inhibe edilmektedir (Shipp vd 1996, Turner ve Hooper 2002).

Memelilerde en fazla böbrekte eksprese edilir ve fizyolojik olarak enkefalinleri parçaladığı için enkefelinaz olarak da adlandırılır. Bilinen en eski görevi beyin metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynamaktır. Özellikle takikinin ailesine ait nöropeptitlerin metabolizmasında da görev aldığı saptandıktan sonra, NEP daha detaylı bir şekilde araştırılmaya başlanmıştır. Yapılan farklı çalışmalar sonrasında NEP'in bombesin, bradikinin, kalsitonin, endotelin-1, nörotensin ve vasoaktif intestinal peptit (VIP) gibi mitojenik peptitleri inaktive ederek özellikle akciğer ve prostat kanserinde, tümör büyümesinin kontrolünde rol oynadığını ortaya çıkmıştır (Shipp vd 1996).

4T1 hücrelerinde, kontrol grubunda, 4 µg/ml Endostatin uygulamasının NEP aktivitesinde % 7,54 oranında bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Tek başına radyoterapi uygulaması enzim aktivitesinde % 60'lık bir azalmaya neden olurken, Endostatin'in radyoterapi ile kombinasyonu da 4T1 hücrelerinde % 16,6 oranında bir artış meydana getirmiştir.

4THMpc hücre hattında ise, tek başına 4 µg/ml Endostatin uygulamasının NEP aktivitesinde % 14,2 oranında bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Tek başına radyoterapi uygulaması enzim aktivitesinde % 6,6'lık bir azalmaya neden olurken, Endostatin'in radyoterapi ile kombinasyonu da 4THMpc hücrelerinde % 8,3 oranında bir azalma meydana getirmiştir. 4T1 hücrelerinde Endostatin tek başına uygulandığında ADAM 10 enziminin aktivitesinde değişiklik yaratmazken NEP'in aktivitesini artırmıştır. Endostatin radyoterapi ile kombine edildiğinde ADAM 10 enzim aktivitesinin baskılanması için radyoterapinin tek başına olan etkisini artırmıştır. Endostatin bunu farklı yollar üzerinden yapmış olabilir. Örneğin 4T1 hücrelerinde radyoterapi uygulaması öncesinde yapılan Endostatin tedavisi hücrelerden anjiogenik büyüme faktörlerinin salınmasına neden olarak hücreleri radyoterapiye hassaslaştırmış olabilir ya da Kaspaz 3 aktivasyonu ile apoptozu tetikleyerek ışınlamanın etkisine katkı sağlamış olabilir. Talidomidin etkisine benzer bir şekilde endostatin 4THM hücrelerinde ADAM 10 enzim aktivitesini artırmıştır. Endostatin ve radyoterapi kombinasyonu ADAM 10 enziminin aktivitesinde önemli bir değişikliğe neden olurken bu kombinasyon NEP açısından önemli bir fark yaratmamıştır.

Tez kapsamında araştırılan her iki enzimin de ortak noktalarından biri P maddesini parçalamalarıdır. Nörobiyolojide son yıllardaki gelişmeler kanser hastalarına umut vermeye başlamıştır. Yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular, P maddesi ve onun reseptörü nörokinin-1 reseptörünün (NK-1R) mitogenez, anjiogenez, hücre göçü ve metastaz ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Gonzalez Moles vd 2009). G-proteine bağlı bir reseptör olan NK-1R'ye ligandın bağlanması, fosfoinositid hidrolizi, kalsiyum hareketi ve mitojenle aktive edilmiş protein kinaz aktivasyonuna neden olmaktadır. İnflamasyon ve kanser arasındaki ilişkinin merkezinde de P maddesi yer almaktadır. 1931 yılında keşfedilen P maddesinin fonksiyonları hakkında 1950'li yıllara kadar kesin bir şey bilinmiyordu. 1950'li yıllarda P maddesi ağrıyı ileten bir nörotransmitter olarak tanımlandı. Bu gün bilinmektedir ki P maddesi fizyolojik stres durumunda merkezi sinir sisteminde önemli bir role sahiptir (Luo vd 1996, Defea vd 2000).

Periferal dokularda ve merkezi sinir sisteminde nörojenik inflamasyon ve immun yanıtın oluşumunda P maddesi rol oynamaktadır ve ağrının algılanmasında da önemli görevler üstlenmektedir. Pek çok periferal dokuda P maddesinin damar genişletici özelliği olduğu bilinmektedir. P maddesi içeren sinir uçları genellikle kan damarları yakınında lokalize olmuştur ve bu uçlardan P maddesi salınımıyla, akut inflamasyonda görülen pek çok fizyolojik olayın başlamasına neden olur. P maddesi sadece sinir hücresi kaynaklı değildir. Eozonofil ve makrofajlar gibi sinirsel olmayan hücrelerde de P maddesi bulunmaktadır. G-protein bağlı reseptörüne bağlanınca aktive olan P maddesi mitojenle aktive edilmiş protein kinazları aktive ederek apoptoza neden olur. Ayrıca, *ras* onkogenini aktive ettiği ve reseptöre bağlandığında TAPI-duyarlı matriks metalloproteazları özellikle de TACE'i aktive ederek membrana bağlı TGF- α 'nın aktif formda salınmasına neden olur. TGF- α MAPK yolunu aktive ederek kolon epitel hücrelerinin ve astrostoma hücre proliferasyonunu artırır (Palma vd 1999, Friess vd 2003, Munoz vd 2004, Singh vd 2000). Son olarak, P maddesi ve reseptörü arasındaki etkileşimin pankreas kanseri, glioma meme kanseri, kolon displazi ve karsinomlarında tümör büyümesinin ilerleyişi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. P maddesi, pek çok normal ve neoplastik hücrede NK1 reseptörlerini aktive ederek mitogenezi artırmaktadır. P maddesi ve reseptörünün kanser hücrelerinde de varlığı, immünohistokimya çalışmalarıyla gösterilmiştir. Bütün tümörlerin besin ihtiyacını karşılamak için yeni kan

damarları oluşturmaya ihtiyacı vardır fikrinden yola çıkarak, P maddesi ve reseptörü aracılığıyla kan damar oluşumunun tetiklenmesi kanser hücreleri için tercih edilebilecek en kısa yollardan bir tanesidir (Esteban vd 2006). P maddesi, metastazik insan nöroblastoma hücrelerinin neredeyse % 90'ında, melanoma ve retinoblastoma hücrelerinde de eksprese edilmektedir. Bununla birlikte P maddesi reseptörü ise NK-1, nöroblastoma, retinoblastoma, insan glioma hücre hatları ve pankreatik karsinoma hücre hatlarında eksprese edilmektedir. Ayrıca NK-1'in meme kanseri ve metastazda aşırı ifade edildiği de bilinmektedir (Munoz vd 2004).

Bu bağlamda, kanserle ilişkilendirilen en önemli nöromodulator olan P maddesinin 4T1 ve 4THMpc hücrelerinde de sentezlendiği ve besi yerine salındığı da bu çalışma ile birlikte ilk defa gösterilmiştir.

Endostatin uygulamalarında, 4T1 hücrelerinde, kontrolde besiyeria salınan P maddesi miktarı 145 pg/ml iken, tek başına Endostatin P maddesi miktarını %10,34 oranında azaltmıştır. Radyoterapi besiyeria salınan P maddesini %14,7 oranında artırırken, Endostatin ile kombine edildiğinde besiyeria salınan P maddesi miktarı %47 oranında azalmıştır. Hücre içi P maddesi miktarı 4T1 hücrelerinde kontrol grubunda 149 pg/ml iken tek başına Endostatin hücre içi P maddesi miktarını %1,4 oranında azaltmıştır. Radyoterapi tek başına hücre içi P maddesi miktarını %12,35 oranında artırırken, Endostatin radyoterapi kombine tedavisinde hücre içi P maddesi %20,13 oranında artmıştır.

Endostatin uygulamalarında, 4THMpc hücrelerinde, kontrolde besiyeria salınan P maddesi miktarı 119 pg/ml iken, tek başına Endostatin P maddesi miktarını %2,2 oranında azaltmıştır. Radyoterapi besiyeria salınan P maddesini %19 oranında azaltırken, Endostatin ile kombine edildiğinde besiyeria salınan P maddesi miktarı %21 oranında azalmıştır. Hücre içi P maddesi miktarı 4THMpc hücrelerinde kontrol grubunda 160 pg/ml iken tek başına Endostatin hücre içi P maddesi miktarını %9,3 oranında azaltmıştır. Radyoterapi tek başına hücre içi P maddesi miktarını %10,1 oranında azaltırken, Endostatin radyoterapi kombine tedavisinde hücre içi P maddesi %93,75 oranında azalmıştır.

Bu sonuçlara göre, ilk defa, 4T1 ve 4THMpc hücre hatlarında hücre içerisinde ve besiyeriya salınan P maddesi miktarları saptanmıştır. Tüm bu bilgilerle birlikte, proje kapsamında gerçekleştirilen sitotoksisite test sonuçlarına göre Endostatin 4 µg/ml'lik dozda, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda sitotoksik etki göstermiştir.

6. SONUÇ

Tüm bu verilerle birlikte;

1- Tez kapsamında gerçekleştirilen bütün sitotoksikite test sonuçlarına göre; 4T1 ve 4THMpc hücre hatlarında Endostatin 4 µg/ml'lik dozda 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda sitotoksik etki göstermiştir.

2- İlk defa, 4T1 ve 4THMpc hücre hatlarında hücre içerisinde bulunan ve besi yerine salınan P maddesi miktarları tespit edilmiştir. Endostatin uygulamalarında, 4T1 hücrelerinde, kontrolde besiyeria salınan P maddesi miktarı 145 pg/ml iken, tek başına Endostatin P maddesi miktarını %10,34 oranında azaltmıştır. Radyoterapi besiyeria salınan P maddesini %14,7 oranında artırırken, Endostatin ile kombine edildiğinde besiyeria salınan P maddesi miktarı %47 oranında azalmıştır. Hücre içi P maddesi miktarı 4T1 hücrelerinde kontrol grubunda 149 pg/ml iken tek başına Endostatin hücre içi P maddesi miktarını %1,4 oranında azaltmıştır. Radyoterapi tek başına hücre içi P maddesi miktarını %12,35 oranında artırırken, Endostatin radyoterapi kombine tedavisinde hücre içi P maddesi %20,13 oranında artmıştır.

Endostatin uygulamalarında, 4THMpc hücrelerinde, kontrolde besiyeria salınan P maddesi miktarı 119 pg/ml iken, tek başına Endostatin P maddesi miktarını %2,2 oranında azaltmıştır. Radyoterapi besiyeria salınan P maddesini %19 oranında azaltırken, Endostatin ile kombine edildiğinde besiyeria salınan P maddesi miktarı %21 oranında azalmıştır. Hücre içi P maddesi miktarı 4THMpc hücrelerinde kontrol grubunda 160 pg/ml iken tek başına Endostatin hücre içi P maddesi miktarını %9,3 oranında azaltmıştır. Radyoterapi tek başına hücre içi P maddesi miktarını %10,1 oranında azaltırken, Endostatin radyoterapi kombine tedavisinde hücre içi P maddesi %93,75 oranında azalmıştır.

3- Endostatin 4 µg/ml'lik dozda 4T1 ve 4THMpc hücre hatlarında, ADAM-10 ve Neprilizin enzim aktiviteleri üzerine farklı etkilere neden olduğu ve bu etkilerin radyoterapi ile kombine edildiğinde değiştiği gösterilmiştir. 4T1 hücrelerinde, kontrol grubunda, 4 µg/ml Endostatin uygulamasının NEP aktivitesinde % 7,54 oranında bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Tek başına radyoterapi uygulaması enzim

aktivitesinde % 60lık bir azalmaya neden olurken, Endostatin'in radyoterapi ile kombinasyonu da 4T1 hücrelerinde % 16,6 oranında bir artış meydana getirmiştir.

4THMpc hücre hattında ise, tek başına 4 µg/ml Endostatin uygulamasının NEP aktivitesinde % 14,2 oranında bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Tek başına radyoterapi uygulaması enzim aktivitesinde % 6,6'lık bir azalmaya neden olurken, Endostatin'in radyoterapi ile kombinasyonu da 4THMpc hücrelerinde % 8,3 oranında bir azalma meydana getirmiştir. 4T1 hücrelerinde Endostatin tek başına uygulandığında ADAM 10 enziminin aktivitesinde değişiklik yaratmazken NEP'in aktivitesini artırmıştır. Endostatin radyoterapi le kombine edildiğinde

5-Endostatinin etki mekanizmasında kullanılacak dozun ne denli önemli olduğu ortaya çıkmaktadır. Kombine tedavilerden elde edilecek başarı, iki farklı tedaviyi doğru sıralamaya ve uygun dozlarda uygulamaya bağlıdır. Bu bağlamda test edilen ajanların ya da terapilerin hücre üzerinde ne gibi etkiler yaratabileceği önceden düşünülmeli ve ardından tedavi kombinasyonu düzenlenmelidir.

7. KAYNAKLAR

- ADELSTEIN, D.J. 1998. Recent Advances of Chemoradiation in the Management of Locally Advanced Head and Neck Cancer. *Current Opinion Oncology*, 10: 213–218.
- AKYOL, H. 2004. Kemoterapinin Temel İlkeleri. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Hemşire Programı, Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı.
- ALA-AHO, R. and KAHARI, V.M. 2005. Collagenases in Cancer. *Biochimie*, 87: 273-286.
- ALBRECHT, M., DOROSZEWICZ, J., GILLEN, S., GOMES, I., WILHELM, B., STIEF, T. and AUMULLER, G. 2004. Proliferation of Prostate Cancer Cells and Activity of Neutral Endopeptidase is Regulated by Bombesin and IL-1 β Acting as a Modulator of Cellular Differentiation. *The Prostate*, 58: 82-94.
- APTE, S.S. 2004. A Disintegrin-Like and Metalloprotease (reprolysin type) with Thrombospondin type-1 motifs: the ADAMTS family. *International Journal of Biochemistry and Cell*, 36: 981-985.
- ASLAN, F.E. and GÜRKAN, A. 2007. The Risk Of Breast Cancer At The Women. *The Journal of Breast Health*, 3(2): 63-6.
- BAMIAS, A. and DIMOPOULOS, M.A. 2003. Angiogenesis in Human Cancer: Implications in Cancer Therapy. *European Journal of Internal Medicine*, 14: 459-469.

- BERGERS, G., JAVAHERIANK., LO, K.M., FOLKMAN, J. and HANAHAN D. 1999. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice, *Science*, 284: 808–812.
- BRIZEL, D.M., SCULLY, S.P., HARRELSON, J.M., LAYFIELD, L.J., BEAN, J.M., PROSNITZ, L.R. and DEWHIRST, M.W. 1996. Tumor Oxygenation Predicts for the Likelihood of Distant Metastases in Human Soft Tissue Sarcoma. *Cancer Research*, 56: 941-943.
- BROCK, C.S. and LEE, S.M. 2002. Anti-Angiogenic Strategies and Vascular Targeting in the Treatment of Lung Cancer. *European Respiratory Journal*, 19: 557-570.
- BROWDER, T., BUTTERFIELD, C.E., KRALING, B.M., SHI, B., MARSHALL, B., O'REILLY, M.S. and FOLKMAN, J. 2000. Antiangiogenic Scheduling of Chemotherapy Improves Efficacy Against Experimental Drug-Resistant Cancer. *Cancer Research*, 60: 1878-1886.
- BUNN, P.A., HELFRICH, B.A., BRENNER, D.G., CHAN, D.C., DYKES, D.J., COHEN, A.J. and MILLER Y.E. 1998. Effects of Recombinant Neutral Endopeptidase (EC 3.4.24.11.) On the Growth of Lung Cancer Cell Lines *in Vitro* and *in Vivo*. *Clinical Cancer Research*, 4: 2849-2858.
- BURNS, D.M., WALKER, B., GRAY J. and NELSON J. 1999. Breast Cancer Cell Associated Endopeptidase EC 24.11, Modulates Proliferative Response to Bombesin. *British Journal of Cancer*, 79: 214-220.
- BUSSOLINO, F., MANTOVANI, A. and PERSICO, G. 1997. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochemical Sciences*, 22: 251-256.

- CALFA, C.I., ROSENBLATT, J.D., CHO, H.M., WEBSTER, K. and SHIN, S.U. 2006. Antibodies and Antibody-Fusion as Anti-Angiogenic, Anti-Tumor Agents. *Update on Cancer Therapeutics*, 1: 159-173.
- CARMELIET, P. 2000. Mechanisms of Angiogenesis and Arteriogenesis, *Nature Medicine*, 6: 89-395.
- CARMELIET, P. 2003. Angiogenesis in Health and Disease. *Nature Medicine*, 9(6): 653-660.
- CARPENTER, T.C and STENMARK, K.R. 2001. Hypoxia decreases lung neprilysin express and increases pulmonary vascular leak. *American Journal of Physiology. Lung Cell Molecular Physiology*, 281: 941-948
- CARTER, M.S. and KRAUSE, J.E. 1990. Structure, Expression and Some Regulatory Mechanisms of the Rat Preprotachykinin Gene Encoding Substance P, Neurokinin A, Neuropeptide K, and Neuropeptide Gamma. *Journal of Neurosciencst*, 10: 2203-2214.
- CASTRO-JUNIOR, G., PUGLISI, F., AZAMBUJA, E., EL SAGHIR, N.S. and AWADA, A. 2006. Angiogenesis and Cancer: A Cross-Talk Between Basic Science and Clinical Trials (the “do ut des” paradigm). *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 59: 40-50.
- CHANG, C. and WERB, Z. 2001. The many faces of metalloproteases cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *TRENDS in Cell Biology*, 11(11): 37-43.
- CHINNAIYAN, A.M., ORTH, K., O’ROURKE, K., DUAN, H., POIRIER, G.G. and DIXIT, V.M. 1996. Molecular Ordering Of The Cell Death Pathway Bcl-2 And Bcl-Xl Function Upstream Of The Ced-3-Like Apoptotic Proteases. *The Journal Of Biological Chemistry*, 271(9): 4573–4576.

- CHUBINSKAYA, S., MIKHAIL, R. and DEUTSCH, A. 2001. ADAM-10 Protein is Present in Human Articular Cartilage Primarily in the Membrane-bound form and is Upregulated in Osteoarthritis and in Response to IL-1 alpha in Bovine Nasal Cartilage. *Journal of Histochemistry Cytochemistry*, 49: 1165-1176.
- COFFEY, J.C., WANG, J.H., SMITH, M.J.F., HAYES, D.B., COTTER, T.G. and REDMOND, H.P. 2003. Excisional Surgery for Cancer Cure: Therapy at a Cost. *Lancet Oncology*, 4: 760–768.
- COHEN, J.J. 1998. Apoptosis. To be or not to be. *Postgraduate Syllabus*, 1: 1-19.
- COLCIAGHI, F., BORRONI, B., PASTORINO, L., MARCELLO, E., ZIMMERMANN, M., CATTABENI, F., PADOVANI, A. and LUCA, M. 2002. α -Secretase ADAM-10 as well as α APPs is Reduced in Platelets and CSF of Alzheimer Disease Patients. *Molecular Medicine*, 8: 67-74.
- CONNELL, P.P., KRONB, S.J. and WEICHSELBAUM, R.R. 2004. Relevance and irrelevance of DNA damage response to radiotherapy. *DNA Repair*, 3: 1245–1251.
- COOPER, J.S., GUO, M.D., HERSKOVIC, A., MACDONALD, J.S., MARTENSON, J.A., AL-SARRAF, M., BYHARDT, R., RUSSELL, A.H., BEITLER, J.J., SPENCER, S., ASBELL, S.O., GRAHAM, M.V. and LEICHMAN, L.L. 1999. Chemoradiotherapy of Locally Advanced Esophageal Cancer: Long-Term Follow-up of a Prospective Randomized Trial (RTOG85-01). *The Journal of the American Medical Association*, 281: 1623–1627.

- COOPER, J.S., PAJAK, T.F., FORASTIERE, A.A., JACOBS, J., CAMPBELL, B.H., SAXMAN, S.B., KISH, J.A., KIM, H.E., CMELAK, A.J., ROTMAN, M.M., ENSLEY, J.F., CHAO, K.S.C., SCHULTZ, C.J., LEE, N. and FU, K.K. 2004. Postoperative Radiotherapy and Chemotherapy for High-Risk Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *The New England Journal of Medicine*, 350: 1937–1944.
- CUMMINGS, J., WARD, T.H., RANSON, M. and DIVE, C. 2004. Apoptosis pathway-targeted drugs—from the bench to the clinic. *Reviews on Cancer*, 1705: 53-66.
- DHANABAL, M., RAMCHANDRAN, R., WATERMAN, M.J.F., LU, H., KNEBELMANN, B., SEGAL, M. and SUKHATME, V.P. 1999. Endostatin Induces Endothelial Cell Apoptosis. *The Journal Of Biological Chemistry*, 274(17): 11721–11726.
- DIXELIUS, J., CROSS, M., MATSUMOTO, T., SASAKI T., TIMPL, R. and CLAEISSON-WELS, L. 2002. Endostatin Regulates Endothelial Cell Adhesion and Cytoskeletal Organizations. *Cancer Research*, 62. 1944-1947.
- DRAGOVIC, T., SEKASON, M., BECKER, R.P. and ERDOS, E.G. 1997. Detection of Neutral Endopeptidase 24.11 (neprilysin) in Human Hepatocellular Carcinomas by Immunocytochemistry. *Anticancer Research*, 17: 3233-3238.
- DURAND, R.E. and RALEIGH, J.A. 1998. Identification of Nonproliferating but Viable Hypoxic Tumor Cells *in Vivo*. *Cancer Research*, 58: 3547-3550.
- ECKHARDT, S.G. 1999. Angiogenesis Inhibitors as Cancer Therapy. *Hospital Practice*, 34(1): 63-84.

- EKICI, E. and UTKUALP, N. 2007. Women Instructor Behaviors Towards Breast Cancer. *The Journal of Breast Health*, 3(3): 136-139.
- EKMEKTZOGLOU K.A., XANTHOS, T., GERMAN,V. and ZOGRAFOS, G.C. 2009. Breast cancer: From the earliest times through to the end of the 20th century. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 145: 3-8.
- ELLIS, L.M, STALEY, C.A., LIU, W., FLEMING, R.Y.D., PARIKH, N.U., BUCANA, C.D. and GALLICK, G.E. 1998. Down-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor in a Human Colon Carcinoma Cell Line Transfected with Antisense Expression Vector Specific for c-src. *Journal of Biological Chemistry*, 375: 577-581.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicological Pathology*, 35(4): 495–516.
- EMAMI, B., LYMAN, J., BROWN, A., COIA, L., GOITEIN, M., MUNZENRIDER, J.E., SHANK, B., SOLIN, L.J. and WESSON M. 1991. Tolerance of Normal Tissue to Therapeutic Irradiation. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 21: 109–122.
- ERENPREISA, J. and CRAGG, M.S. 2007. Cancer: A matter of life cycle? *Cell Biology International*, 31: 1507-1510.
- ERGÜN, S., KILIÇ, N., WURMBACH, J.H., EBRAHİMNEJAD, A., FERNANDO, M., SEVİNC, S., KILIÇ, E., CHALAJOUR, F., FIEDLER, W., LAUKE, H., LAMSZUS, K., HAMMERER, P., WEIL, J., HERBST, H. and FOLKMAN, J.2001. Endostatin inhibits angiogenesis by stabilization of newly formed endothelial tubes. *Angiogenesis*, 4(3):193-206.

- ERIN, N., BOYER, P.J., BONNEAU, R.H., CLAWSON, G.A. and WELCH, D.R. 2004. Capsaicin-Mediated Denervation of Sensory Neurons Promotes Mammary Tumor Metastasis to Lung and Heart. *Anticancer Research*, 24: 1003-1010.
- ERIN, N., ZHAO, W., BYLANDER, J., CHASE, G. and CLAWSON, G.A. 2006. Capsaicin-Induced Inactivation of Sensor Neurons Promotes a More Aggressive Gene Expression Phenotype in Breast Cancer Cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 99: 351-364.
- ERIN, N., WANG, N., XIN, P., BUI, V., WEISZ, J., BARKAN, G.A., ZHAO, S.D. and CLAWSON, G.A. 2009. Altered Gene Expression in Breast Cancer Liver Metastases. *The International Journal of Cancer*, 124: 1503-1516.
- EVANS, D.B., WOLFF, R.A. and CRANE, C.H. 2001. Neoadjuvant Strategies for Pancreatic Cancer. *Oncology (Williston Park)*, 15(6): 727-747.
- FADOK, V.A., BRATTON, D.L., ROSE, D.M., PEARSON, A., EZEKEWITZ, R.A. and HENSON, P.M. 2000. A Receptor for Phosphatidylserine-Specific Clearance of Apoptotic Cells. *Nature*, 405: 85–90.
- FAHRENHOIZ, F., GILBERT, S., KOJRO, E., LAMMICH, S. and POSTINA, R. 2000. Alpha-Secretase Activity Metalloprotease ADAM-10, Influences of Domain Structure. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 920: 215-222.
- FEARON, E.R. 1997. Human Cancer Syndromes: Clues to the Origin and Nature of Cancer. *Science*, 278(5340): 1043-1050.
- FERNANDEZ, H.A., KALLENBACH, K., SEGHEZZI, G., GROSSI, E., COLVIN, S., SCHNEIDER, R., MIGNATTI, P. and GALLOWAY, A. 1999. Inhibitor of Endothelial Cell Migration by Gene Transfer of Tissue

Inhibitor of Metalloproteinases-1. *Journal of Surgeon Research*, 82: 156-162.

FERRERASA, M., FELBORB, U., LENHARDA, T., OLSEN, B.R. and DELAÏSSE, A J.M. 2000. Generation and Degradation of Human Endostatin Proteins by Various Proteinases. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 486: 247-251.

FIDLER, I.J. and ELLIS, L.M. 2004. Neoplastic Angiogenesis-Not all Blood Vessels are Created Equal. *The New England Journal of Medicine*, 351: 215-216.

FODA, H. and ZUCKER, S. 2001. Matrix Metalloproteinases in Cancer Invasion, Metastasis and Angiogenesis. *Drug Discovery Today*, 6: 478-482.

FOLKMAN, J. 1971. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *The New England Journal of Medicine*, 285: 1182-1186.

FOLKMAN, J. and INGBER, D. 1992. Inhibition of Angiogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 3: 89-96.

FOLKMAN, J. 1996. What is the Role of Thymidine Phosphorylase in Tumor Angiogenesis? *Journal of the National Cancer Institute*, 88(16): 1091-1092.

FOLKMAN, J. 2006. Antiangiogenesis in cancer therapy—endostatin and its mechanisms of action. *Experimental Cell Research*, 312: 594 – 607.

FRIESEL, R., KOMORIYA, A. and MACIAG, T. 1987. Inhibition of endothelial cell proliferation by gamma-interferon. *The Journal of Cell Biology*, 104: 689-696.

- FRIESS, H., ZHU, Z., LIARD V., SHI, X., SHRINKHANDE, S.V., WANG, L., LIEB, K., KORC, M., PALMA, C., ZIMMERMANN, A., REUBI, J.C. and BUCHLER, M.W. 2003. Neurokinin-1 receptor expression and its potential effects on tumor growth in human pancreatic cancer. *Laboratory Investigation*, 83: 731–742.
- FRISCH, S.M. and SCREATON, R.A. 2001. Anoikis Mechanisms. *Current Opinion Cell Biology*, 13: 555–562.
- FUKAMI, S., WATANABE, K., IWATA, N., HARAOKA, J., LU, B., GERARD, N.P., GERARD, C., FRASER, P., WESTAWAY, D., GEORGE-HYSLOP, P. and SAIDO, T.C. 2002. A β -Degrading Endopeptidase, Neprilysin, in Mouse Brain: Synaptic and Axonal Localization Inversely Correlating with A β Pathology. *Neuroscience Research*, 43: 39-56.
- FURUSE, K., FUKUOKA, M.K., NISHIKAWA, H., TAKADA, Y., KUDOH, S., KATAGAMI, N. and ARIYOSHI, Y. 1999. A Phase III study of Concurrent Versus Sequential Thoracic Radiotherapy in Combination with Mitomycin, Vindesine, and Cisplatin in Unresectable Stage III non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 17: 2692–2699.
- FYLES, A., MILOSEVIC, M., HEDLEY, D., PINTILIE, M., LEVIN, W., MANCHUL, L. and HILL, R.P. 2002. Tumor Hypoxia Has Independent Predictor Impact Only in Patients With Node-Negative Cervix Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 20(3): 680-687.
- GASPARINI, G., LONGO, R., FANELLI M. and TEICHER, B.A. 2005. Combination of Antiangiogenic Therapy With Other Anticancer Therapies: Results, Challenges and Open Questions. *Journal Of Clinical Oncology*, 23(6):1295-1311.

- GIDLEY, D.S., LOREDO, L.N., SLATER, J.D., ARCHAMBEAU, J.O., BEDROS, A.A., ANDRES, M.L. and SLATER, J.M. 1998. Pilot Evaluation of Cytokine Levels in Patients Undergoing Radiotherapy for Brain Tumor. *Cancer detection and prevention*, 22: 20-29.
- GOHRING, B., HOLZHAUSEN, H.J., MEYE, A., HEYNEMANN, H., REBMANN, U., LANGNER, J. and RIEMANN, D. 1998. Endopeptidase 24.11/CD10 is Downregulated in Renal Cell Cancer. *International Journal of Molecular Medicine*, 2: 409-414.
- GORSKI, D.H., BECKETT, M.A., JASKOWIAK, N.T., CALVIN, D.P., MAUCERI, H.J., SALLOUM, R.M., SEETHARAM, S., KOONS, A., HARI, D.M., KUFEL, D.W. and WEICHSELBAUM, R.R. 1999. Blockage of the Vascular Endothelial Growth Factor Stress Response Increases the Antitumor Effects of Ionizing Radiation. *Cancer Research*, 59: 3374–3378.
- GREEN, D.R. and EVAN, G. 2002. A Matter of Life and Death. *Cancer Cell*, 1: 19–30.
- GRIFFIN, R.J., WILLIAMS, B.W., WILD, R., CHERRINGTON, J.M., PARK, H. and SONG, C.W. 2002. Simultaneous inhibition of the receptor kinase activity of vascular endothelial, fibroblast, and platelet-derived growth factors suppresses tumor growth and enhances tumor radiation response. *Cancer Research*, 62: 1702–1706.
- GUPTA, M.K. and REN-YI, Q. 2003. Mechanism and its Regulations of Tumor-Induced Angiogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 9(6): 1144-1155.
- HAJITOU, A., Grignet, C., Devy, L., Berndt, S., Blacher, S., Deroanne, C.F., Bajou, K., Fong, T., Chiang, Y., Foidart, J.M. and Noel, A. 2002. The Antitumoral Effect of Endostatin and Angiostatin is Associated With a Down-

Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Tumor Cells. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16: 1802-1804.

HALL, R.J. and ERICKSON, C.A. 2003. ADAM 10: An Active Metalloprotease Expressed During Avian Epithelial Morphogenesis. *Developmental Biology*, 256: 146-159.

HANAI, J., DHANABAL, M., KARUMANCHI, S.A., ALBANESE C., WATERMAN, M., CHAN, B., RAMCHANDRAN, R., PESTELL, R. and SUKHATME, V.P. 2002. Endostatin Causes G1 Arrest of Endothelial Cells Through Inhibition of Cyclin D1, *Journal of Biological Chemistry*, 277: 16464-16469.

HANAHAN, D. and WEINBERG, R.A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100: 57-70.

HARRISON, L.B., CHADHA, M., HILL, R.J., HU, K. and SHASHA, D. 2002. Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes. *The Oncologist*, 7(6): 492-508.

HARRISON, L. and BLACKWELL, K. 2004. Hypoxia and Anemia: Factors in Decreased Sensitivity to Radiation Therapy and Chemotherapy? *The Oncologist*, 9: 31-40.

HALL, R.J. and ERICKSON, C.A. 2003. ADAM 10: An Active Metalloprotease Expressed During Avian Epithelial Morphogenesis. *Developmental Biology*, 256: 146-159.

HANAI, J., DHANABAL, M., KARUMANCHI, S.A., ALBANESE C., WATERMAN, M., CHAN, B., RAMCHANDRAN, R., PESTELL, R. and SUKHATME, V.P. 2002. Endostatin Causes G1 Arrest of Endothelial

Cells Through Inhibition of Cyclin D1, *Journal of Biological Chemistry*, 277: 16464-16469.

HANAHAN, D. and WEINBERG, R.A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100: 57-70.

HARRISON, L.B., CHADHA, M., HILL, R.J., HU, K. and SHASHA, D. 2002. Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes. *The Oncologist*, 7(6): 492-508.

HARRISON, L. and BLACKWELL, K. 2004. Hypoxia and Anemia: Factors in Decreased Sensitivity to Radiation Therapy and Chemotherapy? *The Oncologist*, 9: 31-40.

HAUGEN, B.R., LARSON, I., PUGAZHENTHI, U., HAYS, W. R., KLOPPER, J.P., KRAMER, C.A. and SHARMA, V. 2004. Retinoic Acid and Retinoid X Receptors Are Differentially Expressed in Thyroid Cancer and Thyroid Carcinoma Cell Lines and Predict Response to Treatment with Retinoids. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(1): 272-280.

HUANG, S.M., LI, J., ARMSTRONG, E.A. and HARARI, P.M. 2002. Modulation of Radiation Response and Tumor-Induced Angiogenesis After Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition by ZD1839 (Iressa). *Cancer Research*, 62: 4300–4306.

IDE, A.G., BAKER, N.H. and WARREN, S.L. 1939. Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *American Journal of Roentgenology*, 42: 891-899.

INDRACCOLO, S., GOLA, E., ROSATO, A., MINUZZO, S., HABELER, W., TISATO, V., RONI, V., ESPOSITO, G., MORINI, M., ALBINI, A., NOONAN, D.M., FERRANTINI, M., AMADORI, A. and CHIECO-BIANCHI L. 2002. Differential effects of angiostatin, endostatin and

interferon- α_1 gene transfer on in vivo growth of human breast cancer cells. *Gene Therapy*, 9(13): 867–878, (2002)

IONOV, Y., YAMAMOTO, H., KRAJEWSKI, S., REED, J.C. and PERUCHO, M. 2000. Mutational Inactivation of the pro-apoptotic Gene BAX Confers Selective Advantage During Tumor Clonal Evolution. *Proceedings of the National Academy of Science*, 97: 10872–10877.

IWATA, N., MIZUMAKI, H., SHIROTANI, K., TAKAKI, Y., MURAMATSU, S.I., LU, B., GERARD, N.P., GERARD, C., OZAWAKA, K. and SAIDO, T.C. 2004. Presynaptic Localization of Neprilysin Contributes to Efficient Clearance of Amyloid- β Peptide in Mouse Brain. *The Journal of Neuroscience*, 24(4): 998-991.

JAIN, R.K. 2001. Normalizing Tumor Vasculature with Anti-Angiogenic Therapy: A New Paradigm for Combination Therapy. *Nature Medicine*, 7: 987-989.

JAGER, R. 2007. Targeting the death machinery in mammary epithelial cells: Implications for breast cancer from transgenic and tissue culture experiments. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 63: 231–240.

KALLURI, R. 2003. Basement Membranes: Structure, Assembly and Role in Tumour Angiogenesis. *National Reviews of Cancer*, 3: 422-433.

KANG, H.Y., SHIM, D., KANG, S.S., CHANG, S.I. and KIM, H.Y. 2006. Protein Kinase B Inhibits Endostatin-Induced Apoptosis in HUVECs. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 39: 97-104.

KERR, J.F.R., WINTERFORD, C.M. and HARMON, B.V. 1994. Apoptosis, Its Significance in Cancer and Cancer Therapy. *Cancer*, 73: 2013-2026.

- KIM, Y.M., JANG, J.W., LEE, O.H., YEON, J., CHOI, E.Y., KIM, K.W., LEE, S.T. and KWON Y.G. 2000. Endostatin Inhibits Endothelial and Tumor Cellular Invasion by Blocking the Activation and Catalytic Activity of Matrix Metalloproteinase. *Cancer Research*, 60: 5410-5413.
- KIM, E., MOORE, J., HUANG, J., SOFFER, S., MANLEY, C.A., O'TOOLE, K., MIDDLESWORTH, W., STOLAR, C.J., KANDEL, J.J. and YAMASHIRO, D.J. 2001. All angiogenesis is not the Same: Distinct Patterns of Response to Antiangiogenic Therapy in Experimental Neuroblastoma and Wilms' Tumor. *Journal of Pediatric Surgery*, 36: 287-290.
- KIM, Y.M., HWANG, Y.M., PYUNN, B.J., KIM, T.Y., LEE, S.T., GHOSH, Y.S. and KWON, Y.G. 2002. Endostatin Blocks Vascular Endothelial Growth Factor-Mediated Signaling Via Direct Interaction With KDR/Flk-1. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 27872-27879.
- KOPFSTEIN, L. and CHRISTOFORI, G. 2006. Metastasis: Cell-Autonomous Mechanisms Versus Contributions by the Tumor Microenvironment. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63: 449-468.
- KOZIN, S.V., BOUCHER, Y., HICKLIN, D.J., BOHLEN, P., JAIN, R.K. and SUIT, H.D. 2001. Vascular endothelial growth factor receptor-2-blocking antibody potentiates radiation-induced long-term control of human tumor xenografts. *Cancer Research*, 61(1): 39-44.
- KVOLS, K.L. 2005. Radiation Sensitizers: A Selective Review of Molecules Targeting DNA and non-DNA Targets. *The Journal Of Nuclear Medicine*, 46(1): 187-190.
- LAMMICH, S., KOJRO, E., POSTINA, R., GILBERT, S., PFEIFFER, M., JASIONOWSKI, H.C. and FAHRENHOLZ, F. 1999. Constitutive and

Regulated Alpha-secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by a Disintegrin Metalloprotease. *Proceedings of the National Academy of Science*, 96: 3922-3927.

LEE, C.G., HEIJN, M., DI TOMASSO, E., GRIFFON-ETIENNE, G., ANCIKIEWICZ, M., KOIKE, C., PARK, K.R., FERRARA, N., JAIN, R.K., SUIT, H.D. and BOUCHER, Y. 2000. Anti-vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Research*, 60: 5565–5570.

LEE, S.J., JANG, J.W., KIM, Y.M., LEE, H.I., JEON, J.Y., KWON, Y.G. and LEE, S.T. 2002. Endostatin Binds to the Catalytic Domain of Matrix Metalloproteinase-2. *FEBS Letters*, 519: 147-152.

LIIZUMI, M. LIU, W. PAI, S.K. FURUTA, E. WATABE, K. 2008. Drug development against metastasis-related genes and their pathways: A rationale for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1786: 87-104.

LIN, S.H. and MAIESE, K. 2001. The Metabotropic Glutamate Receptor System Protects Against Ischemic Free Radical Programmed Cell Death in Rat Brain Endothelial Cells. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 21: 262–275.

LITTLEWOOD, T.J. 2001. The Impact of Hemoglobin Levels on Treatment Outcomes in Patients with Cancer. *Seminars in Oncology*, 28(8): 49-53.

LOPEZ-PEREZ, E., ZHANG, Y., FRANK, S.J., CREEMERS, F.J., SEIDAH, N. and CHECLER, F. 2001. Constitutive Alpha-Secretase Cleavage of the Beta-Amyloid Precursor Protein in the Furin-Deficient LoVo Cell Line: Involvement of the Pro-Hormone Convertase 7 and the Disintegrin Metalloprotease ADAM10. *Journal of Neurochemistry*, 76: 1532-1539.

- LU, J., JIANG, W., YANG, J.H., CHANG, P.Y., WALTERSCHEID, J.P., CHEN, H.H., MARCELL, M., TANG, D., LEE, Y.T., LIAO, W.S.L., YANG, C.Y. and CHEN, C.H. 2008. Electronegative LDL Impairs Vascular Endothelial Cell Integrity in Diabetes by Disrupting Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) Autoregulation. *Diabetes*, 57(1): 158-166.
- LUND, E.L., BASTHOLM, L. and KRISTJANSEN, P.E. 2000. Therapeutic Synergy of TNP-470 and Ionizing Radiation: Effects on Tumor Growth, Vessel Morphology, and Angiogenesis in Human Glioblastoma Multiforme Xenografts. *Clinical Cancer Research*, 6: 971–978.
- LYDEN, D., HATTORI, K., DIAS, S., COSTA, C., BLAIKIE, P., BUTROS, L., CHADBURN, A., HEISSIG, B., MARKS, W., WITTE, L., WU, Y., HICKLIN, D., ZHU, Z., HACKETT, N.R., CRYSTAL, R.G., MOORE, M.A.S., HAJJAR, K.A., MANOVA, K., BENEZRA, R. and RAFII, S. 2001. Impaired Recruitment of Bone-Marrow-Derived Endothelial and Hematopoietic Precursor Cells Block Tumor Angiogenesis and Growth. *Nature Medicine*, 7:1194-1201.
- MACDONALD, J.S., SMALLEY, S.R., BENEDETTI, J., HUNDAHL, S.A., ESTES, N.C., STEMMERMANN, G.N., HALLER, D.G., AJANI, J.A., GUNDERSON, L.L., JESSUP, J.M. and MARTENSON, J.A. 2001. Chemoradiotherapy After Surgery Compared with Surgery Alone for Adenocarcinoma of the Stomach or Gastroesophageal Junction. *The New England Journal of Medicine*, 345: 725–730.
- MACPHERSON, G.R. and SYLVIA, S.W.Ng. 2003. Anti-angiogenic activity of human Endostatin is HIF-1- independent *in vitro* and sensitive to timing of treatment in human saphenous vein assay. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2: 845-854.

- MARION-AUDIBERT, A.M., NEJJARI, M., POURREYRON, C., ANDERSON, W., GOUYSSE, G., JACQUIER, M.F., DUMORTIER, J. and SCOAZEC, J.Y. 2000. Effects of Endocrine Peptides on Proliferation, Migration and Differentiation of Human Endothelial Cells. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, 24: 644-648.
- MILLER, K., SWEENEY, C. and SLEDGE, G. 2001. Redefining the Target: Chemotherapeutics as antiangiogenics. *Journal of Clinical Oncology*, 19: 1195–1206.
- MILLICHIP, M.I., DALLAS, D.J., WU, E., DALE, S. and MCKIE, N. 1998. The Metallo-Disintegrin ADAM-10 (MADM) From Bovine Kidney has Type IV Collagenase Activity *in Vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 245: 594-598.
- MITZNER, W. and WAGNER, E. 1992. On the purported discovery of the bronchial circulation by Leonardo da Vinci. *Journal of Applied Physiology*, 73(3): 1196-1201.
- MOCHIZUKI, S. and OKADA, Y. 2007. ADAMs in Cancer Cell Proliferation and Progression. *Cancer Sciences*, 98: 621-628.
- MOSES, M.A. 1997. The Regulation of Neovascularization of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors. *Stem Cells*, 15: 180-189.
- MUNOZ, M., PEREZ, A., COVENAS, R., ROSSO, M. and CASTRO, E. 2004. Antitumoural action of L-733,060 on neuroblastoma and glioma cell lines. *Archives Italiennes de Biologie Arch*, 142: 105–112.
- MURATA, R., NISHUMURA, Y. and HIRAOKA, M. 1997. An Antiangiogenic Agent (TNP-470) Inhibited Reoxygenation During Fractionated Radiotherapy

- of Murine Mammary Carcinoma. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 37: 1107–1113.
- MURPHY, G. 2008. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Cancer*, 8: 932-941.
- NORDSMARK, M., HOYER, M., KELLER, J., NIELSEN, O.S., JENSEN, O.M. and OVERGARD, J. 1996. The Relationship Between Tumor Oxygenation and Cell Proliferation in Human Soft Tissue Sarcomas. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 35: 701-708.
- NYBERG, P., Ylipalosaari, M., Sorsa, T. and Salo T. 2006. Trypsins and Their Role in Carcinoma Growth. *Experimental Cell Research*, 312: 1219-1228.
- OBRALIC, N., BILENJKI, D. and BILBIJA, Z. 1990. Prognostic Importance of Anemia Related Parameters in Patients with Carcinoma of the Cervix Uteri. *Acta Oncology*, 29: 199-201.
- OEHLER, M.K. and BICKNELL, R. 2000. The Promise of Anti-Angiogenic Cancer Therapy. *British Journal of Cancer*, 82: 749-752.
- ÖKTEM, S., ÖZHAN, M.H. and ÖZOL, D. 2001. Apoptozisin Önemi. *Toraks Dergisi*, 2(1): 91-95.
- O'REILLY, M.S., BOEHM, T., SHING, Y., FUKAI, N., VASIOS, G., LANE, W.S., FLYNN, E., BIRKHEAD, J.R., OLSEN, B.R. and FOLKMAN, J. 1997. Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. *Cell*, 88: 277-285.
- OTSUKA, M. and KONISHI, S. 1976. Release of Substance P-Like Immunoreactivity from Isolated Cord of Newborn Rat. *Nature*, 262: 83-84.

- OVERGAARD, J. and HORSMAN, M.R. 1996. Modification of Hypoxia-Induced Radioresistance in Tumors by the Use of Oxygen and Sensitizers. *Seminars in Radiation Oncology*, 6: 10-21.
- PALMA, C., NARDELLI, F., MANZINI, S. and MAGGI, C.A. 1999. Substance P activates responses correlated with tumour growth in human glioma cells line bearing tachykinin NK1 receptors. *British Journal of Cancer*, 79: 236–243.
- PANDYA, N.M., DHALLA, N.S. and SANTANI, D.D. 2006. Angiogenesis-A New Target For Future Therapy. *Vascular Pharmacology*, 44: 265-274.
- PAPAIKOVOU, V.E., BAMIAS, A. and DIMOPOULOS, M.A. 2004. Thalidomide in Cancer Medicine. *Annals of Oncology*, 15: 1151–1160.
- POLYAK, K. 2007. Breast cancer: origins and evolution. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(11): 3155-3163.
- PENBERTHY, D.R., RICH, T.A. and SHELTON, C.H. 2001. Adams R., Minasi J. S. Jones R. S. A Pilot Study of Chronomodulated Infusional 5-Fluorouracil Chemoradiation for Pancreatic Cancer. *Annals Oncology*, 12: 681– 684.
- PONDER, B.A.J. 2001. Cancer genetics, *Nature*, 41: 336-341.
- PREHN, R.T. 1991. The Inhibition of Tumor Growth by Tumor Mass. *Cancer Research*, 51: 2-4.
- PREHN, R.T. 1993. Two Competing Influences that May Explain Concomitant Tumor Resistance. *Cancer Research*, 53: 3266-3269.

- QESADA, A.R., MUNOZ-CHAPULI, R. and MEDINA, M.A. 2006. Anti-Angiogenic Drugs: from Bench to Clinical Trials. *Medicinal Research Reviews*, 26(4): 483-530.
- REED, J. 1999. Dysregulation of Apoptosis in Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 17: 2941–2953.
- REGE, T.A., FEARS, C.Y. and GLADSON, C.L. 2005. Endogenous inhibitors of angiogenesis in malignant gliomas: Nature's antiangiogenic therapy. *Neuro-Oncology*, 7:106-121.
- REHN, M., VEIKKKOLA, T., KUKK-VALDRE, E., NAKAMURA, H., ILMONEN, M., LOMBARDO, C., PIHLAJANIEMI, T., ALITALO, K. and VUORI, K. 2001. Interaction of Endostatin With Integrins Implicated in Angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Science*, 98: 1024-1029.
- RENNEBERG, H., ALBRECHT, M., KUREK, R., KRAUSE, E., LOTTSPEICH, F., AUMULLER, G. and WILHELM, B. 2001. Identification and Characterization of Neutral Endopeptidase (EC 3.4.24.11) from Human Prostatomes-localization in Prostatic Tissue and Cell Lines. *Prostate*, 46: 173-183.
- RISAU, W. 1997. Mechanisms of Angiogenesis. *Nature*, 386: 671-674.
- ROSATI, R., ADIL, M.R., ALI M.A., ELIASON, J., OROSZ, A., SEBESTYÉN, F. and KALEMKERIAN, G.P. 1998. Induction of apoptosis by a short-chain neuropeptide analog in small cell lung cancer. *Peptides*, 19(9): 1519-1523.

- ROSEN, L.S. 2002. Clinical Experience With Angiogenesis Signaling Inhibitors: Focus on Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Blockers. *Cancer Control*, 9: 36-44.
- ROSENBERG, G.A. 2009. Matrix Metalloproteinases and Their Multiple Roles in Neurodegenerative Diseases. *Lancet Neurology*, 8(2): 205-216.
- ROSENDHALL, M.S., KO, S.C., LONG, M.T., BREWER, B., ROSENZWEIG, E., HEDL, L., ANADERSON, S.M., PYLE, J., MORELAND, M.A., MEYERS, T., KOHNO, T., LYONS, D. And LICHENSTEIN, H.S. 1997. Identification and Characterization of a Pro-Tumor Necrosis Factor- α -Processing Enzyme from the ADAM Family of Zinc Metalloproteases. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 24588-24593.
- ROY, R., ZHANG, B. and MOSES, M.A. 2006. Making the Cut: Protease-Mediated Regulation of Angiogenesis. *Experimental Cell Research*, 312: 608-622.
- RYAN, D.P., COMPTON, C.C. and MAYER, R.J. 2000. Medical Progress: Carcinoma of the Anal Canal. *The New England Journal of Medicine*, 342: 792–800.
- SAARELA, J., REHN, M., OIKARINEN, A., AUTO-HARMAINEN, H. and PIHLAJANIEMI T. 1998. The short and Long Forms of Type XVIII Collagen Show Clear Tissue Specificities in Their Expression and Location in Basement Membrane Zones in Humans. *American Journal of Pathology*, 153: 611-626.
- SALO, P., BRAY, R., SEERATTAN, R., RENO C., MCDOUGALL, J. and HART, D.A. 2007. Neuropeptides Regulate Expression of Matrix Molecule, Growth Factor and Inflammatory Mediator mRNA in Explants of Normal and Healing Medial Collateral Ligament. *Regulatory Peptides*, 142: 1-6.

- SATO, Y., ITOH, F., HINODA, Y., OHE, Y., NAKAGAWA, N., UEDA, R., YACHI, A. and IMAI K. 1996. Expression of CD10/neutral Endopeptidase in Normal and Malignant Tissues of the Human Stomach and Colon. *Journal of Gastroenterology*, 31: 12-17.
- SEALS, D.F. and COURTNEIDGE, S.A. 2003. The ADAMs Family of Metalloproteinases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes & Development*, 17: 7-30.
- SEBASTIEN, P.T. and ARJAN, W.G. 2007. Molecular pathways of angiogenesis inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 355: 1-5.
- SEMENZA, G.L. 2001. Regulation of Hypoxia-Induced Angiogenesis: A Chaperone Escorts VEGF to the Dance. *Journal of Clinical Investigation*, 108: 39-40.
- SHICHIRI, M. and HIRATA, Y. 2001. Antiangiogenesis Signals by Endostatin. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 15: 1044-1053.
- SHIPP, M.A., RICHARDSON, N.E. SAYRE, P.H. BROWN, N.R. MASTELLER, E.L. CLAYTON, L.K. RITZ, J. and REINHERZ, E.L. 1996. Molecular Cloning of the Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen (CALLA) Identifies a Type II Integral Membrane Protein. *Proceedings of the National Academy of Science*, 85: 4819-4823.
- SKIDGEL, R.A. and ERDÖS, E.G. 2004. Angiotensin Converting Enzyme (ACE) and Neprilysin Hydrolyze Neuropeptides: a Brief History, the Beginning and Follow-Ups to Early Studies. *Peptides*, 25(3): 521-525.

- SINGH, R.K., GUTMAN, M., BUCANA, C.D., SANCHEZ, R., LLANSA, N. and FIDLER, I.J. 1995. Interferons alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 4562-4566.
- SINGH, D., JOSHI, D.D., HAMEED, M., QIAN, J., GASCON, P., MALOOF, P.B., MOSENTHAL, A. and RAMESHWAR, P. 2000. Increased expression of preprotachykinin-I and neurokinin receptors in human breast cancer cells: implications for bone marrow metastasis. *Proceedings of the National Academy of Science*, 97: 388–393.
- SOINI, Y. PAAKKO, P. LEHTO, V.P. 1998. Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. *American Journal of Pathology*, 153: 1043-1049.
- SOOD, A.K., SEFTOR, E.A., FLETCHER, M.S., GARDNER, L.M.G., HEIDGER, P.M., BULLER, R.E., SEFTOR, R.E.B. and HENDRIX, M.J.C. 2001. Molecular Determinants of Ovarian Cancer Plasticity. *American Society for Investigative Pathology*, 158: 1279-1288.
- STADLER, W. and WILDING, G. 2003. Angiogenesis Inhibitors in Genitpurinary Cancers. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 46: 41-47.
- STRIETER, R.M., POLVERINI, P.J., KUNKEL, S.L., ARENBERG, D.A., BURDICK, M.D., KASPER, J., DZUIBA, J., VAN DAMME, J., WALZ, A. and MARRIOT, D. 1995. The Functional Role of the ELR Motif in CXC Chemokine-Mediated Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 27348-27357.
- STUBEN, G., POTTGEN, C., KNUHMANN, K., SCHMIDT, K., STUSCHKE, M., THEWS, O. and VAUPEL, P. 2003. Erythropoietin restores the anemia-induced reduction in radiosensitivity of experimental human tumors in

nude mice. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 55(5):1358-1362.

SUMNER, S.C., GALLAGHER, K.S., DAVIS, D.G., COVELL, R.L., JERNIGAN, R.L. and FERETTI, J.A. 1990. Conformational Analysis of the Tachykinins in Solution: Substance P and Physalaemin. *The Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 8: 687-707.

TADDEI, L. and CHIARUNGI, P. 1999. Inhibitory Effect of Full Length Human Endostatin on *In Vitro* Angiogenesis: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 263: 340-345.

TALLANT, C., MARRERO, A. and GOMIS-RUTH, F.X. 2010. Matrix Metalloproteinases: Fold and Function of Their Catalytic Domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(1): 20-28.

TANAHASHI, H. and YOSHIOKA, K. 2008. RNA interference silencing of DRAL affects processing of amyloid precursor protein *Neuroscience Letters*, 439(3): 293-297.

TEICHER, B.A., HOLDEN, S.A., ARA, G., DUPUIS, N.P., LIU, F., YUAN, J., IKEBE, M. and KAKEJI, Y. 1995. Influence of an anti-angiogenic Treatment on 9L Gliosarcoma: Oxygenation and Response to Cytotoxic Therapy. *International Journal of Cancer*, 61: 732–737.

THOMAS, G.M. 1999. Improved Treatment for Cervical Cancer: Concurrent Chemotherapy and Radiotherapy. *The New England Journal of Medicine*, 340: 1198 –1200.

THOMAS, J.P., ARZOOMANIAN, R.Z., ALBERTI, D., MARNOCHA, R., LEE, F., FRIEDL, A., TUTSCH, K., DRESEN, A., GEIGER, P., PLUDA, J.,

- FOGLER, W., SCHILLER, J.H. and WILDING, G. 2003. Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of Recombinant Human Endostatin in Patients With Advanced Solid Tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 21: 223-231.
- TROCHON, V., LI, H. And VASSE, M. 1998. Endothelial Metalloproteinases-Disintegrin Protein (ADAM) is Implicated in Angiogenesis *in vitro*. *Angiogenesis*, 2: 277-285.
- TSCHOPP, J., MARTINON, F. and HOFMANN, K. 1999. Apoptosis: Silencing the Death Receptors. *Current Biology*, 9: 381–384.
- TURK, J.L. 1994. Inflammation: John Hunter's "A treatise on the blood, inflammation and gun-shot wounds". *International Journal of Experimental Pathology*, 75(6):385-95.
- TURNER, A.J. and HOOPER, N.M. 2002. The Angiotensin-Converting Enzyme Gene Family: genomics and pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23: 177-183.
- URBICH, C., REISSNER, A., CHAVAKIS, E., DERNBACH, E., HAENDELER, J., FLEMING, I., ZEIHNER, A.M., KASZKIN, M. and DIMMELER, S. 2002. Dephosphorylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Contributes to the Anti-Angiogenic Effects of Endostatin. *Federation of European Biochemical Societies Letters Journal*, 98: 1024-1029.
- URSINO, M.G., VASINA, V. and DE PONTI, F. Protection from DNBS-Induced colitis by the tachykinin NK₁ receptor antagonist SR140333 in rats *European Journal of Pharmacology*, 603(1): 133-137.
- USMANI, B.A., HARDEN, B., MAITLAND, N.J. and TURNER, A.J. 2002. Differential Expression of Neutral Endopeptidase-24.11 (neprilysin) and

Endothelin-Converting Enzyme in Human Prostate Cancer Cell Lines. *Clinical Sciences*, 103: 314-317.

VANDEPUTTE-RUTTEN, L. and GROS, P. 2002. Novel proteases: common themes and surprising features. *Current Opinion in Structural Biology*, 12: 704-708.

VAN WART, H.E. and BIRKEDAL-HANSEN, H. 1990. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87: 5578-5582.

WACHSBERGER, P., BURD, R. and DICKER, A.P. 2003. Tumor Response to Ionizing Radiation Combined with Antiangiogenesis or Vascular Targeting Agents: Exploring Mechanisms of Interaction. *Clinical Cancer Research*, 9: 1957-1971.

WEINBERG, R.A. 1996. How cancer arises? *Scientific American*, 275: 62-70.

WEIR, B., ZHAO, X. and MEYERSON, M. 2004. Somatic alterations in the human cancer genome. *Cancer Cell*, 6(5): 433-438.

WEN, W., MOSES, M.A., WIEDERSCHAIN, D., ARBÏSER, J.L. and FOLKMAN, J. 1999. The Generation of Endostatin is Mediated by Elastase. *Cancer Research*, 59: 6051-6056.

WOUTERS, A.N., PAUWELS, B., LARDON, F. and VERMORKEN, J.B. 2007. Review: Implications of *In Vitro* Research on the Effect of Radiotherapy and Chemotherapy Under Hypoxic Conditions. *The Oncologist*, 12: 690-712.

- YALCIN, O., ULKER, P., YAVUZER, U., MEISELMAN, H.J. and BASKURT, O.K. 2008. Nitric oxide generation by endothelial cells exposed to shear stress in glass. *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, 294: H2098–H2105.
- YAMAZAKI, K., MIZUI, Y. and TANAKA, I. 1997. Radiation Hybrid Mapping of Human ADAM10 Gene to Chromosome 15. *Genomics*, 45: 457-459.
- YEE, R.W., NORCOM, E.G. and ZHAO, X.C. 2006. Comparison of the relative toxicity of travoprost 0.004% without benzalkonium chloride and latanoprost 0.005% in an immortalized human cornea epithelial cell culture system *Advances in Therapy*, 23(4): 511-518.
- ZATTERSTROM, U.K., FELBOR, U., FUKAI, N. and OLSEN, B.R. 2000. Collagen XVIII/Endostatin Structure and Functional Role in Angiogenesis. *Cell Structure And Function*, 25: 97–101
- ZHENG, T.S., SCHLOSSER, S.F., DAO, T., HINGORANI, R., CRISPE, I.N., BOYER, J.L. and FLAVELL, R.A. 1998. Caspase-3 Controls Both Cytoplasmic and Nuclear Events Associated with Fas-Mediated Apoptosis in Vivo. *Cell Biology*, 95: 13618–13623.
- ZORNIG, M., HUEBER, A.O., BAUM W. and Evan G. 2001. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1551: 1-37.

Çizelge 4.1. 4T1 ve 4THMpc hücreleri üzerine etki göstermeyen radyoterapi dozları

4T1 Hücre Hattı																		
Hücre sayısı	5 Gy Radyoterapi						10 Gy Radyoterapi						20 Gy Radyoterapi					
	24 Saat		48 Saat		72 Saat		24 Saat		48 Saat		72 Saat		24 Saat		48 Saat		72 Saat	
	Kontrol	Radyo Terapi	Kontrol	Radyo Terapi	Kontrol	Radyo Terapi	Kontrol	Radyo Terapi	Kontrol	Radyo Terapi	Kontrol	Radyo Terapi	Kontrol	Radyo Terapi	Kontrol	Radyo Terapi	Kontrol	Radyo Terapi
1000	0,247 ± 0,05	0,217 ± 0,04	0,471 ± 0,05	0,455 ± 0,01	0,596 ± 0,01	0,557 ± 0,01	0,257 ± 0,05	0,247 ± 0,04	0,442 ± 0,04	0,437 ± 0,02	0,606 ± 0,01	0,597 ± 0,02	0,256 ± 0,05	0,210 ± 0,04	0,492 ± 0,05	0,465 ± 0,01	0,600 ± 0,01	0,578 ± 0,03
2500	0,361 ± 0,01	0,313 ± 0,03	0,524 ± 0,04	0,547 ± 0,01	0,668 ± 0,03	0,661 ± 0,03	0,352 ± 0,01	0,323 ± 0,02	0,514 ± 0,04	0,497 ± 0,01	0,667 ± 0,03	0,661 ± 0,02	0,347 ± 0,05	0,310 ± 0,01	0,534 ± 0,04	0,519 ± 0,01	0,697 ± 0,02	0,621 ± 0,04
3000	0,434 ± 0,01	0,420 ± 0,05	0,601 ± 0,05	0,598 ± 0,02	0,783 ± 0,06	0,775 ± 0,02	0,444 ± 0,02	0,410 ± 0,03	0,878 ± 0,05	0,868 ± 0,02	0,793 ± 0,04	0,782 ± 0,01	0,429 ± 0,01	0,420 ± 0,03	0,615 ± 0,03	0,589 ± 0,03	0,792 ± 0,03	0,745 ± 0,02
5000	0,600 ± 0,02	0,584 ± 0,06	0,715 ± 0,05	0,701 ± 0,02	0,853 ± 0,05	0,803 ± 0,03	0,507 ± 0,01	0,494 ± 0,05	0,715 ± 0,05	0,701 ± 0,05	0,881 ± 0,02	0,832 ± 0,02	0,611 ± 0,02	0,569 ± 0,03	0,745 ± 0,03	0,711 ± 0,02	0,873 ± 0,03	0,811 ± 0,02
10000	0,711 ± 0,01	0,701 ± 0,02	0,741 ± 0,02	0,726 ± 0,03	1,071 ± 0,04	0,997 ± 0,02	0,570 ± 0,01	0,560 ± 0,01	0,761 ± 0,02	0,746 ± 0,03	1,092 ± 0,02	1,003 ± 0,01	0,731 ± 0,01	0,700 ± 0,02	0,781 ± 0,04	0,717 ± 0,02	1,099 ± 0,02	0,978 ± 0,03
4THMpc Hücre Hattı																		
Hücre sayısı	5 Gy Radyoterapi						10 Gy Radyoterapi						20 Gy Radyoterapi					
	24 Saat		48 Saat		72 Saat		24 Saat		48 Saat		72 Saat		24 Saat		48 Saat		72 Saat	
	Kontrol	Radyo Terapi	Kontrol	Radyo Terapi	Kontrol	Radyo Terapi	Kontrol	Radyo Terapi	Kontrol	Radyo Terapi	Kontrol	Radyo Terapi	Kontrol	Radyo Terapi	Kontrol	Radyo Terapi	Kontrol	Radyo Terapi
1000	0,376 ± 0,02	0,367 ± 0,03	0,501 ± 0,04	0,483 ± 0,03	0,615 ± 0,03	0,596 ± 0,02	0,324 ± 0,05	0,298 ± 0,04	0,498 ± 0,02	0,447 ± 0,03	0,617 ± 0,01	0,605 ± 0,02	0,298 ± 0,01	0,267 ± 0,01	0,609 ± 0,03	0,599 ± 0,01	0,645 ± 0,01	0,608 ± 0,03
2500	0,461 ± 0,04	0,398 ± 0,03	0,657 ± 0,01	0,640 ± 0,05	0,698 ± 0,02	0,687 ± 0,03	0,405 ± 0,01	0,396 ± 0,02	0,554 ± 0,01	0,517 ± 0,04	0,708 ± 0,02	0,700 ± 0,05	0,356 ± 0,03	0,300 ± 0,03	0,634 ± 0,04	0,613 ± 0,01	0,708 ± 0,02	0,692 ± 0,04
3000	0,536 ± 0,03	0,499 ± 0,02	0,694 ± 0,03	0,691 ± 0,03	0,899 ± 0,03	0,817 ± 0,03	0,496 ± 0,04	0,400 ± 0,05	0,694 ± 0,05	0,658 ± 0,02	0,835 ± 0,04	0,824 ± 0,02	0,400 ± 0,02	0,354 ± 0,01	0,697 ± 0,01	0,619 ± 0,01	0,869 ± 0,03	0,835 ± 0,02
5000	0,779 ± 0,04	0,698 ± 0,03	0,834 ± 0,02	0,791 ± 0,05	0,953 ± 0,01	0,899 ± 0,02	0,634 ± 0,03	0,597 ± 0,03	0,804 ± 0,01	0,794 ± 0,01	0,948 ± 0,04	0,902 ± 0,03	0,719 ± 0,03	0,699 ± 0,02	0,795 ± 0,03	0,736 ± 0,03	0,899 ± 0,03	0,800 ± 0,02
10000	0,976 ± 0,03	0,51 ± 0,04	0,981 ± 0,03	0,936 ± 0,04	1,269 ± 0,03	1,097 ± 0,03	0,826 ± 0,05	0,820 ± 0,04	1,187 ± 0,02	1,158 ± 0,01	1,385 ± 0,03	1,297 ± 0,04	0,890 ± 0,02	0,863 ± 0,02	0,998 ± 0,05	0,965 ± 0,04	1,246 ± 0,02	1,178 ± 0,03

Çizelge 4.1. 4T1 ve 4THMpc hücreleri üzerine etki göstermeyen radyoterapi dozları

ÖZGEÇMİŞ

Esra ARSLAN AYDEMİR, 1978 yılında Denizli’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Denizli’de tamamladıktan sonra 1996 yılında Denizli Anadolu Lisesinden mezun oldu. 1996 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde başladığı lisans öğrenimini, 2000 yılında tamamladı. Aynı yıl Yüksek lisans öğrenimine başladığı Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı’na Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2004 yılında başladığı Doktora öğrenimine devam eden Esra ARSLAN AYDEMİR, halen Araştırma Görevlisi olarak görevini sürdürmektedir.