



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



[Yüksek Lisans Tezi]

[BAZI FİTOKİMYASALLARIN *İN VİTRO* VE *İN VİVO* BİYOLOJİK  
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ]

[Melisa MANAV]

[Biyoloji Anabilim Dalı]

[Zooloji Programı]

DANIŞMAN  
[Prof. Dr.] [Ebru GÜREL GÜREVİN]

[II. DANIŞMAN  
Dr. Öğr. Üyesi Hülya Tuba KIYAN]

[Temmuz, 2024]

İSTANBUL

Bu çalışma, [3.07.2024] tarihinde aşağıdaki jüri tarafından [Biyoloji Anabilim Dalı], [Zooloji Programı]nda [Yüksek Lisans tezi] olarak kabul edilmiştir.

### Tez Jürisi

[Prof. Dr.] [Ebru GÜREL GÜREVİN] (Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
[Fen Fakültesi]

[Doç. Dr.] [Cenk KIĞI]  
İstanbul Üniversitesi  
[Fen Fakültesi]

[Doç. Dr.] [Zelal ADIGÜZEL]  
[Koç Üniversitesi]  
[Tıp Fakültesi]

### **İntihal Programı Beyanı**

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

### **Proje Destekleri**

[Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2023-39516 numaralı projesi ile desteklenmiştir. ]

### **Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri**

[ ]

## ÖNSÖZ

[Bu tez, Combretastatin A-4, plumbagin, berbamin, silibinin ve lentinan doğal biyoaktif bileşiklerinin, A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve HUVEC insan umbilikal ven endotel hücrelerinde *in vitro* sitotoksik etkinliklerinin belirlenmesi, etkin biyoaktif bileşiklerin *in vitro* anjiyogenez ve anjiyogenik faktörlerin ifadesi, ayrıca A549 akciğer kanseri hücreleriyle tümör oluşturulan kuluçkalık yumurtalarda *in vivo* tümör anjiyogenezi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Yüksek lisans sürecim boyunca bilgi birikimini benimle paylaşan, manevi desteğini her daim hissettiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Ebru GÜREL GÜREVİN'e,

Bilimsel katkılarıyla tez sürecimin başarılı bir şekilde tamamlanmasına destek veren sevgili ikinci danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Hülya Tuba KIYAN'a,

Deneylerim boyunca, bilimsel ve manevi desteğini benden esirgemeyen, tezimin *in vitro* çalışmalarında çok büyük katkıları olan sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Serap SANCAR'a,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca, ne zaman ihtiyacım olsa yanımda olan değerli hocam Doç. Dr. Ayşegül KAPUCU'ya ve tecrübelerinden yararlandığım sevgili hocalarım Doç. Dr. Nadim YILMAZER ve Doç. Dr. Aslı KANDİL'e,

Tez deneylerimin *in vivo* kısmını gerçekleştirebilmem için kuluçkalık yumurtaları tedarik eden Pak Tavuk firmasına,

Yüksek lisans tezim boyunca, çalışmalarımda her zaman yardımcı olan sevgili hocam Dr. Biyolog Deniz EROL KUTUCU'ya, deneylerimizi birbirimize destek olarak yürüttüğümüz değerli arkadaşım Uzman Biyolog Gözde GÜNEŞ'e, hücre kültürü çalışmalarım boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Uzman Biyolog Tuba ÇAN'a, laboratuvar çalışmalarımız süresince neşesi ve desteğiyle yanımda olan Uzman Biyolog Sumayyah Abu nnaja'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans sürecimde ve yaşamımda daima desteğini hissettiğim, her derdimi dinleyen ve çözüm bulmaya çalışan meslektaşım ve dostum Biyolog Şule Gamze YILDIRIM'a teşekkür ederim.

Son olarak, hayatımın her alanında olduğu gibi tez sürecimde de her zaman yanımda olan, desteğini ve sonsuz sabrını benden esirgemeyen sevgili nişanlım Beşir Fatih TATLICI'ya, çocukluğumdan beri beni sevgisiyle sarıp sarmalayan biricik anneannem Şahinde ACAR'a, hayatım boyunca aldığım her kararda arkamda duran ve beni motive eden, iş disiplinine hayran olarak büyüdüğüm canım annem Nalan KAÇAN'a, teşekkür ederim. ]

Temmuz 2024

[Melisa MANAV]

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

|                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------|
| [ÖNSÖZ.....                                                           | iv        |
| İÇİNDEKİLER .....                                                     | v         |
| ŞEKİL LİSTESİ.....                                                    | vii       |
| TABLO LİSTESİ.....                                                    | ix        |
| SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ .....                                       | x         |
| ÖZET.....                                                             | xii       |
| SUMMARY.....                                                          | xiv       |
| <b>1. GİRİŞ.....</b>                                                  | <b>1</b>  |
| <b>2. GENEL KISIMLAR .....</b>                                        | <b>2</b>  |
| 2.1. KANSER.....                                                      | 2         |
| 2.2. TÜMÖR ANJİYOGENEZİ VE METASTAZ .....                             | 3         |
| 2.2.1. Anjiyogenez .....                                              | 3         |
| 2.2.2. Anjiyogenez Mekanizması.....                                   | 4         |
| 2.2.3. Tümör Anjiyogenezi ve Metastaz .....                           | 6         |
| 2.2.3.1. Tümör Anjiyogenezinde Bazı Anjiyogenik Faktörlerin Rolü..... | 10        |
| 2.3. İN VİVO ANJİYOGENEZ MODELLERİ .....                              | 11        |
| 2.3.1. Kornea Anjiyogenez Modeli.....                                 | 11        |
| 2.3.2. Matrigel Tıkaç Yöntemi .....                                   | 13        |
| 2.3.3. Koryo-Allantoyik Membran (CAM) Yöntemi.....                    | 14        |
| 2.4. KANSER TERAPİSİNDE DOĞAL KAYNAKLI BİLEŞİKLER .....               | 19        |
| 2.4.1. Silibinin.....                                                 | 20        |
| 2.4.2. Plumbagin .....                                                | 21        |
| 2.4.3. Berbamin.....                                                  | 23        |
| 2.4.4. Combretastatin .....                                           | 25        |
| 2.4.5. Lentinan .....                                                 | 27        |
| <b>3. MALZEME VE YÖNTEM.....</b>                                      | <b>29</b> |
| 3.1. İN VİTRO ÇALIŞMALAR.....                                         | 29        |
| 3.1.1. Hücre Kültürü.....                                             | 29        |
| 3.1.1.1. Hücrelerin Pasajlanması.....                                 | 29        |
| 3.1.1.2. Hücrelerin Ekimi.....                                        | 29        |

|                                                                                                      |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1.1.3. Biyoaktif Bileşiklerin Hazırlanması .....                                                   | 30        |
| 3.1.2. Sitotoksik Aktivite Analizi .....                                                             | 30        |
| 3.1.2.1. MTT Hücre Canlılık Testi.....                                                               | 30        |
| 3.1.2.2. Sülförödamın B Hücre Canlılık Testi.....                                                    | 31        |
| 3.1.3. Tüp Oluşumu Analizi .....                                                                     | 32        |
| 3.1.4. Western Blot Yöntemi .....                                                                    | 32        |
| 3.1.4.1. Protein İzolasyonu .....                                                                    | 32        |
| 3.1.4.2. Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi ve Örneklerin Hazırlanması..... | 33        |
| 3.1.4.3. Sodyum Dodesil Sülfat - Poliakrilamid Jel Elektroföresi (SDS-PAGE) ve Aktarım .....         | 33        |
| 3.1.4.4. Membranların Bloklanması, Antikor Uygulaması ve Görüntüleme .....                           | 34        |
| 3.2. İN VİVO ÇALIŞMALAR.....                                                                         | 35        |
| 3.2.1. Tümör Anjiyogenezi Koryo-Allantoyik Membran (CAM) Yöntemi.....                                | 35        |
| 3.2.1.1. Döllenmiş Yumurtaların Hazırlanması .....                                                   | 35        |
| 3.2.1.2. Kansere Hücrelerinin ve Biyoaktif Maddelerin Hazırlanması .....                             | 36        |
| 3.2.1.3. Matrigel/Hücre Süspansiyonlarının CAM Üzerine Uygulanması .....                             | 37        |
| 3.2.2. Histolojik Yöntem .....                                                                       | 38        |
| 3.2.2.1. Hematoksilen-Eozin Boyama.....                                                              | 38        |
| 3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ .....                                                                      | 39        |
| <b>4. BULGULAR.....</b>                                                                              | <b>40</b> |
| 4.1. İN VİTRO BULGULAR.....                                                                          | 40        |
| 4.1.1. Sitotoksik Aktivite Sonuçları.....                                                            | 40        |
| 4.1.1.1. MTT Hücre Canlılık Testi Sonuçları.....                                                     | 40        |
| 4.1.1.2. SRB Hücre Canlılık Testi Sonuçları.....                                                     | 46        |
| 4.1.2. Tüp Oluşumu Sonuçları.....                                                                    | 51        |
| 4.1.3. Western Blot Sonuçları.....                                                                   | 54        |
| 4.2. İN VİVO BULGULAR.....                                                                           | 55        |
| 4.2.1. Tümör Anjiyogenezi CAM Analizi.....                                                           | 55        |
| 4.2.2. Histolojik Bulgular .....                                                                     | 57        |
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>                                                                    | <b>59</b> |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>                                                                                | <b>79</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>                                                                                | <b>91</b> |

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 2.1:</b> Anjiyogenez dengesinin bozulmasının neden olduğu hastalıklar (Al-Ostoot ve diğ., 2021). ....                                                                                                                                                                                                                                                              | 4  |
| <b>Şekil 2.2:</b> Anjiyogenez süreci (Bryan ve D'Amore, 2007).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 5  |
| <b>Şekil 2.3:</b> Anjiyogenik anahtarın aktivasyonu ve anjiyogenik faktörler (Yue ve diğ., 2007).....                                                                                                                                                                                                                                                                       | 8  |
| <b>Şekil 2.4:</b> Embriyonik gelişiminin 7. günündeki kuluçkalık embriyo (Gánti, 2003). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                | 16 |
| <b>Şekil 2.5:</b> Silibininin moleküler yapısı. <a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Silibinin">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Silibinin</a> Ziyaret Tarihi 17.05.2024]. ....                                                                                                                                                                      | 20 |
| <b>Şekil 2.6:</b> Plumbaginın moleküler yapısı <a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Plumbagin">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Plumbagin</a> Ziyaret Tarihi 17.05.2024]. ....                                                                                                                                                                       | 22 |
| <b>Şekil 2.7:</b> Berbaminin moleküler yapısı [ <a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16217067">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16217067</a> Ziyaret Tarihi 17.05.2024]. ....                                                                                                                                                                        | 24 |
| <b>Şekil 2.8:</b> Combretastatinin moleküler yapısı [ <a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Combretastatin">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Combretastatin</a> Ziyaret Tarihi 17.05.2024]. ....                                                                                                                                                      | 25 |
| <b>Şekil 2.9:</b> CA-4'ün moleküler yapısı [ <a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5351344">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5351344</a> Ziyaret Tarihi 17.05.2024]. ....                                                                                                                                                                             | 26 |
| <b>Şekil 2.10:</b> Lentinanın moleküler yapısı [ <a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/37723">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/37723</a> Ziyaret Tarihi 17.05.2024]. ....                                                                                                                                                                             | 27 |
| <b>Şekil 3.1:</b> Döllenmiş yumurtaların yatay inkübasyonu.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 35 |
| <b>Şekil 3.2:</b> Madde uygulanan ve streç film yardımıyla kapatılan döllenmiş yumurtalar.....                                                                                                                                                                                                                                                                              | 37 |
| <b>Şekil 3.3:</b> CAM yönteminin uygulanışı. A: Kuluçkalık yumurtalardan albümin çekilmesi. B: Üst kabuk kısmının pens yardımıyla çıkarılması. C: Steril disklerin yerleştirilmesi. D: Matrigel/Hücre süspansiyonlarının disk içerisine inokülasyonu. E: Yumurtaların hava almayacak şekilde steril bir streç film yardımıyla kapatılması (BioRender ile oluşturuldu). .... | 38 |
| <b>Şekil 4.1:</b> A549 ve HUVEC hücre hatlarında Combretastatin A-4 (CA-4), plumbagin (PL), berbamin (BRB), silibinin (SLB) ve lentinan (LNT) maddeleriyle 24, 48 ve 72 saatlik tedavi sonrası MTT testi ile belirlenen hücre canlılık değerleri. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001; kontrole göre anlamlılık değerleri.....                                                    | 45 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.1 (devamı):</b> A549 ve HUVEC hücre hatlarında Combretastatin A-4 (CA-4), plumbagin (PL), berbamin (BRB), silibinin (SLB) ve lentinan (LNT) maddeleriyle 24, 48 ve 72 saatlik tedavi sonrası MTT testi ile belirlenen hücre canlılık değerleri. * $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ , *** $p < 0,001$ ; kontrole göre anlamlılık değerleri. ....                                                                                                                                                                                                                                      | 46 |
| <b>Şekil 4.2:</b> A549 ve HUVEC hücre hatlarında Combretastatin A-4 (CA-4), plumbagin (PL), berbamin (BRB) maddeleriyle 24, 48 ve 72 saatlik tedavi sonrası SRB testi ile belirlenen hücre canlılık değerleri. * $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ , *** $p < 0,001$ ; kontrole göre anlamlılık değerleri. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 50 |
| <b>Şekil 4.3:</b> Combretastatin A-4 (CA-4; 1 ve 5 $\mu\text{M}$ ), plumbagin (PL; 1 ve 3 $\mu\text{M}$ ) ve berbamin (BRB; 5 ve 10 $\mu\text{M}$ ) maddelerinin HUVEC hücre hattında 10 saat tedavi sonucu tüp oluşumu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi. ** $p < 0,01$ , *** $p < 0,001$ ; kontrole göre anlamlılık değerleri.....                                                                                                                                                                                                                                                    | 52 |
| <b>Şekil 4.4:</b> HUVEC hücre hattında Combretastatin A-4 (CA-4; 1 ve 5 $\mu\text{M}$ ), plumbagin (PL; 1 ve 3 $\mu\text{M}$ ) ve berbamin (BRB; 5 ve 10 $\mu\text{M}$ ) maddeleriyle 10 saat tedavi sonucu tüp oluşumu. Fotoğraflar, invert ışık mikroskobu ile 10X büyütmede çekildi. Bar: 100 $\mu\text{m}$ .....                                                                                                                                                                                                                                                                      | 53 |
| <b>Şekil 4.5:</b> A549 hücrelerinde Combretastatin A-4 (CA-4; 5 $\mu\text{M}$ ) ve berbamin (BRB; 10 $\mu\text{M}$ ) maddeleriyle tedavinin VEGF-A ve MMP-2 ifadeleri üzerine etkilerinin belirlenmesi. A) Protein bantları. Beta-aktine oranlama yapılarak belirlenen B) VEGF-A ve C) MMP-2 proteinlerinin seviyeleri. ** $p < 0,01$ , *** $p < 0,001$ ; beta-aktine (kontrol) göre anlamlılık değerleri. ....                                                                                                                                                                           | 55 |
| <b>Şekil 4.6:</b> A549 hücrelerinde plumbagin (PL; 10 $\mu\text{M}$ ) maddesiyle tedavinin VEGF-A ve MMP-2 ifadeleri üzerine etkilerinin belirlenmesi. A) Protein bantları. Beta-aktine oranlama yapılarak belirlenen B) VEGF-A ve C) MMP-2 proteinlerinin seviyeleri. * $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ ; beta-aktine (kontrol) göre anlamlılık değerleri.....                                                                                                                                                                                                                                | 55 |
| <b>Şekil 4.7:</b> <i>In vivo</i> CAM yöntemiyle A549 hücreleriyle tümör oluşturulan kuluçkalık yumurtalarda Combretastatin A-4 (CA-4; 5 $\mu\text{M}$ ), plumbagin (PL; 10 $\mu\text{M}$ ) ve berbamin (BRB; 10 $\mu\text{M}$ ) tedavisi. Fotoğraflar, fotoğraf makinesi bağlı stereomikroskop ile 7.80X büyütmede, kuluçkalık yumurtaların embriyonik gelişimlerinin 12. gününde çekildi.....                                                                                                                                                                                            | 56 |
| <b>Şekil 4.8:</b> <i>In vivo</i> CAM yöntemiyle A549 hücreleriyle tümör oluşturulan kuluçkalık yumurtalarda Combretastatin A-4 (CA-4; 5 $\mu\text{M}$ ), plumbagin (PL; 10 $\mu\text{M}$ ) ve berbamin (BRB; 10 $\mu\text{M}$ ) tedavisinin tümör anjiyogenezi üzerine etkileri. *** $p < 0,001$ ; kontrole göre anlamlılık değeri. ....                                                                                                                                                                                                                                                  | 57 |
| <b>Şekil 4.9:</b> <i>In vivo</i> CAM yöntemiyle A549 hücreleriyle tümör oluşturulan kuluçkalık yumurtalarda Combretastatin A-4 (CA-4; 5 $\mu\text{M}$ ), plumbagin (PL; 10 $\mu\text{M}$ ) ve berbamin (BRB; 10 $\mu\text{M}$ ) tedavisinin tümör anjiyogenezi üzerine etkilerinin Hematoksilin-Eozin boyamasıyla belirlenmesi. TH: Tümör hücreleri, siyah oklar: CAM alanına geçiş yapan tümör hücreleri, kesikli çizgili yuvarlak: Yoğun tümör hücre kitlesi, M: Matrigel, kesikli çizgi: CAM ile tümör kitlesi arasında kalan alan. Bar: 100 $\mu\text{m}$ ve 200 $\mu\text{m}$ . .... | 58 |

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa No

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 2.1:</b> Kornea anjiyogenezi yönteminin avantaj ve dezavantajları (Nowak-Sliwinska ve diğ., 2018; Ribatti, 2021).....       | 12 |
| <b>Tablo 2.2:</b> Matrigel tıkaç yönteminin avantaj ve dezavantajları (Nowak-Sliwinska ve diğ., 2018).....                           | 13 |
| <b>Tablo 2.3:</b> CAM yönteminin avantaj ve dezavantajları (Norrby, 2006; Nowak-Sliwinska ve diğ., 2018; Fischer ve diğ., 2022)..... | 18 |
| <b>Tablo 3.1:</b> Kontrol ve deney grupları. ....                                                                                    | 36 |

## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

| Simgeler | Açıklama |
|----------|----------|
|----------|----------|

|    |                    |
|----|--------------------|
| %  | : Yüzde            |
| °C | : Santigrat derece |
| µg | : Mikrogram        |
| µl | : Mikrolitre       |
| µM | : Mikromolar       |
| nM | : Nanomolar        |
| g  | : Gram             |
| l  | : Litre            |
| ml | : Mililitre        |
| mm | : Milimetre        |
| ng | : Nanogram         |

| Kısaltmalar | Açıklama |
|-------------|----------|
|-------------|----------|

|                   |                                              |
|-------------------|----------------------------------------------|
| BSA               | : Sığır serum albümini                       |
| CAM               | : Koryo-allantoyik membran                   |
| CCK               | : Hücre sayım kiti                           |
| dH <sub>2</sub> O | : Distile su                                 |
| DMEM              | : Dulbecco'nun modifiye Eagle medyumunu      |
| DMSO              | : Dimetil sülfoksit                          |
| EC                | : Endotel hücre                              |
| ECM               | : Hücre dışı matriks                         |
| EMT               | : Epitelyal – mezenkimal geçiş               |
| ER                | : Östrojen reseptörü                         |
| FGF               | : Fibroblast büyüme faktörü                  |
| FGFR              | : Fibroblast büyüme faktörü reseptörü        |
| HIF-1 $\alpha$    | : Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 alfa   |
| HIF-1 $\beta$     | : Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 beta   |
| HUVEC             | : İnsan umbilikal ven endotelyal hücre hattı |
| LSB               | : Laemmli örnek tamponu                      |
| MAPK              | : Mitojen aktif protein kinaz                |

|                 |                                                             |
|-----------------|-------------------------------------------------------------|
| <b>MMP</b>      | : Matriks metalloproteinaz                                  |
| <b>MTS</b>      | : 2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolyum                           |
| <b>MTT</b>      | : 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil tetrazolyum bromid |
| <b>NSCLC</b>    | : Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri                     |
| <b>P/S</b>      | : Penisilin/streptomisin                                    |
| <b>PBS</b>      | : Fosfat tamponlu tuz çözeltisi                             |
| <b>PDGF</b>     | : Trombosit kaynaklı büyüme faktörü                         |
| <b>PDGFR</b>    | : Trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü               |
| <b>PGF</b>      | : Plasental büyüme faktörü                                  |
| <b>PI3K</b>     | : Fosfatidilinositol-3 kinaz                                |
| <b>PMSF</b>     | : Fenilmetilsülfonil florid                                 |
| <b>p-VEGFR</b>  | : Fosforile – vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü  |
| <b>RT-qPCR</b>  | : Gerçek zamanlı – kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu   |
| <b>SDS-PAGE</b> | : Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi     |
| <b>SRB</b>      | : Sülförödamın B                                            |
| <b>TAF</b>      | : Tümör anjiyogenik gaktör                                  |
| <b>TBS</b>      | : Tris tamponlu tuz çözeltisi                               |
| <b>TCA</b>      | : Trikloroasetik aset                                       |
| <b>TPA</b>      | : 12-O-tetradekanoilforbol 13-asetat                        |
| <b>VEGF</b>     | : Vasküler endotelyal büyüme faktörü                        |
| <b>VEGFR</b>    | : Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü              |

## ÖZET

### [YÜKSEK LİSANS TEZİ]

#### [BAZI FİTOKİMYASALLARIN *İN VİTRO* VE *İN VİVO* BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ]

[Melisa MANAV]

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

[Biyoloji Anabilim Dalı]

Danışman : [Prof. Dr.] [Ebru GÜREL GÜREVİN]

[II. Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Hülya Tuba KIYAN ]

[Kanser; yılda yaklaşık 2,6 milyon vakayla, dünya çapında en önemli sağlık sorunlarının başında gelmektedir. Kanserın metastaz yoluyla yayılmasında kilit rol oynayan faktör, anjiyogenez sürecidir. Anjiyogenez, mevcut damar endotelinden tomurcuklanma yoluyla yeni kan damarları oluşturmak için endotel hücrelerinin aktivasyonu, göçü ve proliferasyonunu içeren karmaşık bir mekanizmadır. Kanser gibi patolojik koşullarda, anjiyogenez süreci kontrolden çıkmaktadır. Kemoterapi ve radyoterapi, yan etki profili ve doza bağlı direnç göstermeleri nedeniyle kanser tedavilerinde sınırlı etkinliğe sahiptir. Bu nedenler, kanser tedavisinde kullanılacak yeni terapötik ilaçlara duyulan ihtiyacı arttırmaktadır. Anjiyogenezin kanser sürecindeki rolü göz önüne alındığında, tümörlerde damarlanmayı bozarak kanserin gelişimini baskılayan anti-anjiyogenik tedaviler umut vadetmektedir. Kanser tedavisinde uygulanan anjiyogenez hedefli ilaçların önemli bir bölümünün, bitkilerden izole edilen alkaloidler, polifenoller veya terpen gruplarına ait anti-kanser etkinliği olan doğal biyoaktif bileşikler olduğu bilinmektedir. Doğal biyoaktif bileşikler olan Combretastatin A-4 (CA-4), plumbagin, berbamin, silibinin ve lentinanın anti-kanser, antioksidan, anti-inflamatuvar gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, farklı kanser türlerine karşı, etkili birer potansiyel terapötik ajan olabilecekleri düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında, CA-4, plumbagin, berbamin, silibinin ve lentinanın, A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve HUVEC insan umbilikal ven endotel hücrelerinde *in vitro* sitotoksik etkinlikleri belirlenerek, etkin biyoaktif bileşiklerin *in vitro* anjiyogenez ve anjiyogenik faktörlerin ifadesi üzerindeki etkileri, ayrıca A549 akciğer

kanseri hücreleriyle tümör oluşturulan kuluçkalık yumurtalarda *in vivo* tümör anjiyogenezi üzerindeki etkileri araştırıldı.

CA-4 (1-10  $\mu$ M), plumbagin (0,1-10  $\mu$ M), berbamin (2,5-40  $\mu$ M), silibinin (10-200  $\mu$ M) ve lentinan (20-320  $\mu$ M) biyoaktif bileşiklerinin, A549 ve HUVEC hücre hatlarında hücre canlılığı üzerindeki etkileri, 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT) canlılık testiyle değerlendirildi. Etkin bulunan CA-4, plumbagin ve berbamin maddelerinin hücre canlılığı üzerine etkileri, Sülförodamin B (SRB) canlılık testi ile doğrulandı. CA-4, plumbagin ve berbaminin, HUVEC hücrelerinde tüp oluşumu yöntemiyle *in vitro* anjiyogenezi üzerine etkileri belirlendi. Ardından bu maddelerin, MTT testi ile belirlenen IC<sub>50</sub> dozlarında, A549 hücrelerinde anjiyogenik faktörlerin ifadesi üzerine etkileri western blot yöntemi ile belirlendi. CA-4, plumbagin ve berbaminin tümör anjiyogenezi üzerine etkileri, *in vivo* CAM yöntemiyle araştırıldı. Kuluçkalık yumurtalar, embriyonik gelişimlerinin 9.gününe kadar inkübasyona bırakıldı. 9.günde, A549 hücreleri (3x10<sup>6</sup> hücre/yumurta), IC<sub>50</sub> dozlarındaki CA-4, plumbagin ve berbamin ile süspanse edilerek matrigel ile silikon bir disk içerisinde CAM alanına uygulandı. 72 saatlik tedavinin ardından, kuluçkalık yumurtalardaki vasküler yoğunluk incelendi ve tümör dokularının histokimyasal analizi yapıldı.

MTT sonuçlarıyla, CA-4, plumbagin ve berbaminin, A549 hücrelerinde hücre canlılığını inhibe ettiği belirlendi. Silibinin ve lentinanın, kanser hücrelerinde canlılığı azaltmadığı tespit edildi. Doğal biyoaktif bileşiklerin HUVEC hücrelerinde, belirli bir sitotoksik aktivite gösterdiği belirlendi. Plumbagin, yüksek dozlarda HUVEC hücrelerinin canlılığını, A549 hücrelerine kıyasla daha fazla etkilediği saptandı. CA-4, plumbagin ve berbaminin A549 ve HUVEC hücrelerindeki üzerindeki etkilerinin, SRB sonuçlarıyla paralellik gösterdiği belirlendi. CA-4 (1 ve 5  $\mu$ M), plumbagin (1 ve 3  $\mu$ M) ve berbamin (5 ve 10  $\mu$ M) biyoaktif bileşiklerinin, belirlenen tüm dozlarda, HUVEC hücrelerinde tüp benzeri yapıların oluşumunu inhibe ettiğini belirlendi. Western blot sonuçları, CA-4 (5  $\mu$ M), plumbagin (10  $\mu$ M) ve berbaminin (10  $\mu$ M), A549 hücrelerinde VEGF-A ve MMP-2 ifadesini kontrole kıyasla inhibe ettiğini gösterdi. *In vivo* CAM yöntemi sonuçlarıyla, CA-4 (5  $\mu$ M), plumbagin (10  $\mu$ M) ve berbamin (10  $\mu$ M) biyoaktif bileşikleriyle tedavi edilen tedavi edilen kuluçkalık yumurtalarda, vasküler yoğunluğun kontrole kıyasla anlamlı olarak önemli ölçüde inhibe edildiği belirlendi. Tümör dokularının histolojik analizleri, biyoaktif bileşiklerle tedavi edilen tümörlerde CAM alanına invazyonun kontrole kıyasla azaldığı gösterdi. Bütün bu sonuçlar göz önüne alındığında, Combretastatin A-4, plumbagin ve berbamin doğal biyoaktif bileşiklerinin, akciğer kanserinde anjiyogenezi inhibitörleri olarak terapötik ilaç potansiyeli gösterdikleri düşünülmektedir. ]

Temmuz 2024, [106] sayfa.

**Anahtar kelimeler:** [Combretastatin A-4, plumbagin, berbamin, silibinin, lentinan, tümör anjiyogenezi, doğal biyoaktif bileşik]

## **SUMMARY**

**[M.Sc. THESIS]**

**[INVESTIGATION OF *IN VITRO* AND *IN VIVO* BIOLOGICAL ACTIVITIES  
OF SOME PYTOCHEMICALS]**

**[Melisa MANAV]**

**İstanbul University**

**Institute of Graduate Studies in Sciences**

**[Department of Biology]**

**Supervisor : [Prof. Dr.] [Ebru GÜREL GÜREVİN]**

**[Co-Supervisor : Assist. Prof. Dr. Hülya Tuba KIYAN ]**

[Cancer is one of the world's most serious health diseases, affecting around 2.6 million people annually. Angiogenesis is a major factor in the spread of cancer via metastasis. Angiogenesis is an intricate process in which endothelial cells are activated, migrated, and proliferated to generate new blood vessels by budding from the existing vascular endothelium. In pathological circumstances like cancer, the angiogenesis process becomes uncontrolled. Chemotherapy and radiotherapy have limited efficacy in cancer therapies due to side effects and dose dependence. These factors highlight the need for new therapeutic medications to be employed in cancer treatment. Anti-angiogenic treatments, which prevent the growth of cancer by altering the vascularization of tumors, show promise in light of the role that angiogenesis plays in the development of cancer. It is well recognized that a significant portion of angiogenesis-targeted cancer treatments are naturally occurring bioactive substances with anti-tumor properties that are derived from plant groups called terpenes, polyphenols, or alkaloids. Natural bioactive substances Combretastatin A-4 (CA-4), plumbagin, berbamine, silibinin, and lentinan have been demonstrated to have a variety of biological properties, including anti-inflammatory, anti-cancer, and antioxidant properties. As a result, they are regarded as promising therapeutic agents that could be useful against many cancer types. In this thesis, the in vitro cytotoxic activities of CA-4, plumbagin, berbamine, silibinin, and lentinan were

determined on A549 non-small cell lung cancer and HUVEC human umbilical vein endothelial cells, and the effects of active bioactive compounds on *in vitro* angiogenesis and the expression of angiogenic factors, as well as the effects on *in vivo* tumor angiogenesis in hatching eggs in which tumors were created with A549 lung cancer cells, were investigated.

CA-4 (1-10  $\mu\text{M}$ ), plumbagin (0,1-10  $\mu\text{M}$ ), berbamine (2,5-40  $\mu\text{M}$ ), silibinin (10-200  $\mu\text{M}$ ), and lentinan (20-320  $\mu\text{M}$ ) The effects of bioactive compounds on cell viability in A549 and HUVEC cell lines were evaluated by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) viability assay. The effects of the active substances CA-4, plumbagin, and berbamine on cell viability were confirmed by the Sulfordamine B (SRB) viability test. The effects of CA-4, plumbagin, and berbamine on *in vitro* angiogenesis in HUVEC cells were determined by the tube formation method. Then, the effects of these substances on the expression of angiogenic factors in A549 cells, at  $\text{IC}_{50}$  doses determined by the MTT test, were determined by the western blot method. The effects of CA-4, plumbagin, and berbamine on tumor angiogenesis were investigated by the *in vivo* CAM method. Hatching eggs were incubated until the 9th day of their embryonic development. On day 9, A549 cells ( $3 \times 10^6$  cells/egg) were suspended with  $\text{IC}_{50}$  doses of CA-4, plumbagin, and berbamine and applied to the CAM area in a silicone disk with matrigel. After 72 hours of treatment, vascular density in hatching eggs was examined, and histochemical analysis of tumor tissues was performed.

The MTT results indicate that the viability of A549 cells was decreased by CA-4, plumbagin, and berbamine. According to MTT data, silibinin and lentinan had no effect on the survival of cancer cells. Additionally, MTT results proved that naturally occurring bioactive substances showed a specific cytotoxic impact in HUVEC cells. Plumbagin was found to have a greater effect at higher doses on HUVEC cell viability than A549 cells. The effects of berbamine, plumbagin, and CA-4 on A549 and HUVEC cells were shown to be consistent with the SRB findings. The production of tube-like structures in HUVEC cells was found to be suppressed by the bioactive substances CA-4 (1 and 5  $\mu\text{M}$ ), plumbagin (1 and 3  $\mu\text{M}$ ), and berbamine (5 and 10  $\mu\text{M}$ ) at all indicated dosages. According to Western blot results, in A549 cells, the expression of MMP-2 and VEGF-A was decreased by CA-4 (5  $\mu\text{M}$ ), plumbagin (10  $\mu\text{M}$ ), and berbamine (10  $\mu\text{M}$ ) in contrast to the control. The findings of the *in vivo* CAM method showed that vascular density was considerably reduced in hatching eggs treated with the bioactive substances CA-4 (5  $\mu\text{M}$ ), plumbagin (10  $\mu\text{M}$ ), and berbamine (10  $\mu\text{M}$ ) in comparison to the control. Histological examinations of the tumor tissues revealed that, tumors treated with bioactive chemicals had less invasion into the CAM region, in comparison to the control. In light of all these findings, it is believed that the naturally occurring bioactive substances Combretastatin A-4, plumbagin and berbamine have therapeutic pharmaceutical potential as lung cancer angiogenesis inhibitors. |

July 2024, [106] pages.

**Keywords:** [Combretastatin A-4, plumbagin, berbamine, silibinin, lentinan, tumor angiogenesis, natural biocompound]

## 1. GİRİŞ

[Bu çalışma, Combretastatin A-4, plumbagin, berbamin, silibinin ve lentinan doğal kaynaklı biyoaktif bileşiklerinin, A549 akciğer kanseri hücrelerindeki sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi ve etkili doğal biyoaktif bileşiklerin *in vitro* anjiyogenez ve kuluçkalık yumurtalarda akciğer kanseri hücreleriyle oluşturulan tümörlerde *in vivo* tümör anjiyogenezi üzerindeki etkilerinin araştırılması amacıyla yapılmıştır.

Çalışmanın “Genel Kısımlar” bölümünde, kanser hastalığında anjiyogenezin önemi, anjiyogenez araştırmalarında yaygın olarak kullanılan modeller, Combretastatin A-4, plumbagin, berbamin, silibinin ve lentinan doğal biyoaktif bileşiklerinin biyolojik aktiviteleri ve kanser terapisinde kullanımları hakkında genel bilgiler, literatür ile desteklenerek verilmiştir.

“Malzeme ve Yöntem” bölümünde, araştırma kapsamında laboratuvar ortamında gerçekleştirilen bütün deneyler ayrıntılı bir biçimde anlatılmış ve istatistiksel analizler açıklanmıştır.

“Bulgular” bölümünde, laboratuvar ortamında gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen bütün veriler, grafik ve tablolarla desteklenerek ayrıntılı bir biçimde anlatılmıştır.

Son olarak “Tartışma ve Sonuç” bölümünde, çalışmalardan elde edilen tüm veriler değerlendirilmiş, bu alanda bugüne kadar yapılmış çalışmalardan elde edilen bulgular ile karşılaştırılarak yorumlanmış ve sonuca ulaşılmıştır. ]

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. KANSER

Kanser; yılda yaklaşık 2,6 milyon vakayla, dünya çapında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci ölüm nedeni olan yaygın bir sağlık sorunudur (Millimouno ve diğ., 2014; Hazafa ve diğ., 2019). Dünya Sağlık Örgütü'nün açıkladığı veriler, 2022 yılı boyunca 20 milyon yeni kanser vakasının meydana geldiğini göstermektedir ve 2050 yılında, bu sayının 35 milyona erişebileceği öngörülmektedir (Bray ve diğ., 2024). Dünya çapında, kanser tipleri arasında en sık görülen ve ölüm oranlarının en yüksek olduğu akciğer kanserini; ikinci sırada meme kanseri, üçüncü sırada ise kolorektal kanser takip etmektedir (Hazafa ve diğ., 2019; Torre ve diğ., 2016).

Kanser, kısaca normal hücrelerin çeşitli uyarıların etkisiyle kontrolsüz bölünmesi ve anormal hücre fenotipi kazanan bu hücrelerin tümör kitlesini oluşturması sürecidir. Kanser oluşumu veya karsinogenezin nedenleri arasında; iyonize ve ultraviyole radyasyon, viral enfeksiyonlar, aflatoksinler ve genetik mutasyonlar yer almaktadır (Hazafa ve diğ., 2019; Karidio ve Sanlier, 2021).

Kanser hem farklı tiplerinin kompleks fenotipleri hem de birçok moleküler mekanizmayı barındıran karmaşıklığı nedeniyle, yüzyıllardır üzerine araştırmalar yapılan bir hastalıktır. Kanserinin ayırt edici özellikleri, araştırmacılar tarafından daha geniş kapsamda ve bütünsel olarak ele alınmasına imkan vermektedir (Hanahan, 2022). Kanserinin önemli ayırt edici özellikleri, şu şekilde sıralanabilir:

- ❖ Sürdürülebilir proliferatif sinyalleme: Kanser hücrelerinin en temel özelliğidir. Normal hücreler, hücre döngüsü sinyal mekanizmalarının kontrolü altında çoğalırlar ve çoğalmayı uyaran sinyaller, her zaman kontrol altındadır. Kanser hücrelerinde ise bu kontrol mekanizması ortadan kalkar; hücreler kronik olarak çoğalmaya devam eder ve bu da normal hücre fenotipinin bozulmasına yol açar (Hanahan ve Weinberg, 2000; Hanahan ve Weinberg, 2011).
- ❖ Büyümenin baskılanmasından ve apoptozdan kaçma: Normal hücreler, çoğalarak popülasyonunu arttırdığında, yoğunlaşan alanlarda hücre-hücre temasları gerçekleşir ve dokudaki iç dengenin korunması adına hücre çoğalması baskılanır. Bu durum “temas inhibisyonu” veya “kontakt inhibisyon” olarak bilinmektedir. Kanser oluşumunda,

temas inhibisyonu ve hücre çoğalmasını inhibe edecek diğer faktörler ortadan kaldırılmaktadır. Kanser hücreleri, tümör baskılayıcı genlerin mutasyonuna veya fonksiyon kaybına yol açar, proto-onkogenlerin onkogene dönüşümünü tetikler ve anormal hücre çoğalması gibi durumlarda apoptotik hücre ölüm mekanizmalarının devreye girmesini engeller (Hanahan ve Weinberg, 2000; Hanahan ve Weinberg, 2011).

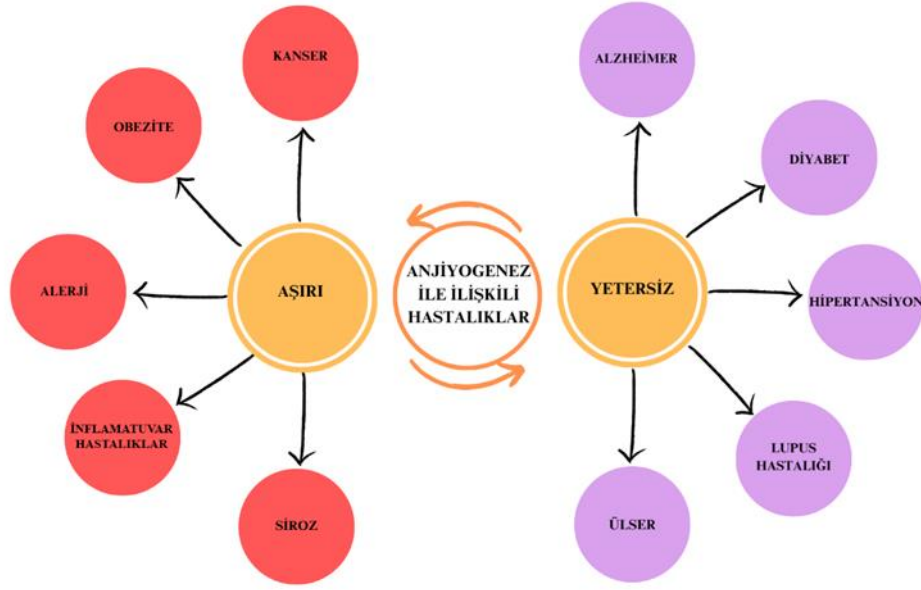
- ❖ İnvazyon ve metastazın aktivasyonu: Kanser hücreleri, büyüyüp dokulara yayılabilmek için metastaz yapmalıdır, fakat tümörün büyümesi için öncelikle daha fazla oksijen ve besin kaynağı sağlayacak yeni damar oluşumuna ihtiyacı vardır. Bu durumda kanser hücreleri, tümör mikro çevresindeki pro-anjiyogenik faktörleri uyararak, anjiyogenik dengeyi bozar ve anjiyogenezi tetikler. Bu adım, kanser gelişiminin en kritik basamağıdır; anjiyogenezin gerçekleşmesi, tümör dokusunun diğer dokulara yayılarak metastaz yapabilmesine imkan vermektedir (Bergers ve Benjamin, 2003; Dudley ve Griffioen, 2023).

## 2.2. TÜMÖR ANJİYOGENEZİ ve METASTAZ

### 2.2.1. Anjiyogenez

Kanserin metastazı ve dolayısıyla tümörün yayılmasında kilit rol oynayan faktör, anjiyogenez sürecidir. İlk kez 1787 yılında John Hunter tarafından ortaya atılan anjiyogenez kavramı; Folkman'ın 1971 yılında, tümör büyümesinin anjiyogenez sürecine bağlı olduğu hipotezini yayımlaması ve anjiyogenezi, kanser tedavisinde terapötik bir hedef olarak ele almasıyla, kanser çalışmalarının odağı haline gelmiştir (Folkman, 1971; Khalid ve diğ., 2016).

Anjiyogenez, mevcut damar endotelinden tomurcuklanma yoluyla yeni kan damarları oluşturmak için endotel hücrelerinin (EC) aktivasyonu, göçü ve proliferasyonunu içeren kompleks bir süreçtir. Bu süreç sağlıklı dokuda, fizyolojik koşullar altında, vasküler mikro çevrede bulunan anjiyogenik moleküller, humoral faktörler, büyüme faktörleri, hücre dışı matriks (ECM) proteinleri ve adezyon reseptörleri gibi uyarıcı ve baskılayıcı düzenleyiciler tarafından moleküler düzeyde dengede tutulmaktadır (Al-Ostoot ve diğ., 2021; Fakhri ve diğ., 2021). Anjiyogenezin azlığı veya çokluğu sonucunda bu dengenin bozulması, çeşitli hastalıklara neden olmaktadır (Şekil 2.1).



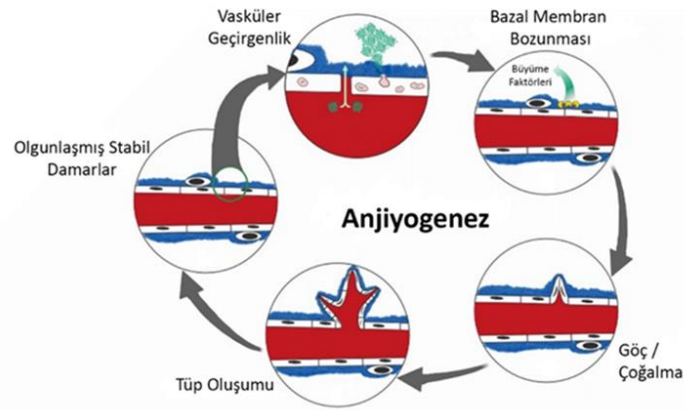
**Şekil 2.1:** Anjiyogenez dengesinin bozulmasının neden olduğu hastalıklar (Al-Ostoot ve diğ., 2021).

### 2.2.2. Anjiyogenez Mekanizması

Fetal dönemdeki embriyoda, endotel progenitör hücrelerden (anjyoblast) yeni kan damarlarının oluşumu anlamına gelen vaskülogenez süreciyle birlikte vasküler ağ gelişmektedir. Yetişkinlerde neovaskülarizasyon ya da diğer adıyla anjiyogenez, nadiren (yara iyileşmesinde ve kadın üreme siklusunda) gerçekleşir; bunun dışında sağlıklı dokulardaki vasküler hareketsizlik, pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik moleküller tarafından dengede tutulmaktadır. Bu dengenin bozulması, pro-anjiyogenik faktörlerin artan salınımı ile gerçekleşir. Hipoksi, iskemi, inflamasyon ve karsinogenez gibi patolojik koşullar; vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi önemli pro-anjiyogenik faktörlerin yukarı regülasyonu için bir uyarıcı görevi görür ve anjiyogenezin kontrolden çıkmasıyla sonuçlanır (Bergers ve Benjamin, 2003; Ribatti, 2008; Khalid ve diğ., 2016; Viallard ve Larrivé, 2017).

Anjiyogenez kısaca başlangıç, göç, tüp oluşumu ve olgunlaşma evrelerinden oluşan 4 adımlı bir süreçtir (Fan ve diğ., 2006; Khalid ve diğ., 2016; Al-Ostoot ve diğ., 2021; Zhang ve diğ., 2024) (Şekil 2.2):

1. **Başlangıç:** İskemik ya da hasarlı dokudan çeşitli uyaranlara yanıt olarak anjiyogenik faktörler sentezlenir ve salınır. Bunlar FGF ve VEGF gibi pro-anjiyogenik faktörler olup, EC'lerin üzerindeki reseptörlere bağlanır. Bu durum EC'lerin aktivasyonuna yol açar. EC'ler, bazal membranın ve çevre dokunun (ECM) parçalanması (degradasyonu) için harekete geçer ve proteolitik enzimler olan matriks metalloproteinazların (MMP) salınmasını uyarır.
2. **Göç:** Bozulmaya uğrayan ECM'den salınan FGF ve VEGF gibi anjiyogenik faktörler, EC'leri uyarır ve bozulan ECM'ye doğru göçünü başlatır. Bu göç aynı zamanda; adezyon molekülleri olan integrinlerin, ECM'ye bağlanmasıyla da uyarılarak düzenlenmektedir.
3. **Tüp Oluşumu:** Endotel hücreleri VEGF tarafından uyarıldıktan sonra, iki yeni fenotipe bürünür; uç hücreleri uyarıcıya doğru göç eder, sap hücreleri de bu hücreleri takip ederek tek sıra halinde çoğalır ve içi boş, tüp benzeri yapılar oluşturulur. Bu oluşum, anjiyopietin moleküllerinin doğal ligandı olan tirozin kinaz reseptörü Tie-2 ile etkileşimi tarafından düzenlenir.
4. **Olgunlaşma:** Perisitlerin ve vasküler düz kas hücrelerinin devreye girmesiyle, oluşan yeni kan damarlarının morfolojik bütünlüğü sağlanır ve damarlar olgunlaştıktan sonra stabil hale gelerek hareketsizleşir.



**Şekil 2.2:** Anjiyogenez süreci (Bryan ve D'Amore, 2007).

### 2.2.3. Tümör Anjiyogenezi ve Metastaz

Dokuların büyümesi ve yüzey alanını genişletebilmesi için oksijen ve besine ihtiyacı vardır. Fakat bir dokunun hacmini  $1 \text{ mm}^3$ 'ten daha fazla arttırabilmesi, ancak daha fazla oksijen ve besin kaynağı sağlayacak yeni damar oluşumu ile gerçekleşebilir (Dudley ve Griffioen, 2023). Bu koşullar tümör dokusu için de geçerlidir. Erken evredeki katı tümörlerin büyümesi, basitçe avasküler ve vasküler olmak üzere iki fazda gerçekleşir (Chaplain, 1996; Bielenberg ve Zetter, 2015; Balberova ve diğ., 2021):

**Avasküler Faz:** Tümör kitlesi, oksijen ve besin gereksinimini komşu kılcal damarlardan difüzyon yoluyla karşılar. Bu evrede tümör hücreleri çoğalsa da mitotik aktivite, hücrel mekanizmaların kontrol ettiği apoptoz (hücre ölümü) ile dengelenir, dolayısıyla tümör kitlesi stabil tutulabilmektedir. Bu fazdaki tümörün çapı  $1 \text{ mm}^3$ 'ten azdır.

**Vasküler Faz:** Kanser hücreleri kontrolsüz çoğalma özellikleri sayesinde sayılarını arttırdıkça, tümör kitlesi büyümeye başlar. Tümör çapının artması, hücrelerin daha fazla oksijen ve besine ve dolayısıyla yeni kan damarlarının oluşumuna ihtiyaç duymasına neden olur. Böylece tümör hücreleri, mikro çevresine tümör anjiyogenik faktörlerini (TAF) salarak, neovaskülarizasyonu uyarır.

Birincil tümörler, büyüyüp dokulara yayılabilmek için metastaz yaparlar. Metastaz, malign (kötü huylu) fenotipli kanser hücrelerinin, bulundukları birincil bölgelerinden daha uzak bir dokuya yayılım göstermesidir. Kanser metastatik büyümesi, 5 adımdan oluşan kompleks bir süreçtir (Su ve diğ., 2015; Auyeung ve Ko, 2017; Fares ve diğ., 2020):

1. **İnvazyon:** Tümör hücreleri, bulunduğu ECM ile ve mikro çevresindeki diğer hücrelerle etkileşime girer. Bu durumda, hareketsiz ve ECM'ye bağlı epitel hücrelerinin transdiferasyon süreci olarak adlandırılan, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) gerçekleşir. EMT, kanser metastaz süreci için kritik olan malign hücrelerin hareketli ve invaziv özellik kazanmasına neden olur.
2. **İntravazasyon** (vücuttaki bir damara yabancı madde girişi): Tümör hücreleri, primer bölgelerinden uzaklaşarak, damar sisteminin lümeni aracılığıyla sistemik dolaşıma katılır.

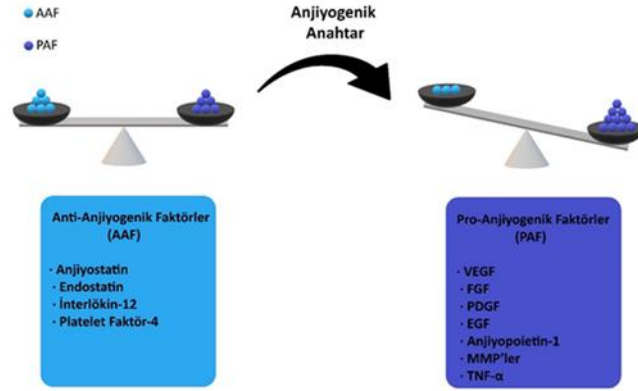
3. **Yayılma:** Dolaşımdaki tümör hücreleri, kan damarlarının duvarlarına yapışma özelliği göstermektedir. Damar duvarına tutunurlar ve ekstrasvazasyondan önce büyümeye başlarlar.
4. **Ekstrasvazasyon** (damardan doku aralıklarına sızma): Tümör hücreleri kan damarlarının duvarını geçerek, hedeflediği organa nüfuz ederler.
5. **Kolonizasyon:** Tümör hücreleri yayıldığı dokuda büyüyerek metastatik lezyonlar (mikro ve makro metastazlar) oluşturur. Kanseri bu evrede, metastatik uyku hali (dormansi) denilen bir evreye geçerek tümör büyümesini, yeni bir anjiyogenezi indükleyene kadar durdurabilmektedir.

Metastaz, kanserin ilerleyişinin son basamağıdır. Tümör hücrelerinin büyümesi, çevre dokuları istila etmesi ve en sonunda da metastazi için anjiyogeneze gereklidir. Bu olguya dair ilk çalışma, 1963 yılında Folkman ve diğerleri tarafından yapılmıştır. Çalışmada, izole edilen köpek tiroid bezi, plazma ile perfüze edilmiş ve ardından, fare melanom hücre süspansiyonu enjekte edilmiştir. Perfüze dokuda bu kanser hücreleri nodüller halinde gözlenirse de nodüllerin çapının yalnızca 1-2 mm'ye ulaşabildiği ve invazyon göstermediği görülmüştür. Bu nodüllerden birinin tiroid bezi lobuna implantasyonu yapıldığında ise kısa süre içerisinde melanomun implant edildiği lobun distal ucunda yeni bir nodülün oluştuğu ve iki gün içerisinde 2 mm'lik bir büyüme gösterdiği; bu hızda bir büyümenin ancak implant edilen melanomun yeni damar oluşumunun yardımı ile dolaşıma katılabilmesiyle mümkün olduğu tespit edilmiştir (Folkman ve diğ., 1963).

Karsinojen ile uyarılmış fare ve sıçanların meme bezi dokusundan alınan parçaların tavşan irisine implant edilerek incelenen çalışmalarda; neoplastik dokunun anjiyogenezi daha fazla indüklediği tespit edilmiştir. Neoplastik epitelin, hiperplastik epitele kıyasla çok daha yüksek seviyelerde anjiyogenik aktivite gösterdiği ve dolayısıyla anjiyogenik aktivite ile dokunun neoplastik dönüşümü arasında paralellik olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu yüksek anjiyogenik kapasitenin, hiperplastik epitelin, neoplastik fenotipe dönüşümünün morfolojik belirteçlerinden çok daha önce ortaya çıktığı bildirilmiştir. Bu veriler doğrultusunda, tümörün malign özellik kazanması sürecinde anjiyogenezin önemli bir belirteç olduğu ve neoplazi öncesi dokuların tespit edilmesinde oldukça yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır (Gimbrone ve Gullino, 1976; Maiorana ve Gullino, 1978). Bu bulgular, avasküler fazdaki katı tümörün vasküler faza

geçerek anjiyogenik kapasite kazanmasının, metastaza kadar giden ilerlemenin başlangıcı olarak kabul edildiğini göstermektedir.

Tümörün avasküler fazdan vasküler faza geçişi, anjiyogenik anahtarın aktivasyonu ile gerçekleşir (Ribatti, 2008; Ribatti ve Pezzella, 2021). Anjiyogenik anahtarın ya da diğer adıyla anjiyogenik şalterin aktivasyonu, pro-anjiyogenik faktörlerin, genel olarak VEGF'in, ekspresyonunu tetikleyici birden fazla unsur ile gerçekleşebilir. Bunlar, başta hipoksi olmak üzere proto-onkogenlerin onkogenlere dönüşümü gibi genetik değişiklikler, tümör ile ilişkili inflamasyon ve tümör mikro çevresinde toplanan inflamatuvar hücrelerin, anjiyogenik moleküllerin salınmasını tetiklemesiyle gerçekleşebilmektedir (Auyeung ve Ko, 2017; Ribatti ve Pezzella, 2021). VEGF'nin bu şekilde uyarılması, anjiyogenik dengeyi pro-anjiyogenik sinyallemeyle arttıracak şekilde bozar ve anjiyogenik anahtarın aktivasyonu gerçekleşir. Sonrasında sınırlı büyümedeki katı tümörler uyku halinden çıkar, malign bir fenotipe geçerek invazyon sürecini başlatır (Lugano ve diğ., 2020; Al-Ostoot ve diğ., 2021) (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3:** Anjiyogenik anahtarın aktivasyonu ve anjiyogenik faktörler (Yue ve diğ., 2007).

Tümör kitlesi büyüdükçe, içte kalan tümör hücreleri komşu hücrelerden, yani difüzyon kaynağından uzaklaşır ve dolayısıyla besin ve oksijenden yoksun hale gelir. Bu durum, tümör hücrelerinin hipoksik duruma geçişine neden olur (Bielenberg ve Zetter, 2015). Hipoksik ortamdaki tümörler yüksek miktarda Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör-1 alfa (HIF-1α) üretmeye başlar. HIF-1α, hipoksi ile tetiklenen anjiyogeneizde kilit rol oynamaktadır. HIF-1α, normal koşullar altında sentezlenip bozunurken; hipoksik koşullarda sitoplazmada birikerek beta konfigürasyonu (HIF-1β) ile dimer oluşturur. HIF-1α ve HIF-1β dimerleri, VEGF'in

ekspresyonunu düzenleyebilir -ki bu durum, pro-anjiyogenik VEGF'in yukarı regülasyonuna ve dolayısıyla anjiyogenezin başlatılmasına neden olur (Aguilar-Cazares ve diğ., 2019). Tümör anjiyogenezi, süreç olarak normal anjiyogenez ile aynı adımlarda ilerler, fakat tümör anjiyogenezindeki mekanizmada, negatif geri besleme (feedback) olmaksızın hiperaktivite (pro-anjiyogenik faktörlerin aşırı ve kontrolsüz üretimi gibi) söz konusudur (Dudley ve Griffioen, 2023). Bu nedenle tümör kan damarları, normal kan damarlarından farklı morfolojik ve işlevsel niteliklere sahip olmaktadır (Nagy ve diğ., 2009; Hida ve diğ., 2010; Viallard ve Larrivé, 2017; Al-Ostoot ve diğ., 2021):

- ❖ Tümör kan damarları, düşük ve yoğun damar yoğunluğu olan bölgeler içeren vasküler heterojenite ile karakterizedir. Tümör kitlesinin büyüdüğü bölgelerde vasküler yoğunluk azalır, bu durum iskemik bölgelerin oluşmasıyla sonuçlanır.
- ❖ Kan damarları olgunlaşmamıştır, kararlı hale geçmez ve dolayısıyla normal kan damarlarında olduğu gibi vasküler geçirgenlik dengede değildir. Tümör kan damarlarında aşırı geçirgenlik söz konusudur, mikro damarlar ve interstisyel sıvı basınçları neredeyse aynıdır. Bu da perfüzyon eksikliğine ve hipoksiye neden olur.
- ❖ Normal damar sisteminde görülen arter-arteriyol-kılcal damar-venül-damar hiyerarşisi, tümör kan damarlarında görülmez. Tümör damar sistemi oldukça geniş, kıvrımlı ve düzensiz bir ağ gibidir, damarlar aşırı dallanma gösterir ve düzensiz düz kas hücre tabakalarını içerir. Ayrıca damarların çapı, normal kan damarlarına kıyasla daha dardır.
- ❖ Tümör kan damarları perisitler bakımından fakirdir. Perisitler düzensiz sıralanmıştır ve EC'ler ile gevşek bağlantılara sahiptir, dolayısıyla normal kan damarlarında olduğu gibi morfolojik bütünlük sağlanamaz.
- ❖ Tümör kan damarlarında kan akışı, normal kan damarlarında olduğu gibi tek yönlü değildir; karmaşıktır ve birden fazla farklı yol izleyebilir.
- ❖ Bazal membran anormal bir morfoloji gösterir, çok katmanlı ve farklı kalınlıklardan oluşmaktadır.

- ❖ Son olarak belki de en önemli fark, fizyolojik koşullarda gerçekleşen anjiyogenezin, yeni kan damarının olgunlaşması ile sona ermesidir; tümör anjiyogenezi ise tümör dokusu var oldukça sürekli olarak devam edebilir (Bielenberg ve Zetter, 2015).

#### **2.2.3.1. Tümör Anjiyogenezinde Bazı Anjiyogenik Faktörlerin Rolü**

VEGF, anjiyogenik faktörler arasında tümör anjiyogenezindeki en etkili ve önemli oyuncudur. Tümör Anjiyogenik Faktör (TAF) veya Vasküler Geçirgenlik Faktörü olarak da bilinir (Khalid ve diğ., 2016). Bu önemli TAF elemanı; nötrofiller, trombositler, makrofajlar, perisitler ve endotelial hücrelerden salınabilmektedir (Aguilar-Cazares ve diğ., 2019). VEGF ailesinin en bilinen üyeleri, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve Plasental Büyüme Faktörü (PGF)'dür. Bu üyelerden VEGF-A, anjiyogenezin en büyük tetikleyicisi ve en güçlü izoformu olarak kabul edilmektedir (Aguilar-Cazares ve diğ., 2019; Al-Ostoot ve diğ., 2021). VEGF-A faktörü, VEGF reseptörlerinden VEGFR-2'ye bağlanarak onu aktive etmesiyle tümör anjiyogenezi tetikler. VEGFR-2, endotelial hücrelerde üretilen bir tirozin kinaz reseptörüdür ve en yüksek etkileşimi VEGF-A ile göstermektedir (Claesson-Welsh ve Welsh, 2013; Al-Ostoot ve diğ., 2021). VEGF-A/VEGFR-2 kompleksi, EC'lerin çoğalmasını ve göçünü, Fosfatidilinositol-3 Kinaz/AKT (PI3K/AKT) sinyal yolağı aracılığıyla uyarır. Bazal membran ve ECM'nin bozunmasını ise MMP'lerin ekspresyonunu uyararak başlatmaktadır (Claesson-Welsh ve Welsh, 2013; Zhang ve diğ., 2024).

Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF) de tümör anjiyogenezinde önemli bir role sahiptir. Tümör ile ilişkili fibroblastları uyararak, VEGF ekspresyonunu ve dolayısıyla tümör anjiyogenezi aktive eder (Moshe ve diğ., 2023). PDGF ailesinden PDGF-AB, endotel hücrelerinin tüp benzeri yapılar oluşturarak, yeni kan damarını inşa etmesi sırasında perisitlerin bölgeye toplanmasını uyararak, tümör kan damarlarının olgunlaşmasına ve kararlı hale gelmesine aracılık eder. PDGF aynı zamanda, bir tirozin kinaz olan reseptörü PDGFR'ye bağlanarak RAS/Mitojen Aktif Protein Kinaz (MAPK) ve PI3K sinyal yollarını da uyarmaktadır. Bu ailenin başka bir üyesi olan PDGF-BB, anjiyogenezi sırasında VEGFR-2 sinyallemesini kontrol ederek, yüksek seviyelerde VEGF ekspresyonunun neden olduğu vasküler anormallikleri önlemeye yardımcı olur (Zhang ve diğ., 2024).

Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF), bir diğer önemli TAF elemanıdır. FGF, normal koşullar altında yara iyileşmesinde ve fizyolojik anjiyogenezinde rol oynayan bir pro-anjiyogenik

moleküldür. Tümör anjiyogenezinde, tıpkı VEGF gibi FGF’de uyarılır ve ekspresyonu artar. Aynı zamanda FGF aktivasyonu, VEGF ekspresyonunu indükleyebilmektedir (Al-Ostoot ve diğ., 2021; Moshe ve diğ., 2023). Tümör anjiyogenezinde FGF’ler, tirozin kinaz olan reseptörlerine (FGFR) bağlanarak PI3K/AKT, RAS/MAPK ve JAK/STAT sinyal yollarının aşağı düzenlenmesini uyarır (Moshe ve diğ., 2023).

Matriks metalloproteinazlar (MMP), tümörün anjiyogenezinde önemli olan bir başka faktördür. MMP’ler, EC’ler tarafından uyarılarak bazal membranın ve ECM bileşenlerinin bozunmasına katılarak patolojik anjiyogeneze; Plasental Büyüme Faktörü (PGF) tarafından uyarılarak ve yine ECM parçalanmasına katılarak da (spesifik olarak MMP-9) metastatik evrenin başlangıcındaki tümör hücrelerinin invazyonunda rol oynarlar. MMP ailesi, VEGF ve FGF gibi çeşitli TAF elemanları tarafından aktive edilebilmektedir. MMP-2, MMP-9 ve MMP-14, tümör anjiyogenezinde görev alan asıl oyunculardır (Quintero-Fabián ve diğ., 2019; Al-Ostoot ve diğ., 2021; Moshe ve diğ., 2023).

### 2.3. *IN VIVO* ANJİYOGENEZ MODELLERİ

Anjiyogenik faktörlerin kanser terapisinde kullanılmaya başlanmasıyla birlikte, anjiyogeneze modellerine olan ilgi artmıştır. *In vitro* modeller hızlı sonuç alınan ve niceliksel veriler elde edilen yöntemler olsa da özellikle anjiyogeneze alanında bir basamak olarak görülür ve mutlaka *in vivo* modeller ile doğrulanması gerekmektedir. Bu nedenlerden dolayı, *in vivo* anjiyogeneze modelleri, potansiyel terapötik ilaç çalışmalarında daha çok tercih edilmektedir (Adair ve Montani, 2010).

#### 2.3.1. Kornea Anjiyogeneze Modeli

Kornea, vücuttaki avasküler ve şeffaf olan tek dokudur. Bu nitelikleri korneayı farelerde, sıçanlarda ve tavşanlarda anjiyogenezin incelenmesi için benzersiz bir doku yapmaktadır (Adair ve Montani, 2010). Folkman ve Gimbrone, tavşan korneasının bahsedilen özelliklerinden yararlanarak anjiyogenezi incelemek için bu modeli ilk kez kullanmış ve yöntemin gelişimine öncülük etmiştir (Nowak-Sliwinska ve diğ., 2018; Ribatti, 2021). Yaptıkları çalışmada, tavşan korneasına, limbustan (kornea ve skleranın birleştiği bölge) farklı mesafelerde olacak şekilde Brown-Pearce epitelyoması ve V2 karsinomu tümörlerini implant ettiklerinde, 10 gün içerisinde limbustan 2-3 mm mesafede yeni kan damarlarının varlığını tespit etmişlerdir (Gimbrone ve diğ., 1974).

Kornea anjiyogenez modelinde, yavaş salınımlı polimer peletler kullanılmaktadır. Tümör parçalarını veya anjiyogenik faktörleri içeren peletler, anestezi altındaki hayvanların korneasında cerrahi olarak oluşturulan, küçük içi boş ceplere implant edilir. Bu küçük stromal cebin limbusa olan uzaklığı, deneyde kullanılan hayvana göre değişiklik göstermektedir. Limbal pleksustan yeni kan damarlarının filizlenmesi, tavşanlarda 3-5 gün içerisinde gerçekleşir ve anjiyogenik aktivite analizi, vasküler yoğunluk üzerinden yapılır. Fare ve sıçanlarda ise anjiyogenik yanıt, damar uzunluğu parametresi üzerinden tespit edilmektedir (Adair ve Montani, 2010; Nowak-Sliwinska ve diğ., 2018; Ribatti, 2021).

Kornea anjiyogenez modelinin avantaj ve dezavantajları, Tablo 2.1'deki gibi sıralanabilir.

**Tablo 2.1:** Kornea anjiyogenezi yönteminin avantaj ve dezavantajları (Nowak-Sliwinska ve diğ., 2018; Ribatti, 2021).

| AVANTAJLAR                                                                                                                                                                                                                                              | DEZAVANTAJLAR                                                                                                                                                                                                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tavşan modelinde, hayvanın boyu ve ağırlığı müdahaleyi ve cerrahi uygulamayı kolaylaştırır.                                                                                                                                                             | Fare ve sıçan kullanılan modellerde anjiyogenik yanıt değişken olduğundan deney grubu optimizasyonu için çok fazla hayvana ihtiyaç duyulabilir. Bu durum deney maliyetini yükseltmektedir.                   |
| Modelde kullanılan pelet, anjiyogenik faktörlerden birkaçının birlikte uygulanmasına imkan vermektedir. Bu da çeşitli anjiyogenik faktörlerin kombinasyonlarının sinerjistik etkisini ve vasküler yanıtını inceleme olanağı sunar.                      | İmplant edilecek tümörün kökeni, vasküler yanıtı değiştirebilmektedir. Modelin uygulandığı hayvandan farklı kökendeki tümörün indüklediği immün yanıt, inflamasyon kaynaklı bir anjiyogeneze sebep olabilir. |
| Modelde, göz gibi küçük ve manipülasyonu kolay bir organ kullanılması önemli bir avantajdır. Ayrıca korneanın saydam bir doku olması, vaskülarizasyonun kolayca gözlemlenmesine ve herhangi bir inflamatuvar reaksiyonun tespit edilmesine imkan verir. | Yöntem, yetkinlik gerektiren ve uygulaması zor bir prosedür içerir.                                                                                                                                          |

|  |                                                                                                                          |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | Yöntemde kullanılan peletlerin, anjiyogenik faktörlerin homojen bir şekilde dağılabileceği şekilde hazırlanması gerekir. |
|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

### 2.3.2. Matrigel Tıkaç Yöntemi

Matrigel tıkaç (plug) yöntemi hem hayvanlarda anjiyogenezin incelenmesi hem de potansiyel pro- ve anti-anjiyogenik moleküllerin test edilmesi için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Matrigel, Engelbreth-Holm-Swarm fare tümöründen türetilen, bazal membran proteinlerini içeren bir karışımdır (Nowak-Sliwinska ve diğ., 2018; Rahman ve diğ., 2020). Esas bileşenleri, 4 bazal membran proteininden oluşmaktadır. Bunlar laminin (~60%), kollagen-IV (~30%), entaktin (~8%) ve perlekan gibi heparin sülfat proteoglikanlardır (~2-3%) (Aisenbrey ve Murphy, 2020). Matrigel, yapısı itibarıyla 37°C’de jelsi bir formdayken, 4°C’de katı haldedir.

Bu yöntem ilk kez, Passaniti ve diğerleri (1992) tarafından tanımlanmıştır. Yöntemde, anjiyogenik ajanlar, matrigel içerisinde süspanse edilerek, C57/BL farelere subkutan olarak (deri altına) enjekte edilir. Matrigel, hayvanın vücut sıcaklığıyla buluştuğunda katı form alacağı için uygulama esnasında soğuk olmalıdır. Enjeksiyondan yalnızca 30 dakika sonra, matrigel katılaşarak bir tıkaç oluşturur ve bu tıkaç, içerisindeki maddenin yavaş salınımına imkan verir. Endotel hücreleri, tıkaçın içerisine göç eder ve damar benzeri yapılar oluşturur. Deney sonlandırıldıktan ve tıkaçı içeren deri parçası çıkarıldıktan sonra, tıkaç içerisindeki vasküler yoğunluk analiz edilir. Çalışmada, matrigel karışımının, FGF ile desteklendiğinde daha yoğun bir vasküler yanıtın oluştuğunu tespit etmişlerdir (Passaniti ve diğ., 1992; Nowak-Sliwinska ve diğ., 2018; Kastana ve diğ., 2019; Stryker ve diğ., 2019; Rahman ve diğ., 2020).

Matrigel tıkaç modelinin avantaj ve dezavantajları, Tablo 2.2’deki gibi sıralanabilir.

**Tablo 2.2:** Matrigel tıkaç yönteminin avantaj ve dezavantajları (Nowak-Sliwinska ve diğ., 2018).

| AVANTAJLAR                                            | DEZAVANTAJLAR                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Yöntem kolay uygulanabilir bir prosedür içermektedir. | Matrigel pahalı bir karışımdır. Yöntemde aynı zamanda fareler de kullanıldığından, deneyin maliyeti yüksektir. |

|                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Yöntem, birden fazla maddenin veya konsantrasyonların analiz edilmesine imkan tanır, bu nedenle potansiyel ilaçların test edilmesi için en uygun yöntemlerden biridir.          | Matrigel, 37°C'de katılaşır. Bu nedenle anjiyogenik faktör ile karıştırılması sırasında çok dikkat edilmesi gerekmektedir. Eğer katılaşmaya başlamışsa, anjiyogenik faktör matrigel içerisinde homojen bir şekilde dağılamaz. |
| Matrigel, içeriği itibarıyla canlı sistemlerin ECM'sini taklit ettiğinden, bu yöntem anjiyogenez tahlili için kullanılabilecek en gerçekçi <i>in vivo</i> yöntemlerden biridir. | Yöntemde kullanılan farelerin türü, yaşı ve cinsiyeti gibi parametrelerin optimize edilmesi gerekmektedir. Matrigelin türetildiği C57BL/6 farelerin kullanılması daha uygundur.                                               |
|                                                                                                                                                                                 | Matrigel, karıştırıldığı maddeye yavaş salınım fırsatı verir, dolayısıyla kullanılan her anjiyogenik faktör için tıkaç oluştuktan sonraki sürenin optimize edilmesi gerekmektedir.                                            |

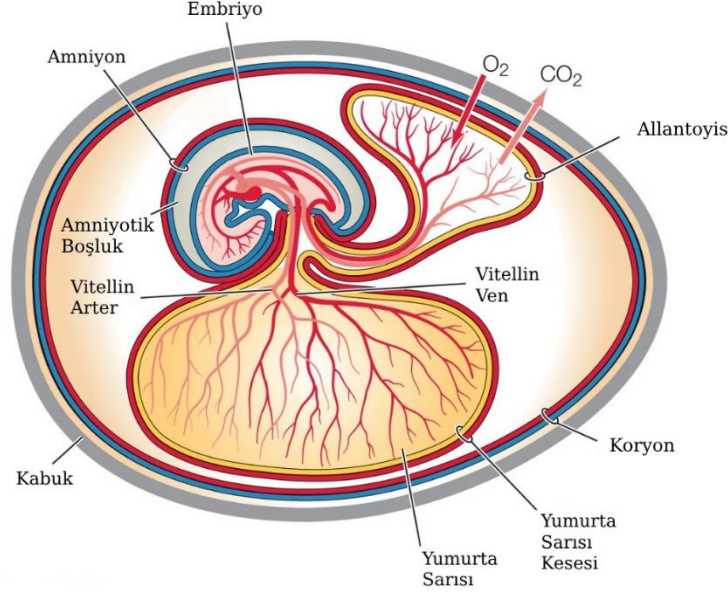
### 2.3.3. Koryo-Allantoyik Membran (CAM) Yöntemi

CAM yöntemi, vasküler biyoloji ve kanser çalışmaları, biyomühendislik, kozmetik testleri, transplantasyon biyolojisi ve ilaç geliştirmede yaygın olarak kullanılan *in vivo* bir yöntemdir (Nowak-Sliwinska ve diğ., 2018). Bu yöntem ilk kez, Rous ve Murphy tarafından, memeli tümör graflarının başka bir dokuda büyümesini incelemek amacıyla kullanılmıştır. Rous ve Murphy, Rous 45 tavuk sarkomasının graftını CAM üzerine implant ederek, 147 tavuk yumurtasının 108'inde, implant edilen tümör graftının bir veya daha fazla tümör oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Aynı zamanda, farklı günlerde implantasyon yaparak, tümör büyümesi için en uygun koşulların, kuluçkanın embriyonik gelişiminin 7. veya 8. gününde elde edildiğini gözlemlemişlerdir (Murphy ve Rous, 1912).

CAM yöntemi kullanılarak *in vivo* tümör ile ilişkili anjiyogenezin ilk kanıtı, yine Murphy tarafından yapılan bir çalışmada elde edilmiştir. Murphy, civcivin embriyonik gelişiminin 5.-7.günlerinde, CAM kısmına Jensen sıçan sarkomasının inokülasyonunu gerçekleştirmiştir. CAM'i, yumurtanın kabuk zarının hemen altında bulunduğu için kolay uygulama adına daha avantajlı bir bölge olarak nitelendirmiştir. Murphy, embriyonik gelişimin 10.-12.günlerinde tümörlerin 2,1 cm çapına ulaştıklarını tespit etmiştir. Ayrıca, embriyonun tümörlerinde damarlanmanın çok daha yoğun olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmadaki en önemli gözlemlerden

biri, histolojik analizlerde, civciv embriyosunun yabancı tümör dokusuna karşı immün yanıt geliştirdiğine dair hiçbir bulgu olmamasıdır (Murphy, 1913).

Koryo-allantoyik membran (CAM), civcivin embriyonik gelişiminin 4-5. günlerinde, koryon ve allantoyis zarlarının mezodermal katmanlarının füzyonu ile oluşmaktadır. CAM, tüm kuş türlerinin döllenmiş yumurtalarında bulunur, kabuğun hemen altında konumlanır ve embriyonun gaz alışverişinden sorumludur, dolayısıyla vaskülerite bakımından zengin bir membrandır. Embriyonik gelişimin 12. ve 13. günlerinde, CAM tüm kabuk zarını kaplar ve genişlemesi tamamlanmış olur (Norrby, 2006; Stryker ve diğ., 2019; Asai ve diğ., 2021). CAM; fibronektin, laminin, tip-I kollagen, MMP-2 ve integrin gibi ECM proteinleri bakımından zengin bir membrandır, dolayısıyla tümör hücrelerinin invaziv karakterini incelemek için gerekli olan fizyolojik nişi oluşturmaktadır (Fischer ve diğ., 2022). Ayrıca membranın kolay erişilebilir, şeffaf bir yüzey oluşu ve en önemlisi de civcivin yabancı dokuya immün yanıt geliştirmemesi, bu yöntemi *in vivo* anjiyogenezin incelenmesi için ideal bir yöntem haline getirmektedir (Norrby, 2006; Asai ve diğ., 2021). Gelişmekte olan embriyonun bağışıklık sistemi üç adımda oluşmaktadır: İlk aşama, embriyonik gelişimin 10-12. gününden sonra başlayan, bağışıklık sisteminin devreye girmesidir; bunu bağışıklık reaksiyonlarının oluşmaya başladığı, embriyonik gelişimin 15. gününe kadar devam eden ikinci aşama takip eder. 16. günden itibaren embriyo, yabancı dokuya (patojenlere) karşı immün yanıt gösterecek yeterliliği kazanmaya başlar (Fischer ve diğ., 2022). Bu koşullar, CAM yöntemini vasküler analizler için daha optimize bir yöntem yapmaktadır (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4:** Embriyonik gelişiminin 7. günündeki kuluçkalık embriyo (Gánti, 2003).

Klasik CAM yöntemi, döllenmiş civciv yumurtalarının, 37°C'de 72 saat boyunca inkübasyonu ile başlar. İnkübasyon sonunda yumurtalardan, kabuğun zarının yapışmasını olabildiğince minimum seviyeye indirmek amacıyla albümin çekilir. CAM alanına erişimi kolaylaştıran bir pencere açılarak, test edilecek madde/graft/implant CAM üzerine uygulanır. Pencerenin kesilerek açılması sırasında dökülmesi muhtemel olan kabuk tozu ve CAM üzerine madde uygulanırken bölgede oluşturulabilecek fiziksel tahrişler, bir bağışıklık yanıtına neden olarak anjiyogenezi tetikleyebilmektedir. Ayrıca, açılan pencerenin uygulamadan sonra sıkı bir şekilde kapatılması gerekmektedir, çünkü membran, oksijen gerilimindeki değişikliklere karşı hassastır (Nowak-Sliwinska ve diğ., 2018; Staton ve diğ., 2009). Bu sebeplerden, test maddesi uygulanmadan önce birkaç gün beklemek ve embriyonun herhangi bir inflamatuvar reaksiyon göstermediğinden emin olmak önemlidir (Stryker ve diğ., 2019). Test edilecek madde, yavaş salınımına imkan veren polimer peletler, jelatin süngerler, plastik diskler veya ksenograft halinde CAM alanına uygulanır ve yalnızca birkaç gün içerisinde (çoğunlukla 3 gün), madde uygulanan alan yumurtadan çıkarılarak, anjiyogenezi analizi yapılır (Norrby, 2006; Stryker ve diğ., 2019).

CAM yöntemi bazı çalışmalarda, embriyonun tamamının bir petri kabına aktarılmasıyla da yapılmıştır. Bu, teoride *in vitro* bir yöntem gibi görünse de aslında *ex ovo* bir hayvan deneyidir. Embriyonun ve ekstra-embriyonik membranlarının petri kabına aktarılması, vaskülarizasyonun daha geniş bir alanda ve kolayca gözlemlenebilir halde gerçekleşmesine fırsat vermektedir.

Ayrıca maddenin uygulanması, yumurta içine kıyasla çok daha kolaydır (Norrby, 2006; Staton ve diğ., 2009; Stryker ve diğ., 2019). Auerbach ve diğ. (1974), embriyonik gelişiminin 3-4. günlerinde, civciv yumurtası embriyolarını bir petri kabına aktararak, tümör anjiyogenezini incelemek amacıyla bir çalışma yapmıştır. Petri kabına aktarılmasından sonraki ilk üç günde, embriyoların %50'si, yumurta sarısı zarında meydana gelen sızıntılar, yumurta sarısı ve albüminin ortak yüzeyindeki kontaminasyon ve diğer gözlemlenemeyen sebeplerden dolayı kaybedilmiştir. Bu durum, henüz uygulama yapılamadan deney grubu sayısının oldukça azalmasına neden olmaktadır (Auerbach ve diğ., 1974). Sonuç olarak *ex ovo* yöntem, yumurta içinde yapılan *in vivo* CAM yöntemine kıyasla daha çok bakım gerektirir (embriyoların kuruması) ve daha fazla ölüm oranına sahiptir (Ribatti, 2021).

CAM yöntemi, başta embriyologlar tarafından embriyonik doku graflarının gelişiminin incelenmesi için kullanılmıştır (Norrby, 2006). Daha sonra bu yöntem, tümör doku graflarının veya hücrelerinin uygulanmasıyla, tümör anjiyogenezinin analizi ve çeşitli maddelerin anti-anjiyogenik potansiyellerinin belirlenmesi için kullanılmaya başlanmış ve oldukça popüler bir *in vivo* yöntem haline gelmiştir. CAM yöntemi, yukarıda bahsedilen ve daha sayısız araştırmacı tarafından onlarca varyasyonu denenerek, sürekli geliştirilmiş ve daha optimize bir deney haline gelmiştir.

Son yıllarda, tümör anjiyogenezinin CAM yöntemi ile analizi amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda genel olarak, test maddesini içeren tümör hücre süspansiyonu ve test maddesi/tümör hücresi içeren matrigel olmak üzere 2 uygulama türü kullanılmaktadır.

Li ve diğ. (2015), hepatoselüler karsinoma (HCC) üzerine bir model geliştirmek amacıyla CAM modelini kullandıkları çalışmada, tümör hücreleri, matrigel içerisinde süspansiyon edilmiştir. CAM üzerine bir silikon disk yerleştirilip matrigel/hücre süspansiyonu uygulanmış ve tümör büyümesi için 5-7 gün beklenerek deney sonlandırılmıştır. Deney sonunda, embriyoların hayatta kalma oranının %93 olduğu ve bu embriyoların %100'ünde tümör oluşumunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Başka bir çalışmada, nazofaringeal karsinoma (NPC) hücre süspansiyonları ve NPC birincil tümör biyopsi dokuları, embriyonik gelişiminin 8. günündeki yumurtanın CAM'i üzerine bir silikon disk içerisinde uygulanarak 5 gün boyunca gözlemlenmiştir. İnokülasyondan 3 gün sonra, NPC hücreleri ve birincil tümör biyopsi dokularının %100'ünde mikro tümör oluşumu

belirlenmiş, ayrıca anjiyogenez yoluyla tümör biyopsi dokularının hacminin arttığı tespit edilmiştir (Xiao ve diğ., 2015).

CAM modelinin avantaj ve dezavantajları, Tablo 2.3'deki gibi sıralanabilir.

**Tablo 2.3:** CAM yönteminin avantaj ve dezavantajları (Norrby, 2006; Nowak-Sliwinska ve diğ., 2018; Fischer ve diğ., 2022).

| AVANTAJLAR                                                                                                                                                                                                                               | DEZAVANTAJLAR                                                                                                                                                                |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Civciv embriyoları, embriyonik gelişimlerinin 10-12. günlerine kadar bağışıklık yetersizliğiyle karakterizedir, dolayısıyla bir inflamatuvar yanıt olmaksızın farklı türde tümör hücrelerinin veya dokularının inokülasyonu yapılabilir. | Test edilecek maddelerin mutlaka çözünebilir olması gereklidir. CAM üzerine uygulanmadan önce gerekli taşıyıcılar içerisinde karıştırılmalı ve homojen bir yapıda olmalıdır. |
| CAM üzerindeki tümör oluşumu, büyümesi ve invazyonu aşamaları, histokimyasal analizler ile kolaylıkla incelenebilmektedir.                                                                                                               | Kuluçkalık yumurtanın embriyonik gelişiminin 15. gününden itibaren devam eden CAM deneylerinde, spesifik olmayan inflamatuvar reaksiyonlar gözlemlenebilir.                  |
| <i>In vivo</i> memeli hayvan modellerinde tümör büyümesi için yaklaşık 3-6 hafta boyunca beklenmesi gerekmektedir. CAM yönteminde ise tümör hücresi inokülasyonunu takiben 2-5 gün içerisinde tümör oluşumu gerçekleşmektedir.           | Deney süresinin kısa olması, tümörün metastazı gibi uzun vadeli gözlemleri engellemektedir.                                                                                  |
| Deney ekipmanı ve yumurtaların maliyeti, diğer hayvan deneylerine kıyasla oldukça düşüktür ve genel anlamda kolay uygulanabilir bir yöntemdir.                                                                                           | CAM yöntemi, kemik iliğinden elde edilen implantlar için kullanılamaz. Bu, model için bir sınırlayıcı unsur olarak düşünülebilir.                                            |
| CAM yöntemi, civciv embriyoları gelişimlerinin 14. gününü geçmediği süreyle yapıldığında etik kurul onayı gerektirmez.                                                                                                                   | CAM zaten vasküler bir yapıya sahiptir ve bu özelliği, yeni damarların tespit edilmesini zorlaştırır.                                                                        |
| <i>In vivo</i> hayvan deneylerinde, örneğin farelerde, grup içerisindeki hayvanların genetik heterojenite göstermemesi gerekmektedir,                                                                                                    | CAM, oksijen gerilimlerine karşı çok hassas bir membrandır, dolayısıyla yumurtada pencere açıldıktan sonra sıkıca kapatılması ve havayla                                     |

|                                                                                                                                                                                                                               |                                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| deneylerde aynı genetik arka plandan gelmiş hayvanlar kullanılır. CAM yönteminde kullanılan civciv embriyolarında hem böyle bir sorun yoktur hem de erkek veya dişi ayrımı olmadan heterojen bir grupta deneyler yapılabilir. | temasının mümkün olduğunca engellenmesi gerekmektedir. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|

## 2.4. KANSER TERAPİSİNDE DOĞAL KAYNAKLI BİLEŞİKLER

Kanser hastalığı, genellikle uzun soluklu bir tedavi süreci gerektirmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ve radyoterapi, yan etkileri ve doza bağlı direnç göstermeleri nedeniyle sınırlı etkinliğe sahiptir. Bu durum, yeni bir potansiyel terapiye duyulan ihtiyacı arttırmaktadır. Anjiyogenezin tümör büyümesi, invazyonu ve metastazındaki kilit rolü göz önüne alındığında; tümör büyümesini, tümörlerde damarlanmayı bozarak baskılayan anti-anjiyogenik tedaviler umut vadetmektedir. Bu yaklaşım, tümör anjiyogenezinin baskılanmasını hedefleyerek etki gösteren inhibitörleri, kanser terapisi için potansiyel bir ilaç haline getirmektedir (Fakhri ve diğ., 2021).

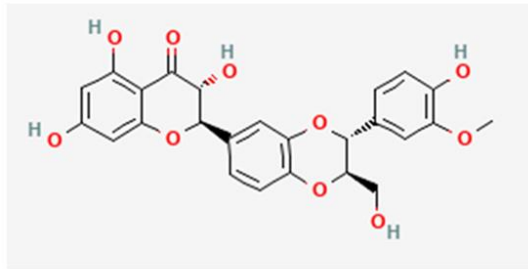
VEGF, anjiyogenez süreci boyunca endotelial hücrelerin fonksiyonu, proliferasyonu ve göçünü, çeşitli sinyal yolları üzerinden düzenleyebilmesi nedeniyle, anti-anjiyogenik terapi için önemli bir ajan olarak görülmektedir (Maj ve diğ., 2016). Kanser tedavisinde kullanılan ve monoklonal bir antikor olan Bevacizumab, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış ilk VEGF-hedefli ajandır (Ansari ve diğ., 2022). Klinik çalışmalar, ilerlemiş küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hastalarında Bevacizumab ve kemoterapi kombinasyonunun, ilk tedavide sağkalımı iyileştirdiğini göstermiştir (Sandler, 2007).

Kanser tedavisinde uygulanan anti-anjiyogenik ilaçların önemli bir bölümünün, bitkilerden izole edilen fitohormonlar, polifenoller, alkaloidler veya terpen gruplarına ait, anti-kanser etkinliği olan biyoaktif bileşikler olduğu bilinmektedir. *Curcuma longa* L. (zerdeçal), *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (yeşil çay), *Ginkgo biloba* L., *Capsicum frutescens* L. (acı biber), *Berberis vulgaris* L. (adi kadıntuzluğu), *Aloe vera* (L.) Burm. f. (Aloe vera), *Apium graveolens* L. (kereviz) ve *Panax ginseng* L. (ginseng)'ten izole edilen doğal biyoaktif bileşikler, anti-kanser aktivite gösteren önemli fitokimyasallardan bazılarıdır. Taxol (*Taxus brevifolia* Nutt.),

Combretastatin (*Combretum caffrum* (Eckl. & Zeyh.) Kuntze), Camptothecin (*Camptotheca acuminata*) ise bitkilerden izole edilen fitoterapötiklerden türetilmiş anti-kanser ilaçlara örnektir. Bu fitokimyasallar, mevcut anti-anjiyogenik ilaçlar ile aynı terapötik etkilere sahip olmalarının yanı sıra; kemoterapötiklerin yan etkilerini sınırlamaları, düşük toksisite profilleri, kolay ulaşılabilirlikleri, düşük maliyetleri ve çok hedefli etkinlikleriyle de ön plana çıkmaktadır. Bu veriler, tümör anjiyogenezinin inhibisyonunda ve dolayısıyla kanser terapisinde, doğal biyoaktif bileşiklerin önemini vurgulamaktadır (Fan ve diğ., 2006; Wang ve diğ., 2015).

#### 2.4.1. Silibinin

Silibinin, *Asteraceae* ailesinin *Silybum marianum* L. Gaertn (süt devedikeni) tohumlarından izole edilen silimarinin ana biyoaktif bileşenidir ve flavonoidlerin alt sınıfı olan flavonolignanların bir üyesidir (Verdura ve diğ., 2021). Silimarin, binlerce yıldır, yılan zehrine ve böcek ısırıklarına karşı kullanılmaktadır. 1970’lerde, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından resmi ilaç olarak sınıflandırılan silimarin, hepatoprotektif bir ajan olarak karaciğer hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Silimarinin dört izomerinden (silibinin, izosilibin, silichristin ve silidianin) biri olan silibinin, bu kompleks bileşiğin yaklaşık %60’ını oluşturmaktadır. Ayrıca silibininin kendisi de Silibinin A ve Silibinin B olmak üzere iki diastereomerin 1:1 orandaki karışımından oluşmaktadır (Wang ve diğ., 2015; Luo ve diğ., 2019; Verdura ve diğ., 2021) (Şekil 2.5).



**Şekil 2.5:** Silibininin moleküler yapısı. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Silibinin> [Ziyaret Tarihi 17.05.2024].

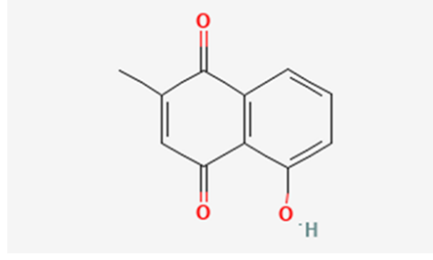
Silibinin; antioksidan, hipokolesterolemik, anti-tümör, kardiyoprotektif, nöroprotektif, anti-viral, antibakteriyal olmak üzere birçok biyolojik aktiviteye sahiptir (Luo ve diğ., 2019; Das ve Banik, 2021). Son yıllarda silibinin ve anti-kanser etkinliğine dair çalışmalar artış göstermiştir. HT-29 (insan kolon kanseri) hücreleri silibinin ile tedavi edildiğinde, kanser hücrelerinin

büyümesi, hücre döngüsünün G0/G1 ve G2/M evrelerindeki duraksamalar üzerinden, doza ve zamana bağlı olarak inhibe edildiği bildirilmiştir (Agarwal ve diğ., 2003). Başka bir çalışma, silibinine maruz bırakılan HUVEC (insan umbilikal ven endotel hücresi) hücrelerinde, kontrole kıyasla tüp oluşumunun azaldığını bildirmiştir. Aynı çalışmada, A549 (insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) hücre sayısının, 48 saat boyunca silibinine maruz bırakıldıktan sonra doza bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir (Rugamba ve diğ., 2021). Prostat tümörlü farelerde yapılan bir çalışmada, fareler 11 hafta boyunca silibinin fosfatidilkolin ile beslendiklerinde, farelerin tümörlerindeki büyümenin %60 oranında inhibe edildiği ve tümör ilerleyişinin, doza bağlı olarak epitel içi neoplaziden farklılaşmış adenokarsinom seviyelerine kadar baskılandığı görülmüştür. Ayrıca diyetteki silibinin, VEGF ve VEGFR2 ifadesini ve tümör mikro damar yoğunluğunu baskılayarak, anjiyogenezi önemli ölçüde inhibe etmiştir (Singh ve diğ., 2008). Başka bir çalışmada, hipoksik koşullara maruz bırakılan HeLa (insan servikal karsinom) ve Hep3B (hepatoselüler karsinom) hücrelerindeki HIF-1alfa birikiminin, silibinin tedavisiyle tamamen inhibe edildiği gösterilmiştir. Ayrıca silibinin, hipoksi ile indüklenen VEGF ifadesini de azaltmıştır (García-Maceira ve Mateo, 2009).

Silibinin, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, potansiyel bir anti-kanser ilaç olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bir dezavantajı, maddenin düşük biyoyararlanımlı olmasıdır. Bu özelliği, silibininin anti-kanser etkinliğinin sınırlanmasına neden olmaktadır, aynı zamanda terapötik dozda silibinin elde edilmesini zorlaştırabilmektedir. Bu durum, yeni silibinin formülasyonları veya kapsüllenmiş nanopartiküller kullanılarak çözülmeye çalışılmaktadır. Silibinin maddesinin diğer terapilerle kombinasyonu, kanser için ümit vadeden bir tedavi olarak görülmektedir (Bosch-Barrera ve diğ., 2017; Luo ve diğ., 2019).

#### 2.4.2. Plumbagin

Plumbagin, *Plumbaginaceae*, *Droseraceae* ve *Ebenaceae* gibi farklı tıbbi bitki ailelerinden elde edilen bir naftokinon bileşenidir. Aynı zamanda, K3 vitamininin yapısal analogudur (Şekil 2.6). *Plumbaginaceae* ailesinden *Plumbago zeylanica* L. bitkisi, plumbagin elde edilen bitkiler içerisinde en bilinen tıbbi bitkidir (Yin ve diğ., 2020; Petrocelli ve diğ., 2023).



**Şekil 2.6:** Plumbagin'in moleküler yapısı <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Plumbagin> [Ziyaret Tarihi 17.05.2024].

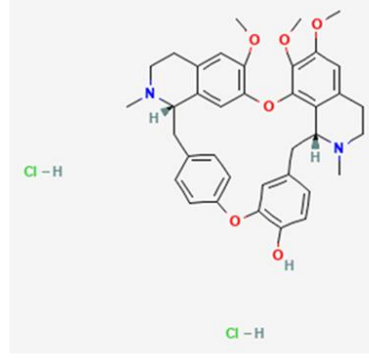
Plumbagin; antioksidan, antibakteriyel, anti-fungal, analjezik, anti-inflamatuvar, anti-diyabetik ve anti-kanser gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip bir ikincil metabolittir (Yin ve diğ., 2020; Petrocelli ve diğ., 2023). Plumbagin'in anti-kanser etkinliği üzerine yapılan bir çalışmada, ER+ MCF-7 ve ER-MDA-MB-231 (insan meme kanseri) hücrelerinde proliferasyonun doza bağlı olarak azaldığı, üstelik MCF-10A (tümörojenik olmayan normal insan meme kanseri) hücrelerinde toksik etki göstermediği tespit edilmiştir (Ahmad ve diğ., 2008). Başka bir çalışmada, OVCAR-5 (insan ovaryum kanseri) hücre süspansiyonu ile tümör oluşturulan farelere plumbagin tedavisi uygulandığında, tümör büyümesinin baskılandığı ve tümör hacminin kontrol grubuna kıyasla azaldığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, BRCA2 gen eksikliği olan PEO-1 ve sisplatine dirençli, BRCA2 geni aktif PEO-4 (insan ovaryum kanseri) hücrelerinde *in vitro* plumbagin tedavisinin, VEGF-A faktörünü önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir. HUVEC (insan umbilikal ven endotelyal hücre hattı) hücrelerinde ise plumbagin tedavisi, VEGF üzerinden yukarı düzenlenen pro-anjiyogenik sinyalizasyonu ve endotelyal hücrelerin çoğalmasını baskılamıştır (Sinha ve diğ., 2013). A549 ve NCI-H522 akciğer kanseri hücrelerinde, 24 saatlik plumbagin tedavisinin hücre çoğalmasını önemli ölçüde inhibe ettiği, bir başka çalışmada rapor edilmiştir. Ayrıca plumbagin uygulaması, bu hücrelerin koloni oluşturma yeteneğini ve göç hareketini baskılamıştır. Aynı çalışmada plumbagin'in, A549 hücreleriyle oluşturulan sferoidlerin boyutunu doza bağlı olarak azalttığı bildirilmiştir (Tripathi ve diğ., 2020). PTEN-koşullu knockout farelerin, kısırlaştırılarak plumbagin içeren bir diyetle beslendiği çalışmada, plumbagin'in, prostat tümörü ağırlığının doza bağlı olarak önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca, plumbagin tedavisinin karaciğer, akciğer, böbrek ve dalak dokularında herhangi bir toksik etkisi bulunmadığı da tespit edilmiştir. Kontrol gruplarında saptanan epitelyal neoplazinin yaygın olduğu; ancak plumbagin tedavi gruplarında doza bağlı olarak invaziv adenokarsinomların büyük ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Hafeez ve diğ., 2015). Plumbagin'in tümör anjiyogenezi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, plumbagin

uygulanan HUVEC hücrelerinde, kılcal tüp benzeri yapıların oluşumunun doza bağlı olarak inhibe edildiği gösterilmiştir. Plumbagin ayrıca, VEGF ile uyarılan HUVEC hücrelerinin göç hareketini önemli ölçüde baskılamıştır. *In vivo* CAM yönteminde, plumbagin uygulanan embriyoda, plumbagin kontrolle kıyasla mikro damarların sayısını azalttığı gösterilmiştir. Kornea anjiyogenez yönteminde, farelerde VEGF uygulamasıyla indüklenen anjiyogenezin, plumbagin tedavisiyle önemli ölçüde baskılandığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, HCT116 (insan kolon karsinoma) ve PC-3 (insan prostat kanseri) hücreleriyle tümör oluşturulmuş farelerde, plumbagin tedavisinin iki tümörün de hacimlerini kontrol grubuna göre önemli derecede azalttığı görülmüştür (Lai ve diğ., 2012).

Plumbagin, çeşitli kanser türlerinde anti-kanser ve anti-anjiyogenik etkinlik gösteren, kanser terapisi için umut vadeden doğal bir biyoaktif bileşiktir. Bitkilerden izole edilen diğer biyoaktif bileşiklerin çoğunda olduğu gibi plumbagin de düşük biyoyararlanıma sahip bir maddedir (Petrocelli ve diğ., 2023). Bu nedenle, potansiyel anti-kanser ilaç çalışmalarında önemli bir aday olan plumbagin, biyoyararlanımı yüksek nanopartikül formülasyonları geliştirilmektedir.

#### 2.4.3. Berbamin

Berbamin, *Berberidaceae* ailesine mensup *Berberis amurensis*, *Berberis vulgaris* ve *Berberis poiretii* bitkilerinden izole edilen bir bis-benzilizokinolin alkaloididir (Şekil 2.7). *Berberis* türleri, geleneksel Çin tıbbında hipertansiyon, kronik kolesistit, hepatit, kanser, dizanteri, enterit ve iskemik kalp rahatsızlıkları olmak üzere birçok hastalıkta yaygın olarak kullanılmaktadır (Zhao ve diğ., 2020; Farooqi ve diğ., 2022; Yu ve diğ., 2022; Liu ve diğ., 2023). *Berberis* türlerinde bulunan ana biyoaktif bileşikler, berberin ve berbamindir. *Berberis* cinsi, yaklaşık 500 tür içermektedir ve bu bitkiler antimikrobiyal, anti-emetik, anti-piretik, antioksidan, anti-inflamatuvar, hipotansif, anti-aritmik, sedatif, anti-nosiseptif ve anti-kolinerjik olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir (Mokhber-Dezfuli ve diğ., 2014; Liu ve diğ., 2021).



**Şekil 2.7:** Berbaminin moleküler yapısı [<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16217067> Ziyaret Tarihi 17.05.2024].

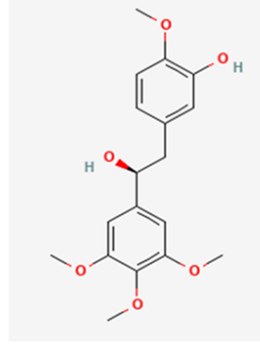
Berbaminin kolorektal kanser üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada, HT-29, HCT116, RKO, SW480 kolorektal kanser hücreleri, 24 saat berbamine maruz kaldıklarında, çoğalmalarının baskılandığı ve HT-29, HCT116, RKO hücrelerinde, kontrole göre berbamin uygulanan grubun doza bağlı olarak koloni sayısının azaldığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, HCT116 hücreleriyle oluşturulan tümör modelinde, berbamin uygulaması yapılan farelerde tümör ağırlığının kontrole kıyasla azaldığı bildirilmiştir (Liu ve diğ., 2023). Başka bir çalışmada, A549 hücreleriyle tümör oluşturulan farelerde berbamin ile tedavinin, tümör hacmini kontrole göre önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca, berbamin uygulanan farelerde akciğer dokusunun ağırlığının ve dokudaki nodüllerin sayısının da azaldığı gösterilmiştir. Berbaminin, A549 ve PC-9 (insan akciğer adenokarsinoma) hücrelerinin çoğalmasını zamana ve doza bağlı olarak inhibe ettiği ve hücrelerin göçünün ve invazyonunun doza bağlı olarak baskılandığı da bildirilmiştir (Liu ve diğ., 2021). Yine A549 hücreleriyle yapılan bir çalışma, berbamin uygulamasının konsantrasyona bağlı olarak, hücrelerde büyümeyi inhibe ettiğini göstermiştir. A549 hücreleriyle tümör oluşturulan farelerde berbamin tedavisi, doza bağlı olarak tümörlerin büyümesini önemli ölçüde baskılamıştır (Hou ve diğ., 2014). Kim ve diğ. (2021), U87MG (glioblastoma) hücrelerini matrigel içinde kuluçkalık embriyonun CAM'i üzerine ekerek berbaminin anti-anjiyogenik etkinliğini incelediklerinde, kontrole göre tümör büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiğini rapor etmişlerdir.

Berbamin, anti-kanser etkinliği üzerine halen birçok araştırma yapılan önemli bir doğal biyoaktif bileşiktir, ancak bu aktivitesini hangi sinyal yollarının düzenlenmesi üzerinden gerçekleştiği konusunda yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bir kemoterapi ilacı olan sorafenib ile sinerjistik etkinliği ve ilacın yan etkilerini azaltarak ilaca duyarlılığını arttırabilmesi (Zhao

ve diğ., 2020), berbaminin kombine kanser terapilerinde umut vadeden bir bileşik olduğunu göstermektedir.

#### 2.4.4. Combretastatin

Combretastatin, *Combretum caffrum* (Eckl. & Zeyh.) Kuntze (Afrika çalısı) türünde bulunan, fenolik stilben grubuna mensup doğal bir bileşiktir. *Combretaceae* ailesinin birçok üyesi, Afrika ve Hindistan'da geleneksel tıpta (akrep sokması, kardiyovasküler hastalıklar) yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu ailenin üyeleri olan combretastatinler, kolşisin (doğal tübülün polimerizasyon inhibitörü) ile paylaştığı yapısal benzerlikleri nedeniyle kolşisinoidler olarak da bilinmektedirler (Cirla ve Mann, 2003; Seddigi ve diğ., 2017; Nainwal ve diğ., 2019) (Şekil 2.8).

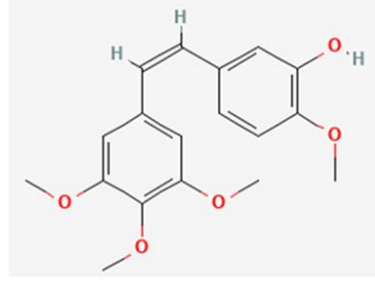


**Şekil 2.8:** Combretastatinin moleküler yapısı

[<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Combretastatin> Ziyaret Tarihi 17.05.2024].

Combretastatin ilk kez yaklaşık 40 yıl önce, Pettit ve diğ. (1982) tarafından *Combretum caffrum* (Eckl. & Zeyh.) Kuntze bitkisinin kabuklarından izole edilmiştir. Combretastatinler (CA) yapısal özelliklerine göre A (stilbenler), B (dihidrotilbenler), C (fenantrenler) ve D (makrosiklik laktonlar) olmak üzere dört gruptan oluşmaktadır (Karatoprak ve diğ., 2020). Kimyasal yapısı nedeniyle genellikle araştırmaların asıl konusu, Combretastatin A grubu bileşikleridir. Pettit ve diğerleri, combretastatinlerin çoğunun izole edilmesi, biyoyararlanım ve terapötik açıdan daha güçlü combretastatin türevlerinin sentezlenmesi alanlarında öncü araştırmalar yaparak, bu doğal biyoaktif bileşiğin geliştirilmesine en önemli katkıyı sağlamışlardır (Pettit ve diğ., 1987; Pettit ve diğ., 1989). 1989 yılında Pettit ve diğerleri tarafından tanımlanan Combretastatin A-4 (CA-4), *Combretum caffrum* türünün bileşenleri arasında, kolşisin bağlanma bölgesinde (kolşisinin de mikrotübüllere bağlandığı bölge

olduğundan bu şekilde bilinmektedir) tübüline bağlanma ve inhibisyon hızı nedeniyle en güçlü anti-mitotik ajan ve dolayısıyla en güçlü form olarak kabul edilmektedir (Pettit ve diğ., 1987; Pettit ve diğ., 1989; Cirla ve Mann, 2003; Nainwal ve diğ., 2019) (Şekil 2.9).



**Şekil 2.9:** CA-4'ün moleküler yapısı [<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5351344> Ziyaret Tarihi 17.05.2024].

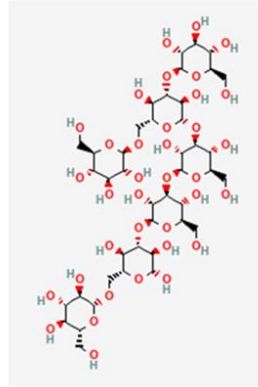
CA-4; antioksidan, anti-inflamatuvar, anti-mitotik, anti-mikrobiyal olmak üzere birçok biyolojik aktiviteye sahip bir cis-stilbendir (Karatoprak ve diğ., 2020). CA-4 ve türevleri üzerinde en çok çalışılan etkinlik ise anti-kanser ve anti-anjiyogenik aktiviteleridir. Grosios ve diğ. (1999), MAC 15A ve SW620 (kolon kanseri) tümör modellerinde, CA-4 ve suda çözünebilen bir ön ilacı olan CA-4-fosfat (CA-4P) ile tedavi edilen tümörlerde, bir doz CA-4 veya CA-4P tedavisinden yalnızca 2 saat sonra hemorajik nekroz belirtileri gözlemlemiş, 4 saat sonra ise yoğun nekrotik alanlar tespit etmişlerdir. MAC 15 ortotopik tümör modelinin, birincil tümörün yanı sıra, metastatik parçaların da oldukça zengin bir vasküler sistem oluşturabildiği, buna karşın tedavi edilen farelerde metastatik parçaların küçük ve avasküler olduğu ve dolayısıyla CA-4 ve CA-4P'nin birincil tümörlerin yanı sıra metastatik tümörlerde de etkili olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada, anjiyogenik faktörler olan FGF-2 veya VEGF-A ile uyarılan HUVEC hücrelerinde CA-4P'nin toksik olmayan konsantrasyonlarının, hücre çoğalmasını önemli ölçüde inhibe ettiği görülmüştür. Aynı zamanda CA-4P, HUVEC hücrelerinde kılcal tüp oluşumunu da önemli ölçüde inhibe etmiştir (Vincent ve diğ., 2005). Su ve diğ. (2016a), MCF-7, T47D (insan meme kanseri), A549 ve 5-8F (nazofaringeal karsinom) hücrelerine CA-4 uygulamasının, hücre çoğalmasını inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, *in vivo* CAM yönteminde CA-4 uygulaması, 48 saatlik tedavinin ardından kontrol grubuna kıyasla doza bağlı olarak, yeni kılcal damar oluşumunu baskılamıştır. Yine bu çalışmada, hipoksik koşullarda CA-4 tedavisinin, HUVEC hücrelerinde VEGF ekspresyonunu inhibe ettiği de bildirilmiştir. Başka bir çalışmada, CA-4'ün farklı dozlarına 24 saat boyunca maruz kalan U-

87 MG (glioma) hücrelerinde göç ve invazyon yeteneğinin baskılandığı ve ayrıca MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin aktivitelerinin inhibe edildiği bildirilmiştir (Roshan ve diğ., 2023).

Combretastatin A-4'ün anti-kanser ve anti-anjiyogenik etkinlikleri, bu bileşiği kanser terapisinde önemli bir yere koymaktadır. Biyoyararlanımın daha yüksek olduğu, suda çözünebilen türevleri, umut verici sonuçlar vermiştir ve hali hazırda katı tümörlerin terapisinde kullanılmak üzere klinik çalışmaları yürütülmektedir (Seddigi ve diğ., 2017).

#### 2.4.5. Lentinan

Lentinan, Şitaki Mantarı olarak da bilinen *Lentinula edodes* türünden izole edilen bir polisakkarittir. Şitaki Mantarı, geleneksel Çin tıbbında, çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Lentinan, moleküler yapısında  $\beta$ -1,3-D-glukan içermektedir.  $\beta$ -glukan, en çok araştırılan polisakkarittir ve biyolojik yanıt değiştiriciler olarak kabul edilmektedir. Aynı zamanda lentinanın, anti-tümör ve anti-inflamatuvar başta olmak üzere farmakolojik etkinliklerinin sorumlusu olan anahtar bir bileşendir (Şekil 2.10). Anti-inflamatuvar ve anti-tümör etkinliklerinin yanı sıra, lentinanın immünomodülatör, antibakteriyal, hipolipidemik, anti-virüs, hipoglisemik aktiviteleri de bilinmektedir (Zhang ve diğ., 2018; Meng ve diğ., 2020; Zhou ve diğ., 2024).



**Şekil 2.10:** Lentinanın moleküler yapısı [<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/37723> Ziyaret Tarihi 17.05.2024].

Li ve diğ. (2021), A549 ve 16HBE (normal insan bronşiyal epitelyal) hücrelerinin lentinan ile 24 saatlik inkübasyonunda, sağlıklı hücrelere kıyasla akciğer kanseri hücrelerinde doza bağlı olarak daha fazla toksisite gösterdiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, A549 hücrelerinin koloni oluşturma eğiliminin, lentinan tarafından baskılandığı da gösterilmiştir. Bir başka

çalışma, LAP0297 (akciğer karsinomu) ve CT26 (kolorektal kanser) hücreleriyle oluşturulan tümörlerde, farelerin düşük dozlarda lentinan ile tedavisinin, kontrole göre tümör büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir. Ayrıca LAP0297 akciğer karsinomlu farelerin lentinan ile 30 günlük tedavisinin, tümör hacmini kalıcı olarak azaltarak, uzun vadede anti-anjiyogenik aktivite gösterebildiği tespit edilmiştir (Deng ve diğ., 2018). Başka bir çalışmada, 24 saat lentinana maruz bırakılan S180 fare sarkoma ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinin çoğalmasının doza bağlı olarak inhibe edildiği, ancak sisplatin uygulamasına kıyasla inhibisyonun daha az olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada, S180 tümör modeli oluşturulan farelerde lentinan tedavisinin, katı tümörleri inhibe ettiği, ancak yine bir kemoterapi ilacı olan siklofosfamid tedavisiyle kıyaslandığında, anti-tümör etkinliğinin daha az olduğu bildirilmiştir (Zhang ve diğ., 2015).

Lentinan ve anti-kanser etkinliğiyle ilgili literatürdeki çalışmalar, lentinanın kombine terapilerdeki rolü üzerine yoğunlaşmıştır. Gerçekten de lentinan, kombine çalışmalarda daha güçlü bir anti-kanser etkinin meydana gelmesini sağlamıştır. A549 hücrelerinde lentinan ve paklitakselin kombine tedavisinin, hücre çoğalmasını, tek başına paklitakselin etkinliğine kıyasla daha güçlü bir şekilde inhibe ettiği bir çalışmada rapor edilmiştir (Liu ve diğ., 2015). Lentinan ve kombinasyonları ile hali hazırda gastrik kanser ve akciğer kanserinin klinik çalışmaları sürdürülmektedir (Zhou ve diğ., 2024), ancak bu alanda yapılacak daha çok araştırmaya gereksinim duyulmaktadır.

Bütün bu bilgilerin ışığında çalışmamızda, birçok biyolojik aktiviteye sahip CA-4, plumbagin, berbamin, silibinin ve lentinan doğal biyoaktif bileşiklerinin, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesinin belirlenmesi ve etkili olan biyoaktif bileşiklerin, *in vitro* anjiyogeneze ve *in vivo* tümör anjiyogenezi üzerindeki aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. ]

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. *İN VİTRO* ÇALIŞMALAR

##### 3.1.1. Hücre Kültürü

Çalışmada, A549 insan akciğer adenokarsinom hücre hattı (ATCC CCL-185) ve HUVEC insan umbilikal ven endotelyal hücre hattı (ATCC CRL-1730) kullanıldı. A549 ve HUVEC hücreleri, %10 fetal sığır serumu (FBS, GIBCO), %1 penisilin/streptomisin (P/S, GIBCO) ilave edilerek hazırlanan Dulbecco'nun modifiye Eagle medyumunda (DMEM, GIBCO), 37°C'de, 1 atmosfer basınç altında ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi.

##### 3.1.1.1. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler, çoğaltıldıkları 75 cm<sup>2</sup>'lik (T75) hücre kültür kabının tüm yüzeyini kapladığında, pasaj işlemi gerçekleştirildi. Öncelikle, kültür kabındaki besiyeri boşaltıldı ve hücreler kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS, WISENT) ile yıkanarak, yapışmayan hücreler uzaklaştırıldı. Ardından %0,25'lik Tripsin-EDTA solüsyonu (GIBCO) eklenerek, kültür kabının yüzeyine yapışan hücrelerin kaldırılması için 1 dakika 37°C'de ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda kültür kabına besiyeri ilave edilerek enzim aktivitesi inhibe edildi. Daha sonra hücreler kültür kabından santrifüj tüplerine aktararak, 1500 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Tüplerdeki süpernatant atılarak hücre peletine DMEM besiyeri eklendi ve hücre süspansiyonu yeni hücre kültür kaplarına aktararak, belirtilen koşullarda inkübasyona bırakıldı. *In vitro* deneylerin devamı boyunca A549 ve HUVEC hücreleri için 2 günde bir pasaj işlemi yapıldı.

##### 3.1.1.2. Hücrelerin Ekimi

Sitotoksik aktivite deneylerinde kullanılacak olan hücre sayısı, Thoma lamında sayılarak hesaplandı. Bunun için kültür kaplarına tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve yüzeye yapışan hücreler kaldırılarak santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak hücre peleti DMEM besiyeri ile süspanse edildi. Bu süspansiyondan yeterli miktarda lama alınarak, mikroskop altında hücre sayımı yapıldı. Sitotoksik aktivite deneyleri için A549 ve HUVEC hücreleri, 96 kuyucuklu plakalara 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Ekimi yapılan hücreler 37°C'de ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı.

### 3.1.1.3. *Biyoaktif Bileşiklerin Hazırlanması*

Deneyde kullanılacak olan doğal biyoaktif bileşikler Combretastatin A-4 (CA-4, Sigma Aldrich, C7744) Plumbagin (Sigma Aldrich, P7262), Berbamin (Sigma Aldrich, 547190), Silibinin (Sigma Aldrich, S0417) ve Lentinan (Santa Cruz, SC-499200A) ticari olarak temin edildi. Biyoaktif maddelerin A549 ve HUVEC hücrelerine uygulanacak konsantrasyonları CA-4 için 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M; plumbagin için 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M; berbamin için 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M; silibinin için 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M ve lentinan için 20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 160  $\mu$ M, 240  $\mu$ M, 320  $\mu$ M olacak şekilde belirlendi. Biyoaktif maddeler belirlenen konsantrasyonlarda, HUVEC ve A549 hücrelerinin besiyeri olan yüksek glikozlu DMEM ile sulandırılarak hazırlandı.

96 kuyucuklu plakalarda 24 saat inkübe edilen hücrelerden, bu sürenin sonunda besiyerleri mikropipet yardımıyla çekilerek uzaklaştırıldı ve hazırlanan konsantrasyonlardaki biyoaktif maddeler 100  $\mu$ l olacak şekilde her hücre kabına verildi. Daha sonra, kontrol ve deney gruplarını içeren 96 kuyucuklu plakaların sitotoksik aktivite analizinin yapılması için 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

### 3.1.2. *Sitotoksik Aktivite Analizi*

#### 3.1.2.1. *MTT Hücre Canlılık Testi*

Bu yöntem, sarı renkte ve suda çözünme özelliğindeki 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT) maddesinin, metabolik olarak aktif canlı hücrelerde bulunan mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri tarafından mor renkte ve suda çözünmeyen formazan kristallerine indirgenmesine ve bu renkli reaksiyonun kolorimetrik olarak ölçülebilmesine dayanmaktadır. Mor rengin yoğunluğu, hücre metabolik aktivitesi ve dolayısıyla canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır (Mosmann, 1983).

MTT (Sigma Aldrich) solüsyonu, PBS içerisinde 5 mg/ml yoğunlukta hazırlandı. Combretastatin A-4, plumbagin, berbamin, silibinin ve lentinan, 3.1.1.3.'de belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanarak, 100  $\mu$ l/kuyucuk olacak şekilde, 96 kuyucuklu plakalardaki A549 ve HUVEC hücrelerine verildi. Kontrol ve deney gruplarını içeren 96 kuyucuklu plakaların 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, her kuyucuğa 30  $\mu$ l olacak şekilde MTT solüsyonu verilerek, 4 saat süresince karanlık ortamda 37°C'de ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde

inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda, kuyucuklardaki MTT içeren besiyerleri, kristalize formazanlara dikkat edilerek mikropipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Ardından her kuyucuğa 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck) eklenerek, formazan kristallerin çözünmesi sağlandı ve 96 kuyucuklu plakalar, orbital çalkalayıcıda 5 dakika boyunca 150 devirde bırakıldı. Bu süre sonunda, renkli reaksiyonun absorbans değerleri mikropilaka okuyucu ile 570 nm dalga boyunda ölçüldü. Hücrelerin % canlılık analizi, kontrol gruplarının absorbans değerlerinin ortalaması %100 olarak kabul edilerek yapıldı. MTT deneyi, her biyoaktif maddenin konsantrasyonu 3 kuyucuk çalışarak, 2 kez tekrar edildi.

### **3.1.2.2. Sülforodamin B Hücre Canlılık Testi**

Sülforodamin B (SRB) testi, SRB'nin hücrelerin protein bileşenlerine bağlanma yeteneğine dayanmaktadır. Parlak pembe renkteki SRB, trikloroasetik asit (TCA) yardımıyla asidik koşullar altında hücresel proteinlere stokiometrik olarak bağlanma ve bazik koşullar altında ayrışma özelliğine sahiptir; dolayısıyla bağlanan boya miktarı ile hücre kütlesi doğru orantılıdır (Vichai ve Kirtikara, 2006; Orellana ve Kasinski, 2016).

Combretastatin A-4, plumbagin ve berbamin, 3.1.4 bölümünde belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanarak, HUVEC ve A549 hücrelerine verildi. Kontrol ve deney gruplarını içeren 96 kuyucuklu plakaların 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, her kuyucuğa 50 µl %50'lik TCA (Sigma Aldrich) eklenerek +4°C'de 1 saat boyunca fiks edildi. Bu süre boyunca hücresel proteinlerin fiksasyonu gerçekleştirildikten sonra, TCA'nın kuyucuklardan uzaklaştırılması için tüm kuyucuklar 5 kez deiyonize su ile yıkandı. Ardından 96 kuyucuklu plakalar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuyucuklar tamamen kuruduktan sonra, %1 asetik asit (Merck) ile %0,4'lük oranda hazırlanan SRB solüsyonu (Sigma Aldrich), kuyucuklara 50 µl olacak şekilde eklendi ve 30 dakika boyunca karanlıkta, oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda, tüm kuyucuklar 5 kez %1'lik asetik asit ile yıkanarak hücresel proteinlere bağlanmayan boya uzaklaştırıldı. Kuyucuklar oda sıcaklığında tamamen kuruduktan sonra, 10 mM konsantrasyonda hazırlanan Tris bazı (VWR) her kuyucuğa 150 µl eklendi ve hücrelerdeki proteinlere bağlanan SRB boyası ayrıştırıldı. Son olarak, absorbans değerleri mikropilaka okuyucu ile 564 nm dalga boyunda ölçüldü. Hücrelerin % canlılık analizi, kontrol gruplarının absorbans değerlerinin ortalaması %100 olarak kabul edilerek yapıldı. SRB deneyi, her biyoaktif maddenin konsantrasyonları 3 kuyucuk çalışarak, 2 kez tekrar edildi.

### 3.1.3. Tüp Oluşumu Analizi

Bu yöntem, endotelyal hücrelerin farklılaşarak bir bazal membran matrisi olan matrigel üzerinde tüp benzeri yapıların oluşumuna dayanmaktadır (Ponce, 2009).

Matrigel (Corning), 96 kuyucuklu plakaya 50 µl ekilerek, 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, DMEM besiyerinde süspanse edilen HUVEC hücreleri (kontrol grubu) ile CA-4 (1 ve 5 µM), plumbagin (1 ve 3 µM) ve berbamin (5 ve 10 µM) maddelerinin konsantrasyonlarını içeren hücre süspanسیونları (deney grubu), matrigel üzerine 50 µl olacak şekilde ekildi ve 10 saat inkübasyona bırakıldı. HUVEC hücreleri, tüp benzeri yapıların oluşumunun gözlemlenmesi için inkübasyon süresinin sonunda, Nikon Eclipse Ti-U invert ışık mikroskobu yardımıyla 10X büyütmede incelenerek, fotoğraflandı. Fotoğraflar, ImageJ Angiogenesis Analyzer programı kullanılarak analiz edildi.

### 3.1.4. Western Blot Yöntemi

Bu yöntem, hücre süspanسیونlu bir karışımındaki spesifik proteinlerin ve bu proteinlerin moleküler ağırlığının, antikor-antijen etkileşimine bağlı olarak kantitatif veya yarı kantitatif biçimde analiz edilmesine dayanmaktadır (Hnasko ve Hnasko, 2015).

#### 3.1.4.1. Protein İzolasyonu

A549 hücreleri, 6 kuyucuklu plakalara ekilerek 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda, A549 hücre besiyeri olan DMEM içerisinde, MTT testi ile belirlenen IC<sub>50</sub> konsantrasyonlarında hazırlanan CA-4 (5 µM), plumbagin (10 µM) ve berbamin (10 µM) maddeleri her kuyucuğa 2 ml uygulandı ve hücreler tekrar inkübe edildi.

Hücrelerin lizis işlemi için 600 µl RIPA tamponu (Santa Cruz), 6 µl fenilmetilsülfonil florid (PMSF, Santa Cruz), 9 µl proteaz inhibitör kokteyl (Santa Cruz) ve 6 µl sodyum ortovanadat (Santa Cruz) bir tüpte hazırlandı. İnkübasyon sonunda, maddeli besiyeri kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve hücreler 1 ml PBS ile yıkandı. PBS kuyucuklardan uzaklaştırıldıktan sonra, 6 kuyucuklu plakalar bir buzun üzerine alınarak hazırlanan soğuk lizis tamponu her kuyucuğa 100 µl olacak şekilde eklendi ve hücreler, silikon uçlu bir spatül yardımıyla kuyucuklardan kazınarak toplandı.

Lizis edilen hücreler, 1,5 ml'lik tüplere aktarıldı ve buzun üzerinde 5 dakikada bir karıştırıcıda tutularak 30 dakika süresince bekletildi. Bu sürenin sonunda, 10'ar saniye olmak üzere 5 defa sonike edildi. Daha sonra tüplerdeki hücreler +4°C'de 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, süpernatant kısmı toplanarak 0,5 ml'lik tüplere aktarıldı.

#### ***3.1.4.2. Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi ve Örneklerin Hazırlanması***

Bradford, Coomassie Brilliant Blue boyasının proteinlere bağlanarak, proteinlerin konsantrasyonlarına göre maksimum absorpsiyonun 465 nm'den 595 nm'ye ve renginin kırmızı-kahverengiden maviye değişmesine dayanan, protein miktarının tayini için kullanılan bir yöntemdir (Kielkopf ve diğ., 2020).

Standartlar, sığır serum albümini (BSA, BioRad) kullanılarak 80, 40, 20, 10 ve 8 µg/ml konsantrasyonlarında hazırlandı ve 96 kuyucuklu plakanın ilgili kuyularına aktarıldı. Örnekler, distile su (dH<sub>2</sub>O) ile 1:100 oranında seyreltilerek hazırlandı ve kuyucuklara aktarıldı. Her bir kuyuya 40 µl Bradford solüsyonu (BioRad) eklendi ve karışım, köpürtülmeden pipetlenerek homojen hale getirildi. Renkli reaksiyonun absorpsiyon değerleri spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda ölçüldü.

Örnekler, protein konsantrasyonları doğrultusunda belirlenen hacimlerde alınarak, dH<sub>2</sub>O ile toplam hacim 10 µl olacak şekilde sulandırıldı ve 0,5 ml'lik tüplere aktarıldı. Beta merkaptotanol ve Laemmli örnek tamponu (LSB, BioRad) 1:20 oranında hazırlanarak, örnek tüplerine 1:1 oranında olacak şekilde eklendi. Daha sonra tüpler, örneklerdeki proteinlerin denatürasyonu için kuru blok ısıtıcıya yerleştirilerek 100°C'de 10 dakika bekletildi. Ardından 5 dakika boyunca buz üzerinde tutularak soğutuldu ve -20°C'de saklandı.

#### ***3.1.4.3. Sodyum Dodesil Sülfat - Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve Aktarım***

Düzenekteki aparatlara takılarak yerleştirilen iki cam yüzey arasına, 1 mm kalınlığa sahip hazır gradient jel döküldü ve hemen ardından 10 kuyucuklu taraklar, jelin üzerine yerleştirildi. Jelin donması için düzenek oda sıcaklığında yaklaşık 1 saat bırakıldı. Bu sürenin sonunda, elektroferez tankının içerisine jel yerleştirildi ve yürütme tamponu eklendi. İlk kuyucuğa 5 µl protein standardı (marker), diğer kuyucuklara ise her bir örnekten 30 µg denatüre edilmiş

protein olacak şekilde belirlenen hacimler yüklendi. Jele yüklenen örnekler kademeli olarak önce 100 V gerilimde 30 dakika; sonra 120 V gerilimde 50 dakika boyunca +4°C’de yürütüldü.

Elektroforez süreci tamamlandıktan sonra, proteinlerin jelden nitroselüloz membrana transferi yarı-ıslak aktarım cihazı (BioRad) yardımıyla yapıldı. Bu işlemten sonra, aktarımın gerçekleştiğini doğrulamak amacıyla, membranlar Ponceau S boyası ile boyandı ve protein bantları kontrol edildi. Ardından boya, membranlardan uzaklaştırıldı.

#### **3.1.4.4. Membranların Bloklanması, Antikor Uygulaması ve Görüntüleme**

Aktarım sonrası membranlar, Tris tamponlu tuz çözeltisi (TBS) ile hazırlanan %2,5’luk süt tozu içeren bloklama solüsyonunda bırakılarak, oda sıcaklığında ve çalkalayıcı üzerinde 60 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda bloklama solüsyonu membranlardan uzaklaştırıldı ve antikor uygulaması yapıldı.

Çalışmada, ekstrasellüler matriks (ECM)’in proteolitik bozunmasını indükleyen matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) (Affinity Biosciences, AF0577) ve anjiyogenezde kilit rol oynayan Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü-A (VEGF-A) (Affinity Biosciences, AF5131) antikorları kullanıldı. Antikorların moleküler ağırlıkları birbirinden farklı olduğundan (MMP-2: 74 kD; VEGF-A: 27 kD), birincil antikorlar MMP-2 ve VEGF-A, %5’lik bloklama solüsyonu ve TBS içerisinde 1:500 oranında birlikte hazırlanarak uygulandı. Membranlar +4°C’de 16 saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda, membranlar oda sıcaklığında 1 saat daha antikora maruz bırakıldı ve Tween 20 içeren TBS (TBST) ile üç defa 15 dakika yıkama işlemi yapıldı. Yıkamaların sonunda, %5’lik bloklama solüsyonu ve TBS içerisinde 1:5000 oranında hazırlanan ikincil antikor (Goat Anti-Rabbit IgG HRP; Affinity Biosciences, S0001) uygulandı ve membranlar oda sıcaklığında çalkalayıcıda 60 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda, membranlar önce TBST ile üç defa 15 dakika; daha sonra TBS ile iki defa 5’er dakika yıkandı.

Membranlar, 1:1 oranında karıştırılarak hazırlanan Peroksidaz reaktifi ve Luminol reaktifi (BioRad) ile 5 dakika boyunca yıkandı ve immünopozitif protein bantları BioRad Chemidoc MP görüntüleme cihazı yardımıyla görüntülendi. Protein bantlarının densitometrik analizi Image Lab programı kullanılarak yapıldı. Membranların beta-aktin görüntülenmesi referans alınarak, gruplar arası istatistiksel analiz yapıldı.

### 3.2. *İN VİVO* ÇALIŞMALAR

#### 3.2.1. Tümör Anjiyogenezi Koryo-Allantoyik Membran (CAM) Yöntemi

Tümör anjiyogenezi CAM deneyi, Klingenberg ve diğ. (2014); Li ve diğ. (2015); Swadi ve diğ. (2018); Javed ve diğ. (2022) tarafından bildirilen yöntemler modifiye edilerek gerçekleştirildi.

##### 3.2.1.1. Dölllenmiş Yumurtaların Hazırlanması

Dölllenmiş kuluçkalık civciv yumurtaları, PakTavuk firmasından temin edildi. Dölllenmiş yumurtalar %70'lik etil alkol (Merck) ile silinerek 37°C sıcaklıkta ve %80 relatif nemdeki kuluçka etüvünde yatay pozisyonda 72 saat inkübe edildi (Şekil 3.1). Yumurtalar, embriyo gelişiminin durdurulması için firmadan buz aküleri ve strafor kutular yardımıyla getirildi; dolayısıyla inkübasyon başladığında yumurtalar, embriyonik gelişimlerinin (EG) 0. gününde kabul edildi. İnkübasyon süresi sonunda (ED-3), steril enjektörler ile yumurtaların alt kısmından 5-7 ml albümin (yumurta akı) çekildi ve kuluçkalık yumurtalar viyollere dikey bir şekilde yerleştirilerek, 6 gün boyunca inkübasyona bırakıldı.



**Şekil 3.1:** Dölllenmiş yumurtaların yatay inkübasyonu.

### 3.2.1.2. *Kanser Hücrelerinin ve Biyoaktif Maddelerin Hazırlanması*

Embriyoda tümör oluşturmak amacıyla, öncelikle CAM alanına ekilecek kanser hücresi sayısı optimize edildi. A549 hücreleri 3.1.1 bölümünde anlatıldığı şekilde 175 cm<sup>2</sup>'lik kültür kaplarında çoğaltılarak 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi ve hücreler kültür kabının yüzeyini kapladığında pasajlandı.

Tümör oluşturmak üzere CAM alanına ekilecek hücre sayısının optimizasyonu için deney grupları, Tablo 3.1'de belirtildiği gibi oluşturuldu:

**Tablo 3.1:** Kontrol ve deney grupları.

| KONTROL GRUPLARI                                          | DENEY GRUPLARI                                                                                                            |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.Kontrol grubu: 2 milyon hücre süspansiyonu içeren grup. | 1.Deney grubu: Combretastatin A-4, Plumbagin ve Berbamin maddeleri eklenmiş 2 milyon A549 hücre süspansiyonu içeren grup. |
| 2.Kontrol grubu: 3 milyon hücre süspansiyonu içeren grup. | 2.Deney grubu: Combretastatin A-4, Plumbagin ve Berbamin maddeleri eklenmiş 3 milyon A549 hücre süspansiyonu içeren grup. |
| 3.Kontrol grubu: 4 milyon hücre süspansiyonu içeren grup. | 3.Deney grubu: Combretastatin A-4, Plumbagin ve Berbamin maddeleri eklenmiş 4 milyon A549 hücre süspansiyonu içeren grup. |

Hücre ve biyoaktif madde süspansiyonları, uygulamanın yapılacağı ED-9. günde taze olarak hazırlandı. Deney optimizasyonu için gereken hücre sayısı Thoma lamında sayılarak hesaplandı. Her bir kontrol grubu için 2, 3 ve 4 milyon hücre, yüksek glikozlu DMEM besiyerinde süspanse edilerek, 15 ml'lik tüplerde hazırlandı. Deney grubu için biyoaktif maddelerin MTT testi analizine göre hesaplanan A549 hücrelerinin %50'sini öldüren inhibisyon konsantrasyonları (IC<sub>50</sub>) kullanıldı. Yapılan analizde IC<sub>50</sub> değerleri CA-4 için 5 µM, plumbagin ve berbamin için 10 µM olarak hesaplandı. Biyoaktif maddelerin belirtilen konsantrasyonları 2, 3 ve 4 milyon kanser hücresi ile süspanse edildi. Hazırlanan biyoaktif

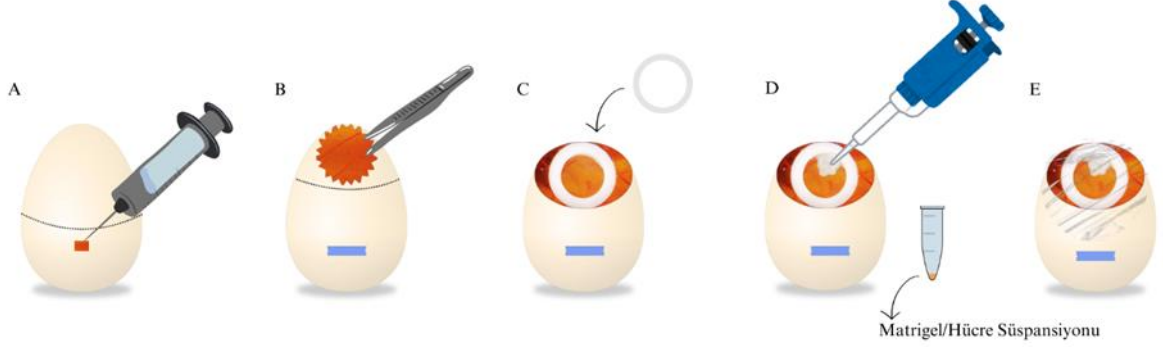
madde ve hücre süspansiyonları, matrigel (Corning) ile 1:1 oranında süspanse edilerek 0,2 ml'lik tüplere koyuldu.

### 3.2.1.3. Matrigel/Hücre Süspansiyonlarının CAM Üzerine Uygulanması

Uygulamadan hemen önce, yumurtaların üst sivri kısmındaki kabuk, steril bir pens yardımıyla uzaklaştırıldı. Daha sonra, yine bir pens yardımıyla steril silikon diskler, döllenmiş yumurtaların CAM alanına yerleştirildi. Bu uygulama, matrigelin oda sıcaklığında katılaşmadan, CAM alanına yayılmasını engellemek amacıyla yapıldı. Ardından CAM alanı üzerindeki silikon disklerin içerisine, matrigel+hücre süspansiyonu veya matrigel+biyoaktif maddeli hücre süspansiyonu ekildi. Uygulamadan sonra, döllenmiş yumurtalar bir streç film yardımı ile hava almayacak şekilde kapatıldı ve 36,5°C'de, %80 relatif nemdeki etüvde dikey bir pozisyonda 3 gün inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.2). Tümör oluşumu, uygulamadan sonraki günlerde sürekli olarak takip edildi. İnkübasyonun sonunda (ED-12) deney sonlandırıldı, döllenmiş yumurtalar Canon EOS 600D fotoğraf makinesine bağlı bir stereomikroskop (Leica M205) ile fotoğraflandı ve hemen ardından tümör dokularının rezeksiyonu gerçekleştirildi. Fotoğraflar, vasküler yoğunluk parametresi üzerinden, ImageJ Angiogenesis Analyzer programı kullanılarak analiz edildi (Şekil 3.3).



**Şekil 3.2:** Madde uygulanan ve streç film yardımıyla kapatılan döllenmiş yumurtalar.



**Şekil 3.3:** CAM yönteminin uygulanışı. A: Kuluçkalık yumurtalardan albümin çekilmesi. B: Üst kabuk kısmının pens yardımıyla çıkarılması. C: Steril disklerin yerleştirilmesi. D: Matrigel/Hücre süspansiyonlarının disk içerisine inokülasyonu. E: Yumurtaların hava almayacak şekilde steril bir streç film yardımıyla kapatılması (BioRender ile oluşturuldu).

### 3.2.2. Histolojik Yöntem

Tümör dokuları, %10'luk nötral formalinde fiksasyona bırakıldı. Fikse edilen dokular birkaç kez musluk suyu ile yıkanarak önce yükselen alkol (%70, %80, %90 ve %100), daha sonra da ksilolden geçirilerek 42°C parafinde bekletildi. Ardından takibi yapılan dokular 58°C'lik parafine bloklar halinde gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom (Leica) yardımıyla kesitler (5- $\mu$ m) alınarak, albümin mayer ile kaplanmış lamaların üzerine kesitler yapıştırıldı.

#### 3.2.2.1. Hematoksilen-Eozin Boyama

Tümör doku kesitleri sırasıyla ksilen, alkol ve su serilerinden geçirilerek deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemleri gerçekleştirildi. Kesitler, 1 dakika hematoksilen solüsyonunda tutuldu ve hemen ardından akarsuya alınarak, morarana kadar, yaklaşık 8 dakika bekletildi. Daha sonra kesitler eozin solüsyonunda 5 dakika bekletildi ve ardından akarsuda yıkandı. Kesitler, %70, %96 ve %100'lük alkol serilerinden ve ksilolden geçirilerek, entellan ile kapatıldı.

Döllenmiş kuluçkalık yumurtada tümör oluşturmak üzere CAM alanına ekilecek hücre sayısı, ImageJ programı ve histolojik kesitlerden elde edilen analiz sonuçları değerlendirilerek, 3 milyon olarak belirlendi. Combretastatin A-4, Plumbagin ve Berbamin maddeleri eklenmiş 3 milyon A549 hücre süspansiyonu içeren deney grupları (12 yumurta/grup) ve 3 milyon A549 hücre süspansiyonu içeren kontrol grubu (12 yumurta/grup) oluşturularak, 3.2.1 bölümünde ayrıntılı bir şekilde anlatılan Tümör Anjiyogenezi CAM yöntemi gerçekleştirildi ve alınan

tümör dokularından elde edilen kesitlere, 3.2.2 bölümünde anlatıldığı şekilde hematoxilen-eozin boyaması yapıldı.

### 3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Tüm çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular, ortalama  $\pm$  standart hata (SEM) olarak hesaplandı. Kontrol ve deney grupları arasında anlamlılık olup olmadığı, GraphPad Prism 5 (GraphPad Prism Version 5 Software Program, San Diego, CA, ABD) programı kullanılarak belirlendi. *In vitro* çalışmalar, Student t testi; *in vivo* çalışması ise tek yönlü ANOVA ve devamında Tukey'in çoklu karşılaştırma testi kullanılarak analiz edildi.  $p < 0,05$  değeri, anlamlı olarak kabul edildi. ]

## 4. BULGULAR

### 4.1. *İN VİTRO* BULGULAR

#### 4.1.1. Sitotoksik Aktivite Sonuçları

##### 4.1.1.1. *MTT Hücre Canlılık Testi Sonuçları*

Combretastatin A-4 (CA-4), plumbagin, berbamin, silibinin ve lentinan maddelerinin, HUVEC ve A549 hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkinliğini belirlemek amacıyla MTT canlılık testi kullanıldı. Combretastatin A-4 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M; plumbagin 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M; berbamin 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M; silibinin 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M ve lentinan 20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 160  $\mu$ M, 240  $\mu$ M, 320  $\mu$ M konsantrasyonlarında hücrelere uygulanarak 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda oluşturdukları sitotoksik etki belirlendi. MTT deneyi, her biyoaktif maddenin konsantrasyonları 3 kuyucuk çalışarak, 2 bağımsız tekrar ile gerçekleştirildi. Deney sonunda, her iki hücre hattı için de %canlılık değerleri hesaplandı ve kontrol grubuyla deney grupları arasındaki anlamlılık değerleri istatistiksel analizler ile belirlendi.

A549 hücrelerinde Combretastatin A-4 uygulaması, hücre canlılığını kontrol grubuna göre zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde azalttı ( $p<0,001$ ). Hücre canlılığının inhibisyonu bakımından en kuvvetli etki 72. saatte, 1  $\mu$ M konsantrasyonda gözlemlendi. Ek olarak, 24 saatlik inkübasyonda, en yüksek CA-4 dozunda (10  $\mu$ M) hücrelerin maruz kaldığı DMSO kontrolünde, kontrole kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir artış gözlemlendi ( $p<0,05$ ). CA-4 uygulamasının, hücre canlılığını 48. ve 72. saatte %50'nin altına düşürdüğü saptandı (Şekil 4.1). CA-4'ün A549 hücreleri için  $IC_{50}$  değeri, 48. saatte 5  $\mu$ M olarak belirlendi.

HUVEC hücrelerinde Combretastatin A-4 uygulamasının, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri boyunca herhangi bir dozda, hücre canlılığını %50'nin altına düşürmediği gözlemlendi. CA-4 uygulamasının, 24. saatte 1  $\mu$ M ( $p<0,001$ ) ve 10  $\mu$ M ( $p<0,01$ ) dozunda; 2  $\mu$ M ve 5  $\mu$ M dozuna ( $p<0,05$ ) kıyasla daha kuvvetli bir azalma meydana getirdiği saptandı. Ayrıca 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M ve 10  $\mu$ M konsantrasyonlarında, hücre canlılığının kontrol grubuna göre zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde azaldığı görülürken (sırasıyla  $p<0,05$ ,  $p<0,01$ ,  $p<0,001$ ); 2  $\mu$ M dozunda inkübasyon sürelerine bağlı bir azalma gözlenmedi. Ayrıca, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde, en yüksek CA-4 dozunda (10  $\mu$ M) hücrelerin maruz kaldığı DMSO

kontrolünde, kontrol grubuna kıyasla HUVEC hücrelerinin canlılığında anlamlı bir artış gözlemlendi ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.1).

HUVEC hücrelerinde CA-4 uygulamasının, hücre canlılığını A549 hücrelerine kıyasla daha az düşürdüğü saptandı. CA-4 uygulamasının küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerine, sağlıklı hücrelerden daha duyarlı olduğu gözlemlendi. Bu nedenle CA-4'ün, akciğer kanseri hücrelerine seçici olarak güçlü toksisite gösterdiği düşünülmektedir.

A549 hücrelerinde plumbagin uygulaması, hücre canlılığını doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde azalttı. 24. saatte plumbagin uygulaması, 0,1  $\mu\text{M}$  dozunda hücre canlılığında anlamlı bir azalmaya neden olmazken, konsantrasyon arttıkça istatistiksel olarak anlamlı bir azalma (1  $\mu\text{M}$  için  $p<0,05$ ; 3  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  için  $p<0,001$ ) meydana getirdiği saptandı. 48. saatte plumbagin uygulamasında, 3  $\mu\text{M}$  dozunda anlamlı bir azalma ( $p<0,05$ ) gözlemlendi ve hücre canlılığındaki bu azalma, konsantrasyona bağlı olarak (5  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  için  $p<0,001$ ) kuvvetlendi. Benzer şekilde, 72 saatlik inkübasyonda plumbagin uygulamasının her dozda hücre canlılığını anlamlı bir şekilde düşürdüğü gözlenirken, 3  $\mu\text{M}$  dozu ( $p<0,01$ ) itibarıyla bu etkinin konsantrasyona bağlı olarak anlamlı bir şekilde (5  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  için  $p<0,001$ ) kuvvetlendiği belirlendi. Plumbagin hücre canlılığında meydana getirdiği en kuvvetli azalmanın, 10  $\mu\text{M}$  dozunda, zamana bağlı olarak ve anlamlı bir şekilde gerçekleştiği saptandı ( $p<0,001$ ). Ek olarak, 48 saatlik inkübasyonda, en yüksek plumbagin dozunda (10  $\mu\text{M}$ ) hücrelerin maruz kaldığı DMSO kontrolünde, kontrol grubuna kıyasla A549 hücrelerinin canlılığında anlamlı bir artış ( $p<0,01$ ); 24 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde ise anlamlı bir azalma ( $p<0,05$ ) gözlemlendi (Şekil 4.1). Plumbagin A549 hücreleri için  $\text{IC}_{50}$  değeri, 24. saatte 10  $\mu\text{M}$  olarak belirlendi.

Plumbagin uygulaması HUVEC hücrelerinde, sadece 5  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  dozlarında hücre canlılığını tüm inkübasyon süreleri boyunca %50'nin altına düşürdü ( $p<0,001$ ). 24 saatlik inkübasyonda, plumbagin uygulamasının her dozda hücre canlılığını anlamlı bir şekilde düşürdüğü gözlenirken, 3  $\mu\text{M}$  dozundan itibaren bu etkinin sırasıyla 5  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  dozlarında, konsantrasyona bağlı olarak anlamlı bir şekilde kuvvetlendiği saptandı ( $p<0,001$ ). 48. saatte 0,1  $\mu\text{M}$  ve 1  $\mu\text{M}$  dozlarındaki plumbagin uygulamasında, hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmezken; konsantrasyonun artmasıyla hücre canlılığının anlamlı bir şekilde inhibe edildiği (3  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  için  $p<0,001$ ) gözlemlendi (Şekil 4.1).

Yüksek dozlarda plumbagin uygulamasının, A549 hücrelerinde hücre canlılığını, HUVEC hücrelerine kıyasla daha az düşürdüğü saptandı.

Berbamin uygulamasının, A549 hücrelerinin canlılığını doza ve zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde azalttığı gözlemlendi. Berbaminin 24 saatlik inkübasyonda, en düşük dozunda (2,5  $\mu$ M) anlamlı bir azalma gözlenmezken; diğer bütün dozlarda, kontrole kıyasla konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttığı (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M ve 40  $\mu$ M için  $p < 0,001$ ) saptandı. 48. ve 72. saatlerde ise berbamin uygulaması, tüm dozlarda hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma (48. saatte 2,5  $\mu$ M için  $p < 0,05$ ; diğer dozlar için  $p < 0,001$ ; 72. saatte tüm dozlar için  $p < 0,001$ ) meydana getirdi. 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M ve 40  $\mu$ M dozlarında berbamin uygulaması, hücre canlılığını inkübasyon sürelerine bağlı olarak gittikçe azaltırken, en kuvvetli etkinin 40  $\mu$ M dozunda meydana geldiği ( $p < 0,001$ ) belirlendi. Berbamin uygulamasının, A549 hücre canlılığını 24. saat itibarıyla 40  $\mu$ M; 48. saatte 20  $\mu$ M ve 72. saatte 10  $\mu$ M dozunda %50'nin altına düşürdüğü gözlemlendi ( $p < 0,001$ ). Ayrıca, 24, 48 ve 72 olmak üzere tüm inkübasyon sürelerinde, en yüksek berbamin dozunda (40  $\mu$ M) hücrelerin maruz kaldığı DMSO kontrolünde, kontrol grubuna kıyasla A549 hücrelerinin canlılığında anlamlı bir azalma gözlemlendi (24. ve 48. saatlerde  $p < 0,05$ ; 72. saatte  $p < 0,001$ ) (Şekil 4.1). Berbaminin A549 hücreleri için  $IC_{50}$  değeri, 48. saatte 10  $\mu$ M olarak belirlendi.

Berbamin uygulaması, HUVEC hücrelerinde hücre canlılığını yalnızca en yüksek iki dozunda (20  $\mu$ M ve 40  $\mu$ M) %50'nin altına düşürdü ( $p < 0,001$ ). Berbamin uygulaması, en düşük konsantrasyon olan 2,5  $\mu$ M dozunda hücre canlılığında, hiçbir inkübasyon saatinde anlamlı bir azalmaya neden olmadı. 24. saatte berbamin uygulamasının, hücre canlılığında doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde azalma meydana getirdiği saptandı (5  $\mu$ M için  $p < 0,01$ ; 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M ve 40  $\mu$ M için  $p < 0,001$ ). Benzer şekilde, HUVEC hücrelerinde berbamin uygulamasının, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde de hücre canlılığını doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde düşürdüğü gözlemlendi (48. saatte 5  $\mu$ M için  $p < 0,05$ , 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M ve 40  $\mu$ M için  $p < 0,001$ ; 72. saatte 5  $\mu$ M için  $p < 0,01$ , 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M ve 40  $\mu$ M için  $p < 0,001$ ). Berbamin uygulamasının, hücre canlılığının inhibisyonu bakımından en kuvvetli etkisinin, en yüksek konsantrasyon olan 40  $\mu$ M dozunda görüldüğü ( $p < 0,001$ ) ve bu etkinin en düşük dozlarda (2,5  $\mu$ M ve 5  $\mu$ M) oldukça az olduğu gözlemlendi. Bunlara ek olarak hücre canlılığındaki azalmanın inkübasyon sürelerine bağlı olarak gerçekleşmediği belirlendi (Şekil 4.1). Berbamin uygulamasının, HUVEC hücrelerindeki hücre canlılığını, düşük dozlarda A549 hücrelerine kıyasla daha az

düşürdüğü saptandı. En düşük konsantrasyon olan 2,5  $\mu$ M dozunda HUVEC hücrelerinde anlamlı bir azalma meydana gelmezken; A549 hücrelerinde, aynı dozda hücre canlılığı anlamlı bir şekilde azaldı ( $p<0,05$ ,  $p<0,001$ ). 5  $\mu$ M dozunda berbamin uygulamasının, A549 hücre canlılığını ( $p<0,001$ ), HUVEC hücrelerine kıyasla ( $p<0,05$ ,  $p<0,01$ ) daha kuvvetli bir şekilde inhibe ettiği saptandı.

Silibinin uygulamasının A549 hücrelerinde, herhangi bir doz ve inkübasyon süresinde, hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmadığı saptandı. 24 saatlik inkübasyonda silibinin uygulaması, bütün dozlarda hücre canlılığını arttırdı ve bu artışın 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M, 100  $\mu$ M ve 200  $\mu$ M dozlarında anlamlı bir şekilde meydana geldiği belirlendi ( $p<0,05$ ,  $p<0,01$ ,  $p<0,001$ ). Benzer şekilde, 48. ve 72. saatte silibinin uygulaması, tüm dozlarda A549 hücrelerinin canlılığını arttırdı ve bu etkinin 48. saat için tüm dozlarda; 72. saat içinse 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M dozlarında anlamlı olduğu belirlendi ( $p<0,05$ ,  $p<0,01$ ,  $p<0,001$ ). Ek olarak, 24. saatte en yüksek silibinin dozunda (200  $\mu$ M) hücrelerin maruz kaldığı DMSO kontrolünde, kontrol grubuna kıyasla, A549 hücrelerinin canlılığında düşük şiddette bir azalma gözlemlendi ( $p<0,05$ ). 24. saatte silibinin uygulamasının, hücre canlılığını 25  $\mu$ M-75  $\mu$ M; 48. saatte 10  $\mu$ M-75  $\mu$ M; 72. saatte ise 10  $\mu$ M-100  $\mu$ M dozları arasında, konsantrasyona bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı gözlemlendi (Şekil 4.1).

Silibinin uygulaması, HUVEC hücrelerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde, hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana getirmedi. 24. saatte silibinin uygulaması, hücre canlılığını anlamlı bir şekilde arttırdı ( $p<0,01$ ,  $p<0,001$ ). Bu etkinin 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M ve 75  $\mu$ M dozları arasında konsantrasyona bağlı bir şekilde kuvvetlendiği; en yüksek konsantrasyonlar olan 100  $\mu$ M ve 200  $\mu$ M dozlarında giderek zayıfladığı gözlemlendi. Silibinin uygulamasının, 48 saatlik inkübasyonda hücre canlılığını 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M, 100  $\mu$ M dozlarında anlamlı olarak arttırdığı ( $p<0,001$ ), ancak 200  $\mu$ M dozundaki artışın, istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. Hücre canlılığındaki bu artışın, 48. saatte 10  $\mu$ M-25  $\mu$ M dozları arasında konsantrasyona bağlı olarak kuvvetlendiği, 50  $\mu$ M ve 200  $\mu$ M dozları arasında ise konsantrasyona bağlı olarak zayıfladığı saptandı. Benzer şekilde, silibinin uygulamasının 72. saatte 10  $\mu$ M-25  $\mu$ M dozlarında hücre canlılığını konsantrasyona bağlı olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı ( $p<0,001$ ); fakat bu anlamlı artışın 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M dozlarında gittikçe zayıfladığı ( $p<0,05$ ,  $p<0,001$ ) gözlemlendi. 72 saatlik inkübasyonda silibinin uygulaması, 200  $\mu$ M dozunda kontrol grubuna göre hücre canlılığını anlamlı bir

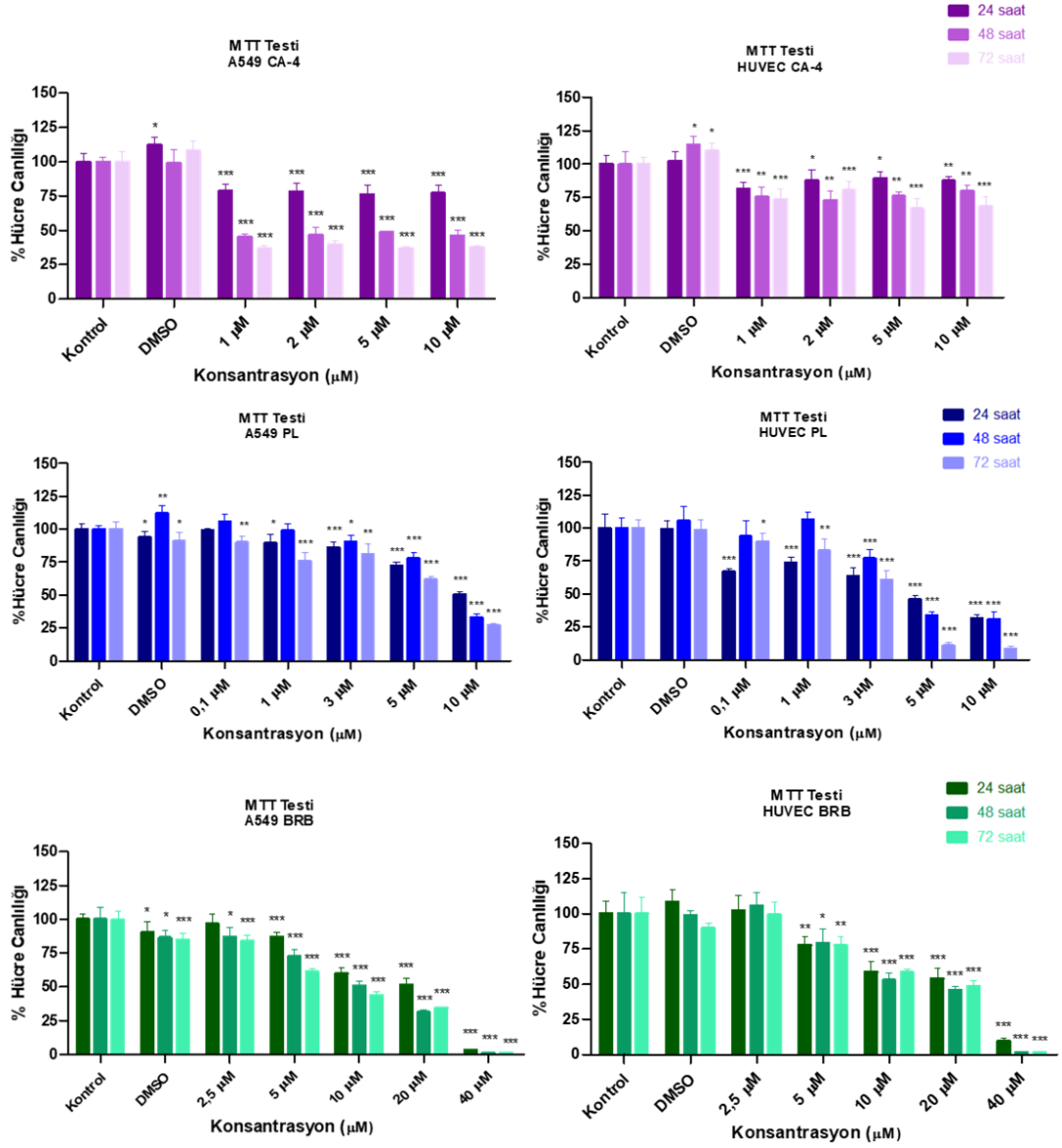
şekilde azalttı ( $p<0,001$ ). Ayrıca, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde, en yüksek silibinin dozunda (200  $\mu\text{M}$ ) hücrelerin maruz kaldığı DMSO kontrolünde, kontrol grubuna kıyasla, HUVEC hücrelerinin canlılığında anlamlı bir artış gözlemlendi ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.1).

Silibinin, akciğer kanseri hücrelerinin canlılığında hiçbir azalmaya neden olmadı. Aksine silibininin, HUVEC ve A549 hücrelerinde hücre çoğalmasını uyarıcı bir etki gösterdiği saptandı. Silibinin, akciğer kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik aktivite göstermemesi nedeniyle sonraki deneylerde kullanılmadı.

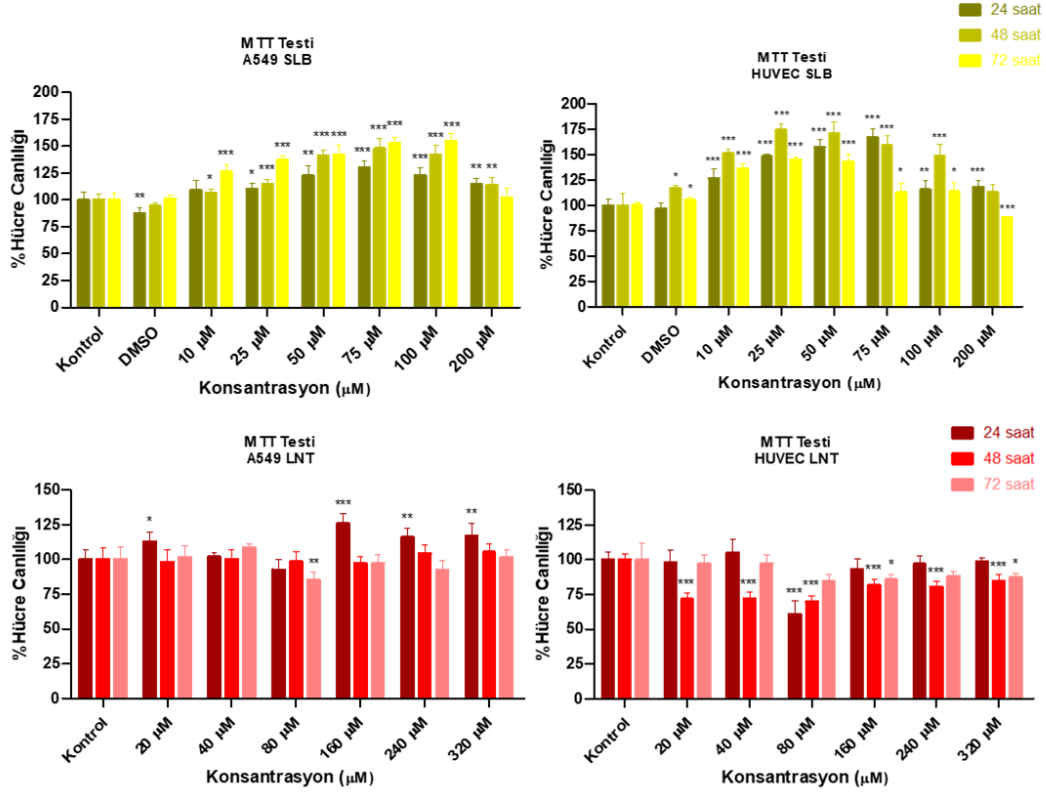
A549 hücrelerinde lentinan uygulamasının, A549 hücre canlılığını yalnızca 80  $\mu\text{M}$  dozunda, 72 saatlik inkübasyon süresinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı ( $p<0,01$ ) belirlendi. 24 saatlik inkübasyonda lentinan uygulamasının, 20  $\mu\text{M}$ , 160  $\mu\text{M}$ , 240  $\mu\text{M}$  ve 320  $\mu\text{M}$  dozlarında hücre canlılığını anlamlı bir şekilde arttırdığı saptandı (sırasıyla  $p<0,05$ ,  $p<0,001$ ,  $p<0,01$ ,  $p<0,01$ ). 48. saatte lentinan uygulamasının hiçbir dozu, hücre canlılığını anlamlı bir şekilde etkilemedi. Lentinan uygulamasının, 24. saatte 80  $\mu\text{M}$ ; 48. saatte 20  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$  ve 160  $\mu\text{M}$ ; 72. saatte ise 160  $\mu\text{M}$  ve 240  $\mu\text{M}$  dozlarında A549 hücre canlılığını çok düşük seviyede azalttığı, ancak anlamlı bir azalma meydana getirmediği belirlendi (Şekil 4.1).

HUVEC hücrelerinde lentinan uygulaması, hücre canlılığında 24 saatlik inkübasyonda, yalnızca 80  $\mu\text{M}$  dozunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana getirdi ( $p<0,001$ ). 48. saatte lentinan uygulamasının, hücre canlılığını tüm dozlarda anlamlı bir şekilde azalttığı saptandı ( $p<0,001$ ). 72 saatlik inkübasyon süresinde, lentinan uygulaması HUVEC hücre canlılığını 160  $\mu\text{M}$  ve 320  $\mu\text{M}$  dozlarında anlamlı bir şekilde inhibe etti ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.1).

Bu bulgular lentinan uygulamasının, iki hücre hattında da doza veya zamana bağlı olarak hücre canlılığında anlamlı bir azalma meydana getirmediğini göstermektedir. Lentinan, akciğer kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik aktivite göstermemesi nedeniyle sonraki deneylerde kullanılmadı.



**Şekil 4.1:** A549 ve HUVEC hücre hatlarında Combretastatin A-4 (CA-4), plumbagin (PL), berbamin (BRB), silibinin (SLB) ve lentinan (LNT) maddeleriyle 24, 48 ve 72 saatlik tedavi sonrası MTT testi ile belirlenen hücre canlılık değerleri. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; kontrole göre anlamlılık değerleri.



**Şekil 4.1 (devamı):** A549 ve HUVEC hücre hatlarında Combretastatin A-4 (CA-4), plumbagin (PL), berbamin (BRB), silibinin (SLB) ve lentinan (LNT) maddeleriyle 24, 48 ve 72 saatlik tedavi sonrası MTT testi ile belirlenen hücre canlılık değerleri. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; kontrole göre anlamlılık değerleri.

#### 4.1.1.2. SRB Hücre Canlılık Testi Sonuçları

Combretastatin A-4, plumbagin ve berbamin maddelerinin, A549 ve HUVEC hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkinliğini belirlemek ve MTT hücre canlılık testinin sonuçlarını doğrulamak amacıyla SRB canlılık testi kullanıldı. CA-4 1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM; Plumbagin 0,1 µM, 1 µM, 3 µM, 5 µM, 10 µM; Berbamin 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM konsantrasyonlarında hücrelere uygulanarak 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda oluşturdukları sitotoksik etki belirlendi. SRB deneyi, her biyoaktif maddenin konsantrasyonları 3 kuyucuk çalışarak, 2 bağımsız tekrar ile gerçekleştirildi. Deney sonunda, her iki hücre hattı için de %canlılık değerleri hesaplandı ve kontrol grubuyla deney grupları arasındaki anlamlılık değerleri istatistiksel analizler ile belirlendi.

Combretastatin A-4 uygulamasının, A549 hücrelerinin canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı görüldü. 24. saatte CA-4 uygulaması, tüm dozlarda hücre canlılığında

azalmaya neden olurken; yalnızca 2  $\mu\text{M}$  dozunda anlamlı bir azalmanın meydana geldiği belirlendi ( $p<0,01$ ). Yine 24. saatte CA-4 uygulamasının, hücre canlılığını 1  $\mu\text{M}$ -2  $\mu\text{M}$  dozlarında, konsantrasyona bağlı olarak azalttığı saptandı. 48 saatlik inkübasyonda ise CA-4, tüm dozlarda hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttı ( $p<0,001$ ). Benzer şekilde, bu azalmanın 1  $\mu\text{M}$ -2  $\mu\text{M}$  dozlarında, konsantrasyona bağlı olarak gerçekleştiği gözlemlendi. 72 saatlik inkübasyonda, CA-4 tüm dozlarda hücre canlılığını %50'nin altında ve anlamlı olarak azalttı ( $p<0,001$ ). Bununla birlikte, 72. saatte hücre canlılığının inhibisyonu bakımından en kuvvetli etkinin, 5  $\mu\text{M}$  dozunda meydana geldiği saptandı ( $p<0,001$ ). Ek olarak, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde, en yüksek CA-4 dozunda (10  $\mu\text{M}$ ) hücrelerin maruz kaldığı DMSO kontrolünde, kontrol grubuna kıyasla, A549 hücrelerinin canlılığında anlamlı bir artış gözlemlendi ( $p<0,01$ ) (Şekil 4.2).

HUVEC hücrelerinde CA-4, 24 saatlik inkübasyonda, tüm dozlarda kontrole kıyasla hücre canlılığını anlamlı bir şekilde arttırdı ( $p<0,05$ ,  $p<0,001$ ). Combretastatin A-4'ün 24. saatte en yüksek proliferatif etkiyi, en yüksek konsantrasyonu olan 10  $\mu\text{M}$  dozunda gösterdiği saptandı. 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda, CA-4 uygulamasının hücre canlılığını tüm dozlarda zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde azalttığı gözlemlendi ( $p<0,001$ ). CA-4'ün, hiçbir dozda HUVEC hücrelerinin canlılığını %50'nin altına düşürmediği saptandı. Ayrıca; 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde, en yüksek CA-4 dozunda (10  $\mu\text{M}$ ) hücrelerin maruz kaldığı DMSO kontrolünde, kontrol grubuna kıyasla, HUVEC hücrelerinin canlılığında anlamlı bir artış gözlemlendi (24, 48 ve 72 için sırasıyla  $p<0,001$ ,  $p<0,001$ ,  $p<0,05$ ) (Şekil 4.2).

Combretastatin A-4'ün, MTT canlılık testi sonuçlarına benzer şekilde, HUVEC hücrelerinde hücre canlılığını A549 hücrelerine kıyasla daha az düşürdüğü saptandı. CA-4 uygulamasının akciğer kanseri hücrelerine, sağlıklı hücrelerden daha duyarlı olduğu, hatta HUVEC hücrelerinde 24 saatlik inkübasyonda hücrelerin proliferasyonunu uyardığı gözlemlendi ve dolayısıyla CA-4'ün, akciğer kanseri hücrelerine seçici olarak güçlü toksisite gösterdiği düşünülmektedir.

Plumbagin'in 24 saatlik inkübasyonunda, 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  dozlarında, hücre canlılığını konsantrasyona bağlı olarak anlamlı bir şekilde azalttığı saptandı ( $p<0,05$ ,  $p<0,001$ ). En düşük doz olan 0,1  $\mu\text{M}$  dozunda ise hücre canlılığında düşük seviyede bir artış meydana geldiği, fakat bu artışın anlamlı olmadığı belirlendi. Benzer şekilde, 48. saatte plumbagin uygulaması, 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  dozlarında, hücre canlılığını konsantrasyona bağlı

olarak anlamlı bir şekilde azalttı ( $p<0,05$ ,  $p<0,001$ ); 0,1 dozunda ise hücre canlılığında, düşük seviyede ve anlamlı bir artış gözlemlendi ( $p<0,05$ ). 72 saatlik inkübasyon süresinde plumbagin, 3  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  dozlarında, hücre canlılığını konsantrasyona bağlı olarak anlamlı bir şekilde azalttı ( $p<0,01$ ,  $p<0,001$ ). 0,1  $\mu\text{M}$  ve 1  $\mu\text{M}$  dozlarında ise A549 hücre canlılığını düşük seviyede arttırdığı belirlendi. Plumbagin hücre canlılığını, 5  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  dozlarında zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde inhibe ettiği gözlemlendi. Ayrıca bu dozlardaki plumbagin uygulaması, hücre canlılığını 48. saat itibarıyla %50'nin altına düşürdü ( $p<0,001$ ). Ek olarak, tüm inkübasyon sürelerinde, en yüksek plumbagin dozunda (10  $\mu\text{M}$ ) hücrelerin maruz kaldığı DMSO kontrolünde, kontrol grubuna kıyasla, A549 hücrelerinin canlılığında düşük seviyede ve anlamlı olmayan bir artış gözlemlendi (Şekil 4.2).

HUVEC hücrelerinde plumbagin, en düşük dozda (0,1  $\mu\text{M}$ ) tüm inkübasyon sürelerinde hücre canlılığını arttırdı. Bu etki, 48. saatte anlamlı bir şekilde meydana geldi ( $p<0,001$ ). 24 saatlik inkübasyonda plumbagin uygulamasının, 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  dozlarında hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttığı; bu azalmanın 1  $\mu\text{M}$ -5  $\mu\text{M}$  dozları arasında konsantrasyona bağlı olarak gerçekleştiği saptandı ( $p<0,001$ ). Plumbagin, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde, 3  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  dozlarında hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttı ( $p<0,001$ ). Hücre canlılığının inhibisyonunun, 3  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  dozlarında zamana bağlı bir şekilde anlamlı olarak meydana geldiği belirlendi. Plumbagin uygulamasının, HUVEC hücrelerinin canlılığını 3  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  dozlarında %50'nin altına düşürdüğü saptandı ( $p<0,001$ ). Ek olarak, 24 ve 72 saatlik inkübasyonlarda, en yüksek plumbagin dozunda (10  $\mu\text{M}$ ) hücrelerin maruz kaldığı DMSO kontrolünde, kontrol grubuna kıyasla, HUVEC hücrelerinin canlılığında anlamlı olmayan bir artış gözlemlendi. Bu etki 48. saatte istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0,001$ ) (Şekil 4.2).

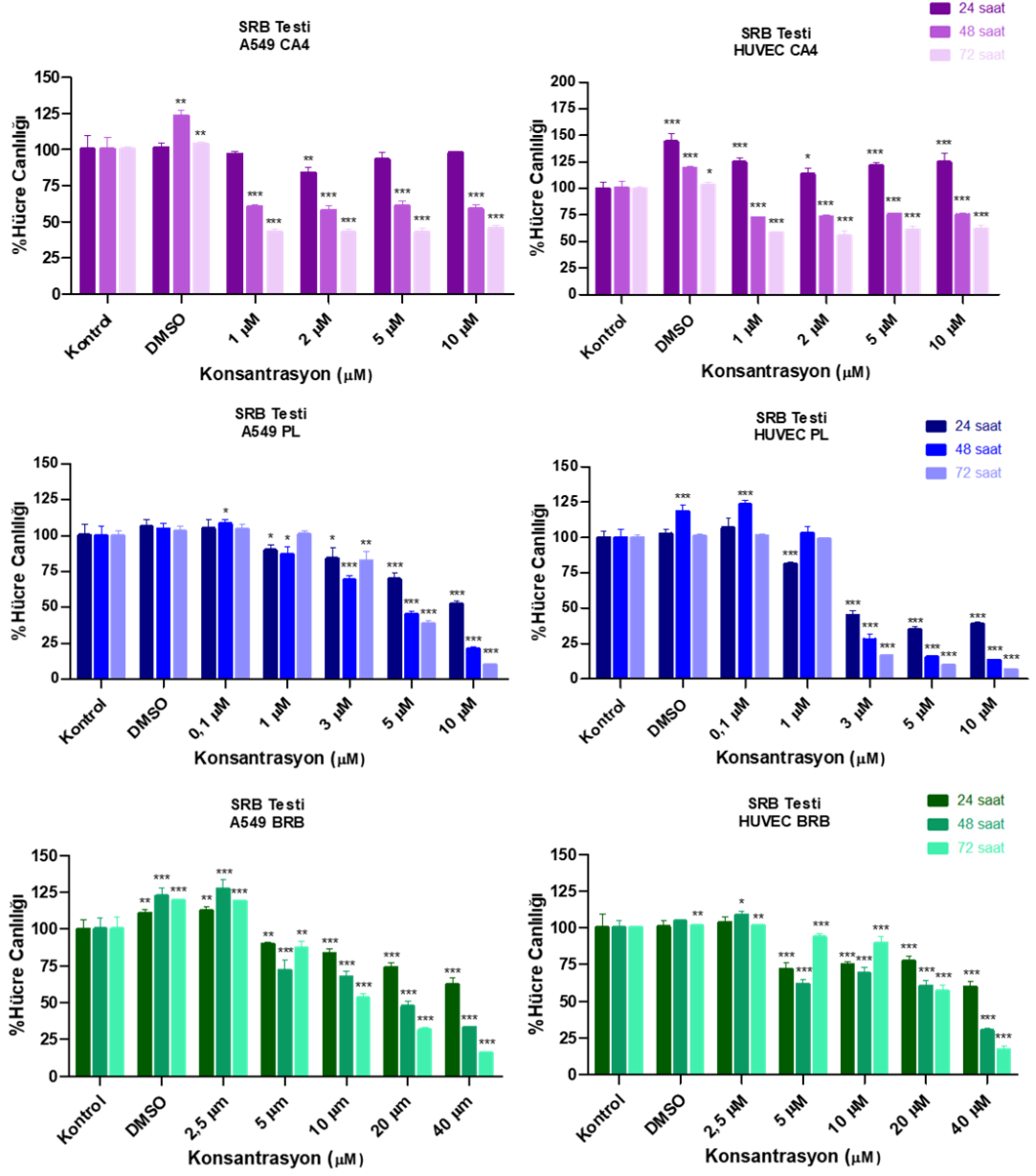
Plumbagin, A549 hücrelerinin canlılığını, MTT hücre canlılık testi sonuçlarıyla paralel bir şekilde, yüksek dozlarda daha kuvvetli inhibe etti. MTT analizinin aksine, SRB hücre canlılık testinde plumbagin uygulamasının, en düşük dozda hücrelerde canlılığı düşük seviyede arttırdığı gözlemlendi. Benzer şekilde HUVEC hücrelerinde plumbagin, yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığını daha fazla azalttı. Bu inhibisyonun MTT hücre canlılık testine kıyasla, SRB testinde daha kuvvetli olduğu gözlemlendi.

Berbamin uygulaması, A549 hücrelerinin canlılığını kontrol grubuna kıyasla, yüksek dozlarda anlamlı olarak azalttı (10, 20 ve 40  $\mu\text{M}$  için  $p<0,001$ ). 24 saatlik inkübasyonda berbaminin, 5

$\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  ve 40  $\mu\text{M}$  dozlarında, hücre canlılığını konsantrasyona bağlı olarak anlamlı bir şekilde azalttığı ( $p<0,01$  ve  $p<0,001$ ); en düşük konsantrasyon olan 2,5  $\mu\text{M}$  dozunda ise hücre canlılığını düşük seviyede de olsa anlamlı bir şekilde arttırdığı saptandı ( $p<0,01$ ). Benzer şekilde, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde berbamin uygulaması, 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  ve 40  $\mu\text{M}$  dozlarında, hücre canlılığını konsantrasyona bağlı olarak anlamlı bir şekilde azaltırken ( $p<0,01$  ve  $p<0,001$ ); 2,5  $\mu\text{M}$  dozunda hücre canlılığını kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı saptandı ( $p<0,001$ ). Sonuç olarak berbaminin, en düşük dozda hücre canlılığına proliferatif bir etkide bulunduğu gözlemlendi. Berbamin uygulamasının, 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  ve 40  $\mu\text{M}$  dozlarında, hücre canlılığını doza ve zamana bağlı olarak azalttığı saptandı ( $p<0,001$ ). Ayrıca berbaminin, 20  $\mu\text{M}$  ve 40  $\mu\text{M}$  dozlarında, hücre canlılığını %50'nin altında azalttığı belirlendi. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde, en yüksek berbamin dozunda (40  $\mu\text{M}$ ) hücrelerin maruz kaldığı DMSO kontrolünde, kontrol grubuna kıyasla, A549 hücrelerinin canlılığında anlamlı bir artış gözlemlendi (24 saat için  $p<0,01$ ; 48 ve 72 saat için  $p<0,001$ ) (Şekil 4.2).

HUVEC hücrelerinde berbamin uygulaması, en düşük dozda (2,5  $\mu\text{M}$ ), tüm inkübasyon sürelerinde hücre canlılığını arttırdı. Bu etki, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0,05$ ,  $p<0,01$ ). 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  ve 40  $\mu\text{M}$  dozlarında berbamin uygulamasının, tüm inkübasyon sürelerinde HUVEC hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttığı saptandı ( $p<0,001$ ). Berbamin uygulamasının hücre canlılığını, yalnızca en yüksek konsantrasyonda (40  $\mu\text{M}$ ) %50'nin altında azalttığı belirlendi ( $p<0,001$ ). Berbamin uygulamasının, 20  $\mu\text{M}$  ve 40  $\mu\text{M}$  dozlarında hücre canlılığını, doza ve zamana bağlı olarak azalttığı saptandı ( $p<0,001$ ). Ayrıca, 72 saatlik inkübasyonda, en yüksek berbamin dozunda (40  $\mu\text{M}$ ) hücrelerin maruz kaldığı DMSO kontrolünde, kontrol grubuna kıyasla, HUVEC hücrelerinin canlılığında anlamlı bir artış gözlemlendi ( $p<0,01$ ) (Şekil 4.2).

Berbamin uygulaması, HUVEC hücrelerinde yalnızca 40  $\mu\text{M}$  dozunda hücre canlılığını %50'nin altına düşürürken; A549 hücrelerinde 20  $\mu\text{M}$  ve 40  $\mu\text{M}$  dozlarında bu etkiyi gerçekleştirdi. Berbamin uygulaması, A549 hücrelerinde 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  ve 40  $\mu\text{M}$  dozlarında, HUVEC hücrelerine kıyasla hücre canlılığını daha fazla inhibe etti; ancak MTT canlılık testi analizindeki kadar kuvvetli bir etki gözlenmedi.



**Şekil 4.2:** A549 ve HUVEC hücre hatlarında Combretastatin A-4 (CA-4), plumbagin (PL), berbamin (BRB) maddeleriyle 24, 48 ve 72 saatlik tedavi sonrası SRB testi ile belirlenen hücre canlılık değerleri. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; kontrole göre anlamlılık değerleri.

#### 4.1.2. Tüp Oluşumu Sonuçları

HUVEC hücreleri, Combretastatin A-4 (1 ve 5  $\mu$ M), plumbagin (1 ve 3  $\mu$ M) ve berbamin (5 ve 10  $\mu$ M) maddeleri ile süspanse edilerek, matrigel içerisine ekildi ve 10 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda, hücreler mikroskop yardımıyla fotoğraflandı ve tüp benzeri yapıların oluşumu analiz edildi (Şekil 4.4). HUVEC hücrelerinde tüp oluşumu; düğüm sayısı, bağlantı noktası (çatallanma oluşturan düğüm gruplarının sayısı), ağların sayısı (tüp benzeri yapıların oluşturduğu ağların sayısı), toplam uzunluk ve toplam dallanmaların uzunluğu parametreleri üzerinden değerlendirildi.

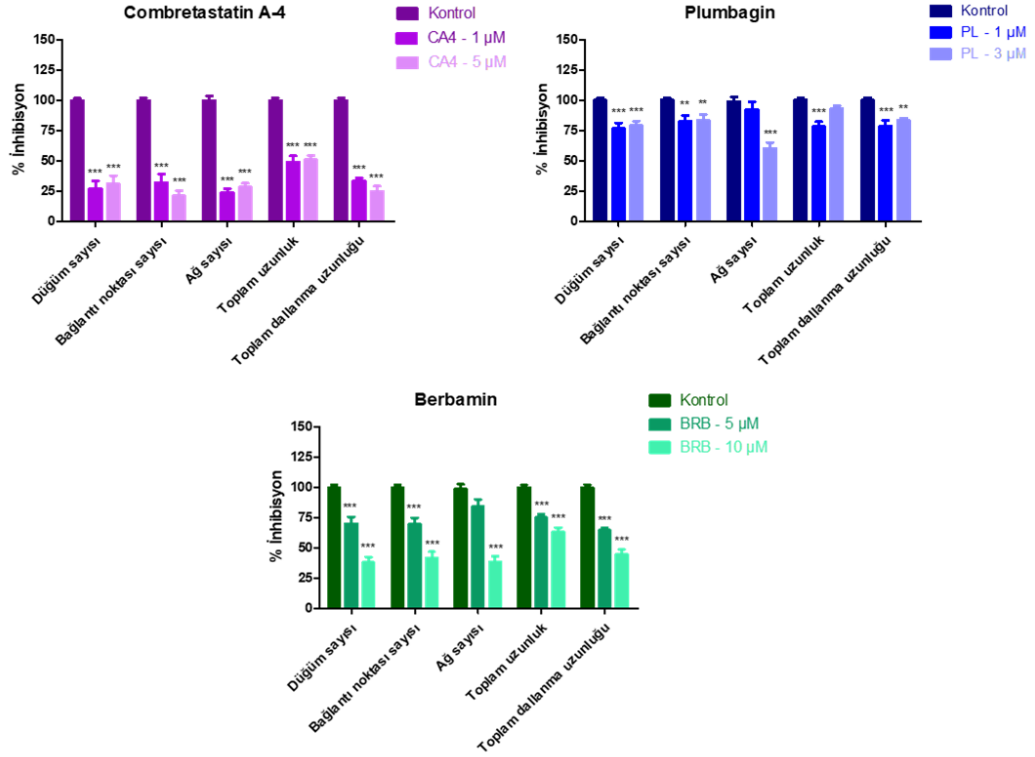
Combretastatin A-4'ün, HUVEC hücrelerinde tüp oluşumunu, kontrole kıyasla her iki konsantrasyonda da istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe ettiği saptandı ( $p<0,001$ ). Dikkat çekici şekilde CA-4, hücre düğümlerinin oluşumunu, kontrole kıyasla 1 ve 5  $\mu$ M dozlarında sırasıyla %27 ve %31 oranlarında baskıladı. Benzer şekilde CA-4'ün, HUVEC hücrelerinin oluşturduğu tüp benzeri ağların sayısını, düşük dozda kontrole kıyasla daha kuvvetli olarak baskıladığı saptandı ( $p<0,001$ ). Aynı zamanda, tüp benzeri yapılar, dallanmalar dahil olmak üzere hücresel yapıların toplam uzunluğu, CA-4 tarafından önemli derecede azaltıldı ( $p<0,001$ ). CA-4'ün tüm parametreler göz önüne alındığında, tüp benzeri yapıların oluşumunu %50 ve daha altında bir oranda inhibe ettiği tespit edildi (Şekil 4.3).

Plumbagin, HUVEC hücrelerinde tüp oluşumunu, kontrole göre anlamlı bir şekilde inhibe ettiği saptandı. Plumbagin tedavisi hücre düğümlerinin oluşumunu ( $p<0,001$ ) ve tüp benzeri yapılar oluşturmak üzere çatallanan düğüm gruplarının sayısını (bağlantı noktası sayısı) ( $p<0,01$ ), anlamlı olarak inhibe etti. Plumbagin uygulamasının, tüp benzeri ağların sayısını, doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği saptandı. Bu inhibisyon, düşük dozda (1  $\mu$ M) anlamlı bulunmazken, yüksek dozda (3  $\mu$ M) istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulundu ( $p<0,001$ ). Ayrıca plumbagin, hücresel yapıların toplam uzunluğunu, 1  $\mu$ M dozunda anlamlı olarak inhibe etti ( $p<0,001$ ). Parametreler göz önüne alındığında, plumbagin tedavisinin, HUVEC hücrelerinde tüp benzeri yapıların oluşumunu azalttığı, ancak herhangi bir dozda tüp oluşumunu %50 oranında inhibe etmediği gözlemlendi (Şekil 4.3).

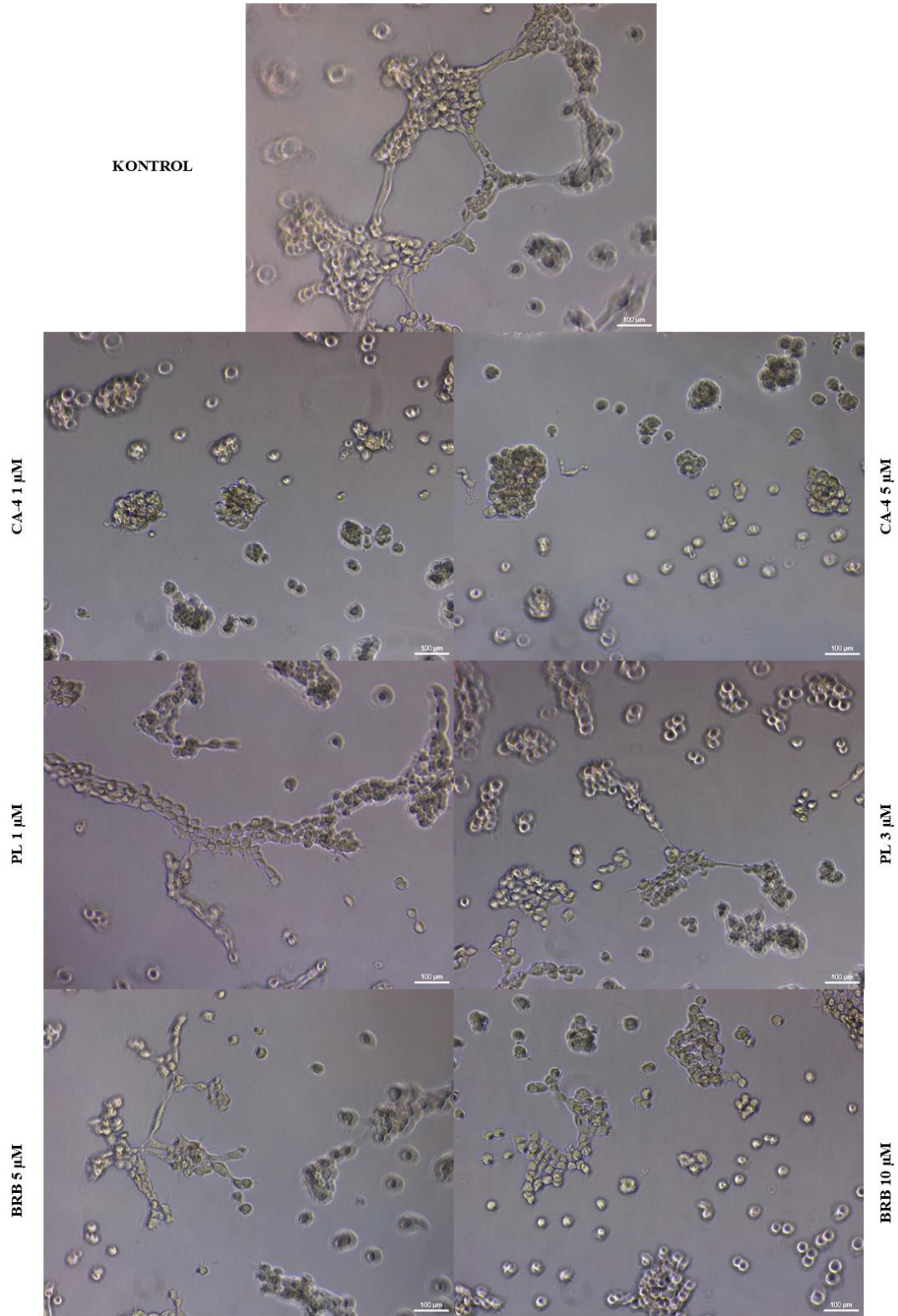
Berbaminin, HUVEC hücrelerinde tüp oluşumunu, kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde inhibe ettiği belirlendi. Berbamin tedavisinin, hücre düğümlerinin oluşumunu doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde inhibe ettiği saptandı ( $p<0,001$ ). Benzer şekilde, tüp benzeri yapılar

oluşturmak üzere çatallanan düğüm gruplarının sayısı (bağlantı noktası sayısı), berbamin uygulamasıyla doza bağlı olarak azaldı ( $p<0,001$ ). Bu parametrelerin inhibisyonunun, yüksek dozdaki berbamin tedavisiyle ( $10\ \mu\text{M}$ ) %50'nin altında gerçekleştiği tespit edildi. Berbamin tedavisi, tüp benzeri ağların sayısını  $5\ \mu\text{M}$  dozunda düşük seviyede;  $10\ \mu\text{M}$  dozunda ise kuvvetli bir şekilde ve anlamlı olarak inhibe etti ( $p<0,001$ ). Berbamin, hücrel yapıların toplam uzunluğunu, doza bağlı bir şekilde anlamlı olarak inhibe etti ( $p<0,001$ ). Tüm parametreler göz önüne alındığında, berbamin tedavisinin HUVEC hücrelerinde tüp oluşumunu inhibe ettiği ve bu inhibisyonun doza bağlı olarak gerçekleştiği belirlendi (Şekil 4.3).

Tüm bu bulgular göz önüne alındığında, HUVEC hücrelerinde tüp oluşumunun inhibisyonu bakımından en etkili doğal biyoaktif bileşiğin CA-4 olduğu düşünülmektedir.



**Şekil 4.3:** Combretastatin A-4 (CA-4; 1 ve 5  $\mu\text{M}$ ), plumbagin (PL; 1 ve 3  $\mu\text{M}$ ) ve berbamin (BRB; 5 ve 10  $\mu\text{M}$ ) maddelerinin HUVEC hücre hattında 10 saat tedavi sonucu tüp oluşumu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi. \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ ; kontrole göre anlamlılık değerleri.



**Şekil 4.4:** HUVEC hücre hattında Combretastatin A-4 (CA-4; 1 ve 5  $\mu$ M), plumbagin (PL; 1 ve 3  $\mu$ M) ve berbamin (BRB; 5 ve 10  $\mu$ M) maddeleriyle 10 saat tedavi sonucu tüp oluşumu. Fotoğraflar, invert ışık mikroskobu ile 10X büyütmede çekildi. Bar: 100  $\mu$ m.

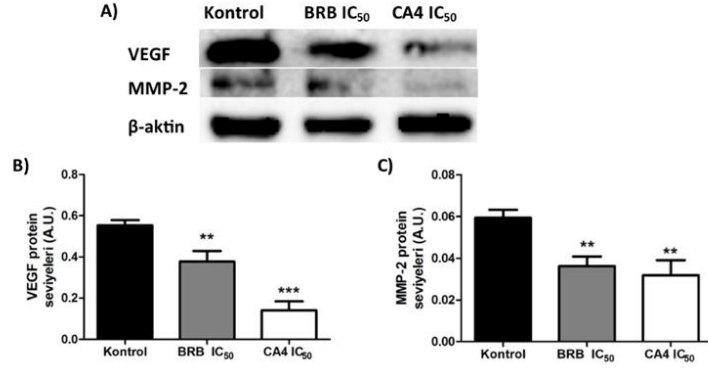
#### 4.1.3. Western Blot Sonuçları

A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleri,  $IC_{50}$  dozlarında Combretastatin A-4 (5  $\mu$ M), plumbagin (10  $\mu$ M) ve berbamin (10  $\mu$ M) ile tedavi edilerek inkübe edildi (inkübasyon süreleri plumbagin için 24, berbamin ve CA-4 için 48 saattir). İnkübasyon sürelerinin sonunda, hücre lizatlarının protein miktarının belirlenmesi için BSA kullanılarak standart eğri grafiği hazırlandı ve örneklerin konsantrasyonları bu grafiğe göre belirlendi. Western blot analizi, deney grupları için 30  $\mu$ g protein lizati kullanılarak gerçekleştirildi. Yöntemde, doğal biyoaktif bileşiklerin A549 hücrelerindeki anjiyogenik faktörlerin ekspresyonu üzerine etkilerini değerlendirmek için MMP-2 ve VEGF-A antikorları ve kontrol olarak beta-aktin antikoru kullanıldı.

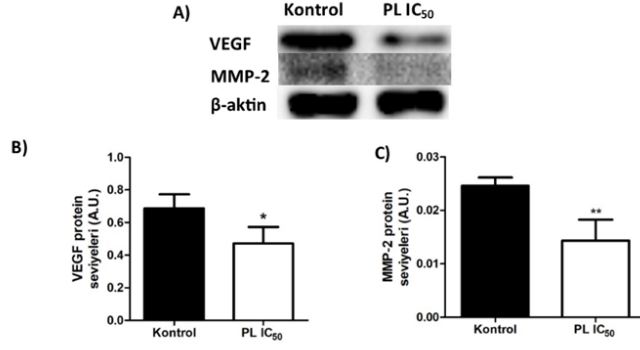
CA-4 tedavisinin, A549 hücrelerinde VEGF-A'nın ifadesini anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edildi ( $p<0,001$ ). Benzer şekilde, plumbagin uygulamasının, hücrelerde VEGF-A ekspresyonunu anlamlı olarak inhibe ettiği gözlemlendi ( $p<0,05$ ). Berbamin tedavisinin, A549 hücrelerinde kontrole kıyasla, VEGF-A proteininin ifadesini anlamlı bir şekilde inhibe ettiği saptandı ( $p<0,01$ ) (Şekil 4.5) (Şekil 4.6).

CA-4 tedavisi, hücrelerde MMP-2'nin ifadesini, kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe etti ( $p<0,01$ ). Plumbagin uygulaması, hücrelerde MMP-2 ifadesinin anlamlı bir şekilde inhibisyonuyla sonuçlandı ( $p<0,01$ ). Benzer şekilde berbamin tedavisinin, A549 hücrelerinde kontrole kıyasla, MMP-2 proteininin ekspresyonunu anlamlı olarak azalttığı gözlemlendi ( $p<0,01$ ). Ayrıca, CA-4'ün, plumbagin ve berbamine kıyasla, A549 hücrelerindeki VEGF-A ifadesi daha kuvvetli bir şekilde azalttığı gözlemlendi (Şekil 4.5) (Şekil 4.6).

CA-4, plumbagin ve berbamin ile tedavinin, akciğer kanseri hücrelerinde VEGF-A ve MMP-2 ifadelerini inhibe ettiği tespit edildi. Bu bulgular, doğal biyoaktif bileşiklerin VEGF ile uyarılan ve MMP-2'nin rol oynadığı anjiyogenezin inhibisyonunda etkili olduğunu göstermektedir.



**Şekil 4.5:** A549 hücrelerinde Combretastatin A-4 (CA-4; 5 µM) ve berbamin (BRB; 10 µM) maddeleriyle tedavinin VEGF-A ve MMP-2 ifadeleri üzerine etkilerinin belirlenmesi. A) Protein bantları. Beta-aktine oranlama yapılarak belirlenen B) VEGF-A ve C) MMP-2 proteinlerinin seviyeleri. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001; beta-aktine (kontrol) göre anlamlılık değerleri.



**Şekil 4.6:** A549 hücrelerinde plumbagin (PL; 10 µM) maddesiyle tedavinin VEGF-A ve MMP-2 ifadeleri üzerine etkilerinin belirlenmesi. A) Protein bantları. Beta-aktine oranlama yapılarak belirlenen B) VEGF-A ve C) MMP-2 proteinlerinin seviyeleri. \*p<0,05, \*\*p<0,01; beta-aktine (kontrol) göre anlamlılık değerleri.

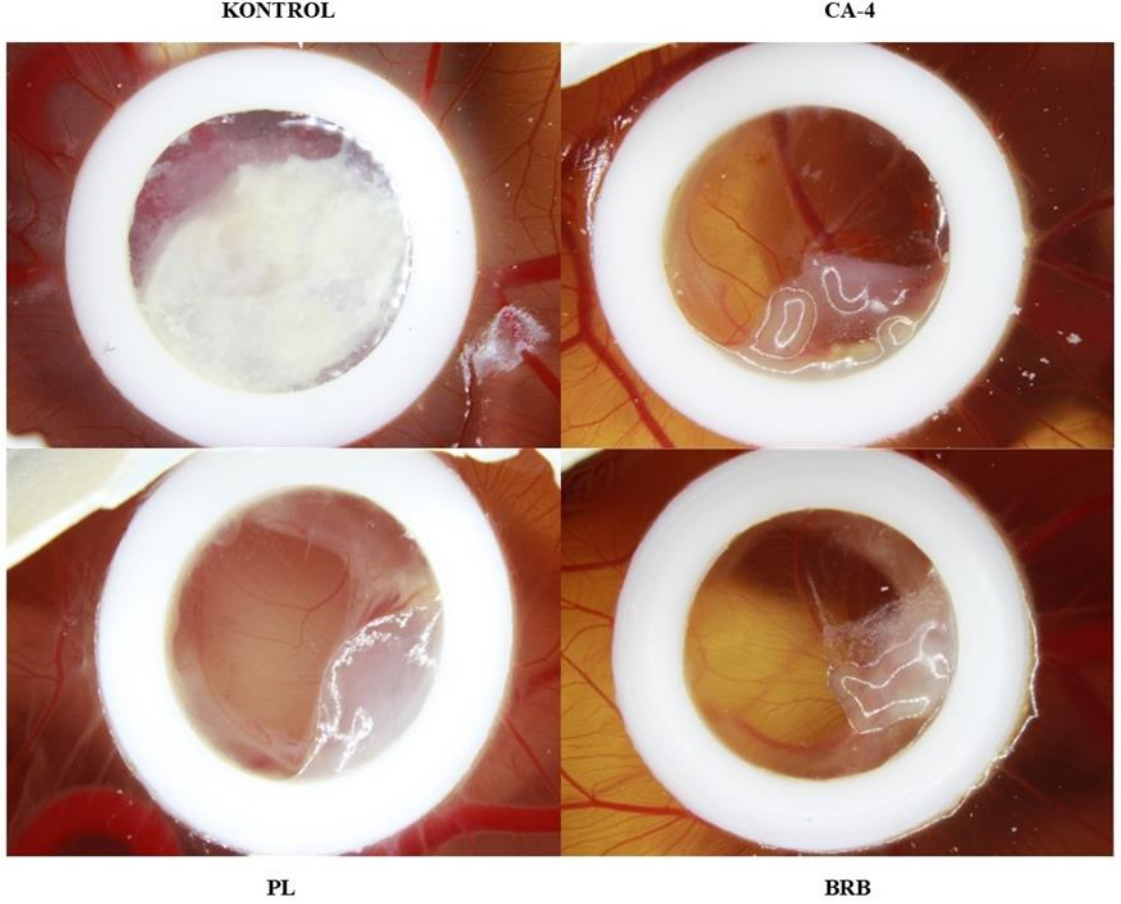
## 4.2. *İN VİVO* BULGULAR

### 4.2.1. Tümör Anjiyogenezi CAM Analizi

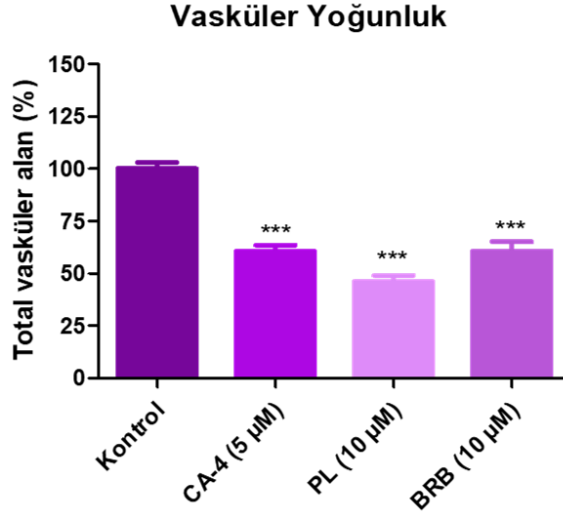
Embriyonik gelişimlerinin (ED) 9. gününde, kuluçkalık civciv yumurtalarının CAM alanına matrigel içerisinde, IC<sub>50</sub> dozlarında Combretastatin A-4 (5 µM), plumbagin (10 µM) ve berbamin (10 µM), A549 hücreleri ile süspanse edilerek uygulandı. 72 saatlik inkübasyondan sonra, ED-12. günde, yumurtalar bir stereomikroskop yardımıyla fotoğraflandı ve vasküler yoğunluk parametresi üzerinden analiz edildi (Şekil 4.7).

Combretastatin A-4, plumbagin ve berbamin ile tedavi edilen kuluçkalık yumurtalarda, vasküler yoğunluğun kontrole kıyasla önemli derecede inhibe edildiği saptandı (p<0,001). Bu

bulgu, biyoaktif maddelerin A549 hücrelerindeki sitotoksik aktivite sonuçlarıyla da paralel bulundu. CA-4, plumbagin ve berbamin maddelerinin, A549 hücreleriyle oluşturulan tümörün anjiyogenezini inhibe ettiği tespit edildi (Şekil 4.8).



**Şekil 4.7:** *In vivo* CAM yöntemiyle A549 hücreleriyle tümör oluşturulan kuluçkalık yumurtalarda Combretastatin A-4 (CA-4; 5  $\mu$ M), plumbagin (PL; 10  $\mu$ M) ve berbamin (BRB; 10  $\mu$ M) tedavisi. Fotoğraflar, fotoğraf makinesi bağlı stereomikroskop ile 7.80X büyütmede, kuluçkalık yumurtaların embriyonik gelişimlerinin 12. gününde çekildi.

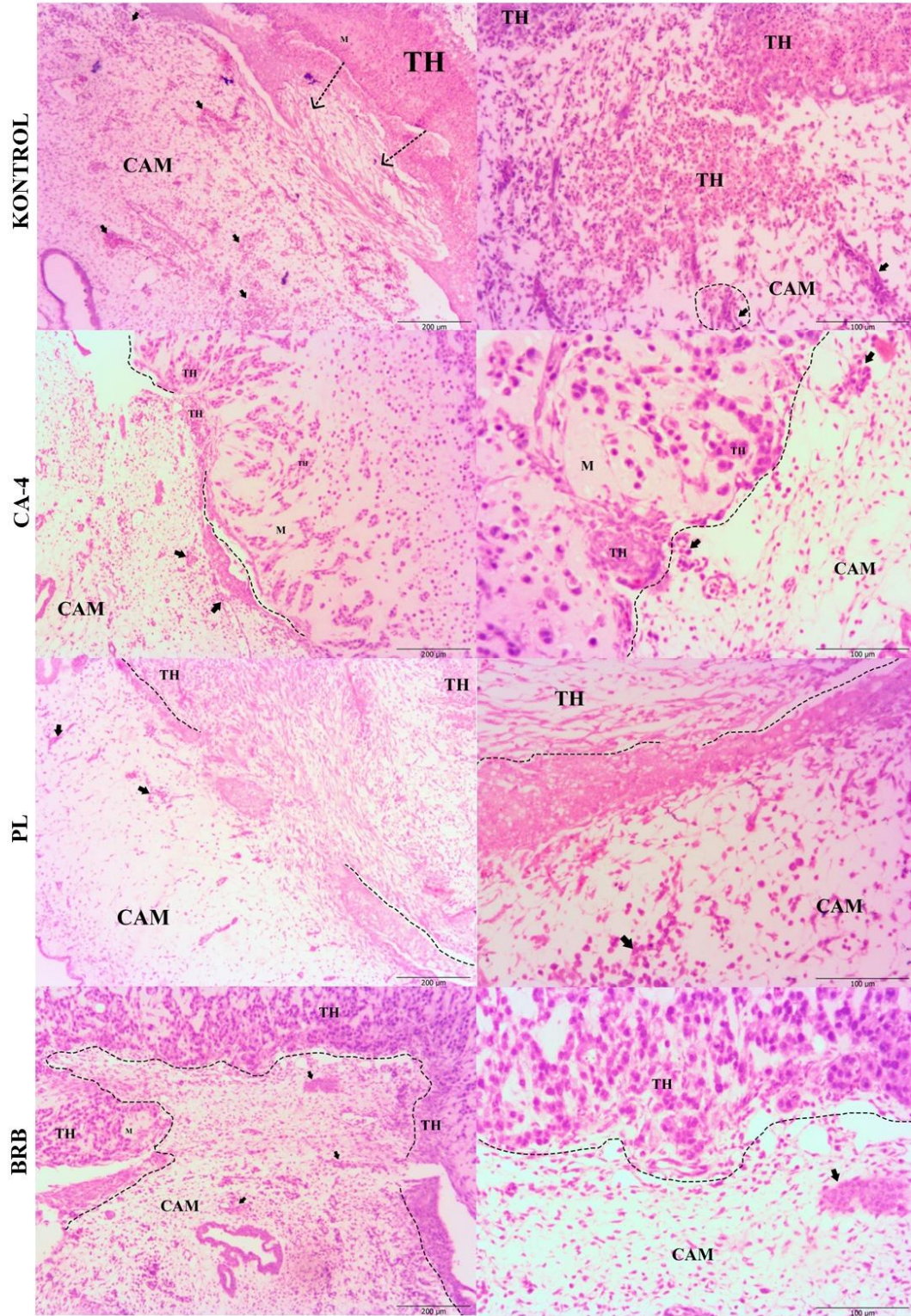


**Şekil 4.8:** *İn vivo* CAM yöntemiyle A549 hücreleriyle tümör oluşturulan kuluçkalık yumurtalarda Combretastatin A-4 (CA-4; 5 µM), plumbagin (PL; 10 µM) ve berbamin (BRB; 10 µM) tedavisinin tümör anjiyogenezi üzerine etkileri. \*\*\*p<0,001; kontrole göre anlamlılık değeri.

#### 4.2.2. Histolojik Bulgular

Tümör dokuları, histolojik takipten geçirilerek, Hematoksilen & Eosin ile boyandı ve fotoğraflandı.

Kontrol grubunda, matrigel içerisindeki tümör hücrelerinin yoğunlukta olduğu görüldü. Tümör hücrelerinin CAM alanına kitleler halinde invazyonu gözlemlendi. Ayrıca kontrol grubunda, çok sayıda kan damarlarının varlığı tespit edildi. CA-4, plumbagin ve berbamin olmak üzere tedavi gruplarında, kontrol grubuna kıyasla matrigel içerisindeki tümör hücrelerinin daha az yoğunlukta olduğu saptandı. Bu bulgu, A549 hücrelerinde gerçekleştirilen MTT ve SRB hücre canlılık testleri ile paralellik göstermektedir. Tedavi gruplarında, CAM alanına geçen tümör hücrelerinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde seyrek olduğu ve membran boyunca yayılma göstermediği tespit edildi. Bu sonuçlar, vasküler alan analizi bulgularıyla uyumlu bulundu. Ayrıca kontrol grubuna kıyasla, tedavi gruplarında CAM alanı ve tümör kitlesi arasındaki alan daha belirgindi ve invaziv bölgeler önemli ölçüde azdı (Şekil 4.9). Bu bulgular, akciğer kanseri hücreleri ile tümör oluşturulmasının başarılı olarak gerçekleştiğini, CA-4, plumbagin ve berbamin ile tedavi edilen tümörlerin yeni damar oluşumu süreci olan anjiyogenezi kontrol grubuna kıyasla inhibe ettiğini, tümör hücrelerinin CAM alanına invazyonunu baskıladığını göstermektedir.



**Şekil 4.9:** *In vivo* CAM yöntemiyle A549 hücreleriyle tümör oluşturulan kuluçkalık yumurtalarda Combretastatin A-4 (CA-4; 5 µM), plumbagin (PL; 10 µM) ve berbamin (BRB; 10 µM) tedavisinin tümör anjiyogenezi üzerine etkilerinin Hematoksilen-Eozin boyamasıyla belirlenmesi. TH: Tümör hücreleri, siyah oklar: CAM alanına geçiş yapan tümör hücreleri, kesikli çizgili yuvarlak: Yoğun tümör hücre kitlesi, M: Matrigel, kesikli çizgi: CAM ile tümör kitlesi arasında kalan alan. Bar: 100 µm ve 200 µm. ]

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

[Kanser; yılda yaklaşık 2,6 milyon vakayla, dünya çapında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci ölüm nedeni olan yaygın bir sağlık sorunudur (Millimouno ve diğ., 2014; Hazafa ve diğ., 2019). Dünya çapında, kanser tipleri arasında en sık görülen ve ölüm oranlarının en yüksek olduğu akciğer kanserini; ikinci sırada meme kanseri, üçüncü sırada ise kolorektal kanser takip etmektedir (Torre ve diğ., 2016; Hazafa ve diğ., 2019). Kanser metastazı ve dolayısıyla tümörün yayılmasında en kilit rolü oynayan faktör, anjiyogenez sürecidir (Al-Ostoot ve diğ., 2021; Fakhri ve diğ., 2021). Hipoksi, iskemi, inflamasyon ve karsinogenez gibi patolojik koşullar, pro-anjiyogenik faktörlerin yukarı düzenlenmesi için bir uyarıcı görevi görür ve anjiyogenezin kontrolden çıkmasıyla sonuçlanır (Bergers ve Benjamin, 2003; Ribatti, 2008; Khalid ve diğ., 2016; Viallard ve Larrivé, 2017). Kanser hastalığı, genellikle uzun bir tedavi süreci gerektirmektedir. Yan etki profili ve doza bağlı direnç gibi faktörler nedeniyle kemoterapi ve radyoterapinin etkinliğinin sınırlı olması, kanser tedavisinde yeni bir potansiyel terapiye duyulan ihtiyacı arttırmaktadır. Anjiyogenezin tümör büyümesi, invazyonu ve metastazındaki kilit rolü göz önüne alındığında, tümör büyümesini, tümörlerde damarlanmayı bozarak baskılayan anti-anjiyogenik tedaviler umut vadetmektedir (Fakhri ve diğ., 2021). Bu bilgilerden yola çıkarak tez kapsamında, Combretastatin A-4, plumbagin, berbamin, silibinin ve lentinan doğal biyoaktif bileşiklerinin, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı A549 ve insan umbilikal ven endotel hücre (HUVEC) hattı üzerindeki sitotoksik etkinliği, CA-4, plumbagin ve berbamin doğal biyoaktif bileşiklerinin HUVEC hücrelerinin tüp oluşturması üzerindeki ve A549 hücrelerinde VEGF-A ve MMP-2 gibi anjiyogenik faktörlerin ifadesi üzerindeki etkinlikleri *in vitro* yöntemlerle; CA-4, plumbagin ve berbamin doğal biyoaktif maddelerinin tümör anjiyogenezi üzerindeki etkileri ise *in vivo* yöntem kullanılarak araştırıldı.

Bu tez kapsamında, Combretastatin A-4 (1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M), plumbagin (0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 5  $\mu$ M ve 10  $\mu$ M), berbamin (2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M ve 40  $\mu$ M), silibinin (10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M) ve lentinan (20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 160  $\mu$ M, 240  $\mu$ M, 320  $\mu$ M) doğal biyoaktif bileşiklerinin, A549 ve HUVEC hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla, MTT hücre canlılık testi kullanıldı. MTT testinin sonuçları değerlendirilerek, akciğer kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etkinlik gösteren Combretastatin A-4, plumbagin ve berbamin doğal biyoaktif maddeleriyle diğer çalışmalara

devam edildi ve bu maddelerin HUVEC ve A549 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri, SRB hücre canlılık testi ile doğrulandı.

Su ve diğ. (2016a) tarafından yapılan çalışmada, A549 hücre hattında Combretastatin A-4'ün 1, 5, 10, 50, 100 nM konsantrasyonlarındaki sitotoksik etkinliği MTT testi ile belirlenmiştir. Çalışmada, 48 saatlik inkübasyonda CA-4'ün hücre canlılığını doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği, ancak hiçbir dozun, hücre canlılığını %50 ve altında azaltmadığı gözlenmiştir. Zhu ve diğ. (2010) MTT testini kullanarak, bir CA-4 türevi olan 4-(4-metoksifenil)-5-(3,4,5-trimetoksifenil)-1H-pirazol-3-amin (XN0502)'nin, 2-10  $\mu\text{M}$  dozlarında A549 hücrelerinin canlılığını 72 saatlik inkübasyonda inhibe ettiğini saptamıştır. Çalışmada,  $\text{IC}_{50}$  değeri 1,8 ( $\pm 0.6$ )  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir. Boehle ve diğ. (2001), CA-4P'nin, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hatlarındaki (Colo-699 ve KNS-62) sitotoksik etkinliğini, EZ4U hücre canlılık kitini kullanarak belirlemişlerdir. CA-4P'nin  $10^{-8}$ - $10^{-4}$  mol/L dozlarına 3 saat boyunca maruz kalan KNS-62 hücrelerinin canlılığı,  $10^{-4}$  mol/L dozunda %31 oranında azalırken; Colo-699 hücrelerinin canlılığı  $10^{-5}$  mol/L dozunda %21 oranında azalmıştır. Ayrıca, iki hücre hattında da düşük dozların hücre canlılığında anlamlı bir inhibisyona neden olmadığı rapor edilmiştir. CA-4P dozlarının bu hücrelere 24 saatlik tedavisinde ise en düşük dozun ( $10^{-8}$  mol/L), Colo-699 ve KNS-62 hücrelerinin canlılığını sırasıyla %39 ve %31 oranında; daha yüksek konsantrasyonların ise sırasıyla %55 ve %46 oranında inhibe ettiği saptanmıştır. CA-4 ile ilgili literatürdeki çalışmalar, CA-4'ten türetilen sentetik bileşiklere odaklanmıştır. Bunun sebebi, CA-4 türevlerinin biyoyararlanımının daha yüksek, suda çözülebilen ve daha kararlı bileşikler olmalarıdır. Çalışmamızda A549 hücre hattında, her iki yöntemde de, CA-4'ün doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı ve 72. saatte hücre canlılığını %50'nin altına düşürdüğü saptandı. Bu açıdan sonuçlarımız, literatürle uyumludur. Öte yandan, Su ve diğ. (2016a), 5-100 nM dozlarında CA-4'ün, hücre canlılığını doza bağlı bir şekilde inhibe ettiğini, ancak hiçbir dozun, hücre canlılığını %50 ve altında bir oranla azaltmadığını rapor etmişlerdir. Bunun nedeni, çalışmamıza kıyasla daha düşük CA-4 dozlarının uygulanması olabilir.

Grosios ve diğ. (1999) tarafından yapılan çalışmada, CA-4'ün ve suda çözülen ön ilaç formu Combretastatin A-4 fosfatın (CA-4P) HUVEC hücrelerindeki sitotoksik etkinliği, nötral kırmızı boyama yöntemi ile incelenmiştir. 0,31  $\mu\text{M}$  ve 0,40  $\mu\text{M}$  dozlarında CA-4 ve CA-4P'ye 24 saat maruz kalan hücrelerin canlılığının kontrole kıyasla, sırasıyla %68,3 ve %63,1'e düştüğü bildirilmiştir. Deng ve diğ. (2020), CA-4P'nin HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik

etkinliğini, CCK-8 testini kullanarak değerlendirmiştir. 12, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerince 0,001-1000 ng/ml dozları arasında CA-4P'ye maruz bırakılan hücrelerin canlılığının, 0,1 ng/mL ve daha yüksek dozlarda azaldığı, ancak %50'ye düşmediği tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada (Yavvari ve diğ., 2022), CA-4P'nin HUVEC hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri, 2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS) hücre canlılık testi ile belirlenmiştir. CA-4P'nin 0,5-10 ng/ml dozları HUVEC hücrelerine uygulanarak, 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. CA-4P'nin, hücre canlılığını doza bağlı olarak inhibe etse de hiçbir dozda %50'ye düşürmediği rapor edilmiştir. Porcù ve diğ. (2013) yaptıkları çalışmada, tripan mavisini boyama yöntemini kullanarak CA-4'ün HUVEC hücreleri üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Hücreler, CA-4'ün 10-1000 nM dozlarına 24, 48 ve 72 saat boyunca maruz bırakılmıştır. 10 nM dozunda, 24 saatlik inkübasyonda CA-4'ün hücre canlılığını, kontrole kıyasla yaklaşık %45 oranında inhibe ettiği saptanmıştır. Vincent ve diğ. (2005), HUVEC hücrelerine CA-4P'nin 5-50 nM arasındaki dozlarını uygulayarak 12, 24, 36 ve 48 saatlik inkübasyonun ardından tripan mavisini boyama yöntemini kullanarak sitotoksik etkinliğini incelemişler ve 20, 30 40 ve 50 nM dozlarındaki CA-4P tedavisinin, HUVEC hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Yukarıda da bahsedildiği üzere, CA-4 ile ilgili literatürdeki çalışmalar, CA-4'ten türetilen ve biyoyararlanımı daha yüksek, suda çözülebilen ve daha kararlı olan sentetik bileşiklere odaklanmıştır. Bu tez kapsamında, CA-4 uygulamasının hücre canlılığını tüm dozlarda zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde azalttığı; ancak hiçbir dozda HUVEC hücrelerinin canlılığını %50'nin altına düşürmediği saptanmıştır. Bu açıdan sonuçlarımız, literatürle uyumludur.

Tripathi ve diğ. (2020) tarafından yapılan çalışmada, A549 hücre hattında, plumbagin'in 1  $\mu$ M-6  $\mu$ M dozları ile 24 saatlik inkübasyon sonundaki sitotoksik etkinlik MTT testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Buna göre plumbagin, doza bağlı olarak A549 hücrelerinin canlılığını inhibe etmiştir. Panda ve diğ. (2020) tarafından yapılan bir başka çalışmada, plumbagin'in akciğer kanseri hücreleri üzerindeki inhibisyon etkisi, MTT testi ile incelenmiştir. Çalışmada plumbagin 2-10  $\mu$ M dozları arasında, A549 hücrelerine uygulanmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. Sonuçlar, plumbagin'in hücre canlılığını doza bağlı bir şekilde azalttığını göstermiştir. Xu ve diğ. (2013) tarafından yapılan çalışmada, CCK-8 kitini kullanarak, 3  $\mu$ M-19  $\mu$ M dozlarındaki plumbagin uygulamasının, 24 saatlik inkübasyonda A549 hücrelerinin canlılığını doza bağlı olarak inhibe ettiği bildirilmiş,  $IC_{50}$  değeri ise 10,3  $\mu$ M olarak belirlenmiştir. Gomathinayagam ve diğ. (2008) MTT testini kullanarak, A549 hücrelerinde 3-

15  $\mu\text{M}$  dozları arasında 24 saatlik plumbagin tedavisinin, hücre canlılığını doza bağlı olarak azalttığını rapor etmişlerdir. Çalışmada, plumbagin uygulamasının 9  $\mu\text{M}$  dozunda hücre canlılığını %55; 12  $\mu\text{M}$  dozunda ise %33 inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu tez kapsamında plumbagin, A549 hücre canlılığını doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde azalttığı saptanmıştır. Bu açıdan sonuçlarımız, literatürle uyumludur. Ayrıca çalışmamızda, MTT ve SRB yöntemleri kullanılarak uygulanan 10  $\mu\text{M}$  dozundaki plumbagin, hücre canlılığını zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde inhibe ettiği ve %50'nin altına düşürdüğü gözlenmiştir. Sonuçlar, Xu ve diğ. (2013) ve Gomathinayagam ve diğ. (2008) tarafından yapılan çalışmalarla paralel bulunmuştur.

Lai ve diğ. (2012) tarafından yapılan çalışmada, plumbagin HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinliği, MTS hücre canlılık testi kullanılarak değerlendirilmiştir. 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  dozlarındaki 72 saatlik plumbagin tedavisinin, hücre canlılığını doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir. Çalışmada, HCT116 (kolon) ve PC-3 (prostat) olmak üzere kanser hücrelerinde, aynı dozlardaki plumbagin tedavisi de gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, HUVEC hücrelerinin plumbagine, kanser hücrelerine kıyasla daha duyarlı olduğunu göstermiştir; HUVEC hücrelerinde plumbagin  $\text{IC}_{50}$  inhibisyon değerinin 5  $\mu\text{M}$ 'dan küçük, kanser hücrelerinde ise 5  $\mu\text{M}$ 'dan büyük olduğu saptanmıştır. Başka bir çalışmada (Sinha ve diğ., 2013), MTS testi ile HUVEC hücrelerinde, plumbagin 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  ve 5  $\mu\text{M}$  dozlarındaki etkisi incelenmiş; 0,5  $\mu\text{M}$  ve 1  $\mu\text{M}$  dozlarında, plumbagin hücre canlılığı üzerinde etkisi olmadığı, ancak en yüksek dozda (5  $\mu\text{M}$ ) hücre canlılığını kuvvetli bir şekilde inhibe ettiği rapor edilmiştir. Çalışmamızda, plumbagin uygulamasının HUVEC hücrelerinin canlılığını doza bağlı bir şekilde azalttığı, inhibisyon etkisinin yüksek dozlarda daha kuvvetli olduğu, MTT testinde 5  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$ ; SRB testinde ise 3  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  dozlarında hücre canlılığını tüm inkübasyon süreleri boyunca %50'nin altına düşürdüğü saptanmıştır. Bu açıdan sonuçlarımız literatür ile uyumlu bulunmuştur. Lai ve diğ. (2012) tarafından yapılan çalışmada, plumbagin HCT116 (kolon) ve PC-3 (prostat) kanser hücrelerine kıyasla HUVEC hücrelerine daha duyarlı olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde, çalışmamızda plumbagin, A549 hücrelerine kıyasla HUVEC hücrelerine daha duyarlı olduğu saptanmıştır. Bu bakımdan, bulgularımız Lai ve diğerlerinin (2012) çalışması ile paralellik göstermektedir.

Hou ve diğ. (2014) tarafından yapılan çalışmada, MTT testi kullanılarak, A549 hücrelerinde 2, 4, 8, 16, 32 ve 64  $\mu\text{M}$  dozlarındaki berbamin uygulamasının, 48 saatlik inkübasyonda hücre canlılığını doza bağlı olarak azalttığı saptanmıştır. Hücre canlılığının inhibisyonu bakımından

IC<sub>50</sub> değeri 11,2 µM olarak belirlenmiştir. Liu ve diğ. (2021) yaptıkları çalışmada, 1,25 µM-80 µM dozlarında berbamin uygulamasının, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda, A549 hücre canlılığını zamana ve doza bağlı olarak inhibe ettiğini MTT testini kullanarak rapor etmişlerdir. Çalışmada, 72. saatte berbamin uygulamasının IC<sub>50</sub> değeri 8,3 µM olarak belirlenmiştir. Benzer bir çalışmada (Duan ve diğ., 2009), MTT testini kullanılarak 10 µM-80 µM dozlarındaki berbamin uygulamasının, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde A549 hücre canlılığını doza ve zamana bağlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu tez kapsamında, berbamin uygulamasının, A549 hücrelerinin canlılığını doza ve zamana bağlı olarak anlamlı bir şekilde azalttığı saptanmıştır. Bu açıdan, sonuçlarımız literatür ile uyumlu bulunmuştur.

Kim ve diğ. (2021) tarafından yapılan çalışmada, berbaminin HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinliği, tripan mavisi ile boyama yöntemi kullanılarak incelenmiştir. 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, berbaminin 5-20 µM dozlarında, HUVEC hücre canlılığı üzerinde düşük ve anlamlı olmayan bir inhibisyon etkisinin gözlemlendiği bildirilmiştir. Çalışmamızda, berbamin uygulamasının, her iki yöntemde de HUVEC hücrelerinde hücre canlılığını doza bağlı olarak inhibe ettiği, MTT testinde en yüksek iki dozunda (20 µM ve 40 µM); SRB testinde ise yalnızca en yüksek konsantrasyonda (40 µM) %50'nin altında azalttığı belirlenmiştir. Kim ve diğ. (2021) tarafından yapılan çalışmaya kıyasla, çalışmamızda daha yüksek bir doz kullanılması ve hücre canlılık analizlerinin farklı olması nedeniyle, hücre canlılığında doza bağlı ve anlamlı bir inhibisyonun meydana geldiği düşünülmektedir. Literatürde, berbaminin MTT veya SRB hücre canlılık testleri kullanılarak *in vitro* hücre canlılığı analizi üzerine bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu açıdan, çalışmamızın literatüre önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Rugamba ve diğerlerinin (2021) yaptıkları çalışmada, silibininin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinliği MTT testi ile belirlenmiştir. Silibininin, 50, 100, 200, 300 ve 400 µM dozlarında, 48 saatlik inkübasyondan sonra hücre canlılığının azalmasına neden olduğu ve %50'lik inhibisyonun 100 µM dozunda meydana geldiği rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada (Mateen ve diğ., 2009), silibininin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinin (H1299, H460 ve H322) çoğalması üzerindeki etkileri, tripan mavisi ile boyama yöntemini kullanarak incelenmiştir. Hücreler 10 µM-75 µM dozları arasında silibinine maruz bırakılarak, 72 saat inkübe edilmiştir. Silibinin, H1299 hücrelerinin çoğalmasını doza ve zamana bağlı olarak inhibe etmiştir. Hücre sayısındaki azalmanın, 48. saatte %22-43; 72. saatte ise %21-72

aralığında olduğu rapor edilmiştir. H460 hücrelerinde hücre sayısındaki azalmanın 48. saatte %33-53 ve 72. saatte %19-65; H322 hücrelerinde ise 24. saatte %28-53, 48. saatte %17-43 ve 72. saatte %24-62 aralığında olduğu saptanmıştır. 72. saatte, en yüksek konsantrasyonda (75  $\mu$ M) silibinin uygulamasının H1299, H460 ve H322 hücrelerinin çoğalmasını sırasıyla %72, %65 ve %62 oranlarında inhibe ettiği belirtilmiştir. Çalışmamızda silibinin uygulamasının A549 hücrelerinde, herhangi bir doz ve inkübasyon süresinde, hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmadığı saptanmıştır. Aksine, silibinin uygulamasının, hücre canlılığını uyarıcı bir etki gösterdiği gözlenmiştir.

Zahira ve diğ. (2018) tarafından yapılan çalışmada, silibininin HUVEC hücre canlılığı üzerindeki etkileri, MTT hücre canlılık testi ile belirlenmiştir. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri boyunca, 50-200  $\mu$ g/mL dozlarında silibinine maruz bırakılan HUVEC hücrelerinin canlılığında, doza bağlı bir azalma olduğu, ancak inkübasyon süreleri arasında anlamlı farklar gözlenmediği tespit edilmiştir. Silibinin uygulamasının, HUVEC hücre canlılığını 72. saatte ve en yüksek dozda ancak %25 oranında inhibe edebildiği rapor edilmiştir. Bir başka çalışmada (Deep ve diğ., 2012), silibinin bileşenleri olan silibinin A ve silibinin B, 5-30  $\mu$ M dozlarında HUVEC hücrelerine uygulanmış, 24 ve 48 saatlik tedaviden sonra etkileri hemositometre yardımıyla hücreler sayılarak incelenmiştir. Çalışmada, silibinin A ve B'nin, hücre canlılığını doza ve zamana bağlı olarak azalttığı saptanmıştır. Çalışmamızda, 72 saatlik inkübasyonda silibinin uygulamasının, en yüksek konsantrasyon olan 200  $\mu$ M dozunda kontrol grubuna kıyasla, hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttığı, ancak doza veya zamana bağlı bir azalma meydana gelmediği gösterilmiştir. Zahira ve diğ. (2018) tarafından yapılan çalışmada, silibinin uygulamasının hücre canlılığında zamana bağlı olarak anlamlı farklar göstermediği rapor edilmiştir. Bu açıdan sonuçlarımız, Zahira ve diğ. (2018) tarafından yapılan çalışma ile uyumlu bulunmuştur.

Liu ve diğ. (2015) tarafından yapılan çalışmada, lentinanın 0,5-100  $\mu$ g/ml dozlarının, A549 hücre hattındaki sitotoksik etkileri MTT testi ile belirlenmiştir. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde lentinan uygulamasının, hücre canlılığını sırasıyla %13,8; %26,9 ve %47,7 oranlarında inhibe ettiği rapor edilmiştir. Li ve diğ. (2021) yaptıkları çalışmada, 1  $\mu$ M-1000  $\mu$ M dozlarındaki lentinan uygulamasının, A549 hücre canlılığını yalnızca en yüksek konsantrasyonlarda inhibe ettiğini, CCK-8 (Hücre Sayım Kiti-8) ile belirlemişlerdir. Lentinan uygulamasının IC<sub>50</sub> inhibisyon dozunun ise 500  $\mu$ M olduğu rapor edilmiştir. Başka bir

çalışmada (Tian ve diğ., 2024), lentinan 10  $\mu$ M-320  $\mu$ M dozlarında A549 hücrelerine uygulanmış, CCK-8 testi ile sitotoksik etkinliği incelenmiştir. Lentinanın, hücre canlılığını 80  $\mu$ M dozundan itibaren inhibe ettiği, ancak %50 oranında azaltmadığı tespit edilmiştir. Bu tez kapsamında, A549 hücrelerinde lentinan uygulamasının, A549 hücre canlılığını yalnızca 80  $\mu$ M dozunda, 72 saatlik inkübasyon süresinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı saptanmıştır. Bu bulgumuz, Tian ve diğ. (2024) tarafından yapılan çalışmanın sonucuyla uyumludur. Çalışmamızda, lentinan uygulamasının 24. saatte 80  $\mu$ M; 48. saatte 20  $\mu$ M, 80  $\mu$ M ve 160  $\mu$ M; 72. saatte ise 160  $\mu$ M ve 240  $\mu$ M dozlarında A549 hücre canlılığını çok düşük seviyede azalttığı, ancak anlamlı bir azalma meydana getirmediği belirlenmiştir. Bu bulgumuz, Li ve diğ. (2021)'nin yaptığı çalışmayla paralellik göstermektedir. Li ve diğ. (2021) tarafından yapılan çalışmada, en yüksek lentinan dozu 1000  $\mu$ M olarak belirlenmiş, daha yüksek dozlarda daha kuvvetli inhibisyon gözlenmiştir. Çalışmamızdaki hücre canlılığındaki düşük inhibisyonun, seçilen doz aralığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Öte yandan, Liu ve diğ. (2015) tarafından yapılan çalışmada, lentinanın A549 hücre canlılığını %50'nin altına düşürdüğü belirlenmiştir. Çalışmamızda, lentinan tedavisinin, kullanılan herhangi bir dozda hücre canlılığını %50'nin altında inhibe etmediği gözlenmiştir. Bu açıdan Liu ve diğ. (2015)'nin çalışması ile sonuçlarımız uyumlu değildir.

Xu ve diğ. (2020) tarafından yapılan çalışmada, lentinanın HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinliği, CCK-8 testi kullanılarak incelenmiştir. Çalışmada, hücreler 0,04, 0,4, 0,8, 1,2, 2, 4, ve 10  $\mu$ M lentinan dozlarına 24 saat maruz bırakılmıştır. Lentinanın 0,04-2  $\mu$ M dozlarının HUVEC hücre canlılığını etkilemediği, 4  $\mu$ M dozunda kontrole kıyasla düşük seviyede anlamlı bir azalma gösterdiği, bunu takiben 10  $\mu$ M dozunda, hücre canlılığının daha kuvvetli olarak azaldığı rapor edilmiştir. Bu tez kapsamında, HUVEC hücrelerinde lentinan uygulamasının hücre canlılığını azalttığı, istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın 24. saatte 80  $\mu$ M dozunda; 48. saatte tüm dozlarda ve 72. saatte ise 160  $\mu$ M ve 320  $\mu$ M dozlarında meydana geldiği saptanmıştır. Xu ve diğ. (2020) tarafından yapılan çalışmada, hücrelere lentinanın 0,04-10  $\mu$ M dozları uygulanmış ve yüksek dozda (10  $\mu$ M), düşük dozlara kıyasla kuvvetli bir inhibisyon gözlenmiştir. Bu açıdan, çalışmamız Xu ve diğ. (2020)'nin sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur.

Anjiyogenez süreci, kısaca ekstraselüler matriksin bozunmasını takiben, endotel hücrelerinin çoğalması, göçü ve tüp oluşturmaya dayanan bir mekanizmadır. Endotel hücreleri, tek sıra

halinde çoğalarak içi boş, tüp benzeri yapılar oluşturur ve daha sonra bu yapılar olgunlaşarak yeni kan damarları halini alır (Fan ve diğ., 2006; Khalid ve diğ., 2016; Al-Ostoot ve diğ., 2021; Zhang ve diğ., 2024). Bu nedenle, HUVEC hücrelerinde tüp oluşumu deneyi, çeşitli maddelerin anti-anjiyogenik aktivitesini belirlemek açısından önemli bir yöntemdir.

Bu bilgilerden hareketle, çalışmamızda CA-4 (1 ve 5  $\mu$ M), plumbagin (1 ve 3  $\mu$ M) ve berbamin (5 ve 10  $\mu$ M) doğal bileşikleriyle çeşitli konsantrasyonlarda 10 saatlik tedavinin, HUVEC hücrelerinde tüp oluşumu üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Biyoaktif bileşiklere ait dozlar, MTT testiyle analiz edilen hücre canlılığı üzerinden, HUVEC hücrelerinde %50 inhibisyon meydana getirmeyen konsantrasyonlar göz önüne alınarak belirlenmiştir. CA-4, plumbagin ve berbamin uygulamasının, HUVEC hücrelerinde tüp oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Su ve diğ. (2016a) tarafından yapılan çalışmada CA4'ün, HUVEC hücrelerinde VEGF ile indüklenen tüp oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. 5, 10 ve 20 nM dozlarındaki CA-4 ve 20 ng/mL dozundaki VEGF, matrigel üzerine ekilerek 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda CA-4'ün, kontrole kıyasla kılcal benzeri tüp oluşumunu doza bağlı olarak baskıladığı saptanmıştır. Başka bir çalışmada (Vincent ve diğ., 2005), HUVEC hücreleri, matrigel üzerine ekilen 5 ng/ml dozundaki FGF-2 ile 3 saat inkübasyona bırakılmış, daha sonra 10 nM dozundaki CA-4P uygulanarak, hücreler her 3 saatte bir incelenmek üzere 9 saat boyunca inkübe edilmiştir. Çalışmada, FGF-2 ile uyarılan HUVEC hücrelerinin CA-4P varlığında, kontrole kıyasla tüp uzunluğunu ve dallanma noktalarının oluşumunu azaltarak, kılcal bir ağ oluşumunu inhibe ettiği rapor edilmiştir. Ding ve diğ. (2011), yaptıkları çalışmada HUVEC hücreleri, matrigel içerisinde 5 ve 10 ng/ml dozlarındaki CA-4P ile 12 saat inkübe edilmiş ve tüp oluşumu incelenmiştir. Çalışmada, CA-4P'nin kontrole kıyasla tüp oluşumunu doza bağlı olarak (5 ve 10 ng/ml dozlarında sırasıyla %51 ve %69) inhibe ettiği belirlenmiştir. Bu tez kapsamında, CA-4'ün, tüp oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu açıdan, bulgumuz literatürle uyumludur. CA-4, HUVEC hücrelerinde toplam dallanma uzunluğu ve bağlantı noktası sayısını (tüp benzeri yapılar oluşturmak üzere çatallanan düğüm gruplarının sayısı), kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde inhibe etmiştir. Bu açıdan, sonuçlarımız Vincent ve diğ. (2005) tarafından elde edilen bulgularla paralel bulunmuştur. Ayrıca, CA-4 tedavisinin yalnızca bu parametreleri (toplam dallanma uzunluğu ve bağlantı noktası sayısı) doza bağlı olarak inhibe ettiği gözlenmiştir. Bu parametreler bakımından bulgularımızın Su ve diğ. (2016a) ve Ding ve diğ.

(2011) ile örtüştüğü görülmüştür. Ek olarak, CA-4'ün tüm parametreler göz önüne alındığında, tüp benzeri yapıların oluşumunu %50 ve altında inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ding ve diğ. (2011) tarafından elde edilen sonuçlarda, CA-4P'nin kontrole kıyasla tüp oluşumunu 5 ve 10 ng/ml dozlarında sırasıyla %51 ve %69 inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu farklılığın, CA-4'ün suda çözünen formunun kullanılması, inkübasyon süresi ve konsantrasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Lai ve diğ. (2012) tarafından yapılan çalışmada, matrigel içerisindeki HUVEC hücrelerine 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M ve 5  $\mu$ M plumbagin dozları uygulanarak, 6-8 saat inkübe edilmiş ve tüp oluşumu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmada, plumbagin kontrole kıyasla, hücrelerde tüp benzeri yapıların oluşumunu doza bağlı olarak inhibe ettiği bildirilmiştir. Bir başka çalışmada (Lee ve diğ., 2019), plumbagin insan endotelial progenitör hücre hattında (EPC) tüp oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir. 0,3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M ve 10  $\mu$ M dozlarındaki plumbagin, 100 ng/ml VEGF ile uyarılmış matrigel içerisindeki EPC hücrelerine uygulandığında, 24 saatlik inkübasyon sonunda VEGF ile uyarılan EPC hücrelerindeki (kontrol) tüp benzeri yapıların oluşumunun, plumbagin tedavisiyle doza bağlı olarak inhibe edildiği gözlenmiştir. Literatürde, plumbagin HUVEC hücrelerinin tüp oluşumu üzerindeki etkilerini inceleyen, Lai ve diğ. (2012) tarafından yapılan çalışma dışında bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu açıdan sonuçlarımızın, literatüre önemli bir katkıda bulunacağını düşünmekteyiz. Bu tez kapsamında, plumbagin HUVEC hücrelerinde tüp oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. 1 ve 3  $\mu$ M dozlarındaki plumbagin tedavisi, tüp benzeri ağ yapılarının sayısını doza bağlı olarak azalttı. Bu parametremiz, Lai ve diğ. (2012) tarafından elde edilen verilerle uyumludur; ancak çalışmamızda, tüm parametrelerde inhibisyon, doza bağlı olarak gerçekleşmemiştir. Lee ve diğ., (2019) tarafından yapılan çalışmada, EPC hücreleri kullanılmıştır. Hücre kaynağı farklılığı göz önüne alınarak, çalışmamız plumbagin tedavisiyle tüp oluşumunun inhibisyonu bakımından Lee ve diğ. (2019) ile uyumlu bulunmuştur.

Kim ve diğ. (2021) tarafından yapılan çalışmada, serum açıklığına bırakılan HUVEC hücreleri, 30 ng/ml VEGF ile uyarılarak matrigel içerisinde 10  $\mu$ M ve 20  $\mu$ M berbamin dozları uygulanmış ve 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Çalışmada, VEGF ile uyarılan HUVEC hücrelerindeki tüp benzeri yapılar halinde tüp oluşumunun, berbamin tedavisiyle doza bağlı olarak inhibe edildiği tespit edilmiştir. Başka bir çalışma (Jin ve diğ., 2018), *Berberis* türlerinde bulunan bir diğer ana biyoaktif bileşik olan berberinin, HUVEC hücrelerindeki tüp oluşumuna

etkilerini incelemiştir. Çalışmada, 50  $\mu\text{M}$  dozundaki berberin, matrigel içerisindeki HUVEC hücrelerine uygulanarak 6 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda berberinin, kontrole kıyasla hücrelerdeki tüp oluşumunu inhibe ettiği saptanmıştır. Gao ve diğ. (2009) tarafından yapılan çalışmada 0,003  $\mu\text{M}$ , 0,3  $\mu\text{M}$  ve 3  $\mu\text{M}$  berberin dozları, 20 ng/ml VEGF ile uyarılan matrigel içerisindeki HUVEC hücrelerine uygulanarak, 8 saat inkübasyona bırakılmıştır. Berberinin 0,03  $\mu\text{M}$  ve 0,3  $\mu\text{M}$  dozlarında, tüp benzeri yapıların dallanma noktalarının oluşumunu, kontrole kıyasla yaklaşık %86 oranında inhibe ettiği saptanmıştır. Literatürde, berbaminin HUVEC hücrelerinin tüp oluşumu üzerindeki etkilerini inceleyen, Kim ve diğ. (2021) tarafından yapılan çalışma dışında bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu açıdan sonuçlarımızın, literatüre önemli bir katkıda bulunacağı düşünülmektedir. Bu tez kapsamında, berbaminin HUVEC hücrelerindeki tüp oluşumunu inhibe ettiği tespit edildi. Berbamin tedavisi, tüm parametrelerde inhibisyon etkisini doza bağlı olarak gerçekleştirdi. Bu açıdan sonuçlarımız, Kim ve diğ. (2021) tarafından yapılan çalışmayla paralellik göstermektedir. Gao ve diğ. (2009), 0,03  $\mu\text{M}$  ve 0,3  $\mu\text{M}$  dozlarındaki berberinin, tüp benzeri yapıların dallanma noktalarının oluşumunu, kontrole kıyasla %86 oranında inhibe ettiğini bildirmiştir. Çalışmamızda, berbaminin 5  $\mu\text{M}$  ve 10  $\mu\text{M}$  dozlarının, bağlantı noktası sayısını, kontrole kıyasla sırasıyla %69 ve %41 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bunun, biyoaktif maddenin farklılığından ve hücrelerin VEGF varlığında berberine maruz kalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

VEGF, tümörün anjiyogenezinde en kritik rolü oynayan pro-anjiyogenik faktördür. VEGF ailesinin anjiyogeneizde en önemli rolü üstlenen üyesi olan VEGF-A, reseptörüne bağlanarak endotel hücrelerin yeni kılcal damarları oluşturmak üzere göçünü ve çoğalmasını uyararak tümör anjiyogenezi sürecini başlatmaktadır (Khalid ve diğ., 2016; Aguilar-Cazares ve diğ., 2019; Al-Ostoot ve diğ., 2021). MMP-2, tümör anjiyogenezinde etkin rol oynayan bir faktördür. Endotel hücreleri tarafından uyarılarak, bazal membranın ve ekstraselüler matriksin parçalanmasında görev yapar. Bu sayede endotel hücrelerinin göçü ve sonrasında yeni kılcal damarların oluşumu gerçekleşmektedir (Quintero-Fabián ve diğ., 2019; Al-Ostoot ve diğ., 2021; Moshe ve diğ., 2023).

Bu bilgilerden hareketle, tez kapsamında CA-4, plumbagin ve berbamin maddelerinin, A549 akciğer kanseri hücrelerinde VEGF-A ve MMP-2 ifadesi üzerindeki etkinliği incelendi. Hücreler, MTT testiyle belirlenen  $\text{IC}_{50}$  konsantrasyonlarında plumbagin (10  $\mu\text{M}$ ) ile 24 saat,

CA-4 (5  $\mu$ M) ve berbamin (10  $\mu$ M) ile 48 saat tedavi edildi. CA-4, plumbagin ve berbamin tedavisinin, hücrelerde VEGF-A ve MMP-2 ekspresyonlarını kontrole göre inhibe ettiği saptandı.

Su ve diğ. (2016a) tarafından yapılan çalışmada, CA-4'ün anjiyogenez üzerine etkileri, western blot yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Çalışmada, MCF-7 meme kanseri ve HUVEC hücreleri hem normoksik hem de hipoksik koşullarda 5, 10 ve 20 nM dozlarında CA-4'e maruz bırakılarak, VEGF proteininin ifadesi incelenmiştir. MCF-7'de daha kuvvetli olmak üzere iki hücre hattında da normoksik koşullarda 24 saatlik CA-4 tedavisinin VEGF ekspresyonunu baskıladığı, ancak hipoksik koşullarda bu inhibisyonun doza bağlı olarak daha kuvvetli bir şekilde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Agut ve diğ. (2020), CA-4'ün HT-29 kolon kanseri hücrelerinin VEGF ifadesi üzerindeki etkilerini, RT-qPCR ile incelemişlerdir. 15  $\mu$ M dozunda 48 saatlik CA-4 tedavisinin, hücrelerde VEGF'in mRNA ekspresyonunu kontrole kıyasla %40 oranında inhibe ettiği saptanmıştır. Başka bir çalışmada (Xiong ve diğ., 2015), HUVEC hücrelerinde, CA-4'ün bir türevi olan CPU-XT-008'in VEGF ifadesi üzerindeki etkilerini western blot yöntemi ile değerlendirilmiştir. Hücrelere 24 saat 0,01; 0,1; 1 ve 10  $\mu$ mol/l dozlarında uygulanan CPU-XT-008'in, VEGF ekspresyonunu doza bağlı olarak inhibe ettiği saptanmıştır. Aynı çalışmada, 24 saat uygulanan CPU-XT-008 tedavisinin, HUVEC hücrelerinde VEGF-A'nın iki farklı izoformu olan VEGF165 ve VEGF121'in mRNA ekspresyonlarını doza bağlı olarak azalttığı, RT-PCR yöntemi ile tespit edilmiştir.

Roshan ve diğ. (2023), U-87MG glioblastoma hücrelerine uygulanan 6,25 ve 12,5  $\mu$ g/ml dozlarındaki CA-4'ün, MMP-2 ve MMP-9'un mRNA ekspresyonu üzerindeki etkilerini, qRT-PCR kullanarak incelemişlerdir. Çalışmada, 24 saatlik CA-4 tedavisinin hücrelerde mRNA seviyelerini kontrole kıyasla azalttığı; CA-4'ün bu etkisinin MMP-2 için daha kuvvetli meydana geldiği rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada (Yang ve diğ., 2022), 50  $\mu$ M dozunda 24 saatlik CA-4 tedavisinin, HepG2 karaciğer kanseri hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunu inhibe ettiği, western blot yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Yao ve diğ. (2015), CA-4P'nin 3 boyutlu kültürlenmiş Walker 256 sıçan meme kanseri hücrelerinin normoksik ve hipoksik koşullarında, MMP-2 ve MMP-14 ifadeleri üzerine etkilerini western blot yöntemi ile incelemişlerdir. Çalışmada, 2  $\mu$ M dozunda 48 saat uygulanan CA-4P'nin normoksik veya hipoksik koşullarda, MMP'lerin ekspresyonunu etkilemediği saptanmıştır. Gong ve diğ. (2020) tarafından yapılan çalışmada, H1299 küçük hücreli olmayan akciğer

kanseri hücrelerinde 24 saatlik CA-4 tedavisinin, MMP-2 ve VEGF ifadeleri üzerindeki etkileri, western blot yöntemi yardımıyla incelenmiştir. 40 nM dozundaki CA-4, hücrelerde VEGF ekspresyonunu kontrole göre önemli ölçüde inhibe etmiştir. CA-4 tedavisinin hücrelerde MMP-2 ekspresyonu üzerindeki inhibe edici etkisi anlamlı bulunmamıştır. Aynı çalışmada, H1299 inokülasyonu yoluyla tümör oluşturulan dişi fareler, 14 gün boyunca CA-4 ile (30 mg/kg) tedavi edilmiş ve tümör dokularında VEGF, MMP-2 ve MMP-9 ifadesi western blot yöntemiyle değerlendirilmiştir. CA-4 tedavili tümörlerde, kontrole kıyasla VEGF ekspresyonunda düşük etkili ve anlamlı bulunmayan bir azalma, MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonlarında ise anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında, 5 µM dozunda CA-4 tedavisinin, A549 hücrelerinde VEGF-A ve MMP-2 ifadelerini kontrole kıyasla anlamlı olarak inhibe ettiği ve bu inhibisyonun VEGF-A ekspresyonu üzerinde daha kuvvetli olarak gerçekleştiği tespit edildi. Yao ve diğ. (2015) tarafından yapılan çalışmada, CA-4P'nin 3 boyutlu kültürlenmiş Walker 256 sıçan meme kanseri hücrelerinin normoksik veya hipoksik koşullarında, MMP-2 ve MMP-14 ifadelerini etkilemediği bildirilmiştir. Bu açıdan sonuçlarımız, Yao ve diğ. (2015)'nin bulguları ile uyumlu bulunmamıştır. Bunun; hücre türünün, uygulanan dozun farklılığından ve CA-4'ün suda çözülen türevinin kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bulgularımız, genel olarak literatürle uyumludur. Farklı hücre tipleri olsa da aynı kanser türündeki Gong ve diğ. (2020) tarafından yapılan çalışmada, *in vitro* western blot analizinde VEGF'in MMP-2'den daha kuvvetli inhibe edildiği belirtilmiştir. Bu açıdan bulgularımız, Gong ve diğ. (2020) ile de paralellik göstermektedir. Literatürde, çeşitli kanser türlerinin CA-4 ve CA-4'ün daha kararlı ve biyoyararlanımı yüksek türevlerinin tedavisiyle VEGF ve MMP-2 ifadesini azalttığıyla ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar genellikle, CA-4 türevleri üzerine yoğunlaşmıştır. Literatürde, western blot yöntemi kullanılarak A549 hücre hattında CA-4 tedavisinin VEGF-A veya MMP-2 ekspresyonunun inhibisyonu bakımından inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu açıdan sonuçlarımızın, literatüre önemli bir katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Lai ve diğ. (2012) tarafından yapılan çalışmada, plumbagin tedavisinin, VEGF ile uyarılan HUVEC hücrelerinde VEGFR2 ifadesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmada HUVEC hücreleri, besiyeri bakımından açlığa maruz bırakılarak 200 ng/ml dozunda VEGF ile uyarılmış, VEGFR2 ve p-VEGFR2 antikorları western blot yöntemi ile gösterilmiştir. 0,1, 1, 3 ve 5 µM dozlarındaki 2 saatlik plumbagin tedavisinin, hücrelerde p-VEGFR2 ekspresyonunu kontrole göre doza bağlı olarak inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu bulgu, VEGFR2'nin VEGF

kaynaklı fosforilasyonunun ve dolayısıyla VEGF-VEGFR2 aracılı anjiyogenezin baskılandığını göstermektedir. Yang ve diğ. (2020), SGC-7901 gastrik kanser hücreleriyle farelerde oluşturdukları tümör dokularında VEGF ve VEGFR2 ifadesi üzerine plumbagin etkilerini, western blot yöntemiyle incelemişlerdir. Düşük (2 mg/kg), orta (4 mg/kg) ve yüksek dozda (6 mg/kg) plumbagin tedavisinin, tümör dokularında VEGF ve VEGFR2 ekspresyonunu, kontrole kıyasla doza bağlı olarak inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada, plumbagin tedavisi ile VEGF ve VEGFR2 ifadesinin inhibe edildiği, farelerin serum örnekleri kullanılarak yapılan ELISA yöntemiyle de saptanmıştır. Li ve diğ. (2012) tarafından yapılan çalışmada, SGC-7901 gastrik kanser hücreleri 2, 4, 8, 12 ve 24 saat olmak üzere farklı inkübasyon sürelerinde, 10 µmol/L plumbagin ile tedavi edilmiş, plumbagin hücrelerde VEGF ifadesi üzerine etkileri western blot yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Çalışmada plumbagin uygulamasının, hücrelerde VEGF ekspresyonunu inhibe ettiği saptanmıştır. Jampasri ve diğ. (2022)'nin yaptıkları çalışmada, plumbagin hipoksik koşullara maruz bırakılan MCF-7 meme kanseri hücrelerinde VEGF-A ve VEGFR2 mRNA seviyeleri üzerindeki etkileri, RT-qPCR yöntemiyle değerlendirilmiştir. Plumbagin uygulanmayan hücrelerde hipoksik koşullarda, normoksik koşullara kıyasla VEGF-A ve VEGFR2 mRNA seviyelerinin arttığı; 1, 2 ve 4 µM dozlarındaki 24 saatlik plumbagin tedavisinin ise hipoksik koşullardaki hücrelerde bu proteinlerin mRNA ekspresyonunu doza bağlı olarak inhibe ettiği tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada (Sakunrangsit ve Ketchart, 2019), farelere LCC9 endokrin dirençli meme kanseri hücrelerinin ortotropik enjeksiyonu yoluyla oluşturulan tümörlerde, plumbagin VEGF ifadesi üzerindeki etkileri, RT-qPCR yöntemi ile değerlendirilmiştir. Düşük (2 mg/kg) ve yüksek dozda (4 mg/kg) plumbagin tedavisinin, tümörlerde VEGF'in mRNA ekspresyonunu doza bağlı olarak inhibe ettiği tespit edilmiştir. Yine bu çalışmada, LCC9 tümörlü farelerin akciğerindeki mikro metastazlar incelenerek, plumbagin tedavisinin akciğer dokusundaki MMP-9 ifadesi üzerindeki etkileri RT-qPCR yöntemiyle değerlendirilmiş, plumbagin uygulamasının akciğerde MMP-9 mRNA seviyelerini kuvvetli bir şekilde azalttığı rapor edilmiştir. Chen ve diğ. (2017) tarafından yapılan çalışmada, plumbagin uygulamasının U87 ve U251 glioblastoma hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 ifadeleri üzerindeki etkileri, western blot yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. 1 ve 2 µM dozlarında 24 saatlik plumbagin tedavisi, her iki hücre hattında da MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonlarını doza bağlı bir şekilde inhibe etmiştir. Plumbagin, MMP-2 ekspresyonunu U87 hücrelerinde; MMP-9 ekspresyonunu ise U251 hücrelerinde daha kuvvetli bir şekilde inhibe ettiği saptanmıştır. Ayrıca western blot sonuçları, RT-qPCR yöntemi

kullanılarak desteklenmiş, U87 ve U251 hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 mRNA seviyelerinin, 1 ve 2  $\mu$ M dozlarındaki 24 saatlik plumbagin tedavisiyle konsantrasyona bağlı olarak azaldığı rapor edilmiştir. 12-O-tetradekanoilforbol 13-asetat (TPA), çalışmalarda yaygın olarak kullanılan bir tümör promotörüdür. Protein Kinaz C'nin hızlı aktivasyonu ve ardından bozunmasını uyararak, hücre çoğalmasını teşvik eder (Kolb ve Davis, 2004). Shieh ve diğ. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, TPA'ya maruz bırakılan A549 akciğer kanseri hücrelerinde plumbagin tedavisinin MMP-2 ifadesi üzerindeki etkileri, western blot yöntemiyle değerlendirilmiştir. Çalışmada 80 nM TPA varlığında 0,5, 1 ve 1,5  $\mu$ M dozlarında 24 saatlik plumbagin tedavisinin, hücrelerde kontrole kıyasla doza bağlı olarak MMP-2 ekspresyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir. Yüksek konsantrasyondaki plumbagin uygulaması, MMP-2 ekspresyonunu %70 oranında baskılamıştır. Bu bulgular, yarı kantitatif RT-PCR yöntemi ile desteklenmiş; 24 saatlik plumbagin tedavisinin TPA ile uyarılan A549 hücrelerinde MMP-2 mRNA ekspresyonunu doza bağlı olarak azalttığı rapor edilmiştir. Bu tez çalışmamız kapsamında, 10  $\mu$ M plumbagin tedavisinin, A549 hücrelerinde VEGF-A ve MMP-2 ifadelerini kontrole göre inhibe ettiği ve bu inhibisyonun MMP-2 ekspresyonu üzerinde daha kuvvetli olarak gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bulgularımız, genel olarak literatürle uyumlu bulunmuştur. Literatürde, çeşitli kanser türlerinin plumbagin tedavisiyle VEGF ve MMP-2 ifadesini azalttığıyla ilgili çalışmalar yer almaktadır. Shieh ve diğ. (2010) tarafından yapılan çalışma dışında, western blot yöntemi kullanılarak A549 hücre hattında plumbagin tedavisinin, VEGF-A veya MMP-2 anlatımının inhibisyonunu inceleyen başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu açıdan sonuçlarımızın, literatüre önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Kim ve diğ. (2021), normoksik veya hipoksik koşullara maruz bırakılan U87MG hücrelerinde berbaminin, VEGF ifadesi üzerindeki etkilerini ELISA yöntemiyle incelemişlerdir. 10 ve 20  $\mu$ M dozlarındaki berbamin tedavisinin, hipoksik koşullardaki hücrelerde kontrole kıyasla, VEGF üretimini inhibe ettiği belirlenmiştir. Aynı çalışmada berbaminin HUVEC hücrelerinde, VEGF (özellikle VEGF-A) reseptörü olan VEGFR-2'nin ve fosforile-VEGFR2'nin (p-VEGFR2) ifadeleri üzerine etkileri, western blot yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Çalışmada, 30 ng/ml VEGF ve berbamin tedavisinin (10 ve 20  $\mu$ M), hücrelerde p-VEGFR2/VEGFR2 ekspresyonunu doza bağlı olarak önemli ölçüde inhibe ettiği rapor edilmiştir. Bu bulgu, VEGFR2'nin VEGF kaynaklı fosforilasyonunun ve dolayısıyla VEGF-VEGFR2 aracılı anjiyogenezin baskılandığını göstermektedir. Wang ve diğ. (2009) tarafından yapılan çalışmada, berbaminin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde VEGF salınımı

üzerindeki etkileri, ELISA yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Çalışmada, berbaminin 10, 20 ve 40  $\mu\text{M}$  dozlarının, hücrelerde doza bağlı olarak VEGF proteininin salınımını inhibe ettiği saptanmıştır. Yine bu çalışmada, berbaminin MDA-MB-231 hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyonları üzerine etkileri de incelenmiş, berbaminin 40 ve 60  $\mu\text{M}$  dozlarıyla 16 saatlik tedavinin, hücrelerde MMP-2 ve MMP-9 mRNA seviyelerini önemli ölçüde inhibe ettiği, RT-PCR yöntemi kullanılarak bildirilmiştir. Başka bir çalışmada (Liu ve diğ., 2023), berbaminin kolon kanseri hücre hatlarında (HCT116, HT-29, RKO) MMP-2 ifadesi üzerine etkileri, western blot yöntemi kullanılarak incelenmiştir. 5, 10 ve 15  $\mu\text{M}$  dozlarında 24 saatlik berbamin tedavisinin, kolon kanseri hücrelerinde MMP-2 ekspresyonunu doza bağlı olarak inhibe ettiği saptanmıştır. Han ve diğ. (2021) tarafından yapılan çalışmada, berbaminin mesane kanseri hücrelerinde (T24 ve 5637) MMP-9 ifadesi üzerine etkileri, western blot yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir; 8 ve 16  $\mu\text{M}$  dozlarında 48 saatlik berbamin uygulamasının, hücrelerde MMP-9 seviyelerini doza bağlı olarak inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu tez kapsamında, 10  $\mu\text{M}$  berbamin tedavisinin, A549 hücrelerinde VEGF-A ve MMP-2 ifadelerini kontrole kıyasla inhibe ettiği belirlenmiştir. Bu açıdan, bulgularımız literatürle uyumlu bulunmuştur. Literatürde, çeşitli kanser türlerinin berbamin ile tedavisi sonucunda, berbaminin VEGF ve MMP-2 ifadesini azalttığıyla ilgili çalışmalar bulunmaktadır, ancak western blot yöntemi kullanılarak, A549 hücre hattında berbamin tedavisinin VEGF-A veya MMP-2 ekspresyonunun inhibisyonunu inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu açıdan sonuçlarımızın, literatüre önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

Anjiyogenezin *in vivo* tahlili için en çok kullanılan yöntemlerden biri, CAM yöntemidir. CAM yöntemi, vasküler biyoloji ve kanser çalışmaları, biyomühendislik, kozmetik testleri, transplantasyon biyolojisi ve ilaç geliştirmede yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Nowak-Sliwinska ve diğ., 2018). Diğer hayvan deneylerine kıyasla maliyetinin düşük olması, deney süresinin kısa oluşu ve kolay uygulanabilirliği, aynı zamanda CAM üzerinde tümör oluşumu, büyümesi ve invazyonu aşamalarının kolaylıkla incelenebilir olması, CAM yöntemini anjiyogenez çalışmaları için oldukça popüler bir metot haline getirmiştir (Norrby, 2006; Nowak-Sliwinska ve diğ., 2018; Fischer ve diğ., 2022).

Bu bilgilerden hareketle, tez kapsamında CA-4, plumbagin ve berbamin ile süspanse edilen A549 akciğer kanseri hücreleri ( $3 \times 10^6$  hücre/yumurta), matrigel içerisinde, embriyonik gelişimlerinin 9. günündeki kuluçkalık yumurtaların CAM alanına uygulandı. Hücrelere, MTT

testiyle belirlenen IC<sub>50</sub> konsantrasyonlarında CA-4 (5 µM) plumbagin (10 µM) ve berbamin (10 µM) uygulandı. Biyoaktif maddelerle 72 saatlik tedavinin, kuluçkalık yumurtalarda oluşturulan tümörlerde anjiyogenez üzerine etkileri vasküler yoğunluk parametresi üzerinden analiz edildi.

Combretastatin A-4'ün, akciğer kanserinde *in vivo* tümör anjiyogenezi CAM yöntemi ile anti-kanser etkinliğinin incelenmesi üzerine, literatürde bir çalışmaya rastlanmamıştır. Öte yandan, CA-4 ve türevlerinin anti-anjiyogenik etkileri, *in vivo* CAM yöntemi ile bazı çalışmalarda araştırılmıştır. Porcù ve diğ. (2013) tarafından yapılan çalışmada, embriyonik gelişiminin (EG) 11. gününde, kuluçkalık yumurtaların CAM bölgesine, 150 ng FGF içeren veya içermeyen pelletler halinde CA-4 (0,01, 0,1 ve 1 nmol/yumurta) topikal olarak uygulanmış ve 72 saat inkübasyonun ardından (EG-14) incelenmiştir. FGF içeren gruplarda, CA-4'ün kontrole kıyasla damar oluşumunu inhibe ettiği, ancak ilginç bir şekilde, FGF içermeyen gruplarda CA-4'ün damar oluşumunu kontrole kıyasla uyardığı saptanmıştır. Çalışmada bu bulgu, CA-4'ün hücrel bir hasarı tetikleyerek, inflamatuvar bir yanıt oluşturmamasından kaynaklanabileceği şeklinde açıklanmıştır. Başka bir çalışmada (Su ve diğ. 2016a), CA-4 biyoaktif maddesi 1, 5 ve 10 nmol/yumurta olacak şekilde, disk şeklindeki filtre kağıtlarına uygulanarak, EG-8'deki kuluçkalık yumurtanın CAM'i üzerine yerleştirilmiştir. Yumurtalar, 48 saatlik inkübasyondan sonra (EG-10) incelendiğinde, CA-4'ün kontrol grubuna kıyasla yeni damar oluşumunu doza bağlı olarak (1, 5 ve 10 nmol için sırasıyla %26,8, %47,2 ve %77,3) inhibe ettiği saptanmıştır. Su ve diğ. (2016b), bir CA-4 türevi olan ZLM-7'nin anti-anjiyogenik etkilerini *in vivo* CAM yöntemi ile incelemişlerdir. EG-8'deki kuluçkalık yumurtalara, ZLM-7 (1, 5 ve 10 nmol/yumurta) çeşitli dozlarda, disk şeklindeki filtre kağıtlarına uygulanarak, CAM üzerine yerleştirilmiş ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda (EG-10) ZLM-7'nin, yeni kılcal damar oluşumunu doza bağlı olarak (1, 5 ve 10 nmol dozları için sırasıyla %27,3, %42,6 ve %71,5) inhibe ettiği rapor edilmiştir. Subbaraj ve diğ. (2023), CA-4 ve suda çözölen nano formülasyonunun (NF-C) anti-anjiyogenik etkinliğini *in vivo* CAM yöntemi ile incelemişlerdir. Çalışmada, CA-4 ve NF-C (10 µM/yumurta), kuluçkalık yumurtaların CAM'i üzerine disk içerisinde uygulanmış ve 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda, CA-4 ve NF-C'nin; damar yoğunluğu, dallanma noktaları, toplam damar ağ uzunluğunu bakımından anjiyogenezi inhibe ettiği ve NF-C'de bu inhibisyonun CA-4'e kıyasla daha kuvvetli olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada, NF-C'nin A498 böbrek kanseri hücre hattı üzerindeki anti-kanser etkinliği yine *in vivo* CAM yöntemi ile değerlendirilmiştir. Kuluçkalık

yumurtalara, EG-10.günde,  $2 \times 10^6$  A498 hücreleri disk içerisinde enjekte edilerek, 4 gün inkübe edilmiştir. EG-14. günde, NF-C ( $10 \mu\text{M}$ /yumurta) disk içerisine uygulanmış ve kuluçkalık yumurtalar 3 gün daha inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda (EG-17), NF-C ile tedavi edilen kuluçkalık yumurtanın tümör kitlesinin, kontrole kıyasla daha küçük olduğu saptanmıştır. Ayrıca, tümör dokularının histolojik analizinde, NF-C ile tedavi edilen tümör dokusunda kontrole kıyasla, CAM'in çevresinde daha az sayıda büyük kan damarı olduğu saptanmıştır. Literatürde, CA-4'ün *in vivo* CAM yöntemi kullanılarak akciğer kanseri hücreleri ile oluşturulan tümör anjiyogenezi üzerindeki anti-kanser etkinliğine dair bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu açıdan çalışmamızın, literatüre önemli bir katkıda bulunacağını düşünmekteyiz. İlk kez bu tez kapsamında, CA-4'ün A549 hücre hattı ile kuluçkalık embriyoda oluşturulan tümörün anjiyogenezi üzerindeki etkileri incelenmiştir. CA-4 tedavisinin, kontrole göre vasküler yoğunluğu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu bulgu, CA-4'ün akciğer kanserinde tümörün anjiyogenezi baskıladığını göstermektedir. Subbaraj ve diğ. (2023) tarafından yapılan çalışmada, CA-4'ün suda çözölen nano formölasyonunun (NF-C), A498 böbrek kanseri hücreleriyle kuluçkalık embriyoda oluşturulan tümör dokusunda kontrole kıyasla, CAM'in çevresinde daha az sayıda büyük kan damarı olduğu tespit edilerek, anti-anjiyogenik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Bu açıdan bulgularımız, kanser türü farklı olmakla birlikte, paralellik göstermektedir. Ek olarak sonuçlarımız, CA-4 ve türevlerinin anti-anjiyogenik etkinlik göstermesi bakımından literatür ile uyumludur. CA-4 ve nano formölasyonlarının, çeşitli kanser türlerinde anti-anjiyogenik aktivite göstermesi nedeniyle, anjiyogenezi çalışmalarında önemli biyoaktif bileşikler olduğu düşünülmektedir.

Plumbagin, *in vivo* tümör anjiyogenezi CAM yöntemi ile anti-kanser etkinliğinin incelenmesi üzerine literatürde bir çalışmaya rastlanmamıştır. Lai ve diğ. (2012) tarafından, plumbagin anti-anjiyogenik etkileri, *in vivo* CAM yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmada, kuluçkalık yumurtaların 3. gününde, plumbagin ( $5 \mu\text{g}$  ve  $15 \mu\text{g}$  /yumurta), disk şeklindeki filtre kağıtları üzerine uygulanarak CAM'e yerleştirilmiş ve 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda (EG-8), plumbagin mikro damar oluşumunu kontrole kıyasla doza bağılı olarak azalttığı saptanmıştır. Literatürde, plumbagin *in vivo* CAM yöntemi kullanılarak akciğer kanseri hücreleri ile oluşturulan tümör anjiyogenezi üzerindeki anti-kanser etkinliğine dair bir çalışmaya rastlanmamıştır. İlk kez bu tez kapsamında, plumbagin A549 hücre hattı ile kuluçkalık embriyoda oluşturulan tümörün anjiyogenezi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Plumbagin tedavisinin, kontrole kıyasla vasküler yoğunluğu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu

bulgu, plumbagin'in akciğer kanserinde tümör anjiyogenezini baskıladığını göstermektedir. Bu açıdan çalışmamızın, literatüre önemli bir katkıda bulunacağı düşünülmektedir. Ayrıca, plumbagin tedavisinin anti-anjiyogenik etkinliği bakımından, çalışmamız Lai ve diğ. (2012) tarafından elde edilen sonuçlarla uyumludur.

Kim ve diğ. (2021) tarafından yapılan çalışmada, berbaminin anti-anjiyogenik etkinliği ve U87MG glioblastoma hücre hattı üzerindeki anti-kanser etkinliği, *in vivo* CAM yöntemi ile incelenmiştir. Anti-anjiyogenik değerlendirme için, kuluçkalık yumurtalara EG-5. gününde berbamin (10 µg/yumurta), disk şeklinde şeffaf steril kağıtlara uygulanarak CAM üzerine yerleştirilmiştir. 2 gün inkübasyondan sonra (EG-7), berbaminin, mikro damar oluşumunu kontrole kıyasla inhibe ettiği rapor edilmiştir. Berbaminin, glioblastoma hücre hattındaki tümör anjiyogenezi etkinliğini değerlendirmek için, U87MG hücreleri ( $1 \times 10^6$  hücre/yumurta) matrigel içerisinde süspanse edilerek, berbamin ile (10 µg/yumurta) veya berbamin olmadan kuluçkalık yumurtaların CAM'i üzerine silikon bir disk içerisinde implant edilmiştir. 7 günlük inkübasyondan sonra, berbamin uygulanan tümör kitlesinin, kontrole kıyasla daha az olduğu; berbaminin tümör büyümesini baskıladığı tespit edilmiştir. Benzer bir çalışma (Han ve Jung, 2022) berbaminin, U87MG hücre hattından türetilen kök hücre benzeri glioblastoma (GSC) üzerindeki tümör anjiyogenezi etkinliğini değerlendirmiştir. Kuluçkalık yumurtalara, EG-7. gününde GSC'ler ( $2 \times 10^6$  hücre/yumurta) ECM jeli içerisinde süspanse edilerek, berbamin ile (5 µg/yumurta) veya berbamin olmadan CAM üzerine uygulanmış ve 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda (EG-14), berbamin uygulanan tümör hacminin, kontrole kıyasla daha az olduğu saptanmıştır. Literatürde, berbaminin *in vivo* CAM yöntemi kullanılarak akciğer kanseri hücreleri ile oluşturulan tümör anjiyogenezi üzerindeki anti-kanser etkinliğine dair bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu açıdan çalışmamızın, literatüre önemli bir katkıda bulunacağını düşünmekteyiz. İlk kez bu tez kapsamında, berbaminin A549 hücre hattı ile kuluçkalık embriyoda oluşturulan tümörün anjiyogenezi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Berbamin tedavisinin, kontrole kıyasla vasküler yoğunluğu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu bulgu, berbaminin akciğer kanserinde tümör anjiyogenezini baskıladığını göstermektedir. Kim ve diğ. (2021) ve Han ve Jung (2022) tarafından yapılan çalışmalarda, berbamin tedavisinin kuluçkalık yumurtalarda sırasıyla U87MG ve U87MG hücre hattından türetilen kök hücre benzeri glioblastoma hücreleriyle oluşturulan tümörlerin kitlesini kontrole kıyasla inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, berbaminin tümör anjiyogenezi üzerindeki anti-kanser etkinliğini göstermektedir. Çalışmamızda, vasküler yoğunluk parametresi üzerinden, berbamin tedavisinin

tümör anjiyogenezi üzerindeki inhibisyonu belirlenmiştir. Bu açıdan, kanser tipleri farklı olmakla birlikte, sonuçlarımız literatür ile uyumlu bulunmuştur.

Doğal kaynaklı biyoaktif bileşiklerin çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olması ve kemoterapide kullanılan ilaçlara kıyasla yan etki profilinin sınırlı olması nedeniyle kanser terapisinde potansiyel terapötik ilaç olarak değerlendirilmesi göz önünde bulundurularak, bu tez kapsamında; Combretastatin A-4, plumbagin, berbamin, silibinin ve lentinan doğal biyoaktif bileşiklerinin, A549 ve HUVEC hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkinliğinin, HUVEC hücrelerinde tüp oluşumu ve A549 hücrelerinde VEGF-A ve MMP-2 ifadeleri üzerindeki etkilerinin yanı sıra, A549 hücreleriyle oluşturulan *in vivo* CAM yöntemi ile tümör anjiyogenezi üzerindeki anti-anjiyogenik etkinliğinin ilk kez incelenmesi amaçlanmıştır.

Sitotoksik aktivite sonuçlarımız, CA-4, plumbagin ve berbaminin, A549 hücrelerinde hücre canlılığını başarılı bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir. Öte yandan, silibinin ve lentinanın, kanser hücrelerinde canlılığı azaltmadığı tespit edildi. Bu doğal biyoaktif bileşiklerin, kemoterapi ilaçlarıyla kombinasyon halinde çalışıldığında, kanser hücreleri üzerinde daha etkili olacağını düşünmekteyiz. Doğal biyoaktif bileşiklerin HUVEC hücrelerinde, belirli bir sitotoksik aktivite gösterdiği belirlendi. Bunlar arasında plumbagin, yüksek dozlarda HUVEC hücrelerinin canlılığını, A549 hücrelerine kıyasla daha fazla etkiledi. Bu açıdan plumbagin, sağlıklı hücrelerde seçici olarak daha az toksisite gösteren aktif türevlerinin geliştirilmesinin, terapötik ilaç potansiyeli bakımından oldukça önemli olduğunu düşünmekteyiz.

*In vitro* tüp oluşumu bakımından sonuçlarımız, CA-4, plumbagin ve berbamin doğal biyoaktif bileşiklerinin, HUVEC hücrelerinde tüp benzeri yapıların oluşumunu inhibe ettiğini göstermektedir. Endotel hücrelerinin aktivasyonu ile başlayan ve yeni damar oluşumuyla devam eden zincirleme süreç düşünüldüğünde, anjiyogenezin baskılanması açısından CA-4, plumbagin ve berbaminin etkin maddeler olduğunu düşünmekteyiz.

Anjiyogenik faktörlerin ifadesi bakımından sonuçlarımız, CA-4, plumbagin ve berbamin doğal biyoaktif bileşiklerinin, A549 hücrelerinde VEGF-A ve MMP-2 proteinlerinin ifadelerini inhibe ettiğini göstermektedir. Tümör anjiyogenezi ve metastazında bu proteinlerin önemli rollere sahip oldukları göz önünde bulundurulduğunda, CA-4, plumbagin ve berbamin maddelerinin anti-anjiyogenik aktivitesini VEGF-A ve MMP-2 ifadelerinin baskılanması üzerinden gösterdiği düşünülmektedir.

*In vivo* CAM yöntemi ile tümör anjiyogenezi bakımından sonuçlarımız, CA-4, plumbagin ve berbamin doğal biyoaktif bileşiklerinin, A549 hücreleriyle tümör oluşturulan kuluçkalık yumurtalarda damar yoğunluğunu inhibe ettiğini göstermektedir. Tümör dokuları hematoksilen-eozin ile boyanıp, histolojik olarak incelendiğinde, doğal biyoaktif bileşiklerle tedavinin, tümör dokusunda kanser hücrelerini azalttığı ve CAM alanına invazyonu inhibe ettiği belirlendi. Bu bulgumuz da CA-4, plumbagin ve berbamin doğal biyoaktif bileşiklerinin tümör anjiyogenezi üzerinde anti-anjiyogenik etkinlik gösterdiğini desteklemektedir.

Bu sonuçlar göz önüne alındığında, Combretastatin A-4, plumbagin ve berbaminin, tümör anjiyogenezinin inhibisyonu bakımından güçlü doğal biyoaktif bileşikler olması nedeniyle, kanser terapisinde önemli birer potansiyel ilaç olduğu düşünülmektedir. CA-4 türevleri, hali hazırda vasküler bozucu ajan olarak, kanser terapisinde ilaç geliştirme çalışmalarında kullanılmaktadır. Ancak, farklı kanser tipleri ve etkili olduğu mekanizmalar bakımından daha çok araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Öte yandan, CA-4'ün tümör anjiyogenezi üzerinde gösterdiği anti-anjiyogenik etkinlik, *in vivo* CAM yöntemi kullanılarak ilk kez incelenmiştir. Bulgularımızın, akciğer kanseri için geliştirilecek yeni potansiyel ilaç çalışmalarına faydalı olacağı düşünülmektedir. Benzer şekilde, plumbagin ve berbamin maddeleri ile ilgili tümör anjiyogenezi üzerine odaklanan çalışmaların artması ve bu maddelerin etkinlik gösterdiği sinyal mekanizmalarının aydınlatılması oldukça önemlidir. Bulgularımız, akciğer kanseri için bu maddelerin potansiyel anti-anjiyogenik ilaç çalışmalarında kullanılmasının yararlı olacağını göstermektedir. Bu maddelerin kemoterapi ilaçlarıyla kombinasyonlarının, kemoterapötiklerin yan etki profillerini sınırlayarak, seçici anti-kanser etkinliklerini arttıracaklarını düşünülmektedir. Bu alanda daha çok *in vitro* ve *in vivo* çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Moleküler yapıları ve fonksiyonel gruplarının farklılığı bakımından tek tek değerlendirilen CA-4, plumbagin ve berbamin maddeleri, doğal kaynaklı bileşikler olmaları dolayısıyla düşük yarı ömre sahiptir. Bu doğal biyoaktif bileşiklerin anti-anjiyogenik etkinliğinden sorumlu yapılarının aydınlatılmasının ve biyoyararlanımı yüksek, suda çözünen türevlerinin geliştirilmesinin, kanser ilaçlarının gelişimine ışık tutacağı düşünülmektedir. ]

## KAYNAKLAR

- [Adair T.H., Montani J.P., 2010, Angiogenesis, Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA).
- Agarwal, C., Singh, R. P., Dhanalakshmi, S., Tyagi, A. K., Tecklenburg, M., Sclafani, R. A., Agarwal, R., 2003, Silibinin upregulates the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and causes cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma HT-29 cells, *Oncogene*, 22(51), 8271–8282.
- Aguilar-Cazares, D., Chavez-Dominguez, R., Carlos-Reyes, A., Lopez-Camarillo, C., Hernadez de la Cruz, O. N., Lopez-Gonzalez, J. S., 2019, Contribution of Angiogenesis to Inflammation and Cancer, *Frontiers in Oncology*, 9, 1399.
- Agut, R., Falomir, E., Murga, J., Martín-Beltrán, C., Gil-Edo, R., Pla, A., Carda, M., Marco, J. A., 2020, Synthesis of Combretastatin A-4 and 3'-Aminocombretastatin A-4 derivatives with Aminoacid Containing Pendants and Study of their Interaction with Tubulin and as Downregulators of the VEGF, hTERT and c-Myc Gene Expression, *Molecules*, 25(3), 660.
- Ahmad, A., Banerjee, S., Wang, Z., Kong, D., Sarkar, F. H., 2008, Plumbagin-induced apoptosis of human breast cancer cells is mediated by inactivation of NF-kappaB and Bcl-2, *Journal of cellular biochemistry*, 105(6), 1461–1471.
- Aisenbrey, E. A., Murphy, W. L., 2020, Synthetic alternatives to Matrigel. *Nature Reviews Materials*, 5(7), 539–551.
- Al-Ostoot, F. H., Salah, S., Khamees, H. A., Khanum, S. A., 2021, Tumor angiogenesis: Current challenges and therapeutic opportunities, *Cancer Treatment and Research Communications*, 28, 100422.
- Ansari, M.J., Bokov, D., Markov, A., Jalil, A.T., Shalaby, M.N., Suksatan, W., Chupradit, S., Al-Ghamdi, H.S., Shomali, N., Zamani, A., Mohammadi, A., Dadashpour, M., 2022, Cancer combination therapies by angiogenesis inhibitors; a comprehensive review, *Cell Communication and Signaling*, 20(1), 49.
- Asai, R., Bressan, M., Mikawa, T., 2021, *Avians as a Model System of Vascular Development*, Vascular Morphogenesis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, In: Ribatti, D. (ed.), 2, Humana Press, New Jersey, 2206, ISBN: 978-1-0716-0916-3, 103-127.
- Auerbach, R., Kubai, L., Knighton, D., Folkman, J., 1974, A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos, *Developmental biology*, 41(2), 391–394.
- Auyeung, K. K., Ko, J. K., 2017, Angiogenesis and Oxidative Stress in Metastatic Tumor Progression: Pathogenesis and Novel Therapeutic Approach of Colon Cancer, *Current Pharmaceutical Design*, 23(27), 3952–3961.

- Balberova O.V., Bykov E.V., Shnayder N.A., Petrova M.M., Gavriluk O.A., Kaskaeva D.S., Soloveva I.A., Petrov K.V., Mozheyko E.Y., Medvedev G.V., Nasyrova R.F., 2021, The "Angiogenic Switch" and Functional Resources in Cyclic Sports Athletes, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6496.
- Bergers, G., Benjamin, L. E., 2003, Tumorigenesis and the angiogenic switch, *Nature reviews, Cancer*, 3(6), 401–410.
- Bielenberg D.R., Zetter B.R., 2015, The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis, *The Cancer Journal*, 21(4):267-73.
- Boehle, A. S., Sipos, B., Kliche, U., Kalthoff, H., Dohrmann, P., 2001, Combretastatin A-4 prodrug inhibits growth of human non-small cell lung cancer in a murine xenotransplant model, *The Annals of Thoracic surgery*, 71(5), 1657–1665.
- Bosch-Barrera, J., Queralt, B., Menendez, J. A., 2017, Targeting STAT3 with silibinin to improve cancer therapeutics, *Cancer treatment reviews*, 58, 61–69.
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., Jemal, A., 2024, Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 74(3), 229–263.
- Bryan, B. A., D'Amore, P. A., 2007, What tangled webs they weave: Rho-GTPase control of angiogenesis, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64 (16), 2053–2065.
- Chaplain, M. A. J., 1996, Avascular growth, angiogenesis and vascular growth in solid tumours: The mathematical modelling of the stages of tumour development, *Mathematical and Computer Modelling*, 23(6), 47–87.
- Chen, G., Yue, Y., Qin, J., Xiao, X., Ren, Q., Xiao, B., 2017, Plumbagin suppresses the migration and invasion of glioma cells via downregulation of MMP-2/9 expression and inaction of PI3K/Akt signaling pathway *in vitro*, *Journal of Pharmacological Sciences*, 134 (1), 59–67.
- Cirla, A., Mann, J., 2003, Combretastatins: from natural products to drug discovery, *Natural Product Reports*, 20(6), 558.
- Claesson-Welsh, L., Welsh, M., 2013, VEGFA and tumour angiogenesis, *Journal of Internal Medicine*, 273(2), 114–127.
- Das, A., Banik, B. K., 2021, Microwave-assisted oxidation and reduction reactions, *Microwaves in Chemistry Applications*, 199–244.
- Deep, G., Gangar, S. C., Rajamanickam, S., Raina, K., Gu, M., Agarwal, C., Oberlies, N. H., Agarwal, R., 2012, Angiopreventive Efficacy of Pure Flavonolignans from Milk Thistle Extract against Prostate Cancer: Targeting VEGF-VEGFR Signaling, *PLoS ONE*, 7(4), e34630.

- Deng, C., Zhao, J., Zhou, S., Dong, J., Cao, J., Gao, J., Bai, Y., Deng, H., 2020, The Vascular Disrupting Agent CA4P Improves the Antitumor Efficacy of CAR-T Cells in Preclinical Models of Solid Human Tumors, *Molecular Therapy*, 28(1), 75–88.
- Deng, S., Zhang, G., Kuai, J., Fan, P., Wang, X., Zhou, P., Yang, D., Zheng, X., Liu, X., Wu, Q., Huang, Y., 2018, Lentinan inhibits tumor angiogenesis via interferon  $\gamma$  and in a T cell independent manner, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37(1), 260.
- Ding, X., Zhang, Z., Li, S., Wang, A., 2011, Combretastatin A4 Phosphate Induces Programmed Cell Death in Vascular Endothelial Cells, *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 19(7), 303–309.
- Diori Karidio, I., Sanlier, S. H., 2021, Reviewing cancer's biology: an eclectic approach, *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 33(1).
- Duan, H., Luan, J., Liu, Q., Yagasaki, K., Zhang, G., 2009, Suppression of human lung cancer cell growth and migration by berbamine, *Cytotechnology*, 62(4), 341–348.
- Dudley A.C., Griffioen A.W., 2023, Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies, *Angiogenesis*, 26(3), 313–347.
- Fakhri, S., Abbaszadeh, F., Jorjani, M., Pourgholami, M. H., 2021, The effects of anticancer medicinal herbs on vascular endothelial growth factor based on pharmacological aspects: a review study, *Nutrition and Cancer*, 73(1), 1–15.
- Fan, T. P., Yeh, J. C., Leung, K. W., Yue, P. Y., Wong, R. N., 2006, Angiogenesis: from plants to blood vessels. *Trends in pharmacological sciences*, 27(6), 297–309.
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., Fares, Y., 2020, Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1).
- Farooqi, A. A., Wen, R., Attar, R., Taverna, S., Butt, G., Xu, B., 2022, Regulation of Cell-Signaling Pathways by Berbamine in Different Cancers, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2758.
- Fischer, D., Fluegen, G., Garcia, P., Ghaffari-Tabrizi-Wizsy, N., Gribaldo, L., Huang, R. Y.-J., Rasche, V., Ribatti, D., Rousset, X., Pinto, M. T., Viallet, J., Wang, Y., Schneider-Stock, R., 2022, The CAM Model—Q&A with Experts, *Cancers*, 15(1), 191.
- Folkman J., 1971, Tumor angiogenesis: therapeutic implications, *The New England journal of medicine*, 285(21), 1182–1186.
- Folkman, J., Long, D.M., Jr., Becker, F.F., 1963, Growth and metastasis of tumor in organ culture, *Cancer*, 16, 453–467.
- Gánti, T., 2003, *The Principles of Life*, Oxford University Press, Büyük Britanya (UK), ISBN: 9780198507260.

- Gao J-L., Shi, J-M., Lee, S. M-Y., Zhang, Q-W., Wang, Y-T., 2009, Angiogenic Pathway Inhibition of *Corydalis yanhusuo* and Berberine in Human Umbilical Vein Endothelial Cells, *Oncology Research*, 17, 519–526.
- García-Maceira, P., Mateo, J., 2009, Silibinin inhibits hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and mTOR/p70S6K/4E-BP1 signalling pathway in human cervical and hepatoma cancer cells: implications for anticancer therapy, *Oncogene*, 28(3), 313–324.
- Gimbrone, M. A., Jr, Cotran, R. S., Leapman, S. B., Folkman, J., 1974, Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea, *Journal of the National Cancer Institute*, 52(2), 413–427.
- Gimbrone, M. A., Jr, Gullino, P. M., 1976, Angiogenic capacity of preneoplastic lesions of the murine mammary gland as a marker of neoplastic transformation, *Cancer research*, 36, 2611–2620.
- Gomathinayagam, R., Sowmyalakshmi, S., Mardhatillah, F., Kumar, R., Akbarsha, M. A., Damodaran, C., 2008, Anticancer Mechanism of Plumbagin, a Natural Compound, on Non-small Cell Lung Cancer Cells, *Anticancer Research*, 28, 785-792.
- Gong, F., Wang, L., Yu, L., Dang, Y., Jiang, X., Zhao, L., Guo, X., 2020, DHPAC, a novel microtubule depolymerizing agent, suppresses angiogenesis and vasculogenic mimicry formation of human non-small cell lung cancer, *Journal of Cellular Biochemistry*, 121 (12), 4756–4771.
- Grosios, K., Holwell, S. E., McGown, A. T., Pettit, G. R., Bibby, M. C., 1999, In vivo and in vitro evaluation of combretastatin A-4 and its sodium phosphate prodrug, *British journal of cancer*, 81(8), 1318–1327.
- Hafeez, B. B., Fischer, J. W., Singh, A., Zhong, W., Mustafa, A., Meske, L., Sheikhan, M. O., Verma, A. K., 2015, Plumbagin Inhibits Prostate Carcinogenesis in Intact and Castrated PTEN Knockout Mice via Targeting PKC $\epsilon$ , Stat3, and Epithelial-to-Mesenchymal Transition Markers, *Cancer Prevention Research*, 8(5), 375–386.
- Han, C., Wang, Z., Chen, S., Li, L., Xu, Y., Kang, W., Wei, C., Ma, H., Wang, M., Jin, X., 2021, Berbamine Suppresses the Progression of Bladder Cancer by Modulating the ROS/NF- $\kappa$ B Axis, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 1–21.
- Han, J. M., Jung, H. J., 2022, Synergistic Anticancer Effect of a Combination of Berbamine and Arcyriaflavin A against Glioblastoma Stem-like Cells, *Molecules*, 27 (22), 7968.
- Hanahan, D., 2022, Hallmarks of Cancer: New Dimensions, *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., 2000, The Hallmarks of Cancer, *Cell*, 100(1), 57–70.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., 2011, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*, 144(5), 646–674.
- Hazafa, A., Rehman, K. U., Jahan, N., Jabeen, Z., 2019, The Role of Polyphenol (Flavonoids) Compounds in the Treatment of Cancer Cells, *Nutrition and Cancer*, 72(3), 386-397.

- Hida, K., Ohga, N., Hida, Y., Shindoh, M., 2010, Significance of anti-angiogenic therapy in head and neck cancer—Heterogeneity of tumor endothelium, *Japanese Dental Science Review*, 46(1), 26–32.
- Hnasko, T. S., Hnasko, R. M., 2015, *The Western Blot, ELISA, Methods in Molecular Biology*, In: Hnasko, R. (ed), 9, Humana Press, New York, 1318, ISBN: 978-1-4939-2742-5, 87–96.
- Hou, Z.-B., Lu, K.-J., Wu, X.-L., Chen, C., Huang, X.-E., Yin, H.-T., 2014, *In Vitro and in Vivo* Antitumor Evaluation of Berbamine for Lung Cancer Treatment, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(4), 1767–1769.
- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16217067>, [Ziyaret Tarihi: 17 Mayıs 2024].
- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/37723#section=Structures>, [Ziyaret Tarihi: 17 Mayıs 2024].
- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5351344>, [Ziyaret Tarihi: 17 Mayıs 2024].
- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Combretastatin>, [Ziyaret Tarihi: 17 Mayıs 2024].
- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Plumbagin#section=2D-Structure>, [Ziyaret Tarihi: 17 Mayıs 2024].
- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Silibinin>, [Ziyaret Tarihi: 17 Mayıs 2024].
- Jampasri, S., Reabroi, S., Tungmunthum, D., Parichatikanond, W., Pinthong, D., 2022, Plumbagin Suppresses Breast Cancer Progression by Downregulating HIF-1 $\alpha$  Expression via a PI3K/Akt/mTOR Independent Pathway under Hypoxic Condition, *Molecules*, 27 (17), 5716.
- Javed, S., Soukhtehzari, S., Fernandes, N., Williams, K.C., 2022, Longitudinal bioluminescence imaging to monitor breast tumor growth and treatment response using the chick chorioallantoic membrane model, *Scientific Reports*, 12(1), 17192.
- Jin, F., Xie, T., Huang, X., Zhao, X., 2018, Berberine inhibits angiogenesis in glioblastoma xenografts by targeting the VEGFR2/ERK pathway, *Pharmaceutical Biology*, 56(1), 665–671.
- Karatoprak, G. Ş., Küpeli Akkol, E., Genç, Y., Bardakci, H., Yücel, Ç., Sobarzo-Sánchez, E., 2020, Combretastatins: An Overview of Structure, Probable Mechanisms of Action and Potential Applications, *Molecules*, 25(11), 2560.
- Kastana, P., Zahra, F. T., Ntenekou, D., Katraki-Pavlou, S., Beis, D., Lionakis, M. S., Mikelis, C. M., Papadimitriou, E., 2019, *Matrigel Plug Assay for In Vivo Evaluation of Angiogenesis*, The Extracellular Matrix, In: Vigetti, D., Theocharis, A.D. (eds), 18, New York, Humana Press, 1952, 219–232.
- Khalid, E.B., Ayman, E.E, Rahman, H., Abdelkarim, G., Najda, A. Natural products against cancer angiogenesis, *Tumor Biology* 2016; 37(11): 14513-14536

- Kielkopf, C. L., Bauer, W., Urbatsch, I. L., 2020, Bradford Assay for Determining Protein Concentration, *Cold Spring Harbor protocols*, 4, 102269.
- Kim, Y. J., Han, J. M., Jung, H. J., 2021, Antiangiogenic and antitumor potential of berbamine, a natural CaMKII $\gamma$  inhibitor, against glioblastoma, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 566, 129–134.
- Klingenberg, M., Becker, J., Eberth, S., Kube, D., Wilting, J., 2014, The chick chorioallantoic membrane as an in vivo xenograft model for Burkitt lymphoma, *BMC Cancer*, 14, 339.
- Kolb, T. M., Davis, M. A., 2004, The tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) provokes a prolonged morphologic response and ERK activation in Tsc2-null renal tumor cells, *Toxicological sciences*, 81 (1), 233–242.
- Lai, L., Liu, J., Zhai, D., Lin, Q., He, L., Dong, Y., Zhang, J., Lu, B., Chen, Y., Yi, Z., Liu, M., 2012, Plumbagin inhibits tumour angiogenesis and tumour growth through the Ras signalling pathway following activation of the VEGF receptor-2, *British Journal of Pharmacology*, 165(4b), 1084–1096.
- Lee, H.-P., Chen, P.-C., Wang, S.-W., Fong, Y.-C., Tsai, C.-H., Tsai, F.-J., Chung, J.-G., Huang, C.-Y., Yang, J.-S., Hsu, Y.-M., Li, T.-M., Tang, C.-H., 2019, Plumbagin suppresses endothelial progenitor cell-related angiogenesis *in vitro* and *in vivo*, *Journal of Functional Foods*, 52, 537–544).
- Li, J., Shen, L., Lu, F., Qin, Y., Chen, R., Li, J., Li, Y., Zhan, H., He, Y., 2012, Plumbagin inhibits cell growth and potentiates apoptosis in human gastric cancer cells *in vitro* through the NF- $\kappa$ B signaling pathway, *Acta Pharmacologica Sinica*, 33 (2), 242–249.
- Li, M., Du, X., Yuan, Z., Cheng, M., Dong, P., Bai, Y., 2021, Lentinan triggers oxidative stress-mediated anti-inflammatory responses in lung cancer cells, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 477(2), 469–477.
- Li, M., Pathak, R.R., Lopez-Rivera, E., Friedman, S.L., Aguirre-Ghiso, J.A., Sikora, A.G., 2015, The *in ovo* chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an efficient xenograft model of hepatocellular carcinoma, *Journal of Visualized Experiments*, 104, 52411.
- Liu, L., Liang, D., Zheng, Q., Zhao, M., Lv, R., Tang, J., Chen, N., 2023, Berbamine dihydrochloride suppresses the progression of colorectal cancer via RTKs/Akt axis, *Journal of Ethnopharmacology*, 303, 116025.
- Liu, L., Xu, Z., Yu, B., Tao, L., Cao, Y., 2021, Berbamine Inhibits Cell Proliferation and Migration and Induces Cell Death of Lung Cancer Cells via Regulating c-Maf, PI3K/Akt, and MDM2-P53 Pathways, *Evidence-Based Complementary and Alternative medicine*, 5517143.
- Liu, W., Gu, J., Qi, J., Zeng, X. N., Ji, J., Chen, Z. Z., Sun, X. L., 2015, Lentinan exerts synergistic apoptotic effects with paclitaxel in A549 cells via activating ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(8), 1949–1955.

- Lugano, R., Ramachandran, M., Dimberg, A, 2020, Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(9), 1745–1770.
- Luo, H., Vong, C. T., Chen, H., Gao, Y., Lyu, P., Qiu, L., Zhao, M., Liu, Q., Cheng, Z., Zou, J., Yao, P., Gao, C., Wei, J., Ung, C. O. L., Wang, S., Zhong, Z., Wang, Y., 2019, Naturally occurring anti-cancer compounds: shining from Chinese herbal medicine, *Chinese medicine*, 14, 48.
- Maiorana, A., Gullino, P. M., 1978, Acquisition of angiogenic capacity and neoplastic transformation in the rat mammary gland, *Cancer research*, 38(12), 4409–4414.
- Maj, E., Papiernik, D., Wietrzyk, J., 2016, Antiangiogenic cancer treatment: the great discovery and greater complexity, *International Journal of Oncology*, 49(5), 1773–1784.
- Mateen, S., Tyagi, A., Agarwal, C., Singh, R. P., Agarwal, R., 2009, Silibinin inhibits human nonsmall cell lung cancer cell growth through cell-cycle arrest by modulating expression and function of key cell-cycle regulators, *Molecular Carcinogenesis*, 49(3), 247–258.
- Meng, Y., Lyu, F., Xu, X., Zhang, L., 2020, Recent Advances in Chain Conformation and Bioactivities of Triple-Helix Polysaccharides, *Biomacromolecules*, 21(5), 1653–1677.
- Millimouno, F. M., Dong, J., Yang, L., Li, J., Li, X., 2014, Targeting Apoptosis Pathways in Cancer and Perspectives with Natural Compounds from Mother Nature, *Cancer Prevention Research*, 7(11), 1081–1107.
- Mokhber-Dezfuli, N., Saeidnia, S., Gohari, A. R., Kurepaz-Mahmoodabadi, M., 2014, Phytochemistry and pharmacology of berberis specie, *Pharmacognosy Reviews*, 8(15), 8–15.
- Moshe D.L., Baghaie L., Leroy F., Skapinker E., Szewczuk M.R., 2023, Metamorphic Effect of Angiogenic Switch in Tumor Development: Conundrum of Tumor Angiogenesis Toward Progression and Metastatic Potential, *Biomedicines*, 11(8), 2142.
- Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55–63.
- Murphy J. B., 1913, Transplantability of Tissues To The Embryo Of Foreign Species : Its Bearing on Questions of Tissue Specificity And Tumor Immunity, *The Journal of experimental medicine*, 17(4), 482–493.
- Murphy, J. B., Rous, P., 1912, The Behavior Of Chicken Sarcoma Implanted in The Developing Embryo, *The Journal of experimental medicine*, 15(2), 119–132.
- Nagy, J. A., Chang, S. H., Dvorak, A. M., Dvorak, H. F., 2009, Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know?, *British journal of cancer*, 100(6), 865–869.
- Nainwal, L. M., Alam, M. M., Shaquiquzzaman, M., Marella, A., Kamal, A., 2019, Combretastatin-based compounds with therapeutic characteristics: a patent review, *Expert opinion on therapeutic patents*, 29(9), 703–731.

- Norrby K., 2006, *In vivo* models of angiogenesis, *Journal of Cellular And Molecular Medicine*, 10(3), 588–612.
- Nowak-Sliwinska, P., Alitalo, K., Allen, E., Anisimov, A., Aplin, A. C., Auerbach, R., Augustin, H. G., Bates, D. O., van Beijnum, J. R., Bender, R. H. F., Bergers, G., Bikfalvi, A., Bischoff, J., Böck, B. C., Brooks, P. C., Bussolino, F., Cakir, B., Carmeliet, P., Castranova, D., Cimpean, A. M., ... Griffioen, A. W., 2018, Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays, *Angiogenesis*, 21(3), 425–532.
- Orellana, E. A., Kasinski, A. L., 2016, Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation, *Bio-protocol*, 6(21).
- Panda, M., Tripathi, S. K., Biswal, B. K., 2020, Plumbagin promotes mitochondrial mediated apoptosis in gefitinib sensitive and resistant A549 lung cancer cell line through enhancing reactive oxygen species generation, *Molecular Biology Reports*, 47(6), 4155–4168.
- Passaniti, A., Taylor, R. M., Pili, R., Guo, Y., Long, P. V., Haney, J. A., Pauly, R. R., Grant, D. S., Martin, G. R., 1992, A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 67(4), 519–528.
- Petrocelli, G., Marrazzo, P., Bonsi, L., Facchin, F., Alviano, F., Canaider, S., 2023, Plumbagin, a Natural Compound with Several Biological Effects and Anti-Inflammatory Properties, *Life*, 13(6), 1303.
- Pettit, G. R., Cragg, G. M., Herald, D. L., Schmidt, J. M., Lohavanijaya, P., 1982, Isolation and structure of combretastatin, *Canadian Journal of Chemistry*, 60(11), 1374–1376.
- Pettit, G. R., Singh, S. B., Hamel, E., Lin, C. M., Alberts, D. S., Garcia-Kendall, D., 1989, Isolation and structure of the strong cell growth and tubulin inhibitor combretastatin A-4. *Experientia*, 45(2), 209–211.
- Pettit, G. R., Singh, S. B., Niven, M. L., Hamel, E., Schmidt, J. M., 1987, Isolation, structure, and synthesis of combretastatins A-1 and B-1, potent new inhibitors of microtubule assembly, derived from *Combretum caffrum*. *Journal of natural products*, 50(1), 119–131.
- Ponce, M. L., 2009, *Tube formation: an in vitro matrigel angiogenesis assay*, *Angiogenesis Protocols, Methods in Molecular Biology*, In: Murray, C., Martin, S. (eds), 10, Humana Press, New Jersey, 467, ISBN: 978-1-59745-241-0, 183–188.
- Porcù, E., Viola, G., Bortolozzi, R., Persano, L., Mitola, S., Ronca, R., Presta, M., Romagnoli, R., Baraldi, P. G., Basso, G., 2013, TR-644 a novel potent tubulin binding agent induces impairment of endothelial cells function and inhibits angiogenesis, *Angiogenesis*, 16(3), 647–662.
- Quintero-Fabián, S., Arreola, R., Becerril-Villanueva, E., Torres-Romero, J. C., Arana-Argáez, V., Lara-Riegos, J., Ramírez-Camacho, M. A., Alvarez-Sánchez, M. E., 2019, Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer, *Frontiers in Oncology*, 9, 1370.

- Rahman, H. S., Tan, B. L., Othman, H. H., Chartrand, M. S., Pathak, Y., Mohan, S., Abdullah, R., Alitheen, N. B., 2020, An Overview of *In Vitro*, *In Vivo*, and Computational Techniques for Cancer-Associated Angiogenesis Studies, *BioMed research international*, 8857428.
- Ribatti, D., 2008, The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of tumor angiogenesis. *Romanian journal of morphology and embryology*, 49(2), 131–135.
- Ribatti, D., 2021, *The Fundamental Contribution of Judah Folkman in the Setting of Angiogenesis Assays*, Vascular Morphogenesis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, In: Ribatti, D. (ed.), 2, Humana Press, New Jersey, 2206, ISBN: 978-1-0716-0916-3, 15–25.
- Ribatti, D., Pezzella, F., 2021, Overview on the Different Patterns of Tumor Vascularization, *Cells*, 10(3), 639.
- Roshan, M. K., Afshari, A. R., Mirzavi, F., Mousavi, S. H., Soukhtanloo, M., 2023, Combretastatin A-4 suppresses the invasive and metastatic behavior of glioma cells and induces apoptosis in them: in-vitro study, *Medical Oncology*, 40(11), 331.
- Rugamba, A., Kang, D. Y., Sp, N., Jo, E. S., Lee, J. M., Bae, S. W., Jang, K. J., 2021, Silibinin Regulates Tumor Progression and Tumorsphere Formation by Suppressing PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cells, *Cells*, 10(7), 1632.
- Sakunrangsit, N., Ketchart, W., 2019, Plumbagin inhibits cancer stem-like cells, angiogenesis and suppresses cell proliferation and invasion by targeting Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in endocrine resistant breast cancer, *Pharmacological Research*, 150, 104517.
- Sandler A., 2007, Bevacizumab in non small cell lung cancer, *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(15-2), 4613–4616.
- Seddigi, Z. S., Malik, M. S., Saraswati, A. P., Ahmed, S. A., Babalghith, A. O., Lamfon, H. A., Kamal, A., 2017, Recent advances in combretastatin based derivatives and prodrugs as antimetabolic agents. *MedChemComm*, 8(8), 1592–1603.
- Shieh, J. M., Chiang, T. A., Chang, W. T., Chao, C. H., Lee, Y. C., Huang, G. Y., Shih, Y. X., Shih, Y. W., 2010, Plumbagin inhibits TPA-induced MMP-2 and u-PA expressions by reducing binding activities of NF-kappaB and AP-1 via ERK signaling pathway in A549 human lung cancer cells, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 335 (1-2), 181–193.
- Singh, R. P., Raina, K., Sharma, G., Agarwal, R., 2008, Silibinin inhibits established prostate tumor growth, progression, invasion, and metastasis and suppresses tumor angiogenesis and epithelial-mesenchymal transition in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model mice, *Clinical Cancer Research*, 14(23), 7773–7780.
- Sinha, S., Pal, K., Elkhanany, A., Dutta, S., Cao, Y., Mondal, G., Iyer, S., Somasundaram, V., Couch, F. J., Shridhar, V., Bhattacharya, R., Mukhopadhyay, D., Srinivas, P., 2013, Plumbagin inhibits tumorigenesis and angiogenesis of ovarian cancer cells *in vivo*, *International Journal of Cancer*, 132(5), 1201–1212.

- Staton, C. A., Reed, M. W., Brown, N. J., 2009, A critical analysis of current *in vitro* and *in vivo* angiogenesis assays, *International Journal of Experimental Pathology*, 90(3), 195–221.
- Stryker, Z. I., Rajabi, M., Davis, P. J., Mousa, S. A., 2019, Evaluation of Angiogenesis Assays. *Biomedicines*, 7(2), 37.
- Su, M., Huang, J., Li, J., Qin, X., Tang, X., Jin, F., Chen, S., Jiang, C., Zou, Z., Peng, K., Nuruzzaman, M., Zhang, J., Luo, J., Liu, S., Luo, Z., 2016b, ZLM-7 exhibits anti-angiogenic effects via impaired endothelial cell function and blockade of VEGF/VEGFR-2 signaling, *Oncotarget*, 7 (14), 19018–19030.
- Su, M., Huang, J., Liu, S., Xiao, Y., Qin, X., Liu, J., Pi, C., Luo, T., Li, J., Chen, X., Luo, Z., 2016a, The anti-angiogenic effect and novel mechanisms of action of Combretastatin A-4, *Scientific Reports*, 6(1).
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., Yu, Q., 2015, Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis, *Molecular Cancer*, 14(1).
- Subbaraj, G. K., Masoodi, T., Yasam, S. K., Chandrashekar, K., Kulanthaivel, L., Shaik, N. A., Hashem, S., Alshabeeb Akil, A. S., Bhat, A. A., 2023, Anti-angiogenic effect of nano-formulated water soluble kaempferol and combretastatin in an *in vivo* chick chorioallantoic membrane model and HUVEC cells, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 163, 114820.
- Swadi, R., Mather, G., Pizer, B.L., Losty, P.D, See, V., Moss., D., 2018, Optimising the chick chorioallantoic membrane xenograft model of neuroblastoma for drug delivery, *BMC Cancer*, 18(1), 28.
- Tian, P., Du, D., Yang, L., Zhou, N., Tao, L., 2024, Lentinan mitigates pemetrexed chemoresistance by the PI3K/Akt pathway in non-small cell lung cancer, *Cell Biochemistry and Biophysics*.
- Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., Jemal, A., 2016, Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update, *American Association for Cancer Research* , 25(1), 16–27.
- Tripathi, S. K., Rengasamy, K. R. R., Biswal, B. K., 2020, Plumbagin engenders apoptosis in lung cancer cells via caspase-9 activation and targeting mitochondrial-mediated ROS induction, *Archives of Pharmacal Research*, 43(2), 242–256.
- Verdura, S., Cuyàs, E., Ruiz-Torres, V., Micol, V., Joven, J., Bosch-Barrera, J., & Menendez, J. A., 2021, Lung Cancer Management with Silibinin: A Historical and Translational Perspective. *Pharmaceuticals*, 14(6), 559.
- Viallard, C., Larrivée, B., 2017, Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets, *Angiogenesis*, 20(4), 409–426.
- Vichai, V., Kirtikara, K., 2006, Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening, *Nature protocols*, 1(3), 1112–1116.

- Vincent, L., Kermani, P., Young, L. M., Cheng, J., Zhang, F., Shido, K., Lam, G., Bompais-Vincent, H., Zhu, Z., Hicklin, D. J., Bohlen, P., Chaplin, D. J., May, C., Rafii, S., 2005, Combretastatin A4 phosphate induces rapid regression of tumor neovessels and growth through interference with vascular endothelial-cadherin signaling. *The Journal of clinical investigation*, 115(11), 2992–3006.
- Wang, S., Liu, Q., Zhang, Y., Liu, K., Yu, P., Liu, K., Luan, J., Duan, H., Lu, Z., Wang, F., Wu, E., Yagasaki, K., Zhang, G., 2009, Suppression of growth, migration and invasion of highly-metastatic human breast cancer cells by berbamine and its molecular mechanisms of action, *Molecular Cancer*, 8, 81.
- Wang, Z., Dabrosin, C., Yin, X., Fuster, M. M., Arreola, A., Rathmell, W. K., Generali, D., Nagaraju, G. P., El-Rayes, B., Ribatti, D., Chen, Y. C., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A. G., Nowshien, S., Amedei, A., Niccolai, E., Amin, A., Ashraf, S. S., Helferich, B., Yang, X., Guha, G., Bhakta, D., Ciriolo, M.R., Aquilano, K., Chen, S., Halicka, D., Mohammed, S.I., Azmi, A.S., Bilsland, A., Keith, W.N., Jensen, L. D., 2015, Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy, *Seminars in cancer biology*, 35, 224–243.
- Xiao X., Zhou X., Ming H., Zhang J., Huang G., Zhang Z., Li P., 2015, Chick Chorioallantoic Membrane Assay: A 3D Animal Model for Study of Human Nasopharyngeal Carcinoma. *PLoS One*, 10(6), e0130935.
- Xiong, R., Sun, J., Liu, K., Xu, Y., He, S., 2015, Effect of CPU-XT-008, a combretastatin A-4 analogue, on the proliferation, apoptosis and expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in human umbilical vein endothelial cells, *Oncology Letters*, 11(1), 491–499.
- Xu, T.-P., Shen, H., Liu, L.-X., Shu, Y.-Q., 2013, Plumbagin from *Plumbago Zeylanica* L Induces Apoptosis in Human Non-small Cell Lung Cancer Cell Lines through NF- $\kappa$ B Inactivation, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(4), 2325–2331.
- Xu, Y., Du, Y., 2020, Effects of Lentinan on Endothelial Cell Activity, Inflammatory Response, Endoplasmic Reticulum Stress, and Apoptosis in Sepsis, *Advances in Polymer Technology*, 2020, 1–9.
- Yang, C., Feng, X., Li, Z., He, Q., 2020, Plumbagin inhibits tumor angiogenesis of gastric carcinoma in mice by modulating nuclear factor-kappa B pathway, *Translational Cancer Research*, 9 (2), 556–564.
- Yang, L., Ma, X., Guo, K., Li, J., Zhang, C., Wu, L., 2022, Dual-functional antitumor conjugates improving the anti-metastasis effect of combretastatin A4 by targeting tubulin polymerization and matrix metalloproteinases, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 238, 114439.
- Yao, N., Ren, K., Jiang, C., Gao, M., Huang, D., Lu, X., Lou, B., Peng, F., Yang, A., Wang, X., Ni, Y., Zhang, J., 2015, Combretastatin A4 phosphate treatment induces vasculogenic mimicry formation of W256 breast carcinoma tumor in vitro and in vivo, *Tumor Biology*, 36(11), 8499–8510.

- Yavvari, P., Laporte, A., Elomaa, L., Schraufstetter, F., Pacharzina, I., Daberkow, A. D., Hoppensack, A., Weinhart, M., 2022, 3D-Cultured Vascular-Like Networks Enable Validation of Vascular Disruption Properties of Drugs *In Vitro*, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10.
- Yin, Z., Zhang, J., Chen, L., Guo, Q., Yang, B., Zhang, W., Kang, W., 2020, Anticancer Effects and Mechanisms of Action of Plumbagin: Review of Research Advances, *Biomed Research International*, 6940953.
- Yu, B. B., Liu, L. L., Yan, J. D., Cao, J. B., Cao, Y., 2022, Effect of berbamine on invasion and metastasis of human liver cancer SMMC-7721 cells and its possible mechanism, *Anti-cancer Drugs*, 33(1), e178–e185.
- Yue, P. Y., Mak, N. K., Cheng, Y. K., Leung, K. W., Ng, T. B., Fan, D. T., Yeung, H. W., Wong, R. N., 2007, Pharmacogenomics and the Yin/Yang actions of ginseng: anti-tumor, angiomodulating and steroid-like activities of ginsenosides, *Chinese medicine*, 2, (6).
- Zahira N. V., Nakhjavania, M., Hajianb, P., Shirazic, F. H., Mirzaei, H., 2018, Evaluation of Silibinin Effects on the Viability of HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma) and HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial) Cell Lines, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 17(1), 261-267.
- Zhang R., Yao Y., Gao H., Hu X., 2024, Mechanisms of angiogenesis in tumour, *Frontiers in Oncology*, 14, 1359069.
- Zhang, Y., Li, Q., Shu, Y., Wang, H., Zheng, Z., Wang, J., Wang, K., 2015, Induction of apoptosis in S180 tumour bearing mice by polysaccharide from *Lentinus edodes* via mitochondria apoptotic pathway, *Journal of Functional Foods*, 15, 151–159.
- Zhang, Y., Zhang, M., Jiang, Y., Li, X., He, Y., Zeng, P., Guo, Z., Chang, Y., Luo, H., Liu, Y., Hao, C., Wang, H., Zhang, G., Zhang, L., 2018, Lentinan as an immunotherapeutic for treating lung cancer: a review of 12 years clinical studies in China, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 144(11), 2177–2186.
- Zhao, W., Bai, B., Hong, Z., Zhang, X., Zhou, B., 2020, Berbamine (BBM), a Natural STAT3 Inhibitor, Synergistically Enhances the Antigrowth and Proapoptotic Effects of Sorafenib on Hepatocellular Carcinoma Cells, *ACS Omega*, 5(38), 24838–24847.
- Zhou, G., Liu, H., Yuan, Y., Wang, Q., Wang, L., Wu, J., 2024, Lentinan progress in inflammatory diseases and tumor diseases, *European Journal of Medical Research*, 29(1).
- Zhu, H., Zhang, J., Xue, N., Hu, Y., Yang, B., He, Q., 2010, Novel combretastatin A-4 derivative XN0502 induces cell cycle arrest and apoptosis in A549 cells, *Investigational New Drugs*, 28(4), 493–501. ]

## ÖZGEÇMİŞ

| Kişisel Bilgiler |                                                                          |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Adı Soyadı       | Melisa MANAV                                                             |
| Doğum Yeri       |                                                                          |
| Doğum Tarihi     | Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.                               |
| Uyruğu           | <input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer: |
| E-Posta Adresi   |                                                                          |
| Web Adresi       |                                                                          |

| Eğitim Bilgileri |                       |
|------------------|-----------------------|
| Lisans           |                       |
| Üniversite       | İstanbul Üniversitesi |
| Fakülte          | Fen Fakültesi         |
| Bölümü           | Biyoloji Bölümü       |
| Mezuniyet Yılı   | 25.01.2021            |

| Yüksek Lisans |                         |
|---------------|-------------------------|
| Üniversite    | İstanbul Üniversitesi   |
| Enstitü Adı   | Fen Bilimleri Enstitüsü |
| Anabilim Dalı | Biyoloji Anabilim Dalı  |
| Programı      | Zooloji Programı        |

| Makale ve Bildiriler |  |
|----------------------|--|
| [                    |  |