

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**BEVACİZUMAB'IN ANTİANJİYOGENİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN  
MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

**EBRU ALP**

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Sevdâ MENEVŞE

ANKARA  
Haziran 2011

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**BEVACİZUMAB'IN ANTİANJİYOGENİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN MEME  
KANSERİ HÜCRE HATTINDA ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

**EBRU ALP**

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Sevda MENEVŞE

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2007-94 proje numarası ile desteklenmiştir.

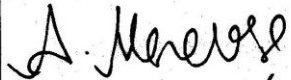
ANKARA  
Haziran 2011

**T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Doktora Programı  
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından  
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.**

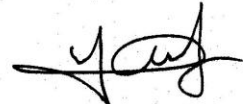
**Tez Savunma Tarihi : 29/06/2011**

  
**Prof. Dr. Sevda MENEVŞE**  
Gazi Üniversitesi  
Jüri Başkanı

  
**Prof. Dr. Adnan MENEVŞE**  
Gazi Üniversitesi

  
**Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ**  
Gazi Üniversitesi

  
**Prof. Dr. Deniz ERDOĞAN**  
Gazi Üniversitesi

  
**Yrd. Doç. Dr. Yasemin SOYSAL**  
Afyon Kocatepe Üniversitesi

## **İÇİNDEKİLER**

|                                             | <b>Sayfa No</b> |
|---------------------------------------------|-----------------|
| Kabul ve Onay                               | <b>I</b>        |
| İçindekiler                                 | <b>II</b>       |
| Şekiller ve Grafikler                       | <b>VII</b>      |
| Tablolar                                    | <b>XI</b>       |
| Semboller, Kısaltmalar                      | <b>XII</b>      |
| <b>1. GİRİŞ</b>                             | <b>1</b>        |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>                    | <b>3</b>        |
| 2.1. Meme yapısı                            | <b>3</b>        |
| 2.2. Meme kanseri                           | <b>4</b>        |
| 2.2.1. Risk faktörleri                      | <b>5</b>        |
| 2.2.1.1. Yaş                                | <b>5</b>        |
| 2.2.1.2. Kişisel meme kanseri hikayesi      | <b>6</b>        |
| 2.2.1.3. Fertil çağ süresi                  | <b>6</b>        |
| 2.2.1.4. Ailede meme kanseri hikayesi       | <b>7</b>        |
| 2.2.1.5. Kalıtsal sendromlar                | <b>7</b>        |
| 2.2.1.6. Hormon tedavisi                    | <b>7</b>        |
| 2.2.1.7 Alkol ve sigara kullanımı           | <b>8</b>        |
| 2.2.1.8. Diyet                              | <b>8</b>        |
| 2.2.1.9. Genetik faktörler                  | <b>8</b>        |
| 2.2.2. Meme kanseri metastazı               | <b>9</b>        |
| 2.3. Anjiyogenez                            | <b>12</b>       |
| 2.3.1. Tümör anjiyogenezi                   | <b>14</b>       |
| 2.3.1.1. Vasküler endotelial büyüme faktörü | <b>17</b>       |
| 2.3.1.1.1. VEGF-A                           | <b>17</b>       |
| 2.3.1.1.2. VEGF-A geni                      | <b>19</b>       |

|                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.3.1.1.3. VEGF-C                                                      | 20        |
| 2.3.1.1.4. VEGF-C geni                                                 | 20        |
| 2.3.1.2. VEGF reseptörleri                                             | 21        |
| 2.3.1.2.1. VEGFR-2                                                     | 21        |
| 2.3.1.2.2. VEGFR-2 geni                                                | 22        |
| 2.3.1.3. Siklooksijenaz enzim sistemi                                  | 23        |
| 2.3.1.3.1. COX-2 geni                                                  | 23        |
| 2.3.1.3.2. COX-2 ve kanser gelişimi                                    | 24        |
| 2.4. Antianjiyogenik tedavi                                            | 25        |
| 2.4.1. Bevacizumab                                                     | 28        |
| 2.5. Programlanmış hücre ölümü (Apoptoz)                               | 31        |
| 2.6. MDA-MB-231 Meme kanseri hücre hattı                               | 32        |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>                                              | <b>33</b> |
| 3.1. Kullanılan araç ve gereçler                                       | 33        |
| 3.1.1. MDA-MB-231 hücre hattı                                          | 33        |
| 3.1.2. Kullanılan cihazlar                                             | 33        |
| 3.1.3. Kullanılan sarf malzemeler                                      | 34        |
| 3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler                                    | 34        |
| 3.1.5. Kullanılan kitler                                               | 35        |
| 3.2. Besiyeri ve çözeltilerin hazırlanışı                              | 36        |
| 3.2.1. % 10'luk DMEM besiyerinin hazırlanışı                           | 36        |
| 3.2.2. % 1'lik DMEM besiyerinin hazırlanışı                            | 36        |
| 3.2.3. XTT karışımının hazırlanması                                    | 36        |
| 3.2.4. 0.2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> çözeltisinin hazırlanışı | 37        |
| 3.2.5. 0.1 M Sitrik Asit çözeltisinin hazırlanışı                      | 37        |
| 3.2.6. Fosfat-sitrat çözeltisinin (pH: 7.8) hazırlanışı                | 37        |
| 3.2.7. % 0.25 Nonidet P-40 (NP-40) çözeltisinin hazırlanışı            | 37        |
| 3.2.8. 1 mg/ml Proteinaz K çözeltisinin hazırlanışı                    | 37        |

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.9. 1 mg/ml Ribonükleaz A (RNaz A) çözeltisinin hazırlanışı                                           | 38 |
| 3.2.10. 10X Tris Borat EDTA (TBE) stok çözeltisinin hazırlanışı                                          | 38 |
| 3.2.11. 0.5 M EDTA çözeltisinin hazırlanışı                                                              | 38 |
| 3.2.12. 1X Tris Borat EDTA (TBE) tamponunun hazırlanışı                                                  | 38 |
| 3.2.13. Orange G jel yükleme tamponu                                                                     | 38 |
| 3.2.14. Stok Etidyum Bromür boyasının hazırlanışı                                                        | 39 |
| 3.2.15. Agaroz jelin hazırlanışı                                                                         | 39 |
| 3.2.16. 1X PBS çözeltisinin hazırlanması                                                                 | 39 |
| 3.3. Yöntemler                                                                                           | 39 |
| 3.3.1. Hücre kültürü                                                                                     | 39 |
| 3.3.2.XTT Hücre canlılığı deneyi                                                                         | 40 |
| 3.3.3. Canlı, apoptotik ve nekrotik hücre ayrımının floresan mikroskopunda incelenmesi                   | 41 |
| 3.3.4. Besiyerine salınan laktat dehidrojenaz (LDH) miktarının ölçülerek sitotoksik etkinin belirlenmesi | 41 |
| 3.3.5. Hücre çoğalmasının Bromodeoksiuridin (BrdU) ile belirlenmesi                                      | 42 |
| 3.3.6. DNA fragmentasyonunun ELISA yöntemi ile belirlenmesi                                              | 43 |
| 3.3.7. DNA fragmentasyonunun agaroz jel elektroforezi ile gösterilmesi                                   | 44 |
| 3.3.7.1 Agaroz jel elektroforezi                                                                         | 45 |
| 3.3.8. Hücre kültüründen total RNA'nın elde edilmesi                                                     | 45 |
| 3.3.9. Komplementer DNA (cDNA) sentezi                                                                   | 46 |
| 3.3.9.1 Reverse Transkriptaz PCR (RT-PCR) programı                                                       | 47 |
| 3.3.10. Gen ifadesinin Real-Time PCR ile belirlenmesi                                                    | 47 |
| 3.3.10.1. VEGF-A geninin ifade düzeyinin kantitatif analizi                                              | 48 |
| 3.3.10.2. VEGF-C geninin ifade düzeyinin kantitatif analizi                                              | 48 |
| 3.3.10.3. VEGFR2 geninin ifade düzeyinin kantitatif analizi                                              | 49 |

|                                                                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.10.4. COX-2 geninin ifade düzeyinin kantitatif analizi                                                                  | 50        |
| 3.3.10.5. GAPDH geninin ifade düzeyinin kantitatif analizi                                                                  | 50        |
| 3.3.10.6. VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2, COX-2 ve GAPDH genleri için<br>Real Time PCR tepkime karışımları                          | 51        |
| 3.3.10.7. Light Cyclor (LC) deney programı                                                                                  | 51        |
| 3.4. Matrigel hücre invazyon testi                                                                                          | 53        |
| 3.5. Transwell hücre migrasyon testi                                                                                        | 54        |
| 3.6. İstatistiksel analiz yöntemleri                                                                                        | 54        |
| <b>4. BULGULAR</b>                                                                                                          | <b>56</b> |
| 4.1. MDA-MB-231 Hücrelerinin Bevacizumab' a duyarlılığının XTT<br>Hücre Canlılığı Yöntemi ile İncelenmesi                   | 56        |
| 4.2. Canlı, apoptotik ve nekrotik hücre dağılımının floresan<br>mikroskopunda incelemesi                                    | 57        |
| 4.3. Besiyerine salınan laktat dehidrojenaz (LDH) miktarının ölçülerek<br>sitotoksik etkinin belirlenmesi                   | 61        |
| 4.4. Hücre çoğalmasının bromodeoksiuridin (BrdU) ile belirlenmesi                                                           | 62        |
| 4.5. DNA fragmentasyonunun ELISA yöntemi ile belirlenmesi                                                                   | 63        |
| 4.6. DNA fragmentasyonunun agaroz jel elektroforezi ile<br>gösterilmesi                                                     | 63        |
| 4.7. Gen ifade düzeylerinin kantitatif değerdendirilmesi                                                                    | 64        |
| 4.8. Gen ifade düzeylerinin karşılaştırması                                                                                 | 67        |
| 4.8.1. Bevacizumab' ın VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2 ve COX-2<br>genlerinin ifade düzeylerine 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki etkisi | 67        |
| 4.9. Hücre invazyonu                                                                                                        | 70        |
| 4.10. Hücre migrasyonu                                                                                                      | 73        |
| <b>5. TARTIŞMA</b>                                                                                                          | <b>74</b> |
| <b>6. SONUÇ</b>                                                                                                             | <b>82</b> |
| <b>7. ÖZET</b>                                                                                                              | <b>84</b> |

|                     |            |
|---------------------|------------|
| <b>8. SUMMARY</b>   | <b>86</b>  |
| <b>9. KAYNAKLAR</b> | <b>88</b>  |
| <b>10. EKLER</b>    | <b>114</b> |
| <b>11. ÖZGEÇMİŞ</b> | <b>115</b> |



## ŞEKİLLER ve GRAFİKLER

|                                                                                                                        | Sayfa No |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>Şekil 1:</b> Meme yapısı                                                                                            | 3        |
| <b>Şekil 2:</b> Metastaz oluşumunun temel basamakları                                                                  | 10       |
| <b>Şekil 3:</b> Metastazda rol alan genler                                                                             | 11       |
| <b>Şekil 4:</b> Vasküler ağın oluşumu                                                                                  | 13       |
| <b>Şekil 5:</b> Tümörün/mikrovasküler mikroçevrenin moleküler ve hücresel elemanlarından bazıları                      | 16       |
| <b>Şekil 6:</b> VEGF yolağı                                                                                            | 19       |
| <b>Şekil 7:</b> VEGF ailesi ve reseptörleri. sVEGFR-1: çözünebilir VEGFR-1                                             | 22       |
| <b>Şekil 8:</b> Antianjiyogenik baskılamayı sağlayan ajanlar                                                           | 26       |
| <b>Şekil 9:</b> VEGF sinyalinin çeşitli yaklaşımlarla baskılanması                                                     | 28       |
| <b>Şekil 10:</b> Bevacizumab' ın VEGF' yi baskılaması                                                                  | 30       |
| <b>Şekil 11:</b> MDA-MB-231 hücrelerinin morfolojik görüntüsü                                                          | 32       |
| <b>Şekil 12:</b> VEGF-A mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi | 48       |
| <b>Şekil 13:</b> VEGF-C mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi | 49       |
| <b>Şekil 14:</b> VEGFR2 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi | 49       |

|                                                                                                                                                            |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Şekil 15:</b> COX-2 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi                                      | <b>50</b> |
| <b>Şekil 16:</b> GAPDH mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi                                      | <b>51</b> |
| <b>Şekil 17:</b> MDA-MB-231 hücrelerinde apoptozun morfolojik olarak gösterilmesi.                                                                         | <b>57</b> |
| <b>Şekil 18:</b> VEGF-A geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri.                                                | <b>64</b> |
| <b>Şekil 19:</b> VEGF-C geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri.                                                | <b>65</b> |
| <b>Şekil 20:</b> VEGFR2 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri.                                                | <b>65</b> |
| <b>Şekil 21:</b> COX-2 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri.                                                 | <b>66</b> |
| <b>Şekil 22:</b> GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri.                                                 | <b>66</b> |
| <b>Şekil 23:</b> 96. saatte kontrole göre 200 µg/ml Bevacizumab uygulamasından sonra MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonu.                                    | <b>71</b> |
| <b>Şekil 24:</b> 96. saatte kontrole göre 200 µg/ml Bevacizumab uygulamasından sonra MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonu.                                   | <b>72</b> |
| <b>Grafik 1:</b> MDA-MB-231 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Bevacizumab ile 24, 48, 72 ve 96 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları. | <b>56</b> |

- Grafik 2:** MDA-MB-231 hücrelerinin ( $10^6$  hücre/kuyu) 58  
Bevacizumab ile 24 saat inkübasyonu sonunda belirlenen  
Canlı/Apoptotik/Nekrotik hücre oranları.
- Grafik 3:** MDA-MB-231 hücrelerinin ( $10^6$  hücre/kuyu) 59  
Bevacizumab ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen  
Canlı/Apoptotik/Nekrotik hücre oranları.
- Grafik 4:** MDA-MB-231 hücrelerinin ( $10^6$  hücre/kuyu) 59  
Bevacizumab ile 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen  
Canlı/Apoptotik/Nekrotik hücre oranları.
- Grafik 5:** MDA-MB-231 hücrelerinin ( $10^6$  hücre/kuyu) 60  
Bevacizumab ile 96 saat inkübasyonu sonunda belirlenen  
Canlı/Apoptotik/Nekrotik hücre oranları.
- Grafik 6:** MDA-MB-231 hücrelerinin Bevacizumab ile doza ve 61  
zamana bağlı inkübasyonu sonunda görülen LDH salınımı.
- Grafik 7:** MDA-MB-231 hücrelerinin Bevacizumab ile doza ve 62  
zamana bağlı inkübasyonu sonunda görülen DNA sentez  
oranlarındaki değişim.
- Grafik 8:** MDA-MB-231 hücrelerinin Bevacizumab ile doza ve 63  
zamana bağlı inkübasyonu sonunda görülen DNA  
fragmentasyon oranı.
- Grafik 9:** MDA-MB-231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak 68  
Bevacizumab uygulanması sonrasında VEGF-A geninin mRNA  
düzeylerindeki değişiklik.
- Grafik 10:** MDA-MB-231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı 69  
olarak Bevacizumab uygulanması sonrasında VEGF-C geninin  
mRNA düzeylerindeki değişiklik.

**Grafik 11:** MDA-MB-231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı 69 olarak Bevacizumab uygulanması sonrasında VEGFR2 geninin mRNA düzeylerindeki değişiklik.

**Grafik 12:** MDA-MB-231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı 70 olarak Bevacizumab uygulanması sonrasında COX-2 geninin mRNA düzeylerindeki değişiklik.

**Grafik 13:** MDA-MB-231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı 71 olarak Bevacizumab uygulanması sonrasında invazyon yeteneklerindeki değişiklikler.

**Grafik 14:** MDA-MB-231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı 73 olarak Bevacizumab uygulanması sonrasında migrasyon yeteneklerindeki değişiklikler.

## **TABLÖLAR**

|                                                                                                                                                  | <b>Sayfa No</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| <b>Tablo 1:</b> Anjiyogenik ve anjiyogenezi baskılayan faktörler                                                                                 | <b>13</b>       |
| <b>Tablo 2:</b> RT-PCR tepkime karışımı                                                                                                          | <b>47</b>       |
| <b>Tablo 3:</b> Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program                                                                                 | <b>47</b>       |
| <b>Tablo 4:</b> VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2, COX-2 ve GAPDH Real-Time PCR tepkime karışımı                                                            | <b>51</b>       |
| <b>Tablo 5:</b> VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2, COX-2 ve GAPDH genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı | <b>52</b>       |

## SEMBOLLER ve KISALTMALAR

|                         |                                                  |
|-------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>°C</b>               | : Santigrad Derece                               |
| <b>µl</b>               | : Mikrolitre                                     |
| <b>µg</b>               | : Mikrogram                                      |
| <b>ARNT</b>             | : Aril Hidrokarbon Reseptör Nükleer Translokator |
| <b>bç</b>               | : Baz Çifti                                      |
| <b>BRCA-1</b>           | : Breast Cancer-1                                |
| <b>BRCA-2</b>           | : Breast Cancer-2                                |
| <b>BrdU</b>             | : 5-bromo-2'-deoksiüridin                        |
| <b>cDNA</b>             | : Komplementer DNA                               |
| <b>COX-1</b>            | : Siklooksijenaz-1                               |
| <b>COX-2</b>            | : Siklooksijenaz-2                               |
| <b>Cp</b>               | : Crossing point                                 |
| <b>dk</b>               | : Dakika                                         |
| <b>DNA</b>              | : Deoksiribonükleik asit                         |
| <b>dNTP</b>             | : Deoksiribonükleotidtrifosfat                   |
| <b>EDTA</b>             | : Etilendiamintetraasetikasit                    |
| <b>EGF</b>              | : Epidermal Büyüme Faktörü                       |
| <b>ErbB-2</b>           | : HER2/neu                                       |
| <b>FGF</b>              | : Fibroblast Büyüme Faktörleri                   |
| <b>GAPDH</b>            | : Gliseraldehit 3 Fosfat Dehidrojenaz            |
| <b>GCSF</b>             | : Granülosit Koloni Uyaran Faktör                |
| <b>HGF</b>              | : Hepatosit Büyüme Faktörü                       |
| <b>HIF</b>              | : Hipoksi ile İndüklenen Faktör                  |
| <b>IL-8</b>             | : İnterlökin-8                                   |
| <b>LC</b>               | : Light Cyclor                                   |
| <b>LDH</b>              | : Laktat Dehidrojenaz                            |
| <b>MgCl<sub>2</sub></b> | : Magnezyum Klorür                               |
| <b>MMP</b>              | : Matriks Metalloproteinaz                       |
| <b>nM</b>               | : Nanomolar                                      |

|                                 |                                                        |
|---------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <b>NOS</b>                      | :Nitrik Oksit Sentaz                                   |
| <b>NRP</b>                      | : Nörofilin                                            |
| <b>NSAID</b>                    | : Steroid Olmayan Antiinflamatuvar İlaçlar             |
| <b>P53</b>                      | : Protein 53                                           |
| <b>PA</b>                       | : Plazminojen aktivatör                                |
| <b>PCR</b>                      | : Polimeraz Zincir Tepkimesi                           |
| <b>PDGF</b>                     | : Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü                    |
| <b>PDGFR-<math>\beta</math></b> | : Trombosit kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü- $\beta$ |
| <b>PGE2</b>                     | : Prostaglandin E2                                     |
| <b>PGF</b>                      | : Plasental Büyüme Faktörü                             |
| <b>PIGF</b>                     | : Plasenta Büyüme Faktörü                              |
| <b>pmol</b>                     | : Pikomol                                              |
| <b>RAS</b>                      | : Rat Sarcoma Protein                                  |
| <b>Rb</b>                       | : Retinoblastoma                                       |
| <b>REST</b>                     | : Relatif Ekspresyon Software Tool                     |
| <b>RNA</b>                      | : Ribonükleik asit                                     |
| <b>RNase A</b>                  | : Ribonükleaz A                                        |
| <b>Rpm</b>                      | : Dakika Başına Dönme Sayısı                           |
| <b>RTK</b>                      | : Reseptör Tirozin Kinaz                               |
| <b>RT-PCR</b>                   | : Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Tepkimesi         |
| <b>S</b>                        | : Saat                                                 |
| <b>sn</b>                       | : Saniye                                               |
| <b>Sp1</b>                      | : Özgüllük proteini 1                                  |
| <b>TGF- <math>\beta</math></b>  | : Transforme Edici Büyüme Faktörü- $\beta$             |
| <b>TGF-<math>\alpha</math></b>  | : Transforme Edici Büyüme Faktörü- $\alpha$            |
| <b>TIMP</b>                     | : MMP Doku İnhibitörü                                  |
| <b>TIMP-1</b>                   | : MMP Doku İnhibitörü-1                                |
| <b>TIMP-2</b>                   | : MMP doku inhibitörü-2                                |
| <b>TMB</b>                      | : Tetrametilbenzidin                                   |
| <b>TNF- <math>\alpha</math></b> | : Tümör Nekroz Faktörü- $\alpha$                       |
| <b>UPL</b>                      | : Universal Prob Kütüphanesi                           |

|                  |                                                                                                               |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>UV</b>        | : Ultraviyole                                                                                                 |
| <b>V</b>         | : Voltaj                                                                                                      |
| <b>VEGF</b>      | : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü                                                                          |
| <b>VEGF-Trap</b> | : Çözünebilir VEGF Reseptörü                                                                                  |
| <b>VEGFR-1</b>   | : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü-1                                                               |
| <b>VEGFR-2</b>   | : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü-2                                                               |
| <b>VEGFR-3</b>   | : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü-3                                                               |
| <b>VHL</b>       | : Von Hippel-Lindau proteini                                                                                  |
| <b>VPF</b>       | : Vasküler Permeabilite Faktörü                                                                               |
| <b>Wnt</b>       | : Wingless-int 1                                                                                              |
| <b>XTT</b>       | : Sodyum 3'-[1-(fenilamminokarbonil)-3,4-tetrazolyum]-bis<br>(4-metoksi-6-nitro) benzen sulfonik asit hidrat) |



## 1. GİRİŞ

Meme kanseri, genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesine bağlı olarak gelişen ve en sık rastlanan kanser türlerinden biridir. Meme kanseri tedavisinde ilk yaklaşım tümörün cerrahi olarak vücuttan uzaklaştırılmasıdır. Metastaz yapmış meme kanserlerinin tedavisi ise genellikle hormonoterapi, kemoterapi ve radyoterapi şeklindedir.

Birçok fizyolojik olayda normal bir mekanizma olan anjiyogeneze tümör gelişimi sırasında en önemli süreçlerden biri olarak kabul edilmektedir. Anjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler arasındaki dengenin bozulmasıyla birlikte tümör damarlaşmaya başlar ve daha hızlı büyüyerek invaziv özellik kazanır. Anjiyogenezin baskılanmasında önemli bir seçenek olan antianjiyogenik terapi kanser tedavisine ek tedavi yaklaşımları sunmaktadır. Bu alandaki araştırmalarda vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) en önemli hedef moleküllerden biri haline gelmiştir. VEGF proteini, tümör anjiyogenezinde, özellikle endotelial kökenli tümör hücrelerinin sağkalımında anahtar rol oynamaktadır. İnsanda VEGF'nin A'dan E'ye kadar isimlendirilen beş tipi ve bu moleküllerin bağlandığı 3 farklı VEGF reseptörü vardır. VEGF-A molekülü, tirozin kinaz aktivitesine sahip VEGFR-1 ve VEGFR-2 olarak adlandırılan iki reseptöre bağlanır. Meme kanseri dokularında çeşitli anjiyogenik büyüme faktörlerinin ifadelendiği bildirilmesine rağmen bunlardan en fazla ifade edilenin VEGF-A molekülü olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu nedenle VEGF-A molekülünün baskılanması anjiyogenezi inhibe ederek tümör hücrelerinin büyümesini engellemekte ve metastaz yapabilme potansiyellerinin kaybına neden olmaktadır. Bu amaçla Bevacizumab (Altuzan, Avastin) gibi VEGF'ye karşı geliştirilmiş insan

monoklonal antikorları klinikte kullanılmaktadır. Bevacizumab başlıca kolon, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, meme, over ve baş-boyun kanseri gibi birçok kanser türünde ek tedavi olarak uygulanmaya başlanmıştır.

Tümör dokusu içerisinde görülen kılcal damar yoğunluğunun artışı (intratümöral neovaskülarizasyon) meme kanseri gelişiminde potansiyel bir belirteçtir. Meme kanser dokusunda gözlenen intratümöral neovaskülarizasyon sırasında siklooksijenaz 2 geninin (COX-2) yüksek derecede ifade edilmesi, VEGF'nin ifadesindeki artma ve prostoglandin E2 salınımıyla ilişkilidir. Prostaglandin sentezinin COX-2 uyarısı ile artması, kanser hücrelerinin çoğalmasını ve anjiyogenezi uyarırken apoptozu baskılamakta ve metastatik potansiyeli arttırmaktadır.

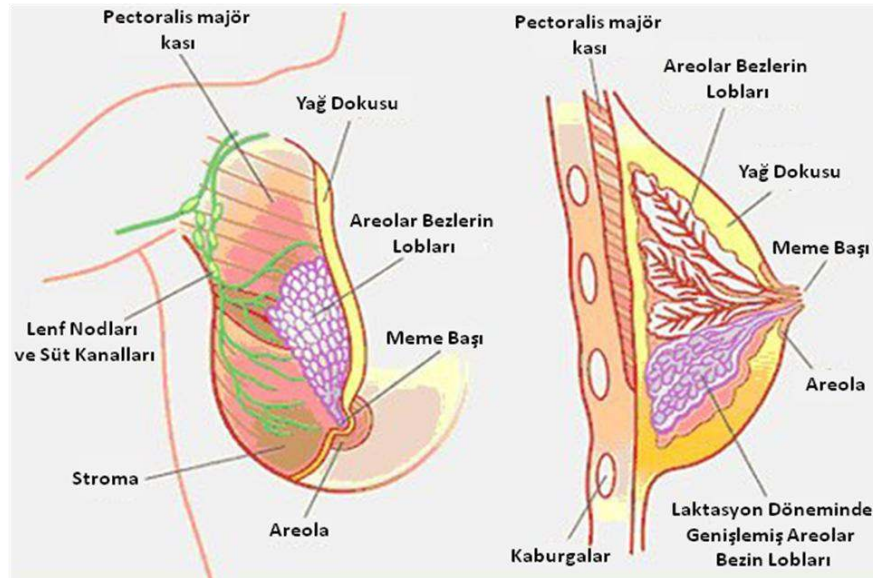
Bu çalışmada, klinikte antianjiyogenik tedavide kullanılan ilaçlardan biri olan Bevacizumab'ın, metastatik meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki antianjiyogenik ve apoptotik etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla Bevacizumab'ın anjiyogenez gelişiminde önemli rolleri olduğu bilinen VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2 ve COX-2 genlerinin mRNA ifade düzeyleri ve MDA-MB-231 hücrelerinin invazyon yetenekleri üzerine etkisi araştırıldı. Ayrıca hücrelerin Bevacizumab'a verdiği apoptotik ve sitotoksik yanıtlar da araştırılarak ilacın hücre ölümüne olan etkisi değerlendirildi.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Meme Yapısı

Yaş ve hormonların etkisi altında belirgin bir iç dinamiğe sahip olan meme, süt üretimi gibi özel bir görevi yerine getirmektedir. Meme bezi önde yüzeysel fasya, arkada ise derin fasya ile sınırlanan bir dokudur. Meme derisinden derin fasyaya doğru uzanan ve memeyi olduğu yere bağlayan “cooper ligamentleri” bulunur. Bu ligamentler kanserin yayılmaması ve ilk belirtilerinin ortaya çıkmasında önem taşımaktadırlar<sup>1,2</sup>.

Meme süt bezleri (lobül) ve süt kanalları (ductus) olmak üzere iki kısımdan oluşur (Şekil 1). Meme dokusunun aksiller bölgeyi de kapsayan üst dış kadranda fazla miktarda bulunması, bu bölümde tümörlerin daha fazla oluşmasına neden olur<sup>3</sup>.



Şekil 1. Memenin Yapısı

Bir kadında memenin büyüklüğü, şekli ve durumu yaşamı boyunca değişim içerisinde ve gebelik, emzirme, menstrual döngü ve menapoz gibi çeşitli fizyolojik durumlarda değişiklik gösterir <sup>4,5</sup>. Memenin makro ve mikro anatomik yapısı bu fizyolojik durumlarda farklı özellikler gösterir <sup>4</sup>.

## **2.2. Meme Kanseri**

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser tipi olmakla beraber birçok ülkede kanser sonucu gerçekleşen ölümlerin en önemli nedenini oluşturmaktadır <sup>6</sup>. Bir kadının yaşamı boyunca meme kanserine yakalanma riski %12.3' olup, kadınlar arasında meme kanseri gelişme riski 1/8 dir. Günümüzde kansere bağlı ölümlerin %18'i ve kadınlarda ortaya çıkan kanserlerin %32'si meme kanserine bağlı olarak gelişmektedir <sup>3,7-9</sup>. T.C. Sağlık Bakanlığı verilerine göre Türkiyede meme kanseri kadınlar arasında birinci sırada yer almaktadır <sup>10</sup>. Tüm meme kanserleri içinde erkeklerde görülen meme kanseri oranı ise %1 civarındadır <sup>11</sup>. Ülkemizde henüz düzenli bir meme kanseri kayıt programı olmadığından, kesin sıklığının belirlenmesi güçtür <sup>12</sup>. Ancak ülkemizde kadınlarda meme kanseri görülme oranı T.C. Sağlık Bakanlığı 2005 yılına ait Sağlık istatistiklerine göre %35.4'lük bir oran ile ilk sırada yer almaktadır <sup>10</sup>. Mevcut verilere göre, doğu bölgelerimizde 20/100.000, batı bölgelerimizde ise 40-50/100.000 oranında bir sıklığın olduğu tahmin edilmektedir <sup>12</sup>.

Meme kanseri, lobüllerin ya da süt kanallarını oluşturan hücrelerden köken almaktadır <sup>13</sup>. Dolayısı ile meme dokusunda, normal hücre davranışını düzenleyen mekanizmaların bozulmasının ve buna bağlı olarak hücrelerin kontrolsüz çoğalmasının ve yayılmasının sonucu olarak meme kanseri oluştuğu söylenebilir <sup>14</sup>. Eğer karsinom süt kanallarında meydana gelirse duktal karsinom, lobüllerde meydana gelirse lobüler

karsinom adını almaktadır <sup>15</sup>. Histopatolojik olarak incelendiğinde meme kanserlerinin % 10'unun lobül, % 90'ının ise duktus epitelinden oluştuğu görülmektedir <sup>14</sup>.

### 2.2.1. Risk Faktörleri

Çok sayıda risk faktörü ile ilişkili olan meme kanserinin, maruz kalınan risk faktörlerinin azalmasına ve artmasına bağlı olarak, görülme sıklığında da farklılıklar ortaya çıkmaktadır <sup>16</sup>. Meme kanserinin gelişiminde genetik faktörlerin yanı sıra minör risk faktörleride önem taşımaktadır. Bunlar arasında erken menarş, geç menopoz, obezitesi olan postmenopozal kadınlar, alkol alımı, düşük doz radyasyon, diabetes mellitus, ileri yaş, pestisitlere maruz kalma, uzun süreli oral kontraseptif ilaç alımı gösterilebilir <sup>17,18</sup>.

#### 2.2.1.1. Yaş

Kadınlarda ileri yaşa sahip olmak meme kanserine yakalanmada etkili olan risk faktörleri arasında incelenmektedir <sup>16, 19</sup>. Özellikle 50 yaş ve üzerinde olan kadınlarda meme kanseri görülme sıklığının arttığı bildirilmiştir. Meme kanseri tanısı konan kadınlar üzerinde yapılan çalışmalarda, hastaların %70'inin 50 yaş ve üzerinde olduğu bildirilmiştir. Elli yaşın altında olan kadınlara göre 50 yaş ve üzerindeki kadınlarda, meme kanseri görülme sıklığının 4 kat daha fazla olduğu bilinmektedir <sup>20</sup>.

#### 2.2.1.2. Kişisel Meme Kanseri Hikayesi

Meme kanseri öyküsü olan ve tedavi gören kadınların, tekrar meme kanserine yakalanma olasılığının, meme kanseri teşhisi konulmamış kadınlara göre 3-4 kat daha fazla olduğu ifade edilmektedir <sup>16, 21</sup>. Ayrıca iyi huylu tümörlerin meme kanseri gelişme riskini değişik oranlarda arttırabildiği belirtilmektedir <sup>21</sup>.

#### 2.2.1.3. Fertil Çağ Süresi

Menarş yaşının erken olması ve menopoza geç yaşta girilmesi fertil çağı uzatmaktadır. Bu durum kadının daha uzun süre östrojen hormonu etkisi altında kalmasına neden olup, meme kanseri gelişme riskini arttırmaktadır <sup>16, 19-22</sup>. Tüm meme kanseri vakalarının %70-80'ini oluşturan sporadik meme kanseri için risk faktörlerinin çoğu östrojen düzeyindeki artışla ya da östrojene uzun süre maruz kalma ile ilişkilidir <sup>14, 23</sup>.

On iki yaşından önce menarş görülmesi durumunda meme kanseri insidansı iki kat artarken, geciken menarşın ise meme kanseri riskini %30-50 oranında azalttığı gösterilmiştir <sup>20</sup>. Hiç doğum yapmamış kadınlarda meme kanseri insidansında artış gözlenmiştir. İlk gebeliği 30 yaşından sonra olan kadınların meme kanserine yakalanma riski, 18 yaşından sonra ilk gebeliği olanlara göre daha yüksektir. Geç menopoza giren kadınlarda da insidans artmış olarak izlenir <sup>17, 24</sup>.

#### 2.2.1.4. Ailede Meme Kanseri Hikayesi

Aile bireyleri arasında meme kanseri öyküsünün olması, kadınların meme kanserine yakalanma riskini arttırmaktadır. Bu kadınların diğer kadınlara nazaran daha dikkatli izlenmeleri gerekmektedir <sup>16, 20, 21, 25, 26</sup>.

Bilateral meme kanseri riski ailesinde meme kanseri olan bireylerde daha sık görülür ve ailede bilateral meme kanseri görülmesi durumu daha erken yaşta meme kanserine yakalanma riskini arttırmaktadır. Daha önce yapılan meme biyopsilerinde sellüler atipi, atipik duktal hiperplazi, lobüler neoplazi, juvenil papillomatozis saptanan kadınlarda meme kanseri riski artmıştır <sup>17</sup>.

#### 2.2.1.5. Kalıtsal Sendromlar

Kalıtsal meme-over kanseri sendromu, bölgeye spesifik herediter meme kanseri, Li-Fraumeri sendromu, Cowden Sendromu, Muir Sendromu gibi kalıtsal bazı sendromlar varlığında da meme kanseri görülme sıklığı artar <sup>14,17</sup>.

#### 2.2.1.6. Hormon Tedavisi

Postmenopozal hormon tedavisinin meme kanseri insidansı üzerine olan etkisi halen tartışmalıdır. Hormon tedavisi sonucunda olguların %36' sında memelerde ağrı uyarılırken %17-32'inde ise mammografik değişiklikler gözlenmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda mamografi sonucunda, postmenopozal hormon tedavisi alan kadınların meme dansitelerinde %25 kadar artış belirlenmiştir <sup>17, 27</sup>.

Menopoz nedeniyle 10 yıldan fazla östrojen tedavisi gören kadınlarda meme kanseri görülme riskinin yükseldiği dikkat çekmektedir <sup>16, 20, 28, 29</sup>.

#### 2.2.1.7. Alkol ve Sigara Kullanılması

Alkol ve sigara kullanımının meme kanseri riski üzerine olan etkisi kesinlik kazanmamakla birlikte alkol kullanan kadınlarda meme kanserine yakalanma riskinin nispeten arttığı ifade edilmektedir <sup>16, 20, 28</sup>. Bunun yanında bazı araştırmalarda sigaranın meme kanserinin oluşması yönünde bir risk faktörü olarak değerlendirilebileceğine dair bulgular elde edilmiştir <sup>16</sup>.

#### 2.2.1.8. Diyet

Kişi başına düşen yağ tüketimi ile meme kanseri arasında doğrudan ilişki bulunmuştur. Bu ilişki postmenopozal kadınlarda, premenopozal kadınlara oranla daha kuvvetlidir ve postmenopozal obezitede risk artar <sup>30, 31</sup>.

#### 2.2.1.9. Genetik Faktörler

Son yıllarda yapılan çalışmalar, özellikle premenopozal meme kanserinin etiyolojisinde genetik faktörlerin ön plana çıktığını göstermiştir. Bu çalışmalarda bazı genlerde mutasyon olması durumunun meme kanseri gelişiminde etkili olduğu bildirilmiştir. Bu genlerden en önemli ikisi breast cancer 1 (BRCA1) ve breast cancer 2 (BRCA2) genleridir. Sırasıyla, 17. ve 13. kromozomlarda yerleşmiş olan bu genlerde mutasyon taşıyanlarda yaklaşık %85 oranında meme kanseri görülür.



Ayrıca BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonları tüm meme kanserlerinin %5'inde görülür <sup>17,30</sup>.

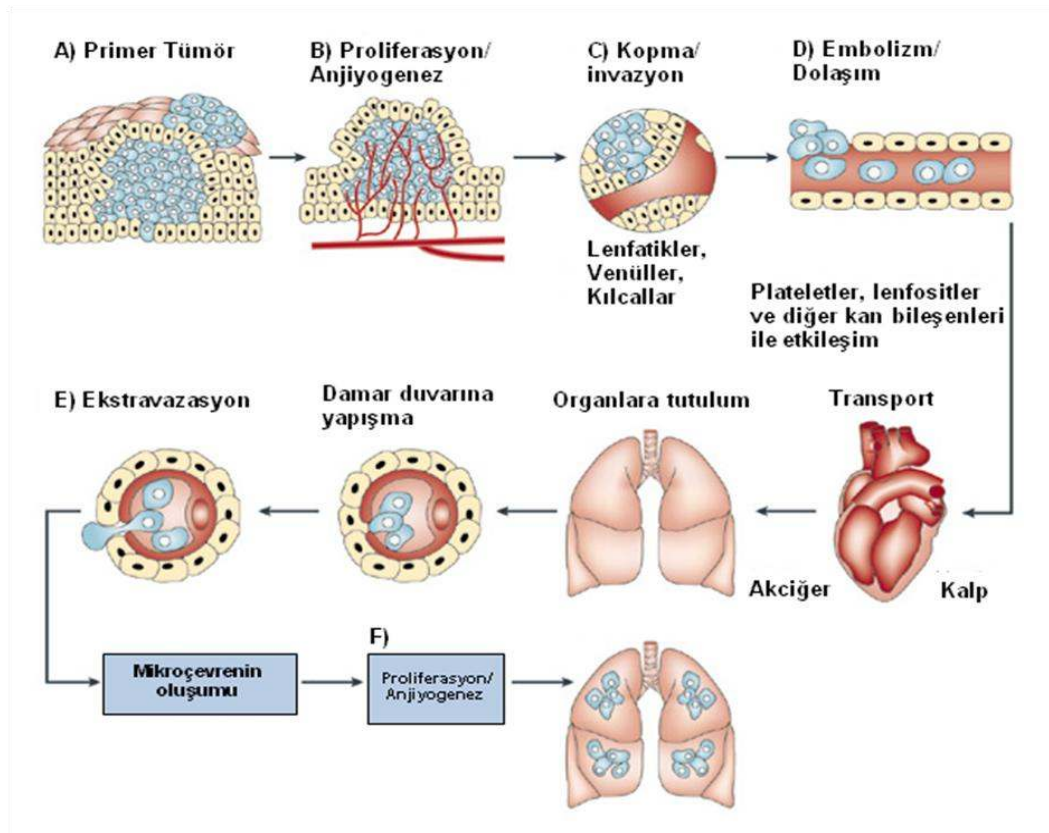
Kolon kanseri gelişiminde olduğu gibi 17. kromozomda yerleşmiş olan protein 53 (P53) tümör baskılayıcı geni de meme kanseri gelişmesinde önemli bir yere sahiptir. Bu genin kaybı ile meme kanseri arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Meme kanseri gelişiminde etkili olan bir diğer gen ise 13. kromozomda bulunan Retinoblastoma (Rb) genidir. Bu gen tümör baskılayıcı bir gendir ve bu lokusta heterojenitenin kaybı premenopozal meme kanserine neden olmaktadır. Yine ErbB-2 (HER2/neu) onkogeninin meme ve over kanseri gelişiminde önemli olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir <sup>32</sup>.

Meme kanserlerinde temel risk faktörleri arasında gösterilen aile hikâyesi, kişide önceden meme kanseri hikayesinin olması, genetik yatkınlık, BRCA1 ve BRCA2 genlerinde mutasyon, önceden geçirilen diğer benign meme hastalıkları önemli bir yere sahiptir <sup>17, 33</sup>. Benign meme hastalıklarından, fibrokistik hastalık, solid veya papiller orta derecede hiperplaziler, fibrovasküler nüveli papilloma, atipik duktal veya lobüler hiperplaziler, neoplaziler (lobüler karsinoma insitu) meme kanseri ile birlikte sıklıkla gözlenmektedir <sup>17, 32</sup>.

### 2.2.2. Meme kanseri metastazı

Meme kanserinde primer tümörün en fazla metastazı bölgesel lenf nodlarına olmaktadır <sup>34, 35</sup>. Erken evre meme kanserleri tedavi edilebilmesine karşın yıllar sonra bile hastaların % 10-20' sinde uzak dokulara metastaz yapabilir. Meme kanseri hücrelerinin metastazları sıklıkla akciğer, karaciğer, kemik, plevra, ve böbreklere olmaktadır <sup>36</sup>.

Metastatik hastalık tam olarak tedavi edilemese bile bazı terapötik yöntemler ile ilerlemesi yavaşlatılabilir <sup>35</sup>. Agresif tümörü olan bazı hastalarda seyir çok hızlı olabilir ve kısa bir sürede ölüme neden olabilir <sup>36</sup>. Tümör metastazının gerçekleşmesi için birçok basamağı içeren bir süreç işler. Metastaz oluşumunun temel basamakları Şekil 2' de gösterilmiştir.



Şekil 2. Metastaz oluşumunun temel basamakları <sup>37</sup>

Şekil 2A' da görüldüğü gibi metastazın başlaması için ilk önce hücresel transformasyon ve tümör gelişimi gereklidir. Eğer tümör yoğunluğu 1-2 mm çapını geçtiyse ileri damarlaşma gerçekleşir. Daha sonra ise anjiyogenik faktörlerin salınımı ile doku çevresinde damar ağı

oluşur (Şekil 2B). Bazı tümör hücreleri stromaya lokal invazyon yapar (Şekil 2C). İnvazyon sonrasında ise tek tek tümör hücrelerinin veya agregatların kopması ile embolizasyon gerçekleşir. Daha sonra dolaşımdaki birçok tümör hücresi hızlı bir şekilde parçalanır. Dolaşımda canlı kalmayı başarabilen hücreler ya kılcal damar endoteline yada endotel altında bulunan membrana yapışarak uzak organların kılcal damar yatağında tutunurlar (Şekil 2D). Ekstravazasyonun da invazyona benzer şekilde gerçekleştiği düşünülmektedir (Şekil 2E). Tümör hücrelerinin tutunduğu organdaki parankimada gerçekleşen hücre çoğalması metastatik sürecin tamamlanmasını sağlar (Şekil 2F). Tümör gelişiminin devamı için damar ağının oluşması gereklidir. Tümör hücreleri tekrar dolaşıma aynı basamakları takip ederek geçebilir ve başka metastaz süreçleri başlayabilir <sup>37</sup>. Metastaz sürecinde işlev gören çok sayıda gen tanımlanmıştır. Bu genlerden bazıları Şekil 3’de görülmektedir.



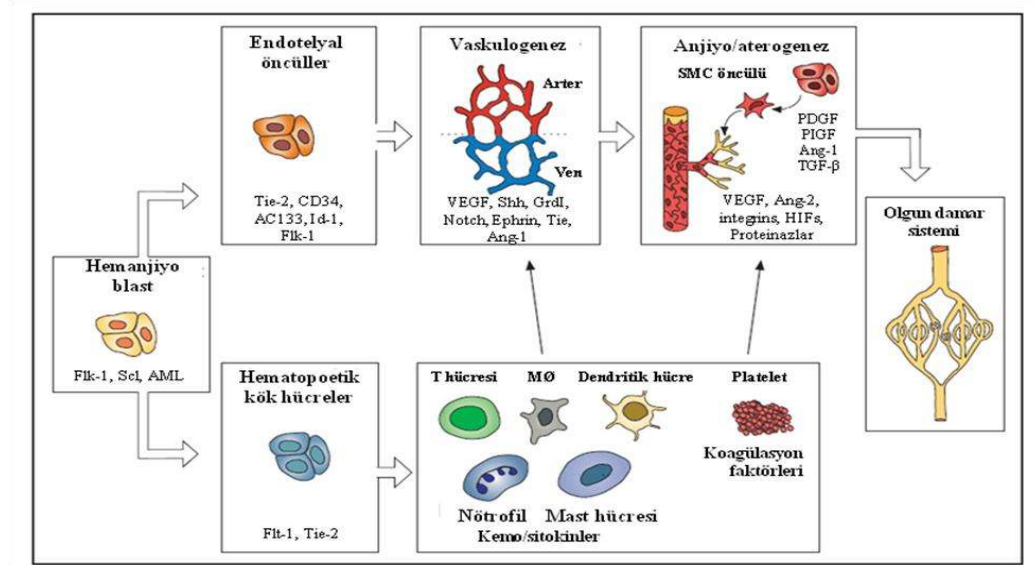
**Şekil 3. Metastazda rol alan genler** <sup>38</sup>

Bütün kanserlerde olduğu gibi meme kanseri metastazında da tümör anjiyogenezi önemli rol oynamaktadır.

### 2.3. Anjiyogenez

Anjiyogenez terimi ilk kez Hertig tarafından 1935 yılında kullanılmıştır <sup>39</sup>. Memeli hücrelerinin yaşamlarını devam ettirebilmesi için besine ve oksijene ihtiyaçları vardır. Besin ve oksijen ihtiyaçlarının karşılanması kan damarları aracılığı ile olur. Endotelyal öncüllerin embriyonik ve embriyo dışı mezoderm içerisinde farklılaşması ile ilkel damarsal ağı oluşturması vaskulogenez olarak adlandırılırken, daha sonra gerçekleşen damar oluşumu ise anjiyogenez olarak adlandırılır <sup>40</sup>. Çok hücreli organizmaların gelişmesi ve gerekli büyüklüğe ulaşabilmeleri için vaskulogenez ve anjiyogenez yolu ile yeni damarların oluşumu gereklidir <sup>40, 41</sup>. Başka bir deyişle mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesi olayına anjiyogenez adı verilir ve vücutta doğal olarak ortaya çıkan bir süreçtir <sup>42</sup> (Şekil 4).

Anjiogenez, embriyoda organ gelişimi için yetişkinlerde ise hasarlanmış olan organların tamiri için büyük önem taşır. Anjiyogenezin sıkı denetlendiği embriyogenez, kadın üreme sistemi ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik durumlar dışında, anjiyogenez organizmada oldukça sınırlıdır <sup>42</sup>. Proanjiogenik ve anti anjiogenik faktörler arasındaki dengenin bozulmasıyla anjiogenezin kontrolü yapılamaz hale gelir. Bu dengesizlik birçok hastalığın patogenezinde önemli rol oynar <sup>43</sup>. Bunun sonucu olarak anjiyogenez işleminin artması çeşitli inflamatuvar hastalıklarda, kanserlerde ve göz hastalıklarında görülür <sup>44-49</sup>.



Şekil 4. Vasküler ağın oluşumu <sup>50</sup>

Anjiyogenez sürecinde görevli olan ve anjiyogenezin baskılanması için gerekli olan bazı faktörler Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Anjiyogenik ve anjiyogenezi baskılayan faktörler

| Anjiyogenik faktörler                                      | Anjiyogenezi baskılayan faktörler        |
|------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| VEGF (Vasküler endotelial büyüme faktörü)                  | Trombospondin- 1                         |
| PGF (Plasental büyüme faktörü)                             | Anjiostatin                              |
| FGF (Fibroblast büyüme faktörü)                            | Endostatin                               |
| TGF- $\alpha$ (Transforme edici büyüme faktörü- $\alpha$ ) | Vazostatin                               |
| TGF- $\beta$ (Transforme edici büyüme faktörü- $\beta$ )   | VEGF inhibitörü                          |
| EGF (Epidermal büyüme faktörü)                             | Trombosit faktör-4 fragmenti             |
| HGF (Hepatosit büyüme faktörü)                             | Prolaktin derivesi                       |
| TNF- $\alpha$ (Tümör nekroz faktör- $\alpha$ )             | Restin                                   |
| PDGF (Trombosit kaynaklı büyüme faktörü)                   | Proliferinle ilgili protein              |
| GCSF (Granülosit koloni uyaran faktör)                     | İnterferon- $\alpha$ - $\beta$           |
| IL-8 (İnterlökin-8)                                        | Anjiopoetin-2                            |
| Anjiyogenin                                                | Antitrombin-3 fragmenti                  |
| Proliferin                                                 | İnterferon ile indüklenebilen protein-10 |
| COX-2 (Siklooksijenaz-2)                                   | Platelet faktör-4                        |
| Efrinler                                                   | TIMP (MMP doku inhibitörü)               |
| PA (Plazminojen aktivatör)                                 | Osteopontin fragmenti                    |
| MMP’ler (Matriks metalloproteinazlar)                      | Maspin                                   |
| Kemokinler                                                 |                                          |
| NOS (Nitrik oksit sentaz)                                  |                                          |
| İntegrinler                                                |                                          |
| VEGFR (VEGF reseptörü)                                     |                                          |

Yeni damar oluşumunun her bir basamağında özel moleküllerin işlevi ve varlığı gerekmektedir. Buna göre yeni damar oluşumunda rol alan moleküllerin katıldıkları basamaklar aşağıdaki gibidir:

- Bazal membranın proteolitik enzimler tarafından yıkılması  
Endotel hücrelerinin invazyon ve göç süreçlerinde plazminojen aktivatör (PA) ve matriks metaloproteinazlar (MMP) görev yapar <sup>51-53</sup>.
- Endotel hücre aktivasyonu, proliferasyonu ve göçü  
Anjiyogenik uyarı ile aktifleşen endotel hücrelerin ekstraselüler matrikse göç etmesi sırasında vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) görev alır <sup>54</sup>.
- Tübül oluşumu ve olgunlaşma, damar stabilizasyonu ve ekstraselüler matriksin yeniden şekillenmesi

Fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve VEGF gibi büyüme faktörlerinin aktivasyonu, hücrelerin çoğalmasını ve ekstraselüler matriks içine göç etmesini uyarır ve bu arada ekstraselüler matriks bileşenleri yıkılır. Büyüme faktörlerinin baskılanması sonucu anjiyogenez baskılanır ve ekstraselüler matriksin proteolitik yıkımı engellenerek yeni oluşmuş kılcalların etrafında matriks bileşenleri sentezlenir <sup>55</sup>.

### 2.3.1. Tümör anjiyogenezi

Folkman ve arkadaşları 1971 yılında tümör gelişiminin anjiyogeneze bağımlı olduğunu göstermişlerdir <sup>56</sup>. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, bir araya getirilen bulgular sonucunda da tümör dokularında anjiyogenezin uyarıldığı kanıtlanmıştır <sup>57</sup>. Anjiyogenez tümör oluşumunu tek başına başlatamaz, ancak tümörün ilerlemesini ve metastazını uyarır. Tümör hücrelerinin aksine anjiyogenezde rol alan

endotel hücreler genomik olarak kararlıdır ve antianjiyogenik terapiye direnç göstermediğinden ideal bir terapötik hedef olarak gösterilebilir <sup>50</sup>.

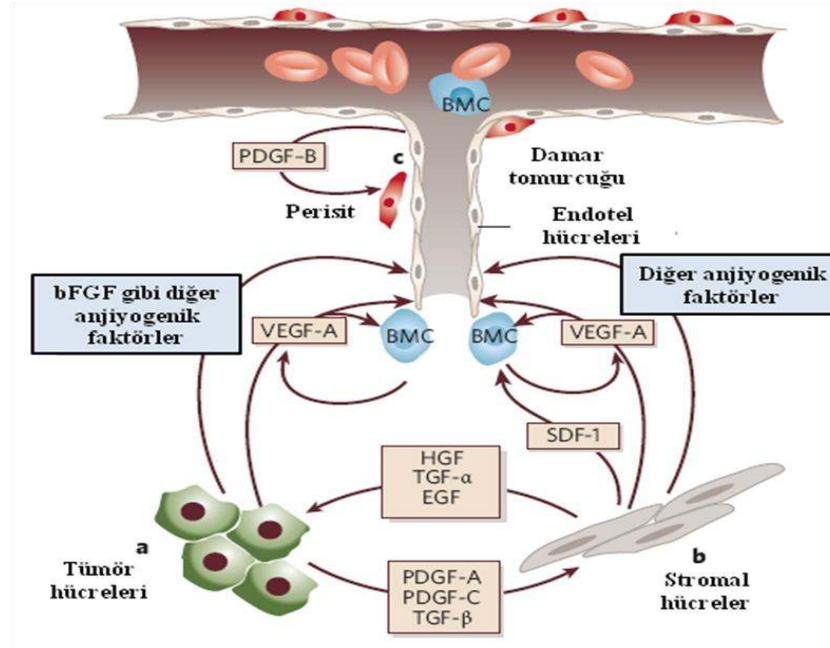
Tümörün büyümesi sırasında mikrodamarlar, tümöre besin ve oksijen sağlamak amacıyla sayıca artış gösterirler. Bunun nedeni anjiyogenezi uyaran ve baskılayan moleküller arasındaki dinamik dengenin bozulmasıdır. Bu dengenin bozulmasında ise tümör ve endotel hücreleri arasındaki etkileşim temel rol oynamaktadır <sup>48, 55, 58</sup>.

Anjiyogenezin, tümör dokusunun büyümesindeki rolünün yanı sıra metastazı kolaylaştırdığı, deneysel ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir <sup>58, 59</sup>. Metastazın başlangıcında ve sonunda anjiyogeneze ihtiyaç vardır. Tümör hücresi metastaz yapmış olsa bile hedef organda hemen damar oluşumunu sağlayamayabilir ve mikroskobik düzeyde kalabilir <sup>55, 60</sup>. Metastatik özelliğın anjiyogenezin şiddetine bağılı olduğı klinik veriler tarafından da desteklenmektedir <sup>61, 62</sup>.

Tümörün büyüklüğü 0,5 mm<sup>3</sup>'ün üstüne çıktığında tümörün beslenmesi anjiyogeneze bağımlı iken, 0,5 mm<sup>3</sup>'den daha küçük bir tümör, oksijen ve gıdayı difüzyon yolu ile alabilmektedir <sup>47, 63</sup>. Hipoksi ve anjiyogenez ile ilişkili moleküller (VEGF, FGF, TGF-beta, PDGF) sayesinde tümör hücrelerinin anjiyogenezi başlatma özellikleri artmaktadır <sup>64</sup>. Anjiyogenezi uyarmak için yalnızca anjiyogenik faktörlerin artması yeterli olmayıp, anjiyogenez inhibitörlerinin de azalması gereklidir <sup>48</sup>.

Anjiyogenez, endotelial hücrelerden salınan çeşitli büyüme faktörleri ve hücre adezyon moleküllerinin birlikte çalışmasını gerektirir <sup>54, 65, 66</sup>. Yirmi yıldan fazla bir süredir birçok potansiyel anjiyogenik faktör keşfedilmiştir <sup>66, 67</sup>. Tümör hücreleri tarafından salınan VEGF-A, Plasenta

büyüme faktörü (PIGF), VEGF-C, FGF, anjiyopoietinler ve interlökin-8 gibi birçok anjiyogenik faktör vardır. Tümör hücreleri aynı zamanda PDGF-A, PDGF-C ve TGF- $\beta$  gibi stromal hücre toplanma faktörleri de salgılayabilirler. Tümör oluşumu sırasında endotelial hücreler, trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü- $\beta$  (PDGFR- $\beta$ ) aktivasyonunu takiben mikrodamarlaşmada perisitlerin toplanmasını uyaran PDGF-B üretirler<sup>68</sup>,<sup>69</sup> (Şekil 5). Tümör anjiyogenezi esnasında gerçekleşen olaylar ve gerekli olan moleküllerin tümü göz önüne alındığında yeni damarların oluşması ve olgunlaşması oldukça karmaşık ve koordineli bir süreç gerektirdiği görülmektedir<sup>50, 68</sup>.



**Şekil 5. Tümörün/mikrovasküler mikroçevrenin moleküler ve hücresel elemanlarından bazıları<sup>70</sup>.**



#### 2.3.1.1. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)

İlk defa 1983 yılında Senger ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Bu protein, kobay derisinde bir vasküler sızıntı başlattığı için tümör vasküler permabilite faktörü (VPF) olarak isimlendirilmiştir <sup>71</sup>. 1989 yılında Ferrara ve arkadaşları vasküler endotelyal büyüme faktörünü sığır foliküler hücre besiyerinden izole etmişlerdir <sup>72</sup>.

VEGF protein ailesi VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve PlGF adı verilen altı üyeden meydana gelmektedir <sup>54, 73, 74</sup>.

##### 2.3.1.1.1. VEGF-A

VEGF-A ve reseptörü bu güne kadar anjiyogenezdeki sinyal yollarında en iyi tanımlanmış moleküllerdir <sup>54, 65, 66</sup>. *In situ* hibridizasyon yöntemiyle birçok tümörde VEGF-A mRNA ifadesi arttığı gösterilmiştir <sup>75</sup>. Birçok tümör hücre hattı *in vitro* koşullarda VEGF-A salgılar. *In situ* hibridizasyon çalışmaları, akciğer, meme, gastrointestinal sistem, böbrek, mesane, over ve endometriyum kanserlerinde VEGF ifade düzeyinin arttığını göstermiştir <sup>69</sup>. Tek bir VEGF-A alelinin bile kaybı embriyonik kayıplara neden olmaktadır <sup>54, 65, 66</sup>.

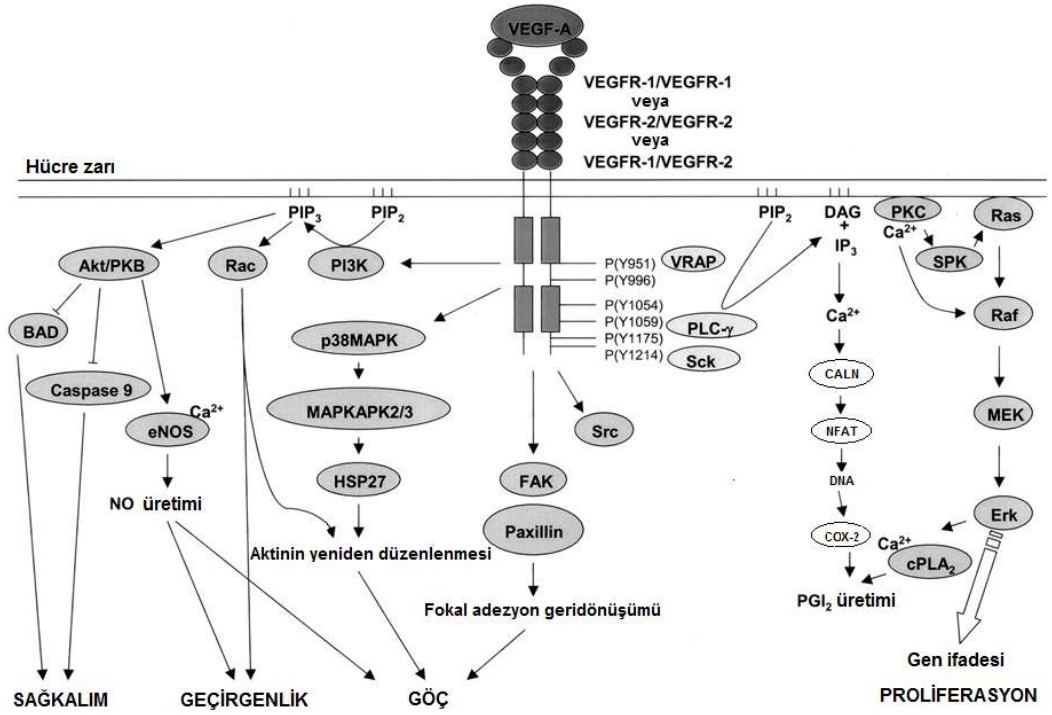
Alternatif intron kesimleme mekanizması ile 121, 165, 189 ve 206 aminoasit içeren 4 farklı izoform oluşur (sırasıyla VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> ve VEGF<sub>206</sub>) <sup>76,77</sup>. Doğal VEGF 45 kD' luk heparin bağlı homodimerik bir glikoproteindir <sup>72</sup>. Bu özellik daha çok majör VEGF izoformu olan VEGF<sub>165</sub>' e aittir. VEGF<sub>121</sub> ise asidik bir polipeptittir ve heparin bağlanma bölgesi bulunmaz. VEGF<sub>189</sub> ve VEGF<sub>206</sub> oldukça bazik ve heparine yüksek afinite ile bağlanan iki izoformdur <sup>78</sup>. Heparin

bağlanma bölgesinin kaybı VEGF' nin mitojenik aktivitesinin düşmesi ile sonuçlanmaktadır<sup>79</sup>.

VEGF-A geninin ifadesi hipoksi durumlarında artar. Hipoksi ile indüklenen faktör (HIF) adı verilen transkripsiyon faktörü VEGF-A düzenlenmesinde önemli rol alır<sup>80</sup>. Bazik, heterodimerik, heliks-loop-heliks proteini olan HIF-1 iki alt ünite içerir. Bunlar HIF-1 $\alpha$  ve aril hidrokarbon reseptör nükleer translokator (ARNT) olarak bilinen HIF-1 $\beta$  dır. Hipoksi durumunda HIF-1 özgül enhancer bölgesine bağlanarak gen ifadesini artırır<sup>81</sup>.

Onkogenik mutasyonlar veya RAS (Rat sarcoma protein) amplifikasyonları VEGF' nin aşırı ifade edilmesine neden olur<sup>82, 83</sup>. Wnt (Wingless-int 1) sinyal yolağındaki mutasyonlar sıklıkla premalignant kolonik adenomlar ile ilişkilidir ve VEGF' nin aşırı ifade edilmesi ile sonuçlanır<sup>84</sup>.

VEGF-A, VEGF Reseptörü-1 (VEGFR-1, Flt-1) ve VEGF Reseptörü-2 (VEGFR-2, KDR, Flk-1) olmak üzere iki farklı reseptör tirozin kinaza (RTK) bağlanabilme özelliğine sahiptir. Bu iki reseptörden VEGFR-2, VEGF-A' nın mitojenik ve anjiyogenik etkisinin başlıca aracısı olarak görev yapar. VEGF-A'nın hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanmasını takiben hücresel sinyal yollarının aktifleşmesi sonucunda, hücre sağkalımı, hücresel geçirgenlik, hücre göçü, prostaglandin üretimi ve hücre çoğalması olayları gerçekleşir (Şekil 6)<sup>85</sup>.



Şekil 6. VEGF Yolağı<sup>85</sup>

#### 2.3.1.1.2. VEGF-A Geni

VEGF-A, PlGF, VEGF-B, VEGF-C ve VEGF-D' nin de bulunduğu bir gen ailesinin üyesidir<sup>86-92</sup>. Memelilerde bulunan vasküler endotelial büyüme faktörü genlerinden biri olan VEGFA geni, 6. kromozomun kısa kolu üzerinde yerleşik (6p21), 16.304 bp uzunluğunda ve 8 eksondan meydana gelmektedir. 232 amino asitlik, 27 kDa ağırlığında bir proteini şifreler<sup>93</sup>. Genin 2.4 kb'lık TATA-kutusu içermeyen promotöründe 3 adet SP-1, 4 adet AP-1 ve 2 adet AP-2 transkripsiyon faktörleri için bağlanma dizisi bulunmaktadır. Sekiz eksona sahip VEGFA geni, transkripsiyon sonrası alternatif splicing ile 4 farklı izoform oluşturmaktadır. En kısa izoform VEGF121 ekson 1-5-8, VEGF165 ekson 1-5-7-8, VEGF189 ve VEGF206 proteinlerinin mRNA'ları ise tüm sekiz eksonu da içermektedir ancak 6. eksondaki 5' splice donor bölgesinin

kullanım farkına bağılı olarak VEGF189 ve 206 izoformları çeşitliliğı meydana getirmektedir. Genin transkripsiyonel aktivasyonu HIF-1'in, VEGF promotöründe yerleşik 28 bç'lik hipoksi ile indüklenen enhancer dizisine bağlanmasıyla sağlanır<sup>94</sup>.

#### 2.3.1.1.3. VEGF-C

VEGF-C, VEGF-benzeri protein olarak da bilinir ve salınımı çoğunlukla kalp, plasenta, kas, over ve ince bağırsaktan olur. VEGF-A ile %16'sı benzeyen 388 amino asitten oluşmuştur<sup>74, 89</sup>. Çeşitli insan tümörlerinde de yüksek VEGF-C düzeyi gösterilmiştir. Lenfatik damarların oluşmasında (lenfanjiogenez) ve lenf nodu metastazında rol oynadığı gösterilmiştir. VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak vasküler ve lenfatik endotelial hücrelerde mitojenik etki yapar<sup>54, 74, 95</sup>.

#### 2.3.1.1.4. VEGF-C Geni

VEGF-C geni 4. kromozomun kısa kolu üzerinde yerleşik (4q34), 109.207 bç uzunluğunda 7 eksondan oluşmaktadır. 419 amino asitlik bir proteini kodlamaktadır ve bulundurduğu sinyal peptid dizisinin iki farklı kesimi 23 kDa ve 32 kDa ağırlığında biyoaktif formlarını meydana getirmektedir<sup>96</sup>. Bunun dışında VEGFC'nin 3 farklı alternatif splicing formu rapor edilmiştir. VEGF ailesi proteinlerinin genleri TATA-kutusu bulundurmamaktadır ve transkripsiyonları çeşitli heterojen cis-elementlerce sağlanmaktadır. Ayrıca, VEGF-A'nın aksine, VEGF-B promotöründe olduğu gibi VEGF-C promotörü de hipoksi ile düzenlenen çeşitli faktörlerin tanıma dizilerini içermemektedir<sup>97</sup> ve bu nedenle bu genlerin transkripsiyonları mRNA düzeyinde hipoksi ile kontrol edilmemektedir<sup>98</sup>. IL-1 ve TNF- $\alpha$  ile sağlanan VEGF-C indüksiyonunun,

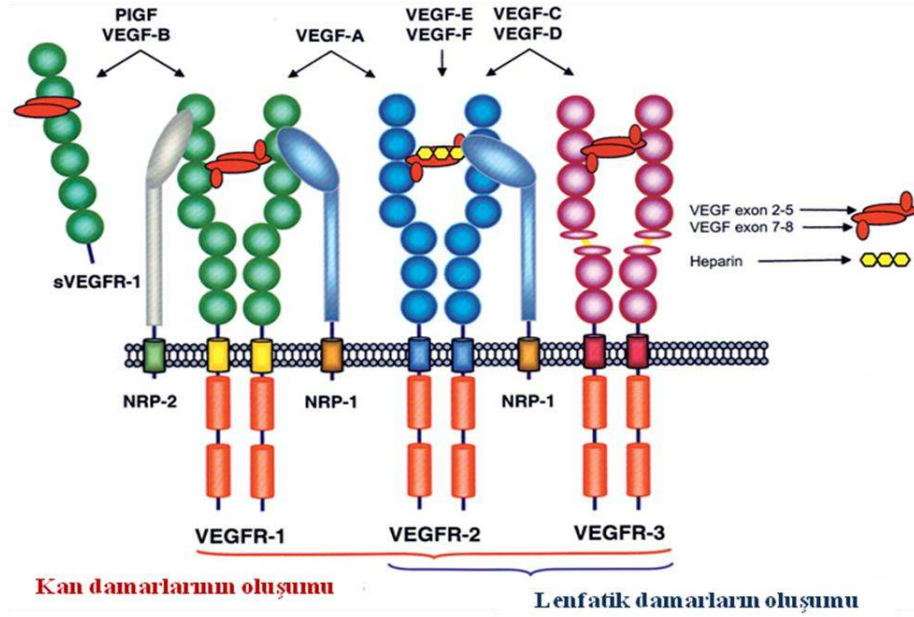
önemli bir transkripsiyon faktörü olan NF- $\kappa$ B aracılığıyla olduğu düşünülmektedir<sup>99, 100</sup>.

#### 2.3.1.2. VEGF reseptörleri

VEGF moleküllerinin bağlandığı 3 tip reseptör vardır. VEGF-A molekülü reseptör tirozin kinaz olan VEGFR-1 ve VEGFR-2 moleküllerine bağlanır. İki reseptörde hücre dışı kısmında 7 tane immunoglobülin benzeri bölge içerir ve korunmuş tirozin kinaz dizisi bulundurur<sup>101, 103</sup>. Aynı aile üyelerinden olan VEGF Reseptörü-3 (VEGFR-3, Flt-3) ise VEGF-A reseptörü değildir ancak onun yerine lenfanjiyogenik faktörler olan VEGF-C ve VEGF-D' ye bağlanır<sup>104, 105</sup> (Şekil 7).

##### 2.3.1.2.1. VEGFR-2

VEGFR-2, VEGF-A' ya VEGFR-1' den daha düşük afinite ile bağlanır<sup>106-108</sup>. VEGFR-2, mitojenik, anjiyogenik ve VEGF' nin zar geçirgenliğini artırıcı etkisinde en temel araçtır. VEGFR-2 ligandının bağlanması sonrası dimerize olduktan sonra gerçekleşen tirozin fosforilasyonu mitojenik, kemotaktik ve sağ kalım ile sonuçlanan sinyal oluşumuna neden olur<sup>109</sup>.



Şekil 7. VEGF ailesi ve reseptörleri. sVEGFR-1: çözünebilir VEGFR-1 <sup>110</sup>

VEGF sinyal yolağının uyarılması nörofilin (NRP), heparan sülfat, integrinler ve kaderinler gibi bazı hücre proteinlerinin, ligand ve onların reseptörleriyle etkileşmesi sonucu gerçekleşir. VEGF-A' nın bütün izoformları nörofilin ailesi proteinleri ve heparan sülfat ile ilişki kurar. Nörofilin-1 ve nörofilin-2 sırasıyla VEGFR-2 ve VEGFR-1 ile ilişki kurar ve bu reseptörler ile sinyali hızlandırır <sup>110</sup>.

#### 2.3.1.2.2. VEGFR-2 Geni

VEGFR-2 (FLT1/KDR) geni 4. kromozomun uzun kolunda yerleşik (4q11-q12), 47.337 bç uzunluğunda ve 26 eksondan oluşmaktadır. 1356 amino asitlik, 152 kDa ağırlığında bir reseptör protein tirozin kinazı kodlamaktadır <sup>111</sup>. VEGF, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-Eb, VEGF-Fc gibi ligandlarca tanınan VEGFR2 proteini, hücre dışı 7 immünoglobulin-benzeri domain, 1 transmembran segment, 1 membranla

bitişik segment, hücre içi 70 amino asitlik protein-tirozin kinaz domaini ve 1 karboksil-uç domaini içermektedir <sup>112</sup>.

#### 2.3.1.3. Siklooksijenaz Enzim Sistemi

Siklooksijenaz enzimleri, araşidonik asitten tromboksan ve prostaglandinlerin sentezini gerçekleştirir. Bu enzimlerin, siklooksijenaz-1 (COX-1) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) olmak üzere iki farklı izoformu vardır <sup>113, 114</sup>. COX-1 birçok organ ve dokuda sürekli ifade edilirken, COX-2 inflamasyon ve kanser gibi bazı patolojik durumlarda ifade edilir <sup>115, 116</sup>. COX-1, mukozal koruma, trombosit agregasyonu, renal kan akımı gibi fizyolojik işlevleri sürdürmede önemli rol oynar <sup>116, 117</sup>. COX-2 ise mitojenik uyarılar, büyüme faktörleri, sitokinler, tümör uyarıları, iyonize radyasyon, hipoksik koşullar ve karsinojenler tarafından uyarılabilir <sup>115, 118</sup>.

##### 2.3.1.3.1. COX-2 Geni

1991 yılında çeşitli laboratuvarlarda COX aktivitesine sahip ikinci bir gen ürünü, yani COX-2 tanımlanmıştır. COX-2 geni, 1. kromozomun uzun kolu (1q25.2-q25.3) üzerinde yerleşmiştir. Bu gen 8.3 kb uzunluğunda olup, 4.5 kb'lık bir mRNA'yı kodlamaktadır. COX-2 proteini ise 604 amino asit uzunluğunda ve yaklaşık 72 kDa ağırlığında proteindir <sup>119</sup>. COX-2 geninin 5' bölgesinde çok sayıda cis etkili elemanların varlığı bu genin uyarılabilir olmasını sağlamaktadır <sup>120,121</sup>.

COX-2 geni 10 ekson içermekte olup, sinyal peptid bölgesi, dimerizasyon bölgesi, membran bağlanma bölgesi ve katalitik aktivite bölgesi olmak üzere 4 yapısal bileşene sahiptir. Ayrıca 10. ekson, steroid

olmayan anti-inflamatuar ilaçların (NSAID) etkinlikleri için önemli olan özgün amino asit birimlerinin şifrelerini taşır <sup>122</sup>.

#### 2.3.1.3.2. COX-2 ve kanser gelişimi

COX-2 ve kanser gelişimiyle ilgili birçok mekanizma öne sürülmüştür. Yapılan hayvan deneyleri ve insan çalışmalarında COX-2 enzim aktivitesinin fazla olmasının, hücre çoğalması, anjiyogenezin artışı, apoptozun yokluğu, metastaz artışı ve mutajenik etkiye neden olduğu gösterilmiştir <sup>123, 124</sup>.

Diğer kanserlerde olduğu gibi meme kanserinde de COX-2 ifadesinin varlığının hastalığın seyrinin kötü olması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir ve bu molekülün önemi araştırılmaya devam etmektedir <sup>125</sup>. İnvaziv insan meme kanserlerinin %40'ında COX-2'nin ifade edildiği gösterilmiştir <sup>115</sup>.

İyi huylu ve kötü huylu fare intestinal tümörlerinde stromal COX-2 ifadesi, prostoglandin E2 (PGE2) düzeyinin artmasına neden olarak anjiyogenez ve VEGF indüksiyonuna neden olur <sup>126-128</sup>. Ayrıca COX-2'nin anjiyogenez ile ilişkisi, COX-2 pozitif kolon kanseri hücrelerinde diklofenak kullanımı ile anjiyogenezde görülen azalmanın bir sonucu olarak gösterilmiştir. Ardından birçok kanser tipinde COX-2'nin ifadesinde artışın olduğu gösterilmiştir <sup>129, 130</sup>. Çeşitli kanserlerde COX-2 ve tümör içi damar yoğunluğu arasında ilişki olduğu gösterilmiştir <sup>131</sup>. Meme ve serviks kanserinde, VEGF ile beraber damar yoğunluğunun, COX-2 ile birlikte artışı gösterilmiş olup kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir <sup>129, 130</sup>. Kronik inflamasyon, sitokinler vb. uyarılar COX-2 artışına neden olarak yeni



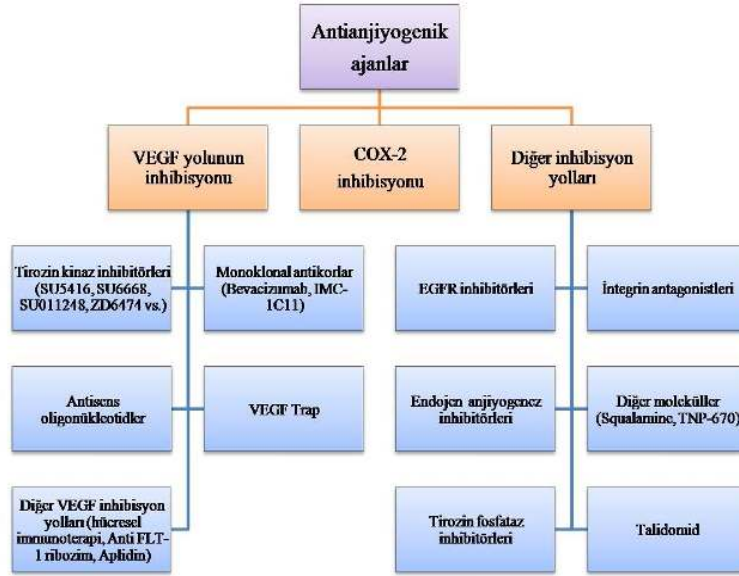
damar oluşumuna yol açarken, COX-2 doğrudan anjiyogenik faktörleri uyarıp, vasküler geçirgenliği artırır <sup>132</sup>.

Kolon kanseri hücrelerinde, COX-2 ifadesindeki artış vasküler endotel hücrelerinin matrikse göç etmelerini sağlarken, *in vitro* ortamda kılcal damarları arttırdığı gözlenmiştir <sup>133</sup>. Ayrıca COX-2 nin genetik kaybı veya baskılanması VEGF üretiminde azalmaya neden olmaktadır <sup>127</sup>. Farelerde oluşturulan anjiyogenez modelinin kullanıldığı bir çalışmada, selektif COX-2 inhibitörünün (celecoxib) korneal damar oluşumunu baskılandığı rapor edilmiştir <sup>129</sup>.

COX-2 enzimi insan kanser hücrelerinin invaziv özelliklerini düzenleyen önemli bir proteindir. Kanser hücrelerindeki yüksek COX-2 ifadesi prostaglandin sentezini arttırmakta ve hücreleri daha invazif hale getirmektedir <sup>134</sup>.

#### **2.4. Antianjiyogenik tedavi**

Anjiyogenez inhibitörleri ilk olarak 1970'li yıllarda çalışılmaya başlanmış ve ardından protamin ve platelet faktör gibi anjiyogenez inhibitörleri ilk defa kullanılmaya başlanmıştır <sup>56, 135, 136</sup>. Daha sonra, anjiyostatik steroidler, fumagillin ve interferon  $\alpha$ -2a' nın antianjiyogenik etkisi keşfedilmiştir <sup>137, 139</sup>. Moleküler biyolojideki gelişmeler sonucunda antianjiyogenik tedavi amacıyla etki mekanizmaları birbirinden farklı olan çok sayıda anti anjiyogenik ajan belirlenmiştir ve klinik kullanıma uygunluğu araştırılmaktadır. Bu ajanlar arasında etkilerini VEGF, COX-2 ve diğer yollar üzerinden gösteren çok sayıda molekül bulunmaktadır (Şekil 8) <sup>140</sup>.



**Şekil 8. Antianjiyogenik baskılamayı sağlayan ajanlar** <sup>140</sup>

Anjiyogenez inhibitörleri çoğunlukla endotel hücrelerine etki ederek tümör gelişimini engeller. Tümör hücrelerinin aksine endotel hücrelerine kan dolaşımı ile ulaşılması daha kolaydır. Doğrudan tümör hücrelerini hedefleyen ilaçlara karşı gelişen direnç antianjiyogenik ilaç kullanımında genellikle oluşmaz. Ayrıca yetişkinlerde anjiyogenez sınırlı olduğundan antianjiyogenik ilaçlara bağlı olarak oluşan yan etkilerin çok az görülmesi beklenmektedir <sup>140,-142</sup>. Anjiyogenez esnasında VEGF, FGF, PDGF, anjiyopoetin 1 ve 2, hepatosit büyüme faktörü (HPG) gibi değişik büyüme faktörleri tirozin kinaz reseptörleri üzerinden endotel hücrelerini uyarmaktadırlar.

Antianjiyogenik ajanların 3 tipi vardır.

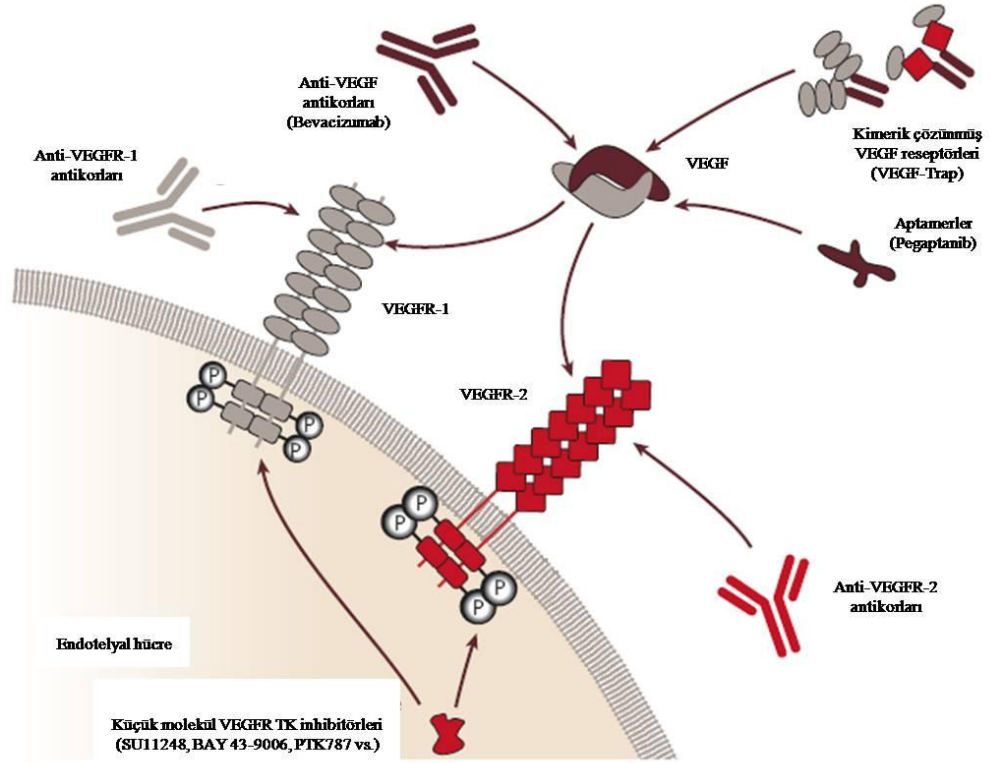
➤ Tip 1 inhibitörler tek bir anjiyogenik proteini baskırlar. Bu gruptan örnek olarak VEGF inhibitörü olan Bevacizumab verilebilir. Tip 1 inhibitörler kematotopatik ajanlar ile birlikte kullanılabilir.

➤ Tip 2 anjiyogenez inhibitörleri ise iki ya da üç anjiyogenik proteinin aktivitesini bloke ederler. Bu şekilde bir inhibitör olan Iressa, VEGF, bFGF ve TGF-alfa' nın ifadesini baskılamaktadır.

➤ Tip 3 anjiyogenez inhibitörleri çok geniş spektrumlu anjiyogenez inhibitörleridir <sup>142, 143</sup>.

Anjiogenez inhibitörleri; tümör hücrelerinden anjiyogenik proteinlerin salgılanmalarını baskılayabilir ya da bu proteinlerin reseptörlerine bağlanmalarını engelleyebilir. Ayrıca bazı anjiyogenez inhibitörleri doğrudan anjiyogenik proteini baskılayarak da etkisini göstermektedir <sup>142, 143</sup>.

VEGF yolağının inhibitörleri, günümüzde üzerinde en çok çalışılan ve klinik olarak kullanımda olan ilaçlar arasında en gelişmiş ajanlardır. Şekil 9' da VEGF yolağının baskılanmasına yönelik çeşitli yaklaşımlar gösterilmiştir. Daha sonraki kısımda ayrıntılı olarak tartışılacak olan VEGF-A inhibitörü Bevacizumab' ın yanında çeşitli küçük moleküller, VEGF reseptörlerini hedef alacak şekilde geliştirilmiştir <sup>70</sup>.



**Şekil 9. VEGF sinyalinin çeşitli yaklaşımlarla baskılanması** <sup>70</sup>

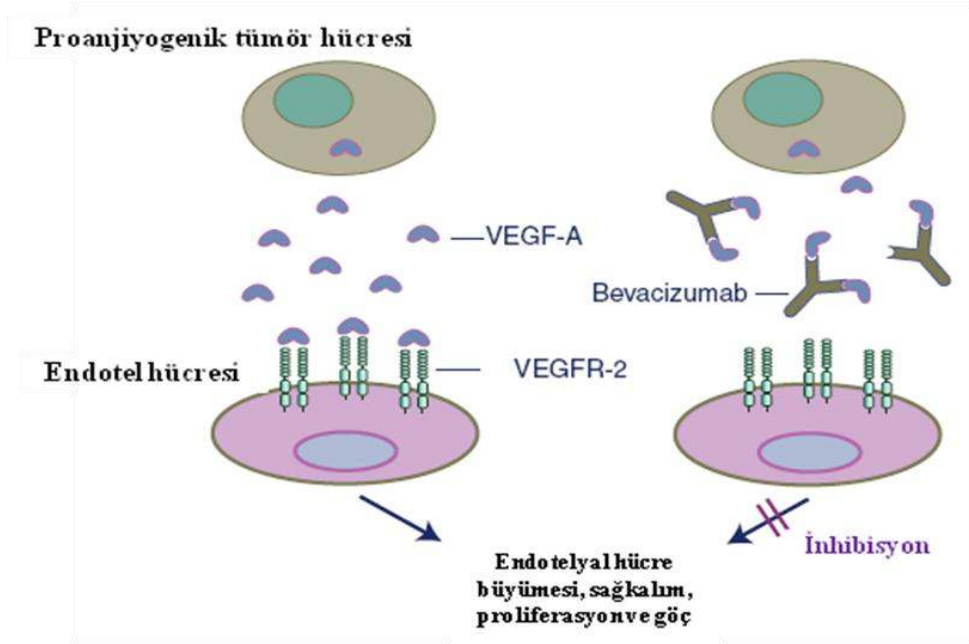
Bu ilaçların dışında son zamanlarda kimerik çözünebilir VEGF reseptörü (VEGF-trap) geliştirilmiştir. VEGF-trap potansiyel anjiyogenez inhibitörüdür ve VEGFR1 ve R2' nin hücre dışı bölgelerini içeren bir füzyon proteinidir. VEGF-trap, VEGF-A'ya bağlanır ve tüm VEGF-A izoformlarını ve plasental büyüme faktörünü nötralize eder <sup>144</sup>.

#### 2.4.1.Bevacizumab

Bevacizumab Amerikan İlaç Komitesi (FDA) tarafından metastatik kolorektal kanser olgularında kullanım onayı verilen ilk antianjiyogenik ajandır <sup>145, 146</sup>. İlk olarak 2004 yılında bağırsak ve akciğer kanserinin tedavisinde standart kemoterapi ile birlikte kullanılmak üzere

onaylanmış, ardından 2008 yılında da meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere onay almıştır <sup>145, 147</sup>. Bevacizumab insan VEGF-A'nın tüm izoformlarını nötralize etmek için tasarlanmış ve fare epitoplarının insanlara uygulanması ile fareden VEGF'ye karşı elde edilmiş monoklonal bir antikordur.

Monoklonal antikorlar tümör hücrelerinde bulunan çeşitli hedef moleküllere yönelik geliştirilmiştir ve son zamanlarda kanser tedavisinde kullanılan en etkin ilaçlar arasında yer almaktadır. Bu ilaçların yüksek düzeyde özgüllüklerinin olması ve düşük toksisite göstermeleri nedeniyle tedavide kullanımları yaygınlaşmıştır. Bir monoklonal antikor olan Bevacizumab Fab antijen bağlanma bölgesi ile ve Fc bölgesi içermektedir ve başlangıçta VEGF-A'ya bağlanır. Bevacizumab VEGF'ye bağlanınca, VEGF'nin endotelial hücreleri yüzeyindeki flt-1 ve KDR reseptörlerine bağlanmasını engeller <sup>145, 146, 147</sup> (Şekil 10). Aynı zamanda, sadece VEGF-A'nın tüm izoformlarını bloke etmekle kalmayıp, proantijenik özelliğe sahip diğer VEGF ailesi üzerinden de etkisini gösterebilir <sup>146, 147</sup>. VEGF aktivitesinin baskılanmasıyla Bevacizumab intraselüler sinyal transdüksiyonunu ve endotelial hücrelerin çoğalmasını ve göçünü önler. Böylece Bevacizumab yeni damar oluşumu ve metastazın engellenmesi ile tümör hücrelerinin sitotoksik ilaçlara duyarlılığını artırır. Ayrıca VEGF'ye bağlanan Bevacizumab'ın FGF, EGF ve PDGF gibi diğer büyüme faktörlerine bağlanmadığı gösterilmiştir



**Şekil 10. Bevacizumab' ın VEGF' yi baskılaması**

Bevacizumab' ın terminal yarı ömrü 17-21 gündür. Bevacizumab' ın keşfinden bugüne kadar birçok kanser türünde çeşitli çalışmalar yapılmıştır <sup>147</sup>. Kolorektal kanser dışında Bevacizumab' ın küçük hücre dışı akciğer kanseri, renal ve meme kanseri gibi diğer tümör tiplerindeki rolü halen araştırılmaktadır <sup>69</sup>. Metastatik kolon kanserinde Bevacizumab' ın kemoterapiye eklendiğinde sadece kemoterapi alanlara kıyasla hastanın ömrünü ve tedaviye cevap verme olasılığını önemli ölçüde arttırdığı görülmüştür <sup>145, 146, 147</sup>. Metastatik kolorektal kanserli hastalarda geleneksel tedaviye kıyasla Bevacizumab' ın klasik IFL (İrinotekan-Fluourasil-lökoverin) ile kombinasyonu hastalarda yaşam süresini önemli derecede arttırmış, tümör progresyonunda ciddi azalmaya neden olmuştur <sup>145, 148</sup>.

Bevacizumab kanser tedavisi sırasında bazı yan etkilere neden olabilmektedir. Gastrointestinal sistem bozuklukları, hipertansiyon, pulmoner hipertansiyon, kardiyovasküler sistem bozuklukları, nöropati, cilt kuruluğu, ciltte renk değişimi bu yan etkiler arasında sayılabilir <sup>149</sup>.

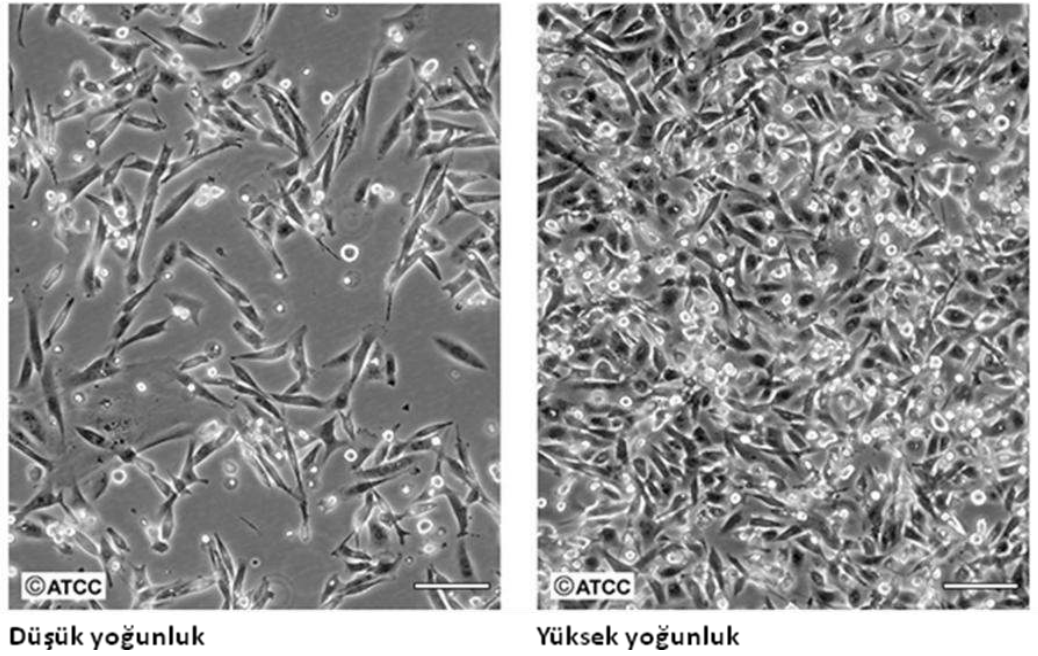
## 2.5. Programlanmış Hücre Ölümü (Apoptoz)

Apoptoz ve nekroz temel hücre ölüm mekanizmalarından ikisini oluşturmaktadır <sup>150, 151</sup>. Hücre ölümü olarak da adlandırılan apoptoz, erişkin yaşamın birçok fizyolojik sürecinde, embriyonik gelişimde, organogenezde ve birçok patofizyolojik durumda görülmektedir. Apoptozun patogenezinde spesifik endonükleazlar aracılığı ile nükleozomlar arasındaki nükleer kromatinin kesimlenmesi sonucunda yaklaşık 200 bp'lik parçacıklar oluşmaktadır. Apoptotik süreç uyarıcı ve baskılayıcı moleküller aracılığı ile kontrol edilir ve bu uyarılar arasındaki denge hücrenin apoptoza veya mitoze girişini belirler <sup>151, 152</sup>. Apoptozun düzenlenmesinde görevli Bcl-2 <sup>153 154</sup>, c-myc <sup>155</sup> ve p53 <sup>152, 154</sup> gibi bazı hücresel moleküller yer almaktadır.

Hücre ölümü, hücre dışından gelen sinyaller, hücre içinden gelen sinyaller ve apoptozu indükleyici faktörler aracılığı ile gerçekleşebilir ve apoptozun uyarılması için sistein proteaz özelliği olan kaspaz enzimlerine ihtiyaç duyulmaktadır <sup>156,157</sup>. Apoptozun düzenlenmesinde Bcl-2/Bax gen ailesi oldukça önemlidir ve bu ailenin antiapoptotik (Bcl-2, Bcl-xL) ve proapoptotik (Bax, Bak) olmak üzere 20 üyesi belirlenmiştir. Bu genlerin arasındaki oran ile hücrenin apoptoza yada mitoze gideceğine karar verilir <sup>158</sup>. Apoptoz genel olarak içsel ve dışsal (reseptör aracılı) yollar olmak üzere iki yolla başlatılabilir <sup>159</sup>. Dışsal yolda dışarıdan gelen sinyale FAS ve TNF reseptörleri gibi hücre zarında bulunan reseptör ile cevap verilirken içsel yolda hücre içi sinyaller ile apoptoz başlatılır <sup>160</sup>. İçsel yolda oksidatif stres ve DNA hasarı gibi uyarılar sonucunda mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c'nin salınması ile kaspaz kaskadı başlatılır <sup>161</sup>. Dışsal yolda daha çok kaspaz-8 görevli iken, içsel yolda kaspaz-9 daha aktiftir. Ancak her iki yolda da kaspaz-3 aktivasyonu sonucu diğer proteazlar ve nükleazlar aktif hale gelir <sup>162</sup>.

## 2.6. MDA-MB-231 Meme kanseri hücre hattı

MDA-MB-231 hücre hattı 1973 yılında M.D. Anderson kanser merkezindeki bir hastadan alınmış ve üretilmiştir. Epitel benzeri morfolojileri ile fenotipik olarak iç şeklindeki hücreler gibi görünürler. *In vitro* olarak, MDA-MB-231 hücre hattı invazif bir fenotipe sahiptir. Bu hücreler östrojen reseptörü içermezler ve mutant p53 proteinini üretirler<sup>163</sup>.



Şekil 11: MDA-MB-231 hücrelerinin morfolojik görüntüsü<sup>163</sup>



### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1 Kullanılan Araç ve Gereçler**

##### **3.1.1. MDA-MB-231 Hücre Hattı**

Çalışmamızda, T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'na bağlı Şap Enstitüsü Müdürlüğü, Hücre ve Virüs Bankası Bölümü'nden alınan insan meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücreleri kullanıldı. (HÜKÜK Kayıt No: 02031201) kullanıldı.

##### **3.1.2. Kullanılan Cihazlar**

- Biyogüvenlik kabini (DanLaf, Danimarka)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Derin dondurucu, -30°C (Sanyo, Japonya)
- Derin dondurucu, -86°C (Sanyo, Japonya)
- Elektroforez tankı (Thermo Scientific, ABD)
- Floresan ataçmanlı mikroskop (Olympus BX-50, Japonya)
- Hassas terazi (AND-ER-182A, Japonya)
- Hybaid PCR-Sprint otomatik ısı döngü cihazı (Thermo Scientific, ABD)
- Invert mikroskop (Zeiss, Almanya)
- Işık mikroskobu (DCM 4000, Leica, Almanya)
- Jel görüntüleme sistemi (Kodak, ABD)
- Karbondioksitli etüv (Sanyo, Japonya)
- LightCycler Real-Time PCR cihazı (Roche, Almanya)
- Manyetik karıştırıcı (TMA 2071, Almanya)
- Mikropipetler, 10µL, 100µL, 100µL (Bt10, Bt100, Bt1000 Biohit, CLP, ABD)

- Mikrolaka okuyucu (BioTek ELx800, ABD)
- pH metre (WTW 422, Almanya)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22 R, Almanya)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000) (Thermo Scientific, ABD)
- Spin vorteks (Biosan, Rusya)

### 3.1.3 Kullanılan Sarf Malzemeler

- Hücre dondurma ampülü (Greiner, Almanya)
- Hücre kültür flaskları, 25 cm<sup>2</sup> ve 75 cm<sup>2</sup> (Corning, ABD)
- Kültür tüpleri (Corning, ABD)
- Mikrosantrifüj tüpleri (CLP, Almanya)
- Petri kabı, 35mm, 60mm ve 100mm (Corning, ABD)
- Pipet uçları (CLP, Almanya)
- Transwell Boyden chamber (8 µm por çapı) (Millipore, ABD)

### 3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Bevacizumab (Avastin, Altuzan) (Roche, Almanya)
- Agaroza (Peqlab, Erlangen, Almanya)
- Akridin Oranj (Sigma, ABD)
- Borik asit (Amresco, ABD)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Amresco, ABD)
- Disodyumhidrojenfosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Sigma, ABD)
- Etanol (Sigma, ABD)
- Etidyum Bromür (Sigma, ABD)
- Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Amresco, ABD)

- Gliserol (Merck, Almanya)
- Glutamin (HyClone, Thermo, ABD)
- İnaktif edilmiş fetal sığır serumu (FCS) (HyClone, Thermo, ABD)
- Nonidet P-40 (NP-40) (Sigma, ABD)
- Orange G (Sigma, ABD)
- Penisilin/Streptomisin (HyClone, Thermo, ABD)
- Primerler (Alfa DNA, Almanya)
- Proteinaz K (Sigma, ABD)
- Ribonükleaz A (Sigma, ABD)
- DMEM besiyeri (HyClone, Thermo, ABD)
- Sitrik Asit (Sigma, ABD)
- Sodyumdihidrojenfosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (Sigma, ABD)
- Sülfirik asit ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (Merck, Almanya)
- Tripsin-EDTA (HyClone, Thermo, ABD)
- Tris (Amresco, ABD)
- Universal Probe Library (UPL) Problemleri (Roche, Almanya)
- Matrigel (B&D Bioscience, ABD)

### 3.1.5. Kullanılan Kitler

- Cell Death Detection ELISA Plus Kit (Roche, Almanya)
- Cell Proliferation ELISA, BrdU (5-bromo-2'-deoksiuridin) (Kolorimetrik) (Roche, Almanya)
- Cell Proliferation Kiti II (XTT) (Roche, Almanya)
- Cytotoxicity Detection Kit Plus LDH (Laktat Dehidrogenaz) (Roche, Almanya)
- High Pure RNA İzolasyon Kiti (Roche, Almanya)
- TaqMan Master Mix (Roche, Almanya)

- Transcriptor First Strand cDNA Sentez Kiti (Roche, Almanya)
- İnsan VEGF ELISA kiti (Thermo, ABD)

### **3.2. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı**

#### **3.2.1. % 10'luk DMEM Besiyerinin Hazırlanışı**

450 ml DMEM besiyeri içerisine, 50 ml fetal sığır serumu (FCS), 200 mM L-glutaminden 10 ml ve son konsantrasyonu 100 IU/ml penisilin ile 100 µg/ml streptomisin olacak şekilde hazırlandı.

#### **3.2.2. % 1'lik DMEM Besiyerinin Hazırlanışı**

495 ml DMEM besiyeri içerisine, 5 ml FCS, 200 mM L-glutaminden 10 ml, 100 IU/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin eklenerek hazırlandı.

#### **3.2.3. XTT Karışımının Hazırlanması**

Tek bir örnek için 50 µL XTT (sodyum 3'-[1-(fenilamminokarbonil)-3,4-tetrazolyum]-bis (4-metoksi-6-nitro) benzen sulfonik asit hidrat) işaretleyici ajan ve 1 µL elektron eşleştirme (N-metildibenzopirazin metil sülfat) ajanı kullanmadan hemen önce karıştırılarak taze olarak hazırlandı.

#### 3.2.4. 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ Çözeltisinin Hazırlanışı

1.42 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tartılarak son hacim 50 ml olacak şekilde distile su içinde çözüldü.

#### 3.2.5. 0.1 M Sitrik Asit Çözeltisinin Hazırlanışı

0.96 g sitrik asit tartılarak son hacim 50 ml olacak şekilde distile su içinde çözüldü.

#### 3.2.6. Fosfat-Sitrat Çözeltisinin (PH: 7.8) Hazırlanışı

0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  çözeltisi ile 0.1 M sitrik asit çözeltisi 48:2 oranında karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan çözeltinin pH'sı 7.8'e ayarlandı.

#### 3.2.7. % 0.25 Nonidet P-40 (Np-40) Çözeltisinin Hazırlanışı

25  $\mu\text{L}$  NP-40 alınarak son hacmi 10 ml olacak şekilde distile suda çözüldü.

#### 3.2.8. 1 mg/ml Proteinaz K Çözeltisinin Hazırlanışı

1 mg Proteinaz K tartılıp son hacim 1 ml olacak şekilde distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

### 3.2.9. 1 mg/ml Ribonükleaz A (RNaz A) Çözeltisinin Hazırlanışı

1 mg RNaz A enzimi tartılıp son hacim 1ml olarak şekilde distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

### 3.2.10. 10X Tris Borat EDTA (TBE) Stok Çözeltisinin Hazırlanışı

Öncelikle 54 g Tris bazı, 27.5 g borik asit ve 20 ml 0.5 M EDTA (pH: 8) bir miktar distile suda çözündükten sonra son hacim 500 ml olacak şekilde üzerine distile su eklendi.

### 3.2.11. 0.5 M EDTA Çözeltisinin Hazırlanışı

29.2 g EDTA, 160 ml distile su içerisinde çözündükten sonra son hacim distile su ile 200 ml'ye tamamlandı ve pH = 8'e ayarlandı.

### 3.2.12. 1X Tris Borat EDTA (TBE) Tamponunun Hazırlanışı

50 ml 10X TBE, distile su ile 500 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

### 3.2.13. Orange G Jel Yükleme Tamponu

55 ml Gliserol, 100 mg Orange G ve 45 ml 1X TBE tamponu karıştırılarak hazırlandı.

#### 3.2.14. Stok Etidyum Bromür Boyasının Hazırlanışı

100 mg etidyum bromür son hacmi 10 ml olacak şekilde distile suda çözülerek hazırlandı.

#### 3.2.15. Agaroj Jelin Hazırlanışı

% 1.5' luk agaroj jel hazırlamak için, 1.52 g agaroj hassas terazide tartıldıktan sonra üzerine son hacmi 100 ml olacak şekilde 1X TBE çözeltisi koyuldu ve mikrodalga fırın kullanılarak kaynatıldı. Agarozun homojen bir şekilde erimesinden sonra içine 3.5 µL etidyum bromür eklendi ve yatay jel elektroforez tankına dökülerek jelin donması sağlandı. Sonra jelin üzerini örtecek şekilde 1X TBE tamponundan eklendi.

#### 3.2.16. 1X PBS Çözeltisinin Hazırlanması

1.09 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.32 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ve 9 g  $\text{NaCl}_2$  tartılıp 800 ml distile su içerisinde çözüldükten sonra pH'sı 7.4'e ayarlanıp son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

### **3.3. Yöntemler**

#### 3.3.1. Hücre Kültürü

MDA-MB-231 hücreleri, %10'luk DMEM besiyerinde %95 nem ve %5  $\text{CO}_2$  içeren ortamda 37 °C'de kültüre edilerek çoğaltıldı.

### 3.3.2. XTT Hücre Canlılığı Deneyi

MDA-MB-231 hücrelerinde Bevacizumab' ın hücre canlılığı üzerine olan etkilerinin belirlenmesi için kolorimetrik XTT test yöntemi kullanıldı. Çoğalan MDA-MB-231 hücreleri yeterli sayıya ulaştıktan sonra 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra pellet üzerine %10 FCS içeren DMEM eklendi. Daha sonra hücreler Thoma lamı ile sayıldı. Hücreler, %10 FCS içeren DMEM içerisinde homojen bir şekilde dağıtıldıktan sonra 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına her kuyucuğa 10.000 hücre / 100 µL olacak şekilde ekildi. Hücrelerin üzerine son konsantrasyonu 50, 100, 150 ve 200 µg olacak şekilde %10'luk DMEM içerisinde seyreltilmiş olan stok Bevacizumab çözeltilerinden eklendi. Daha sonra hücreler 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi. Bevacizumab uygulamasına ait sürelerin dolması ile birlikte her bir kuyucuğa 50 µL XTT karışımı eklendi ve formazan ürününün oluşturduğu renk değişimi 4 saat sonunda mikropılaka okuyucu ile 490 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak belirlendi. Her bir doz için deney 5 tekrarlı yapılarak elde edilen ortalama absorbens değerleri kullanıldı. Sadece besiyeri ve XTT karışımını içeren örnekler absorbensların belirlenmesinde kör olarak kullanıldı. Hücre canlılığının hesaplanması için örneklerin absorbens değerlerinden kör örneğin absorbens değeri çıkartıldı. Daha sonra örneklere ait 5 farklı absorbens değerinin ortalaması alındı. Sadece hücre içeren kontrol örneğinin ortalama absorbensı %100 canlılığa karşılık gelen değer olarak kabul edildi ve ilaç uygulanan hücrelerden elde edilen absorbens değerleri, kontrol hücrelerine göre oranlanarak hücre canlılığı yüzde olarak belirlendi.



### 3.3.3. Canlı, Apoptotik ve Nekrotik Hücre Ayrımının Floresan Mikroskopunda İncelenmesi

Akridin oranj sadece canlı hücrelerin zarından içeri girip bu hücrelerin DNA'sına bağlandığından canlı hücreler yeşil renkte görülür. Etidyum bromür ise ölü hücrelerin zarından geçip DNA'ya bağlandığından, nekrotik hücrelerde kırmızı rengin oluşmasına neden olur. Buna karşın her iki boya da apoptotik hücre zarından içeri girebildiği için sarı-turuncu renkte ve karakteristik apoptotik nükleus görünümünün görüntülenmesine olanak sağlar<sup>164</sup>.

Hücre kültürlerinin sonlandırılmasını takiben hücreler 3 µL, 100 µg/ml akridin oranj ve etidyum bromür içeren çözelti ile boyanarak floresan mikroskopunda canlı, apoptotik ve nekrotik hücre oranlarının belirlenmesi için değerlendirildi.

### 3.3.4. Besiyerine Salınan Laktat Dehidrojenaz (LDH) Miktarının Ölçülerek Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

Glikoliz sırasında laktatın pirüvata dönüşümünü sağlayan LDH molekülü tüm hücrelerde bulunan stabil bir enzimdir. Hücre zarının hasar görmesiyle birlikte hızlı bir şekilde besiyerine salınır. Ölü veya hücre zarı hasarlı olan hücrelerin miktarındaki artış besiyerindeki LDH aktivitesinin artması ile sonuçlanmaktadır. LDH aktivitesindeki bu artış da deney sonunda oluşan renkli formazan kristalinin miktarının artmasına dolayısı ile elde edilen absorbansın yüksek olmasına neden olmaktadır<sup>143,144</sup>. Bu enzimin besiyerindeki aktivitesi Cytotoxicity Detection (LDH) kiti kullanılarak aşağıdaki protokole göre ölçüldü.

1. MDA-MB-231 hücreleri 96'lık kültür kaplarına her bir kuyucuğa 10.000 hücre gelecek şekilde ekildi.
2. İnkübasyon süreleri dolduktan sonra kültür ortamından 100 µL besiyeri alınıp 96 kuyulu mikropiğin her bir kuyucuğuna eklendi.
3. Her bir kuyucuğa kit içerisinde bulunan 100µL taze hazırlanmış reaksiyon karışımı eklendi. Işıktan uzak bir ortamda, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
1. Mikropiğa okuyucu cihazı ile 490 nm dalga boyundaki absorbans değeri okundu.
2. Deney protokolünde kullanılan kontroller:
  - Kör kontrol: Besiyeri
  - Düşük kontrol: Besiyeri+Hücre
  - Yüksek kontrol: Triton X-100 solüsyonu+Besiyeri+Hücre
3. Elde edilen absorbans değeriinden kör kontrolün absorbansı çıkartıldıktan sonra, ilaçların sitotoksite değeriinin yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.  
$$\text{Sitotoksite (\%)} = (\text{örnek abs.} - \text{düşük kontrol abs.} / \text{yüksek kontrol abs.} - \text{düşük kontrol abs.}) \times 100$$

#### 3.3.5. Hücre Çoğalmasının Bromodeoksiüridin (BrdU) ile Belirlenmesi

Bu yöntem, bir primidin analogu olan 5-bromo-2'-deoksiüridin (BrdU) DNA sentezi sırasında timin yerine DNA'ya katılması esasına dayanır. BrdU'nun DNA'ya katılması immunolojik yöntem ile belirlenir. Böylece DNA sentezi geçiren hücre döngüsünün S fazında olan hücrelerin oranları belirlenmektedir <sup>145</sup>.

MDA-MB-231 hücreleri Bevacizumab ile muamele edildikten sonra ilaçların hücre çoğalması üzerine olan etkisi “Cell Proliferation ELISA, BrdU” kiti kullanılarak aşağıdaki protokole göre araştırıldı.

1. MDA-MB-231 hücreleri 96'lık kültür kaplarına her bir kuyucuğa 10.000 hücre gelecek şekilde ekildi.
2. Bir gece sonra belirtilen dozlarda Bevacizumab ile muamele edildi. Her bir konsantrasyon için deney üç tekrarlı yapıldı.
3. İnkübasyon süreleri dolduktan sonra her bir kuyucuğa 10 µL BrdU çözeltisi eklendi. 37 °C'de 2 saat inkübe edildi ve besiyeri uzaklaştırıldı.
4. 200 µL FixDenat çözeltisi eklendi ve 25 °C'de 30 dk inkübe edildi.
5. FixDenat çözeltiside uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyucuğa 100 µL peroksidaz enzimi ile konjuge BrdU antikorunu içeren anti-BrdU-POD solüsyonu eklendi. 25 °C'de 90 dk inkübe edildi.
6. Antikor uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyucuk 300 µL 1X PBS ile 3'er defa yıkandı.
7. Substrat olarak kit içerisinde bulunan tetrametilbenzidin (TMB) çözeltisinden 100 µL eklenerek yeterli renk değişimi gözlenene kadar 25 °C'de 5-30 dk bekletildi.
8. Her bir kuyucuğa 25 µL 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eklenerek karıştırıldı. 5 dakika içinde mikropilaka okuyucu ile 450 nm dalga boyundaki absorbans değerleri belirlendi.

#### 3.3.6. DNA Fragmentasyonunun ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi

1. MDA-MB-231 hücreleri 96 kuyulu kültür kaplarında her bir kuyucuğa 10.000 hücre gelecek şekilde ekildi. Hücrelere daha önce belirtilen

miktarda Bevacizumab verilerek uygun sürelerde inkübe edildi. Her bir konsantrasyon için deney üç tekrarlı yapıldı.

2. İnkübasyon süreleri dolduktan sonra her kuyuya 200 µL lizis tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 30 dk bekletildi.
3. Mikrosantrifüj tüpüne alınan hücre lizatı oda sıcaklığında, 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvıdan 20 µL alınıp streptavidin kaplı mikropalakaya aktarıldı.
5. 80 µL anti-histon biyotin ile anti-DNA POD eklendi ve oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 2 saat süreyle inkübe edildi.
6. Örnekler 300 µL yıkama çözeltisi ile oda sıcaklığında 3 defa yıkandı.
7. Her bir kuyucuğa kit içerisinde bulunan peroksidaz substrat solüsyonundan ABTS 100 µL eklendi. Renk değişimi gözleninceye kadar oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi.
8. 100 µL ABTS durdurucu solüsyonu eklendikten sonra mikropalaka okuyucu cihazı ile 405 nm dalga boyundaki absorbans değerleri okundu.

### 3.3.7. DNA Fragmentasyonunun Agaroz Jel Elektrofrezisi ile Gösterilmesi

1. Her bir doz için  $10^6$  hücre olacak şekilde belirtilen miktarda Bevacizumab verilerek uygun sürelerde inkübe edildikten sonra hücreler 10 ml'lik tüplere alınıp santrifüj edildi.
2. Hücreler 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilip üstte kalan sıvı atıldı. Çökelti üzerine 50 µL fosfat-sitrat tamponu (pH 7.8) eklenerek oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.
3. Karışım 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

4. Süpernatant üzerine 3 µL RNaz A ve 3 µL NP-40 çözeltilerinden eklenerek 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.
5. Bu süre sonunda 3 µL Proteinaz K çözeltisi eklenerek tekrar 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında örnekler elektroforez yöntemi uygulanana kadar +4 °C'de saklandı.

#### 3.3.7.1 Agaroza Jel Elektroforezi

Bunun için daha önceden hazırlanmış olan %1.5'lik agaroz jele DNA örneklerinden 15 µL alınarak, 3 µL Orange G jel yükleme tamponu karıştırılıp jeldeki kuyulara yüklendi. Aynı zamanda kuyulardan birine de 100 baz çiftlik (bp) DNA moleküler ağırlık belirteci yüklenerek 90 dk dakika 75 volt sabit akımda yürütüldü. Süre sonunda "Kodak Gel Logic 100" görüntüleme sistemi kullanılarak jelin fotoğrafı çekildi.

#### 3.3.8. Hücre Kültüründen Total RNA'nın Elde Edilmesi

Bevacizumab ile inkübasyon sürelerinin dolmasıyla, hücrelerden RNA izolasyonu, "High Pure RNA Isolation Kiti" kullanılarak, aşağıda yazılı olan protokole göre biyogüvenlik kabininin içinde yapıldı.

1. Hücrelerin üzerine 200 µL soğuk PBS ve 400 µL Lizis tamponu eklenip 15 saniye vortekslendi.
2. Filtre, toplama tüpüne yerleştirilip tüm karışım filtre üstüne aktarıldı.
3. Tüp 9000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi.
4. Toplama tüpünde toplanan sıvı atılıp filtre aynı tüpe tekrar yerleştirildi.

5. Her bir örnek için 90 µL DNaz inkübasyon tamponu steril tüpe alındı ve 10µL DNaz I eklendi. Pipetaj ile karıştırıldıktan sonra karışım filtrenin ortasına bırakıldı. 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
6. 500 µL'lik 1. yıkama çözeltisi filtre üzerine eklendi ve 9000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Filtre altında toplanan kısım atıldıktan sonra aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
7. 500 µL'lik 2. yıkama çözeltisi filtre üzerine eklendi ve 15 saniye 9000 rpm'de santrifüj edildi. Filtre altında toplanan kısım atıldıktan sonra aynı toplama tüpü içerisine yerleştirildi.
8. 200 µL'lik 3. yıkama çözeltisi filtre üzerine eklendi ve 3 dk 13500 rpm'de santrifüj edildi.
9. Toplama tüpü atıldı. Filtre, steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
10. Filtre üzerine 20 µL örnek seyreltme çözeltisi eklendi ve 9000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
11. Elde edilen RNA'ların miktarları ve saflığı "NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre" cihazında ölçülerek RT-PCR'da kullanılabilecek kadar - 80 °C derin dondurucuda saklandı.

#### 3.3.9. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi (RT-PCR)

Elde edilen RNA'lar spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda ölçülerek mikrolitredeki mikrogram değerleri belirlendi. Primer olarak random hekzamerler kullanılarak cDNA sentez kiti ile total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentezi sırasında kullanılan kimyasallar ve miktarları Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 2: RT-PCR tepkime karışımı.**

|                                   | Son Konsantrasyon           | Hacim                       |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Steril H <sub>2</sub> O-PCR grade | -                           | RNA miktarına göre değişken |
| Reaksiyon Tamponu                 | 1x (8mM MgCl <sub>2</sub> ) | 4µL                         |
| dNTP                              | 1mM                         | 2µL                         |
| Random hekzamer primeri           | 60µM                        | 2µL                         |
| RNaz inhibitörü                   | 20 ünite                    | 0.5µL                       |
| Transkriptor Ters Transkriptaz    | 10 ünite                    | 0.5µL                       |
| Total RNA                         | 1µg                         | 1µg olacak şekilde          |

cDNA için PCR karışımı ince çeperli 0.2 ml'lik tüplere dağıtıldıktan sonra elde edilen total RNA eklendi.

#### 3.3.9.1 Reverse Transkriptaz PCR (RT-PCR) Programı

Otomatik ısı döngüsü cihazı, Tablo 3'de belirtilen programa ayarlanarak cDNA sentezi yapıldı.

**Tablo 3: Otomatik ısı döngüsü cihazında uygulanan program.**

|                     | Sıcaklık | Zaman | Döngü sayısı |
|---------------------|----------|-------|--------------|
| Primer Bağlanması   | 25°C     | 10dk  | 1            |
| Ters Transkripsiyon | 50°C     | 60dk  | 1            |
| İnaktivasyon        | 85°C     | 5dk   | 1            |
| Soğutma             | 4°C      | -     | 1            |

Reaksiyon sonucunda elde edilen cDNA örnekleri Real-Time PCR'da kullanılabilecek kadar -20 °C'lik derin dondurucuda saklandı.

#### 3.3.10. Gen İfadesinin Real-Time PCR ile Belirlenmesi

VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2 ve COX-2 genlerinin mRNA miktarları, Real-Time PCR yöntemi ile Light Cycler (LC) cihazı kullanılarak belirlendi. Amplifikasyonlar 20 µL toplam tepkime hacmi içerisinde; cDNA, mRNA'ya özgü primerler, UPL probu, LightCycler TaqMan Master karışımı ve distile su kullanılarak gerçekleştirildi. VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2 ve

COX-2 gen ifade miktarlarını normalize etmek için GAPDH mRNA düzeyi referans olarak alındı.

#### 3.3.10.1. VEGF-A Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

VEGF-A genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimi ise Şekil 12'de gösterilmiştir.

VEGF-A Forward primer: 5'- AGTGTGTGCCCCACTGAGGA -3'  
VEGF-A Reverse primer: 5'- GGTGAGGTTTGATCCGCATA -3'  
9 numaralı prob dizisi: 5'CATCACCA3'

```

                                     5' -AGTGTGTGCCCCACTGAGGA-3'
781 ATGCGATGCGGGGGCTGCTGCAATGACGAGGGCCTGGAGTGTGTGCCCCACTGAGGAGTCC
                                     5' -CATCACCA-3'
841 AACATCACCATGCAGATTATGCGGATCAAACCTCACCAAGGCCAGCACATAGGAGAGATG
                                     3' -ATACGCCTAGTTTGGAGTGG-5'
```

**Şekil 12: VEGF-A mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000372067 giriş no'lu dizi) Translasyon başlangıç nükleotidine göre numaralandırılmıştır.**

#### 3.3.10.2. VEGF-C Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

VEGF-C genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimi ise Şekil 13'de gösterilmiştir.

VEGF-C Forward primer: 5'- TGCCAGCAACACTACACAG -3'  
VEGF-C Reverse primer: 5'- GTGATTATTCCACATGTAATTGGTG -3'  
27 numaralı prob dizisi: 5'- CAGGCAGC -3'



5' -TGCCAGCAACACTACCACAG-3'

661 GTTCATTCCATTATTAGACGTTCCCTGCCAGCAACACTACCACAGTGT CAGGCAGCGAAC  
5' -CAGGCAGC-3'

721 AAGACCTGCCCCACCAATTACATGTGGAATAATCACATCTGCAGATGCCTGGCTCAGGAA  
3' -GTGGTTAATGTACACCTTATTAGTG-5'

**Şekil 13: VEGF-C mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000280193 giriş no'lu dizi). Translasyon başlangıç nükleotidine göre numaralandırılmıştır.**

### 3.3.10.3. VEGFR2 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

VEGFR2 genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimi ise Şekil 14' de gösterilmiştir.

VEGFR2 Forward primer: 5'-GAACATTTGGGAAATCTCTTGC-3'  
VEGFR2 Reverse primer: 5'- CGGAAGAACAATGTAGTCTTTGCC-3'  
18 numaralı prob dizisi: 5'-CAGCAGGA -3'

5' -GAACATTTG

3421 GACTGCTGGCACGGGGAGCCAGTCAGAGACCCACGTTTTCAGAGTTGGTGGAACATTTG

GGAAATCTCTTGC-3'      5' -CAGCAGGA -3'

3481 GGAAATCTCTTGC AAGCTAATGCT CAGCAGGATGGCAAAGACTACATTGTTCTTCCGATA  
3' -CCGTTTCTGATGTAACAAGAAGGC-5'

**Şekil 14: VEGFR2 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000263923 giriş no'lu dizi) Translasyon başlangıç nükleotidine göre numaralandırılmıştır.**

#### 3.3.10.4. COX-2 Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

COX-2 genine ait UPL prob ve primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir. Prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimi ise Şekil 15' de gösterilmiştir.

COX-2 Forward primer: 5'-TCACGCATCAGTTTTTCAAGA-3'  
COX-2 Reverse primer: 5'-TCACCGTAAATATGATTAAAGTCCAC-3'  
23 numaralı prob dizisi: 5'GGGCTGGG3'

```

                                     5' -TCACGCATCAGTTTTTCAAGA-3'
541 AACATGATGTTTGCATTCTTTGCCAGCACTTCACGCATCAGTTTTTCAAGACAGATCAT
                                     5' -GGGCTGGG-3'
601 AAGCGAGGGCCAGCTTTCACCAACGGGCTGGGCCATGGGGTGGACTTAAATCATATTTAC
                                     3' -CACCTGAATTTAGTATAAAATG
661 GGTGAAACTCTGGCTAGACAGCGTAAACTGCGCCTTTTCAAGGATGGAAAAATGAAATAT
    CCACT-5'
```

**Şekil 15: COX-2 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000367468 giriş no'lu dizi) Translasyon başlangıç nükleotidine göre numaralandırılmıştır.**

#### 3.3.10.5. GAPDH Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

GAPDH genine ait UPL prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimleri Şekil 16' de gösterilmiştir.

GAPDH Forward primer: 5'- AGCCACATCGCTCAGACAC -3'  
GAPDH Reverse primer: 5'- GCCCAATACGACCAAATCC -3'  
60 numaralı prob dizisi: 5'- TGGGGAAG -3'

601 CCTCCTGTTTCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTTTGCCTCGCCAGCCGAGCCACATCGCTCA 5' -AGCCACATCGCTCA

661 GACACCATGGGGAAGGTGAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGTCTGTTATGGGCGCCTGGTC GACAC -3'

5' -TGGGGAAG -3' 3' -CCTAAACCAGCATAACCCG-5'

**Şekil 16: GAPDH mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENST00000229239 giriş no'lu dizi).**

### 3.3.10.6. VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2, COX-2 ve GAPDH

#### Genleri için Real Time PCR tepkime karışımları

VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2, COX-2 ve GAPDH genlerine uygun verilen primer ve probalar kullanılarak Real-Time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan bileşenlerin miktarları Tablo 4'de verilmiştir.

**Tablo 4: VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2, COX-2 ve GAPDH Real-Time PCR tepkime karışımı**

|                          | Son Konsantrasyon | Hacim  |
|--------------------------|-------------------|--------|
| dH <sub>2</sub> O        | -                 | 6.2µL  |
| MgCl <sub>2</sub> (25mM) | 4mM               | 1.2µL  |
| Primer F (10pmol/µL)     | 2.5pmol           | 0.25µL |
| Primer R (10pmol/µL)     | 2.5pmol           | 0.25µL |
| TaqMan prob (100pmol/µL) | 10pmol            | 0.1µL  |
| TaqMan karışımı (10x)    | 1x                | 1µL    |
| cDNA                     | -                 | 1µL    |

### 3.3.10.7. Light Cyclers (LC) Deney Programı

Real-Time PCR karışımları hazırlandıktan sonra kapiller tüplere dağıtıldı ve üzerine cDNA'ler eklendi. Kapiller tüpler 3000 rpm'de 10 sn santrifüj edildi. Tüpler cihaza yerleştirildikten sonra Tablo 5'de belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi

gerçekleştirildi. VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2, COX-2 ve GAPDH genleri için aynı program kullanıldı. Reaksiyon sonucu, VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2, COX-2 ve GAPDH genlerinin mRNA ifade düzeylerini gösteren Crossing point (Cp) değerleri belirlendi. VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2, COX-2 ifade düzeyleri GAPDH ifade düzeyine göre normalize edildi.

**Tablo 5: VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2, COX-2 ve GAPDH genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı.**

| Program 1. Ayrılma (Denatürasyon)                                       |         |         |
|-------------------------------------------------------------------------|---------|---------|
| Program Verisi                                                          | Değer   |         |
| Döngüler                                                                | 1       |         |
| Analiz Modu                                                             | -       |         |
| Sıcaklık Hedefleri                                                      | Kısım 1 |         |
| Hedef Sıcaklık (°C)                                                     | 95      |         |
| İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)                                             | 10:00dk |         |
| Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)                                             | 20.0    |         |
| Program 2. Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon) |         |         |
| Program Verisi                                                          | Değer   |         |
| Döngüler                                                                | 50      |         |
| Analiz Modu                                                             | Çoğalma |         |
| Sıcaklık Hedefleri                                                      | Kısım 1 | Kısım 2 |
| Hedef Sıcaklık (°C)                                                     | 95      | 60      |
| İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)                                             | 10sn    | 20sn    |
| Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)                                             | 20.0    | 10.0    |
| Program 3. Soğutma                                                      |         |         |
| Program Verisi                                                          | Değer   |         |
| Döngüler                                                                | 1       |         |
| Analiz Modu                                                             | -       |         |
| Sıcaklık Hedefleri                                                      | Kısım 1 |         |
| Hedef Sıcaklık (°C)                                                     | 40      |         |
| İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)                                             | 30sn    |         |
| Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)                                             | 20.0    |         |

### 3.4. Matrigel hücre invazyon testi

Matrigel® bir çeşit fare tümör hücre serisinin salgıladığı jelatin, laminin ve başka proteinleri içeren organik karışımın ticari ve yaygın bilimsel ismidir. Bu karışım içeriği itibariyle, dokularda hücrelerin etrafını saran hücre dışı matrikse (Ekstraselüler Matrix, ECM) çok benzediği için, hücre serilerinin laboratuvar koşullarında büyütülmesinde hücrelerin tutunduğu substrat olarak kullanılmaktadır. Ayrıca hücrelerin invazyon yaparken ekstraselüler matriksi parçalama yeteneklerinden dolayı invazyon çalışmalarında matrigel kullanılmaktadır.

Matrigel +4 °C' de bir gece bekletilerek çözüldükten sonra tekrar jel halini almaması için oldukça hızlı bir şekilde serum içermeyen besiyeri ile sulandırılarak 1mg/ml olacak şekilde -80 °C' de saklandı. Çalışmaya başlamadan önce 1 mg/ml matrigel çözüldü ve 24 kuyulu Transwell chamber' da bulunan 8 µm por çapına sahip polikarbonat filtrenin üzeri 30 µg Matrigel ile kaplandı. Hücreler 24, 48, 72 ve 96 saat Bevacizumab' a maruz bırakıldıktan sonra PBS ile yıkandı ve 3 saat süreyle serum içermeyen besiyeri ile muamele edildi. Transwell chamber hazırlandıktan sonra chamber' ın içine belirtilen konsantrasyonlarda Bevacizumab içeren 200 µl serum içermeyen besiyeri içinde 100.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Chamber' ın alt kısmına 750 µl %10'luk serumlu besiyeri eklendi. 24 saat boyunca hücrelerin serum içeren besiyerinin olduğu kısma hareket etmeleri beklendi. 24 saatin sonunda chamber' ın içinde kalan hücreler pipet yardımıyla alındı. Chamberda bulunan filtrenin alt kısmına geçen hücreler PBS ile iki defa yıkandıktan sonra metanol' de 20 dakika bekletilerek fikse edildi. Daha sonra filtre 2 defa PBS ile yıkandıktan sonra 3 dakika hematoksilin ile boyandı. Tekrar PBS ile iki defa yıkandıktan sonra hücreler 30 saniye eosin ile boyandı. Eosin boyamasından sonra filtre 2 defa PBS ile yıkandıktan sonra

Chamber' dan bistüri yardımıyla uzaklaştırıldı. Filtre lamın üzerine yerleştirildikten sonra entellan ile birlikte lamel kapatıldı.

### **3.5. Transwell hücre migrasyon testi**

Hücreler 24, 48, 72 ve 96 saat Bevacizumab' a maruz bırakıldıktan sonra PBS ile yıkandı ve 3 saat süreyle serum içermeyen besiyeri ile muamele edildi. Transwell chamber' ın içine belirtilen konsantrasyonlarda Bevacizumab içeren 200 µl serum içermeyen besiyeri içinde 100.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Chamber' ın alt kısmına 750 µl %10'luk serumlu besiyeri eklendi. 24 saat boyunca hücrelerin serum içeren besiyerinin olduğu kısma hareket etmeleri beklendi. 24 saatin sonunda chamber' ın içinde kalan hücreler pipet yardımıyla alındı. Chamberda bulunan filtrenin alt kısmına geçen hücreler PBS ile iki defa yıkandıktan sonra metanol' de 20 dakika bekletilerek fikse edildi. Daha sonra filtre 2 defa PBS ile yıkandıktan sonra 3 dakika hematoksin ile boyandı. Tekrar PBS ile iki defa yıkandıktan sonra hücreler 30 saniye eosin ile boyandı. Eosin boyamasından sonra filtre 2 defa PBS ile yıkandıktan sonra Chamber' dan bistüri yardımıyla uzaklaştırıldı. Filtre lamın üzerine yerleştirildikten sonra entellan ile birlikte lamel kapatıldı.

### **3.6. İstatistiksel Analiz Yöntemleri**

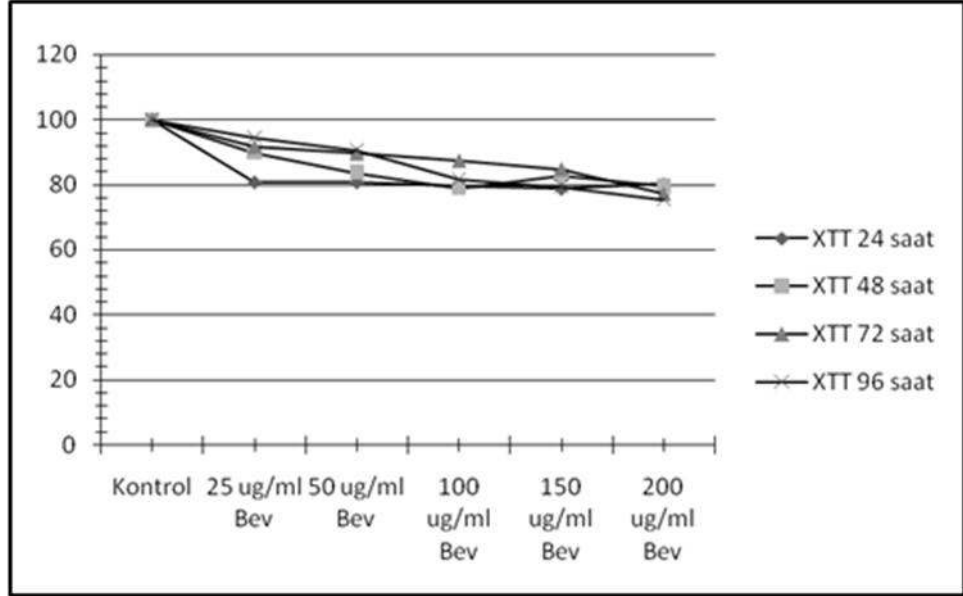
Doza ve zamana bağlı olarak değişen, VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2 ve COX-2 mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar "REST (2009 V2.0.13)" istatistik programı ile karşılaştırıldı <sup>165</sup>. Hücre canlılığı, apoptoz ve nekrotik oranlardaki değişimler ise "tek yönlü Anova" testiyle karşılaştırıldı. Veriler "SPSS 15.0" istatistik programı kullanılarak

değerlendirildi. 0.05'den küçük olan p değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. MDA-MB-231 Hücrelerinin Bevacizumab' a duyarlılığının XTT Hücre Canlılığı Yöntemi ile İncelenmesi

Bevacizumab'ın meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisini belirlemek için öncelikle XTT yöntemi uygulandı. Buradan elde edilen canlılık oranlarından kullanılan ilacın hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlandı.



**Grafik 1: MDA-MB-231 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) Bevacizumab ile 24, 48, 72 ve 96 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları.**

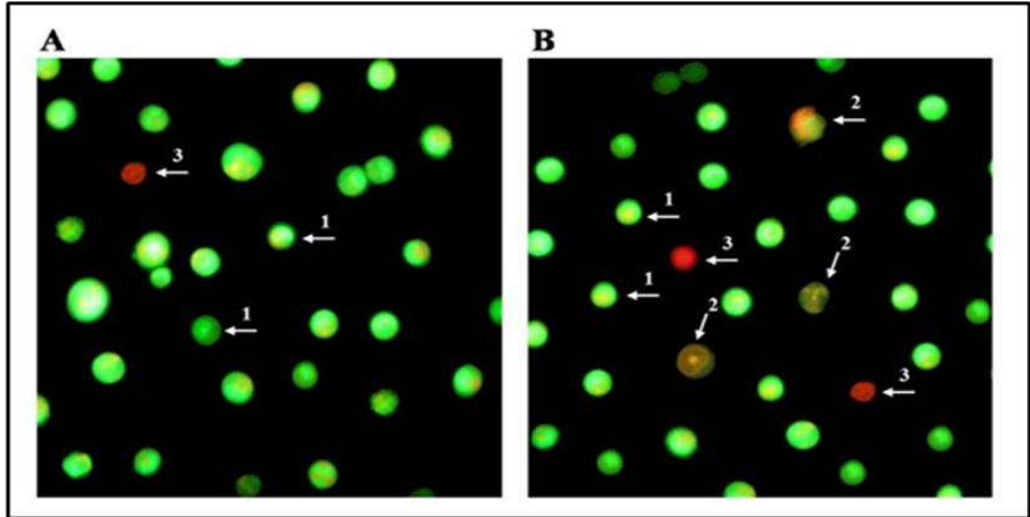
Grafik 1' de 24, 48, 72 ve 96 saat inkübasyon sonucunda hücrelerin Bevacizumab' a olan cevabı hücre canlılık oranları ile gösterilmektedir. Buna göre MDA-MB-231 hücrelerinin canlılık oranlarının doza ve zamana bağlı olarak bir miktar düştüğü ancak bu azalmanın %75'in altına inmediği belirlendi. Kullandığımız en yüksek Bevacizumab



konsantrasyonu olan 200 µg/ml'de hücre canlılığının 24 saatte %80.21, 48 saatte canlılığın %79.76 oranında olduğu, 72 saatte %77.21, 96 saatte ise %75.43 olarak görülmektedir. Bu sonuçlara göre Bevacizumab' ın MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığı üzerine en yüksek etkisinin 200 µg/ml konsantrasyonunda ve 96 saat inkübasyonda olduğu belirlendi.

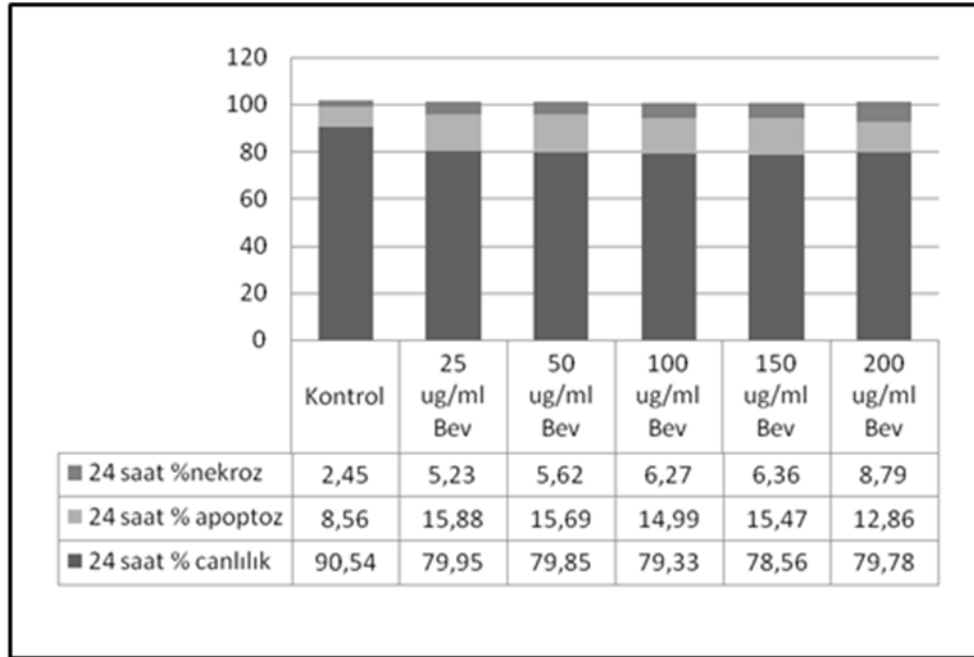
#### 4.2. Canlı, Apoptotik ve Nekrotik Hücre Dağılımının Floresan Mikroskobunda İncelemesi

Bevacizumab'ın MDA-MB-231 hücrelerine olan etkisinin belirlenmesi amacıyla kullandığımız XTT yönteminden elde edilen bulgular, ilaç uygulaması sonrasında gözlenen canlı hücrelerin oranını göstermektedir. Bevacizumab uygulanmasından sonra hücreler akridin oranj / etidyum bromür ile boyanıp floresan mikroskobunda canlılık, apoptoz ve nekroz açısından değerlendirildi. Hücrelerin floresan mikroskobundaki görünüşleri şekil 17' de gösterilmiştir.

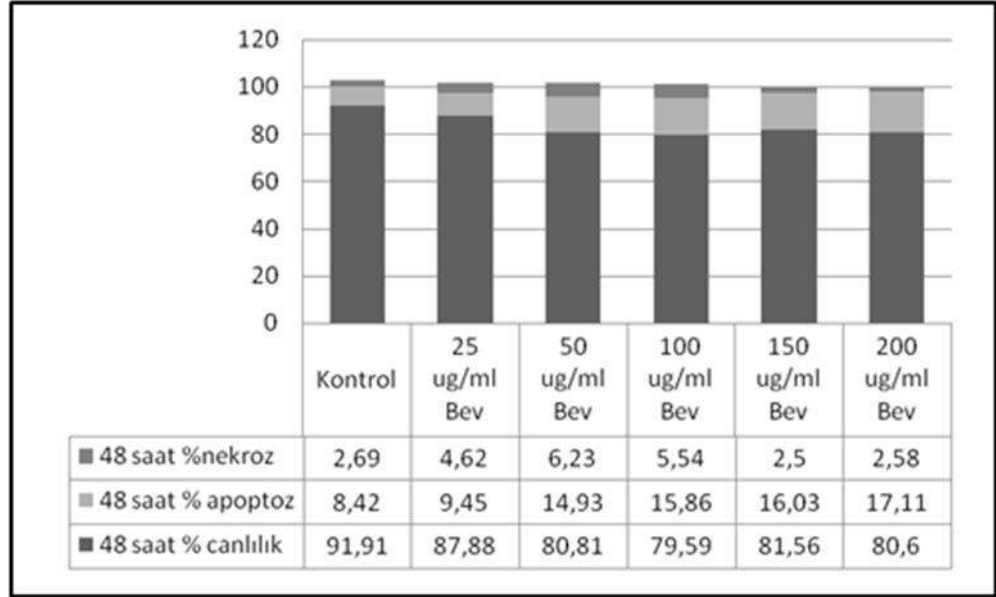


Şekil 17: MDA-MB-231 hücrelerinde apoptozun morfolojik olarak gösterilmesi. A: kontrol, B: 200 ug/ml Bevacizumab. Yeşil renkte görülenler canlı hücreleri (1), kırmızı renkte görülenler nekrotik hücreleri göstermektedir (3). Apoptozun aşamasına göre değişik şekillerde boyanmış olan apoptotik hücreler ise 2 numara ile gösterildi.

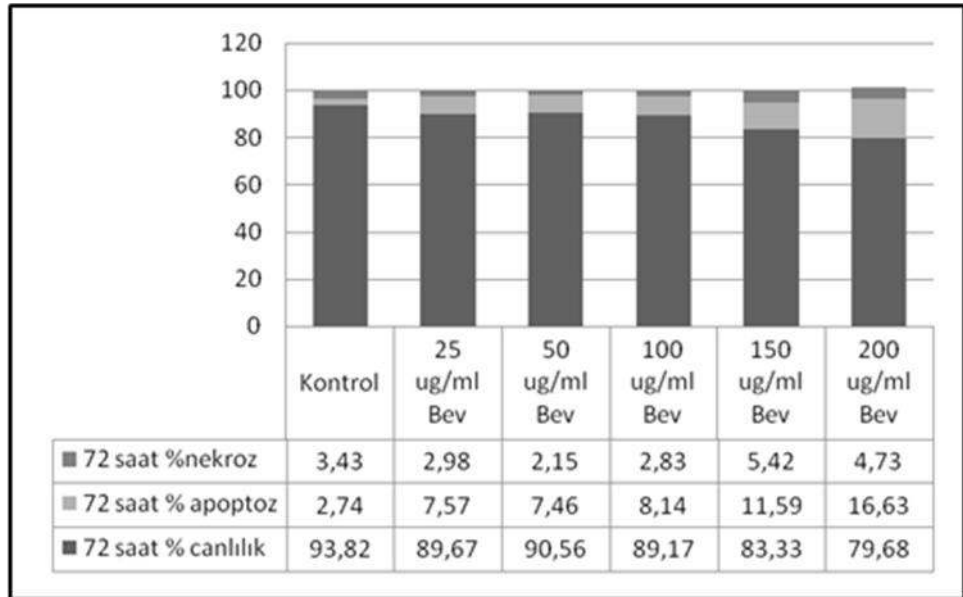
Floresan mikroskopunda yapılan analizlere göre, 24, 48, 72 ve 96 saat Bevacizumab uygulamasının hücrelerde doza ve zamana bağlı olarak apoptozu uyardığı ancak ilacın apoptotik oranı belirgin şekilde arttırmadığı belirlendi. Kullanılan en yüksek Bevacizumab konsantrasyonunda IC50 değerine tüm sürelerde ulaşılamadı. Buna göre 24 saat için en yüksek doz olan 200 µg/ml’deki apoptotik oran %12.86, 48 saat için ise %17.11 olarak bulundu (Grafik 2 ve 3). 72 saat sonra en yüksek doz olan 200 µg/ml’deki apoptotik oran ise %16.63 olarak belirlendi. Bevacizumab’ın bu süreler sonunda MDA-MB-231 hücreleri üzerinde gösterdiği nekrozda ise fazla bir artış olmadığı gözlemlendi. (Grafik 2,3 ve 4).



**Grafik 2: MDA-MB-231 hücrelerinin (10<sup>6</sup> hücre/kuyu) Bevacizumab ile 24 saat inkübasyonu sonunda belirlenen Canlı/Apoptotik/Nekrotik hücre oranları.**

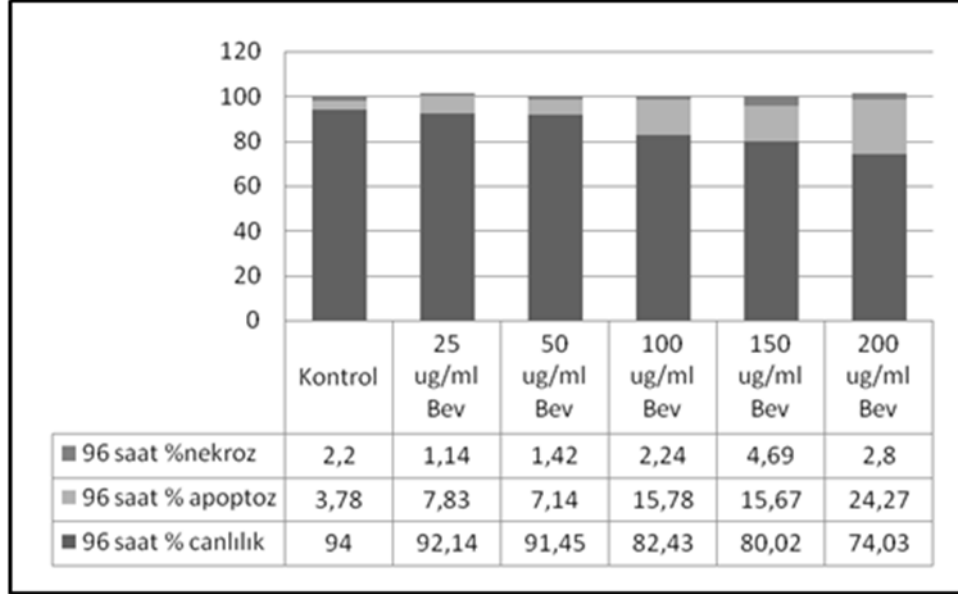


**Grafik 3: MDA-MB-231 hücrelerinin ( $10^6$  hücre/kuyu) Bevacizumab ile 48 saat inkübasyonu sonunda belirlenen Canlı/Apoptotik/Nekrotik hücre oranları.**



**Grafik 4: MDA-MB-231 hücrelerinin ( $10^6$  hücre/kuyu) Bevacizumab ile 72 saat inkübasyonu sonunda belirlenen Canlı/Apoptotik/Nekrotik hücre oranları.**

96 saat süre ile Bevacizumab uygulanan MDA-MB-231 hücrelerinde ise gözlenen apoptotik oranın %24.27 olduğu belirlendi (Grafik 5). Bevacizumab uygulamasının 96 saat sonra doz ve zamana bağlı olarak hücreler üzerindeki nekroz oranlarında önemli bir artış gözlenmedi.

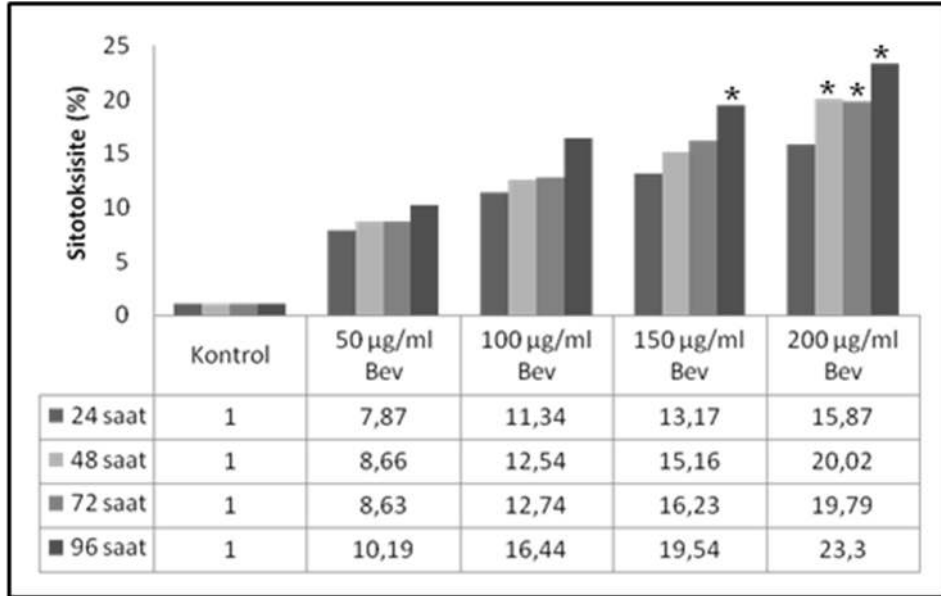


**Grafik 5: MDA-MB-231 hücrelerinin ( $10^6$  hücre/kuyu) Bevacizumab ile 96 saat inkübasyonu sonunda belirlenen Canlı/Apoptotik/Nekrotik hücre oranları.**

Floresan mikroskobu deneyimizin sonuçlarını dikkate aldığımızda her bir doz ve süre için elde ettiğimiz hücre canlılık oranlarının XTT sonuçlarımızla uyumlu olduğu belirlendi. Bu sonuçlara göre, Bevacizumab'ın kullanılan doz ve uygulanan sürelerde IC50 değerine ulaşılacak kadar etkili bir apoptotik cevap oluşturmadı ancak en yüksek konsantrasyonda yaklaşık %25 oranında apotoz gözlemlendi ( $p < 0.05$ ).

#### 4.3. Besiyerine Salınan Laktat Dehidrojenaz (LDH) Miktarının Ölçülerek Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

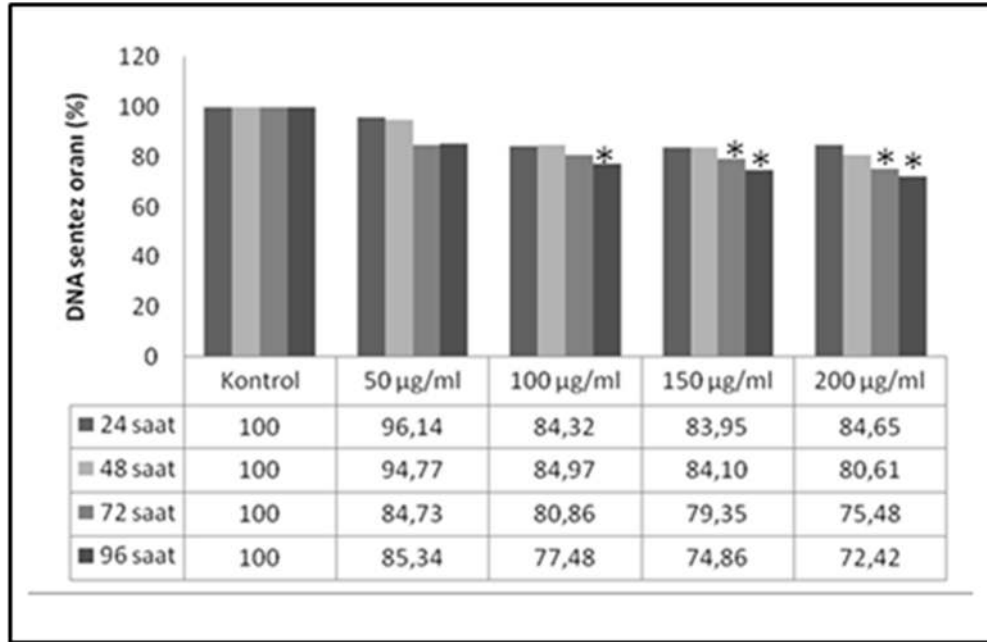
Bevacizumab'ın MDA-MB-231 hücrelerine 24, 48, 72 ve 96 saat süre ile uygulanmasından sonra ilacın hücreler üzerine olan sitotoksik etkisini belirlemek için besi yeri ortamına salınan LDH miktarı ölçüldü. Bevacizumab'ın neden olduğu sitotoksik etkinin yüzdesel değeri, LDH analizinden elde edilen verilerin kontrol grubu ile karşılaştırılması ile hesaplandı. Buna göre doz ve zamana bağlı olarak sitotoksitenin arttığı belirlendi. Özellikle 150 µg/ml Bevacizumab uygulamasında 72 saat sonunda sitotoksiste oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ( $p<0.05$ ). Ayrıca 200 µg/ml ilaç uygulamasında 48, 72 ve 96. saatlerde sitotoksiste de anlamlı bir artış olduğu belirlendi ( $p<0.05$ ). (Grafik 6).



Grafik 6: MDA-MB-231 hücrelerinin Bevacizumab ile doza ve zamana bağlı inkübasyonu sonunda görülen LDH salınımı. \*;  $p<0.05$ .

#### 4.4. Hücre Çoğalmasının Bromodeoksiuridin (BrdU) ile Belirlenmesi

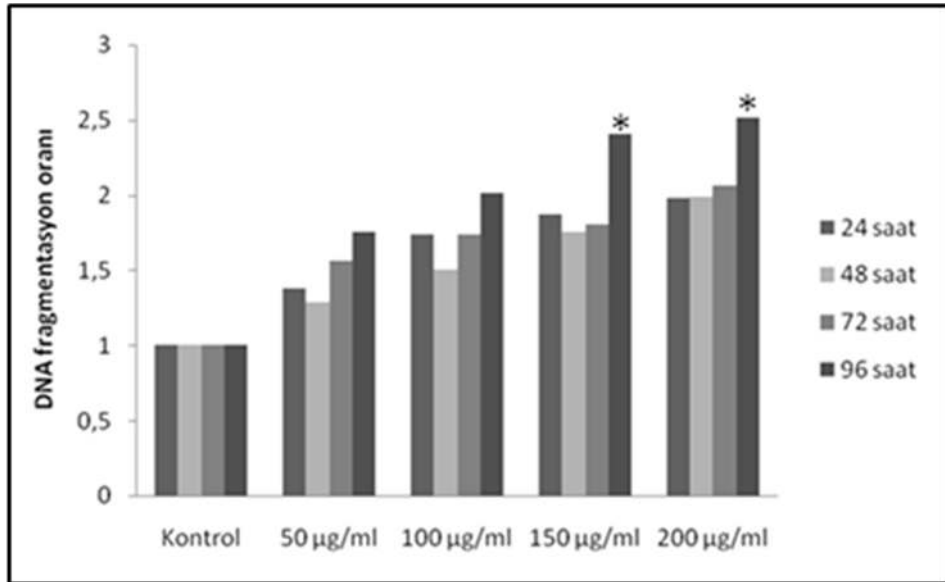
Bevacizumab' ın hücre çoğalması (DNA sentezi) üzerine etkisinin belirlenmesinde hücre çoğalması ELISA, BrdU yöntemi kullanıldı. Grafik 7' da 24, 48, 72 ve 96 saat inkübasyon sonucunda hücrelerin Bevacizumab' a cevabı gözlenmektedir. Bevacizumab uygulamasından sonra hücre çoğalmasının doz ve zamana bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Bu azalmanın 96. saatte en yüksek olduğu dozlar 100, 150 ve 200 µg/ml olarak bulunmuştur (Grafik 7). 72. saatte ise 150 ve 200 µg/ml bevacizumab uygulaması sonrası hücre çoğalmasının anlamlı şekilde azaldığı gözlenmiştir ( $p<0.05$ ).



Grafik 7: MDA-MB-231 hücrelerinin Bevacizumab ile doza ve zamana bağlı inkübasyonu sonunda görülen DNA sentez oranlarındaki değişim. \*;  $p<0.05$ .

#### 4.5. DNA Fragmentasyonunun ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi

Bevacizumab uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen DNA fragmentasyonunun belirlenmesinde, sitoplazmik mono ve oligo nükleozomların miktarlarının ELISA yöntemi ile saptanmasını temel alan DNA Fragmentasyonu-ELISA kiti kullanıldı. Buna göre, hücrelerde görülen DNA fragmentasyon miktarında doz ve zamana bağlı olarak artış gözlemlendi. En yüksek artış 96 saat süre sonunda 150 ve 200 µg/ml’de belirlendi ( $p<0.05$ ) (Grafik 8).



Grafik 8: MDA-MB-231 hücrelerinin Bevacizumab ile doza ve zamana bağlı inkübasyonu sonunda görülen DNA fragmentasyon oranı. \*;  $p<0.05$ .

#### 4.6. DNA Fragmentasyonunun Agaroz Jel Elektroforezi ile Gösterilmesi

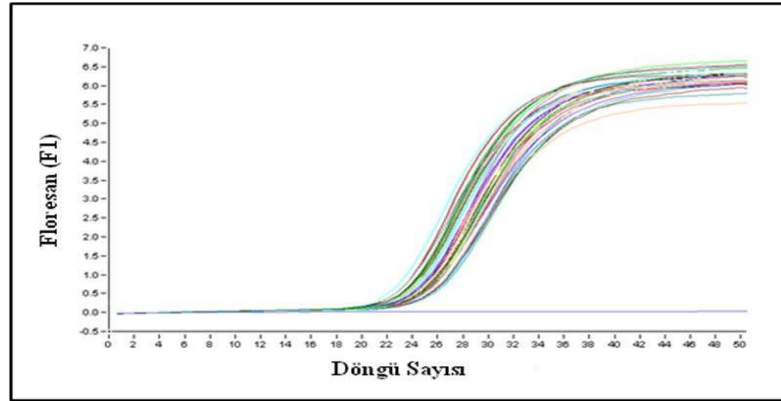
Agaroz jel elektroforezi ile DNA fragmentasyonun gösterilmesine dayanan yöntemde daha çok yüksek oranda apoptoz gözlemlendiği takdirde ve DNA fragmentasyonunun fazla olduğu durumlarda

jelde belirgin düzeyde fragmentasyon görülür. Yaptığımız deneyde apoptoz oranının düşük olması nedeniyle, agaroz jel elektroforezi yönteminin kullanıldığı fragmentasyon deneyinde görüntülenebilecek düzeyde DNA fragmentasyonu gözlenmedi.

#### 4.7. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi

VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2 ve COX-2 genlerinin ifade düzeyinin kantitatif değerlendirilmesi için Light Cycler cihazı kullanıldı. MDA-MB-231 hücre hattından elde edilen cDNA'larda VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2 ve COX-2 ile bu genlerin normalizasyonu için seçilen GAPDH genlerine özgül primerler ve UPL LNA problemleri kullanılarak çalışıldı.

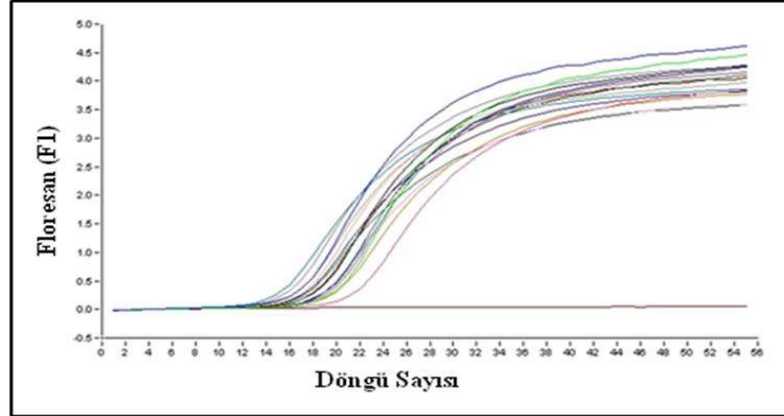
VEGF-A geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 18'de gösterildi.



**Şekil 18: VEGF-A geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. VEGF-A geninin Real Time PCR tepkimesine ait C<sub>p</sub> değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.**

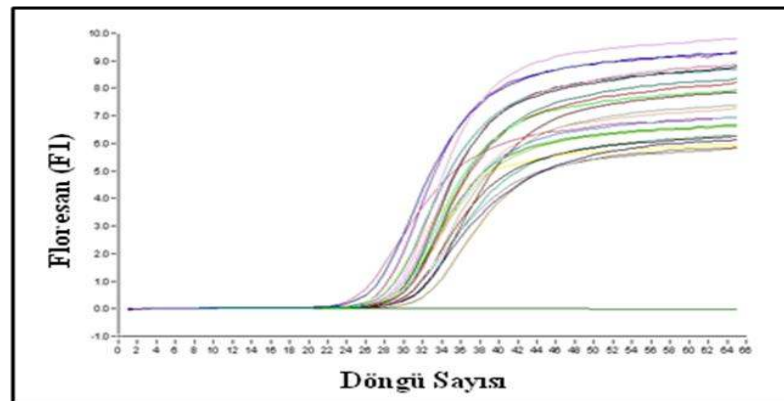


VEGF-C geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 19'da gösterildi.



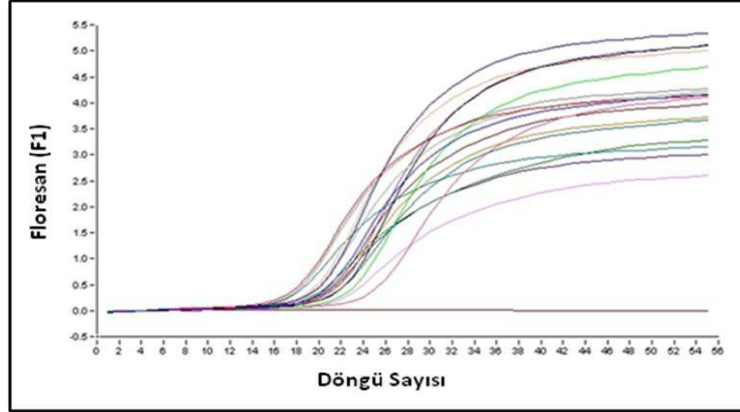
**Şekil 19: VEGF-C geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. VEGF-C geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.**

VEGFR2 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 20'de gösterildi.



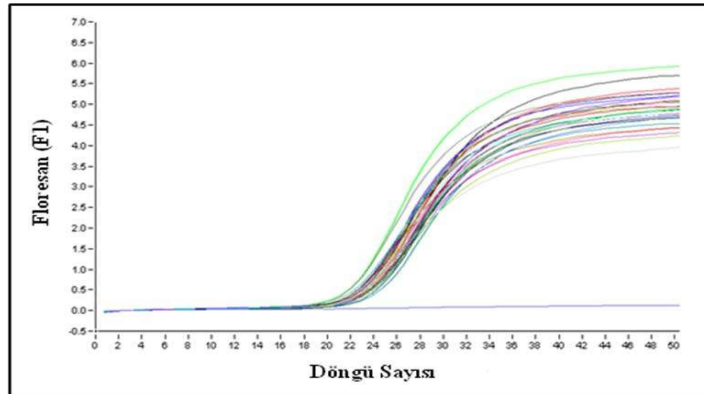
**Şekil 20: VEGFR2 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. VEGFR2 geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.**

COX-2 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 21’de gösterildi.



Şekil 21: COX-2 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. COX-2 geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 22’de gösterildi.



Şekil 22: GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. GAPDH geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

Göreceli gen ifadesi sonuçları REST programı kullanılarak “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplandı. Pfaffl eşitliği aşağıda belirtilmiştir.

$$R = \frac{E (\text{hedef})^{\Delta Ct (\text{kontrol-örnek})}}{E (\text{referans})^{\Delta Ct (\text{kontrol-örnek})}}$$

Eşitlikte belirtilen Ct, tepkime sırasında oluşan floresan sinyalin eşik değeri geçtiği andaki döngü sayısını ifade etmektedir. Ct değeri tepkimenin başında mevcut olan mRNA (cDNA) miktarı ile ters orantılıdır.  $\Delta Ct$  değeri ise kontrol ile örneklerin Ct değerleri arasındaki farkı göstermektedir. Eşitlikte belirtilen E, PCR etkinliğini, elde edilen R ise ifade oranını göstermektedir.

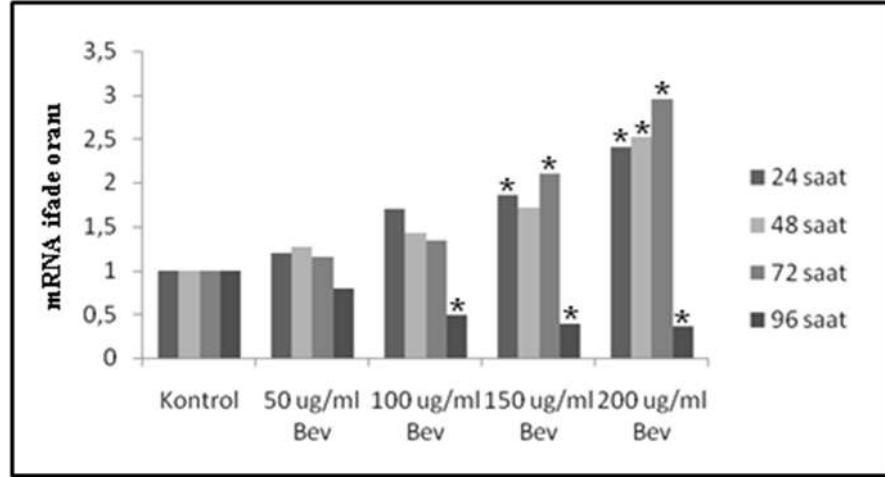
#### **4.8. Gen İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması**

##### **4.8.1. Bevacizumab’ ın VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2 ve COX-2 Genlerinin İfade Düzeylerine 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki Etkisi**

MDA-MB-231 hücre hattında Bevacizumab uygulanmasından sonra VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2 ve COX-2 genlerinin ifade düzeylerinin doza ve zamana bağlı olarak karşılaştırmalı değerlendirmesi yapıldı. Anjiyogeneze görev alan bu genlerin mRNA ifade düzeylerini belirlemek için kantitatif Real-time PCR yöntemi kullanıldı.

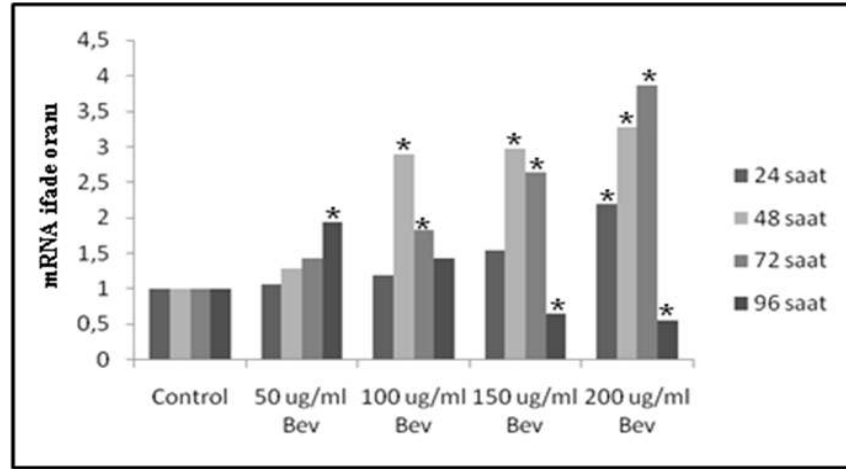
VEGF-A mRNA ifade düzeyinin 24., 48. ve 72. saatte doza bağımlı olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlendi ( $p < 0.05$ ). VEGF-A mRNA ifade edilmesindeki bu artışın en yüksek ilaç konsantrasyonunda ve uzun

sürelili inkübasyonda olduğu belirlendi. Buna karşın, 96. saatte ise VEGF-A mRNA ifade düzeyinin anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlendi (Grafik 9) ( $p<0.05$ ).



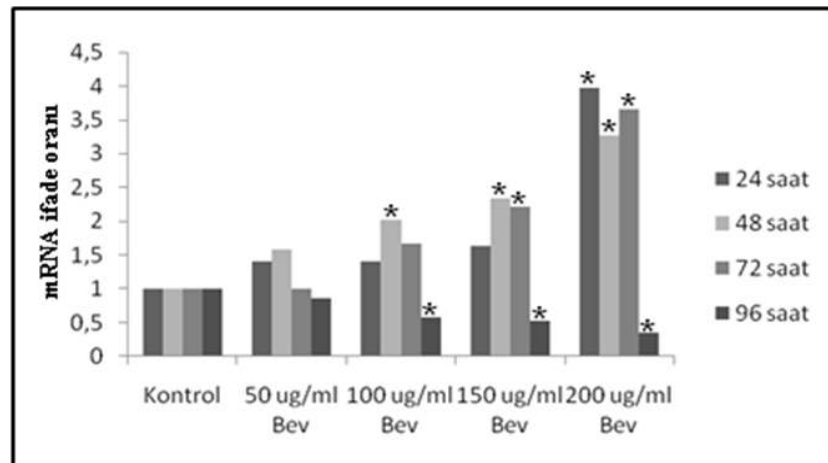
**Grafik 9: MDA-MB-231 hücrelerinin doz ve zamana bağılı olarak Bevacizumab uygulanması sonrasında VEGF-A geninin mRNA düzeylerindeki değişimlik. Hedef genin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi.**

VEGF-C mRNA ifade düzeyine baktığımızda, 50 µg/ml Bevacizumab konsantrasyonunda sadece 96. saatte anlamlı bir şekilde artış gözlemlendi ( $p<0.05$ ). Bevacizumab 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonda kullanıldığında ise VEGF-C mRNA ifadesinin 72. saate kadar arttığı, 96. saatte ise azalmaya neden olduğu belirlendi ( $p<0.05$ ) (Grafik 10).



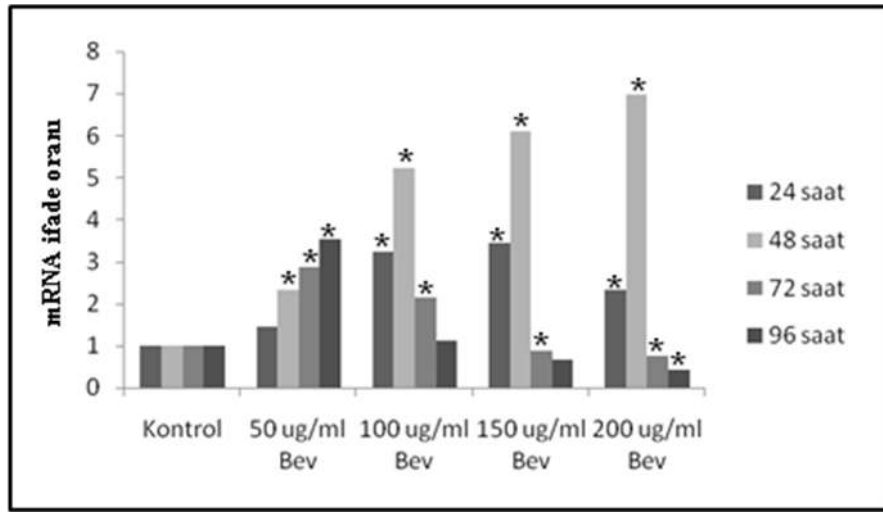
**Grafik 10: MDA-MB-231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Bevacizumab uygulanması sonrasında VEGF-C geninin mRNA düzeylerindeki değişiklik.** Hedef genin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi.

VEGF-A' nın reseptörü olan VEGFR2 mRNA ifade düzeyinde 50 µg/ml Bevacizumab uygulandığında tüm süreler için anlamlı bir değişikliğe sebep olmaz iken daha yüksek konsantrasyonlarda anlamlı değişikliklerin olduğu bulundu. 96 saat süre ile 100 µg/ml ve üzeri konsantrasyonlarda Bevacizumab uygulanması sonucunda ise VEGFR2 mRNA'sının azaldığı belirlendi ( $p < 0.05$ ) (Grafik 11).



**Grafik 11: MDA-MB-231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Bevacizumab uygulanması sonrasında VEGFR2 geninin mRNA düzeylerindeki değişiklik.** Hedef genin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi.

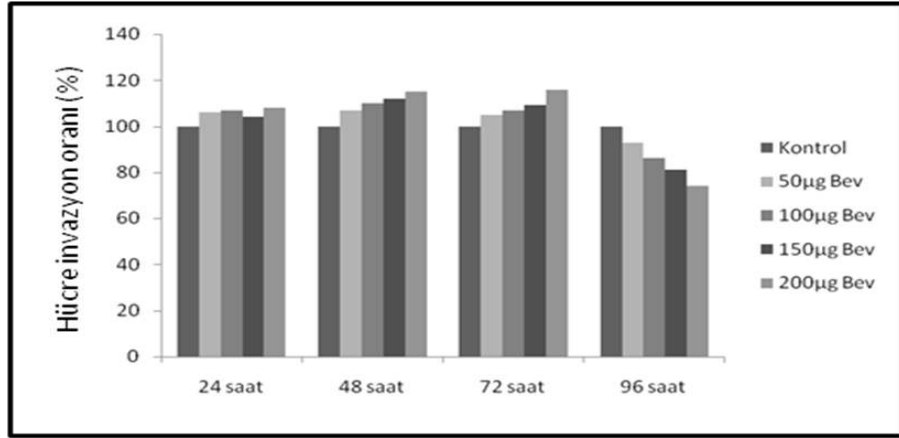
Anjiyogenezde önemli görevi olduğu bilinen COX-2 mRNA ifade düzeyinin 24. ve 48. saatlerde tüm Bevacizumab konsantrasyonlarında artışa neden olduğu bulundu. 72 ve 96. saatlerde ise COX-2 mRNA ifadesinin 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonda artmasına rağmen, 150 ve 200 µg/ml Bevacizumab uygulandığında ise COX-2 mRNA'sının azaldığı görüldü ( $p<0.05$ ) (Grafik 12).



**Grafik 12: MDA-MB-231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Bevacizumab uygulanması sonrasında COX-2 geninin mRNA düzeylerindeki değişiklik.** Hedef genin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edildi.

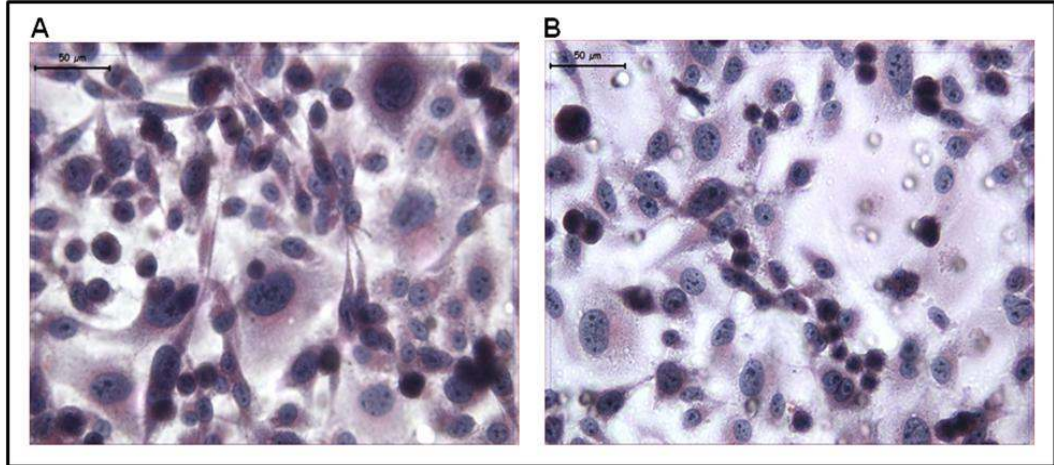
#### 4.9. Hücre İnvazyonu

Bevacizumab uygulamasından sonra hücrelerin invazyon yeteneklerindeki değişiklikleri gözlemek amacıyla Matrigel invazyon testi yapıldı. İnvazyon yeteneğine sahip olan MDA-MB-231 hücreleri 24, 48 ve 72 saat Bevacizumab uygulamasından sonra invazyon yeteneklerinde önemli bir azalma gözlenmedi. Buna karşın hücrelerin invazyon yeteneklerinde doza bağlı olarak artış gözlemlendi (Grafik 13).



**Grafik 13: MDA-MB-231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Bevacizumab uygulanması sonrasında invazyon yeteneklerindeki değişiklikler.**

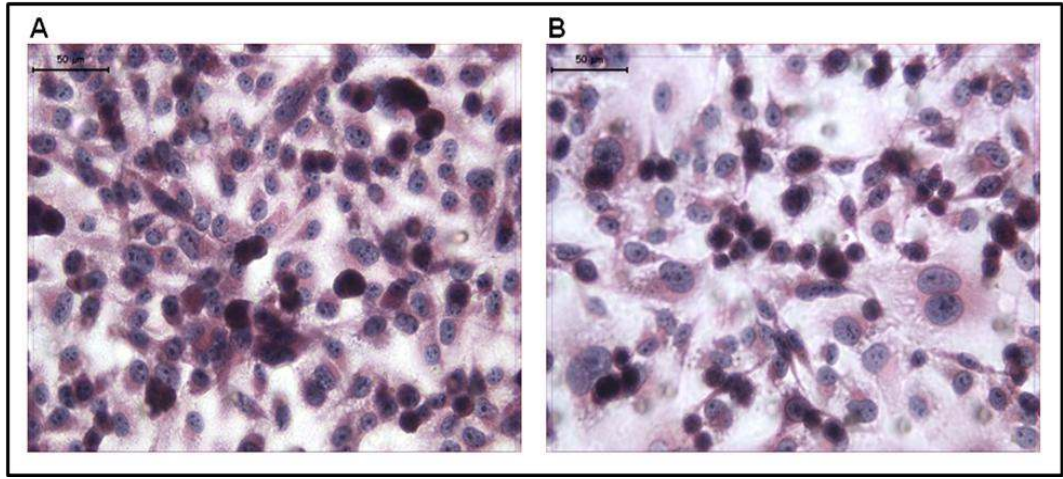
96 saat sonra ise doza bağlı Bevacizumab uygulamasından sonra hücrelerin invazyon yeteneklerinde %26' ye varan oranda düşüş gözlemlendi (Grafik 13). Şekil 23' de 200 µg/ml bevacizumab uygulamasını takiben Matrigel invazyon testi sonrasında çekilmiş bir fotoğraf gözlenmektedir.



**Şekil 23. 96. saatte kontrole göre 200 µg/ml Bevacizumab uygulamasından sonra MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonu. A-Kontrol, B-200 µg/ml Bevacizumab.**

#### 4.10. Hücre migrasyonu

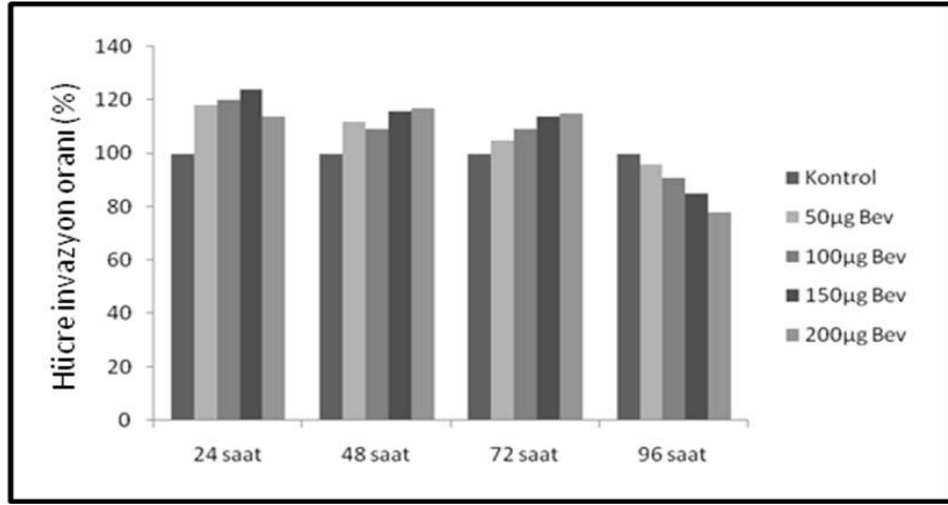
İnvazyon testinde olduğu gibi Bevacizumab uygulamasından sonra hücrelerin migrasyon yeteneklerindeki değişiklikleri gözlemek amacıyla Trans-well migrasyon testi yapıldı. Şekil 24' de Trans-well migrasyon testine ait bir örnek görülmektedir (200 µg/ml Bevacizumab ve kontrol).



**Şekil 24. 96. saatte kontrole göre 200 µg/ml Bevacizumab uygulamasından sonra MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyonu. A-Kontrol, B-200 µg/ml Bevacizumab.**

24, 48 ve 72 saat Bevacizumab uygulamasından sonra MDA-MB-231 hücrelerinin migrasyon yeteneklerinde artış gözlenirken 96 saat sonra doza bağımlı Bevacizumab uygulamasından sonra hücrelerin migrasyon yeteneklerinde %22' ye varan oranda düşüş gözlemlendi (Grafik 14).





**Grafik 14: MDA-MB-231 hücrelerinin doz ve zamana bağlı olarak Bevacizumab uygulanması sonrasında migrasyon yeteneklerindeki değişiklikler.**

## 5.TARTIŞMA

Yapılan klinik çalışmalarda, tümör dokusunda gözlenen anjiyogenezde önemli olan VEGF/VEGFR2 sinyal yolağının aktivasyonunun, bir antikor aracılığı ile VEGF molekülü üzerinden veya kimyasal ajanlarla VEGFR2 üzerinden baskılanmasının, tümör büyümesini azalttığı ve kanser hastalarının yaşam sürelerinin artışına neden olduğu gösterilmiştir <sup>166, 167, 168</sup>.

Örneğin, Bevacizumab ile anjiyogenezin baskılanması sonucu rektal karsinomlu hastalarda tümör perfüzyonu, vasküler hacim ve mikrovasküler yoğunluğun azaldığı gözlenmiştir <sup>166</sup>. Kabbinavar ve arkadaşlarının Bevacizumab' ın etkinliği ve güvenilirliği üzerine yaptıkları faz II klinik çalışmasında ise 104 ileri evre metastatik kolorektal kanserli hasta çalışmaya dahil edilmiştir. İlginç olarak 5-fluorourasil (5-FU) ve Lökovorin (LV) ile birlikte düşük doz Bevacizumab (5 mg/kg) ile tedavi edilen hastalarda yüksek doza (10 mg/kg) göre daha iyi sonuçlar alınabileceği belirtilmiştir <sup>169</sup>. Lee ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada bevacizumab' ın, Ixabepilon ve sunitinib ile birlikte kullanıldığı *in vivo* meme, kolon, akciğer ve böbrek kanser modellerinde sinerjistik antitümör aktivite gösterdiği bildirilmiştir <sup>170</sup>.

Meme kanseri hücre hatlarında (MCF7, MDA-MB-231, ve SKBR3) yapılan bir çalışmada, hücrelere Bevacizumab' ı da içeren çeşitli monoklonal antikorlar verilerek hücreler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada kullanılmış olan en yüksek Bevacizumab konsantrasyonu olan 100 µg/ml' de, meme kanseri hücrelerinin 6 gün süre ile inkübe edilmesi sonucunda, gözlenen hücre canlılık oranlarında hücre hatlarına

özgül olan farklılıkların olduğu belirlenmiştir. Buna göre, çalışmamızda da kullandığımız hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerinde gözlenen canlılık oranının %75-80 arasında olduğu bildirilmiştir. Buna karşın diğer hücrelerin ise hücre canlılıklarının MCF-7 için %70 civarında, SKBR3 hücrelerinde ise bu oran neredeyse %60'a düştüğü belirlenmiştir <sup>171</sup>. Bu çalışma ile uyumlu olacak şekilde çalışmamızda, MDA-MB-231 hücrelerine 4 gün süre ile 100 µg/ml konsantrasyonda Bevacizumab uygulandığında hücre canlılığının %80'nin üzerinde olduğunu belirledik. Aynı süre için hücre canlılığının %80'nin altına düşmesi için gereken 200 µg/ml gibi yüksek düzeyde Bevacizumab uygulanması gerektiği de elde ettiğimiz bulgular arasındadır (Grafik 1). Çalışmada kullandığımız inkübasyon süresinin 6 gün olarak alınması durumunda 100 µg/ml konsantrasyonda Bevacizumab kullanımı ile Emlet ve arkadaşlarının <sup>171</sup> elde ettiği sonuca benzer bir sonuç belirleyeceğimizi düşünmekteyiz.

Bevacizumab'ın meme kanseri hücreleri üzerine olan etkisini araştıran çalışmalar sınırlı olmakla birlikte literatürde görülen çalışmalarda over <sup>172</sup>, pankreas <sup>173</sup>, nöroblastom <sup>174</sup> ve hepatosellüler kanser <sup>175</sup> gibi çeşitli kanserler üzerine yapılan çalışmalar vardır. Bu araştırmalardan elde edilen sonuçlara baktığımızda, çoğunluğunun çalışmamızda elde ettiğimiz verilerle uyumlu olmasına rağmen uyumsuz olan verilerde bulunmaktadır. Örneğin, Sims ve arkadaşları nöroblastoma hücrelerinde yaptıkları çalışmada hipoksik kültür ortamına eklenen VEGF' nin hücrelerin çoğalmasına neden olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada, nöroblastoma hücrelerinde VEGF' nin neden olduğu hücre çoğalmasının Bevacizumab eklenmesiyle ortadan kalktığı gözlenmiştir <sup>172</sup>. Benzer şekilde Lee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Bevacizumab'ın etkisi insan umbilikal damar endotel hücreleri (HUVEC) ile Y-79 insan retinoblastoma hücreleri ile birlikte kültüre edilerek araştırılmıştır.

Çalışmada, Y-79 retinoblastoma hücrelerinin ortama VEGF salgıladığı ve iki hücrenin bir arada bulunduğu bu koşullarda her iki hücrenin çoğalmasında artış olduğu bildirilmiştir. Buna karşın ortama eklenen Bevacizumab' ın ortama salgılanan VEGF' miktarını azalttığı ve bu durumunda hücrelerin çoğalmasını engellediği belirlenmiştir <sup>176</sup>. Xiong ve ark.' larının 2010 yılında yaptıkları çalışmada ise bir arada kültüre edilen HUVEC hücreleri ile hepatosellüler kanser hücrelerine Bevacizumab uygulandığında, endotel hücrelerinde VEGF-PI3K/Akt-survivin sinyal kaskadının baskılandığı ve hepatosellüler kanser hücrelerinin adriamisin duyarlılığının arttığı gözlenmiştir. Bu çalışmada, hepatosellüler karsinom hücrelerinin verildiği farelerde, bevacizumab ile adriamisinin birlikte uygulamasının, ilaçların tek başına verilmesine oranla daha iyi sonuçlar verdiği bulunmuştur <sup>175</sup>. Bu çalışmalardan elde edilen veriler genel olarak, Bevacizumab'ın kanser hücrelerinin çoğalması üzerine olan etkileri açısından dikkate alındığında, çalışmamızda bulduğumuz sonuçlarla uyumlu olduğu görülmektedir. Çalışmamızda Bevacizumab' ın meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerinin çoğalması üzerine negatif etkilerinin olduğu hücrelerin apoptoza uğramasından (Grafik 2-5) ve kültür ortamına LDH salınımının artmasından (Grafik 6) gözlenmektedir. Ayrıca hücrelerde DNA sentez oranlarının azaldığının görülmesi de hücrelerin çoğalma miktarında azalmanın olduğunu göstermektedir (Grafik 7).

Bevacizumab' ın kanser hücreleri üzerine olan çoğalmayı baskılayan etkilerini gösteren çalışmaların yanısıra ilacın kanser hücreleri üzerine etkisiz olduğunu bildiren çalışmalarda bulunmaktadır. Örneğin, Mabuchi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *in vitro* koşullarda VEGF verilmiş olan over kanser hücrelerine uygulanan Bevacizumab' ın, hücre çoğalması üzerine etkisinin olmadığı gösterilmiştir.

Ancak aynı çalışmada, *in vivo* koşullarda Bevacizumab'ın anjiyogenezi önemli ölçüde baskıladığı ve yara iyileşmesini geciktirdiği bildirilmiştir <sup>174</sup>. Bu çalışmalar dışında, Fujita ve arkadaşları paklitaksel ve Bevacizumab'ın birlikte etkisini çeşitli baş boyun skuamöz kanseri hücre hatlarında çalışmışlardır. Bevacizumab tek başına ve paklitaksel ile birlikte kullanıldığında hücrelerin çoğalması üzerine etkisinin olmadığı bildirilmiştir <sup>177</sup>. Bevacizumab'ın kanser hücreleri üzerine olan etkisinin araştırıldığı çalışmalarda görülen bu farklılıklar kullanılan hücre hatlarının birbirinden değişik olması, hücre kültür ortamı, hücrelere farklı ilaç konsantrasyonlarının uygulanması gibi nedenlerden dolayı olabilir. Ancak yapılan çalışmalarda kullanılan hücrelere baktığımızda, asıl nedenin kanser hücrelerindeki farklılık olduğu göze çarpmaktadır. Bu durum Bevacizumab tedavisi alan kanser hastalarının ilaca farklı cevaplar verebileceğini akla getirmektedir. Hatta Emlet ve arkadaşlarının <sup>171</sup> yaptığı çalışma dikkate alındığında, meme kanserine ait üç farklı hücrenin (MCF7, MDA-MB-231, ve SKBR3) Bevacizumab uygulamasına farklı cevaplar verdiği görülmektedir. Bu durum tedavide, farklı kanser hücresi klonlarını barındıran tümör dokusunda da ilaca yanıtın değişiklik gösterebileceğine işaret etmektedir. Bunun sonucunda ise direnç gösteren hücrelerin zamanla metastaz ile uzak doku ve organlara gidebileceği de unutulmamalıdır.

Meme kanseri hücre hatları ile primer meme kanseri hücreleri VEGF veya VEGF reseptörünü ifade etmektedir <sup>178-182</sup>. Meme kanserlerinde VEGF ifadesindeki artış tümörün ilerleyişi ve tekrarlama riski ile ilişkili olarak bulunmuştur <sup>183</sup>.

Kanser dokusunda anjiyogenezi arttırdığı bilinen diğer önemli bir molekül grubu da, COX-2 enziminin etkisi ile oluştuğu bilinen prostanoidlerdir. COX-2 etkisi ile oluşan bu moleküllerin ayrıca invazyonu uyardığı ve metastazı arttırdığı da bilinmektedir <sup>184, 185</sup>.

Çeşitli tümör ve premalign dokularda COX-2 geninin ifadesinde artış olduğunun belirlenmesi, COX-2'nin tümör gelişiminde önemli roller oynadığını göstermektedir <sup>186</sup>. Ayrıca meme kanserlerinde de COX-2 ifadesindeki artışın kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir <sup>187</sup>. Anjiyogenez sırasında VEGF molekülünün COX-2 kökenli prostaglandinler ile etkileşime geçtiği ve meme kanseri hastalarına ait dokularda VEGF ile COX-2 ifadesinin tümör derecesi, lenf nodu metastazı ve tümör büyüklüğü ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir <sup>188</sup>. Çalışmamızda Bevacizumab aracılığı ile VEGF molekülü baskılanmış olan MDA-MB-231 hücrelerindeki COX-2 ifadesine baktığımızda, düşük ilaç konsantrasyonlarında COX-2 geninin ifadelenmesinin arttığını belirledik. Buna karşın, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda özellikle 96 saat süreli inkübasyonda COX-2 mRNA'sının ifadesinde azalmanın olduğunu gözledik (Grafik 12). Aynı sürelerde VEGF ile VEGFR-2'nin mRNA ifade düzeylerinin COX-2 ifade düzeyleri ile korelasyon gösterdiğini belirledik (Grafik 9-11). VEGF'yi hedef alan ajanların anti-anjiyojenik etkilerinin kanserlerde etkili olduğu bildirilmiş olsa da <sup>189-191</sup> hem VEGF hem de reseptörünü ifade eden tümörler otokrin ya da parakrin şekilde geri beslemeli sinyal yollarını kullanabilir <sup>192-194</sup>. Bu durum kısa süreli ve düşük doz Bevacizumab inkübasyonu sonucunda VEGF ile reseptörünün mRNA ifade düzeylerindeki artışı açıklamaktadır. Ayrıca COX-2 geninin ifadesinde de benzer şekilde artışın olması MDA-MB-231 hücrelerinin anjiyogenez yeteneğinin sadece VEGF aracılı olmadığını buna başta COX-2 geni olmak üzere anjiyogenez ile ilişkili genlerin ve henüz

belirlenmemiş diğer olası genlerin de önemli ölçüde katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

İlginç bir şekilde pankreas kanser hücrelerinde yapılan bir çalışmada, Bevacizumab uygulanmış olan hücrelerde, VEGF geninin transkripsiyonel kontrolünde iş gören Sp1 transkripsiyon faktörünün ifadesinin arttığı gösterilmiştir. Bu transkripsiyon faktörünün artışına bağlı olarak başta VEGF olmak üzere Sp1 molekülünün hedefi olan diğer genlerin de ifadelerinde artış olduğu belirlenmiştir <sup>172</sup>. Bu açıdan baktığımızda, COX-2 geninin promotör dizisinde işlevsel Sp1 bağlanma bölgesinin olması <sup>195</sup>, Bevacizumab uygulaması sonrasında VEGF ile COX-2 geninin ifadelerindeki değişikliğin birbirleri ile uyum içinde olmasını açıklamaktadır.

Hücre invazyonu ve migrasyonu meme kanserinin metastazında önemli bir yere sahiptir <sup>196</sup>. Solid tümörlerde antianjiyogenik tedavi ile invazyon arasındaki ilişkiyi araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yang ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada insan uveal melanoma hücre hatlarında Bevacizumab ile birlikte in vitro invazyonun azaldığı gösterilmiştir <sup>197</sup>. Bevacizumab'ın anjiyogenezi baskıladığını gösteren prelinik ve klinik faz çalışmalarına karşın anjiyogenez üzerinde arttırıcı etkisi olduğunu gösteren bazı çalışmalar da bulunmaktadır. Keunen ve arkadaşlarının ratlarda oluşturdukları glioblastoma üzerinde yaptıkları çalışmada Bevacizumab tedavisinden sonra tümör hücre invazyonunun arttığı gözlemiştir <sup>198</sup>. Ebos ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada ise antianjiyogenik ilaçlarla tedavi edilen farelerde metastazın arttığına dair veriler elde edilmiştir <sup>185199</sup>. Bu çalışmaların dışında Lucio-Eterovic ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 72 saat Bevacizumab uygulamasından sonra doza bağımlı olarak glioblastoma hücre hatlarında invazyonun arttığı gözlenmiştir. Bu

çalışma ile VEGF dışındaki diğer proanjiyogenik faktörlerin ifadelerindeki artış sayesinde glioblastoma hücrelerinin antianjiyogenik tedaviden kaçtığı gösterilmiştir. Ayrıca, Lucio-Eterovic ve arkadaşları endotel hücrelerdeki parakrin VEGF etkisinin yanısıra otokrin VEGF sinyalinin glioblastoma hücre invazyonunu kontrol ettiğini belirtmişlerdir <sup>200</sup>. Bevacizumab' ın meme kanseri üzerine etkisini araştıran çalışmalarda çelişkili sonuçlar ile karşılaşmaktadır. Bazı çalışmalarda Bevacizumab' ın metastatik meme kanseri üzerine etkisinin kısa süreli olduğu ayrıca hastaların yaşam sürelerinin artmadığı gösterilmiştir <sup>201</sup>. Bizim çalışmamızda MDA-MB-231 kanser hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat süre ile bevacizumab uygulaması yapılmasına rağmen hücre invazyonunda herhangi bir azalma gözlenmedi. Ancak 96 saat inkübasyondan sonra hücre invazyonunda doza ve zamana bağlı olarak azalma olduğu gösterildi. Bu sonuç VEGF' nin 96. saate kadar gösterdiği mRNA düzeyindeki artışla paralellik göstermektedir. Hücrelerin antianjiyogenik tedaviye verdiği yanıtın meme kanseri hücrelerinde yüksek oranda sentezlenen VEGF' nin otokrin cevabından kaynaklandığını düşündürmektedir. Bizim çalışmamızı destekler nitelikte olan bazı çalışmalar ile meme kanseri hücrelerinin yüzeyindeki VEGFR-2 aktivasyonu sayesinde VEGF-A üretiminin arttığı bildirilmiştir. Bu sayede bu hücrelerde ayrı bir otokrin sinyal döngüsünün varlığı gösterilmiştir. Bu sinyal döngüsü aracılığıyla VEGFR-2 aktivasyonu sonucunda meme kanseri hücrelerinin gelişimi ve sağkalımı desteklenmektedir <sup>193</sup>.

Antianjiyogenik bir ajan olan Bevacizumab dışında geliştirilmiş ve geliştirilmekte olan birçok terapötik ajan bulunmaktadır. Ancak bunların faz çalışmalarının yapılması oldukça uzun zaman almakta ve bu ilaçların bazıları yüksek oranda gösterdikleri yan etkiler nedeniyle kullanımdan kaldırılabilir. Yeni ilaç geliştirebilmesi için öncelikle kanser oluşumuna neden olan mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir. Günümüzde ölümle sonuçlanan kanserler arasında ilk



sıralarda yer alan meme kanseri gelişiminin, ilerlemesinin ve metastazının altında yatan hücresel ve moleküler mekanizmaların araştırılması ve ilişkili moleküllere karşı yeni terapotik yaklaşımların geliştirilmesi meme kanserinin tedavisinde önemli adımlar atılmasını sağlayacaktır.

## 6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında Bevacizumab' ın MDA-MB-231 hücre hattı üzerine olan etkilerini araştırdık. İlaç uygulaması sonrasında 24, 48, 72 ve 96. saatlerde hücre kültürleri sonlandırılarak hücrelerin canlılık oranları, nekroz oranları ve apoptotik oranları uygun yöntemler kullanılarak belirlendi. Ayrıca, Bevacizumab' ın DNA fragmentasyonuna, DNA sentezine ve anjiyogenez ile ilgili genlerin ifadesi üzerine etkisi Real-Time PCR yöntemleri kullanılarak araştırıldı.

Çalışmamızda Bevacizumab' ın etkisiyle 24 ve 48. saatlerde COX-2 ifade düzeyinde artış gözlenirse de, daha yüksek süre ve konsantrasyonlarda COX-2 ifade oranının azaldığının bulunması VEGF inhibitörü olan Bevacizumab' ın uzun süreli inkübasyonlarda ve yüksek dozlarda COX-2 ifade düzeyini baskılayabileceğini ve hücrelerin anjiyogenik özelliklerini azaltabileceğini göstermektedir.

VEGF' nin büyüme ve metastaz için kritik bir faktör olduğu bilinmektedir. Bu nedenle VEGF' ye yönelik tedavi stratejileri son zamanlarda oldukça önemli hale gelmiştir. Çalışmamızda, anjiyogenez belirteci olan VEGF-A, VEGF-C ve VEGFR2 mRNA ifade düzeylerinin ve invazyon yeteneklerinin 96 saat Bevacizumab uygulamasından sonra azaldığının bulunması, MDA-MB-231 hücrelerinin anjiyogenik özelliklerinin baskılanması için uzun süreli Bevacizumab uygulanması gerekliliğini göstermektedir.

Sonuç olarak, tümör dokusunun büyümesi ve metastatik özellik göstermelerinde önemli olan anjiyogenezin baskılanması için kullanılan başta Bevacizumab olmak üzere diğerk antianjiyogenik ajanların kanser hücreleri üzerine olan etkilerinin araştırılması ve bu moleküllerin uyardığı ya da baskıladığı sinyal yolaklarının tanımlanması, metastatik özellik gösteren kanser hücrelerinin apoptoza yönlendirilmesinde daha etkili olabilecek ajanların tasarlanması ve geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

## 7. ÖZET

### **Bevacizumab'ın antianjiyogenik ve apoptotik etkilerinin meme kanserli hücre hattında araştırılması**

Tümör anjiyogenezi tümör hücreleri tarafından anjiyogenik faktörlerin salınımı, proteolitik enzimlerin aktivasyonu ve endotelial hücrelerin proliferasyonu ve göçünü içeren çok aşamalı kompleks bir mekanizmadır. VEGF büyüme ve metastaz için kritik olan anjiyogenik bir fenotipe geçişte sınırlayıcı bir faktördür. Anjiyogenez hedefli son yaklaşımlar vasküler endotelial hücreleri uyaran faktörlerin ve bunların reseptörlerinin baskılanmasına bağlıdır. VEGF bu alandaki araştırmalarda en önemli hedef moleküllerden biri haline gelmiştir. VEGF'ye karşı geliştirilen ilaçlardan biri monoklonal bir antikor olan Bevacizumab' dır (Avastin, Altuzan). Prostaglandinlerin COX-2 ile indüklenmiş artışı, anjiyogenez, kanser hücrelerinin çoğalması, apoptozun baskılanması ve metastatik potansiyelin artışı uyarmaktadır. Bu çalışma ile Bevacizumab'ın meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 üzerindeki antianjiyogenik ve apoptotik etkisi ile VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2 ve COX-2 mRNA ifadeleri üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmamızda, MDA-MB-231 hücrelerinde, çeşitli doz ve inkübasyon sürelerinde, Bevacizumab uygulanması sonrası, "XTT" yöntemi ve "akridin oranj-etidyum bromür" boyamasıyla hücre canlılığı belirlendi. Aynı sinyal iletim yolağında görev alan VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2 ve bu yolak üzerine de etki eden COX-2 genlerinin mRNA ifade düzeylerinin belirlenmesi için kantitatif Real-Time PCR yöntemi kullanıldı.

Çalışmamızda, Bevacizumab' ın etkisiyle 24 ve 48. saatlerde COX-2 ifade düzeyinde artış gözlenirse de 72 ve 96. saatlerde bu COX-2 ifade oranı 50 µg/ml' den sonraki dozlarda düşük düzeylerde seyretmektedir. Anjiyogeneze önemli görevi olduğu bilinen VEGF-A, VEGF-C ve VEGFR2 mRNA ifade düzeylerinin ve invazyon yeteneklerinin 24, 48 ve 72. saattlerde doza bağımlı olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlendi. 96. saatte ise VEGF-A, VEGF-C ve VEGFR2 mRNA ifade düzeylerinin ve hücrelerin invazyon yeteneklerinin anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlendi. Elde ettiğimiz veriler, MDA-MB-231 hücrelerinin anjiyogenik özelliklerinin baskılanması için uzun süreli Bevacizumab uygulaması gerektiğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Anjiyogeneze, Gen ifadesi, Apoptoz, Meme Kanseri, Bevacizumab.

## **8. SUMMARY**

### **Investigation of anti-angiogenic and anti-apoptotic effects of bevacizumab in breast cancer cell line**

Tumor angiogenesis is a complex mechanism consisting of multi-step events including secretion or activation of angiogenic factors by tumor cells, activation of proteolytic enzymes, proliferation and migration of endothelial cells. VEGF may be the rate limiting factor in the tumor-related switch to an angiogenic phenotype that is critical for growth and metastasis. Current approaches to target angiogenesis rely on inhibiting growth factors that stimulate vascular endothelial cells or blocking their receptors. VEGF has become a major target of investigation in this area. Bevacizumab is a monoclonal antibody developed against VEGF. Enhanced COX2-induced synthesis of prostaglandins stimulates cancer cell proliferation, promotes angiogenesis, inhibits apoptosis, and increases metastatic potential. In the present study, we aimed to investigate the antiangiogenic and apoptotic effect of Bevacizumab on MDA-MB-231 cell line and changes of VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2 and COX-2 mRNA expressions.

In our study, cell viability was detected in the MDA-MB-231 cells by XTT assay method and acridin-orange/ethidium bromide staining, for different dosages and incubation time, following Bevacizumab treatment. Quantitative Real-Time PCR method was used for analysis of mRNA expression levels of VEGF-A, VEGF-C, VEGFR2 genes which take part in same signal pathway and COX-2 acting on this pathway.

In this study, although COX-2 mRNA expression was higher in breast cancer cells at 24 and 48h, its expression level was low in MDA-MB-231 at 72 and 96h after the 50 µg/ml dose. VEGF-A, VEGF-C and VEGFR2 mRNA expression level and invasion ability of MDA-MB-231 cells significantly increased at 24, 48 and 72h in a dose dependent manner. VEGF-A, VEGF-C and VEGFR2 mRNA expression and invasion ability of MDA-MB-231 significantly decreased at 96h in a dose dependent manner. Our data suggest that the long-term application of bevacizumab is required for the suppression of angiogenic properties.

**Keywords:** Angiogenesis, gene expression, Apoptosis, breast cancer, Bevacizumab.

## 9. KAYNAKLAR

1. MacNaughton J, Banah M, McCloud P, Hee J, Burger H. Age related changes in follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, oestradiol and immunoreactive inhibin in women of reproductive age. Clin Endocrinol (Oxf). 1992; 36(4): 339-45.
2. Weinstein L. Hormonal therapy in the patient with surgical menopause. Obstet Gynecol. 1990; 75(4 Suppl): 47S-50S.
3. William C. Wood, Hyman B. Muss, Lawrence J. Solin, Olufunmilayo I. Olopade. Cancer of the Breast: In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (editors). *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. 7th. Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p.1399-1487.
4. Scott JR, Diosio PJ, Hammond CB, editors. Danforth Obstetrics and Gynecology. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Company; 1995.
5. Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7 th edition, Philadelphia Saunders Company, 1999.
6. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin. 2010; 60(5):277-300.
7. Harris JR, Morrow M, Bonadonna G. Cancer of the Breast. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (editors). *Cancer Principles and Practice of Oncology*. 5th Ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1993. p.1264-1265.
8. Koçak S. Kimler meme kanseri olur? Klinik Bilimler ve Doktor 2000; 6(1): 68-72.



9. Tuncer S. Jinekolojik kanserlerde tarama. Hacettepe Tıp Dergisi. 2000; 31 (2):113-20.
10. T.C.Sağlık Bakanlığı 2005 yılı istatistikleri [internette]. [06 Ocak 2010'da okundu]. elektronik adresi: <http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-3417/eski2yeni.html>.
11. Fisher B. Malignancies of the Breast. In: Cameron RB (editor). *Practical Oncology*. 1st edition. Connecticut: Appleton & Lange; 1994: p. 417-434.
12. Özmen V. Dünya'da ve Türkiye'de meme kanseri, Meme Sağlığı Dergisi, 2006:7-9.
13. Canadian Cancer Society, What is Breast Cancer ? [internette]. [01 Ocak 2010'da okundu]. Elektronik adresi: [http://www.cancer.ca/canada-wide/about\\_cancer/types\\_of\\_cancer/what\\_is\\_breast\\_cancer.aspx](http://www.cancer.ca/canada-wide/about_cancer/types_of_cancer/what_is_breast_cancer.aspx)
14. Berardo D, Allred DC, O'Connell P. Breast cancer. In: NJ Totowa, editor. Principles of molecular medicine. 1st ed. New Jersey: Humana Pres; 1998. p.625-32.
15. Bomford CK, Kunkler IH, Sherriff SB. Walter and Miller's Textbook of RT, Radiation Physics, Therapy and Oncology. (2 nd ed). Churchill Livingstone Inc., Edinbudgh 1993, pp383-394.
16. Manjer J, Berglund G, Bondesson L, Garne JP, Janzon L, Malina J. Breast cancer incidence in relation to smoking cessation. Breast Cancer Res Treat. 2000; 61(2): 121-9.
17. Topuz E. Meme Kanseri: Biyoloji, Tanı, Evreleme, Tedavi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları; 1997.

18. Bray GA. The underlying basis for obesity: relationship to cancer. *J Nutr.* 2002; 132(11 Suppl): 3451S-3455S.
19. Rogers C., Thompson K., Robinson S. "Introducing a breast health strategy into schools", *Health Education.* 2002: 102(3);106-12.
20. Newcomb PA, Wernli KJ. Risk Factors. In: Sauter ER, Daly MB (editors). *Breast Cancer Risk Reduction and Early Detection.* 1st edition. London: Springer; 2010: p. 3-22.
21. Campbell JB. Breast cancer-race, ethnicity, and survival: a literature review. *Breast Cancer Res Treat.* 2002; 74(2): 187-92.
22. Bentley JR, Delfino RJ, Taylor TH, Howe S, Anton-Culver H. Differences in breast cancer stage at diagnosis between non-Hispanic white and Hispanic populations, San Diego County 1988-1993. *Breast Cancer Res Treat.* 1998; 50(1): 1-9.
23. Kenemans P, Verstraeten RA, Verheijen RH. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas.* 2004; 49(1): 34-43.
24. MacMahon B, Trichopoulos D, Brown J, Andersen AP, Aoki K, Cole P, et al. Age at menarche, probability of ovulation and breast cancer risk. *Int J Cancer.* 1982; 29(1): 13-6.
25. Barton MB. Screening mammography for women aged 40-49: are we off the fence yet? *CMAJ.* 2001; 164(4): 498-9.
26. Meiser B, Butow P, Barratt A, Friedlander M, Kirk J, Gaff C, et al. Breast cancer screening uptake in women at increased risk of developing hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2000; 59(2): 101-11.

27. Schairer C, Lubin J, Troisi R, Sturgeon S, Brinton L, Hoover R. Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. JAMA. 2000; 283(4): 485-91.
28. Clavel-Chapelon F, Gerber M. Reproductive factors and breast cancer risk. Do they differ according to age at diagnosis? Breast Cancer Res Treat. 2002; 72(2): 107-15.
29. Cuzick J. Epidemiology of breast cancer--selected highlights. Breast. 2003; 12(6): 405-11.
30. Cardenosa G, Eklund GW. Benign papillary neoplasms of the breast: mammographic findings. Radiology. 1991; 181(3): 751-5.
31. Reynolds HE, Larkin GN, Jackson VP, Hawes DR. Fixed-facility workplace screening mammography. AJR Am J Roentgenol. 1997; 168(2): 507-10.
32. Klauber-DeMore N. Tumor biology of breast cancer in young women. Breast Dis. 2005-2006; 23: 9-15.
33. Tuncel E. Klinik Radyoloji. 1. baskı. Ankara: Güneş & Nobel Tıp Kitabevleri; 1998.
34. Soran A, Koçer B, Yazıhan N, Sürmeli S, Ataoğlu H, Ünal B, ve ark. Meme kanseri lenf nodu metastazında serum vasküler endotelial büyüme faktörleri c,d ve c/d oranının önemi: prospektif klinik çalışma, Meme Sağlığı Dergisi 2007; 3(3): 125-130
35. Oliver G, Detmar M. The rediscovery of the lymphatic system: old and new insights into the development and biological function of the lymphatic vasculature. Genes Dev. 2002; 16(7):773-83.
36. Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R, Viale G. Breast cancer. Lancet. 2005; 365(9472): 1727-41.

37. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(6): 453-8.
38. Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9(4): 274-84.
39. Hertig AT. Angiogenesis in early human chorion and in the primary placenta of the Macaque monkey. *Contributions to embryology*. 1935; 25 (146): 37-81.
40. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000; 407(6801): 249-57.
41. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*. 2002 Dec;29(6 Suppl 16):15-8.
42. Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun;3(6):422-33.
43. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005; 438(7070): 932-6.
44. Issa R, Krupinski J, Bujny T, Kumar S, Kaluza J, Kumar P. Vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, in human brain tissue after ischemic stroke. *Lab Invest*. 1999; 79(4): 417-25.
45. Slevin M, West D, Kumar P, Rooney P, Kumar S. Hyaluronan, angiogenesis and malignant disease. *Int J Cancer*. 2004; 109(5): 793-4.
46. Luttun A, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P. The role of proteinases in angiogenesis, heart development, restenosis, atherosclerosis, myocardial ischemia, and stroke: insights from genetic studies. *Curr Atheroscler Rep*. 2000; 2(5): 407-16.

47. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(6): 401-10.
48. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis*. 2000; 21(3):505-15.
49. Yin G, Liu W, An P, Li P, Ding I, Planelles V, et al. Endostatin gene transfer inhibits joint angiogenesis and pannus formation in inflammatory arthritis. *Mol Ther*. 2002; 5(5 Pt 1): 547-54.
50. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003; 9(6): 653-60.
51. Andreasen PA, Kjøller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer*. 1997; 72(1): 1-22.
52. Blasi F. uPA, uPAR, PAI-1: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways? *Immunol Today*. 1997; 18(9): 415-7.
53. Stepanova VV, Tkachuk VA. Urokinase as a multidomain protein and polyfunctional cell regulator. *Biochemistry (Mosc)*. 2002; 67(1): 109-18.
54. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003; 9(6): 669-76.
55. Konukoğlu D, Turhan MS. Anjiyogenezin temel moleküler mekanizmaları ve tümör anjiyogenezi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2005; 36(1): 42-8.
56. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971; 285(21): 1182-6.

57. Chodak GW, Haudenschild C, Gittes RF, Folkman J. Angiogenic activity as a marker of neoplastic and preneoplastic lesions of the human bladder. *Ann Surg.* 1980; 192(6): 762-71.
58. Fernandez PM, Rickles FR. Tissue factor and angiogenesis in cancer. *Curr Opin Hematol.* 2002; 9(5): 401-6.
59. Tonini T, Rossi F, Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene.* 2003; 22(42): 6549-56.
60. Nicolson GL. Organ specificity of tumor metastasis: role of preferential adhesion, invasion and growth of malignant cells at specific secondary sites. *Cancer Metastasis Rev.* 1988; 7(2): 143-88.
61. Manders P, Beex LV, Tjan-Heijnen VC, Geurts-Moespot J, Van Tienoven TH, Foekens JA, et al. The prognostic value of vascular endothelial growth factor in 574 node-negative breast cancer patients who did not receive adjuvant systemic therapy. *Br J Cancer.* 2002; 87(7): 772-8.
62. Rosen LS. Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. *Cancer Control.* 2002; 9(2 Suppl): 36-44.
63. McNamara DA, Harmey JH, Walsh TN, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. Significance of angiogenesis in cancer therapy. *Br J Surg.* 1998; 85(8): 1044-55.
64. Ataergin AS, Özet A, Arpacı F. Kanser tedavisinde anjiyogenez inhibitörlerinin yeri. *T Klin Tıp Bilimleri* 1999; 19: 100-5.
65. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(10): 795-803.

66. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000; 407(6801): 242-8.
67. Klagsbrun M, D'Amore PA. Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol*. 1991; 53: 217-39.
68. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 2003; 9(6): 685-93.
69. Ferrara N. Angiogenesis, From basic science to clinical applications. Newyork (ABD) Taylor and Francis, 2007
70. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005; 438(7070): 967-74.
71. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983; 219(4587): 983-5.
72. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 161(2): 851-8.
73. Kleespies A, Guba M, Jauch KW, Bruns CJ. Vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. *J Surg Oncol*. 2004; 87(2): 95-104.
74. Ortéga N, L'Faqihi FE, Plouët J. Control of vascular endothelial growth factor angiogenic activity by the extracellular matrix. *Biol Cell*. 1998; 90(5): 381-90.
75. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a

- potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol.* 2002; 20(21): 4368-80.
76. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol.* 1991; 5(12): 1806-14.
77. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem.* 1991; 266(18): 11947-54.
78. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem.* 1992; 267(36): 26031-7.
79. Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R, et al. The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem.* 1996; 271(13): 7788-95.
80. Safran M, Kaelin WG Jr. HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *J Clin Invest.* 2003; 111(6): 779-83.
81. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1995; 270(3): 1230-7.
82. Grugel S, Finkenzeller G, Weindel K, Barleon B, Marmé D. Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem.* 1995; 270(43): 25915-9.



83. Okada F, Rak JW, Croix BS, Lieubeau B, Kaya M, Roncari L, et al. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(7): 3609-14.
84. Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res*. 2001; 61(16): 6050-4.
85. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev*. 2004; 56(4): 549-80.
86. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88(20): 9267-71.
87. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Ferraro MG, Aprelikova O, Alitalo K, et al. Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PIGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene*. 1993; 8(4): 925-31.
88. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, et al. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(6): 2576-81.
89. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukkk E, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand

for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 1996;15(2):290-98.

90. Lee J, Gray A, Yuan J, Luoh SM, Avraham H, Wood WI. Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(5): 1988-92.
91. Orlandini M, Marconcini L, Ferruzzi R, Oliviero S. Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(21): 11675-80.
92. Achen MG, Stacker SA. The vascular endothelial growth factor family; proteins which guide the development of the vasculature. *Int J Exp Pathol.* 1998; 79(5): 255-65.
93. Kim DH, Xu W, Kamel-Reid S, Liu X, Jung CW, Kim S, et al. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor (VEGFA) and VEGF receptor (VEGFR2) gene polymorphism on the treatment outcome following imatinib therapy. *Ann Oncol.* 2010; 21(6): 1179-88.
94. Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, Silva M, Schilling J, Lau K, et al. Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 165(3): 1198-206.
95. Salven P, Lymboussaki A, Heikkilä P, Jääskela-Saari H, Enholm B, Aase K, et al. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol.* 1998; 153(1): 103-8.

- 96.[internette]. [11 Ocak 2010'da okundu]. elektronik adresi:  
<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=VEGFC&search=VEGFC>
- 97.Chilov D, Kukk E, Taira S, Jeltsch M, Kaukonen J, Palotie A, et al. Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. *J Biol Chem* 1997; 272: 25176-83.
- 98.Enholm B, Paavonen K, Ristimaki A, Kumar V, Gunji Y, Klefstrom J, et al. Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene* 1997; 14: 2475-83.
- 99.Laitinen M, Ristimaki A, Honkasalo M, Narko K, Paavonen K, Ritvos O. Differential hormonal regulation of vascular endothelial growth factors VEGF, VEGF-B, and VEGF-C messenger ribonucleic acid levels in cultured human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 1997; 138: 4748-56.
100. Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, Alitalo K. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Opin Biotechnol.* 1999; 10(6): 528-35.
101. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, et al. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene.* 1990; 5(4): 519-24.
102. Matthews W, Jordan CT, Gavin M, Jenkins NA, Copeland NG, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(20): 9026-30.

103. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. 1991; 6(9): 1677-83.
104. Karkkainen MJ, Mäkinen T, Alitalo K. Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat Cell Biol*. 2002; 4(1): E2-5.
105. Pajusola K, Aprelikova O, Korhonen J, Kaipainen A, Pertovaara L, Alitalo R, et al. FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res*. 1992; 52(20): 5738-43.
106. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, et al. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 187(3): 1579-86.
107. Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(16): 7533-7.
108. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnürch H, Martinez R, Møller NP, Risau W, et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*. 1993; 72(6): 835-46.
109. Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE*. 2001; 2001(112): re21.
110. Cébe-Suarez S, Zehnder-Fjällman A, Ballmer-Hofer K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci*. 2006; 63(5): 601-15.

111. Padró T, Bieker R, Ruiz S, Steins M, Retzlaff S, Bürger H, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its cellular receptor KDR (VEGFR-2) in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2002; 16(7): 1302-10.
112. Roskoski R Jr. VEGF receptor protein-tyrosine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 375(3): 287-91.
113. Okamoto T, Hara A, Hino O. Down-regulation of cyclooxygenase-2 expression but up-regulation of cyclooxygenase-1 in renal carcinomas of the Eker (TSC2 gene mutant) rat model. *Cancer Sci*. 2003; 94(1): 22-5.
114. Hemmerlein B, Galuschka L, Putzer N, Zischkau S, Heuser M. Comparative analysis of COX-2, vascular endothelial growth factor and microvessel density in human renal cell carcinomas. *Histopathology*. 2004; 45(6): 603-11.
115. Singh B, Berry JA, Shoher A, Ayers GD, Wei C, Lucci A. COX-2 involvement in breast cancer metastasis to bone. *Oncogene*. 2007; 26(26): 3789-96.
116. Tuna B, Yorukoglu K, Gurel D, Mungan U, Kirkali Z. Significance of COX-2 expression in human renal cell carcinoma. *Urology*. 2004; 64(6): 1116-20.
117. Khan KN, Stanfield KM, Trajkovic D, Knapp DW. Expression of cyclooxygenase-2 in canine renal cell carcinoma. *Vet Pathol*. 2001; 38(1): 116-9.
118. Chen Q, Shinohara N, Abe T, Harabayashi T, Nonomura K. Impact of cyclooxygenase-2 gene expression on tumor invasiveness in a

human renal cell carcinoma cell line. J Urol. 2004; 172(6 Pt 1): 2153-7.

119. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L. Cyclooxygenase in biology and disease. The FASEB Journal 1998; 12: 1063-73.
120. Inoue H, Yokoyama C, Hara S, Tone Y, Tanabe T. Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. J Biol Chem. 1995; 270(42): 24965-71
121. Copeland RA, Williams JM, Giannaras J, Nurnberg S, Covington M, Pinto D, et al. Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91(23): 11202-6.
122. Herschman HR. Prostaglandin synthase 2. Biochim Biophys Acta 1996; 1299: 125-40.
123. Arun B, Goss P. The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention. Semin Oncol. 2004; 31(2 Suppl 7): 22-9.
124. Denkert C, Winzer KJ, Hauptmann S. Prognostic impact of cyclooxygenase-2 in breast cancer. Clin Breast Cancer. 2004; 4(6): 428-33.
125. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. Oncologist. 2004; 9(6): 606-16.
126. Seno H, Oshima M, Ishikawa TO, Oshima H, Takaku K, Chiba T, et al. Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-

dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps. Cancer Res. 2002; 62(2): 506-11.

127. Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. J Clin Invest. 2000; 105(11): 1589-94.
128. Sonoshita M, Takaku K, Sasaki N, Sugimoto Y, Ushikubi F, Narumiya S, et al. Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc(Delta 716) knockout mice. Nat Med. 2001; 7(9): 1048-51.
129. Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. Cancer Res. 2000; 60(5): 1306-11.
130. Davies G, Salter J, Hills M, Martin LA, Sacks N, Dowsett M. Correlation between cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in human breast cancer. Clin Cancer Res. 2003; 9(7): 2651-6.
131. Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. Clin Cancer Res. 2000; 6(1): 135-8.
132. Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. Cancer Res. 2002; 62(3): 632-5.
133. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. Cell. 1998; 93(5): 705-16.

134. Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(7): 3336-40.
135. Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg*. 1972; 175(3): 409-16.
136. Taylor S, Folkman J. Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature*. 1982; 297(5864): 307-12.
137. Folkman J, Langer R, Linhardt RJ, Haudenschild C, Taylor S. Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science*. 1983; 221(4612): 719-25.
138. Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, et al. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature*. 1990; 348(6301): 555-7.
139. Sidky YA, Borden EC. Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumor- and lymphocyte-induced vascular responses. *Cancer Res*. 1987; 47(19): 5155-61.
140. Fayette J, Soria JC, Armand JP. Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment. *Eur J Cancer*. 2005; 41(8): 1109-16.
141. Avraham H, Banu N, Scadden DT, Abraham J, Groopman JE. Modulation of megakaryocytopoiesis by human basic fibroblast growth factor. *Blood*. 1994; 83(8): 2126-32.
142. Erdem F, Gündoğdu M. Anjiojenesis ve anti-anjiojenik tedavi. *AÜTD* 2005; 37: 1-6.
143. Folkman J. Endogenous angiogenesis inhibitors. *APMIS*. 2004; 112(7-8): 496-507.



144. Tew WP, Colombo N, Ray-Coquard I, Oza A, del Campo J, Scambia G, Spriggs D. VEGF-Trap for patients (pts) with recurrent platinum-resistant epithelial ovarian cancer (EOC): Preliminary results of a randomized, multicenter phase II study. *Journal of Clinical Oncology*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 25, No. 18S (June 20 Supplement), 2007: 5508
145. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004; 350(23): 2335-42.
146. Marshall J. The role of bevacizumab as first-line therapy for colon cancer. *Semin Oncol*. 2005; 32: S43-S47.
147. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2004; 3: 391-400.
148. Fong TA, Shawver LK, Sun L. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res*. 1999; 59 (1): 99-106.
149. Semenza GL. Clinical Implications of Basic Research: A New Weapon for Attacking Tumor Blood Vessels. *New England Journal of Medicine*. 2008; 358 (19): 2066
150. Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathology Annals*. 1982; 17: 229-259.

151. Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis. Basic types of cell death. Archives of Pathology and Laboratory Medicine. 1993; 117: 1208-1214.
152. Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. Cancer and Metastasis Reviews. 1992; 11: 95-103.
153. Hockenbery DM. The bcl-2 oncogene and apoptosis. Seminars in Immunology. 1992; 4: 413-420.
154. van Slooten H-J, van der Vijver MJ, van der Velde CJH, van Dierendonck JH. Loss of bcl-2 in invasive breast cancer is associated with high rates of cell death, but also with increased proliferative activity. British Journal of Cancer. 1998; 77: 789-796.
155. Koskinen PJ, Alitalo K. Role of myc amplification and over-expression in cell growth, differentiation and death. Seminars in Cancer Biology. 1993; 4: 3-12.
156. Schimmer AD. Apoptosis in leukemia: from molecular pathways to targeted therapies. Best Pract Res Clin Haematol 2008; 21(1): 5-11.
157. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007; 35(4): 495-516.
158. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. J Internal Med. 2005; 258: 479-517.
159. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. Am J Med 1999, 107(5): 489-506.

160. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 2000, 69: 217-45.
161. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002, 9(3): 459-70.
162. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 2005, 4(2): 139-63
163. [internette]. [01 Ocak 2010'da okundu]. elektronik adresi: <http://www.atcc.org/Attachments/1982.jpg>
164. Swanson SM, Ijaz A, Fahning ML. The use of acridine orange and ethidium bromide to determine the viability of pre-implantation mouse embryos cultured in vitro. *Br Vet J* 1987; 143(4): 306-11.
165. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(9): e36.
166. Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, et al. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasculature effects in human rectal cancer. *Nat Med* 2004; 10(2): 145-7.
167. Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, Hudes GR, Wilding G, Figlin RA, et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24(1): 16-24.

168. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356(2): 125-34.
169. Kabbinavar FF, Schulz J, McCleod M, Patel T, Hamm JT, Hecht JR, et al. Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3697-3705.
170. Lee FY, Covelto KL, Castaneda S, Hawken DR, Kan D, Lewin A, et al. Synergistic antitumor activity of ixabepilone (BMS-247550) plus bevacizumab in multiple in vivo tumor models. *Clin Cancer Res* 2008; 14(24): 8123-31.
171. Emlet DR, Brown KA, Kociban DL, Pollice AA, Smith CA, Ong BB, et al. Response to trastuzumab, erlotinib, and bevacizumab, alone and in combination, is correlated with the level of human epidermal growth factor receptor-2 expression in human breast cancer cell lines. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(10): 2664-74.
172. Sims TL, Williams RF, Ng CY, Rosati SF, Spence Y, Davidoff AM. Bevacizumab suppresses neuroblastoma progression in the setting of minimal disease. *Surgery* 2008; 144(2): 269-75.
173. Jia Z, Zhang J, Wei D, Wang L, Yuan P, Le X, et al. Molecular basis of the synergistic antiangiogenic activity of bevacizumab and mithramycin A. *Cancer Res* 2007; 67(10): 4878-85.
174. Mabuchi S, Terai Y, Morishige K, Tanabe-Kimura A, Sasaki H, Kanemura M, et al. Maintenance treatment with bevacizumab

prolongs survival in an in vivo ovarian cancer model. Clin Cancer Res 2008; 14(23): 7781-9.

175. Xiong YQ, Sun HC, Zhu XD, Zhang W, Zhuang PY, Zhang JB, et al. Bevacizumab enhances chemosensitivity of hepatocellular carcinoma to adriamycin related to inhibition of survivin expression. J Cancer Res Clin Oncol. 2010 May 21.
176. Lee SY, Kim DK, Cho JH, Koh JY, Yoon YH. Inhibitory effect of bevacizumab on the angiogenesis and growth of retinoblastoma. Arch Ophthalmol 2008; 126(7): 953-8.
177. Fujita K, Sano D, Kimura M, Yamashita Y, Kawakami M, Ishiguro Y, et al. Anti-tumor effects of bevacizumab in combination with paclitaxel on head and neck squamous cell carcinoma. Oncol Rep. 2007; 18(1): 47-51.
178. Salven P, Lymboussaki A, Heikkilä P, Jääskela-Saari H, Enholm B, Aase K, et al. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. Am J Pathol 1998; 153(1): 103-8.
179. Xie B, Tam NN, Tsao SW, Wong YC. Co-expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (flk-1 and flt-1) in hormone-induced mammary cancer in the Noble rat. Br J Cancer 1999; 81; 1335–43.
180. Kranz A, Mattfeldt T, Waltenberger J. Molecular mediators of tumor angiogenesis: enhanced expression and activation of vascular

endothelial growth factor receptor KDR in primary breast cancer. *Int J Cancer* 1999; 84: 293–8.

181. Price DJ, Miralem T, Jiang S, Steinberg R, Avraham H. Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 2001; 12: 129–35.
182. Bachelder RE, Crago A, Chung J, Wendt MA, Shaw LM, Robinson G, et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2001; 61(15): 5736-40.
183. Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist* 2000; 5 Suppl 1: 37–44.
184. Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* 2001; 1(1): 11-21.
185. Howe LR, Subbaramaiah K, Brown AM, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8(2): 97-114.
186. van Rees BP, Ristimäki A. Cyclooxygenase-2 in carcinogenesis of the gastrointestinal tract. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36(9): 897-903.

187. Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* 2002; 62(3): 632-5.
188. Lim SC. Role of COX-2, VEGF and cyclin D1 in mammary infiltrating duct carcinoma. *Oncol Rep* 2003; 10(5): 1241-9.
189. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993; 362(6423): 841-4.
190. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1011–27.
191. Schneider BP, Miller KD. Angiogenesis of breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1782–90.
192. Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Hinton DR, Gill PS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood* 2001; 98: 1904–13.
193. Weigand M, Hantel P, Kreienberg R, Waltenberger J. Autocrine vascular endothelial growth factor signalling in breast cancer. Evidence from cell lines and primary breast cancer cultures in vitro. *Angiogenesis* 2005; 8: 197–204.
194. Akahane M, Akahane T, Shah A, Okajima E, Thorgeirsson UP. A potential role for vascular endothelial growth factor-D as an

autocrine growth factor for human breast carcinoma cells. *Anticancer Res* 2005; 25: 701–7.

195. Xu Q, Ji Y-S, Smedtje JF. Sp1 increases expression of cyclooxygenase-2 in hypoxic vascular endothelium: implications for the mechanisms of aortic aneurysm and heart failure. *J Biol Chem* 2000; 275: 24583–24589.
196. Yodkeeree S, Ampasavate C, Sung B, Aggarwal BB, Limtrakul P. Demethoxycurcumin suppresses migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cell line. *Eur J Pharmacol* 2010; 627: 8-15.
197. Yang H, Jager MJ, Grossniklaus HE. Bevacizumab suppression of establishment of micrometastases in experimental ocular melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51: 2835-42.
198. Keunen O, Johansson M, Oudin A, Sanzey M, Rahim SA, Fack F, et al. Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 3749-54.
199. Ebos JM, Kerbel RS. Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8: 210-21.
200. Lucio-Eterovic AK, Piao Y, de Groot JF. Mediators of glioblastoma resistance and invasion during antivascular endothelial growth factor therapy. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 4589-99.



201. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nature Reviews Cancer* 2008; 8: 592-603.

## 10. EKLER

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince ilgisini ve desteğini daima hissettiğim, emeğini ve zamanını harcayarak, mesleki bilgi ve tecrübeleriyle eğitimimde ve çalışmalarımda beni yönlendiren değerli hocam, tez danışmanım Sn. Prof. Dr. Sevda MENEVŞE'ye şükranlarımı sunarım.

Doktora eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, desteklerini her zaman hissettiğim değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. Adnan MENEVŞE'ye ve Sn. Prof. Dr. Abdullah EKMEKÇİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimimin yanısıra tezimin hazırlanmasının tüm aşamalarında emeği geçen tüm öğretim üyelerimize ve tüm çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca dostluklarını, manevi desteklerini ve yardımlarını benden esirgemeyen, başta Sn. Öğr. Gör. Dr. H. İlke ÖNEN ve Sn. Dr. Akın YILMAZ olmak üzere, Sn. Uzm. Atiye Seda YAR, Sn. Araş. Gör. Volkan ERGİN ve Sn. Araş. Gör. İrem DOĞAN' a teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatım boyunca sevgilerini ve desteklerini sürekli yanımda hissettiğim, eğitim sürecim boyunca gösterdikleri anlayış ve özveriler için annem Ulviye ALP, babam Mehmet Ali ALP ve abim Ahmet ALP' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## 11. ÖZGEÇMİŞ

**Adı** : Ebru

**Soyadı** : ALP

**Doğum Yeri ve Tarihi** : Ankara, 12.10.1979

### **Eğitimi:**

**2005-** Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Doktora Eğitimi

**2001-2004** Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Eğitimi

**1997-2001** Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Lisans Eğitimi

**1994-1997** Kalaba Lisesi, Lise Eğitimi

**1993-1994** Kamil Ocak İlköğretim Okulu, Ortaokul Eğitimi

**1987-1992** Kamil Ocak İlköğretim Okulu, İlkokul Eğitimi

**Yabancı Dili** : İngilizce

### **Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:**

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği

Moleküler Kanser Araştırmaları Derneği

EACR, European Association for Cancer Research

## **Bilimsel Etkinlikleri:**

### **A) Ödüller:**

**1-** Akın Yılmaz, Hacer İlke Önen, Ebru Alp, Ece Konaç, Sevda Menevşe, Abdullah Ekmekçi, Adnan Menevşe, MDA-MB-231 Hücre Hattında 5-Fluorourasil ve Lökoverin Kombinasyonunun Sisplatin- Uyarıtlı Apoptozisi Arttırıcı Etkisi, *XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 28-31 Ekim 2009, Bodrum (Poster dalında 1. lik Ödülü)*

**2-** Ümit Korucuoğlu, Aydan Biri, Ece Konaç, **Ebru Alp**, İlke Önen, Mustafa İlhan, Esengül Türkyılmaz, Ahmet Erdem, Mehmet Erdem, Sevda Menevşe, Açıklanamayan infertilite olgularında endometriumdaki imprint genlerin ekspresyonu, *XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 28-31 Ekim 2009, Bodrum (Poster dalında 2. lik Ödülü)*

**3-** Berna Arlı, Ceyla İrkeç, Sevda Menevşe, Akın Yılmaz, **Ebru Alp**, Multipl sklerozlu hastalarda Fraktalkin gen reseptör polimorfizmi, *44. Ulusal Nöroloji Kongresi 11–16 Kasım 2008, Antalya (Poster Dalında 3. lük ödülü)*

## **B) Projeler:**

- 1- 2010 yılında Gazi Üniversitesi BAP fonunca desteklenen “Pankreatik kanser hücre serisinde histon deasetilaz (HDAC) inhibitörlerinin proliferatif ve apoptotik sinyal yollarındaki genler üzerine olan etkileri” konulu 01-2010/39 kodlu proje
- 2- 2010 yılında Gazi Üniversitesi BAP fonunca desteklenen “Renal hücreli karsinomda VHL, TIMP-3 ve RASSF1A genlerinin transkriptomik düzeyindeki ifadeleri” konulu 01-2010/25 kodlu proje
- 3- 2010 yılında Gazi Üniversitesi BAP fonunca desteklenen “Renal Hücreli Karsinomda Dolaşımsal DNA Metilasyon Belirteçleri” konulu 01-2010/24 kodlu proje
- 4- 2010 yılında Gazi Üniversitesi BAP fonunca desteklenen “Cisplatin dirençli Hep-2 larinks kanseri hücre hattında reseptör tirozin kinaz inhibitörü SU14813 ile cisplatin’ in apoptotik etkilerinin araştırılması” konulu 01/2010-26 kodlu proje
- 5- 2010 yılında Gazi Üniversitesi BAP fonunca desteklenen “Malign plevral mezotelyoma ve plevral mezotel hücre serilerinde mTOR ve NF-KB aktivitesinin baskılanmasının hücreler üzerine olan etkisi” konulu 01/2010-23 kodlu proje
- 6- 2010 yılında Gazi Üniversitesi BAP fonunca desteklenen “Tiroid kanser hücre hatlarında Timokinon ve Genistein’in telomerez aktivitesi ve apoptozis üzerine etkisi” konulu 01/2010-68 kodlu proje
- 7- 2008 yılında Gazi Üniversitesi BAP fonunca desteklenen “Kolon Kanseri Hücre Hatlarında, Apigenin Flavonoidinin Apoptoz Gen

Ekspresyonuna Olan Etkilerinin Araştırılması” konulu 01/2008-13 kodlu proje

- 8- 2007 yılında Gazi Üniversitesi BAP fonunca desteklenen “Bevacizumab’ın anti-anjiyojenik ve apoptotik etkilerinin meme kanserli hücre hattında araştırılması” konulu 01/2007-94 kodlu proje
- 9- 2007 yılında Gazi Üniversitesi BAP fonunca desteklenen “HL-60 Hücre hattında Mevastatin ve 5-Aza-2-deoksisitidinin Apoptotik ve Epigenetik Etkilerinin Belirlenmesi” konulu 01/2007-95 kodlu proje
- 10-2007 yılında Gazi Üniversitesi BAP fonunca desteklenen “Streptozotocin ile oluşturulmuş diyabetli sıçanlarda Resveratrol kullanımı sonucunda Cyclooxygenase-1 ( COX-1 ) ve Cyclooxygenase-2 ( COX-2 ) genlerinin ekspresyonlarının araştırılması” konulu 01/2007-34 kodlu proje
- 11-2007 yılında Gazi Üniversitesi BAP fonunca desteklenen “Epitel Over Kanser gelişiminde vasküler endotelial büyüme faktörü, reseptörü ve moleküler yolaktaki ilgili genlerin ifadenmesi” konulu 01/2007-26 kodlu proje
- 12-2005 yılında Gazi Üniversitesi BAP fonunca desteklenen “Açıklanamayan İnfertilite, Tekrarlayan Gebelik Kayıpları ve IVF’ de İmplantasyon Başarısızlığı olan Olgularda Endometriyumdaki İmprint Genlerin Ekspresyonu” konulu 01/2005-65 kodlu proje
- 13-2004 yılında Gazi Üniversitesi BAP fonunca desteklenen “Türk popülasyonunda koroner arter hastalığıyla eNOS ve MMP-9 genlerindeki başlıca polimorfizmlerin ilişkisi” konulu 01/2004-75 kodlu proje