

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDOSTATİN, VİNORELBİN ve KOMBİNASYONLARININ
İNSAN ENDOTEL, BÖBREK EPİTEL ve MEME KANSER HÜCRELERİ
ÜZERİNE OLAN SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşegül Cansu KİLİT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2012

**ENDOSTATİN, VİNORELBİN ve KOMBİNASYONLARININ
İNSAN ENDOTEL, BÖBREK EPİTEL ve MEME KANSER HÜCRELERİ
ÜZERİNE OLAN SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ayşegül Cansu KİLİT

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2010.02.0121.032 proje numarası ile ve Türkiye Bilimsel Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 111T613 proje numarası ile hızlı destek projesi ile desteklenmiştir.

2012

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDOSTATİN, VİNORELBİN ve KOMBİNASYONLARININ
İNSAN ENDOTEL, BÖBREK EPİTEL ve MEME KANSER HÜCRELERİ
ÜZERİNE OLAN SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşegül Cansu KİLİT

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 16/01/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (95) not takdir edilerek Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Kayahan FIŞKIN..... (Danışman)

Yrd. Doç Dr. Esra AYDEMİR

Yrd. Doç. Dr. Nilüfer İMİR

ÖZET

ENDOSTATİN, VİNORELBİN ve KOMBİNASYONLARININ İNSAN ENDOTEL, BÖBREK EPİTEL ve MEME KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNE OLAN SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşegül Cansu KİLİT

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Ocak 2012, 109 Sayfa

Klasik kanser tedavileri olarak bilinen cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyoterapi 40 yılı aşkın süredir uygulanmaktadır. Kemoterapi, sitotoksik ya da sitostatik etkili bazı kimyasallar kullanılarak doğrudan tümör hücrelerini yok etmeyi hedef alan klasik bir kanser tedavisidir.

Kemoterapide hedef tümör hücresi olduğu için uygulama sırasında söz konusu ajan yüksek dozlarda kullanılmakta ve normal hücreler üzerinde yan etkilere neden olan toksik yanıtlar oluşturmaktadır. Bunun yanında yüksek doz kullanımına bağlı olarak kanser hücrelerinde kullanılan ajana karşı direnç gelişmekte ve bu nedenle de tedavi başarısı giderek azalmaktadır. Söz konusu yan etkilerin azaltılarak tedavi etkinliğinin artırılması için; kemoterapi, farklı kanser tedavileri ile kombine edilmektedir.

Endostatin, kollajen XVIII' in C-terminal ucundan elde edilen 20 kDa moleküler ağırlığa sahip endojen bir anti-anjiogenik faktördür. Endostatin, endotel hücre göçünü inhibe eder, apoptozu indükler ve bu sayede tümörün yeni damar oluşturmalarını engeller. Jing ve arkadaşları, endostatinin ticari formda satılan ve klinik uygulamalarda kullanılan formu olan endostarı, cisplatin, vinorelbin ve paklitaksel ile kombine etmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda; kombine tedaviler sayesinde, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinin oluşturduğu tümörün büyüklüğünde önemli bir inhibisyon olduğunu göstermişlerdir.

Vinorelbin, *Catharanthus roseus* (pervane çiçeği) ekstraktının alkaloidlerinden elde edilen yarısentetik bir maddedir. 1994 yılında FDA (Federal Drug Administration); vinorelbini küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin tedavisinde kullanılması için onaylamıştır. O tarihten bu yana vinorelbin; küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, meme kanseri ve prostat kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır. Vinorelbin normal hücrelerde de diğer kemoterapötik ajanlara oranla daha az yan etkiler oluşturduğu için tek başına ya da kombine halde bir çok farklı çalışmada kullanılmaktadır. Vinorelbini, antianjiyogenik bir ajan ile kombine ederek kullanmanın etkin dozun azaltılması açısından yararlı olabileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenle çalışmamızda; endostatin ve vinorelbin kombinasyonunun meme kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Ayrıca endostatin ve vinorelbinden oluşan kombine tedavinin, apoptoz mekanizmasında anahtar roller üstlenen TRAIL, TNF- α ve Kaspaz-2,3,6,8 ve 9 proteinleri üzerine sergilediği etkiler ortaya konmuştur. Bunun yanı sıra, her iki ajan ve kombinasyonlarının normal epitel hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri de araştırılmıştır.

Bu çalışma ile endostatin ilk kez vinorelbin ile kombine edilmiş ve elde edilen sonuçlarda endostatinin ilk kez TNF- α ve kaspaz-8 üzerinden kanser hücrelerinde sitotoksik etki yarattığı ortaya çıkarılmıştır. Endostatin ve vinorelbinin sadece belirli dozlarda birbiri üzerine sinerjistik etki gösterebildiği görülmüştür.

ANAHTAR KELİMELEER: Endostatin, Vinorelbin, 293T, MDAMB 231

JÜRİ: Prof.Dr. Kayahan FIŞKIN (Danışman)

Yrd. Doç Dr. Esra AYDEMİR

Yrd. Doç. Dr. Nilüfer İMİR

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC EFFECTS OF ENDOSTATIN, VINORELBINE AND THEIR COMBINATION ON HUMAN ENDOTHELIAL, KIDNEY EPITHELIAL and BREAST CANCER CELLS

Ayşegül Cansu KİLİT

Ms Thesis in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

January 2012, 109 Pages

Classical cancer treatments known as surgical intervention, chemotherapy and radiotherapy are applied for over 40 years. Chemotherapy is a classic cancer treatment that targeted to destroy tumor cells directly by using cytotoxic or cytostatic effects of some chemicals.

The agent in question is used to target tumor cells. However during the application of high doses of chemotherapy normal cells are also effected by theratment as well as cancer cells and occured as toxic side effects. In addition, depending on the agents used, cancer cells usually develop resistance against tested chemicals. Therefore success of the treatment gradually decreases. Chemotherapy is combined with different cancer treatments to increase the effectiveness of treatment and to reduce these toxic side effects.

Endostatin is a 20 kDa endogenous anti-angiogenic factor that is derived from end of the C-terminal of collagen XVIII. Endostatin, inhibits endothelial cell migration, induces apoptosis and thereby it obstacles to create new tumor blood vessels from the existing tumor cells. Jing and colleagues combined a commercial and clinically used form of endostatin, endostar, with cisplatin, vinorelbine and paclitaxel. As a result of this study they showed a significant inhibition on the tumor size of non-small cell lung cancer cells due to the positive effects of the combinations.

Vinorelbine is a semisynthetic substance obtained from *Catharanthus roseus* extract alkaloids. In 1994, the FDA (Federal Drug Administration) approved vinorelbine for the treatment of non-small cell lung cancers. Since then, it has been used in the treatment of non-small cell lung cancer, breast cancer and prostate cancer. As vinorelbine has little or no toxic side effects on normal cells, it has been widely used, either alone or in combinations, in various investigations. We think that to combined vinorelbine with an antiangiogenic agent will provide positive effects to reduce the amount of effective doses of both tested agents. Because of this reason; our aim of this study has been to determine the cytotoxic effects of endostatin and vinorelbine, either alone or in combination, in breast cancer cells. In addition, the effects of endostatin and vinorelbine combination on TRAIL, TNF- α and caspase-2,3,6,8 and 9 proteins which are known among the key apoptotic proteins had be exposed. Moreover cytotoxic effects of endostatin, vinorelbine and their combinations have also be studied in normal epithelial cells.

By this study, for the first time, endostatin was combined with vinorelbine and results showed that endostatin caused a cytotoxic effect on cancer cells via TNF- α and caspase-8 pathways. The synergetic effects of endostatin and vinorelbin was shown at only certain doses.

KEY WORDS: Endostatin, Vinorelbine, 293T, MDAMB 231

COMMITTEE: Prof.Dr. Kayahan FIŞKIN (Supervisor)

Asst. Prof. Dr. Esra AYDEMİR

Asst. Prof. Dr. Nilüfer İMİR

ÖNSÖZ

Kanser tedavisi ızdırıp verici, yorucu ve uzun bir süreçtir. Titizlikle yapılan her çalışmanın sonucu bu amansız hastalığın tedavisi için değerli ve önemlidir. Tedavi süresini kısaltmak, ilaçların etkisini arttırmak, alternatif tedavi yöntemlerini oluşturmak ya da yeni ilaç kombinasyonlarını saptamak kanser alanında gerçekleştirilen tüm çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmanın da temel amacı olmuştur.

Bu tez çalışmasında, endostatin ve vinorelbin kombinasyonunun meme kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi; apoptoz mekanizmasında anahtar roller üstlenen ve günümüzde sitotoksik biomarkerlar olarak değerlendirilen TRAIL, TNF- α ve Kaspaz -2,-3,-6,-8 ve -9 enzimleri üzerindeki değişimi araştırılarak aydınlatılmaya çalışılmıştır.

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

Kemoterapide yüksek dozlarda kullanılan sitotoksik ajanlar vücuttaki normal hücreler üzerinde de aynı toksik etkiyi gösterip, başka bir ifade ile seçici olarak kanser hücrelerini değil aynı zamanda normal vücut hücrelerini de öldürerek toksik yan etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle kullandığımız her iki ajanın ve kombinasyonlarının kanser hücrelerine karşı sergileyeceği seçicilik oldukça önemli olduğu için, denemelerin tümü insan böbrek epitel (293T) ve insan meme kanser (MDAMB 231) hücrelerinde yapılarak sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Tez kapsamında endostatinin tek başına ve kemoterapatik bir ilaç olan vinorelbin ile birlikte kombine edilerek meme kanser hücrelerindeki üç ayrı sitotoksik biyomarker etkilerini araştırdık. Elde ettiğimiz şaşırtıcı ve aynı zamanda düşündürücü olan

bulguların, kanser tedavisi için durmadan çalışan değerli bilim insanlarına katkı sağlayacağını umut etmekteyiz.

Bu denli kapsamlı bir çalışma ile bana yüksek lisans yapabilme fırsatını sunan, karşılaştığım her zorlukta yanımda olan ve bana çözüm bulabilmeyi öğreten, desteğini ve şefkatini hep hissettiğim, tanımaktan onur ve gurur duyduğum sevgili büyüğüm, sayın danışmanım Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN'a, bu yola ilk adımımı atmamı ve ilerlememi sağlayan, her çıkmaza girdiğimde bana yol gösteren, sonsuz sabrı ve sevgisiyle yalnızca bilim yapmayı değil bana hayatı öğreten, bildiğim her şeyi borçlu olduğum, sonucu iyi veya kötü ama birlikte; birçok zorluğun üstesinden geldiğimiz, sayın hocam, biricik ablam Yrd. Doç Dr. Esra AYDEMİR'e, tez çalışmalarımın bir bölümünü yürüttüğüm Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma Uygulama Merkezinden Prof. Dr. Nidai ÖZEŞ'e ve bu birimde görev yapan tüm merkez çalışanlarına, tezimle ilgili sorunlarımda bilgisinden ve tecrübesinden yararlandığım Sayın Yrd. Doç. Dr. Nilüfer İMİR'e ve Sayın Dr. Ece ŞİMŞEK'e, tüm yardım ve destekleri için Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü Sayın Hocam Prof. Dr. Hüseyin SÜMBÜL'e, meslektaşlarım, çok değerleri kardeşlerim Bircan ÖNEL ve Aykut KURUOĞLU'na, Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nün Öğretim Üyelerine, yüksek lisansım süresince sevgisini ve sabrını benden hiç esirgemeyen, her türlü desteği ile yanımda olan, bu yolda yaşanan tüm heyecan ve üzüntülerimin ortağı, sevgili hayat arkadaşım Turan KİLİT'e ve her adımında ne olursa olsun ilerlememe sebep ve destek olan CANIM AİLEME sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI.....	4
2.1 Kanser.....	4
2.1.1. Apoptoz.....	7
2.1.2. Anjiogenez.....	17
2.1.3. Meme Kanseri.....	18
2.2. Kanser Tedavileri.....	20
2.2.1. Cerrahi mücadele.....	21
2.2.2. Kemoterapi.....	22
2.2.2.1. Vinorelbin	23
2.2.3. Radyoterapi.....	24
2.2.4. Antianjiogenik tedavi	25
2.2.4.1. Endostatin	26
2.2.5. Kombine tedaviler	29
2.2.5.1. Vinorelbin ile yapılan kombinasyon çalışmaları	30
3. MATERYAL VE METOD	31
3.1. Hücreler ve Kültür Koşulları	31
3.2. İlaçların Uygulanması ve Sitotoksik Etkinliklerinin Saptanması	31
3.2.1. Kombine tedavi uygulamaları	32
3.3. Sitotoksikite Testleri	34
3.3.1. WST-1 hücre proliferasyon kiti ile sitotoksik etkinin belirlenmesi	34
3.3.2. CyQUANT ® NF hücre proliferasyon kiti ile sitotoksik etkinin belirlenmesi	34
3.3.3. Kaspaz 2,-3,-6,-8,-9 aktivitesinin ölçümü	35

3.3.4. TNF- α miktarının belirlenmesi	36
3.4. Endostatin'in, Vinorelbin'in ve Kombinasyonunun Kaspaz-3, TNF- α ve TRAIL Üzerine Olan Etkilerin Western-Blot ile Gösterilmesi	36
3.4.1. Western-blot deneylerinde kullanılan solüsyonların içerikleri	36
3.4.2. Hücrelerin western-blot için hazırlanması	37
3.4.3. Jellerin hazırlanması	38
3.4.4. Örneklerin jele yüklenmesi ve SDS-PAGE	38
3.4.5. Antikorlarla işaretleme	39
3.4.6. Membranın görüntülenmesi	40
3.5. İstatistiksel Analiz	40
4. BULGULAR	41
4.1. Vinorelbinin Tek Başına MDAMB 231 ve 293 T Hücre Hatları Üzerine Gösterdiği Sitotoksik Etkiler	41
4.1.1. 293 T hücre hattı	41
4.1.2. MDAMB 231 hücre hattı	42
4.2. Endostatinin Tek Başına 293 T, MDAMB 231 ve HUVEC Hücre Hatları Üzerine Gösterdiği Sitotoksik Etkiler	44
4.2.1. 293 T hücre hattı	44
4.2.2. MDAMB 231 hücre hattı	50
4.2.3. HUVEC hücre hattı	56
4.3. Endostatin ve Vinorelbin Kombinasyonunun Hücre Hatları Üzerine Gösterdiği Sitotoksik Etki	59
4.3.1. 293 T hücre hattı	59
4.3.2. MDAMB 231 hücre hattı	61
4.4. Endostatin, Vinorelbin ve Kombinasyonlarının, Hücrelerde Kaspaz-2, -3, -6, -8 ve -9 Enzimlerine Olan Etkisi.....	63
4.4.1 293 T hücre hattı	63
4.4.2. MDAMB 231 hücre hattı.....	68
4.5. Endostatin, Vinorelbin ve Kombinasyonlarının; Hücrelerde TNF- α Üzerine Etkisi.....	74
4.5.1. 293T hücre hattı	74
4.5.2. MDAMB 231 hücre hattı.....	75

4.6. Endostatin, Vinorelbin ve Kombinasyonlarının Western-Blot Sonuçları.....	76
5. TARTIŞMA.....	78
6. SONUÇ	87
7. KAYNAKLAR.....	88
8. EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

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

Kısaltmalar

293T	İnsan Böbrek Epitel Hücre Hattı
ADP	Adenozin Di Fosfat
APAF	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
CARD	Kaspaz Birleştirici Parçalar
dATP	Deoksiribo Adenozin Tri Fosfat
DcR	Decay Reseptörü
DD	Ölüm Parçacığı
DED	Ölüm Efektör Parçacığı
DFF	DNA Fragmentasyon Faktörü
DISC	Ölüm Uyarıcı Sinyal Kompleksi
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit

DR	Ölüm Reseptörü
ECM	Ekstra Selüler Matriks
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
ER	Endoplazmik Retikulum
FADD	Ölüm Parçacığı İçeren Fas Bağımlı Protein
FAS-L	Fas Ligant
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GPI	Glikozilfosfotidil inozitol
GrB	Granzim B
HUVEC	İnsan Umbilikal Damar Hücre Hattı
ICE	İnterlökin-1 beta dönüştürücü enzim
IGF	İnterlökin Büyüme Faktörü
IL	İnterlökin
KASPAZ	Sistein Aspartat Spesifik Proteazları
KI	Kombinasyon İndeksi
MAPK	Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinaz
MCI	Mitotik Hücre İnhibitörü
MDAMB 231	İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı
MDR	Çoklu İlaç Direnci
NaCl	Sodyum Klorür
NFkB	Nükleer faktör Kappa-B
OPG	Osteoprotegerin
PARD	Poli Adenozin Riboz Polimeraz
PBS	Fosfat-Tuz Tamponu
pH	Bir Solüsyonun Asitlik ya da Bazlık Değeri

PI3K	Fosfotidilinozitol 3-kinaz
pNA	Peptit Nükleik Asit
PVDF	Platelit Kökenli Büyüme Faktörü
Rb	Retinoblastoma
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	Ortalama değerin standart hatası
SREBP	Sterol Düzenleyici Element Bağlayıcı Protein
TBST	Tris-Baz solüsyonu
TEMED	Tetraetilmetildiamin
TGF- α	Tümör Büyüme Faktör Alfa
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TNF-R	Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
TRAF	TNF reseptörü bağımlı faktör
TRAIL	TNF Bağımlı Apoptozis İndükleyici Ligand
UV	Ultraviyole ışını
WST	Hücre Proliferasyon Kiti

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kanser hücrelerinin altı temel özelliği	6
Şekil 2.2. Kaspazların moleküler sınıflandırılması	10
Şekil 2.3. Sitokrom c ve APAF-1 aracılı apoptozis	11
Şekil 2.4. Trail ve hücre ölümü	14
Şekil 2.5. Trail ve ölüm reseptörleri	16
Şekil 2.6. Var olan damarlardan yeni kan damarlarının gelişmesi	17
Şekil 2.7. Vinorelbinin apoptotik etkisi	24
Şekil 2.8. Endostatinin anjiogenez ile ilişkisi	27
Şekil 2.9. Endostatin aktivasyonu ve anjiogenez üzerine etkisi	28
Şekil 4.1. Vinorelbinin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde, 293 T hücre hattı üzerine etkisi	42
Şekil 4.2. Vinorelbinin 0.039 ng/ml-1 µg/ml arasında denenilen dozlarının, 293 T hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)	43
Şekil 4.3. Vinorelbinin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde, MDAMB 231 hücre hattı üzerine etkisi	44
Şekil 4.4. Vinorelbinin 3.92 ng/ml-1 µg/ml arasında denenilen dozlarının, MDAMB 231 hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)	45
Şekil 4.5. Endostatinin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde, 293 T hücre hattı üzerine etkisi	46
Şekil 4.6. Endostatinin 3.92 ng/ml-1 µg/ml arasında denenilen dozlarının, 293 T hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)	47
Şekil 4.7. Endostatinin 24 saatlik inkübasyon süresinde, 293 T hücre hattı üzerine etkisi	48
Şekil 4.8. Endostatinin 48 saatlik inkübasyon süresinde, 293 T hücre hattı üzerine etkisi	49
Şekil 4.9. Endostatinin 72 saatlik inkübasyon süresinde, 293 T hücre hattı üzerine etkisi	50
Şekil 4.10. Endostatinin 31.25 ng/ml-5 µg/ml arasında denenilen dozlarının, 293 T hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)	51
Şekil 4.11. Endostatinin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde, MDAMB 231 hücre hattı üzerine etkisi	52
Şekil 4.12. Endostatinin 3.92 ng/ml-1 µg/ml arasında denenilen dozlarının, MDAMB 231 hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)	53

Şekil 4.13. Endostatinin 24 saatlik inkübasyon süresinde, MDAMB 231 hücre hattı üzerine etkisi ..	54
Şekil 4.14. Endostatinin 48 saatlik inkübasyon süresinde, MDAMB 231 hücre hattı üzerine etkisi ..	55
Şekil 4.15. Endostatinin 72 saatlik inkübasyon süresinde, MDAMB 231 hücre hattı üzerine etkisi ..	56
Şekil 4.16. Endostatinin 31.25 ng/ml-5 µg/ml arasında denenilen dozlarının, MDAMB 231 hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%) ..	57
Şekil 4.17. Endostatinin 24 saatlik inkübasyon süresinde, HUVEC hücre hattı üzerine etkisi ..	58
Şekil 4.18. Endostatinin 48 saatlik inkübasyon süresinde, HUVEC hücre hattı üzerine etkisi ..	59
Şekil 4.19. Endostatinin 72 saatlik inkübasyon süresinde, HUVEC hücre hattı üzerine etkisi ..	60
Şekil 4.20. 4 µg/ml total proteindeki kaspaz-2 enzim aktivitesinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 293 T hücrelerindeki etkinliği ..	64
Şekil 4.21. 4 µg/ml total proteindeki kaspaz-3 enzim aktivitesinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 293 T hücrelerindeki etkinliği ..	65
Şekil 4.22. 4 µg/ml total proteindeki kaspaz-6 enzim aktivitesinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 293 T hücrelerindeki etkinliği ..	66
Şekil 4.23. 4 µg/ml total proteindeki kaspaz-8 enzim aktivitesinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 293 T hücrelerindeki etkinliği ..	67
Şekil 4.24. 4 µg/ml total proteindeki kaspaz-9 enzim aktivitesinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 293 T hücrelerindeki etkinliği ..	68
Şekil 4.25. 4 µg/ml total proteindeki kaspaz-2 enzim aktivitesinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda MDAMB 231 hücrelerindeki etkinliği ..	69
Şekil 4.26. 4 µg/ml total proteindeki kaspaz-3 enzim aktivitesinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda MDAMB 231 hücrelerindeki etkinliği ..	70
Şekil 4.27. 4 µg/ml total proteindeki kaspaz-6 enzim aktivitesinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda MDAMB 231 hücrelerindeki etkinliği ..	71
Şekil 4.28. 4 µg/ml total proteindeki kaspaz-8 enzim aktivitesinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda MDAMB 231 hücrelerindeki etkinliği ..	72

Şekil 4.29. 4 µg/ml total proteindeki kaspaz-2 enzim aktivitesinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda MDAMB 231 hücrelerindeki etkinliği	73
Şekil 4.30. 10 ⁶ hücre/ml'deki TNF- α proteinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 293 T hücre hattı üzerinde etkinliği	74
Şekil 4.31. 10 ⁶ hücre/ml'deki TNF-α proteinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda MDAMB 231 hücre hattı üzerinde etkinliği	75
Şekil 4.32. Vinorelbin ve endostatinin tek başına ve kombine olarak Kaspaz-3, TNF-α, TRAIL aktivitesi üzerine etkilerinin western-blot ile gösterilmesi.....	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. 96-kuyucuklu plaklarda endostatin ve vinorelbinin birlikte uygulamaları	39
Çizelge 4.1. 293T hücre hattında endostatin (1µg/ml-1.95 ng/ml) ve vinorelbin (1µg/ml-15.62ng/ml) kombinasyonun 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 450nm'deki absorbans (OD) değerleri	60
Çizelge 4.2. 293T hücre hattında endostatin (5µg/ml-31.25 ng/ml) ve vinorelbin (1µg/ml-15.62 ng/ml) kombinasyonun 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, 450nm'deki absorbans (OD) değerleri	61
Çizelge 4.3. MDAMB 231 hücre hattında endostatin (1µg/ml-1.95 ng/ml) ve vinorelbin (1µg/ml-15.62 ng/ml) kombinasyonun 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, 450nm'deki absorbans (OD) değerleri	62
Çizelge 4.4. MDAMB 231 hücre hattında endostatin (5µg/ml-31.25 ng/ml) ve vinorelbin (1µg/ml-15.62 ng/ml) kombinasyonun 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, 450nm'deki absorbans (OD) değerleri	63

1. GİRİŞ

Bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesi için gerekli olan biyolojik özellikler hedef alınarak kanser hücrelerini yok etmek mümkün olabilir. Bunun için bir hücrenin kanserleşme yolundaki ilerleyişi ve kanserli hücreyi ölüme götürecek olan mekanizmanın iyi anlaşılması ve yorumlanması gereklidir. Bu bağlamda programlı hücre ölümü yani apoptozis mekanizması yapılan tüm kanserle mücadele çalışmalarında yol gösterici olmaktadır.

Programlı hücre ölümü ya da apoptozis, doku gelişimi homeostasinin korunmasında oldukça önemlidir (Schulz vd 1999). Ancak apoptozis sadece fizyolojik olaylarla ilişkili değildir, birçok klinik hastalığın tedavisinde hedef alınabilecek önemli mekanizmalardan birisidir. Son yıllarda apoptozis ve kanser ilişkisini gösteren birçok çalışma yapılmıştır. Bu bağlamda apoptozis etkili bir kanser tedavisi sağlamak için hedef alınacak en önemli hücresel mekanizmadır. Dahası günümüzde kullanılan pek çok ajan, anti tümör etkilerini, kanser hücrelerinde apoptozis mekanizmasını tetiklemek koşuluyla sağlamaktadır (Hayakawa vd 2008).

Tümör hücrelerinde apoptozisin uyarımı; pro-apoptotik faktörlerin ekspresyonunu tetikleyerek ya da anti-apoptotik faktörlerin ekspresyonunu baskılayarak sağlanabilir (Ozben 2007). Apoptozis temelde iki farklı yolla uyarılabilmektedir. Bunlar:

1. Ölüm reseptörlerinin bağlanması takiben kaspaz-8'in aktivasyonu ile uyarılan dışsal yolak
2. Hücresel stres ile kaspaz-9 aktivasyonu sayesinde uyarılan içsel yolak

Ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas ve tümör nekrozis faktör reseptörleri (TNF-R) TNF ailesine ait olup sitosolik ölüm merkezleri içerir. Bu reseptörler apoptoz mekanizmasının başlatıcısı olarak rol oynayan kaspaz-8'in aktivasyonunu sağlar. Bu şekilde yolaktaki diğer moleküllerin de birbirini aktive etmesi ile mekanizmada diğer kaspazların ve pro-kaspaz 3'ün aktive olmasıyla beraber apoptoz mekanizması işler. Dışsal yolağın bir kolu pro-kaspaz 3 aracılığı ile dışarıdan gelen sinyaller ile başlar ve

membranda bulunan FAS, TNF, TRAIL gibi ölüm reseptörleri ile aktive olur. Diğer bir kol ise kaspaz-8'in Bid molekülü ile etkileşime girmesi ile devam eder ve bu kademeli ilerleyiş mekanizmasının altında BCL2 ailesi molekülleri yer almaktadır (Ghavami 2009).

Kanserli hücreyi ölüme götüren mekanizma olan apoptozisin anlaşılması ve çalışılmasının yanı sıra, hücrenin kanserleşmesi yolundaki ilerleyişi olan anjiogenezin baskılanması da kanserle mücadele çalışmalarında oldukça önemli bir yere sahiptir. Var olan damarlardan yeni kan damarları oluşumu olarak tanımlanan anjiogenez mekanizması normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşebilmesi için gerekli olan özelliklerden birisidir çünkü tümör hücrelerinin gerek duyduğu besin ve oksijen, kan damarlarından sağlanır. O halde, anjiogenez mekanizmasının inhibisyonu kanser tedavisi için önemli bir hedeftir (Connolly vd 2002).

Anjiogenez inhibitörlerinden bazıları, günümüzde kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Endostatin, endojen anti-anjiogenik faktörlerden biridir (O'reilly vd 1997). Pre-klinik denemelerde oldukça başarılı sonuçlar elde edilmesine rağmen endostatin, klinik denemelerde beklenen başarıyı sağlayamamıştır. Yapılan araştırmalar sonucunda endostatinin bifazik etkili olduğu yani ya çok düşük dozlarda ya da oldukça yüksek dozlarda etki gösterdiği saptanmıştır (Calfa vd 2006, Qesada vd 2006). Son yıllarda tasarlanan kombine tedaviler ile endostatinin antianjiogenik ve antitümöral etkisini artırarak kanser tedavisinde daha etkin olarak kullanılması umut edilmektedir (Gasparini vd 2005).

Vinorelbin yarısentetik karakterli bir vinka alkaloittir. Son yıllarda vinorelbinin meme kanser tedavisindeki başarısı oldukça dikkat çekmektedir. Özellikle meme ve küçük hücreli olmayan akciğer kanser tedavisinde vinorelbin diğer vinka alkaloidlere oranla daha başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlamakla kalmamış yan etkilerin oranında da önemli ölçüde azalma sağlamıştır. Ayrıca tek başına kullanıldığı gibi kombine tedavilerde de başarı oranını arttırmaktadır (Hayakawa vd 2008).

Kemoterapi, tümör hücrelerini; antianjiogenik terapi, endotel hücrelerini hedef aldığı için vinorelbin gibi kemoterapik bir ilaç ile endostatin gibi anti-anjiogenik bir ajanın kombinasyonu kanser ile çift taraflı savaşı sağlamaktadır.

Bir ajanın ticari formda hizmete sunulan bir ilaç haline gelmesi uzun, yorucu bir süreç sonunda gerçekleşir ve maliyeti oldukça fazladır. Bu nedenle yeni ilaçların keşfi yerine var olanların etkinliğini arttırmak maddi ve manevi açıdan büyük yararlar sağlar. Bu nedenle, son yıllarda tasarlanan kombine tedaviler ile endostatinin antianjiogenik ve antitümöral etkisini artırarak kanser tedavisinde daha etkin olarak kullanılması umut edilmektedir (Gasparini vd 2005).

Tedavi süresini kısaltmak, ilaçların etkisini artırmak, alternatif tedavi yöntemlerini oluşturmak ya da yeni ilaç kombinasyonlarını saptamak, kanser alanında gerçekleştirilen tüm çalışmalarda olduğu gibi bizim çalışmamızın da temel amacı olmuştur.

2. KURUMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

2.1. Kanser

Kanser, hücre döngüsünün kontrolündeki işlev bozuklukları ve mutasyonların birikimi nedeniyle ölmesi gereken hasarlı ve mutant hücrelerin hücre döngüsü boyunca ilerlemesi; hücrede meydana gelen genetik ve/veya epigenetik değişikliklerin birikimi sonrasında ortaya çıkabilen bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (Ponder 2001, Foster 2008).

Genomda meydana gelen mutasyonlara bağlı olarak, normal hücrelerde malignant özelliklerin artması sonucunda kanserin oluştuğu bilinmektedir. DNA hasarı, replikasyon hataları ve metabolizmada oluşan zararlı yan ürünler gibi iç etmenler ya da iyonize radyasyon, UV ışınları ve karsinojenler gibi dış etmenler kansere neden olmaktadır. Bu gibi faktörlere bağlı olarak tek bir insan hücresinde her gün yaklaşık olarak 10.000 mutasyon meydana geldiği düşünülmektedir (Bertram 2001).

Kansere neden olan genetik değişikliklerin çoğu, bu hücrelerin büyüme veya ölümü kontrol eden ekstraselüler sinyalleri görmezden gelmelerini sağlamaktadır. Hücre bölünmesi, hücre döngüsünde yer alan ve günümüzde ayrıntılı bir biçimde tanımlanmış olan kontrol noktaları tarafından özenle düzenlenir. Buna benzer olarak hücrenin ölüme yönlendirilmesi de ancak bazı sinyaller ile aktive olabilen ve genetik olarak programlanmış bir mekanizma sayesinde gerçekleşebilir. Apoptoz olarak adlandırılan bu mekanizma sayesinde mutasyona uğramış, gereğinden fazla çoğalmış ya da artık organizma için gerekli olmayan hücreler ölüme yönlendirilir. Apoptoz mekanizmasının aktivasyonunu sağlamak, var olan tümörü yok etmek için kaçınılmaz bir sondur. (Elmore 2007).

Hücre döngüsü, hücrelerin büyümesi ve üremesini kapsayan bir süreçtir. Büyüme faktörleriyle uyarılmış ve replikasyona doğru ilerleme gösteren hücreler, hücre döngüsünün G1 fazından çıkarak S fazına geçer ve DNA sentezi başlamış olur. S fazını G2 fazı takip eder ve artık hücre M fazında duplikasyona hazırdır.

Hücre döngüsünde, bölünmenin hatasız bir şekilde gerçekleşmesini sağlamak amacıyla birçok kontrol noktası bulunmaktadır. Bu kontrol noktaları, hücre büyümesi ve gelişiminin kontrolünü elinde tutarak karmaşık iletişim ve etkileşimleri düzenler. Hücre döngüsü boyunca, denetleme noktaları siklin bağımlı kinazlar (cdk) tarafından kontrol edilmektedir. Siklinler G1 den S'e, G2'den M fazına kadar hücre döngüsünün tüm fazlarında görev alır. Siklin bağımlı kinazlar, yapısal protein olan bir siklin molekülü ve bir enzim olan kinazdan oluşur. Hücre döngüsünü engelleyici proteinler olan siklin bağımlı kinaz inhibitörleri, siklin bağımlı kinazların aktivitesinin kontrolünden sorumludur (Foster 2008).

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

Hücre döngüsünde önemli bir rolü olan, dolayısıyla kanser gelişiminde de önemli görevlere sahip olan iki gen ailesi vardır. Bunlar; onkogenler (*Her2/neu*, *Ras*, *c-Myc* vb.) ve tümör baskılayıcı (*p53* ve *Rb*) genlerdir. Kanserleşmiş hücrelere bakıldığında mutasyonların çoğunlukla proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelmiş olduğu görülür. Proto-onkogenler hücre üremesinin farklı evrelerinde rol oynar. Ancak bir mutasyon sonucu proto-onkogenler onkogene dönüşürse, bunun sonucunda tümör büyümesi gerçekleşebilir. Tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar ise mutant hücrelerdeki bölünme baskısını ortadan kaldırdığı için hücrelerin çoğalarak tümör oluşturmaya izin verir (Foster 2008, Ingber 2008).

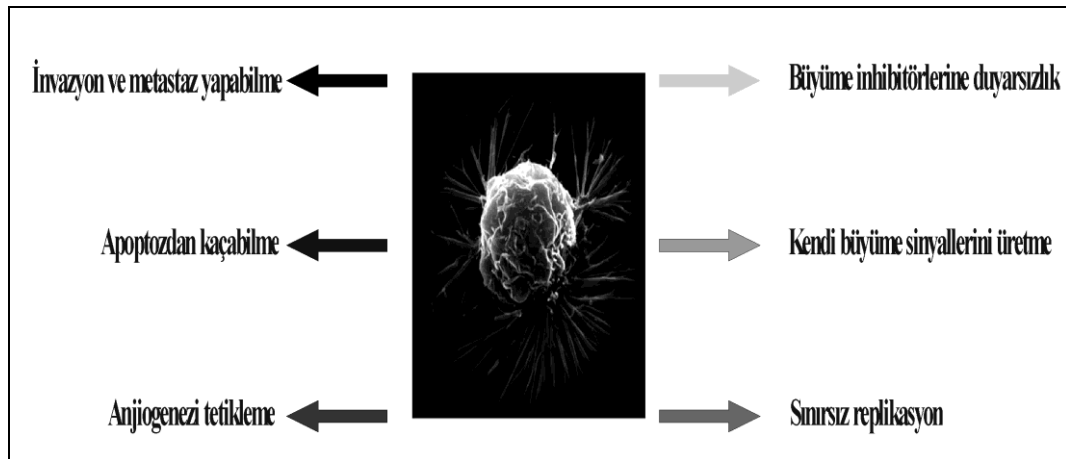
Hücre döngüsü kontrol mekanizmaları ile mutasyonları tespit edilen hasarlı hücrenin malignant sürece doğru ilerlemesi iki farklı yolla engellenir. İlki hücre şişmesi ve hızlı parçalanma olarak karakterize edilen “nekrozis” ; ikincisi ise DNA fragmentasyonu ve hücre zarının küçük parçalara bölünmesiyle karakterize olan “apoptozis”dir. Normal

hücrelerde DNA hasarının tespit edilmesinden sonra hücreyi ölüme götüren apoptotik süreç, kanser açısından mutant hücrelerin çoğalmasının engellenmesinde de oldukça önemlidir (Foster 2008).

Bilim adamlarının uzun süreden beri devam eden çalışmaları sonucunda, kanser tipine bağlı olmaksızın, tüm malignant hücrelerde var olan altı temel özellik ortaya çıkarılmıştır. Bu özellikler:

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

Bu altı temel özelliğin her biri, kanserin fizyolojik belirteçleri olarak gösterilmekte ve kanser tedavisi için farklı hedefler olarak kabul edilmektedir (Hanahan ve Weinberg 2000) (Şekil 2.1)



Şekil 2.1. Kanser hücrelerinin altı temel özelliği (Hanahan ve Weinberg 2000'den alınarak uyarlanmıştır)

2.1.1 Apoptozis

Hücre ölümüyle ilgili ilk bilgiler 1920 yılında ışık mikroskobunun ve yeni boya yöntemlerinin keşfedilmesi ile elde edilmiştir. Hücrede ilk tanımlanan ölüm tipi “nekroz”dur. Patolojik hücre ölümü olarak bilinen nekrozda, enerjinin birden azalması sonucunda hücre zarının geçirgenliği değişir ve hücre içerisine su ve sodyum girişi ile hücre şişer. Bunun sonucunda hücre bu dirence dayanamaz, hücre zarı patlar ve proteolitik enzimler içeren plazma, hücreler arası boşluğa sızarak inflamasyonun oluşmasına yol açar.

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

Apoptoz, *Caenorhabditis elegans*’tan insana kadar tüm çok hücreli canlılarda görülen, evrimsel olarak çok iyi korunmuş bir mekanizmadır (Cummings vd 2004, Heemst vd 2007). Gelişmiş organizmalarda gereksinim duyulmayan, fonksiyonları bozulmuş hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı bir biçimde ölmesi olarak da tanımlanan apoptoz, embriyonel dönemden başlayarak tüm yaşam boyunca devam etmektedir (Zornig vd 2001).

Hücre hacmindeki kayıp, plazma membran kabarcıkları, nükleer yoğunlaşma, kromatin toplanması ve DNA’da endonükleotik parçalanma gibi özellikler apoptotik hücreler için karakterizedir (Hu ve Kavanagh 2003). Apoptozis sırasında hücre membranı asimetrisini kaybeder ve fosfatidilserin hücre yüzeyinden salınmaya başlar. Bu sayede makrofajlara bu hücrelerin parçalanmasıyla ilgili sinyal gönderilmiş olur. Oluşan apoptotik cisimlerdeki fosfatidilserin fagositik hücrelerde bulunan vitronektin, lektin yapıdaki reseptörlere tutunur ve fagositik hücrelerce yok edilir. Bu nedenle çevre dokularda inflamasyona yol açmaz (Cohen 1998).

Memeli hücrelerinde apoptozis mekanizması; hücre içi ve hücre dışı birçok sinyal tarafından kontrol edilir. Apoptozis bu içsel (mitokondriyel) ya da dışsal (ölüm reseptörleri) yolaklardan biri ile aktive edilir. Dışsal yolak dışarıdan gelen sinyaller ile başlar ve membranda bulunan FAS, TNF, TRAIL gibi ölüm reseptörleri ile aktive olur. Bu kademeli ilerleyiş mekanizmasının altında, kaspazlar ve BCL2 ailesi molekülleri yer almaktadır.

Kaspazlar apoptotik hücre ölümünde önemli bir görev üstlenen multigen ailesinden oluşan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Kelime olarak "Cysteine Aspartate Specific ProteASEs- CASPASE" olarak türetilmiştir. Öncelikle inaktif proteinler olarak sentezlenen bu enzimler çeşitli yollarla aktive edilmelerinin ardından hücresel hedeflerdeki tetrapeptit motifleri tanır ve substratı, bir aspartat rezidüsünün karboksil tarafından ayırır. Hücre ölümü sırasında meydana gelen pek çok sellüler ve morfolojik değişimler, bu enzimlerin rol oynadığı birtakım süreçler neticesinde gelişir (Nicholson 1999).

Kaspaz-1, kaspaz ailesinin prototipidir ve önceleri prointerlökin-1-beta'nın biyolojik aktif formuna dönüşümünden sorumlu, ICE (interlökin-1-beta dönüştürücü enzim) olarak da adlandırılan, bir sistein proteaz olarak tanımlanmıştır (Thornberry vd 1992, Cerretti vd 1992). Daha sonraları ise ICE'nin diğer sistein-proteazlardan farklı olarak amid bağının N-terminalindeki p1 pozisyonu olarak bilinen ucunda aspartik asitin mutlak gerekliliğini gerektiren farklı bir sistein-proteaz olduğu keşfedilmiştir.

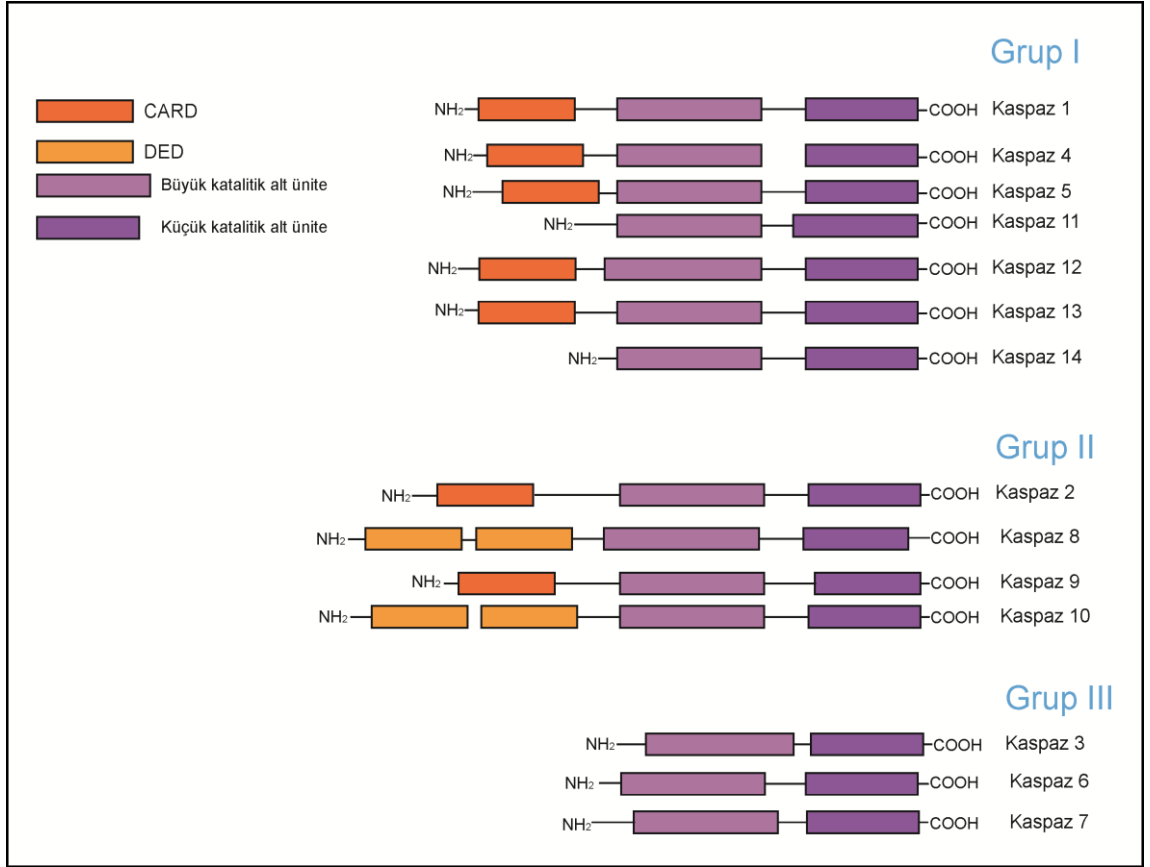
ICE'nin inflamasyondaki rolü geniş bir şekilde aydınlatılırken bir taraftan da hücre ölümünden sorumlu genetik yoldaki rolü ortaya konmuştur (Ellis 1991). Bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'in üzerinde yapılan bu çalışmada, hücre ölümü sırasında görev alan genetik yolda ced-3 isimli bir genin kodladığı proteinin, hermafroditin gelişimi esnasındaki tüm programlı hücre ölümlerinden sorumlu olduğu görülmüştür. Daha sonraları ise ced-3'ün memelilerdeki ICE'nin bir homoloğu olduğu gözlenmiştir (Yuan vd 1993, Xue vd 1996). Bu bilgiler doğrultusunda apoptotik hücre ölümleri esnasında meydana gelen proteolizler ve bu yıkımlar sonucu gerçekleşen biyokimyasal olaylar aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Memelilerde en az 14 kaspaz tanımlanmıştır (Alnemri 1996). Filogenetik analiz sonucunda gen ailesinin ICE (kaspaz-1) ile ilişkili ve ced-3 benzeri olmak üzere iki subgrubu olduğu görülür. Proenzimlerin kısa (kaspaz 3,6,7) veya uzun prodomain barındırmalarına göre de kaspazları daha alt gruplara ayırmak mümkündür. Alternatif olarak bu proteazlar, substrat spesifitelerine göre de gruplandırılabilir (Thornberry vd 1997, Rano 1997). Günümüzdeki modern yaklaşım ise proteazları üç gruba ayırmaktadır (Nicholson ve Thornberry 1999). Kaspazlar, tetrapeptit motiflerini aminoasit spesifitelerine göre tanır ve p4 pozisyonundaki aminoasitlere göre üç spesifik gruba ayrılır.

Grup 1 kaspazlar (kaspaz-1, 4, 5, 13); P4 pozisyonunda hidrofobik aminoasitleri tanır ve sitokinlerin maturasyonuna aracılık eder.

Grup 2 kaspazlar (kaspaz-2, 3, 7); apoptosisin major efektörleri olarak bilinirler ve bu kaspazların yeğledikleri ayırma noktaları hücre ölümü sırasındaki pek çok proteinlerde gözlenir.

Grup 3 kaspazlar (kaspaz-6, 8, 9, 10) ise P4 pozisyonunda alifatik aminoasitleri tanır ve grup 2 kaspazların aktivasyonunda görev alır (Şekil 2.2). Kaspazlara ek olarak bir serin proteaz olan granzim-B gibi başka proteazlar da kaspaz aktivasyonunda görev almakta olup, bazen de kaspazların yerine fonksiyon görerek apoptotik hücre ölümüne katkıda bulunur (Şekil 2.1). Ancak bu sıralanmanın istisnaları da mevcuttur. Örneğin kaspaz-2 kendiliğinden aktive olabilir ve yine kaspaz-6 efektör proteaz olarak görev alabilir (Nicholson 1999).



Şekil 2.2. Kaspazların moleküler sınıflandırılması (Nicholson 1999'dan uyarlanmıştır).

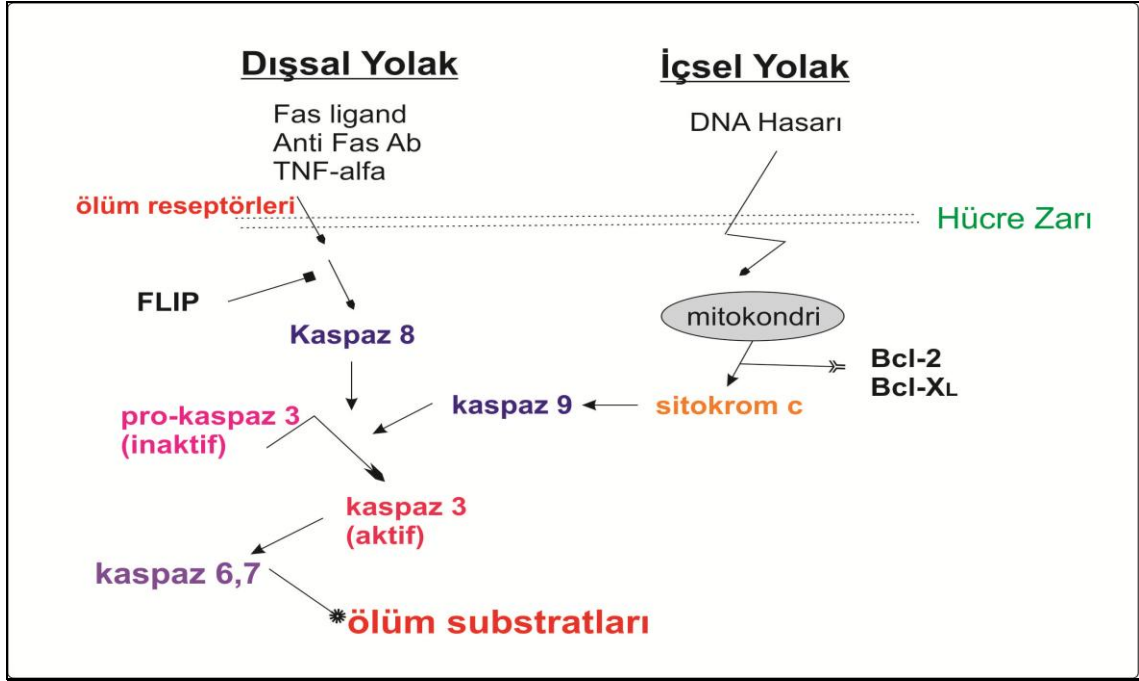
Kaspaz aracılı apoptozisin aktivasyonunda üç ayrı yolun varlığı bilinmektedir;

- Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis
- Hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile tetiklenen apoptozis
- Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis

a) Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis:

Hücrel stres durumunda mitokondriden, sitokrom c ve apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) salınarak dATP kofaktörlüğünde prokaspaz-9 molekülüne bağlanır (Şekil 2.3). Bu yolla aktive olan kaspaz-9, prokaspaz-3'ü aktive eden kaskadı başlatır ve devamında sitoplazmada yapısal proteinlerin sindirimi, kromozomal DNA'nın

degradasyonu ve hücrenin fagositozu sağlanır (Hu vd 1999, Li 1997, Krajewski vd 1997).



Şekil 2.3: Sitokrom c ve Apaf-1 aracılı apoptozis

Apaf-1 molekülündeki konformasyonel değişiklikler apoptozom oluşumuna ve apoptozisin aktivasyonuna neden olur. Apoptozomun oluşum ve fonksiyon görmesi ise mitokondrial ve sitozolik faktörler tarafından düzenlenir (Cuzzolino vd 2004).

b) Hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile tetiklenen apoptozis:

Fas-ligand (Fas-L) ve Tumor nekrozis faktör (TNF) gibi moleküllerin, hücre yüzeyindeki Fas ve TNF reseptörlerine bağlanmasıyla sitoplazmaya kaspaz-8'i aktive eden sinyaller yayılır.

Kimyasal, fiziksel ya da viral enfeksiyonlarla hasar görmüş hücrelerde, interleukin-1 (IL-1) gibi pro-enflamatuar sitokinlerin etkisi sonucu, hücre yüzey Fas ekspresyonu başlar. Bu süreç Fas antijeninin “up-regülasyonu” olarak adlandırılır. Bu süreç sırasında sitotoksik T hücreleri de Fas-L yapımı için uyarılırlar ve Fas-FasL bağlanması ile prokaspaz 8 ve 2'nin aktivasyonu sağlanır (Nagata ve Golstein 1995). Böylece hücrenin

apoptozise gitmesi indüklenmiş olur (Grell vd 1994). Fas-Fas-L etkileşimi FADD (Fas bağımlı ölüm domain proteini) aracılığıyla olur (Bhojani vd 2005)

Bir yandan da, ilk kez granülositlerde keşfedildiği için Granülosit-enzim kelimelerini birleştirerek ifade edilen Granzim B (GrB), sitotoksik T hücrelerinden salgılanarak GrB reseptörlerine bağlanır. GrB bir serin proteaz enzimidir. Sitoplazma içine alınan GrB, kaspas kaskadı üzerinden apoptozisi başlatır (Srinivasula vd 1996, Darmon vd 1995, Martin vd 1996, Andrade vd 1998).

c) Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis:

Endoplazmik retikulum (ER), hücre içi kalsiyum dengesi, sentezi ve membran proteinlerinin katlanmasını içeren birçok süreçte kritik öneme sahiptir. Hücre içi kalsiyum seviyeleri yükseldiğinde ER membranında bulunan prokaspaz-12 aktifleşir ve sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile karşılıklı olarak etkileşerek kaspaz kaskadını aktive eder (Nakamura vd 2000, Rao vd 2001).

Kasparların etkilediği hedef noktalar; DNA hasarının tamirinden sorumlu Poli ADP Riboz Polimeraz (PARP) (Hirata vd 1998), DNA-bağımlı protein kinaz (DNA-PK) (Casciola vd 1996, Song vd 1996), nükleus membranının integritesini sağlayan laminler (Liu vd 1996) ve UIRNP (Nicholson 1997)'dir. Bunların yanında DNA'nın parçalanmasına yol açan nükleazları inhibe eden DNA fragmentasyon faktörü (DFF 45) (Chen vd 2008), hücre içi kolesterol homeostazisinden sorumlu bir integral protein olan Sterol Düzenleyici Element Bağlayıcı Protein (SREBP-1) (Zou vd 1997), bir tümör supresör gen olan retinoblastom geni ve hücre iskelet proteinlerinden Fodrin (Nagata ve Golstein 1995) olarak özetlenebilir.

Apoptoz, ölüm reseptörleri adı verilen birbiriyle yapısal olarak akraba olan birkaç reseptör tarafından aktif olarak uyarılır. En iyi bilinen örnekleri TNF- α ve Fas reseptörleridir. Hücreye sitotoksik T reseptörleri yoluyla ulaşan Fas ligandı, ya da TNF-alfa, hücre yüzeyinde bulunan kendine özgü reseptörlerine bağlanarak apoptozu uyarabilir.

TNF- α geni 6. kromozomda yerleşiktir (6p21.3) ve başlıca aktif makrofajlar, killer hücreleri ve T lenfositler tarafından eksprese edilirler (Oppenheim vd 2000).

TNF reseptör ailesi 3 temel gruptan oluşmaktadır. İlki sitoplazmik kuyrukta yerleşik olup “death domain” (DD) içerir. DD içeren reseptörlerin aktivasyonu sonucunda Fas-aracılı DD ve TNF-R aracılı DD gibi hücre içi moleküller aktif hale gelir. Bu moleküllerin aktivasyonu ise kaspaz kaskadını aktive eder ve apoptozis indüklenir. İkinci grup reseptörler bir veya daha fazla TNF-R aracılı faktör (TRAF) aktivasyonu ile mitojen aktifleştirici protein kinazlar (MAPK), nükleer faktör kapa-B inhibitör (NFkB) kinaz ve fosfotidilinositol 3-kinaz (PI3K) gibi hücre proliferasyonu, büyümesi ve apoptozunda rol oynayan, dolayısıyla kanser hücrelerinin büyümesinde önemli rolü olan sinyal ileti yollarının aktivasyonuna neden olmaktadır. Üçüncü grup reseptörün ise sinyal ileti sistemindeki rolü tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir.

Endojen TNF- α T hücrelerinde reseptör aracılı apoptozisi indüklemektedir (Zheng 1995). *In vitro* çalışmalar, düşük doz TNF'nin bazı malign hücre gruplarında proliferasyona neden olduğunu ortaya koymaktadır (Liu 2000). TNF aynı zamanda hücre içi sinyal ileti yolları sayesinde otokrin bir tümör büyüme faktörü olarak da rol oynayabilir.

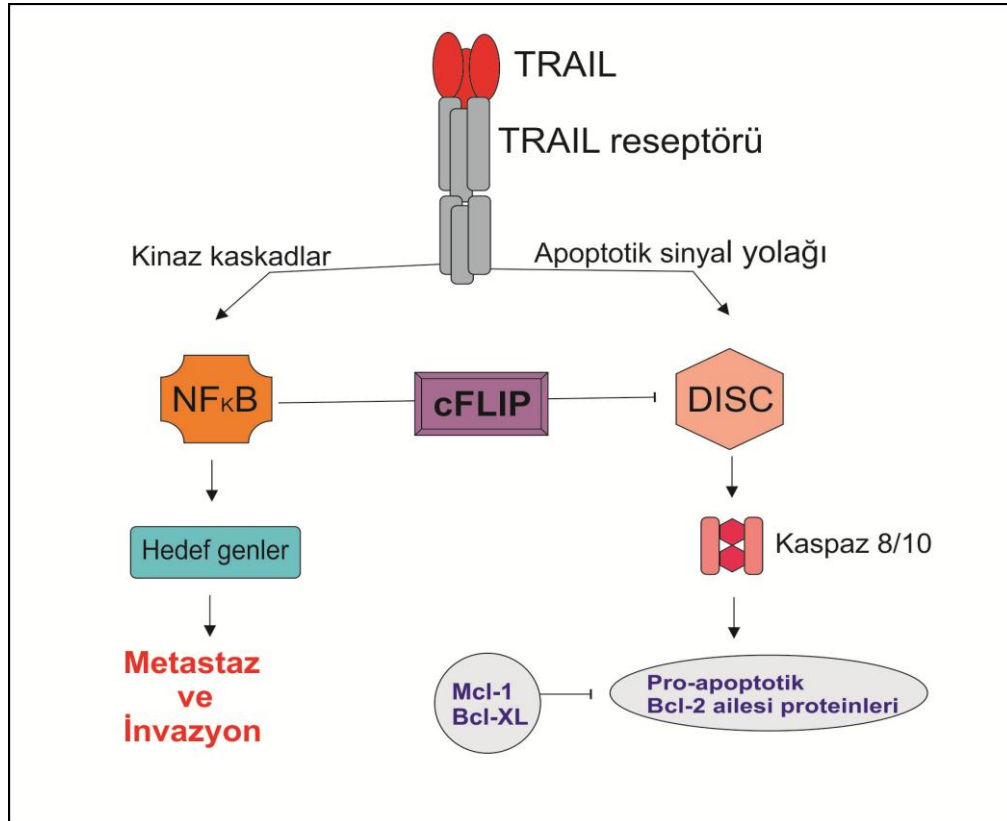
TNF kanser oluşumu üzerinde etkili olabilmektedir (Moore vd 1999, Suganuma vd 1999). TNF'nin kanser oluşum mekanizması üzerine olan etki yolu net olarak bilinmemekle birlikte DNA hasarı oluşturmaya veya DNA tamiri inhibisyonu tümör oluşumundan sorumlu tutulmaktadır.

TNF ile Fas ligandlarını da içeren ve reseptörlerindeki ölüm domainleri vasıtası ile etkilerini gösteren belirli sitokinler tarafından uyarılmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda; TNF ailesinin yeni bir üyesi tanımlanmış ve TNF ile ilişkili apoptozisi uyaran ligand (TRAIL) olarak adlandırılmıştır.

TNF (Tümör Nekrozis Faktör) ailesinden olan TRAIL (TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand), 32 kDa ağırlığında bir proteindir ve 4 değişik reseptöre bağlanabilmektedir (Wiley vd 1995, Sheridan vd 1997, Pan vd 1997). Bu liganda özgü

olan DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 reseptörleri hücrenin ölüme gitmesi veya canlılığının devam ettirilmesi açısından önemlidir (Sun vd 2000, Almasan ve Ashkenazi 2003, Kimberley ve Screaton 2004, Marini vd 2005). Bu molekül, vücudun çeşitli patojenlerden ve prekanseröz hücrelerden korunmasında rolü olan monosit, makrofaj, dendritik hücreler, natural killer hücreleri ve sitotoksik T lenfositler gibi hücrelerde eksprese edilmektedir ve bu hücrelerin gösterdiği sitotoksik etkiye aracılık etmektedir (Fanger vd 1999, Kayagaki vd 1999, Halaas vd 2000).

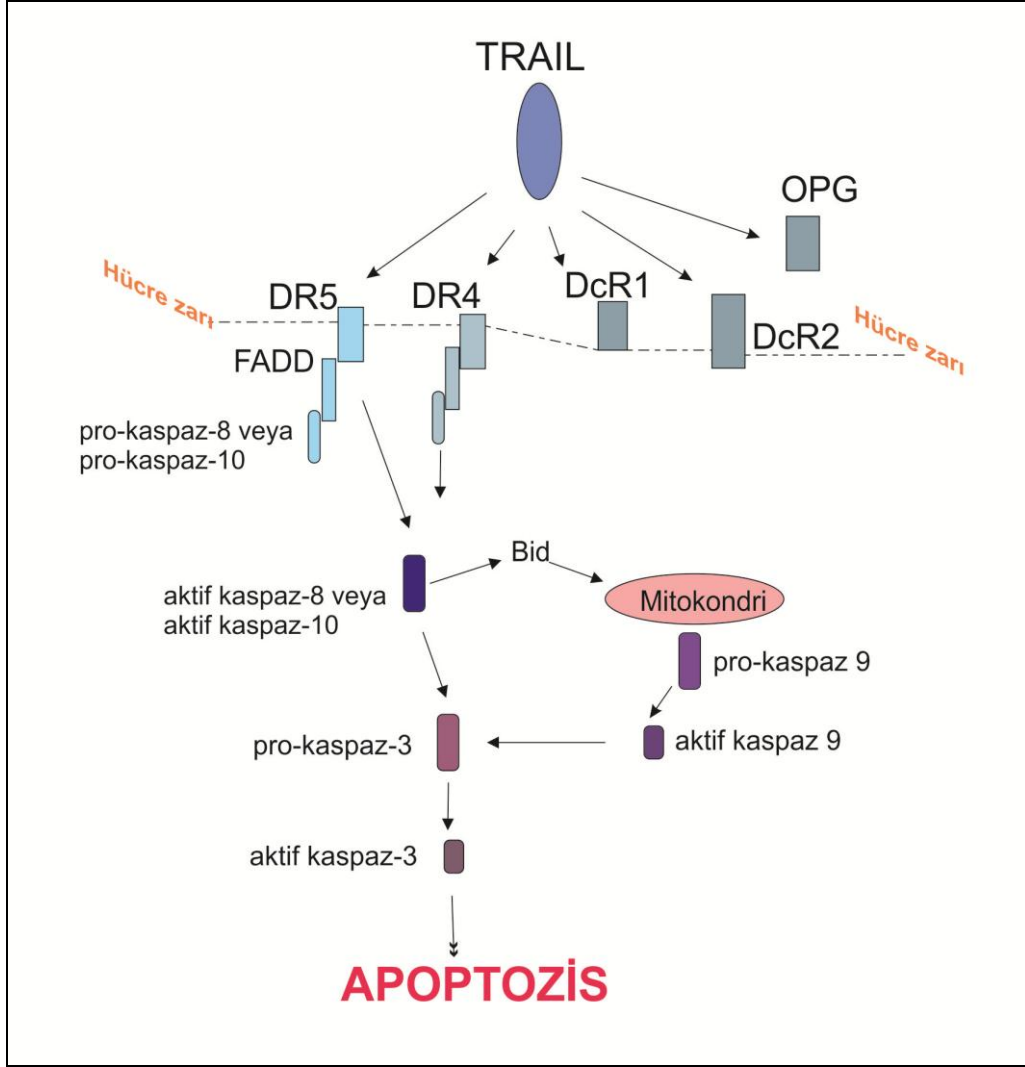
TRAIL, tip II membran proteinlerinin bir tipi olup, çeşitli dokularda eksprese olmaktadır. Diğer TNF ligandları gibi, trimerler olarak sentezlenirler ve membrandan sistein proteazları ile serbest formdaki ligandı oluşturmak için kesilebilirler. Optimum biyolojik aktivitesi için de bir Zn atomunun yapıda olması gereklidir. TRAIL'in esas fonksiyonu apoptozisi uyarmak ve transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'yi aktive etmektir (Kimberley ve Screaton 2004)



Şekil 2.4. Trail ve hücre ölümü

TRAIL, kanser hücrelerinin yok olmasında etkilidir, fakat normal hücreler üzerine herhangi bir etkisi olmadığı görülmüştür (Sun vd 2000, Kimberley ve Screaton 2004).

TRAIL'i bağlayan TNF reseptör (TNFR) gen süperaillesinin sinyalizasyonda görev yapan iki reseptörünün tanımlanması, bu ligand tarafından indüklenen apoptoz mekanizmasını daha iyi bir şekilde açıklamaktadır. DR4 (ölüm reseptörü 4 veya TRAIL-R1) ve DR5 (TRAIL-R2) olarak adlandırılan bu reseptörler, korunmuş bir ölüm domain motifi içermektedirler. Bu iki ölüm reseptörlerine ek olarak, TRAIL'i bağlayan üç reseptör daha tanımlanmıştır. Decoy reseptörleri olarak adlandırılan DcR1 (TRAIL-R3) ve DcR2 (TRAIL-R4), DR4 ve DR5'in ekstraselüler domainlerine yakın homoloji gösterirler. DcR2, fonksiyonel olmayan ve ucu kesik bir ölüm domainine sahip iken, DcR1 transmembran ve ölüm domainlerine sahip değildir. Ayrıca, glikofosfatidil inozitol (GPI) bir kuyruk ile membrana bağlı olarak bulunur. Bu nedenle, bu her iki reseptör de bir apoptozis sinyali iletme yeteneğine sahip değildir. Beşinci bir bağlanma (binding) proteini olan çözünür TNFR aile üyesi ise, osteoprotegerin (OPG)' dir. OPG; dimerik, çözünür ve salgı formlarında bulunmaktadır. Aynı zamanda, TRAIL'e bağlanma özelliğindedir ancak fizyolojik sıcaklıkta bu etkisi daha düşük düzeyde seyretmektedir (Şekil 2.5) (Sun vd 2000, Almasan ve Ashkenazi 2003, Kimberley ve Screaton 2004, Marini vd 2005).



Şekil 2.5. Trail ve ölüm reseptörleri

TRAIL, malignant melanoma, lenfoma, kolon karsinomu, akciğer karsinomu, meme karsinomu ve malignant gliomalardan elde edilen çeşitli tümör hücre hatlarında apoptozisi uyaran agonistik DR4 ve DR5 reseptörleri ile etkileşime girmektedir (Fukuda vd 2003).

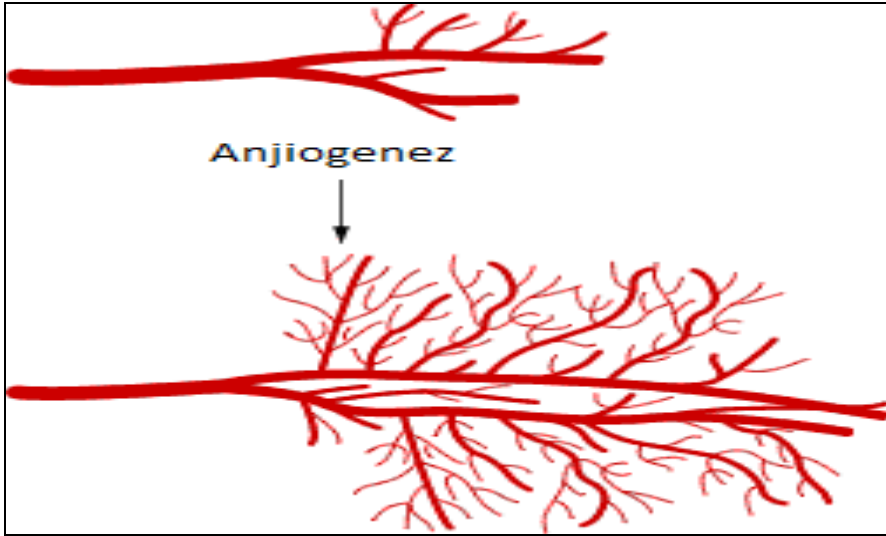
TRAIL, çeşitli tümör hücrelerinde apoptozisi uyarırken, transforme olmamış normal hücreleri uyarmaz. Bu durum, TRAIL'in normal dokularda salgılanan fakat kanser hücrelerinde salgılanmayan antagonistik tuzak reseptörleri DcR1 ve DcR2 ile de etkileşime girdiğini açıklamaktadır. DcR1 ve DcR2 apoptozisi uyarmaz, ancak hücreleri

apoptozisden (TRAIL ile uyarılan apoptozis) korumaktadırlar (Lee vd 1999, Fukuda vd 2003).

DR4 ve DR5 reseptörleri, TNF reseptör ailesinin diğer üyeleri ile önemli homolojiye sahiptirler. DR4 ve DR5 boyunca sinyal iletimi, bu reseptörlerdeki sitoplazmik ölüm domainlerinin varlığına bağlıdır. TRAIL'in DR4 ve DR5'e bağlanması ile bir seri kaspaz tetiklenir ve apoptozis gerçekleşir (Lee vd 1999).

2.1.2. Anjiogenez

Varolan kan damarlarından yeni damarların filizlenmesi olarak tanımlanan anjiogenez, çözülebilir faktörler, ekstraselüler matriks (ECM) bileşenleri ve hücreler arasında gerçekleşen karmaşık bir mekanizmayı içerir.



Şekil 2.6. Varolan damarlardan yeni kan damarlarının gelişmesi

Kanser hücreleri, büyümek ve farklılaşmak için, besin ve oksijeni 150–200 μm uzaklıktaki kılcal damarlardan difüzyon yoluyla temin edebilir. Besin ve oksijen ihtiyacını difüzyon ile sağlayan kanser hücresi ise ancak 2 mm^3 'lük boyuta ulaşabilir (Folkman ve Ingber 1992, Folkman 1996). Tümör hücresinin çoğalmaya devam edebilmesi için daha fazla oksijen ve besin gerekmektedir. Oksijen ve besin ihtiyacını karşılayamayan tümör hücresi daha fazla büyüyemez ve durgun fazda kalır buradan da anlaşıldığı gibi; tümör hücresi varlığını devam ettirmek ve çoğalabilmek için,

çevresindeki kan damarlarının da gelişimini sağlamak zorundadır. İşte bu durumda tümör hücresinin ihtiyaç duyduğu oksijen ve besini alabilmesi için var olan damarlardan yeni kan damarlarının gelişimini yani “anjiogenezi” sağlar.

Tümör ilişkili anjiogenezi; spesifik büyüme faktörlerine, endotel hücre reseptörlerinin aktivasyonuna ve endotel hücrelerinin çoğalma kapasiteleri ile buna aracılık eden hücre dışı matriks komponentlerine bağlıdır. Anjiogenezi birçok ajan rol alır. Bunlar;

- I. Tümör hücrelerinden,
- II. Monosit, fibroblast gibi ortamdaki diğer hücrelerden
- III. Kollajen matriksin yıkımı sonrasında açığa çıkabilirler (Klagsbrun ve Amore 1996).

Embriyoda damar gelişimi üç basamakta meydana gelir; vaskulogenez, anjiogenezi ve arteriogenezi. Endotel hücre öncülleri tarafından kan damarlarının oluşumu vaskulogenez olarak adlandırılır. Vaskulogenez iki basamaklı bir süreçtir. İlk olarak endotel hücreler primer vasküler ağı oluşturmak için bir araya gelirler. İkinci basamakta düz kas hücreleri ve perisitler ile iş birliği yaparak kan damarlarını oluştururlar. Hem vaskulogenezde hem de anjiogenezi endotel hücreler ve düz kas hücreleri birlikte iş görür. Arteriogenezi ise vasküler ağ daha büyük kolleteral arterlerin oluşumu için yeniden şekillenir. Bu süreçte damar boyunca gerçekleşen hücre göçleri, yeni damar ağlarının oluşumu ve hücrelerin çoğalmaları gözlenir (Carmeliet 2000, Calfa vd 2006).

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

2.1.3. Meme kanseri

Meme kanseri epitel kökenli hücrelerin kanserleşmesi sonucu oluşan ve kadınlarda en sık görülen malign (kötü huylu) tümör olarak bilinmektedir ve kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Meme kanserinde; Avrupa'da yılda

180.000, Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda 184.000 yeni olgu saptanmakta olup, ülkemizdeki görülen kanser vakaları arasında akciğer kanserinden sonra % 24,1 oranla ikinci sırada yer almaktadır (Ekici ve Utkualp 2007, Aslan ve Gürkan 2007).

Meme kanserlerinin yaklaşık %90'nı rastlantısal olarak meydana gelmekte olup diğer %10'luk kısmının kalıtsal kaynaklı sebeplerden meydana geldiği bilinmektedir (Chu-Xia 2006).

Kalıtsal meme ve ovaryum kanseriyle ilişkili, yüksek risk oluşturan iki gen tanımlanmıştır. Bu genler; BRCA1 (Meme Kanseri Geni 1) ve BRCA2 (Meme Kanseri Geni 2) genleridir (Beckmann vd 2007). Bu iki genin üreme hücrelerindeki mutasyonu; o kişide meme kanseri, ovaryum kanseri ya da her ikisinin birden %50 ile %80 oranına varan bir aralıkta gerçekleşme olasılığı taşıdığı anlamına gelir (Hortobagyi 1998, Chu-Xia 2006).

Bütün meme kanserleri somatik genetik anormalliklere sahiptir. Meydana gelen meme kanserlerinde, birçok gende (örneğin; p53, bcl-2, c-myc ve c-myb) mutasyon veya normal gen ve gen ürünlerinin (*HER-2/neu* ve *siklin D1*) aşırı ifade edilmesi gibi anormallikler tanımlanmıştır (Hortobagyi 1998).

Normal meme büyümesi ve gelişimi, karmaşık ilişkilere sahip hormonlar ve büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Bu hormonların arasında östrojen, progesteron, androjen, glukokortikoid, prolaktin, tiroid ve insülin hormonları yer alır. Büyüme faktörlerine örnek olarak; insülin benzeri büyüme faktörü (*IGF-1/2*), fibroblast büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü (*EGF*) ve tümör büyüme faktörü alfa (*TGF- α*) verilebilir. Büyüme faktörleri ve hormonların spesifik membran reseptörleriyle etkileşimleri sonucu oluşan biyokimyasal sinyaller, birçok genin aktivasyonunu ve ekspresyonunu etkilemektedir (Margolese vd 2003).

Meme kanserinin dört genel evresi vardır ve bu evrelerden dördüncüsünde, kanser artık meme dışındaki diğer bölgelere yayılmıştır. Meme kanserinde metastazının en sık görüldüğü bölgeler lenf düğümleri, kemik dokusu, akciğer, karaciğer, beyin ve böbrek üstü bezleridir. Cerrahi müdahale, doz ölçümünün yapılabilmesine bağlı olarak

radoterapi ve gün geçtikçe biyolojisinin daha çok aydınlatılmasıyla kemoterapi ve hormonal terapi meme kanserli vakalarda ölüm oranını azaltmayı başarmıştır. Ancak kullanılan hiçbir tedavi tek başına uygulandığında bu kanseri tamamen ortadan kaldırmayı başaramamaktadır. Bunun yanı sıra, hastalarda tedavi şekline bağlı olarak gelişen birçok toksik yan etki tedavi başarısının önemli ölçüde azalmasına yol açmaktadır (Ekmektzoglou vd 2009).

2.2. Kanser Tedavileri

Uzun yıllardır klasik kanser tedavileri yaygın olarak çeşitli kanser tiplerinde kullanılmaktadır. Ancak, her bir tedavi yönteminin yarattığı yan etkiler veya beklenmedik sonuçlar göz önüne alındığında, tedavilerin geliştirilerek daha etkili hale getirilmesi gerektiği görülmektedir. Bu nedenle bilim adamları bu tedavileri birlikte uygulayarak etkilerini arttırmaya yönelik çalışmalar yapmaktadırlar. İlaçların tek başlarına uygulamalarında, kombine edilerek kullanımıyla ve kombine edildiklerinde sinerjistik etkilerinin olup olmadığını belirleyen dozların araştırılması geçen yüzyıldan beri çalışılan bir konudur.

Bu amaçla ilk kez Heidelberg yaptığı prelinik çalışmada, radyasyon terapisini takiben kemoterapik ilaçlar uygulamış ve radyoterapinin tek başına sağladığı etkinin, ilaçla birlikte uygulandıktan sonra arttığını saptayarak kombine tedavilerin uygulanması için ilk umut verici sonucu bilim dünyasına açıklamıştır (Kvols 2005).

1960'lı yıllarda Mayo klinikte Moertel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise radyoterapi ve kemoterapi birlikte kullanılmış, mide ve pankreas kanser hastalarının radyoterapiye hassaslığı ve dolayısıyla tedavi sonrasında elde edilen başarı önemli ölçüde artmıştır.

1974 yılında Nigro, 5-florourasil ve mitomisin C kombinasyonunu radyasyon ile birlikte uygulamış ve elde ettiği sonuçlar hem medikal hem de radyasyon onkologlarının dikkatini çekebilecek kadar başarılı olmuştur. Bu tarihten sonra da bilim dünyasında alternatif tedavi yöntemleri araştırılmaya devam edilmiştir (Cooper vd 1999, Thomas 1999).

Normal bir hücrenin malignant özellik kazanması için gerekli basamakların her biri (Şekil 2.1) göz önüne alındığında, aslında her biri kanser tedavisine yönelik ipuçları vermekte olup yeni yaklaşımları da yanında sunmaktadır.

Klasik kanser tedavileri incelenecek olursa;

- 1-Tümörün vücuttan çıkarılması amacı ile uygulanan **cerrahi müdahale**,
- 2-Kimyasal maddeler kullanılarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu engelleyen ve/veya hücrelerin apoptoza yönelmelerini teşvik eden **kemoterapi**
- 3- Radyoaktif maddelerden yararlanılarak, radyasyonun hücreler üzerinde öldürücü etkisini kullanan **radyoterapi** yer almaktadır (Kopfstein ve Cristofari 2006).

2.2.1. Cerrahi müdahale

İlk cerrahi müdahale Aulus Cornelius Celsus'un, M.S 25-50 yıllarında, günümüzde bilinen metastatik meme kanserinin karakteristik özelliklerinden pek çoğunu tanımlaması ve cerrahi girişim ile meme dokudan kitlenin uzaklaştırılmasının meme kanseri için bir tedavi yöntemi olabileceğini bildirmesiyle hız kazanmıştır.

Cerrahi müdahale yapılacaksa genellikle, kanserin henüz yayılmamış olması tercih edilir. Başka bir ifade ile cerrahi müdahalenin başarısı, tümörün metastaz yapıp yapmadığına bağlı olarak değişmektedir. Hücreler, henüz birincil tümörden kan veya lenf dolaşımına geçmemiş ise, cerrahi müdahale ile tümörün tamamını uzaklaştırmak mümkün olabileceği için tedavide başarı şansı yüksektir.

Ancak primer tümörden ayrılan hücreler kana ya da lenfe geçmiş ise, primer tümör alındıktan sonra hala dolaşımda var olan tümör hücreleri nedeni ile de vücudun herhangi bir bölgesinde ikincil bir tümör gelişimi gözlenebilir (Coffey vd 2003).

2.2.2. Kemoterapi

Kemoterapi, özellikle çoğalan hücrelere karşı seçici öldürücü etkileri olan, doğal veya sentetik kimyasal, biyolojik ajanlar veya hormonlarla yapılan tedavi şeklidir.

1960'lı yıllardan bu yana kullanıldığı bilinmektedir. Kemoterapide kullanılan ajanlar sitostatik ya da sitotoksik olabilir. **Sitostatik ajanlar**, hücre gelişimini hücre döngüsünün bir fazında durdurmak için kullanılırlar. **Sitotoksik ajanlar** ise hücreleri öldürmek için bu hücrelerde genellikle apoptozu teşvik ederler.

Kemoterapik ajanların seçici olmayan etkileşimlerinden, tümör hücreleri kadar normal hücreler de etkilenebilir. Bu hücrelerde de aktive olan apoptoz mekanizması normal hücrelerin ölümüne yol açmaktadır. Normal hücrelerde meydana gelen bu etki sonrasında oluşan, “toksik yanıtlar ya da yan etkiler” olarak değerlendirilen bir çok komplikasyon, yaşamı tehdit edebilir ya da yaşam kalitesini bozabilir. Klinik uygulamalarda en sık gözlenen toksik yanıtlar: kemik iliğinde baskılanmaya bağlı lökopeni, trombositopeni, gastrointestinal sistemde mukozit, stomatit, bulantı, kusma, diyare ya da saç dökülmesidir.

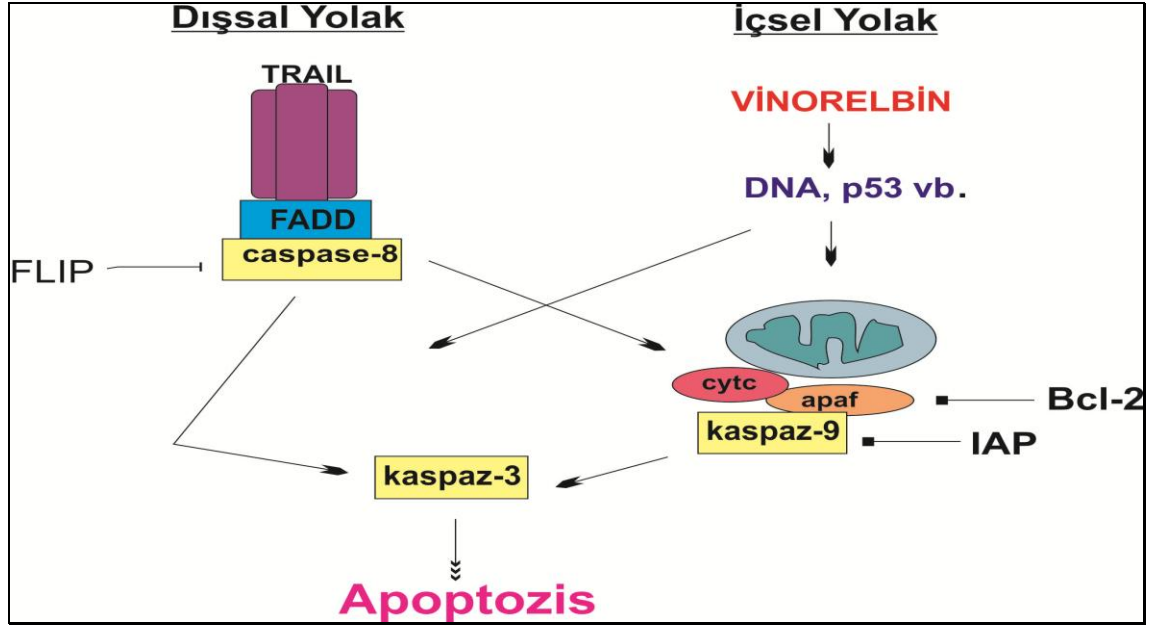
Kemoterapinin kanser hücrelerini hedef aldığı düşünülürse kullanılması gereken doz yüksek miktarlarda olmalıdır. Ancak yüksek miktarlarda kullanılan ilaç da normal hücreler için toksik olacağından, yan etkilerin ortaya çıkması kaçınılmazdır. Bu durum ise, sıklıkla ilaçlarda kullanılacak dozu sınırlar (kan-beyin bariyeri). Kemoterapi için bir diğer olumsuz nokta ise, kullanılan ilaçlara karşı, kanser hücrelerinde direnç gelişiminin söz konusu olmasıdır. Bu direncin iç direnç (intrinsic resistance) veya kazanılmış direnç (acquired resistance) olabileceği düşünülmüştür. Hücrelerde gelişen direnç, hücre membranında yer alan “P glikoproteini'nin” ekspresyonuna bağlı olarak gelişir. P glikoproteini tıpkı bir pompa gibi çalışarak hücre içerisinden kemoterapötik ajanları hızla dışarı atmaktadır. Çoklu ilaç direnci (multiple drug resistance-MDR) olan hücrelerde MDR geninin çoğalmış olması, P glikoproteininin bu hücrelerde daha fazla sentezlendiğini işaret etmektedir. Dolayısı ile proteindeki artışa bağlı olarak daha fazla ilaç dışarı atılmakta ve bu nedenle beklenen etki sağlanamamaktadır (Akyol 2004).

2.2.2.1. Vinorelbin

Vinorelbin, *Catharanthus roseus* (pervane çiçeği) ekstraktının alkaloidlerinden elde edilen ve "mitotik mikrotubul polimerizasyonunun inhibisyonu" yoluyla etkili olan, vinblastinden türemiş semisentetik bir vinca alkaloididir. 1994 yılında FDA (Federal Drug Administration); vinorelbini küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin tedavisinde kullanılması için onaylamıştır. O tarihten bu yana vinorelbin, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, meme kanseri ve prostat kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır.

Vinorelbin, biyolojik etkisini tubuline bağlanarak gösterir ve mikrotubul oluşumunu engeller. Aksonal mikrotubullere etkisi, mitotik tubullere olan etkisinden azdır. Bu da, ilaca bağlı nörotoksiteyi azaltır. Vinorelbinin antitümör etkisi ise doz bağımlıdır.

İleri meme kanseri tedavileri için vinorelbinin en çok faz II ve faz III çalışmalarında kullanılmaktadır. Vinorelbin, normal hücrelerde diğer kemoterapötik ajanlara oranla daha az yan etkiler oluşturduğu için tek başına ya da kombine halde birçok farklı çalışmada kullanılmaktadır. Tek bir ajan olarak vinorelbinin %20-40 oranında yanıt verdiği düşünülmektedir (Breton vd 2001, Marty vd 2001, Francisco vd 2001, Harold vd 2001).



Şekil 2.7. Vinorelbinin apoptotik etkisi

2.2.3. Radyoterapi

Radyasyon tedavileri, ilk zamanlarda tek ve yüksek doz şeklinde uygulanmış ancak tümörlerde beklenen inhibisyon sağlanamamıştır. 20.yy'ın başlarında Claude Regaud, tekrarlanan küçük dozlar şeklinde uyguladığı radyoterapinin deride hasar yaratmadan etki gösterdiğini bildirmiştir.

Radyoterapinin amacı; tümör içindeki malignant özellikteki hücrelerin bölünmelerini veya çoğalmalarını durdurmaktır. Bu amaçla tümörün hacmine göre ve tümörü çevreleyen sağlıklı dokuya en az zarar verecek şekilde belirlenen dozda radyasyon uygulaması yapılır (Connell vd 2004).

Radyoterapide dozdaki artış normal dokularda hasar meydana gelme riskini de beraberinde getirmektedir. Komplikasyonlar uygulanan doza, doku tipine ve organın hangi kısmına uygulandığına bağlı olarak değişim gösterir. Radyoterapinin yol açtığı yan etkiler; bazen hemen, bazen ise uzun bir süre sonra ortaya çıkabilir (Emami vd 1991).

2.2.4. Antianjiogenik tedavi

Anti-anjiogenik ajanların anjiogenezi önemli ölçüde baskılayabilmesi, bu ajanları kullanarak kansere alternatif bir tedavi yöntemi yaratma fikrini doğurmuştur. Bu amaçla yola çıkarak günümüze kadar pek çok çalışma yapılmıştır.

Anti-anjiogenik ajanlar kullanılarak tasarlanan terapiler, doğrudan kanseri hedef alır; her ne kadar heterojen yapıda olsalar da tüm kanser hücreleri anjiogenezi mutlaka tetiklemek zorundadır. Bu nedenle anti-anjiogenik terapiler, anjiogenezi inhibe ettiği için, kanser tedavisi için önemli avantajlar sağlar.

Tek bir damarın binlerce tümör hücresi için gerekli besin ve oksijeni sağladığı göz önüne alınırsa, bu damarın baskılanması tümör hücrelerinin besin ve oksijensiz kalmasına dolayısıyla ya ölmelerine ya da dormant hale geçmelerine neden olur. Yine bu terapi ile kan pıhtılaşmasının lokal başlangıç şeklinin değişimi sağlanabilir.

Anti-anjiogenik terapilerde temel olan anjiogenezi bloklamaktır. Anti-anjiogenik terapiler tümör oluşumunu değil tümörün büyümesini ve metastazını baskılamayı ya da inhibe etmeyi hedeflemelidir.

Anjiogenik faktörler ile anti-anjiogenik faktörler arasındaki dengeden yola çıkarak tümör dokusu gibi hızla çoğalan hücrelerin baskılanması antianjiogenik tedavi açısından yeni stratejilerin geliştirilmesine neden olmuştur. Bunlar;

- Anjiogenik faktörlerin inhibisyonu
- Doğal anti-anjiogenik faktörlerin uygulanması (Endostatin, Angiostatin vb.)
- Endotel hücrelerin inaktivasyonu
- Yeni damarların hücre dışı matriks ile etkileşimini bozacak moleküllerin uygulanması (matriks metalloproteazların inhibitörleri) şeklinde özetlenebilir (Mentlein ve Feindt 2003).

Metastazik tümörlerde yer alan hücreler birbirlerinden oldukça farklılık gösterir. Bu yüzden, salgıladıkları pro-anjiogenik ajanların hem yapıları hem de miktarları arasında

bazı değişiklikler gözlenebilir. Tümör hücrelerinin aynı anjiogenik faktörü üretiyor olmaları, tedaviye aynı yanıtı verecekleri anlamına gelmez (Kim vd 2001, Durand ve Raleigh 1998).

Tümörün mikro çevresinin, anjiogeneze karşı oluşturulacak yanıtı doğrudan etkilediğı bu konu ile ilgili bazı çalışmalarla gösterilmiştir. Tümör mikro çevresi endotelial kompartmanları korur, bazı yaşamsal sinyallerin endotellere iletiminde rol oynar.

Tümör büyümesi için kritik bir önem taşıyan diğerk faktör ise, ekstraselüler matriksin (ECM) bütünlüğünün korunmasıdır. Birçok pro ve anti-anjiogenik ajan ECM'ye depolanır ve parçalanması ile salınır. ECM'nin ve depoladığı modölatörlerin içeriğı tümöre bağılı olarak değışir. Bu nedenle her tümör tek bir ajana karşı, aynı yanıtı vermez. Ajan uygulandıktan sonra elde edilen yanıt ajanın, tümörün hangi bölgesine uygulandığına bağılı olarak değışmektedir. Ayrıca mikroçevre, ajanın vücuda dağılımı konusunda da etkilidir. Bazı klinik denemelerde erken fazda uygulanan anti-anjiogenik ajan akciğer metastazını durdururken karaciğerde metastaz gelişimine neden olmuştur (Sood vd 2001, Miller vd 2001, Thomas vd 2003). Bu farklılığa neden olan mekanizma henüz çözülememiş olsa da bilim adamları tümöre ait mikroçevrenin burada önemli bir kriter olduğı konusunda hemfikirdir.

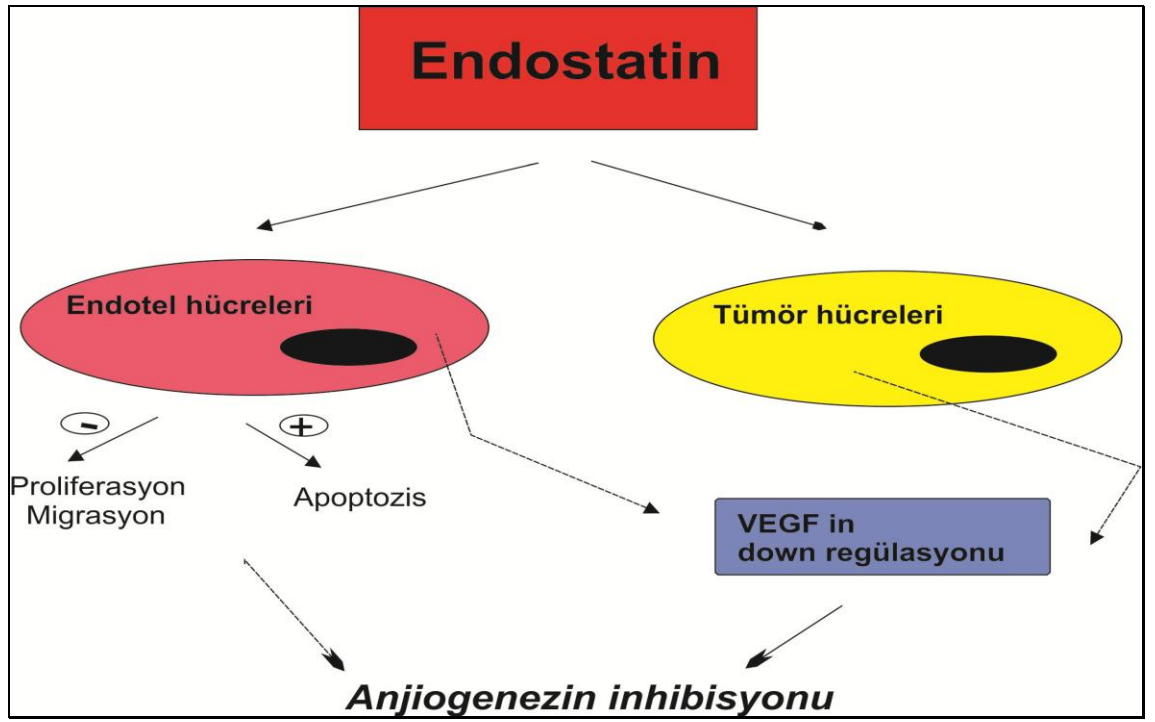
2.2.4.1. Endostatin

Endostatin, kollajen XVIII'in C terminalinde 20 kDa'luk moleküler ağırlığa sahip, endotel hücrelerin proliferasyonunu önleyen, endojen bir anti-anjiogenik proteindir (O'Reilly 1997).

Endostatin; endotel hücre göçünü inhibe ederken apoptozu indükleyebildiğı ve bu sayede tümörün yeni damar oluşturmasını engellediğı bilinmektedir (O'reilly vd 1997, Saarela vd 1998, Wen vd 1999, Ferrerasa vd 2000, Kalluri 2003). Endostatinin anjiogenezi inhibe ettiğı hem korneal hem de koryoallantoik membran deneyleri ile gösterilmiştir (Stadler ve Wilding 2003).

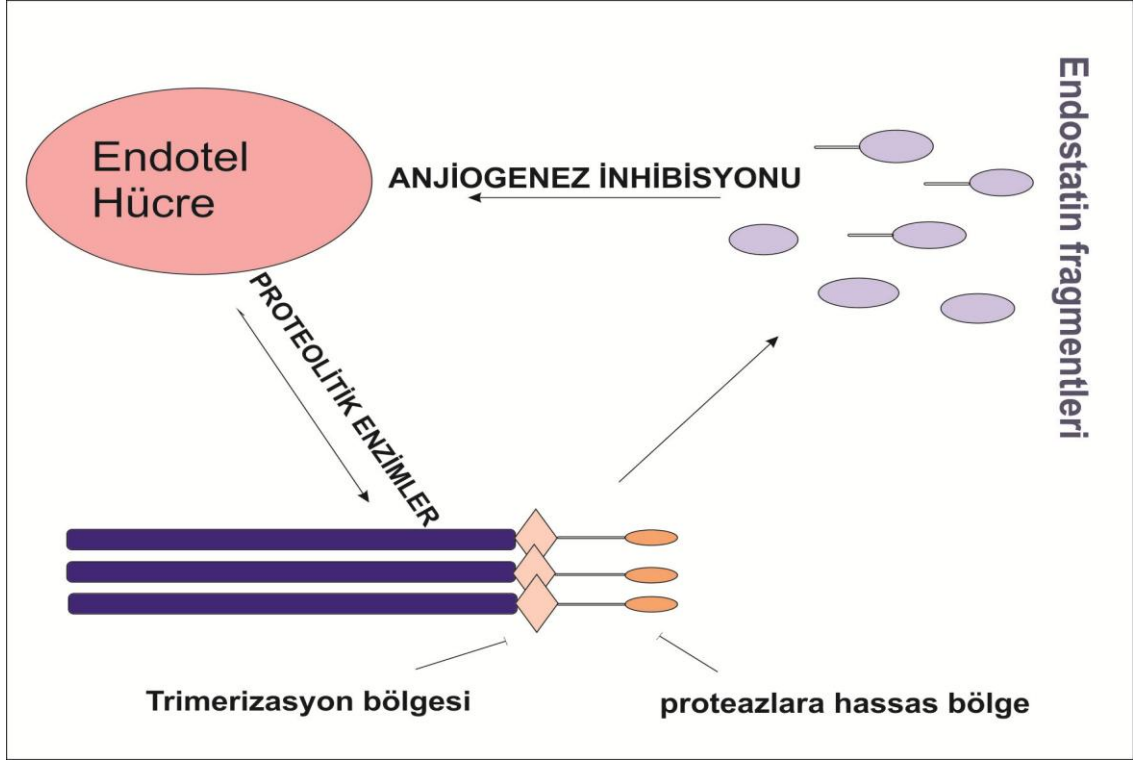
Yapılan bazı çalışmalarda, bakteriler tarafından ekspre edilen endostatin; oldukça yavaş çözüldüğü için proteinin saflaştırılma basamağında önemli sorunlarla

karşılaşmıştır ve sonuçta çalışma esnasında proteinin çözünürlüğünün zamana bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Daha sonrasında bu özellikten yola çıkarak endostatini biyolojik depo molekülü olarak kullanmış ve *in vivo* çalışmalarda, çözünmesini sağlamak amacı ile endostatin yavaş yavaş implante edilmiş ve bu sayede dolaşıma da yavaş bir şekilde katılması sağlanmıştır. Bu deneme sonucunda, endostatin akciğer kanserinin hem primer hem de sekonder formlarında inhibisyon sağlamayı başarmıştır. Benzer şekilde uygulanan endostatin, farklı histolojik özellikteki tümörlerde, büyümeyi önemli ölçüde baskılamıştır (Şekil 2.7).



Şekil 2.8. Endostatinin anjiogenez ile ilişkisi

Endotel hücrelerden salınan endostatin, anjiogenezi baskılamak üzere proteolitik enzimler tarafından aktive edilir (Şekil 2.8) (Zatterstrom vd 2000).



Şekil 2.9. Endostatin aktivasyonu ve anjiyenez üzerine etkisi (Zatterstrom vd 2000'den uyarlanmıştır)

Endostatinin hem primer tümörler hem de onların gelişmiş formları üzerinde etkili olması ve bu etkiyi hücreye spesifik olmadan gerçekleştirebilmesi üzerine, bu protein ile yapılan çalışmalar hızla artmıştır (Folkman 2006).

Endostatinin etki mekanizması uzun yıllardan bu yana pek çok farklı araştırmacı tarafından araştırılmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda matriks metalloproteaz-2 (MMP-2) ile dayanıklı kompleksler oluşturduğu ve MMP-2'nin katalitik bölgesini maskeleyerek aktivitesini baskıladığı (Kim vd 2000, Lee vd 2002), birçok hücre yüzey proteini ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ ve glipikan-1, -4) ile etkileştiği gözlenmiştir. Bu etkileşim sonucunda da hücrelerin adezyon ve migrasyon yeteneklerinin değiştiği saptanmıştır (Rehn vd 2001).

Yine bir diğer önemli özelliği VEGF reseptörlerinden biri olan VEGF-R2 (KDR/FLK1)'nin fonksiyonunu bloke ederek hücrenin hareketini, proliferasyonunu ve canlılığını etkilemeyi başardığıdır (Kim vd 2002).

Endostatinin; Kaspaz-9 aktivasyonuna ve Bcl-2, Bcl-XL, Bad gibi anti-apoptotik proteinlerin seviyelerinin azalmasına neden olarak apoptozu indükleyebildiği (Dhanabal

vd 1999) ve mitojenik büyüme faktör sinyal yolağını bozan hücre yüzey heparan sülfat proteoglikanlara bağlanmak için bFGF ile yarışarak anti-proliferatif ve anti-anjiogenik etkisini sergilediğini gösteren (Hohenester vd 1998) çalışmalar mevcuttur.

2.2.5. Kombine tedaviler

Kanserli hastalarda toksik etkileri farklı olan sitotoksik ilaçlar ve etkilerini farklı bölgelerde ve farklı mekanizmalarla gösteren ilaçlar, daha güçlü etki göstermelerini sağlamak amacıyla kombinasyon şeklinde kullanılmaktadır. Böylece ilaçların artırılmış ve güçlendirilmiş sitotoksik etkileri tümörün kontrol altına alınmasını kolaylaştırırken, diğer taraftan da herbiri daha düşük dozda kullanılarak hastaya olan toksik etkilerin de en aza indirgenmesi amaçlanmaktadır.

Kombine ilaç kullanımının; hastanın tolere edebileceği toksisite ile mümkün olan en fazla malign sayıda hücrenin ortadan kaldırılmasını sağlamak, çok sayıda ve farklı yapıya sahip tümörlere etki edebilmek ve ilaçlara direnç kazanan hücrelerin gelişimini durdurmak veya yavaşlatmak gibi avantajları vardır.

Genellikle tümörlerin büyüme hızı erken dönemde yüksektir. Ancak büyümeye devam ettikçe beslenmesini ve oksijen ihtiyacını karşılayacak olan damarsal yapılar aynı hızla gelişmediğinden tümörün büyüme hızı giderek yavaşlar. Bu şekilde malign tümörlerin hem büyüme hızını ve hem de varlıklarını sürdürmelerini sağlayan damarların oluşumunun önlenmesi ve hatta ortadan kaldırılması, son zamanlarda kanser tedavisinde yeni bir yaklaşım olarak anjiogenesizi ve anti-angiogenik ilaçların geliştirilmesini gündeme getirmiştir.

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

Moleküler hedefli ajanların tolere edilebilen yan etkilere sahip olması, bu ajanların bilinen eski kemoterapötikler ile kombine edilerek kullanılmasını mümkün kılmaktadır. Bu anlamda faz I denemelerini geçerek bir sonraki basamağa geçmiş olan birçok ajan bulunmaktadır.

Kanser ilaçlarının ise; kombine tedaviler için kullanılmadan önce ilkin onaylanmış dozları ve diğer ilaçlarla birleştğinde toksik etki yaratmayacağı bilinen miktarlarda kullanılmak üzere çalışmalar yapılır. İlaçlar kanser hücrelerine farklı toksik etkileriyle birlikte farklı mekanizmalar aracılığı ile birlikte etki gösterirler ve seçilen dozlar daha önceden çalışılmış olan en çok bilinen örnekler baz alınarak doz ayarlaması yapılır.

Bu bağlamda kemoterapi, tümör hücrelerini; antianjiogenik terapi, endotel hücrelerini hedef aldığı için bu ajanların kombinasyonu kanser ile çift taraflı savaşı sağlamaktadır (Chou 2006, Kwak 2007, Sullivan ve Atkins 2009, Palmieri 2009).

2.2.5.1. Vinorelbin ile yapılan kombinasyon çalışmaları

In vitro bir çalışmada Vinorelbinin paklitaksel ile kombinasyonunun sinerjistik olarak sitotoksik etki gösterdiği (Breton vd 2001), docetaxel ile kombinasyonun farmokinetik açıdan etkinlik gösterdiği (Cattel 2001) ve capecitabin ile kombinasyonun fazII ve fazIII çalışmalarında; ilaçların tekli uygulamalarına göre daha yüksek etkinlik gösterdiği (Chan ve Merrill 2009) saptanmıştır.

İntravenöz yolla alınan vinorelbin ve trastuzumab kombinasyonunda ise HER/2 pozitif meme kanserine sahip hastalarda yüksek klinik aktivite gözlenmiştir (Iorfida vd 2010). Bunların yanı sıra, vinorelbin imatinib reseptörü ile kombine edildiğinde; meme kanser hücre hatları üzerinde imatinibin, büyümeyi inhibe edici ve apoptozisi indükleme özelliğinde artış gösterdiği saptanmıştır (Weigel vd 2009).

3. MATERYAL METOD

3.1. Hücreler ve Kültür Koşulları:

Meme kanseri hücre hattı (MDA MB 231), böbrek epitel hücre hattı (293T) ve insan umbilikal endotel hücre hattı (HUVEC) ATCC'den temin edilerek kullanıldı. MDA MB 231 ve 293T hücre hatlarının her ikisi de %10 FCS ve %2 glutamin ile desteklenmiş RPMI 1640 (ATCC Kat. No:30-2001) besi yerinde çoğaltıldı. HUVEC hücre hattı LSGS (İnvitrogen S-003-K) kiti eklenen Medium 200 (İnvitrogen M-200-500) besi yerinde çoğaltıldı. Bütün hücreler %5 CO₂'li atmosferde 37°C'de inkübe edildi. ATCC'nin tavsiye ettiği şekilde hücreler %0.25 tripsin, %0.03 EDTA karışımı ile kaldırılıp 1:2 ya da 1:3 oranında olacak şekilde pasajlanarak, kullanılmayan hücreler %95 besi yeri ve %5 DMSO içerecek şekilde hazırlanan hücre dondurma solüsyonu içerisinde önce -80°C'lik derin dondurucuda 2 gün bekletilip ardından devar kabında sıvı azota alınarak saklandı.

3.2. İlaçların Uygulanması ve Sitotoksik Etkinliklerinin Saptanması:

Pichia Pastoris'de sentezlenmiş insan rekombinant endostatin (Calbiochem Kat. No: 324768, pH:6.2 66 mM sodium fosfat, 59 mM NaCl ve 17 mM sitrik asit içerisinde) sıvı halde temin edildi. Endostatinin çözücüsü (pH:6.2 66 mM sodium fosfat, 59 mM NaCl ve 17 mM sitrik asit) denemelerin tümünde kontrol olarak kullanıldı. Vinorelbin sıvı formda temin edildi. Titizlikle gerçekleştirilen literatür taraması sonrasında, her iki ilaç da göz önüne alınarak, ilk denemelerin 10.000 hücre/kuyucuk üzerinde yapılmasına karar verildi. İlaçlar için kullanılacak en yüksek doz ise 5 µg/ ml olarak saptandı.

Hücreler stoktan açılarak küçük petri kaplarına ekildi ve petri kapları %80-90 oranında dolunca tripsinizasyon ile kaldırılıp 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara ekildi. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda besi yerleri uzaklaştırılıp, her bir ilaç için ilk aşamada en yüksek doz 1 µg/ml olacak şekilde; yarı yarıya seri dilüsyonla %1'lik FBS (Fetal Bovin Serum) içeren besi yeri ile hazırlanan ilaçlar eklendi.

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

3.2.1. Kombine tedavi uygulamaları

KONTROL	KONTROL	Endostatin 1 µg/ml	Endostatin 500 ng/ml	Endostatin 250 ng/ml	Endostatin 125 ng/ml	Endostatin 62,5 ng/ml	Endostatin 31,25 ng/ml	Endostatin 15,62 ng/ml	Endostatin 7,81 ng/ml	Endostatin 3,90 ng/ml	Endostatin 1,95 ng/ml
KONTROL	Vinorelbin 1 µg/ml	1 µg/ml +	500 ng/ml +	250 ng/ml +	125 ng/ml +	62,5 ng/ml +	32,25 ng/ml +	15,62 ng/ml +	7,81 ng/ml +	3,90 ng/ml +	1,95 ng/ml +
KONTROL	Vinorelbin 500 ng/ml	1 µg/ml +	500 ng/ml +	250 ng/ml +	125 ng/ml +	62,5 ng/ml +	32,25 ng/ml +	15,62 ng/ml +	7,81 ng/ml +	3,90 ng/ml +	1,95 ng/ml +
KONTROL	Vinorelbin 250 ng/ml	1 µg/ml +	500 ng/ml +	250 ng/ml +	125 ng/ml +	62,5 ng/ml +	32,25 ng/ml +	15,62 ng/ml +	7,81 ng/ml +	3,90 ng/ml +	1,95 ng/ml +
KONTROL	Vinorelbin 125 ng/ml	1 µg/ml +	500 ng/ml +	250 ng/ml +	125 ng/ml +	62,5 ng/ml +	32,25 ng/ml +	15,62 ng/ml +	7,81 ng/ml +	3,90 ng/ml +	1,95 ng/ml +
KONTROL	Vinorelbin 62,5 ng/ml	1 µg/ml +	500 ng/ml +	250 ng/ml +	125 ng/ml +	62,5 ng/ml +	32,25 ng/ml +	15,62 ng/ml +	7,81 ng/ml +	3,90 ng/ml +	1,95 ng/ml +
KONTROL	Vinorelbin 31,25 ng/ml	1 µg/ml +	500 ng/ml +	250 ng/ml +	125 ng/ml +	62,5 ng/ml +	32,25 ng/ml +	15,62 ng/ml +	7,81 ng/ml +	3,90 ng/ml +	1,95 ng/ml +
KONTROL	Vinorelbin 15,62 ng/ml	1 µg/ml +	500 ng/ml +	250 ng/ml +	125 ng/ml +	62,5 ng/ml +	32,25 ng/ml +	15,62 ng/ml +	7,81 ng/ml +	3,90 ng/ml +	1,95 ng/ml +

Çizelge 3.1. 96-kuyucuklu plaklarda, endostatin ve vinorelbinin birlikte uygulamaları

Yapılan doz tarama çalışmasının ardından ilaçların birlikte uygulamaları ile etkinliklerinin artıp artmayacağını saptamak amacıyla kombinasyon çalışması yapıldı. Bunun için hücreler stoktan açılarak küçük petri kaplarına ekildi ve petri kapları %80-90 oranında dolunca tripsinizasyon ile kaldırılıp 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara ekildi. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda besi yerleri uzaklaştırılıp, her bir ilaç için ilk aşamada en yüksek doz 1 µg/ml olacak şekilde; yarı yarıya seri dilüsyonla %1'lik FBS (Fetal Bovin Serum) içeren besi yeri ile hazırlanan ilaçlar Tablo 3.1'de gösterilen şekilde eklendi. Yapılan ilk deneylerde kuyucuklara önce

vinorelbin ve 30 dk sonra endostatin eklendi. İkinci grup denemelerde kuyucuklara önce endostatin ve 30 dk sonra vinorelbin eklendi Son grupta ise her iki ilaç kuyucuklara eş zamanlı olarak uygulandı.

İlaç uygulamalarının hemen ardından tek bir sıra kuyucuktaki hücre canlılığı saptanıp bu değer sıfırcı zaman olarak kaydedildi. İnkübasyon süresi olarak 24, 48 ve 72 saatlik periyotlar belirlenip, inkübasyon sonrasında hücrelerin canlılığı aşağıda belirtilen sitotoksosite testleri ile değerlendirildi. Bu aşamada her ilaç için canlılığın %50 azalmasını sağlayan dozlar (IC_{50}), ASSAY ZAP (Version 3) analiz programı kullanılarak bulundu.

Her biri kendi içinde dört kez tekrarlanarak, yapılan üç farklı deney sonucunda her bir ilaç için uygulama dozu saptandı.

İki farklı tedavi uygulandıktan 24, 48 ve 72 saat sonra denemeler sonlandırıldı ve sitotoksosite analizleri yapıldı. Elde edilen veriler Chou ve Talalay tarafından hazırlanan **“çoklu ilaç etkileşimlerde kombinasyonun verim hesabı”** (Chou ve Talalay, 1984) temel alarak hazırlanmış ve CalcuSyn (Version2), software programında değerlendirildi. CalcuSyn programı; isminden de anlaşılacağı gibi iki ilacın olası sinerjizmini değerlendirmek için hazırlanmış bir programdır. Farklı ilaçların kombinasyonu sonucunda sitotoksosite testlerinden elde edilen değerler kullanılarak Kombinasyon İndeksi (KI) aşağıda verilen formül ile hesaplanmaktadır:

$$KI = (D1/D1c) + (D2/D2c)$$

D1 ve D2; ilaçlar tek başına uygulandığında hücrelerde %50 inhibisyon sağlayan dozlardır, D1c ve D2c ise kombine halde hücrelerde %50 inhibisyon sağlayan dozlardır. Hesaplama sonrasında KI değeri 1’e eşit ise ilaçlar eklemeli etkili, 1’den büyük ise antagonistik etkili, 1’den küçük ise sinerjistik etkili ve 0,3’den küçük ise güçlü sinerjistik etkili olarak değerlendirilmektedir.

3.3. Sitotoksikite Testleri:

İlaçların hücreler üzerindeki etkisi, aşağıda verilen testler ile belirlendi.

3.3.1. WST-1 hücre proliferasyon kiti ile sitotoksik etkinin belirlenmesi

WST-1 hücre proliferasyon kiti (Rosche, Kat. No: 11 644 807 001) kullanılarak ilaçların sitotoksik etkileri araştırıldı. WST-1 testi canlı hücrelerdeki metabolik aktiviteyi, hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimi aracılığı ile WST-1'i parçalayarak, çözülebilir formazan tuzları oluşturması prensibine dayanarak yapılmaktadır.

Hücreler stoktan açılarak küçük petri kaplarına ekildi ve petri kapları %80-90 oranında dolunca tripsinizasyon ile kaldırılıp 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara ekildi. 24 saatlik süre ardından besi yerleri uzaklaştırıldı ve her bir ilaç için en yüksek doz 5 µg/ml olacak şekilde %1'lik FBS (Fetal Bovin Serum) içeren besi yerinde hazırlanan ilaçlar kuyucuklara eklendi.

Her iki ilaç için de dozlar başlangıçta 1 µg/ml'den başlamak üzere 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062, 0.031, 0.015, 0.0078, 0.0039 ve 0.0019 µg/ml olacak şekilde uygulandı ve sitotoksik doz bulunmaya çalışıldı. İlaçlar her bir kuyucuğa 200 µl olacak şekilde eklendi ve ardından 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerince %5 CO₂'li atmosferde 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı.

Her bir inkübasyon süresinin ardından kuyucuklardaki besi yerleri çekilip 10 µl serumsuz besi yeri üzerine 90 µl WST-1 solüsyonu eklendi ve ortalama 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda plakların absorbans değerleri spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda ölçülerek kaydedildi.

3.3.2. CyQUANT® NF hücre proliferasyon kiti ile sitotoksik etkinin belirlenmesi

CyQUANT® NF testi, hücresel DNA içeriğinin floresan boya ile işaretlenerek gösterilmesi prensibine dayanmaktadır. DNA içeriği hücre sayısı ile doğru orantılıdır. CyQUANT® GR boyası nüklear DNA'ya bağlanmakta ve bu sayede canlı hücre sayısını belirleme olasılığı sağlamaktadır.

HUVEC hücreleri 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara bölündü. Hücrelerin kuyucuklara yapışması için 24 saat beklendi ve bu inkübasyon süresi tamamlanınca, besiyerleri uzaklaştırılıp ilaçlar uygulandı. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, her bir kuyucuğa kit protokolüne göre hazırlanan boya bağlama solüsyonundan 100 μ L eklendi. Bir saatlik inkübasyon süresi sonrasında, floresan yoğunluğu florimetre cihazında 485nm eksitasyon ve 530 nm emisyon dalga boylarında ölçüldü.

3.3.3. Kaspaz 2,-3,-6,-8,-9 aktivitesinin ölçümü

Kolorimetrik proteaz (Kaspaz 2,-3,-6,-8,-9) kiti (Invitrogen, Kat. No:KHZ1001) kullanılarak apoptoz mekanizmasında yer alan önemli bazı kaspaz aktivitelerinde değişim olup olmadığı saptanmaya çalışıldı. Her bir kaspaza ait spesifik amino asit dizileri, VDAD (Kaspaz-2), DEVD (Kaspaz-3), IETD (Kaspaz-8) ve LEHD (Kaspaz-9) bulunmaktadır. Kit içerisinde p-nitroanilin ile işaretlenmiş halde bulunan peptit, kaspazlar tarafından kesilerek pNA kısmı serbest kalır ve elde edilen absorban değeri tespit edilir.

Kaspaz enzim aktivitesinin ölçümü için hücreler, kitte önerildiği şekilde, her bir petride 3×10^6 hücre olacak şekilde, ayrı ayrı küçük petrilere bölündü. Sitotoksite testinde etkin doz olarak belirlenen; endostatin için 5 μ g/ml, vinorelbin için 1 μ g/ml'lik dozlar; %1 FBS içeren besiyerlerine hazırlanmış olup, 24 saat sonra her birinden 4'er tekrarlı olmak üzere bölünmüş olan petrillerdeki hücelere petri başına 5'er ml uygulandı. İlaçların uygulanmasının ardından etkili inkübasyon süresi olarak belirlenen 72 saat'lik zaman dilimi sonunda deney sonlandırıldı.

Süre sonunda petrillerdeki hücrelerin besi yerleri uzaklaştırılıp, hücreler üzerine 500 μ l Edta-Versen eklendi ve hücreler kaldırıldı. Toplanan hücelere buz içerisinde bekletilen Lizis tamponundan 50 μ l eklendi, 10 dakika süre ile yine buz içerisinde bekletildi. Ardından hücreler 10.000g'de 1 dakika santrifüj edilip daha sonra süpernatant kısmı alınarak başka bir cam tüpe aktarıldı. Elde edilen süpernatantlardaki protein miktarını tespit etmek için Bradford Protein Tayin Kiti (Sigma Kat no:B6916) kullanıldı. Bovine Serum Albumin standart protein olarak seçildi ve 1.4, 1.2, 1, 0.5,

0.25, 0.125, 0.625 mg/ml’lik konsantrasyonlarda hazırlanarak kullanıldı. Spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda örneklerin absorbansları ölçüldü ve yapılan hesaplamalarla içerdikleri protein miktarları belirlendi. Her bir örnek, 50 µl’de 200mg/ml protein olacak şekilde sulandırılarak kullanıldı ve kaspaz kalorimetrik proteaz kiti (Invitrogen kat no:KHZ1001) protokolü izlenerek kaspaz-2, -3, -6, -8, -9 aktiviteleri belirlendi.

3.3.4. TNF- α miktarının belirlenmesi

TNF- α miktarının belirlenmesi için hücreler, kitte önerildiği şekilde, her bir petride 1×10^6 hücre olacak şekilde, ayrı ayrı küçük petrilere bölündü. Sitotoksite testinde etkin doz olarak belirlenen; endostatin için 5 µg/ml, vinorelbin için 1 µg/ml’lik dozlar; %1 FBS içeren besiyerlerine hazırlandı ve 24 saat sonra her birinden 4’er tekrarlı olmak üzere bölünmüş olan petrillerdeki hücelere petri başına 5’er ml uygulandı. İlaçların uygulanmasının ardından etkili inkübasyon süresi olarak belirlenen 72 saat’lik zaman dilimi sonunda deney sonlandırıldı. Süre sonunda petrillerdeki hücrelerin besi yerleri 1 ml’lik ependorflara alındı. Çalışılacağı süreye kadar -20°C’lik derin dondurucuda saklandı. Hücrelerden salınan TNF- α miktarı İnsan TNF- α Kiti (Invitrogen, KHC3011) kullanılarak belirlendi.

3.4. Endostatinin, Vinorelbinin ve Kombinasyonunun Caspase-3, TNF- α ve TRAIL Üzerine Olan Etkilerinin Western-Blot ile Gösterilmesi

3.4.1. Western-blot deneylerinde kullanılan solüsyonların içerikleri

Western blot deneylerinde kullanılan tüm kimyasallar Sigma firması tercih edilerek temin edildi.

i) Liziz tamponu

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

ii) 10 X Tris baz solüsyonu (TBS)

24.2 gr tris baz ve 80 gr NaCl 800 ml distile suda çözülüp, pH 7.6’ya ayarlandıktan sonra hacim distile su ile 1 l’ye tamamlandı.

iii) Tris baz solüsyonu-tween 20 (TBST)

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

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

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

v) 4X Alt jel hazırlama tamponu

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

v) 4X Üst jel hazırlama tamponu

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

vi) 10X yürütme tamponu

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

vii) Transfer tamponu

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

viii) % 5’lik süt tozu

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

ix) % 10’luk Amonyum per sülfat (APS)

10 gr APS 100 ml distile suda çözülmüştür.

3.4.2. Hücrelerin western-blot için hazırlanması

Hücreler 1×10^6 hücre/ 10 ml besiyeri (%1 serumlu) olacak şekilde steril küçük petri kaplarına bölündü. Yapışma ve yayılmalarını takiben, besiyerleri uzaklaştırıldı ve kontrol grubu olarak kullanılacak petri kaplarına %1 serumlu taze besiyeri (1,5 ml) eklendi. Diğer petri kaplarına 5 µg/ml endostatin, 1 µg/ml vinorelbin ve her ikisini de içeren % 1 serumlu besiyeri (1,5 ml) eklendi. Hücreler 72 saat süre ile inkübe edildi.

İnkübasyon süresi sonunda hücreler üzerine, proteinlerin çözülebilir hale gelmelerini sağlayacak, triton X-100 içeren liziz tamponundan 300 µl eklenerek hücreler kaldırıldı. Ependorflara alınan hücreler buz içerisinde yarım saat inkübe edildikten sonra örnekler 12 000 rpm’de 20 dakika döndürülerek çöktürüldü. Örneklerdeki protein miktarları, Bradford esasına dayanan protein tespit kiti kullanılarak (Sigma B6916) belirlendi. Western-blot deneylerinden elde edilecek bantların karşılaştırılabilmesi için, jel kuyucuklarına yüklenen örneklerin eşit miktarda protein içermesi gerekmektedir. Bu nedenle, örneklerden her birinin 25 µg protein içeren miktarları hesaplanarak, son hacimleri 20 µl olacak şekilde 2X SDS örnek yükleme tamponlarıyla karıştırıldı. Örnekler 95 °C’de 5 dakika kaynatılarak, jele yüklemeye hazır hale getirildi.

3.4.3. Jellerin hazırlanması

Jellerin döküleceği camlar alkol ile silinerek temizlendi ve jel dökme aparatına yerleştirildi. Her iki enzim için de % 4’lük ayırma jeli (üst jel) ve %10’luk yürütme jeli (alt jel) kullanıldı.

i) % 10’luk alt jelin hazırlanması

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

ii) % 4’lük üst jelin hazırlanması

1,625 ml distile su, 625 µl 4X Üst jel hazırlama tamponu, 250 µl %40 akrilamid-bisakrilamid, 15 µl %10’luk APS, 5 µl tetraetilmetilendiamid (TEMED) karıştırıldı. Jeller 15 ml’lik falkonlarda hazırlandı ve ardından önce alt jel, içerisine TEMED dökülür dökülmez, camlar arasına pipetlendi. Üst yüzeyin düzgün olması için jelin üst kısmına su ile doyurulmuş bütanol eklendi. Alt jel polimerize olmadan, üst jelin içerisine TEMED eklenmedi. Alt jel polimerize olduktan hemen sonra bütanol uzaklaştırılıp, üst jele TEMED eklendi ve solüsyon alt jelin üzerine pipetlenip, polimerize olması beklendi.

3.4.4. Örneklerin jele yüklenmesi ve SDS-PAGE

Jeller polimerize olduktan sonra, toplam hacmi 20 µl olan 2X SDS yükleme tamponuyla karıştırılan örnekler ve 15 µl moleküler ağırlık standartları (Santacruz sc-

2035) jel kuyucuklarına yüklendi. Jeller, elektroforez tankına yerleştirilip ve tank 1X yürütme tamponuyla doldurularak, sistem 20 mA'de çalıştırıldı. Örnekler alt jele geçer geçmez, akım 40 mA'e yükseltildi. Yükleme tamponu jelin en altına ulaştığında da sistem kapatılarak sonlandırıldı.

SDS-PAGE devam ederken membrana transfer için uygun boyutlarda kesilmiş PVDF membranlar, transferde kullanılacak watman kağıtları ve süngerler, transfer tamponunda ıslatılıp hazırlandı. Sistem kapatıldıktan sonra jeller kurutma kağıtları yardımıyla camlardan ayrıldı. Islatılmış süngerlerden biri transfer aparatına yerleştirilip; üzerine kuru watman kağıdı yardımıyla alınmış jel (jelin üst yüzü yukarı bakacak şekilde) yerleştirildi. Üzerine sırasıyla ıslatılmış membran, ıslatılmış watman ve ıslatılmış sünger koyularak aparat kapatıldı. Transfer tamponuyla doldurulan tank içerisine yerleştirilerek, 40 V'da 2 saat elektroforez uygulandı ve membrana transfer gerçekleştirildi. Transfer işlemi bitince, sistem kapatıldı ve ardından membran % 5'lik süt tozuna alınarak +4° C'de bir gece bekletildi (Yalçın vd 2008).

3.4.5. Antikorlarla işaretleme

Süt tozundan alınan membranlar 4 kez, TBST ile 15 dakika yıkandı. Bu arada primer antikor solüsyonları hazırlandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra membranlar primer antikor (TRAIL için SantaCruz sc-65340 katalog numaralı fare monoklonal antikor 1:2000, kaspaz 3 için SantaCruz sc-7272 katalog numaralı fare monoklonal antikoru 1:100 oranında seyreltilerek ve TNF- α için SantaCruz sc-73343 katalog numaralı fare monoklonal antikoru 1: 200 oranında seyreltilerek) ile bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda membranlar TBST ile 15'er dakikalık aralıklarla, 4 kez yıkandı. Yıkama sonunda membran TRAIL için 1:10000 ve kaspaz-3 için 1:10000 ve TNF- α için 1:10000 oranında seyreltilerek hazırlanan sekonder antikor (SantaCruz, hrp-bağlı immünoglobulin G) ile 1 saat süresince inkübe edildi. İnkübasyon sonunda membranlar son kez TBST ile 15' şer dakika aralıklar ile 4 kez yıkandı.

3.4.6. Membranın görüntülenmesi

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

3.5 İstatistiksel Analiz

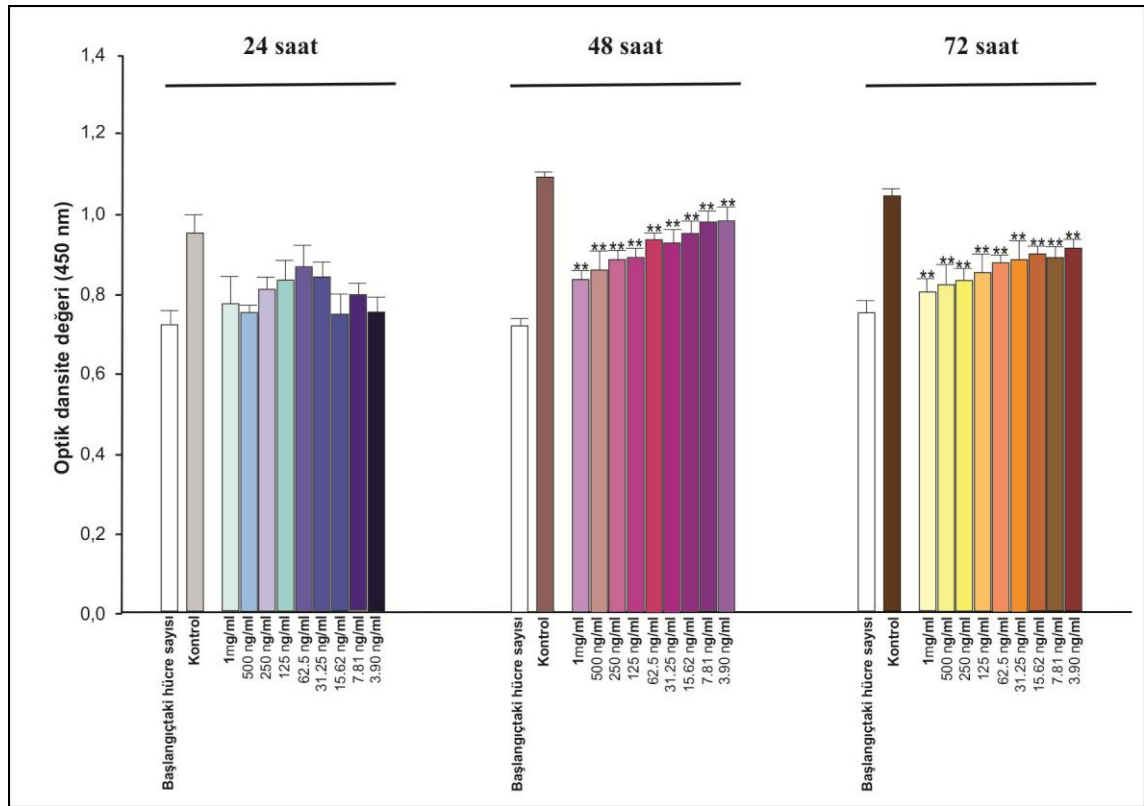
Sitotoksosite testlerinden elde edilen deney sonuçlarındaki kontrol ve diğer gruplar arasındaki farklılık Graph-pad InStat istatistik programında, Tek Yönlü Anova Testi ve ardından Dunnet Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak değerlendirildi. Enzim aktivitelerinden elde edilen veriler ise Graph-pad InStat istatistik programında, Tek Yönlü Anova Testi kullanılarak değerlendirildi. Tüm veriler ortalama $\pm$ SEM değerleri halinde, Sigma Plot 10.0 programı kullanılarak grafik haline getirildi.

4. BULGULAR

4.1. Vinorelbinin Tek Başına 293 T ve MDAMB 231 Hücre Hatları Üzerine Gösterdiği Sitotoksik Etkiler

4.1.1. 293 T hücre hattı

Yirmi dört saatlik inkübasyon süresi sonunda, vinorelbin 3.90 ng/ml-1µg/ml aralığında denenilen dozların hiç birinde 293 T hücre hattı üzerinde sitotoksik etki göstermedi. Ancak, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda, denenilen tüm dozlar, 293 T hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azalttığı gözlemlendi (**, p<0.001). Vinorelbinin tek başına 293 T hücre canlılığı üzerindeki etkisi grafiklenerek (Şekil 4.1) aşağıda gösterildi.

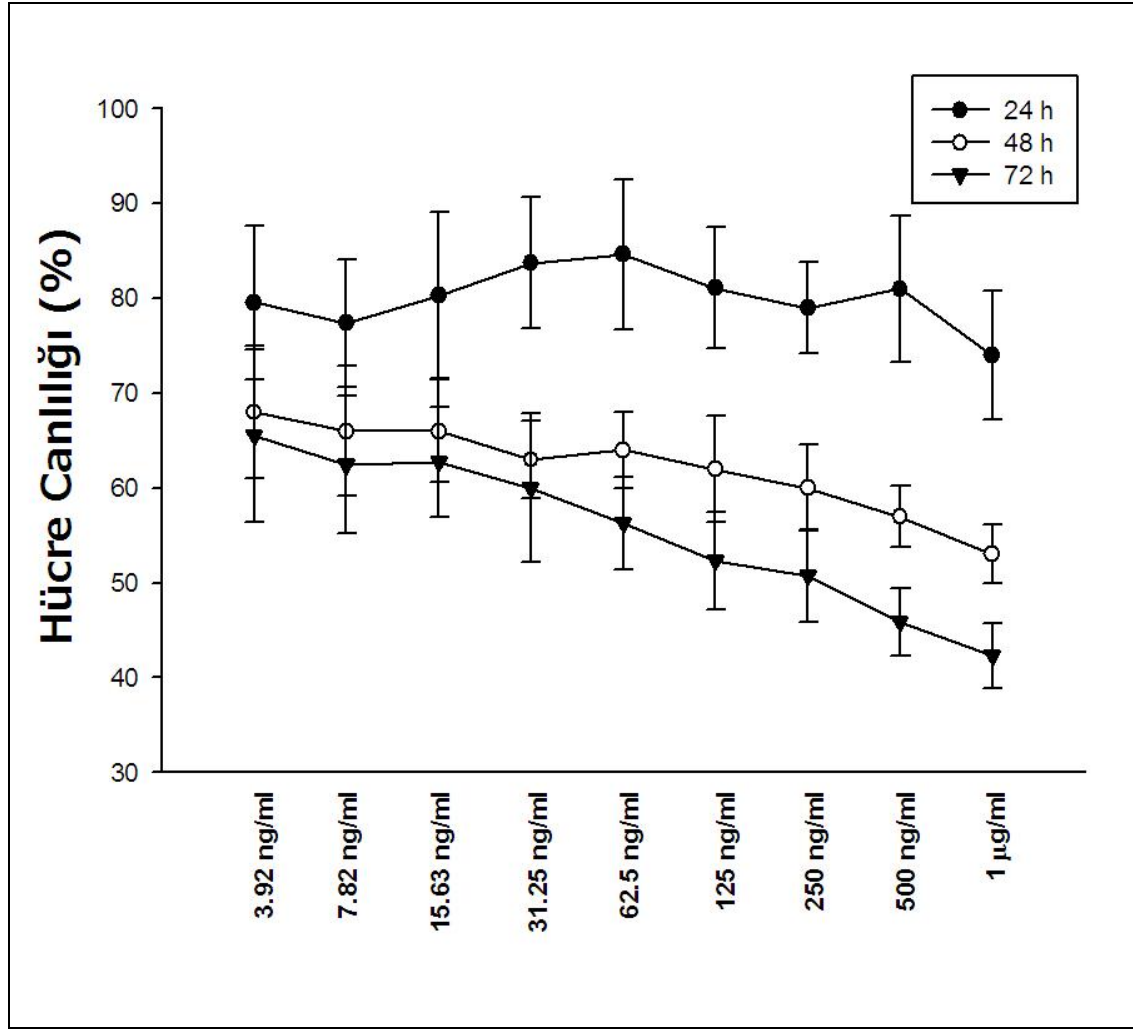


Şekil 4.1. Vinorelbinin 24,48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde, 293T hücre hattı üzerine etkisi

Şekil 4.1'deki grafiklerde de görüldüğü gibi, 24 saatlik inkübasyon sonunda tek başına vinorelbin uygulamasının kontrol grubuna oranla hücrelerde sitotoksik bir etki

göstermediği saptandı. 293 T hücreleri oldukça hızlı üredikleri için, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda kontrol grubundaki hücrelerde de canlılık kaybı olmuştur.

Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak hesaplanan hücre canlılığının yüzde değeri Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

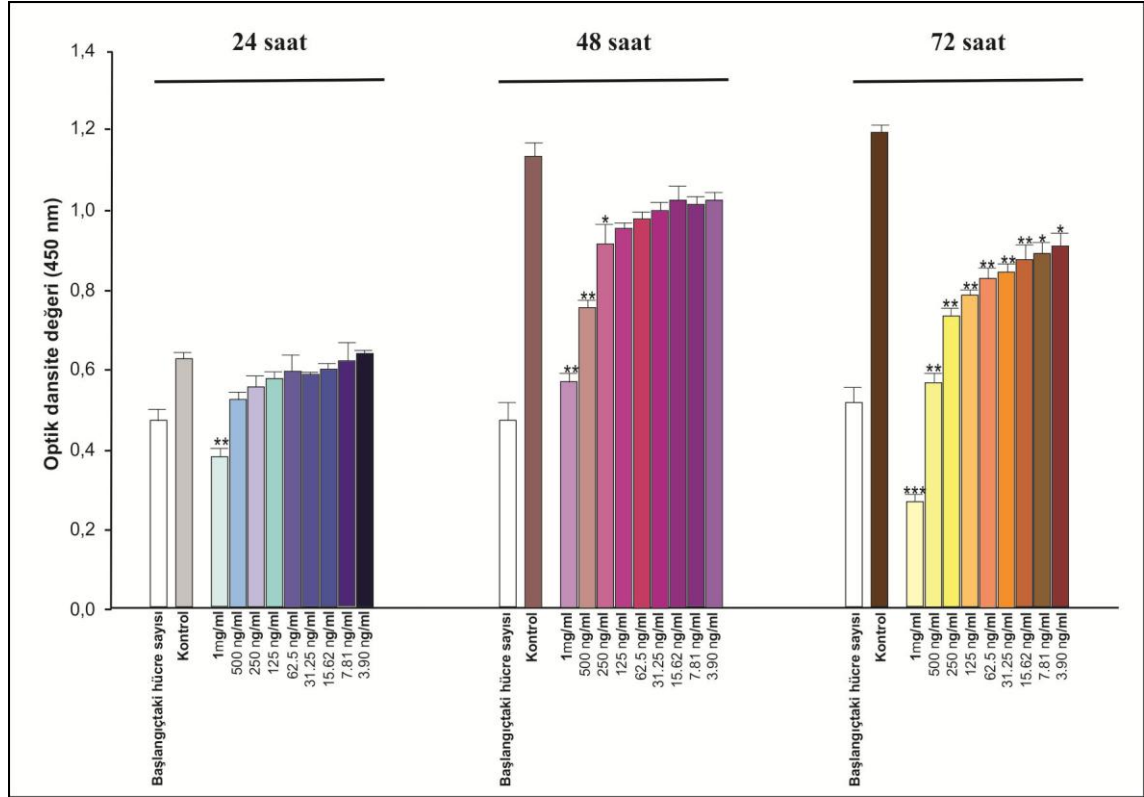


Şekil 4.2. Vinorelbinin 3,92 ng/ml-1µg/ml arasında denenen dozlarının 293T hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)

4.1.2. MDAMB 231 hücre hattı

Yirmi dört saatlik inkübasyon süreleri sonunda, vinorelbin 3,90 ng/ml-1µg/ml aralığında denenen dozların hiç birinde MDAMB 231 hücre hattı üzerinde sitotoksik

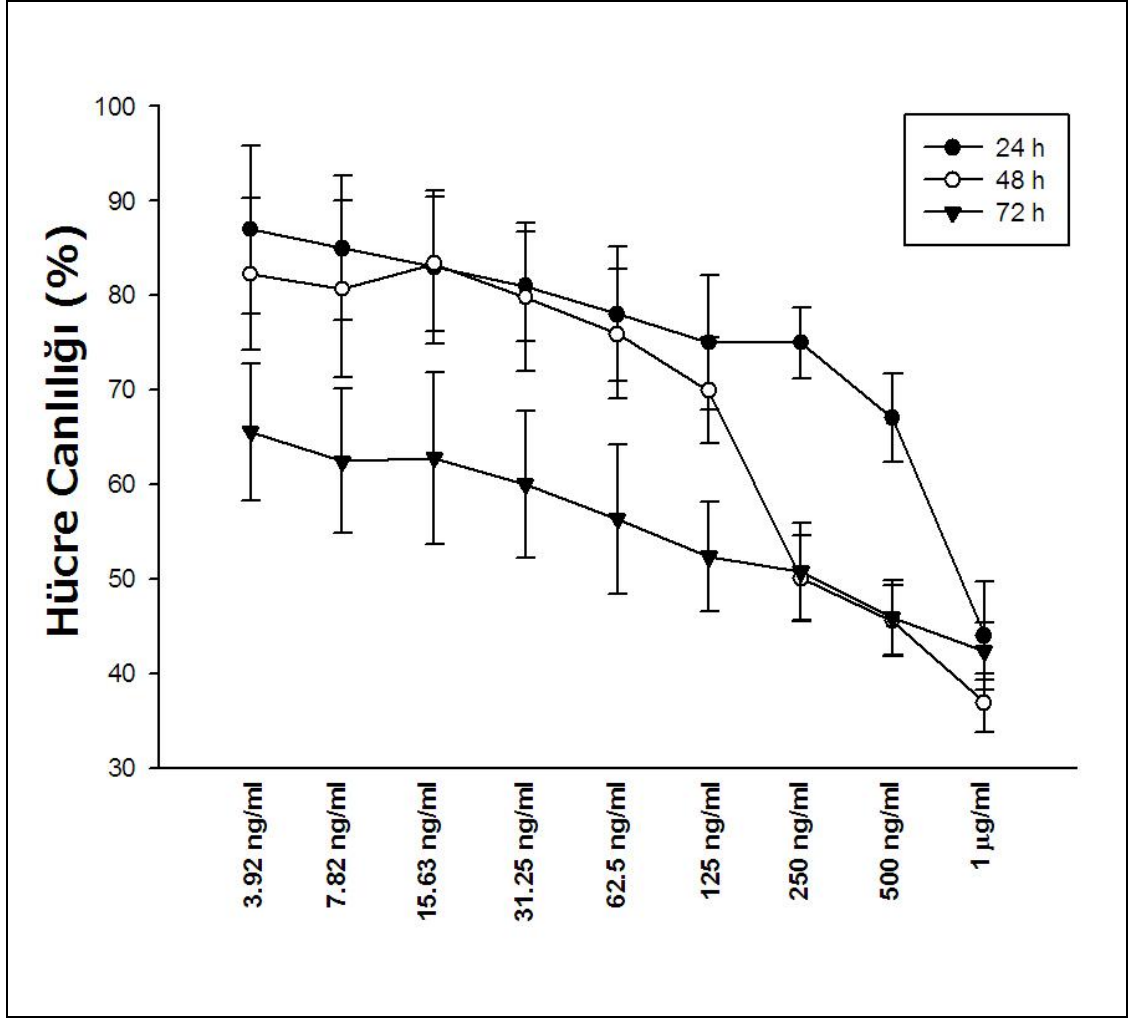
etki göstermedi. Ancak, 72 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda, denenen tüm dozlar, MDAMB 231 hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azalttığı gözlemlendi (****, $p < 0.0001$). Vinorelbinin tek başına MDAMB 231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi grafiklenerek (Şekil 4.3) aşağıda gösterildi.



Şekil 4.3. Vinorelbinin 24,48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde, MDAMB 231 hücre hattı üzerine etkisi

Şekil 4.3'teki grafiklerde de görüldüğü gibi, 24 saatlik inkübasyon sonunda tek başına Vinorelbin uygulamasının kontrol grubuna oranla hücrelerde sitotoksik bir etki göstermediği saptandı.

Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak hesaplanan hücre canlılığının yüzde değeri Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

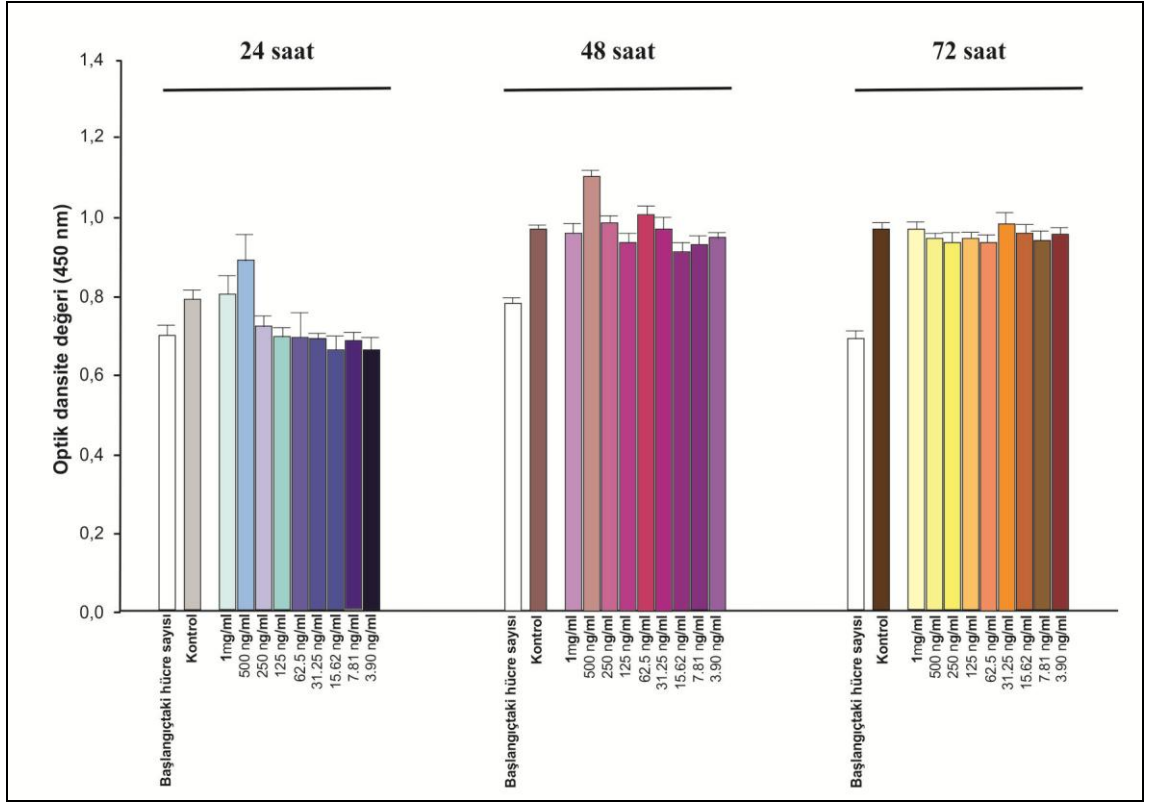


Şekil 4.4. Vinorelbinin 3.92 ng/ml-1µg/ml arasında denenilen dozlarının, MDAMB 231 hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)

4.2. Endostatinin Tek Başına 293 T, MDAMB 231 ve HUVEC Hücre Hatları Üzerine Gösterdiği Sitotoksik Etkiler

4.2.1. 293 T hücre hattı

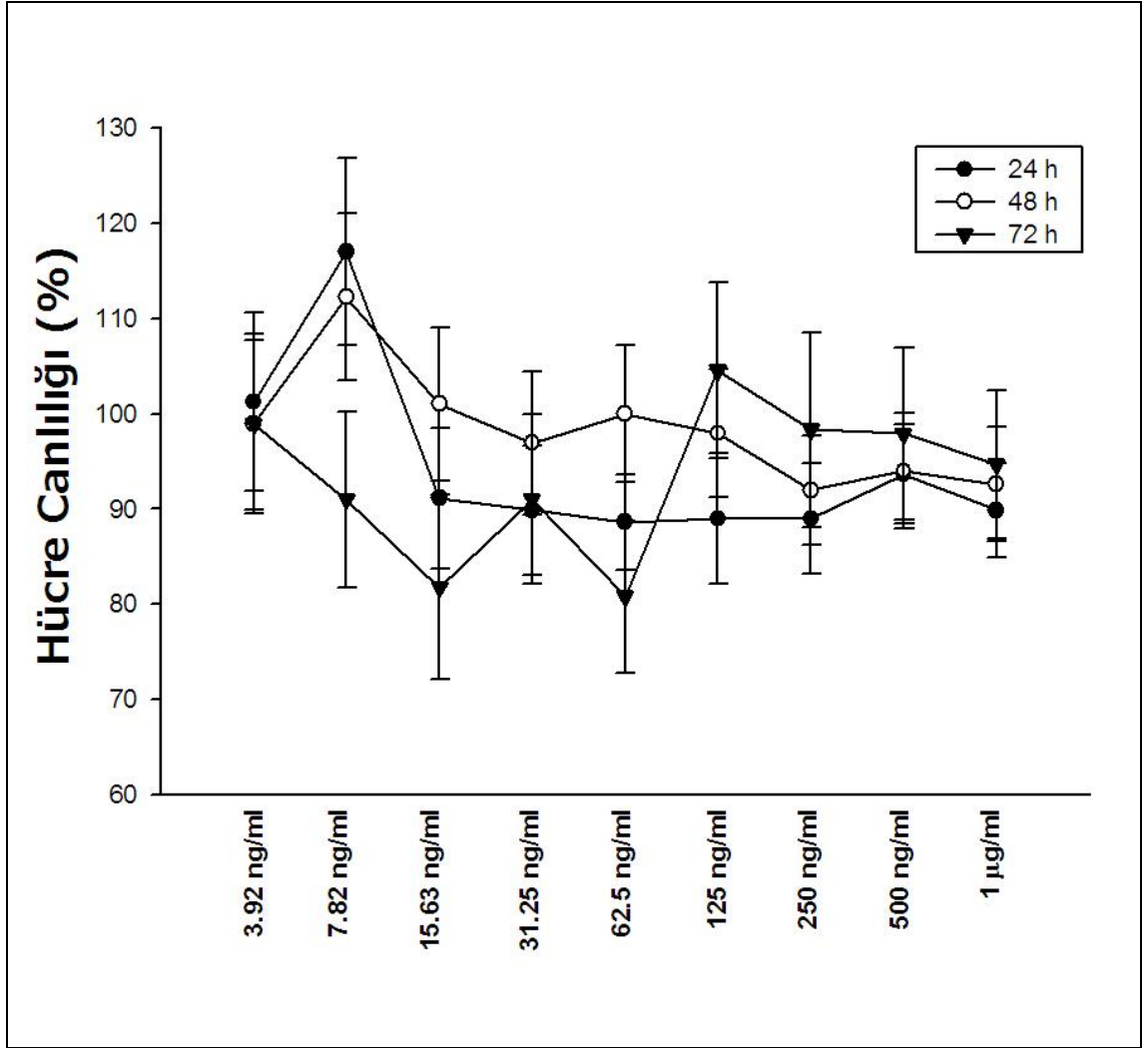
Yirmi dört ve 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, endostatin; 3,90 ng/ml-1µg/ml aralığında denenilen dozların hiç birinde 293 T hücre hattı üzerinde sitotoksik etki göstermedi. Endostatinin tek başına 293 T hücre canlılığı üzerindeki etkisi grafiklenerek (Şekil 4.5) aşağıda gösterildi.



Şekil 4.5. Endostatinin 24,48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde, 293T hücre hattı üzerine etkisi

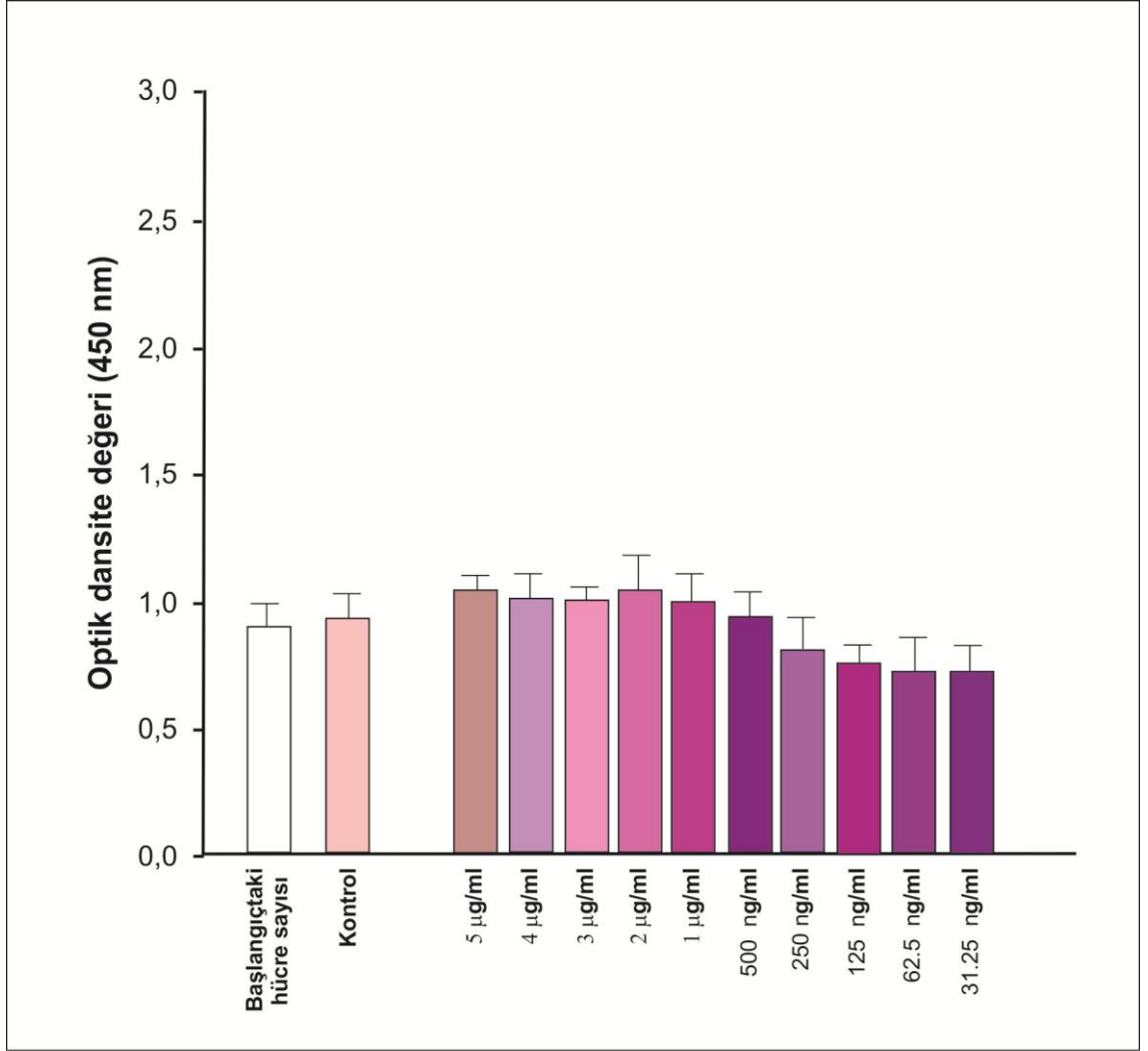
Şekil 4.5'teki grafiklerde de görüldüğü gibi, 24,48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda tek başına endostatin uygulamasının kontrol grubuna oranla hücrelerde sitotoksik bir etki göstermediği saptandı. 293 T hücreleri oldukça hızlı üredikleri için, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda kontrol grubundaki hücrelerde de canlılık kaybı olmuştur.

Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak hesaplanan hücre canlılığının yüzde değeri Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

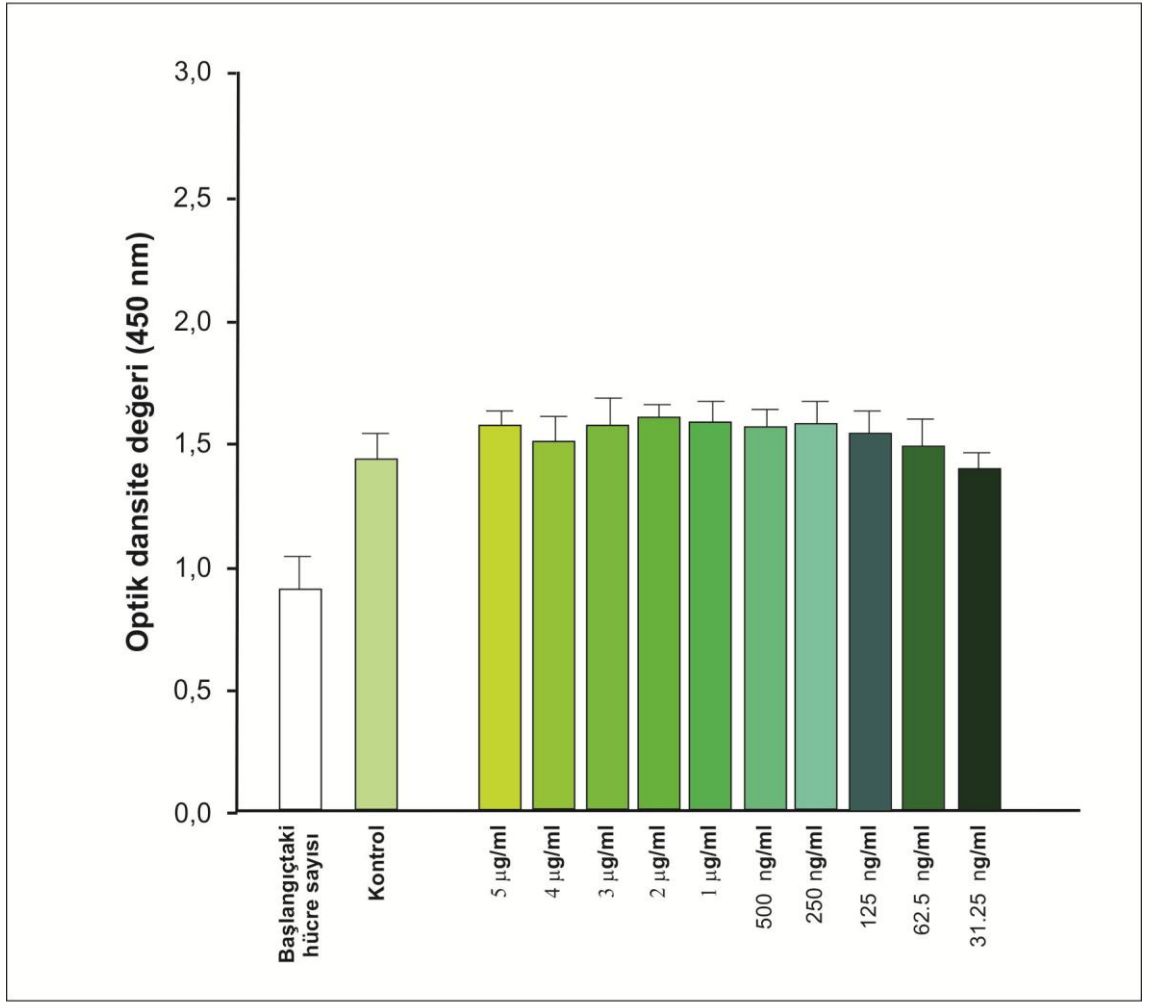


Şekil 4.6. Endostatinin 3.92 ng/ml-1µg/ml arasında denenilen dozlarının, 293 T hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)

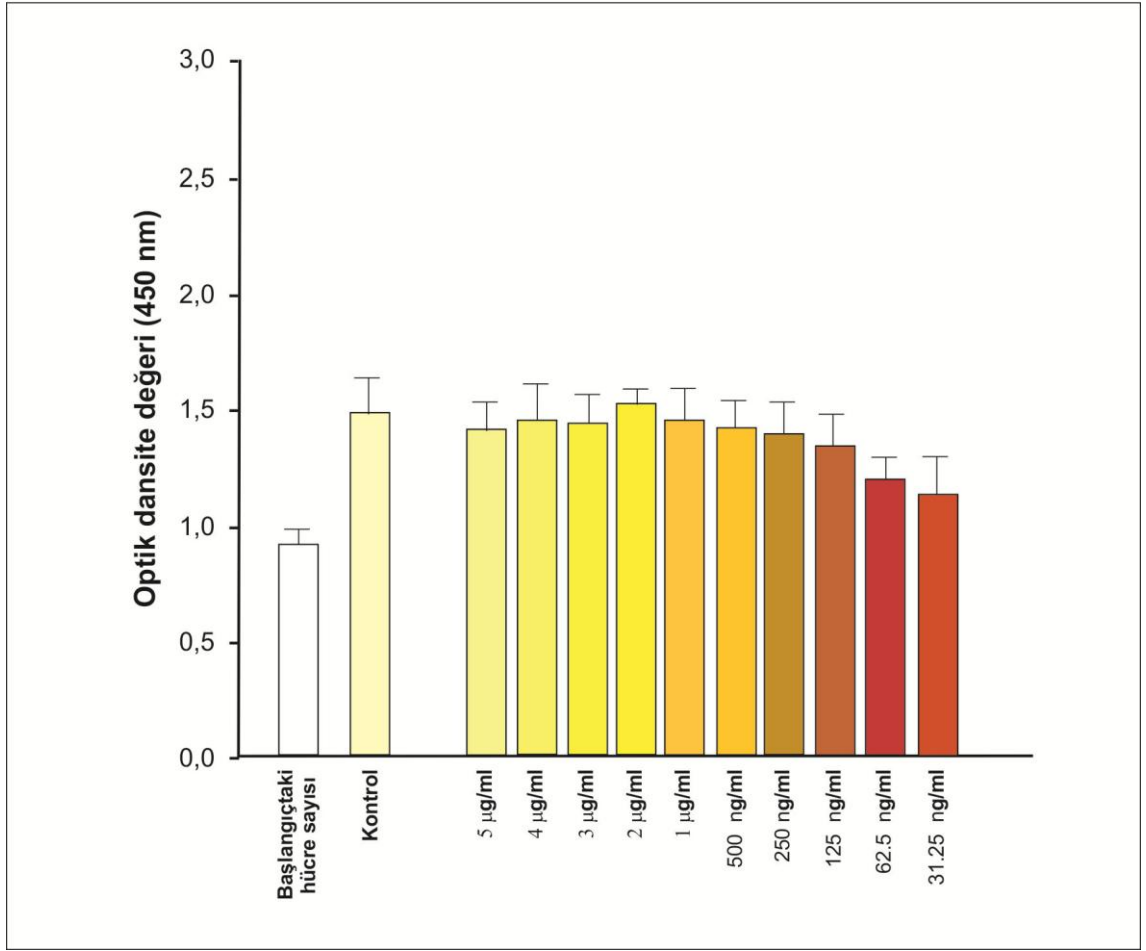
Endostatinin 3,90 ng/ml-1µg/ml aralığında denenilen dozları ile yapılan doz tarama çalışmalarında etki gözlenemediği için; dozlar 5µg/ml-31.25ng/ml arasında değiştirilerek deneyler tekrarlandı. Endostatinin; 24 saat (Şekil 4.7), 48 saat (Şekil 4.8) ve 72 saat (Şekil 4.9) inkübasyon sürelerinde tek başına, 293 T hücre canlılığı üzerindeki etkisi grafiklenerek aşağıda gösterildi.



Şekil 4.7. Endostatinin 24 saatlik inkübasyon süresinde, 293 T hücre hattı üzerine etkisi



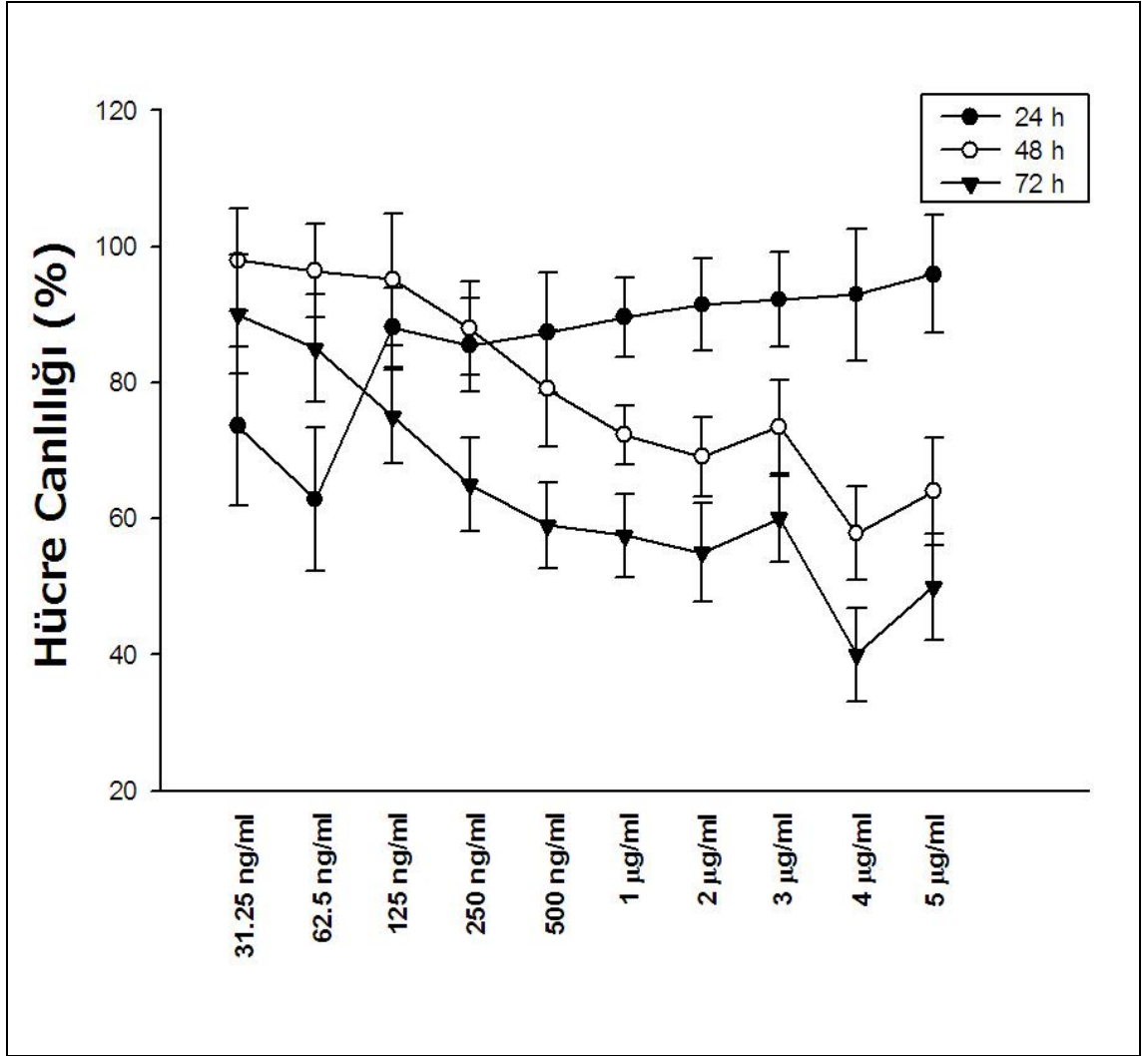
Şekil 4.8. Endostatinin 48 saatlik inkübasyon süresinde, 293 T hücre hattı üzerine etkisi



Şekil 4.9. Endostatinin 72 saatlik inkübasyon süresinde, 293 T hücre hattı üzerine etkisi

Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’da da görüldüğü gibi; 24,48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda tek başına endostatin uygulamasının kontrol grubuna oranla 293 T hücrelerinde sitotoksik bir etki göstermediği saptandı.

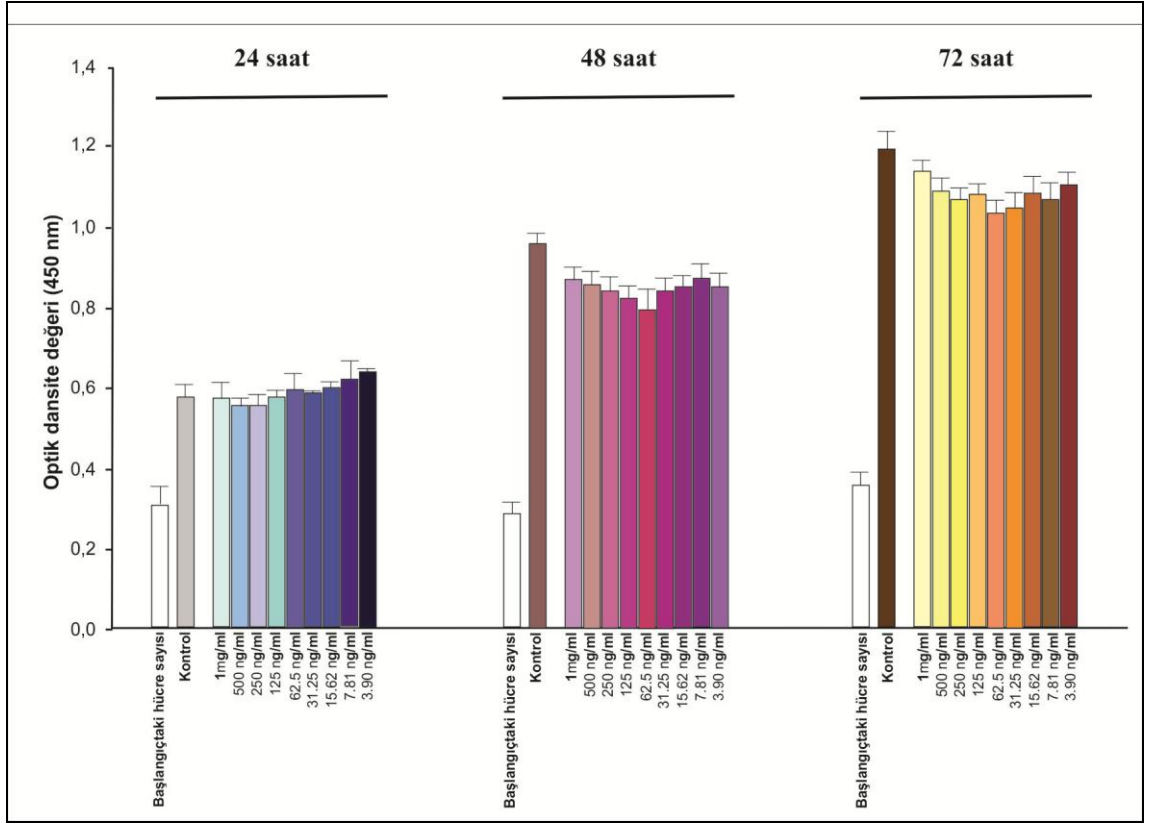
Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak hesaplanan hücre canlılığının yüzde değeri Şekil 4.10’da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Endostatinin 31.25 ng/ml-5µg/ml arasında denenen dozlarının, 293 T hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)

4.2.2. MDAMB 231 hücre Hattı

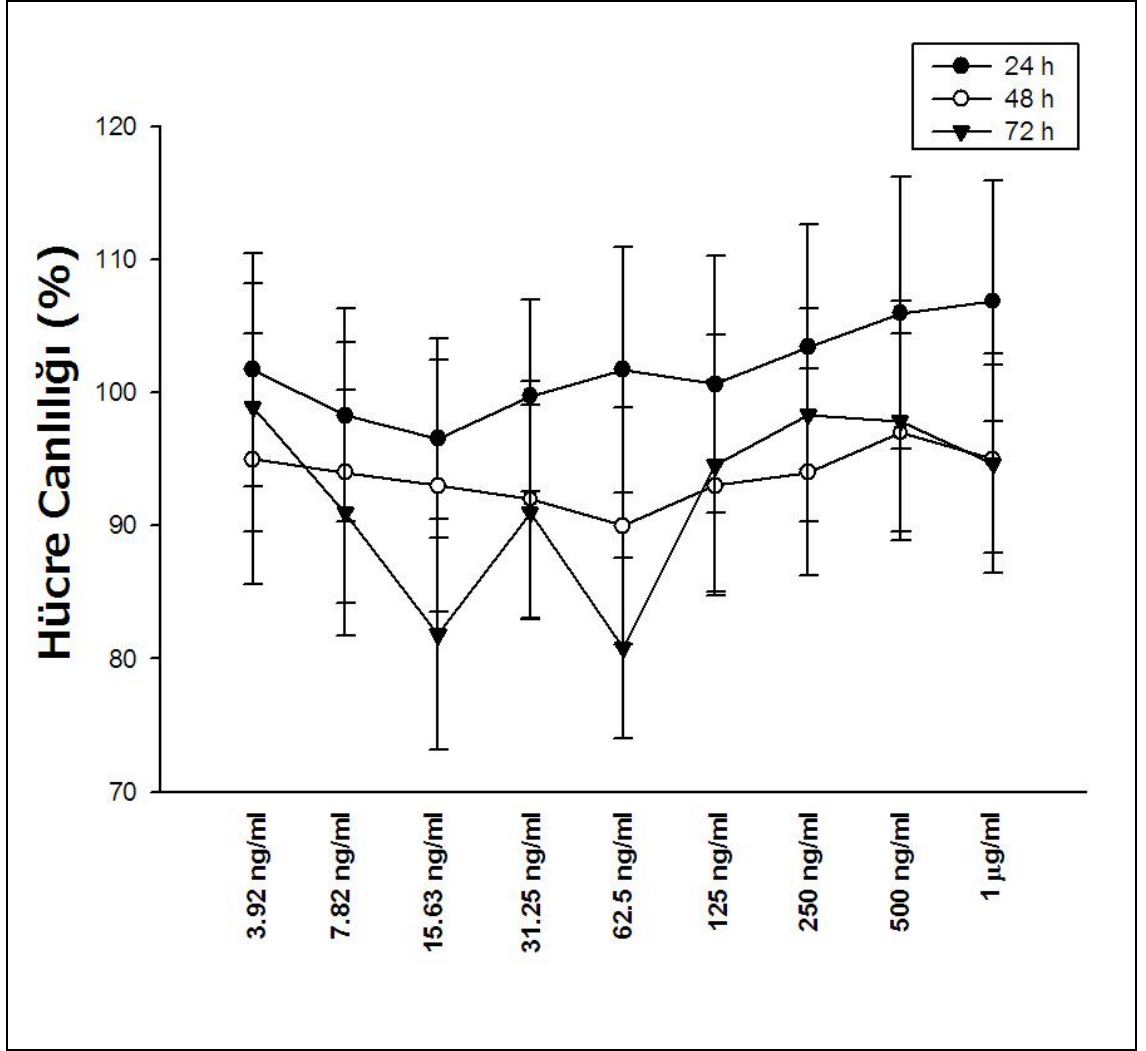
Yirmi dört, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, endostatin; 3,90 ng/ml-1µg/ml aralığında denenen dozların hiç birinde MDAMB 231 hücre hattı üzerinde sitotoksik etki göstermedi. Endostatinin tek başına MDAMB 231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi grafiklenerek (Şekil 4.11) aşağıda gösterildi.



Şekil 4.11. Endostatinin 24,48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde, MDAMB 231 hücre hattı üzerine etkisi

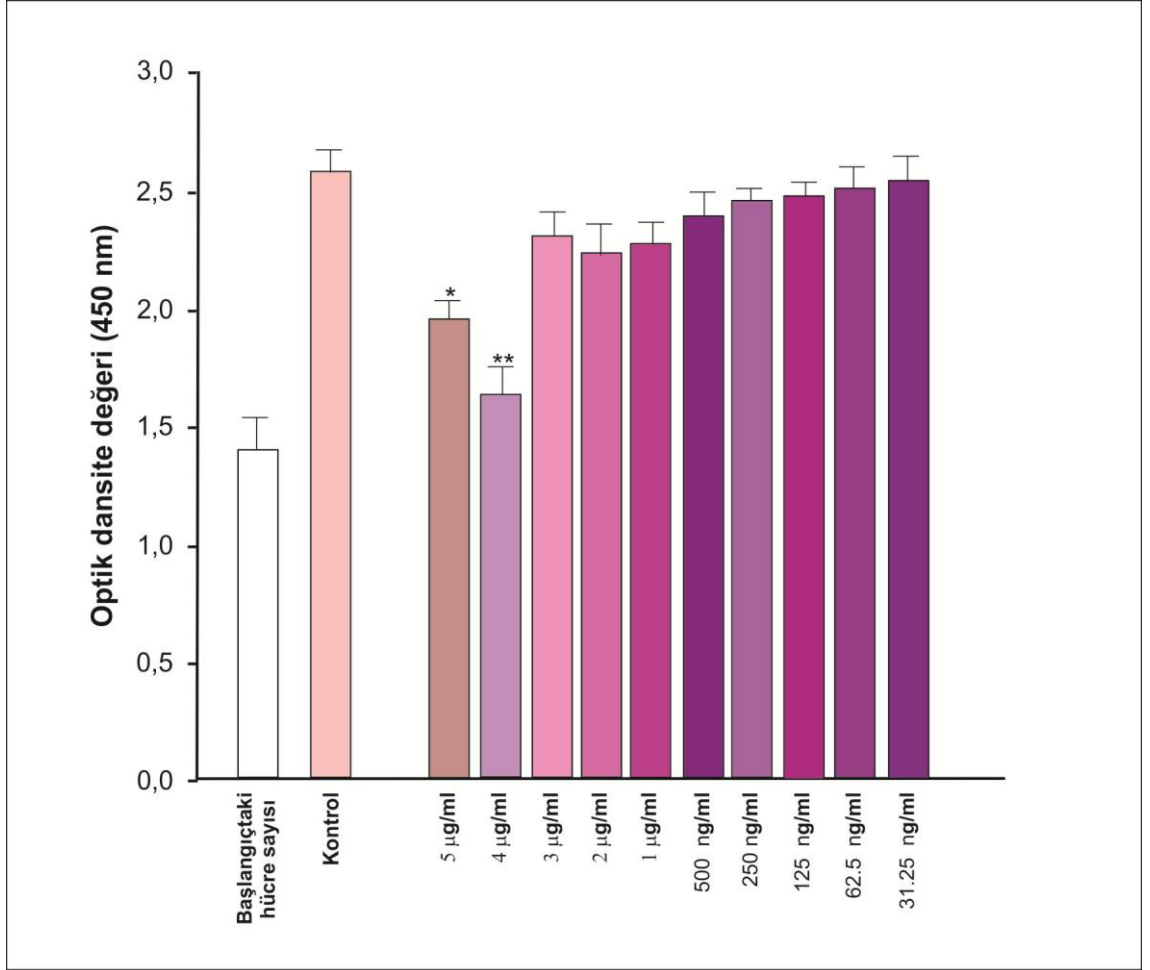
Şekil 4.11’deki grafiklerde de görüldüğü gibi, 24,48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda tek başına endostatin uygulamasının kontrol grubuna oranla hücrelerde sitotoksik bir etki göstermediği saptandı.

Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak hesaplanan hücre canlılığının yüzde değeri Şekil 4.12’de gösterilmiştir.

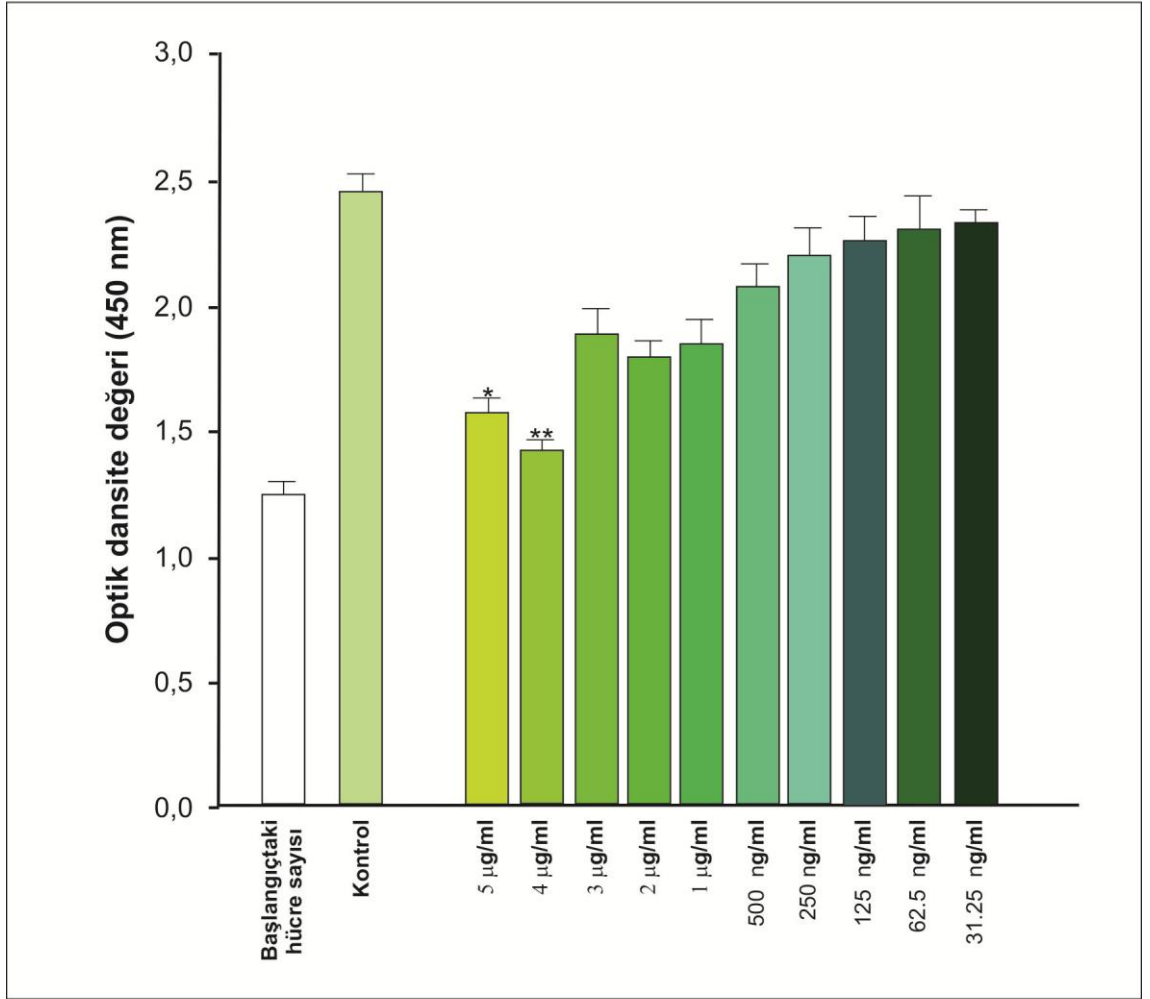


Şekil 4.12. Endostatinin 3.92 ng/ml-1µg/ml arasında denenilen dozlarının, MDAMB 231 hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)

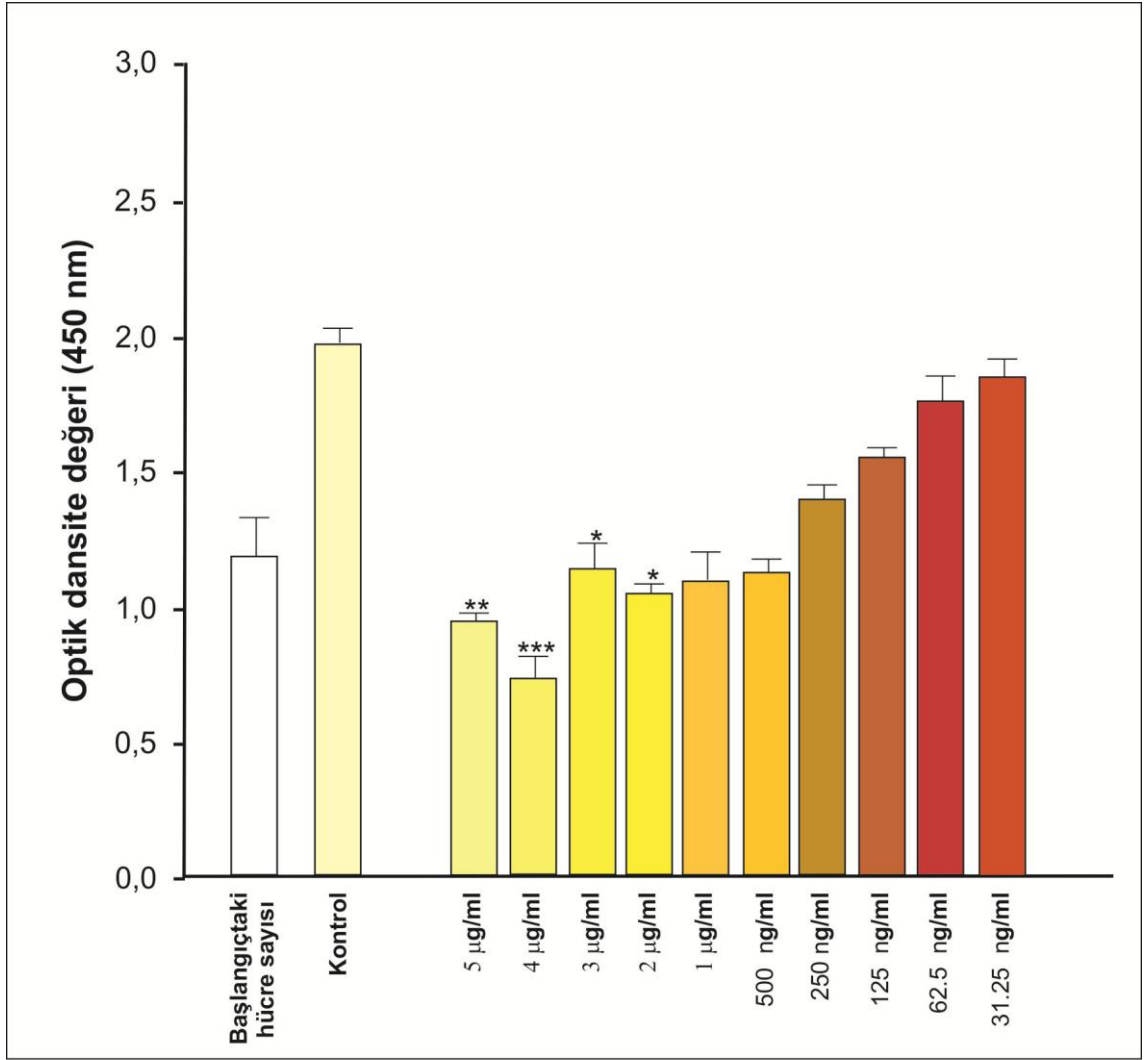
Endostatinin 3,92 ng/ml-1µg/ml aralığında denenilen dozlarının MDAMB 231 hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%) (Şekil 4.12) değerlendirildikten sonra, bu doz aralığında yapılan doz tarama çalışmalarında etki gözlenemediği bulundu. Bu yüzden doz arttırımına gidilerek, dozlar 5µg/ml-31.25ng/ml arasında değiştirilip deneyler tekrarlandı. Endostatinin tek başına, 24 saat (Şekil 4.13), 48 saat (Şekil 4.14) ve 72 saat (Şekil 4.15) inkübasyon sürelerinde, MDAMB 231 hücre canlılığı üzerindeki etkisi grafiklenerek aşağıda gösterildi.



Şekil 4.13. Endostatinin 24 saatlik inkübasyon süresinde, MDAMB 231 hücre hattı üzerine etkisi



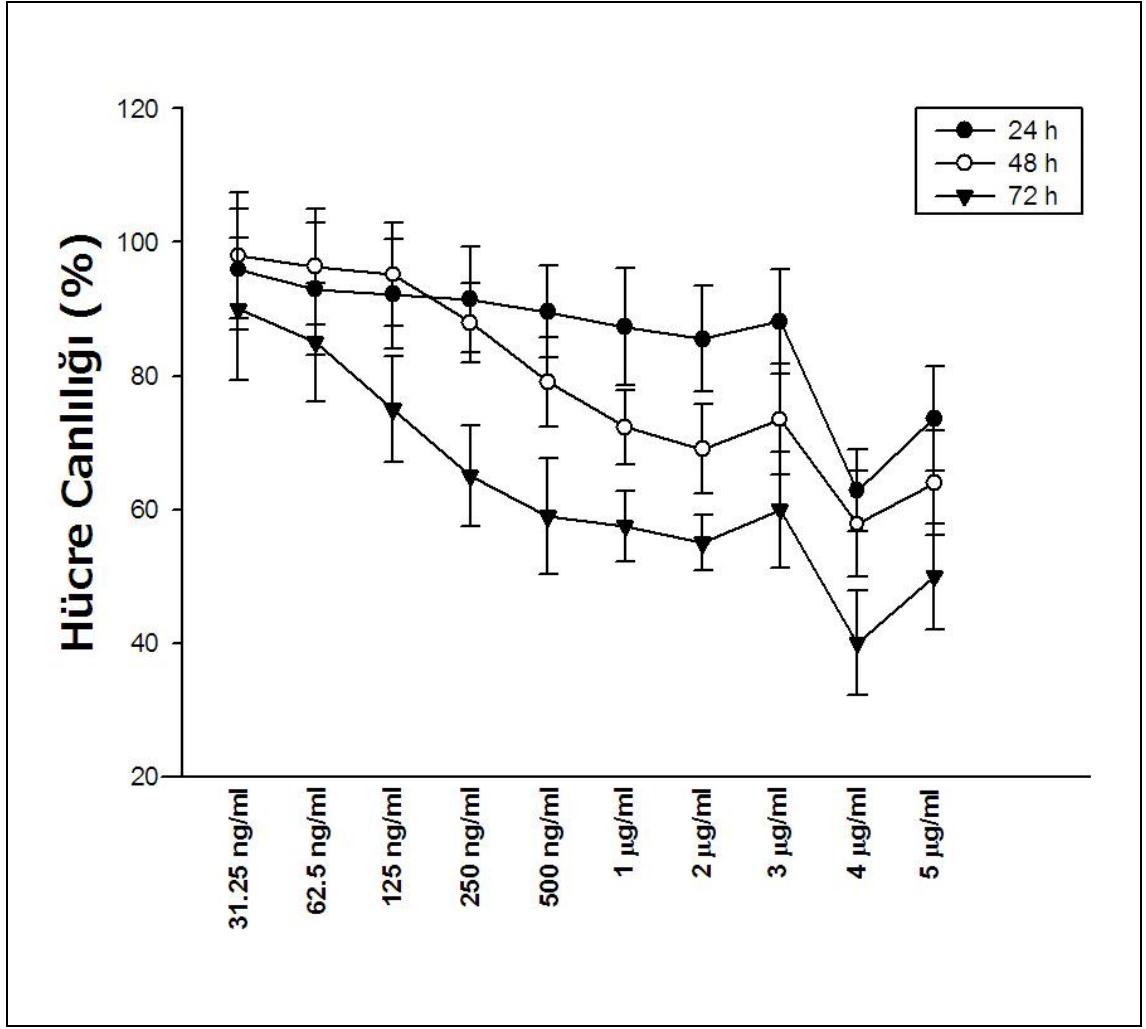
Şekil 4.14. Endostatinin 48 saatlik inkübasyon süresinde, MDAMB 231 hücre hattı üzerine etkisi



Şekil 4.15. Endostatinin 72 saatlik inkübasyon süresinde, MDAMB 231 hücre hattı üzerine etkisi

Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te de görüldüğü gibi, 24,48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda ortak olarak 4µg/ml'lik tek başına endostatin uygulamasının kontrol grubuna oranla önemli ölçüde hücrelerde sitotoksik bir etki gösterdiği saptandı (***, $p < 0.0001$).

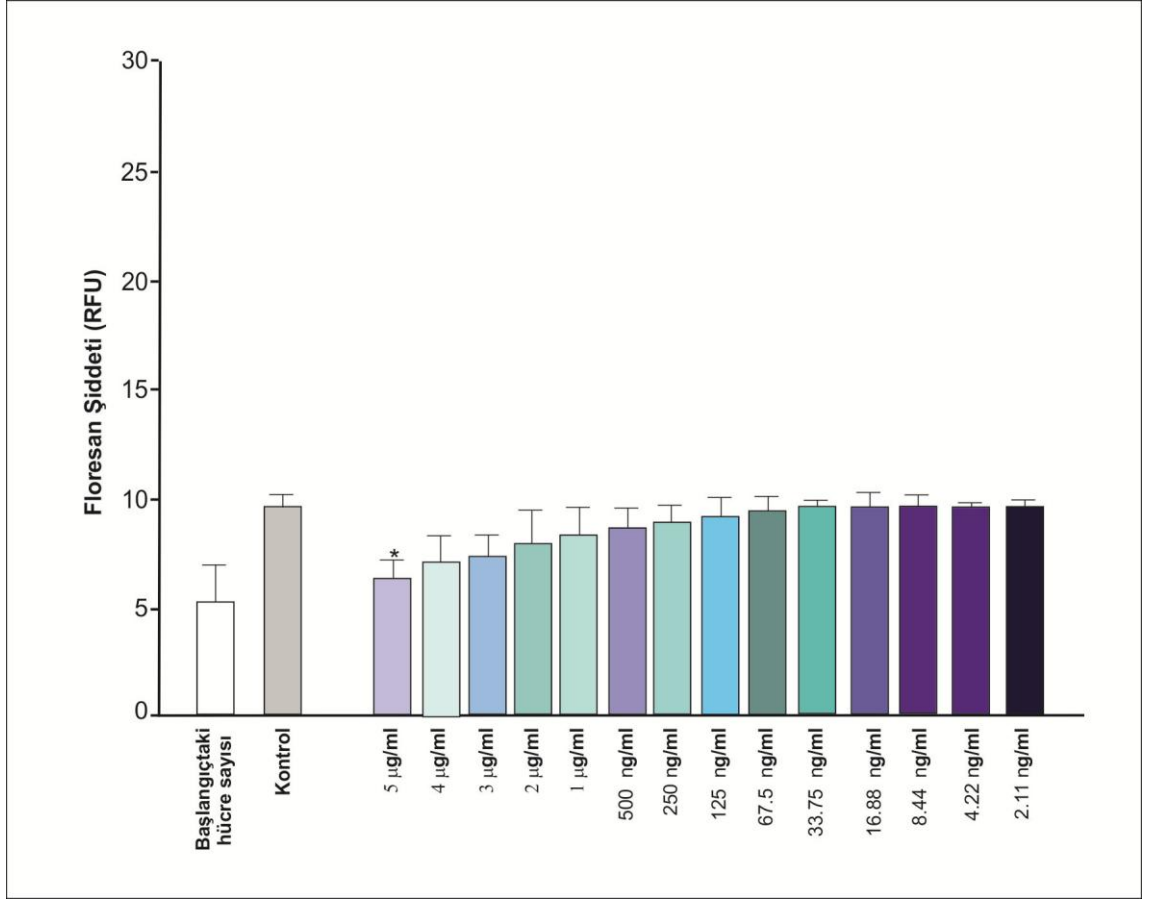
Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak hesaplanan hücre canlılığının yüzde değeri Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.16. Endostatinin 31.25ng/ml-5µg/ml arasında denenilen dozlarının, MDAMB 231 hücre hattında hücre canlılığına etkisi (%)

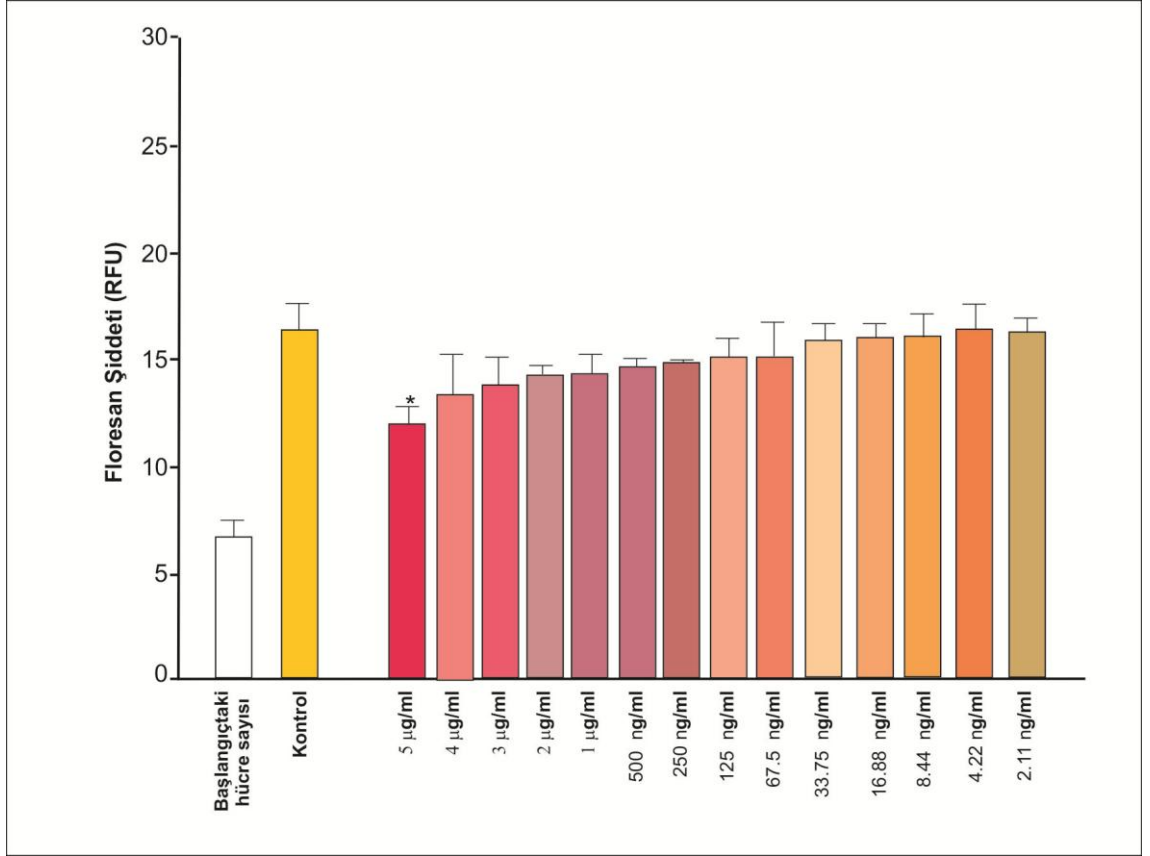
4.2.3. HUVEC hücre hattı

Yirmi dört, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, endostatinin; 3,90 ng/ml-1µg/ml aralığında denenilen dozlarının hiç biri, MDAMB 231 hücre hattı üzerinde sitotoksik etki göstermediği sonucundan yola çıkarak HUVEC hücre hattında denemeler 5µg/ml-31.25ng/ml arasındaki dozlarda yapıldı. Endostatinin tek başına HUVEC hücre canlılığı üzerindeki etkisi 24 (Şekil 4.17), 48 (Şekil 4.18) ve 72 saat (Şekil 4.19) olmak üzere grafiklenerek aşağıda gösterildi.



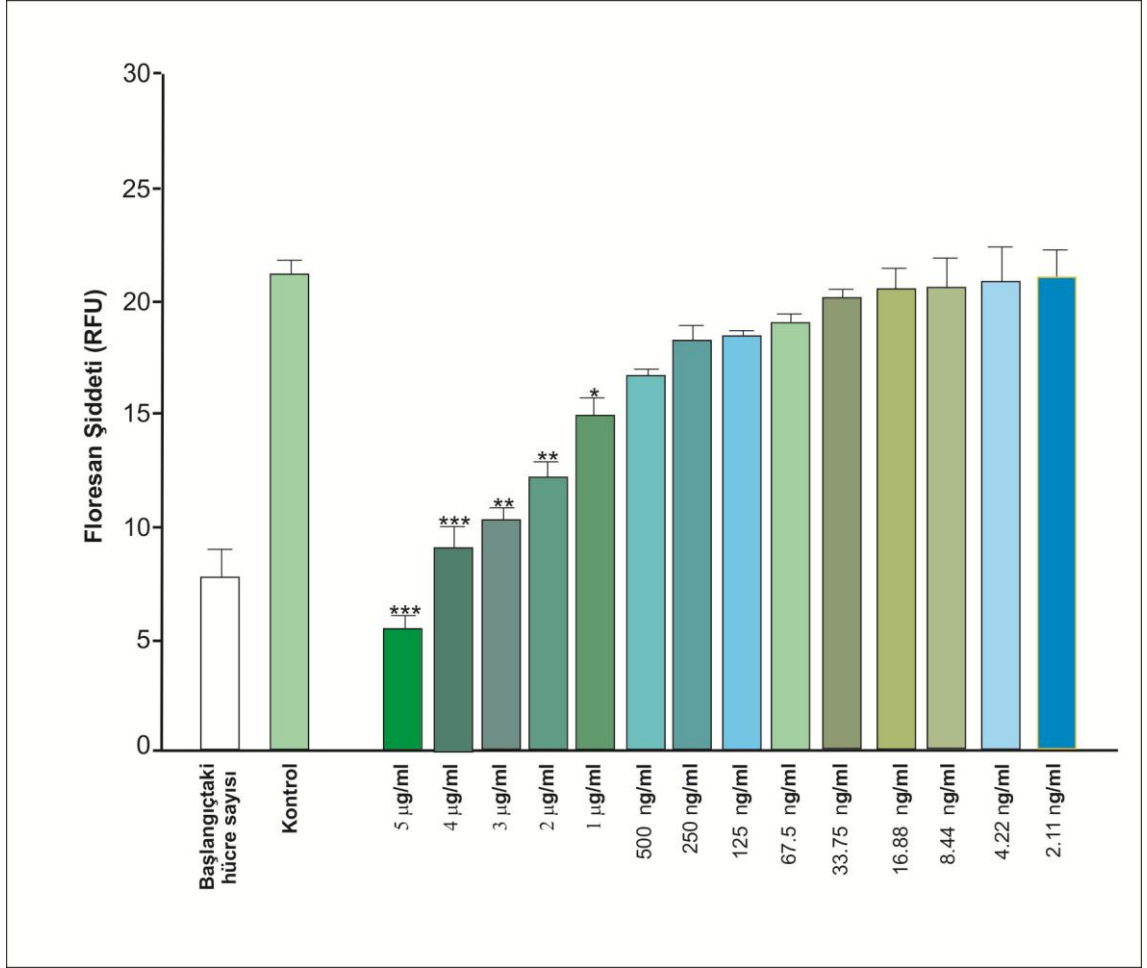
Şekil 4.17 Endostatinin 24 saatlik inkübasyon süresinde, HUVEC hücre hattı üzerine etkisi

Şekil 4.17’de de görüldüğü gibi, 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 5µg/ml’lik tek başına endostatin uygulamasının kontrol grubuna oranla hücrelerde sitotoksik bir etki gösterdiği saptandı (*, $p<0.05$).



Şekil 4.18 Endostatinin 48 saatlik inkübasyon süresinde, HUVEC hücre hattı üzerine etkisi

Şekil 4.18’de de görüldüğü gibi, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda 5µg/ml’lik tek başına endostatin uygulamasının kontrol grubuna oranla hücrelerde sitotoksik bir etki gösterdiği saptandı (*, $p<0.05$).



Şekil 4.19 Endostatinin 72 saatlik inkübasyon süresinde, HUVEC hücre hattı üzerine etkisi

Şekil 4.19’da da görüldüğü gibi, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 5 ve 4µg/ml’lik tek başına endostatin uygulamasının kontrol grubuna oranla önemli ölçüde hücrelerde sitotoksik bir etki gösterdiği saptandı (***, $p < 0.0001$).

4.3. Endostatin ve Vinorelbin Kombinasyonunun Hücre Hatları Üzerine Gösterdiği Sitotoksik Etki

4.3.1. 293 T hücre hattı

Yapılan doz tarama çalışmalarını takiben ilk aşamada belirlenmiş olan; 3,90 ng/ml-1µg/ml aralığında denenen dozlar, 96 kuyucuklu plak üzerinde 293 T hücre hatlarına, iki ilacın kombine edilmesi şeklinde 24,48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde uygulandı. 72 saat sonunda elde edilen değerler aşağıda gösterildi (Çizelge 4.1).

KONTROL	KONTROL	END 1 µg	END 500ng	END 250ng	END 125ng	END 62,5ng	END 31,25ng	END 15,62ng	END 7,81ng	END 3,90ng	END 1,95ng
1.607 ± 0.03	1.738 ± 0.04	1.587 ± 0.08	1.646 ± 0.11	1.553 ± 0.11	1.594 ± 0.10	1.665 ± 0.12	1.618 ± 0.07	1.633 ± 0.10	1.588 ± 0.12	1.625 ± 0.11	0.2472 ± 1.62
KONTROL	VİN 1 µg										
1.841 ± 0.04	1.339 ± 0.18	1.396 ± 0.20	1.356 ± 0.19	1.295 ± 0.19	1.368 ± 0.21	1.321 ± 0.18	1.381 ± 0.20	1.242 ± 0.22	1.227 ± 0.21	1.217 ± 0.20	1.207 ± 0.19
KONTROL	VİN 500ng										
1.689 ± 0.03	1.351 ± 0.19	1.095 ± 0.14	1.296 ± 0.18	1.218 ± 0.15	1.302 ± 0.18	1.279 ± 0.16	1.363 ± 0.18	1.277 ± 0.22	1.176 ± 0.14	1.235 ± 0.18	1.198 ± 0.17
KONTROL	VİN 250ng										
1.637 ± 0.05	1.405 ± 0.17	1.195 ± 0.17	1.276 ± 0.16	1.234 ± 0.20	1.386 ± 0.20	1.417 ± 0.23	1.381 ± 0.19	1.295 ± 0.21	1.233 ± 0.18	1.248 ± 0.19	1.151 ± 0.17
KONTROL	VİN 125ng										
1.864 ± 0.05	1.253 ± 0.16	1.216 ± 0.14	1.248 ± 0.16	1.197 ± 0.16	1.407 ± 0.19	1.308 ± 0.19	1.230 ± 0.15	1.214 ± 0.17	1.202 ± 0.14	1.223 ± 0.17	1.219 ± 0.16
KONTROL	VİN 62,5ng										
1.806 ± 0.04	1.426 ± 0.17	1.303 ± 0.16	1.260 ± 0.15	1.267 ± 0.16	1.295 ± 0.15	1.257 ± 0.15	1.307 ± 0.18	1.298 ± 0.18	1.301 ± 0.17	1.303 ± 0.18	1.269 ± 0.16
KONTROL	VİN 31,25ng										
1.658 ± 0.04	1.423 ± 0.19	1.269 ± 0.15	1.304 ± 0.16	1.240 ± 0.14	1.288 ± 0.15	1.241 ± 0.14	1.263 ± 0.16	1.212 ± 0.16	1.160 ± 0.12	1.178 ± 0.13	1.221 ± 0.16
KONTROL	VİN 15,62ng										
1.729 ± 0.03	1.543 ± 0.16	1.528 ± 0.16	1.447 ± 0.15	1.381 ± 0.15	1.560 ± 0.19	1.373 ± 0.16	1.453 ± 0.19	1.238 ± 0.18	1.317 ± 0.13	1.305 ± 0.13	1.292 ± 0.15

Çizelge 4.1. 293T hücre hattında endostatin (1µg/ml-1.95 ng/ml) ve vinorelbin (1µg/ml-15.62 ng/ml) kombinasyonunun 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 450nm'deki absorpsiyon (OD) değerleri

Çizelge 4.1'de verilen tabloda da görüldüğü gibi iki ilacın kombinasyonu sonucu elde edilen değerler ile ilaçların kendi kontrol değerleri kıyaslandığında herhangi bir etkileşim olmadı. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonucunda elde edilen tüm veriler birbirileri ile benzerlik göstermektedir.

Elde edilen veriler dahilinde, kombinasyon çalışması; vinorelbinin dozları değiştirilmeden, endostatinin doz taramasında sitotoksik açıdan etkili bulunduğu dozlar olan 5µg/ml-31.25ng/ml arasında değiştirilerek deneyler tekrarlandı. Bunun sonucunda elde edilen değerlerle oluşturulan tablo (Çizelge 4.2) aşağıda gösterildi.

KONTROL	KONTROL	END 5 µg	END 4 µg	END 3 µg	END 2 µg	END 1 µg	END 500 ng	END 250 ng	END 125 ng	END 62.5 ng	END 31.25 ng
1.685 ± 0.13	1.721 ± 0.02	1.542 ± 0.14	1.148 ± 0.27	1.355 ± 0.22	1.589 ± 0.21	1.723 ± 0.24	1.783 ± 0.18	1.747 ± 0.19	1.801 ± 0.23	1.797 ± 0.21	1.924 ± 0.26
KONTROL	VİN 1 µg										
1.748 ± 0.19	1.114 ± 0.05	1.657 ± 0.23	1.528 ± 0.18	1.204 ± 0.19	1.203 ± 0.19	1.478 ± 0.21	1.592 ± 0.21	1.672 ± 0.17	1.347 ± 0.21	1.489 ± 0.19	1.451 ± 0.23
KONTROL	VİN 500ng										
1.832 ± 0.15	1.239 ± 0.13	1.585 ± 0.16	1.105 ± 0.13	1.277 ± 0.19	1.456 ± 0.21	1.503 ± 0.24	1.489 ± 0.23	1.632 ± 0.18	1.289 ± 0.18	1.221 ± 0.16	1.348 ± 0.21
KONTROL	VİN 250ng										
1.698 ± 0.22	1.307 ± 0.32	1.397 ± 0.21	1.120 ± 0.20	1.320 ± 0.22	1.468 ± 0.27	1.523 ± 0.19	1.480 ± 0.17	1.467 ± 0.19	1.502 ± 0.22	1.289 ± 0.14	1.514 ± 0.20
KONTROL	VİN 125ng										
1.864 ± 0.17	1.322 ± 0.31	1.497 ± 0.24	1.137 ± 0.23	1.406 ± 0.20	1.587 ± 0.19	1.446 ± 0.14	1.517 ± 0.17	1.543 ± 0.21	1.476 ± 0.16	1.321 ± 0.21	1.872 ± 0.19
KONTROL	VİN 62,5ng										
1.525 ± 0.19	1.388 ± 0.21	1.489 ± 0.19	1.289 ± 0.22	1.582 ± 0.14	1.369 ± 0.25	1.490 ± 0.22	1.687 ± 0.15	1.505 ± 0.23	1.496 ± 0.19	1.528 ± 0.19	1.589 ± 0.15
KONTROL	VİN 31,25ng										
1.648 ± 0.21	1.403 ± 0.20	1.443 ± 0.25	1.334 ± 0.19	1.432 ± 0.20	1.597 ± 0.11	1.339 ± 0.19	1.690 ± 0.25	1.518 ± 0.12	1.692 ± 0.17	1.722 ± 0.27	1.498 ± 0.22
KONTROL	VİN 15,62ng										
1.734 ± 0.11	1.451 ± 0.25	1.724 ± 0.21	1.523 ± 0.19	1.534 ± 0.21	1.499 ± 0.22	1.534 ± 0.20	1.621 ± 0.19	1.432 ± 0.20	1.789 ± 0.18	1.675 ± 0.21	1.797 ± 0.23

Çizelge 4.2. 293T hücre hattında endostatin (5µg/ml-31.25 ng/ml) ve vinorelbin (1µg/ml-15.62 ng/ml) kombinasyonun 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 450nm'deki absorbands (OD) değerleri

4.3.2. MDA MB 231 hücre hattı

Yapılan doz tarama çalışmalarını takiben ilk aşamada belirlenmiş olan; 3,90 ng/ml-1µg/ml aralığında denenen dozlar, 96 kuyucuklu plak üzerinde MDAMB 231 hücre hattına, iki ilacın kombine edilmesi şeklinde 24,48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde uygulandı. 72 saat sonunda elde edilen değerler aşağıda gösterildi (Çizelge 4.3).

KONTROL	END 1 µg	END 500ng	END 250ng	END 125ng	END 62,5ng	END 31,25ng	END 15,62ng	END 7,81ng	END 3,90ngr	END 1,95ngr
1,738 ± 0.14	1,587 ± 0.10	1,646 ± 0.19	1,553 ± 0.11	1,594 ± 0.10	1,665 ± 0.12	1,618 ± 0.07	1,633 ± 0.10	1,588 ± 0.12	1,625 ± 0.11	1,472 ± 0.21
VİN 1 µg										
1,339 ± 0.18	1,396 ± 0.20	1,356 ± 0.19	1,295 ± 0.19	1,368 ± 0.21	1,321 ± 0.18	1,381 ± 0.20	1,242 ± 0.22	1,227 ± 0.21	1,217 ± 0.20	1,207 ± 0.19
VİN 500ng										
1,351 ± 0.19	1,095 ± 0.14	1,296 ± 0.18	1,218 ± 0.15	1,302 ± 0.18	1,279 ± 0.16	1,363 ± 0.18	1,277 ± 0.22	1,176 ± 0.14	1,235 ± 0.18	1,198 ± 0.17
VİN 250ng										
1,405 ± 0.17	1,195 ± 0.17	1,276 ± 0.16	1,234 ± 0.20	1,386 ± 0.20	1,417 ± 0.23	1,381 ± 0.19	1,295 ± 0.21	1,233 ± 0.18	1,248 ± 0.19	1,151 ± 0.17
VİN 125ng										
1,253 ± 0.16	1,216 ± 0.14	1,248 ± 0.16	1,197 ± 0.16	1,407 ± 0.19	1,308 ± 0.19	1,230 ± 0.15	1,214 ± 0.17	1,202 ± 0.14	1,223 ± 0.17	1,219 ± 0.16
VİN 62,5ng										
1,426 ± 0.17	1,303 ± 0.16	1,260 ± 0.15	1,267 ± 0.16	1,295 ± 0.15	1,257 ± 0.15	1,307 ± 0.18	1,298 ± 0.18	1,301 ± 0.17	1,303 ± 0.18	1,269 ± 0.16
VİN 31,25ng										
1,423 ± 0.19	1,269 ± 0.15	1,304 ± 0.16	1,240 ± 0.14	1,288 ± 0.15	1,241 ± 0.14	1,263 ± 0.16	1,212 ± 0.16	1,160 ± 0.12	1,178 ± 0.13	1,221 ± 0.16
VİN 15,62ng										
1,543 ± 0.16	1,528 ± 0.16	1,447 ± 0.15	1,381 ± 0.15	1,560 ± 0.19	1,373 ± 0.16	1,453 ± 0.19	1,238 ± 0.18	1,317 ± 0.13	1,305 ± 0.13	1,292 ± 0.15

Çizelge 4.3. MDAMB 231 hücre hattında endostatin (1µg/ml-1.95 ng/ml) ve vinorelbin (1µg/ml-15.62 ng/ml) kombinasyonunun 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 450nm'deki absorbans (OD) değerleri

Çizelge 4.3'te verilen tabloda da görüldüğü gibi iki ilacın kombinasyonu sonucu elde edilen değerler ile ilaçların kendi kontrol değerleri kıyaslandığında herhangi bir etkileşim olmadı. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonucunda elde edilen tüm veriler birbirileri ile benzerlik göstermektedir.

Elde edilen veriler dahilinde, kombinasyon çalışması; vinorelbinin dozları değiştirilmeden, endostatinin doz taramasında sitotoksik açıdan etkili bulunduğu dozlar olan 5µg/ml-31.25ng/ml arasında değiştirilerek deneyler tekrarlandı. Bunun sonucunda elde edilen değerlerle oluşturulan tablo (Çizelge 4.4) aşağıda gösterildi.

KONTROL	END 5 µg	END 4 µg	END 3 µg	END 2 µg	END 1 µg	END 500 ng	END 250 ng	END 125 ng	END 62.5 ng	END 31.25 ng
1.967 ± 0.23	1.632 ± 0.11	1.118 ± 0.47	1.305 ± 0.22	1.689 ± 0.26	1.723 ± 0.24	1.823 ± 0.17	1.847 ± 0.11	1.808 ± 0.26	1.897 ± 0.16	1.954 ± 0.24
VİN 1 µg										
1.223 ± 0.061	1.406 ± 0.20	0.927 ± 0.19	1.204 ± 0.19	1.203 ± 0.19	1.478 ± 0.21	1.599 ± 0.22	1.672 ± 0.17	1.347 ± 0.21	1.657 ± 0.23	1.451 ± 0.23
VİN 500ng										
1.442 ± 0.12	1.582 ± 0.14	1.105 ± 0.13	1.277 ± 0.19	1.221 ± 0.16	1.503 ± 0.24	1.489 ± 0.23	1.632 ± 0.18	1.289 ± 0.18	1.585 ± 0.16	1.348 ± 0.21
VİN 250ng										
1.583 ± 0.32	1.480 ± 0.17	1.120 ± 0.20	1.320 ± 0.22	1.289 ± 0.14	1.523 ± 0.19	1.432 ± 0.20	1.597 ± 0.11	1.339 ± 0.19	1.397 ± 0.21	1.514 ± 0.20
VİN 125ng										
1.594 ± 0.26	1.517 ± 0.17	1.137 ± 0.23	1.489 ± 0.19	1.321 ± 0.21	1.446 ± 0.14	1.456 ± 0.21	1.543 ± 0.21	1.476 ± 0.16	1.497 ± 0.24	1.872 ± 0.19
VİN 62,5ng										
1.790 ± 0.11	1.687 ± 0.15	1.289 ± 0.22	1.443 ± 0.25	1.369 ± 0.25	1.490 ± 0.22	1.468 ± 0.27	1.505 ± 0.23	1.496 ± 0.19	1.528 ± 0.19	1.589 ± 0.15
VİN 31,25ng										
1.823 ± 0.20	1.690 ± 0.25	1.334 ± 0.19	1.518 ± 0.12	1.467 ± 0.19	1.502 ± 0.22	1.587 ± 0.19	1.489 ± 0.19	1.692 ± 0.17	1.722 ± 0.27	1.498 ± 0.22
VİN 15,62ng										
1.880 ± 0.17	1.724 ± 0.21	1.523 ± 0.19	1.534 ± 0.21	1.499 ± 0.22	1.534 ± 0.20	1.621 ± 0.19	1.432 ± 0.20	1.789 ± 0.18	1.675 ± 0.21	1.797 ± 0.23

Çizelge 4.4. MDAMB 231 hücre hattında endostatin (5µg/ml-31.25 ng/ml) ve vinorelbin (1µg/ml-15.62 ng/ml) kombinasyonunun 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 450nm’deki absorbans (OD) değerleri

Yukarıda verilen tablodan da görülebileceği gibi endostatinin 4 µg/ml’ lik dozu ile vinorelbinin 1µg/ml ‘lik dozu ile oluşturulan kombinasyon, hücreler üzerinde en fazla sitotoksik etkiyi yarattığı için çalışmanın bundan sonraki bölümünde bu dozlar kullanıldı.

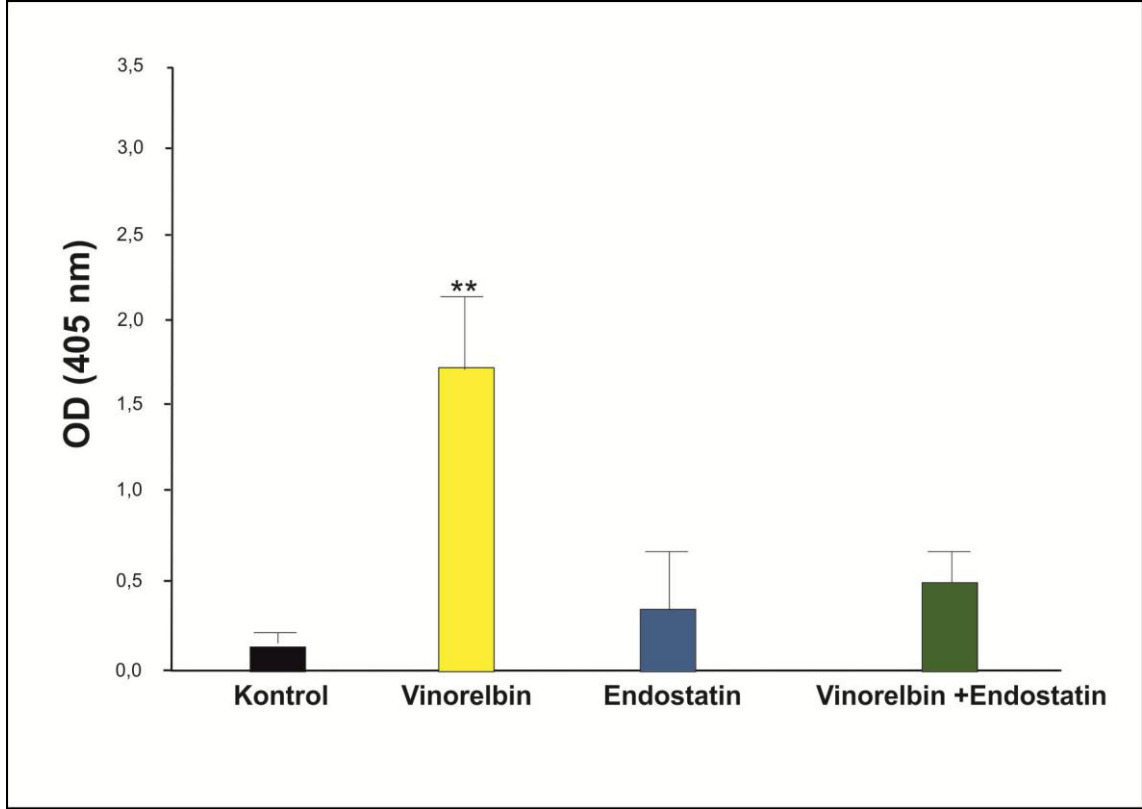
4.4. Endostatin, Vinorelbin ve Kombinasyonlarının; Hücrelerde Kaspaz-2, -3, -6, -8 ve -9 Enzimlerine Olan Etkisi

Kaspaz enzim aktivitesinin tayini için çalışılan hücre hatlarında her örnek için toplam protein miktarları, Bradford protein miktar kiti kullanılarak hesaplandı. Kaspaz enzim aktivitelerini belirleyebilmek için her kuyucuğa mikrolitrede 4 µg protein olacak şekilde pipetleme yapılarak örneklerdeki protein miktarları sabitlendi. Grafikler bu değer başlangıç kabul edilerek çizildi.

4.4.1. 293 T hücre hattı

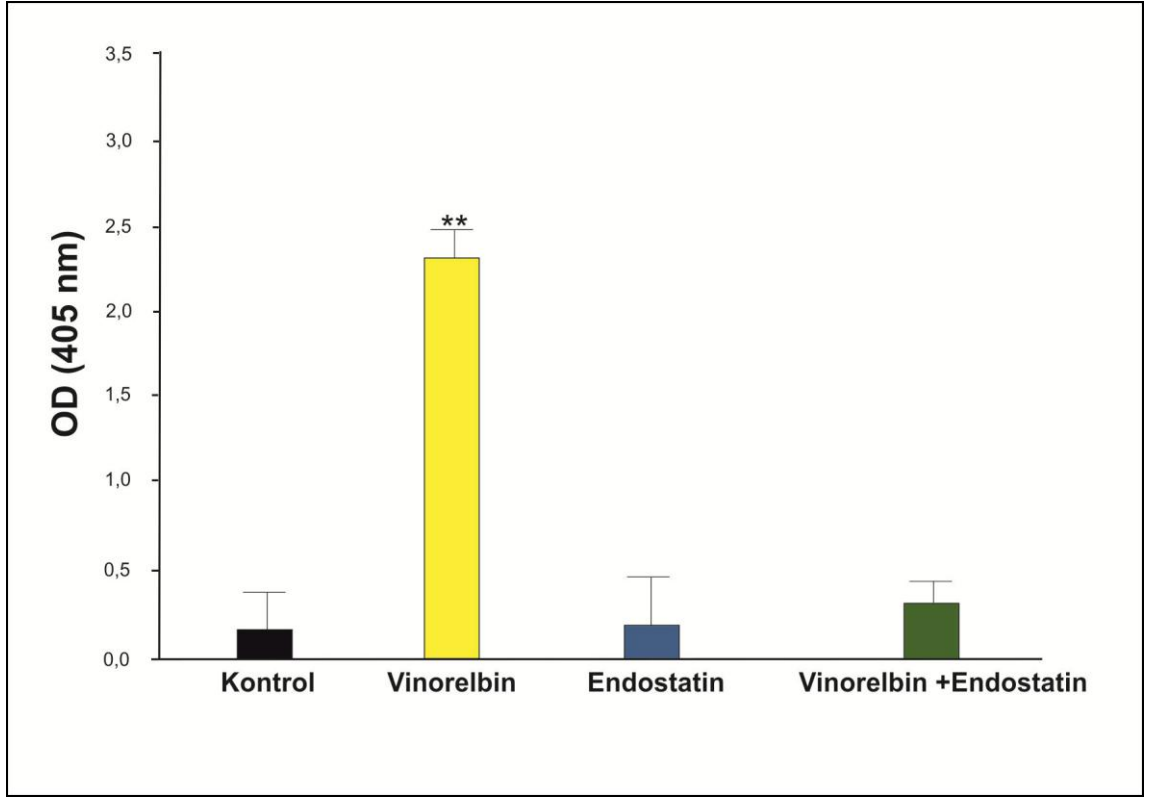
Yapılan doz tarama ve kombinasyon çalışmalarını takiben; endostatinin (4 µg/ml), vinorelbinin (1 µg/ml) ve her iki dozun endostatin ile vinorelbin kombinasyonunun

(4µg/ml+1 µg/ml), 239 T hücre hattı üzerinde kaspaz-2, -3, -6, -8 ve -9 enzim aktivitelerine bakıldı. 72 saatlik inkübasyon süresi ardından elde edilen değerler her bir protein için ayrı ayrı olmak üzere aşağıda grafiklerle gösterildi.



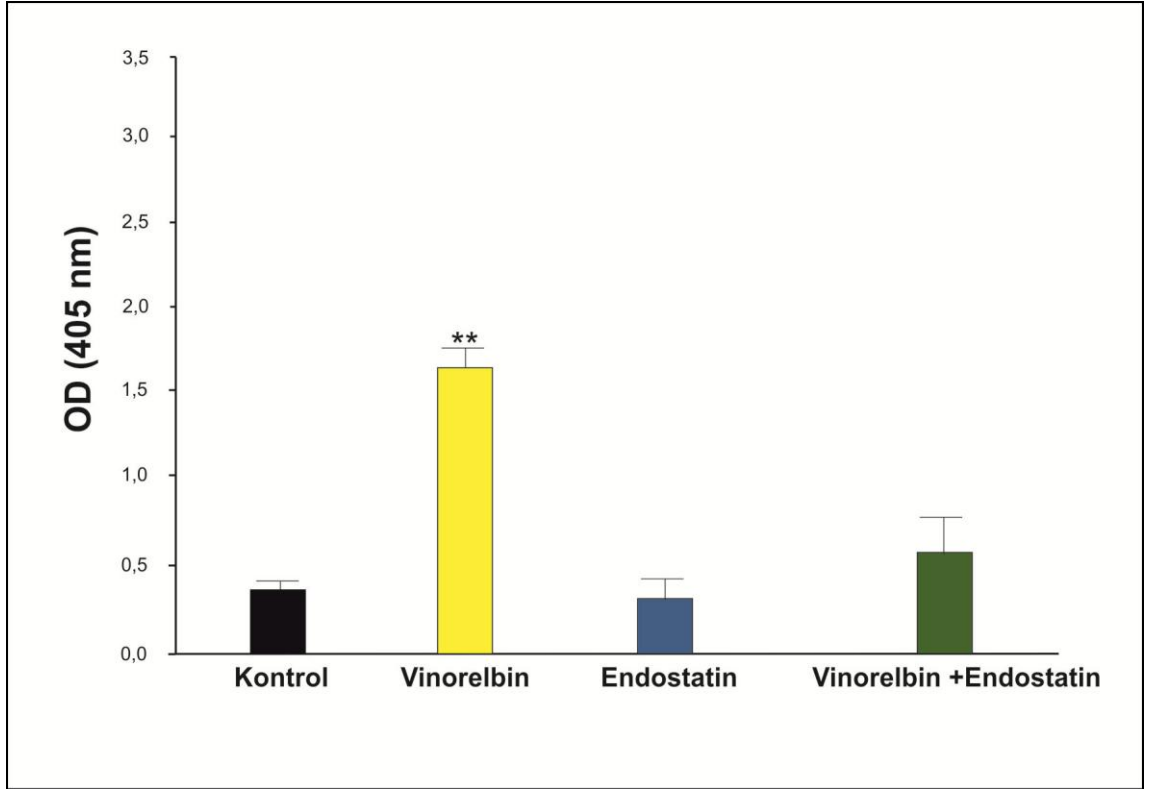
Şekil 4.20. 4 µg/ml total proteindeki kaspaz-2 enzim aktivitesinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 293 T hücrelerindeki etkinliği

Şekil 4.20'den de anlaşılacağı gibi; vinorelbinin 1 µg/ml'lik uygulanmasında kontrole kıyasla, kaspaz-2 enzim aktivitesi 4,90 kat arttı. Endostatinin tek başına 4 µg/ml'lik uygulamasında, kontrole kıyasla kaspaz-2 enzim aktivitesi 1,23 kat artarken iki ilacın kombinasyonunun (4µg/ml+1 µg/ml), kontrole kıyasla kaspaz-2 enzim aktivitesinin 1,93 kat artmış olduğu görüldü (**, p<0.01).



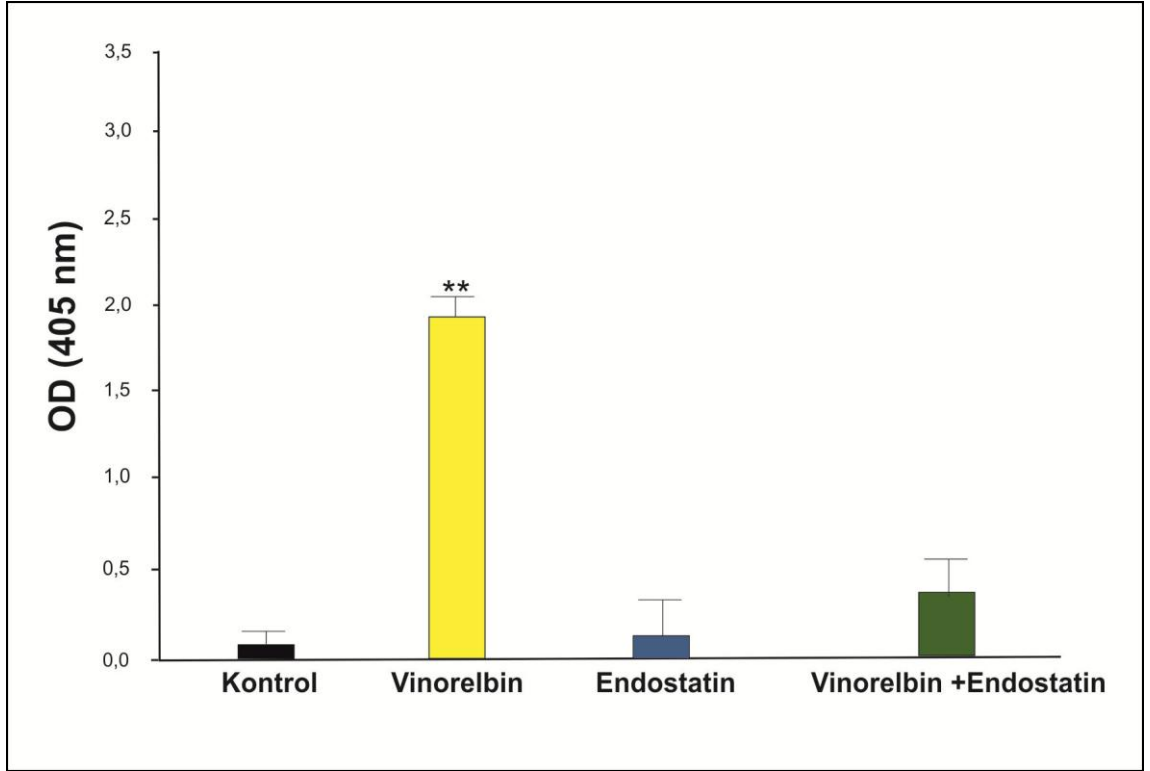
Şekil 4.21. 4 µg/ml total proteindeki kaspaz-3 enzim aktivitesinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 293 T hücrelerindeki etkinliği

Şekil 4.21'den de anlaşılacağı gibi; vinorelbinin 1 µg/ml'lik uygulanmasında kontrole kıyasla, kaspaz -3 enzim aktivitesi 15,77 kat arttı. Endostatinin tek başına 4 µg/ml'lik uygulamasında, kontrole kıyasla kaspaz -3 enzim aktivitesi 1,29 kat artarken iki ilacın kombinasyonunun (4µg/ml+1 µg/ml), kontrole kıyasla kaspaz-3 enzim aktivitesinin 2,68 kat artmış olduğu görüldü (**, p<0.01).



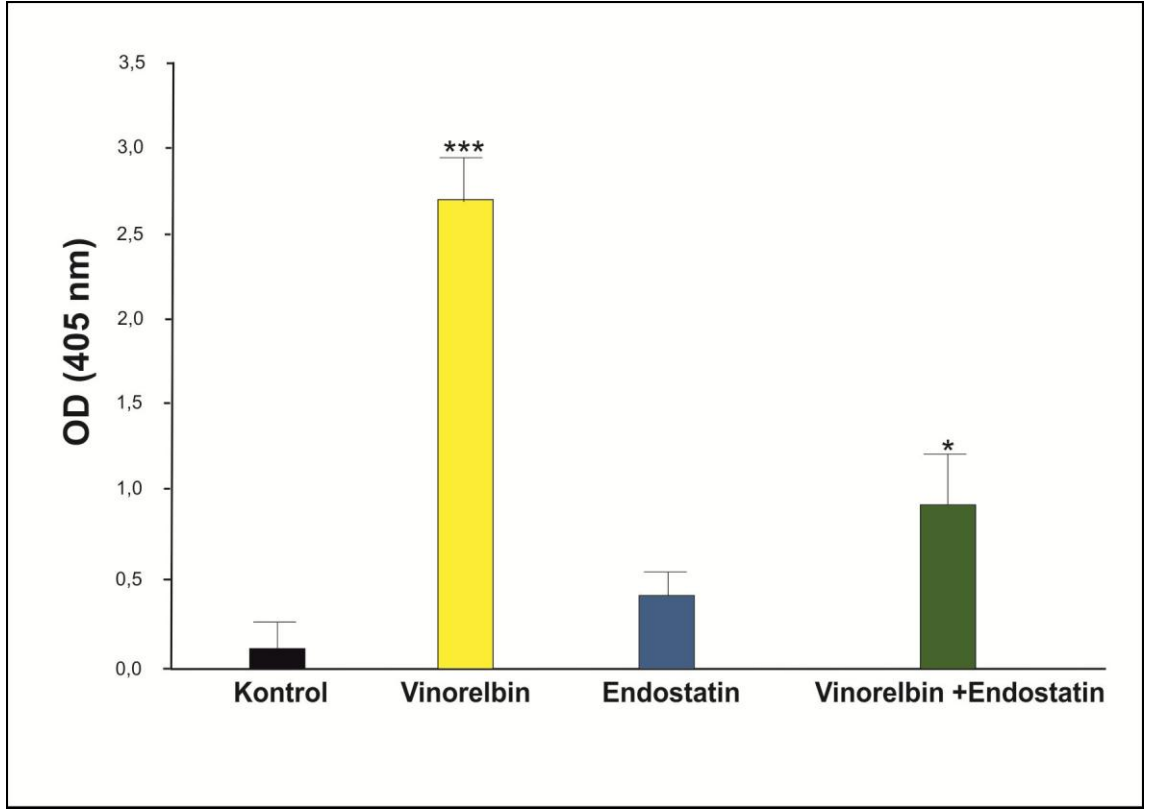
Şekil 4.22. 4 µg/ml total proteindeki kaspaz-6 enzim aktivitesinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 293 T hücrelerindeki etkinliği

Şekil 4.22'den de anlaşılacağı gibi; vinorelbinin 1 µg/ml'lik uygulanmasının kontrole kıyasla, kaspaz-6 enzim aktivitesi 5,65 kat arttı. Endostatinin tek başına 4 µg/ml'lik uygulamasında, kontrole kıyasla kaspaz -6 enzim aktivitesi 1,14 kat artarken iki ilacın kombinasyonunun (4µg/ml+1 µg/ml), kontrole kıyasla kaspaz-6 enzim aktivitesinin 2,06 kat artmış olduğu görüldü (**, p<0.01).



Şekil 4.23. 4 µg/ml total proteindeki kaspaz-8 enzim aktivitesinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 293 T hücrelerindeki etkinliği

Şekil 4.23'den de anlaşılacağı gibi; vinorelbinin 1 µg/ml'lik uygulanmasının kontrole kıyasla, kaspaz -8 enzim aktivitesi 16,37 kat arttı. Endostatinin tek başına 4 µg/ml'lik uygulamasında, kontrole kıyasla kaspaz -8 enzim aktivitesi 1,48 kat artarken iki ilacın kombinasyonunun (4µg/ml+1 µg/ml), kontrole kıyasla kaspaz-8 enzim aktivitesinin 2,50 kat artmış olduğu görüldü (**, p<0.01).

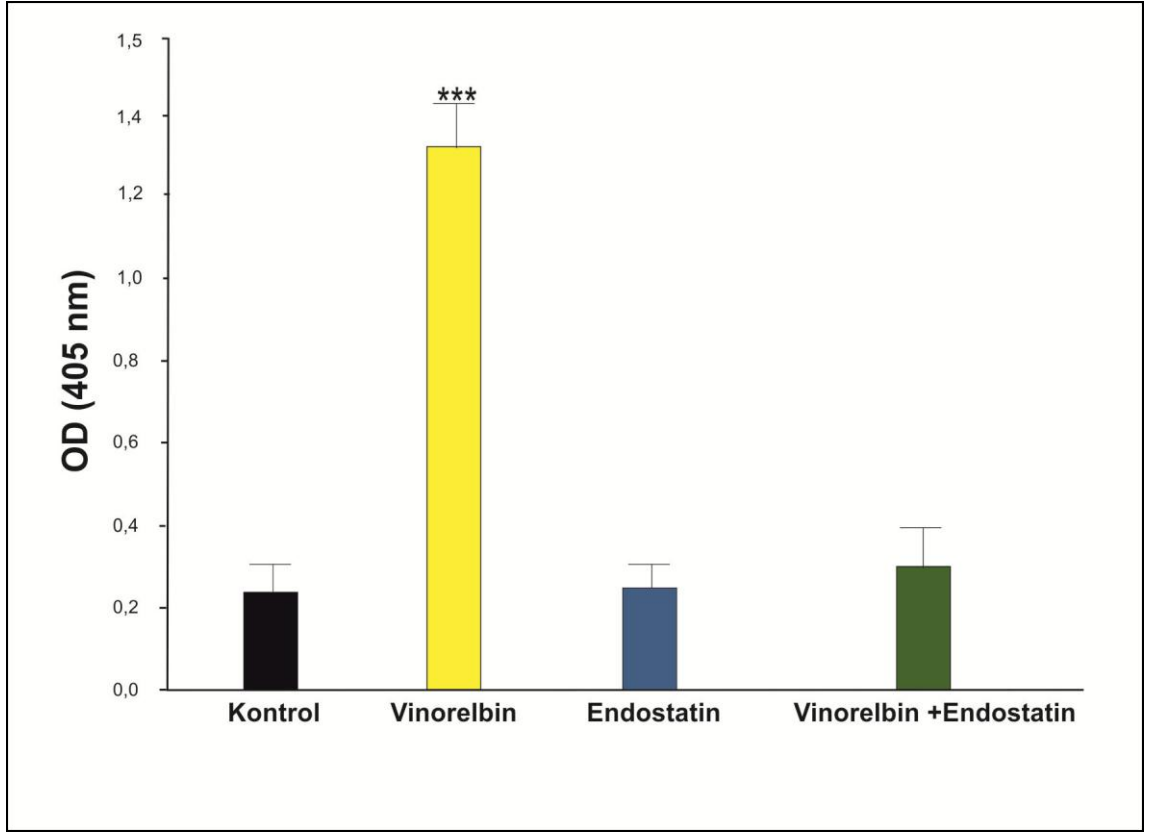


Şekil 4.24. 4 µg/ml total proteindeki kaspaz-9 enzim aktivitesinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 293 T hücrelerindeki etkinliği

Şekil 4.24'ten de anlaşılacağı gibi; vinorelbinin 1 µg/ml'lik uygulanmasının kontrole kıyasla, kaspaz -9 enzim aktivitesi 15,72 kat arttı. Endostatinin tek başına 4 µg/ml'lik uygulamasında, kontrole kıyasla kaspaz -9 enzim aktivitesi 2,66 kat artarken iki ilacın kombinasyonunun (4µg/ml+1 µg/ml), kontrole kıyasla kaspaz -9 enzim aktivitesinin 5,15 kat artmış olduğu görüldü (*, $p<0.05$ - ***, $p<0.001$).

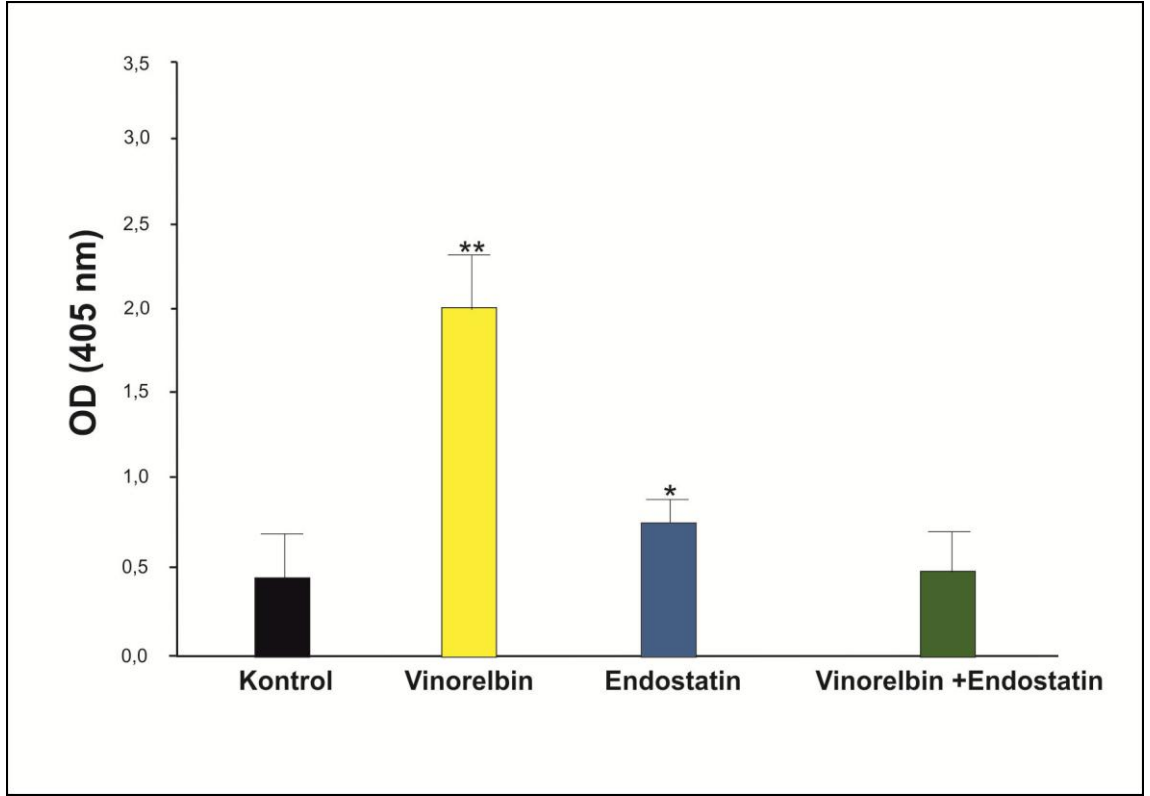
4.4.2. MDAMB 231 hücre hattı

Yapılan doz tarama ve kombinasyon çalışmalarını takiben; endostatinin (4 µg/ml), vinorelbinin (1 µg/ml) ve her iki dozun endostatin ile vinorelbin kombinasyonunun (4µg/ml+1 µg/ml), MDAMB 231 hücre hattı üzerinde kaspaz-2, -3, -6, -8 ve -9 enzimlerinin aktivitesine bakıldı. 72 saatlik inkübasyon süresi ardından elde edilen değerler her bir protein için ayrı ayrı olmak üzere aşağıda grafiklerle gösterildi.



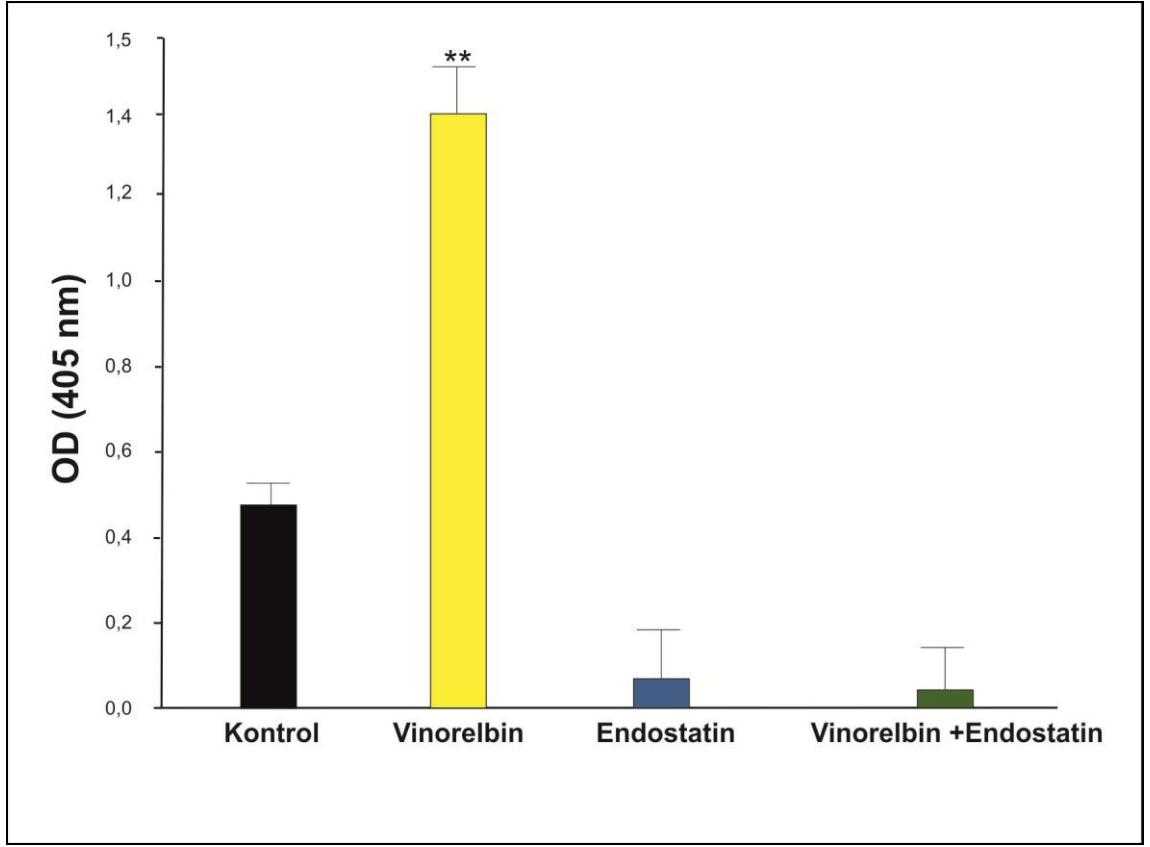
Şekil 4.25. 4 µg/ml total proteindeki kaspaz-2 enzim aktivitesinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda MDAMB 231 hücrelerindeki etkinliği

Şekil 4.25'ten de anlaşılacağı gibi; vinorelbinin 1 µg/ml'lik uygulanmasında kontrole kıyasla, kaspaz-2 enzim aktivitesi 5,99 kat arttı. Endostatinin tek başına 4 µg/ml'lik uygulamasında, kontrole kıyasla kaspaz -2 enzim aktivitesi 1,23 kat artarken iki ilacın kombinasyonunun (4µg/ml+1 µg/ml), kontrole kıyasla kaspaz-2 enzim aktivitesinin 1,45 kat artmış olduğu görüldü (***, $p<0.001$).



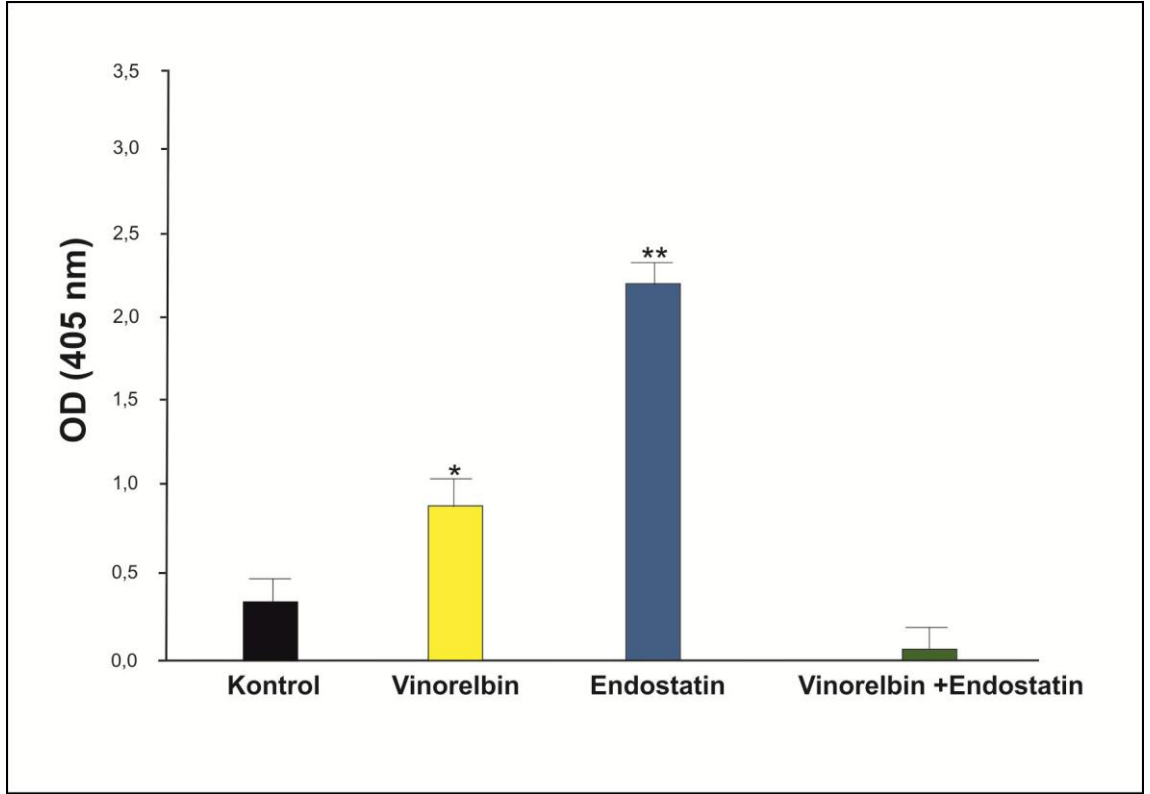
Şekil 4.26. 4 µg/ml total proteindeki kaspaz-3 enzim aktivitesinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda MDAMB 231 hücrelerindeki etkinliği

Şekil 4.26'dan da anlaşılacağı gibi; vinorelbinin 1 µg/ml'lik uygulanmasının kontrole kıyasla, kaspaz-3 enzim aktivitesi 6,63 kat arttı. Endostatinin tek başına 4 µg/ml'lik uygulamasında, kontrole kıyasla kaspaz -3 enzim aktivitesi 1,96 kat artarken iki ilacın kombinasyonunun (4µg/ml+1 µg/ml), kontrole kıyasla kaspaz-3 enzim aktivitesinin 1,34 kat artmış olduğu görüldü (*, $p<0.05$ - **, $p<0.01$).



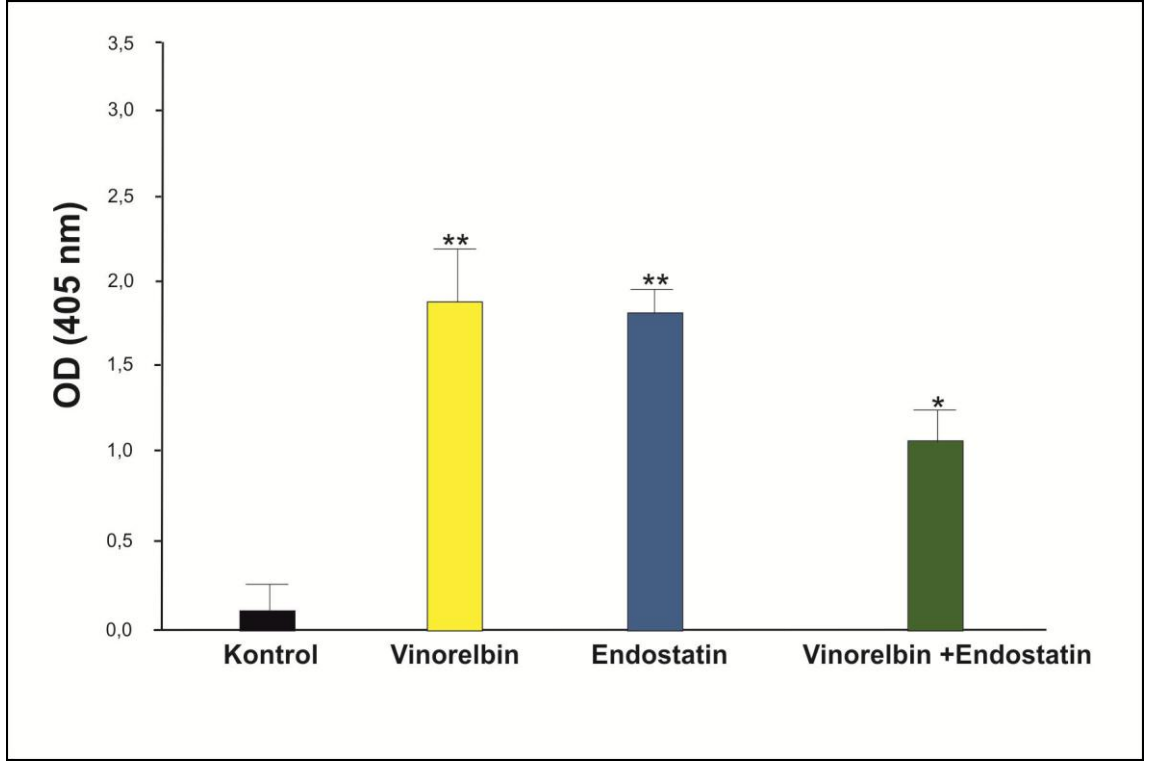
Şekil 4.27. 4 µg/ml total proteindeki kaspaz-6 enzim aktivitesinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda MDAMB 231 hücrelerindeki etkinliği

Şekil 4.27'den de anlaşılacağı gibi; vinorelbinin 1 µg/ml'lik uygulanmasında kontrole kıyasla, kaspaz-6 enzim aktivitesi 3,02 kat arttı. Endostatinin tek başına 4 µg/ml'lik uygulamasında, kontrole kıyasla kaspaz-6 enzim aktivitesi 0,36 kat artarken iki ilacın kombinasyonunun (4µg/ml+1 µg/ml), kontrole kıyasla kaspaz-6 enzim aktivitesinin 0,14 kat artmış olduğu görüldü (**, p<0.01).



Şekil 4.28. 4 µg/ml total proteindeki kaspaz-8 enzim aktivitesinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda MDAMB 231 hücrelerindeki etkinliği

Şekil 4.28'den de anlaşılacağı gibi; vinorelbinin 1 µg/ml'lik uygulanmasında kontrole kıyasla, kaspaz-8 enzim aktivitesi 1,68 kat arttı. Endostatinin tek başına 4 µg/ml'lik uygulamasında, kontrole kıyasla kaspaz-8 enzim aktivitesi 3,34 kat artarken iki ilacın kombinasyonunun (4µg/ml+1 µg/ml), kontrole kıyasla kaspaz-8 enzim aktivitesinin 0,2 kat artmış olduğu görüldü (*, $p<0.05$ - **, $p<0.001$).



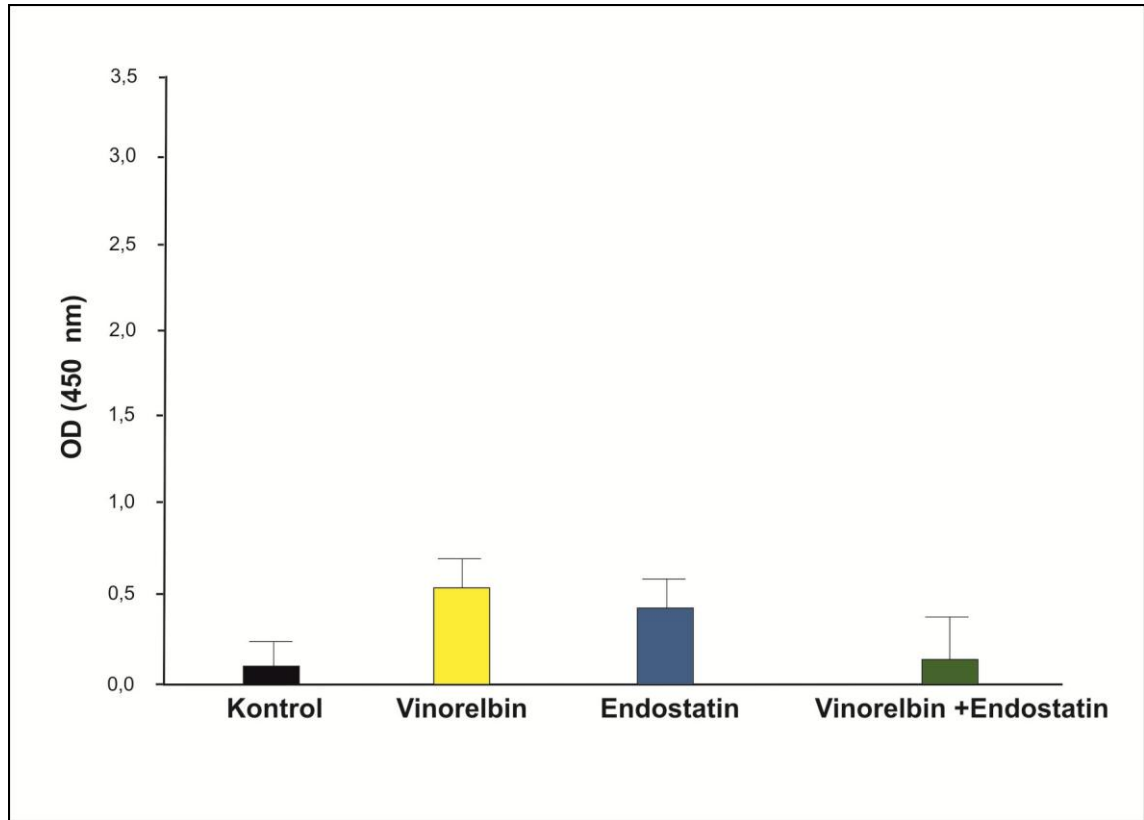
Şekil 4.29. 4 µg/ml total proteindeki kaspaz-9 enzim aktivitesinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda MDAMB 231 hücrelerindeki etkinliği

Şekil 4.29'dan da anlaşılacağı gibi vinorelbinin 1 µg/ml'lik uygulanmasında kontrole kıyasla, kaspaz-9 enzim aktivitesi 18 kat arttı. Endostatinin tek başına 4 µg/ml'lik uygulamasında, kontrole kıyasla kaspaz -9 enzim aktivitesi 16 kat artarken iki ilacın kombinasyonunun (4µg/ml+1 µg/ml), kontrole kıyasla kaspaz-9 enzim aktivitesinin 10,95 kat artmış olduğu görüldü (*, $p<0.05$ - **, $p<0.01$).

4.5. Endostatin, Vinorelbin ve Kombinasyonlarının; Hücrelerde TNF- α Üzerine Etkisi

4.5.1. 293 T Hücre hattı

Yapılan doz tarama ve kombinasyon çalışmalarını takiben; endostatinin (4 $\mu\text{g/ml}$), vinorelbinin (1 $\mu\text{g/ml}$) ve her iki dozun endostatin ile vinorelbin kombinasyonunun (4 $\mu\text{g/ml}$ +1 $\mu\text{g/ml}$), 293 T hücre hattında TNF- α proteini üzerine olan etkinliğine bakıldı. 72 saatlik inkübasyon süresi ardından elde edilen değerler aşağıda grafik ile (şekil 4.30) gösterildi.



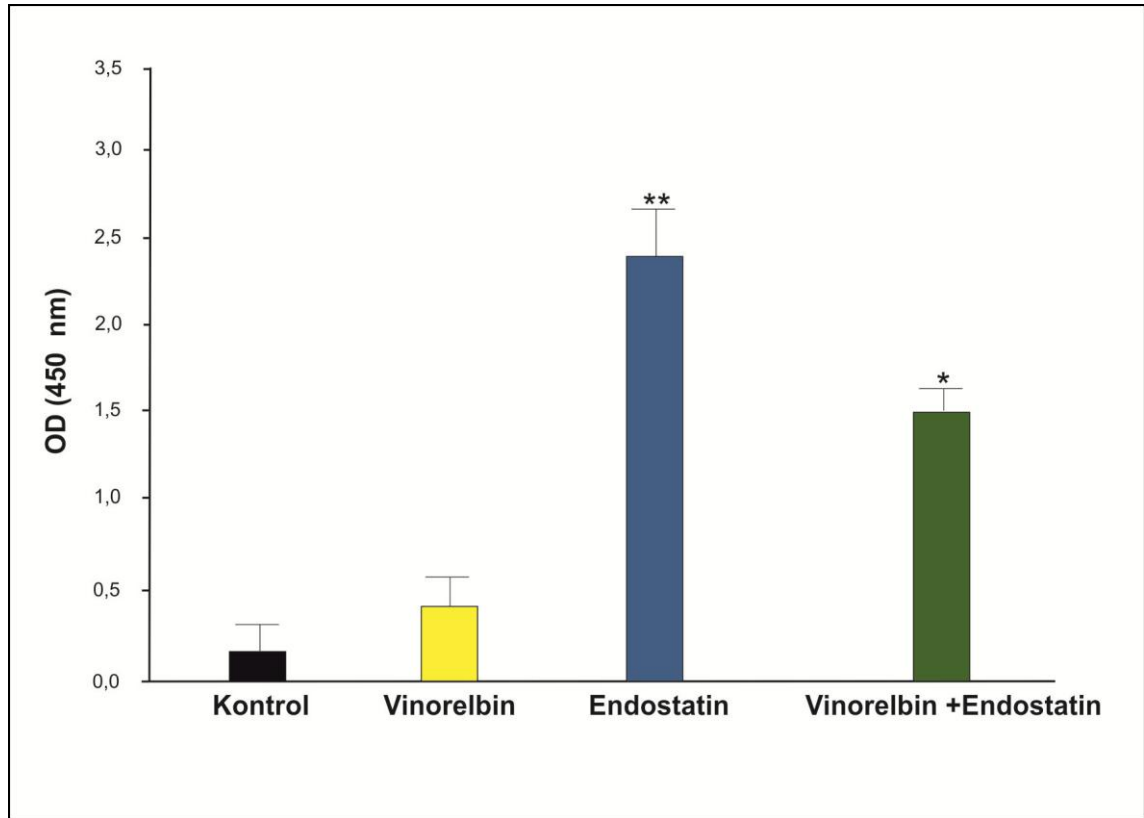
Şekil 4.30. 10⁶ hücre/ml'deki TNF- α proteinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 293 T hücre hattı üzerinde etkinliği

Şekil 4.30'dan da anlaşılacağı gibi; vinorelbinin 1 $\mu\text{g/ml}$ 'lik uygulanmasında kontrole kıyasla, TNF- α miktarı 2,45 kat arttı. Endostatinin tek başına 4 $\mu\text{g/ml}$ 'lik uygulamasında, kontrole kıyasla TNF- α miktarı 0,346 kat artarken iki ilacın

kombinasyonunun (4µg/ml+1 µg/ml), kontrole kıyasla TNF-α miktarının 1,04 kat artmış olduğu görüldü.

4.5.2. MDAMB 231 Hücre hattı

Yapılan doz tarama ve kombinasyon çalışmalarını takiben; endostatinin (4 µg/ml), vinorelbinin (1 µg/ml) ve her iki dozun endostatin ile vinorelbin kombinasyonunun (4µg/ml+1 µg/ml), MDAMB 231 hücre hattında TNF-α proteini üzerine olan etkinliğine bakıldı. 72 saatlik inkübasyon süresi ardından elde edilen değerler aşağıda grafik ile (Şekil 4.31) gösterildi.

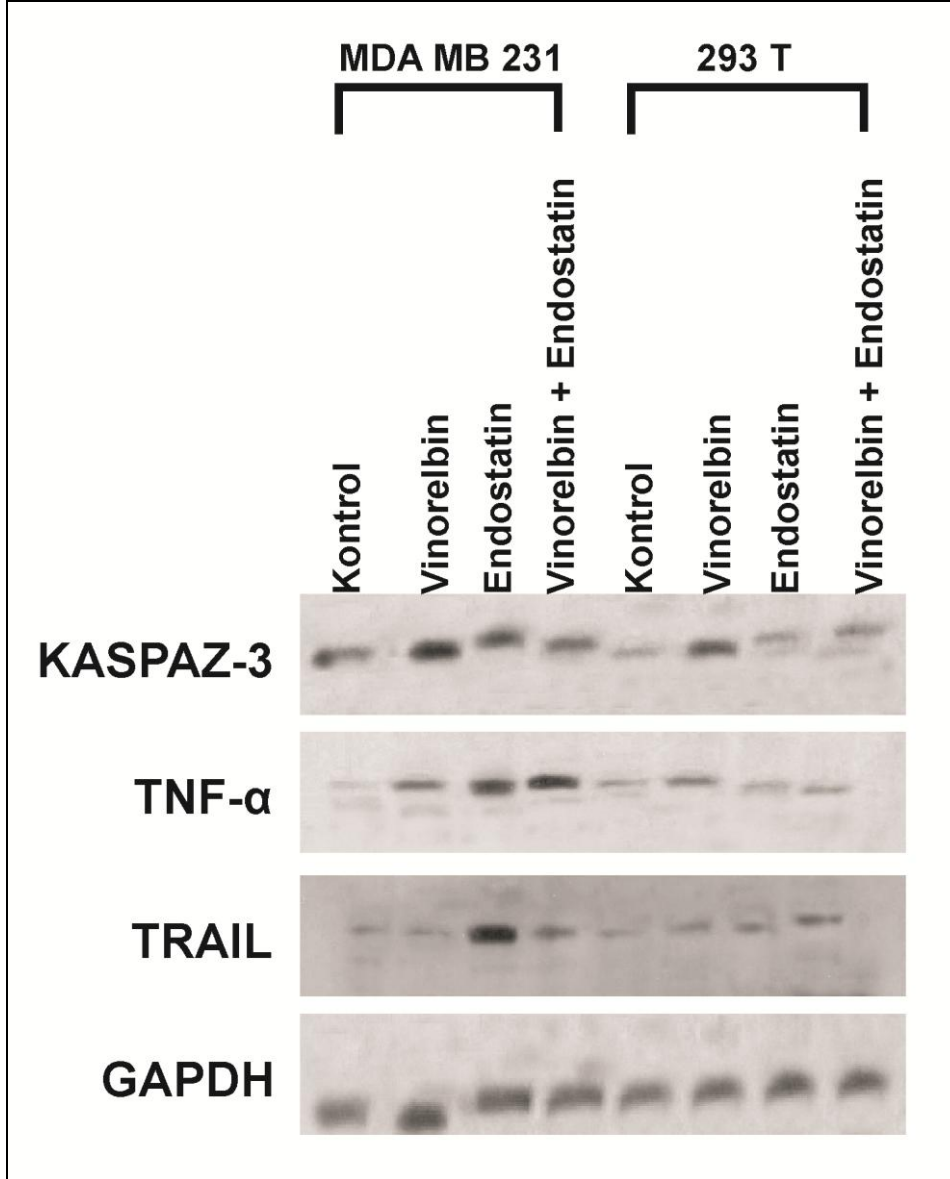


Şekil 4.31. 10⁶ hücre/ml'deki TNF-α proteinin, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda MDAMB 231 hücre hattı üzerinde etkinliği

Şekil 4.31'den de anlaşılacağı gibi; vinorelbinin 1 µg/ml'lik uygulanmasında kontrole kıyasla, TNF-α miktarı 4,99 kat arttı. Endostatinin tek başına 4 µg/ml'lik uygulamasında, kontrole kıyasla TNF-α miktarı 25,55 kat artarken iki ilacın

kombinasyonunun (4µg/ml+1 µg/ml), kontrole kıyasla TNF-α miktarı 17,5 kat artmış olduğu görüldü (*, p<0.05 - **, p<0.01).

4.6. Endostatin, Vinorelbin ve Komybinasyonlarının Western-Blot Sonuçları



Şekil 4.32. Vinorelbin ve endostatinin tek başına ve kombine olarak Kaspaz-3, TNF-α, TRAIL miktarları üzerine etkilerinin western-blot ile gösterilmesi

Şekil 4.32'deki görüntülemelerden de anlaşılacağı gibi MDAMB 231 hücrelerinde, TRAIL protein miktarı endostatin uygulamasında artarken, TNF- α protein miktarının hem endostatin hem de endostatin ve vinorelbin kombinasyonunda artmış olduğu gözlemlendi. Kaspaz-3 protein miktarı en fazla vinorelbinde artarken, endostatin ve iki ilacın kombinasyonu uygulamalarında da kontrole kıyasla artış olduğu gözlemlendi. 293T hücre hattında ise kontrole kıyasla, kaspaz-3 proteini dışında ölçümü yapılan hiçbir protein tipinde önemli sayılabilecek bir artış olmadığı gözlemlendi. GAPDH proteini bu test için tüm grupların kontrolü olarak kullanıldı.

5. TARTIŞMA

Özellikle akciğer ve meme kanserinin tedavisinde kullanılan yarısentetik bir vinka alkaloit olan vinorelbin, tübülün polimerizasyonunu inhibe ederek hücre döngüsünü G2/M fazında durdurmaktadır. Bu sayede interfaz evresindeki hücrenin ölümüne neden olmaktadır (Aapro ve Finek 2011). Tek başına kullanılan vinorelbin, son yıllarda özellikle meme kanserinde sergilediği başarılı antikanser etkileri ve daha az toksik yan etkiler yaratması sayesinde dikkat çeken kemoterapötik ajanlar arasında yer almaktadır (Zeybek vd 2011).

Yapılan birçok çalışmada vinorelbinin *in vitro* ve *in vivo* antikanser etkisi gösterilmiştir. Vinorelbin, diğer vinka alkaloidlere oranla hücrede daha az toksik yanıt oluşturduğu için kombine tedavilerde başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır (Johnson vd 1996). Çalışmamızda öncelikle vinorelbinin 293 T insan böbrek epitel hücreleri üzerine göstereceği olası etkiler değerlendirilmiştir. Vinorelbinin 293 T hücreleri üzerinde sergilediği sitotoksik etkilerin doz ve zamana bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir. Yirmi dört saatlik inkübasyon süresi sonunda, 3,90 ng/ml-1µg/ml aralığında denenen dozların hiç birinde 293 T hücre hattı üzerinde sitotoksik etki göstermezken 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda, denenen tüm dozlar, 293 T hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azaltmıştır. 1µg/ml vinorelbin uygulanan hücrelerde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda hücre canlılığı sırasıyla %74, %53 ve % 42 olarak hesaplanmıştır. Yirmi dört saatlik inkübasyon süreleri sonunda 1µg/ml vinorelbin uygulanan MDAMB 231 hücrelerinde canlılık %44 olarak hesaplanmıştır. 72 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda, denenen tüm dozlar, bu hücrelerin canlılığını önemli ölçüde azaltmıştır.

Bazal membrana ait kollajen XVIII'in internal bir fragmenti olan endostatin son yıllarda potansiyel bir antianjiogenik ajan olarak kabul edilmektedir. 1971 yılında keşfedilen bu peptit ile ilgili o yıllardan bu yana pek çok araştırma yapılmış olsada endostatin etki mekanizması tam anlamıyla aydınlatılabilmemiş değildir. Yapılan pek çok çalışmada endostatinin anti-tümoral etkisi *in vivo* gösterilse de, *in vitro* koşullarda tümör

hücrelerinde sitotoksik etki yaratmadığı genel geçer bir teori olarak pek çok bilim adamı tarafından kabul edilmekte ve desteklenmektedir.

Endostatin anti anjiogenik bir peptit olduğu için doğrudan hedefleri arasında tümör hücreleri değil tümör için yeni damar oluşumunu sağlayacak olan endoteller yer almaktadır (Shichiri ve Hirata 2001). Endostatinin neden endotel hücrelere spesifik olduğu, başka bir deyişle kanser hücrelerinde neden sitotoksik bir yanıt oluşturmadığı henüz aydınlatılamamıştır.

Yapılan birçok çalışmada endostatinin *in vitro* ve *in vivo* aktivitesi, bifazik doz yanıt eğrisi ile gösterilmektedir. Endostatinin anti-tümoral etkisi düşük dozlarda ve uzun süreli uygulamalarda ortaya çıkmaktadır. Belirli bir doz aralığında tümör hücrelerinde inhibisyon sağlayan peptit, eşik değerin üstünde hiçbir etki yaratmamaktadır. Bu bilgi ışığında çalışmamızda endostatinin 293 T, MDAMB 231 ve HUVEC hücreleri üzerine göstereceği olası etkiler, öncelikle düşük dozlarda, olabildiğince uzun inkübasyon sürelerinde değerlendirilmiştir.

Endostatin tüm hücrelerde 3,90 ng/ml-1 g/ml doz aralığında, tek başına ve vinorelbin ile birlikte kullanılmıştır. Endostatin hiçbir inkübasyon süresinde, bu doz aralığında, 293 T hücrelerinde istatistiksel açıdan önemli kabul edilebilecek sitotoksik etkiler sergilememiştir. Endostatinin en yüksek dozu olan 1 g/ml'nin uygulandığı hücrelerde 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığını % 89,8 olarak hesaplanmıştır. 48 ve 72 saatlik periyotların sonunda ise 293 T hücrelerinde hesaplanan canlılık oranı sırasıyla % 92,6 ve % 94,7 olarak saptanmıştır. Benzer şekilde, endostatin MDAMB 231 hücrelerinde hiçbir dozda ve inkübasyon süresinde sitotoksik etkiye neden olmamıştır.

Her iki hücre hattında da elde edilen bulgular, endostatinin bu hücrelerde de bifazik doz-yanıt eğrisi oluşumuna neden olduğunu düşündürmektedir. Yukarıda da belirtildiği gibi endostatin etkisi doz ve zamana hassas şekilde bağlıdır. Her ne kadar endostatin olabildiğince düşük konsantrasyonlarda kullanılmak istense de elde edilen bulgular endostatin konsantrasyonunun değiştirilmesi gerektiğini göstermektedir. Bu nedenle

5µg/ml ve 31.25ng/ml arasında, yarı yarıya dilüsyon ile hazırlanan yeni dozlarda endostatinin etkisi tekrar araştırılmıştır.

Endostatin 5µg/ml-31.25ng/ml arasında denenen dozların hiçbirinin 24,48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda kontrol grubuna oranla 293 T hücrelerinde sitotoksik bir etki göstermediği saptanmıştır. Ancak, MDAMB 231 hücre hattı için 24,48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda endostatinin en yüksek üç dozda hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir.

Endostatinin insan umbilikal damar endotel hücreleri (HUVEC) üzerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda sadece 5µg/ml'lik dozu hücrelerde sitotoksik bir etki göstermiştir. 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 5 ve 4µg/ml'lik endostatin uygulamasının hücrelerde önemli sitotoksik etkiler gösterdiği saptandı. Endostatin HUVEC hücrelerinde zamana bağlı olarak sitotoksik etkilere yol açmıştır.

Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada, Endostatin'in *in vitro* koşullarda tümör hücrelerinin proliferasyonu üzerine herhangi bir etki yaratmadığı belirtilmiştir. Jing ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada endostatinin kolon kanser (CD26) ve damar endotel hücrelerinin (HUVEC) proliferasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Endostatin geni CD26 hücrelerine klonlanmış, endostatin ekspre eden CD26 hücrelerinin büyümesinde dört gün sonunda bile bir inhibisyon saptanamamıştır. Endostatin geninin klonlandığı CD 26 kolon kanser hücrelerinin büyütüldüğü besiyeri toplanıp HUVEC hücreleri üzerine eklenmiş ve HUVEC hücrelerinin proliferasyonunun önemli ölçüde inhibe ettiği saptanmıştır. Tümör hücrelerinin köken aldıkları dokuya bağlı olarak anti-angiogenik terapiye vereceği yanıt değişir. Indraccolo ve arkadaşları endostatinin *in vitro* şartlarda, MCF7 ve MDA-MB435, insan meme kanser hücre hatlarının proliferasyonu üzerinde önemli bir etki yaratmadığını saptamışlardır (Indraccolo vd 2002). 293 T böbrek epitel hücrelerinden sentezlenen endostatin hücrelerin besiyerinden toplanmış ve daha sonra BT4C sıçan glioma hücrelerine uygulanmıştır. Endostatin bu hücre hattında da *in vitro* koşullarda büyümeyi durdurucu ya da sitotoksik bir etki yaratmamıştır. *In vitro* hücre canlılık testleri endostatinin tümör hücreleri üzerine doğrudan bir etki yaratmadığını göstermektedir. Tümör hücrelerinde apoptoz ya da nekrozun, tümör kan dolaşımında

meydana gelen azaltma sonucunda ortaya çıkan ikincil bir etki olduğu düşünülmektedir. Endostatinin tümör hücreleri üzerinde proliferasyonu inhibe etmediği ortaya konmuştur. Bu bulguyu ortaya koyan çalışmalarda endostatin rekombinant olarak kullanılmıştır ve rekombinant proteinlerin *in vitro* koşullarda oldukça dayanıksız olduğu ve antitümör etkinin ortaya çıkması için oldukça yüksek dozlarda kullanılması gerektiği bilinmektedir. Endostatin gibi antianjiogenik ajanlar doğrudan tümörü hedef almadığı için kronik olarak yapılacak uygulamalar etkiyi artırabilir (Bergers vd 1999, Blezinger vd 1999, O'reilly 1997). Endostatin geninin ökaryotik hücrelere transferi sonucunda hücrelerin *in vitro* koşullarda büyümelerinde bir inhibisyon saptanmamıştır. Ancak bu genin ekspresyonu sonucu oluşan endostatin *in vivo* koşullarda tümör büyümesini inhibe etmiştir (Dhanabal 1999, Feldman vd 2001)

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

Hajitou ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında endostatinin *in vitro* koşullarda EF43.fgf-4 fare meme kanser hücre hattında VEGF ekspresyonunu baskıladığını ortaya koymuşlardır. Bu sonuç endostatinin yalnızca endotel hücreler üzerine değil doğrudan kanser hücrelerine de etki edebileceğini göstermektedir. Endostatinin tümör hücreleri üzerine doğrudan yaptığı bu etki VEGF'nin transkripsiyonel regülasyonu sayesinde ortaya çıkmaktadır. Endostatin tümör hücrelerinde yalnızca VEGF ekspresyonunu düzenlerken endotel hücrelerde hücre döngüsü ile ilgili ve apoptozu düzenleyici birçok genin ekspresyonunu etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle de endotel hücreler üzerinde daha fazla etki göstermektedir (Hajitau vd 2002). Ancak, çalışmamız sonucunda endostatinin endotel hücrelerde doza ve zamana bağlı olarak seçici bir toksisite yarattığı ortaya konmuştur.

Kombine halde uygulandıklarında, vinorelbin ile pozitif sonuçlar veren bazı kemoterapötik ilaçlar arasında paklitaksel (Romero vd 1999, Martin vd 2000, Polyzos

vd 2003, Bouillet vd 2004), doksataksel (Kornek vd 2001, Vassilomanolakis vd 2003, Mayordomo vd 2004), doksorubisin (Hochster vd 2001, Pawlicki vd 2002), epirubisin (Vici vd 2002, Frontini vd 2005), mitoksantron (Llombart-Cussac vd 1998, Onyenadum vd 2005), mitomisin (Colleoni vd 1997, Bourgeois vd 1998), gemitabin (Lobo vd 2003, Gennetas vd 2005), 5-florourasil (Zambetti vd 2000, Pienkowski ve Jagiello-Grusfeld 2001), sisplatin (Vassilomanolakis vd 2000, Chehal vd 2004, Mustacchi vd 2002), ifosfamide (Leone vd 1996, Campisi vd 1999) ve kapesitabine (Kouroussis vd 2004, Welt vd 2005) yer almaktadır. Vinorelbin bir çok kemoterapötik ajan ile kombine halde kullanılmıştır, ancak bugüne kadar antianjiogenik bir ajan ile kombinasyonunu işaret eden bir çalışmaya rastlanmamıştır. Buradan yola çıkarak çalışmamızda endostatin ve vinorelbinin insan meme kanser hücrelerindeki olası sinerjistik etkileri değerlendirilmiştir.

Kombine tedavilerden elde edilecek başarı, iki farklı tedaviyi doğru sıralamaya ve uygun dozlarda uygulamaya bağlıdır. Bu bağlamda test edilen ajanların ya da terapilerin hücre üzerinde ne gibi etkiler yaratabileceği önceden düşünülmeli ve ardından tedavi kombinasyonu düzenlenmelidir. Bu nedenle çalışmamızda endostatin ve vinorelbin uygulamaları, önce endostatin ve ardından vinorelbin ve tam aksi şekilde uygulandığı gibi, bu iki ajan aynı anda uygulanarak hücrelerde yarattıkları sitotoksikite değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular ışığında, ilaçların uygulama sırasının kombinasyonun verimliliğini değiştirmedeği ortaya konmuştur.

Yapılan doz tarama çalışmalarını takiben ilk aşamada belirlenmiş olan; 3,90 ng/ml-1 µg/ml aralığında denenilen dozlar, 96 kuyucuklu plak üzerindeki 293T ve MDAMB 231 hücrelerine iki ilacın kombine edilmesi şeklinde 24,48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde uygulandı. Bu dozlarda endostatin sitotoksik olmasa da, vinorelbinin hücreler üzerindeki sitotoksitesi üzerine nasıl bir etki yaratacağını saptamak amacı ile yapılan kombinasyonlar değerlendirildiğinde; iki ilacın kombinasyonu sonucu elde edilen değerler ile ilaçların kendi kontrol değerleri kıyaslandığında herhangi bir etkileşim olmadığı saptanmıştır. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonucunda elde edilen tüm veriler birbirileri ile benzerlik göstermektedir. Başka bir ifade ile, bu dozlarda hazırlanan kombinasyonların herhangi bir sinerjizme yol açmadığı

gösterilmiştir. Kombinasyon çalışması, vinorelbinin dozları değiştirilmeden, endostatinin doz taramasında sitotoksik bulunduğu dozlar olan 5µg/ml-31.25ng/ml arasında değiştirilerek tekrarlandı. Hazırlanan yetmiş farklı kombinasyon, ilaçlarda öncelik gözeterek ve gözetmeden, hücreler üzerine uygulandı. Tüm inkübasyon süreleri göz önüne alınarak değerlendirilen deney sonuçlarına göre, endostatinin 4 µg ve vinorelbinin 1 µg'lık dozları kullanılarak yapılan deneyde 72 saatlik inkübasyondan sonra ilaçların sinerjistik etki gösterdiği saptandı. İlaçların uygulama önceliği ve/veya eş zamanlı uygulaması deney sonuçlarında bir değişiklik yaratmadı.

Çalışmamızda vinorelbin (1 µg) ve endostatin (4 µg) birbirleri üzerinde sinerjistik etkiler yaratmıştır. Endostatin *in vitro* meme kanserlerinde ilk kez vinorelbin ile kombine kullanılmış ve vinorelbinin sitotoksik etkisini önemli ölçüde arttırmıştır. Bir çok araştırmacının aksine, bulgularımız endostatinin MDAMB 231 meme kanser hücre hattında, optimum dozda kullanıldığında, önemli bir sitotoksik etki yarattığını net bir şekilde ortaya koymaktadır. Çalışmamız bulguları arasında önemle belirtilmesi gereken bir nokta da şudur ki: vinorelbin (1 µg) ve endostatin (4 µg) kombine olarak uygulandığında MDAMB 231 hücrelerinde sinerjistik etkilere neden olurken, 293 T hücreleri üzerinde bir sinerjizim yaratmamıştır. Bu dozlar kullanılarak hazırlanan kombinasyonlarda hücre ölüm oranı, ilaçlar tek tek kullanıldığı zaman elde edilen değerlerden daha düşüktür. Bu demektir ki, bu ikili kombinasyon seçici bir toksisite sergilemekte ve epitel hücrelerinde toksik yanıtlar oluşturmamaktadır.

Endostatin hücre içi Ca^{+2} ve Mg^{+2} seviyelerini p53 ya da Bcl-2 gibi genlerin aktivitesini değiştirerek endotel hücrelerde apoptozu tetikler (Qesada vd 2006). Bu noktadan yola çıkarak endostatinin (4 µg/ml) meme kanser hücreleri üzerinde yarattığı sitotoksik etkinin apoptoz yolu ile olup olmadığı araştırılmıştır.

Endostatinin ve vinorelbinin sitotoksik aktivitelerini apoptoz indüksiyonu ile gerçekleştirip gerçekleştirmediği kaspaz -2,-3,-6,-8 ve -9 enzimlerinin aktivitelerinde değişikliğin kolorimetrik olarak tespit edilmesi ile ortaya konmuştur. Kaspazlar hücreden alınan içsel ve dışsal sinyallere bağlı olarak koordineli bir şekilde aktive olur. Ancak hücrenin ölüm emrini son olarak ileten Kaspaz-3'dür ve bu nedenle

ekspresyonundaki artış hücrenin mutlak suretle apoptoza uğramasına neden olur (Heemst vd 2007).

72 saatlik inkübasyon periyodu sonunda ve hücreler üzerinde sitotoksik etkiler yaratan dozlarda endostatinin (4 µg/ml) ve vinorelbinin (1 µg/ml), kaspaz enzimlerinden -2,-3,-6,-8 ve-9 aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. MDAMB 231 hücre hattında 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, 4 µg/ml endostatin uygulaması, kontrol grubuna oranla, kaspaz-2 enzim aktivitesinde 1.23, kaspaz-3 enzim aktivitesinde 1.96, kaspaz-6 enzim aktivitesinde 0.36, kaspaz-8 enzim aktivitesinde 3,34 ve kaspaz-9 enzim aktivitesinde 16 kat artışa neden olmuştur. Aynı hücrelerde ve inkübasyon süresi sonunda, vinorelbin ise kaspaz-2 enzim aktivitesinde 5.99, kaspaz-3 enzim aktivitesinde 6.63, kaspaz-6 enzim aktivitesinde 3.02, kaspaz-8 enzim aktivitesinde 1.68 ve kaspaz-9 enzim aktivitesinde 18 kat artışa neden olmuştur. İki ilaç birlikte uygulandığında ise kontrol grubuna oranla, kaspaz-2 enzim aktivitesinde 1.45, kaspaz-3 enzim aktivitesinde 1.34, kaspaz-6 enzim aktivitesinde 0.14, kaspaz-8 enzim aktivitesinde 0.2 ve kaspaz-9 enzim aktivitesinde 10.95 kat artışa neden olmuştur. 293T hücre hattında 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, 4 µg/ml endostatin uygulaması, kaspaz-2 enzim aktivitesinde 1.23, kaspaz-3 enzim aktivitesinde 1.29, kaspaz-6 enzim aktivitesinde 1.14, kaspaz-8 enzim aktivitesinde 1.48 ve kaspaz-9 enzim aktivitesinde 2.66 kat artışa neden olmuştur. Aynı hücrelerde ve inkübasyon süresi sonunda, vinorelbin ise kontrol grubuna oranla, kaspaz-2 enzim aktivitesinde 4.9, kaspaz-3 enzim aktivitesinde 15.77, kaspaz-6 enzim aktivitesinde 5.65, kaspaz-8 enzim aktivitesinde 16.37 ve kaspaz-9 enzim aktivitesinde 15.72 kat artışa neden olmuştur. İki ilaç birlikte uygulandığında ise kontrol grubuna oranla, kaspaz-2 enzim aktivitesinde 1.93, kaspaz-3 enzim aktivitesinde 2.68, kaspaz-6 enzim aktivitesinde 2.06, kaspaz-8 enzim aktivitesinde 2.50 ve kaspaz-9 enzim aktivitesinde 5.15 kat artışa neden olmuştur.

Dhanabal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada NIH3T3 fibroblast, A10 düz kas, H9c2 (2-1) miyoblast hücrelerinde endostatin hiçbir etki sergilememiştir. Renal kanser hücreleri (786-0), fibroblastlar (NIH3T3), akciğer fibroblastlar (IMR-90), düz kas hücreleri (A10) ve miyoblastlar (H9c2 (2-1)) 10 µg/ml endostatin ile muamele edilmiş ve hiçbir apoptotik özellikte değişme gözlenmemiştir. Aynı çalışmada apoptoz

mekanizmasının önemli bir bileşeni olan kaspaz-3 aktivitesi de incelenmiştir. 2, 4, 8, 14 saatlik inkübasyon sonucunda yukarıda belirtilen hücrelerde kaspaz-3 enzim aktivitesinde hiçbir değişiklik saptanmamış ancak 24 saat sonunda endotel hücrelerde kaspaz-3 miktarı artarken, NIH3T3 fibroblastları dışındaki diğer endotel olmayan tüm hücrelerde kaspaz-3 aktivasyonunda bir fark saptanamamıştır. Yalnızca NIH3T3 fibroblastlarında kaspaz-3 aktivitesi önemli şekilde değişmiştir (Dhanabal vd 1999). Bu çalışmada da endostatin endotel olmayan hücrelerde kaspaz enzim aktivitesinde artışa neden olmuştur.

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

Yapılan doz tarama ve kombinasyon çalışmalarını takiben, endostatinin (4 µg/ml), vinorelbinin (1 µg/ml) ve her iki ilaç kombinasyonunun (4µg/ml+1 µg/ml), 239 T hücre hattında TNF-α protein miktarı üzerine olan etkileri incelenmiştir. Vinorelbinin 1 µg/ml’lik uygulanmasında kontrole kıyasla, TNF-α miktarı 2,45 kat artarken, tek başına endostatinin 4 µg/ml’lik uygulamasında TNF-α miktarı 0,346 kat artmıştır. Kombinasyon (4µg/ml+1 µg/ml), ise bu hücrelerde TNF-α miktarını 1,04 kat arttırmıştır. MDAMB 231 hücre hattında 72 saat sonunda TNF-α miktarı vinorelbinin 1 µg/ml’lik uygulanmasında 4,99 kat, endostatinin tek başına 4 µg/ml’lik uygulamasında 25,55 kat ve kombinasyon sonrasında ise 17,5 kat artmış olduğu saptandı.

Günümüze kadar yapılan birçok çalışmada endostatinin anti-anjiogenik etkisini doğrudan tümör hücreleri üzerine etki ederek değil, tümörün etrafında yeni damar oluşturmak üzere toplanan endotellerin proliferasyonu, invazyonu üzerinde apoptotik etki sağlayarak gerçekleştirdiği ortaya konmuştur. Ancak çalışmamızda titizlikle yürütülen deneyler sonucunda, endostatinin MDAMB 231 meme kanser hücreleri üzerine doğrudan sitotoksik etki yarattığı ortaya çıkarılmıştır.

Apoptoz mekanizmasının son durağı olan kaspaz-3 proteinindeki artış, hücrelerin ölüm mekanizması olarak apoptozu kullandığının bir göstergesidir. Bu bağlamda elde ettiğimiz western-blot görüntüleri değerlendirildiğinde, sitotoksite deneylerinde elde edilen sonuçlara paralel olarak; MDAMB 231 hücrelerinde kaspaz-3 protein miktarının en fazla vinorelbin uygulamasında artmış olduğu görülmektedir.

Tek başına endostatin ve endostatin ile vinorelbin kombinasyonunun uygulamasında 293 T hücrelerinde kaspaz-3 protein miktarı artmazken, yine bu hücrelerde vinorelbin uygulamasında, vinorelbin sitotoksik olduğu için kaspaz-3 protein miktarında önemli bir artışa neden olduğu gözlenmiştir.

Şekil 4.32’de de görüldüğü gibi, MDAMB 231 hücrelerinde TNF- α protein miktarı kontrol grubuna oranla en fazla endostatin uygulamasında artmıştır. Vinorelbin ile kıyaslandığında, endostatinin TNF- α miktarının daha fazla artmasına yol açtığı görülmektedir. Tek başına endostatin uygulaması ile kombine tedavi uygulamasını karşılaştırdığımızda; protein miktarında önemli bir değişiklik gözlenmediği için bu artışın endostatine bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Endostatin 293 T hücrelerinde sitotoksik etki yaratmadığı için TNF- α miktarında da kaydadeğer bir artış gözlenmemiştir.

Hücrelerin dışsal yolağı kullanarak apoptozu gittiklerinin bir göstergesi de TNF- α ve TRAIL miktarındaki artıştır. Endostatin uygulanmış MDAMB 231 hücrelerinde; TNF- α miktarındaki artışa paralel olarak TRAIL proteininde de bir artış gözlenmiştir. Tüm sitotoksite testleri ve western-blot sonuçları değerlendirildiğinde, endostatinin MDAMB 231 hücrelerindeki sitotoksik etkiyi TNF- α ve TRAIL proteinlerini arttırarak ortaya koyduğu gösterilmiştir.

Endostatinin bugüne kadar aydınlatılan etki mekanizmaları arasında, apoptozun dışsal yolağını tetikleyerek hücreler üzerinde sitotoksik etki yarattığını gösteren bir kanıt bulunmamaktadır. Bu bağlamda sonuçlarımızın bilim dünyasına, endostatinin mekanizmasına dair yeni bir bakış açısı getireceğini umut etmekteyiz.

6. SONUÇ

Tüm bu verilerle birlikte;

1. Tez kapsamında gerçekleştirilen sitotoksikite test sonuçlarına göre; MDAMB 231 hücre hattında endostatin 4 µg/ml’lik dozda 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda sitotoksik etki göstermiştir.
2. İlk defa, endostatinin TNF- α proteini ile olan ilişkisi ortaya çıkarılmıştır.
3. Endostatinin endotel hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini işaret eden birçok çalışma bulunmaktadır. Ancak endostatin, çalışmamızda bu hücrelerde doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik etki sergilememektedir.
4. Endostatinin tümör hücrelerinde sitotoksik etkiler sergilemediğini işaret eden çalışmaların aksine, optimum doz saptandığında endostatin insan meme kanser hücrelerinde TNF- α miktarında artışa yol açarak sitotoksik etkiler sergilemiştir. Endostatinin etki mekanizmasında kullanılacak dozun ne denli önemli olduğu çalışmamızın en önemli sonuçlarından bir tanesidir.
5. Endostatin TNF- α proteininin miktarını arttırdığı gibi, ölüm reseptörlerinden bir tanesi olan TRAIL protein miktarını da artırmaktadır. Bu bağlamda, endostatinin kanser hücrelerinde yarattığı sitotoksik etki apoptoz mekanizmasının dışsal (hücre membran) yolağını tetikleyerek olabileceğini düşünmemize neden olmuştur. Bunu doğrulamak için yapılacak çalışma, bu mekanizmada bir alt kademe proteini olan Bid’in protein miktarının belirlenmesi bir sonraki basamak olarak değerlendirilebilir.
6. İlk kez çalışmamızda endostatin ve vinorelbin kombine halde meme kanser hücreleri üzerine uygulanmıştır. Endostatin, vinorelbinin epitel hücreler üzerinde yarattığı toksik yanıtı baskılayarak bu hücrelerin canlılığını tetiklemiştir.

7. KAYNAKLAR

- AAPROA, M. and FINEK, J. 2011. Oral vinorelbine in metastatic breast cancer: A review of current clinical trial results. *Cancer Treatment Reviews*, 10: 1016.
- AKYOL, H. 2004. Kemoterapinin temel ilkeleri, TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Hemşire Programı, Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı. 18-22.
- ALMASAN, A. and ASHKENAZI, A. 2003. Apo2L/TRAIL: Apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine&Growth Factor Rev*, 14: 337–348.
- ALNEMRI, E.S., LIVINGSTON, D.J., NICHOLSON, D.W., SALVESEN, G., THORNBERRY, N.A. and WONG, W.W. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87 (2): 171.
- ANDRADE, F., ROY, S., NICHOLSON, D., THORNBERRY, N., ROSEN, A. And CASCIOLA-ROSEN, L. 1998. Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity*, 8: 451–460.
- ASLAN, F.E. and GÜRKAN, A. 2007. The risk of breast cancer at the women. *The Journal of Breast Health*, 3(2): 63–6.
- BAMIAS, A. and DIMOPOULOS, M.A. 2003. Angiogenesis in human cancer: Implications in cancer therapy. *European Journal of Internal Medicine*, 14: 459–469.
- BECKMANN, M.W., BANI, M.R., FASCHING, P.A., STRICK, R. and LUX, M.P. 2007. Risk and risk assessment for breast cancer: Molecular and clinical aspects. *Maturitas*, 57: 56–60.

- BERGERS, G., JAVAHERIAN, K., LO, K.M., FOLKMAN, J. and HANAHAN, D. 1999. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science*, 284(5415): 808-12.
- BERTRAM, J.S. 2001. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 21: 167–223.
- BHOJANI, M.S., CHEN, G., ROSS, B.D., BEER, D.G. and REHEMTULLA, A. 2005. Nuclear localized phosphorylated FADD induces cell proliferation and is associated with aggressive lung cancer. *Cell Cycle Nov*, 4(11): 1478–81.
- BIANCHI, L. 2002. Differential effects of angiostatin, endostatin and interferon-alpha(1) gene transfer on in vivo growth of human breast cancer cells. *Gene Therapy*, 9(13): 867-78.
- BLEZINGER, P., WANG, J., GONDO, M., QUEZADA, A., MEHRENS, D., FRENCH, M., SINGHAL, A., SULLIVAN, S., ROLLAND, A., RALSTON, R. and MIN, W. 1999. Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene. *Natural Biotechnology*, 17(4): 343-8.
- BOUILLET, T., SAINTIGNY, P., LEVY, E., SPANO, J.P., MORIN, F., POMMEYROL, A., BRUN, B., BENNAMOUN, M., BREAU, J.L. and MORÈRE, J.F. 2004. Weekly paclitaxel (P) combined with biweekly vinorelbine (V) in metastatic breast cancer (MBC): final results of a clinical phase II study. *Journal of Clinical Oncology*, 22(14S): 783.
- BOURGEOIS, H., TURPIN, F., BOUCHADA, M., VOLTERS, A., CVITKOVIC, F., GOUPIL, A., JANVIER, M., TUBIANA-HULIN, M., SOULIE, P., BERLIE, J., GIRARD, M. and ROUESSE, J. 1998. Mitomycin-vinorelbine as second line chemotherapy in metastatic breast cancer. *Bull Cancer*, 85(9): 794.
- BRETON, J.L., WESTEEL, V., JACOULET, P., MERCIER, M., CHAZARD M. And DEPIERRE, A. 2001. Phase I study of paclitaxel (Taxol®) plus vinorelbine

- (Navelbine®) in patients with untreated stage IIIb and IV non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 31: 295–301.
- BUSSOLINO, F., MANTOVANI, A. and PERSICO, G. 1997. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochemical Sciences*, 22: 251–256.
- CALFA, C.I., ROSENBLATT, J.D., CHO, H.M., WEBSTER, K. and SHIN, S.U. 2006. Antibodies and antibody-fusion as anti-angiogenic, anti-tumor agents. *Update on Cancer Therapeutics*, 1: 159–173.
- CAMPISI, C., FABI, A., PAPALDO, P., TOMAO, S., MASSIDDA, B., ZAPPALA, A., IONTA, M.T. and COGNETTI, F. 1999. Ifosfamide given by continuous-intravenous infusion in association with vinorelbine in patients with anthracycline-resistant metastatic breast cancer: a phase I–II clinical trial. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 44(Suppl.): 1–4.
- CARMELIET, P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*, 6: 89–395.
- CASCIOLA-ROSEN, L., NICHOLSON, D.W., CHONG, T., ROWAN, K.R., THORNBERRY, N.A., MILLER, D.K. and ROSEN A. 1996. Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair : A fundamental principle of apoptotic death. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(5): 1957–64.
- CATTEL, L., RECALENDI, V., AIROLDI, M., TAGINI, V., ARPICCO, S., BRUSA, P. and BUMMA, C. 2001. A sequence-dependent combination of docetaxel and vinorelbine: pharmacokinetic interactions. *Farmaco*, 56: 779–784.
- CERRETTI, D., KOZLOSKY, C.J., MOSLEY, B., NELSON, N., VAN NESS, K. and GREENSTREET T. 1992. Molecular cloning of the interleukin1 beta converting enzyme. *The Science*, 256: 97–100.

- CERRETTI, D.P., KOZLOSKY, C.J., MOSLEY, B., NELSON, N., VAN NESS, K. and GREENSTREET, T.A. 1992. Molecular cloning of the interleukin1 beta converting enzyme. *The Science*, 256: 97 - 100.
- CHAN, A. and VERRILL, M., 2009. Capecitabine and vinorelbine in metastatic breast cancer. *European Journal Of Cancer*, 45: 2253 –2265.
- CHEHAL, A., TAHER, A. and KHALIL, M. 2004. Shamseddine A. Cisplatin plus vinorelbine (PVn) as a salvage regimen for refractory breast cancer. *Breast*, 13(5):421–4.
- CHEN, W.J., HUANG, Y.T., WU, M.L., HUANG, T.C., HO, C.T. and PAN, M.H. 2008. Induction of apoptosis by vitamin D2, ergocalciferol, via reactive oxygen species generation, glutathione depletion, and caspase activation in human leukemia Cells. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 14;56(9): 2996–3005.
- CHOU, T. 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies, *Pharmacological Reviews*, 58: 621–681.
- CHOU, T.C. and TALALAY, P. 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, 22: 27-55.
- CHU-XIA, D. 2006. BRCA1: Cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Research*, 34: 1416–1426.
- COFFEY, J.C., WANG, J.H., SMITH, M.J.F., HAYES, D.B., COTTER, T.G. and REDMOND, H.P. 2003. Excisional surgery for cancer cure: Therapy at a cost. *Lancet Oncology*, 4: 760–768.
- COHEN, J.J. 1998. Apoptosis, to be or not to be. *Postgraduate Syllabus*, 1: 1–19.

- COLLEONI, M., MANENTE, P., STOCKER, J., AMOR, H., LAMON, S., NELLI, P., VICARIO, G., SGARBOSSA, G. and GRAIFF, C. 1998. Mitomycin C and vinorelbine in pretreated breast cancer. *Tumori*, 83(5):834–6.
- CONNELL, P.P., KRONB, S.J. and WEICHSELBAUM, R. 2004. Relevance and irrelevance of DNA damage response to radiotherapy. *DNA Repair*, 3: 1245–1251.
- CONNOLLY, E.M., HARMEY, J.H., O'GRADY, T., FOLEY, D., ROCHE-NAGLE, G., KAY, E. and BOUCHIER-HAYES D.J. 2002. Cyclo-oxygenase inhibition reduces tumour growth and metastasis in an orthotopic model of breast cancer. *British Journal of Cancer*, 87(2): 231-7.
- COOPER, J.S., GUO, M.D., HERSKOVIC, A., MACDONALD, J.S., MARTENSON, J.A., AL-SARRAF, M., BYHARDT, R., RUSSELL, A.H., BEITLER, J.J., SPENCER, S., ASBELL, S.O., GRAHAM, M.V. and LEICHMAN, L.L. 1999. Chemoradiotherapy of locally advanced esophageal cancer: Long-term follow-up of a prospective randomized trial (RTOG85-01). *The Journal of the American Medical Association*, 281: 1623–1627.
- COZZOLINO, M., FERRARO, E., FERRI, A., RIGAMOTI, D., QUONDAMATTEO, F., DING, H., XU, Z.S., FERRARI, F., ANGELINI, D.F., ROTILIO, G., CATTANEO, E., CARRI, M.T. and CECCONI, F. 2004. Apoptosome inactivation rescues proneural and neural cells from neurodegeneration. *Cell Death Differ.* 11: 1179–91.
- CUMMINGS, J., WARD, T.H., RANSON, M. and DIVE, C. 2004. Apoptosis pathway-targeted drugs from the bench to the clinic. *Reviews on Cancer*, 1705: 53–66.
- DARMON, A.J., NICHOLSON, D.W. and BLEACKLEY, R.C. 1995. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature*, 377: 446–448.

- DHANABAL, M., VOLK, R., RAMCHANDRAN, R., SIMONS, M. and SUKHATME, V.P. 1999. Cloning, expression, and in vitro activity of human endostatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 258(2): 345-52
- DONADIO, M., ARDINE, M., BERRUTI, A., RITORTO, G., FEA, E., MISTRANGELO, M., COCCORULLO, Z., BERGNOLO, P., COMANDONE, A. and BERTETTO, O. 2003. Gemcitabine and vinorelbine as second-line treatment in patients with metastatic breast cancer: a phase II study. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 52(2): 147–52.
- DURAND, R.E. and RALEIGH, J.A. 1998. Identification of nonproliferating but viable hypoxic tumor cells in Vivo. *Cancer Research*, 58: 3547–3550.
- EKICI, E. and UTKUALP, N. 2007. Women instructor behaviors towards breast cancer. *The Journal of Breast Health*, 3(3): 136–139.
- EKMEKTZOGLOU, K.A., XANTHOS, T., GERMAN, V. and ZOGRAFOS, G.C. 2009. Breast cancer: From the earliest times through to the end of the 20th century. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 145: 3–8.
- ELLIS, R.E., YUAN, J.Y. and HORVITZ, H.R. 1991. Mechanisms and functions of cell death. *Annual Review of Cell Biology*, 7: 663–698.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicological Pathology*, 35(4): 495–516.
- EMAMI, B., LYMAN, J., BROWN, A., COIA, L., GOITEIN, M., MUNZENRIDER, J.E., SHANK, B., SOLIN, L.J. and WESSON, M. 1991. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 21: 109–122.
- FANGER, N.A., MALISZEWSKI, C.R., SCHOOTEY, K. and GRITFUH, T.S. 1999. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-

- related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Journal of Experimental Medicine*, 190: 1155–1164.
- FEARON, E.R. 1997. Human cancer syndromes: Clues to the origin and nature of cancer. *Science*, 278(5340): 1043–1050.
- FELDMAN, A.L., ALEXANDER, H.R., HEWITT, S.M., LORANG, D., THIRUVATHUKAL, C.E., TURNER, E.M. and LIBUTTI SK. 2001. Effect of retroviral endostatin gene transfer on subcutaneous and intraperitoneal growth of murine tumors. *Journal of National Cancer Institute*, 93(13):1014–20.
- FERRERASA, M., FELBORB, U., LENHARDA, T., OLSEN, B.R. and DELAÏSSE, A. J.M. 2000. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 486: 247–251.
- FOLKMAN, J. 1996. What is the role of thymidine phosphorylase in tumor angiogenesis?. *Journal of the National Cancer Institute*, 88(16): 1091–1092.
- FOLKMAN, J. 2006. Antiangiogenesis in cancer therapy-endostatin and its mechanisms of action. *Experimental Cell Research*, 312: 594 – 607.
- FOLKMAN, J. and INGBER, D. 1992. Inhibition of angiogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 3: 89–96.
- FOSTER, I. 2008. Cancer: A cell cycle defect. *Radiography*, 14: 144–149.
- FRANCISCO, J.E., VALERO, V., PUSZTAI, L., BOEHNKE-MICHAUD, L., BUZDAR, A.U. and HORTOBAGYI, G.N. 2001. Chemotherapy of metastatic breast cancer: What to expect in 2001 and beyond. *Oncologist*, 6: 133–146
- FRONTINI, L., ARDIZZOIA, A., GIORDANO, M., FAGNANI, D., SCANNI, A., ISA, L., SCOGNAMIGLIO, G., PRESSIANI, T., COLOMBO, I. and BERTOLINI,

- A. 2005. Epirubicine-vinorelbine (EV) intravenous combination followed by oral vinorelbine (VNR) as first-line treatment in advanced breast cancer (ABC) patients *Journal of Clinical Oncology*, 23: 770
- FUKUDA, M., HAMAO, A., TANAKA, A., KITADA, M., SUZUKI, S., KUSAMA, K. and SAKASHITA, H. 2003. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/APO2L) and its receptors expression in human squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oncology Reports*, 10: 1113–1119.
- GASPARINI, G., LONGO, R., TOI, M. and FERRARA, N. 2005. Angiogenic inhibitors: a new therapeutic strategy in oncology. *Nature Clinical Practice Oncology*, 2(11):562-77.
- GENNATAS, C., MICHALAKI, V., MOURATIDOU D., TSAVARIS N., ANDREADIS C., PSYCHOGIOS, J. and POULAKAKI, N. 2005. Gemcitabine in combination with vinorelbine for heavily pretreated advanced breast cancer. *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology*, 23(16):63S.
- GHAVAMI, S., HASHEMI, M. ANDE, S. R. YEGANEH. B, XIAO, W., ESHRAGHI, M., BUS, C. J., KADKHODA, K. WIECHEC, E., HALAYKO, A.J. and LOS, M. 2009. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *Journal of Medical Genetics*, 46:497-510
- GRELL, M., KRAMMER, P.H. and SCHEURICH, P. 1994. Segregation of APO- 1/Fas antigen- and tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *European Journal Immunology*, 24(10): 2563–6.
- HALAAS, O., VIK, R., ASHKENAZI, A. and ESPEVIK, T. 2000. Lipopolysaccharide induces expression of APO2 ligand/TRAIL in human monocytes and macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology*, 51: 244–250.
- HAJTOU, A., GRIGNET, C., DEVY, L., BERNDT, S., BLACHER, S., DEROANNE, C.F., BAJOU, K., FONG, T., CHIANG, Y., FOIDART, J.M. and NOËL, A. 2002. The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a

down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells. *FASEB Journal*, 16(13):1802-4.

HANAHAN, D. and WEINBERG, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57–70.

HAROLD, B.J., KUTER, I., CAMPOS, S.M., GELMAN, R.S., TRIBOU, L., PARKER, L.M., MANOLA, J., YOUNGER, J., MATULONIS, U., BUNNELL, C.A., PARTRIDGE, A.H., RICHARDSON, P.G., CLARKE, K., SHULMAN, L.N. and WINER, E.P. 2001. Clinical Activity of trastuzumab and vinorelbine in women with HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, Vol 19, No 10: 2722–2730.

HAYAKAWA, A., KAWAMOTO, Y., NAKAJIMA, H., SAKAI, J., TAKASAWA, R., NAKASHIMA, I., MAGAE, J. and TANUMA, S. 2008. Bid truncation mediated by caspases-3 and -9 in vinorelbine-induced apoptosis. *Apoptosis*, 13:523–530.

HEEMST, D., REIJER, P.M. and WESTENDORP, R.G.J. 2007. Ageing or cancer: A review on the role of caretakers and gatekeepers. *European Journal of Cancer*, 43: 2144–2152.

HIRATA, H., TAKAHASHI, A., KOBAYASHI, S., YONEHARA, S., SAWAI, H., OKAZAKI, YAMAMOTO K. and SASADA M.T. 1998. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 187: 587–600.

HOCHSTER, H.S., VOGEL, C.L., BURMAN, S.L. and WHITE, R. 2001. Activity and safety of vinorelbine combined with doxorubicin or fluorouracil as first-line therapy in advanced breast cancer: a stratified phase II study. *Oncologist* 6(3):269–77.

- HOHENESTER, E., SASAKI, T., OLSEN, B.R. and TÍMPL, R. 1998. Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 Å resolution. *EMBO Journal*, 17(6):1656-64.
- HORTOBAGYI, G.N. 1998. Treatment of breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 339: 974–984.
- HORTOBAGYI, G.N. 2003. Gemcitabine in combination with vinorelbine for treatment of advanced breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 3(Suppl. 1): 34–8.
- HU, W. and KAVANAGH, J.J. 2003. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *Lancet Oncology*, 4: 721–29.
- HU, Y.M., BENEDICT, M.A. and DING, L.Y. 1999. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-I-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO Journal*, 18: 3586–3595.
- INDRACCOLO, S., GOLA, E., ROSATO, A., MINUZZO, S., HABELER, W., TISATO, V., RONI, V., ESPOSITO, G., MORINI, M., ALBINI, A., NOONAN, D.M., FERRANTINI, M., AMADORI, A. and CHIECO-BIANCHI, L. 2002. Differential effects of angiostatin, endostatin and interferon-alpha(1) gene transfer on in vivo growth of human breast cancer cells. *Gene Therapy*, 9(13):867-78.
- INGBER, D.E. 2008. Can cancer be reversed by engineering the tumor microenvironment?. *Seminars in Cancer Biology*, 18: 356–364.
- IORFIDA, M., BAGNARDI, V., BALDUZZI, A., DELLAPASQUA, S., CARDILLO, A., LUINI, A., INTRA, M., MINCHELLA, I., VERONESI, P., VIALE, G., GOLDBIRSCH, A. and COLLEONI, M. 2010. Preoperative therapy with trastuzumab and oral vinorelbine (+/- endocrine therapy) in patients with HER2-positive breast cancer. *The Breast*, 19: 128–132.

- JOHNSON, S.A., HARPER, P., HORTOBAGYI, G.N. and POUILLART, P. 1996. Vinorelbine: an overview. *Cancer Treatment Reviews*, 22(2):127-42.
- KALLURI, R. 2003. Basement membranes: Structure, assembly and role in tumor angiogenesis. *National Reviews of Cancer*, 3: 422–433.
- KAYAGAKI, N., YAMAGUCHI, N., NAKAYAMU, M., TAKEDA, K., AKIBA, H., TSUTSUI, H., OKAMURA, H., NAKANISHI, K., OKAMURA, K. and YAGITA, H. 1999. Expression and function of the TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *Journal of Immunology*, 163: 1906–1913.
- KIM, E., MOORE, J., HUANG, J., SOFFER, S., MANLEY, C.A., O'TOOLE, K., MIDDLESWORTH, W., STOLAR, C.J., KANDEL, J.J. and YAMASHIRO, D.J. 2001. All angiogenesis is not the Same: Distinct patterns of response to antiangiogenic therapy in experimental neuroblastoma and Wilms' tumor. *Journal of Pediatric Surgery*, 36: 287–290.
- KIM, Y.M., HWANG, Y.M., PYUNN, B.J., KIM, T.Y., LEE, S.T., GHOSH, Y.S. and KWON, Y.G. 2002. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 27872–27879
- KIM, Y.M., JANG, J.W., LEE, O.H., YEON, J., CHOI, E.Y., KIM, K.W., LEE, S.T. and KWON, Y.G. 2000. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase. *Cancer Research*, 60: 5410–5413.
- KIMBERLEY, F.C. and SCREATON, G.R. 2004. Following a TRAIL: Update on a ligand and its five receptors. *Cell Research*, 14(5): 359–372.
- KLAGSBRUN, M. and AMORE, D. P. 1996. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 7: 259–70.

- KOPFSTEIN, L. and CHRISTOFORI, G. 2006. Metastasis: Cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63: 449–468.
- KORNEK, G.V., ULRICH-PUR, H., PENZ, M., HAIDER, K., KWASNY, W., DEPISCH, D., KOVATS E., LANG, F., BRUNO SCHNEEWEISS, B. And SCHEITHAUER, W. 2001. Treatment of advanced breast cancer with vinorelbine and docetaxel with or without human granulocyte colony-stimulating factor. *Journal of Clinical Oncology*, 19(3):621–7.
- KOUROUSSIS, C., KALBAKIS, K., ANDROULAKIS, N., AGELAKI, S., VAMVAKAS, L., MALAS, K., SOUGLAKOS, J., VARDAKIS, N. and GEORGOULIAS, V. 2004. A dose escalation study of leucovorin (LV) and 48-hour continuous infusion of 5-fluorouracil in combination with cyclophosphamide and vinorelbine in pretreated patients with metastatic breast cancer. *Anticancer Research*, 24(6):4217–21.
- KRAJEWSKI, S., KRAJEWSKA, M., ELLERBY, L.M., WELSH, K., XIE, Z., DEVERAUX, Q.L., SALVESEN, G.S., BREDESEN, D.E., ROSENTHAL, R.E., FISKUM, G. and REED, J.C. 1999. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*, 96: 5752–5757.
- KVOLS, K.L. 2005. Radiation sensitizers: A selective review of molecules targeting DNA and non-DNA targets. *The Journal Of Nuclear Medicine*, 46(1): 187–190.
- KWAK, E.L., CLARK, J.W. and CHABNER, B. 2007. Targeted agents: The rules of combination. *Clinical Cancer Research*, 13: 5232–7.
- LEE, S.H., SHIN, M.S., KIM, H.S., LEE, H.K., PARK, W.S., KIM, S.Y., LEE, J.H., HAN, S.Y., PARK, J.Y., OH, R.R., JANG, J.J., HAN, J.Y., LEE, J.Y. and YOO, N.J. 1999. Alterations of the DR5/TRAIL receptor 2 gene in non-small cell lung cancers. *Cancer Research*, 59: 5683–5686.

- LEE, S.J., JANG, J.W., KIM, Y.M., LEE, H.I., JEON, J.Y., KWON, Y.G. and LEE, S.T. 2002. Endostatin binds to the catalytic domain of matrix metalloproteinase-2. *FEBS Letters*, 519: 147–152.
- LEONE, B.A., VALLEJO, C.T., ROMERO, A.O., PEREZ, J.E., CUEVAS, M.A., LACAVA, J.A., SABATINI, J.L., DOMINGUEZ, M.E., RODRIGUEZ, R., BARBIERI, M.R., ORTIZ, E.H., SALVADORI, M.A., ACUNA, L.A., ACUNA, J.M., LANGHI, M.J., AMATO, S. and MACHIAVELL, M.R. 1996. Ifosfamide and vinorelbine as first-line chemotherapy for metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 14(11):2993–9.
- LI, P., NIJHAWAN, D., BUDIHARDJO, I., SRINIVASULA, S.M., AHMAD, M., ALNEMRI, E.S. and WANG X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91: 479 – 489.
- LIU, R.Y., FAN, C., LIU, G., OLASHAW, N.E. and ZUCKERMAN, K.S. 2000. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for tumor necrosis factor-alpha supported proliferation of leukemia and lymphoma cell lines. *Journal of Biology Chemical*, 275: 21086–93.
- LIU, X., KIM, C.N., YANG, J., JEMMERSON, R. and WANG, X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86: 147–157.
- LLOMBART-CUSSAC, A., PIVOT, X., RHOR-ALVARADO, A., LE CESNE, A., LE CHEVALIER, T., TURSZ, T. and SPIELMANN, M. 1998. First line vinorelbine-mitoxantrone combination in metastatic breast cancer patients relapsing after an adjuvant anthracycline regimen: results of a phase II study. *Oncology*, 55(5): 384–90.
- LOBO, F., VIRIZUELA, J.A., DORTA, F.J., FLORIÁN, J., LOMAS, M., JIMÉNEZ, E., LÓPEZ, P., CASADO, V., LÉON, A., ESTÉVEZ, L.G. and DÓMINE, M. 2003. Gemcitabine/vinorelbine in metastatic breast cancer patients previously

treated with anthracyclines: results of a phase II trial. *Clinical Breast Cancer*, 4(1):46–50.

MARGOLESE, R.G., HORTOBAGYI, G.N. and BUCHHOLZ, T.A. 2003. Neoplasms of the breast. *Section*, 32: 118–1822.

MARINI, P., SCHMID, A., JENDROSSEK, V., FALTIN, H., DANIEL, P.T., BUDACH, W. and BELKA, C. 2005. Irradiation specifically sensitises solid tumor cell lines to TRAIL mediated apoptosis. *BMC Cancer*, 5: 5.

MARION, T.W., MEINHOLD-HEERLEIN, I., BAUERSCHLAG, D.O., SCHEM, C., BAUER, M., JONAT, W., MAASS, N. and MUNDHENKE, C. 2009. Combination of imatinib and vinorelbine enhances cell growth inhibition in breast cancer cells via PDGFR beta signalling. *Cancer Letters*, 273: 70–79.

MARTIN, M., LLUCH, A., CASADO, A., GARCIA, CARBONERO, I., PAZ, L., ESTEBAN, C., INSA, A., ALFONSO, R. GARCIA-CONDE, J. and DIAZ-RUBIO, E. 2000. Paclitaxel plus vinorelbine: an active regimen in metastatic breast cancer patients with prior anthracycline exposure. *Annals of Oncology*, 11(1):85–9.

MARTIN, S.J., AMARANTE-MENDES, G.P., SHI, L., CHUANG, T.H., CASIANO, C.A., O'BRIEN, G.A. FITZGERALD, P., TAN, E.M., BOKOCH, G. M., GREENBERG, A. H. AND GREEN, D. R. 1996. The cytotoxic cell protease granzyme B initiates apoptosis in a cell- free system by proteolytic processing and activation of the ICE/CED-3family protease, CPP32, via a novel two-step mechanism. *The EMBO Journal*, 15: 2407–2416.

MARTY, M., FUMOLEAU P., ADENIS A., ROUSSEAU Y., MERROUCHE, Y., ROBINET, G. and SENAC, I. 2001. Oral vinorelbine pharmacokinetics and absolute bioavailability study in patients with solid tumors. *Annals Oncology* 12 (11): 1643–9.

- MAYORDOMO, J.I., MILLA, A., MORALES, S., YUBERO, A., LORENZO, A., BAENA, J.M., MODOLELL, A., SANZ, J., ILLARRAMENDI, J., GARCIA, M.J., MACHENG, I., BURRILO, M.A. and TRES, A. 2004. Biweekly docetaxel and vinorelbine as first-line chemotherapy in metastatic breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 5(2):131–5.
- MENTLEIN, R. and HELD-FEINDT, J. 2003. Angiogenesis factors in gliomas: A new key to tumor therapy?. *Naturewissenschaften*, 90: 385–94.
- MILLER, K., SWEENEY, C. and SLEDGE, G. 2001. Redefining the Target: Chemotherapeutics as antiangiogenics. *Journal of Clinical Oncology*, 19: 1195–1206.
- MOORE, R.J., OWENS, D.M., STAMP, G., ARNOTT, C., BURKE, F., EAST, N., HOLDSWORTH, H., TURNER, L., ROLLINS, B., PASPARAKIS, M., KOLLIAS, G. and BALKWILL, F. 1999. Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis. *Nature Medicine*, 5: 828–31.
- MORABITO, A., FILIPPELLI, G., PALMERI, S., CASCINU, S., FERRAÙ, F., ZAGONEL, V., GATTUSO, D., CATALANO, V., CAPACCETTI, B., FRANCIOSI, V., ACCURSO, V., SCINTO, F. and GASPARINI, G. 2003. The combination of gemcitabine and vinorelbine is an active regimen as second-line therapy in patients with metastatic breast cancer pretreated with taxanes and/or anthracyclines: a phase I–II study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 78(1):29–36.
- MUSTACCHI, G., MUGGIA, M., MILANI, S., CECCHERINI, R., LEITA, M.L. and DELLACH, C. 2002. A phase II study of cisplatin and vinorelbine in patients with metastatic breast cancer. *Annals Oncology*, 13(11):1730–6
- NAGATA, S. and GOLSTEIN, P. The fas death factor. 1995. *Science*, 267: 1449–56.
- NAKAMURA, K., BOSSY-WETZEL, E., BURNS, K., FADEL, M.P., LOZYK, M., GOPING, I. S., OPAS, M., BLEACKLEY, R.C., GREEN, D. R. and

- MICHALAK, M. 2000. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 150: 731–740.
- NICHOLSON, D.W. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 6: 1028–1042.
- NICHOLSON, DW. and THORNBERRY, NA. 1997. Caspases: Killer Proteases. *Trends Biochemical Science*, 22(8):299-306.
- O'REILLY, M.S., BOEHM, T., SHING, Y., FUKAI, N., VASIOS, G., LANE, W.S. FLYNN, E., BIRKHEAD, J.R., OLSEN, B.R. and FOLKMAN, J. 1997. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88: 277–85.
- ONYENADUM, A., GOGAS, H., MARKOPOULOS, C., BAFALOUKOS, D., ARAVANTINOS, G., MANTZOURANI, M., KOUTRAS, A., TZORAKOELEFTERAKIS, E., XIROS, N., MAKATSORIS, T., FOUNTZILAS, G. and KALOFONOS, H.P. 2007. Mitoxantrone plus vinorelbine in pretreated patients with advanced breast cancer *Journal of Chemotherapy*, 19(5): 582-9.
- OPPENHEIM, J., FELDMANN, M., DURUM, SK., HIRANO, T., VILCEK J. And NICOLA, NA., 2000. Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense. *Academic Press*, 3–20
- OZBEN, T. 2007. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *Journal of Pharmacology Science*, 96: 2181–96.
- PALMIERI, G., CAPONE, M., ASCIERTO, M.L., GENTILCORE, G., STRONCEK, D.F., CASULA, M., SINI M.C., PALLA, M., MOZZILLO, N. and ASCIERTO, P.A. 2009. Main roads to melanoma. *Journal of Translational Medicine*, 7: 86.

- PAN, G., NI, J., WEI, Y.F., YU, G., GENIZ, R. and DIXIT, V.M. 1997. An antagonist decoy receptor and death domain-containing receptor for TRAIL. *Science*, 277: 815–818.
- PAN, G., O'ROURKE, K., CHINNAIYAN, A.M., GENIZ, R., EBNER, R., NI, J. and DIXIT, V.M. 1997. The receptor for the cytosolic ligand TRAIL. *Science*, 276: 111–113.
- PAWLICKI, M., ROLSKI, J., ZALUSKI, J., SIEDLECKI, P., RAMLAU, C. and TOMZAK, P. 2002. A phase II study of intravenous navelbine and doxorubicin combination in previously untreated advanced breast carcinoma. *Oncologist*, 7(3):205–9.
- PIENKOWSKI, T. and JAGIELLO-GRUSZFELD, A. 2001. Five-day infusion of fluorouracil and vinorelbine for advanced breast cancer patients treated previously with anthracyclines. *International Journal of Clinical Pharmacology Research*, 21(3–4):111–7.
- POLYZOS, A., TSAVARIS, N., KOSMAS, C., GOGAS, H., TOUFEXI, H., KOSMIDIS, C., MARKOPOULOS, C., GIANNOPOULOS, A., PAPADOPOULOS, O., STAMATIADIS, D. and KOURAKLIS, G. 2003. Full dose paclitaxel plus vinorelbine as salvage chemotherapy in anthracycline-resistant advanced breast cancer: a phase II study. *Journal of Chemotherapy*, 15(6):607–12
- PONDER, B.A.J. 2001. Cancer genetics. *Nature*, 41: 336–341.
- QESADA, A.R., MUNOZ-CHAPULI, R. and MEDINA, M.A. 2006. Anti-Angiogenic Drugs: from Bench to Clinical Trials. *Medicinal Research Reviews*, 26(4): 483-530.
- RANO, T.A., TIMKEY, T., PETERSON, E.P., ROTONDA, J., NICHOLSON, D.W. and BECKER, J.W. 1997. A combinatorial approach for determining protease

specificities: application to interleukin-1 β converting enzyme (ICE). *Chemical Biology*, 4: 149 - 155.

RAO, RV., HERMEL, E., CASTRO-OBREGON, S., DEL RIO, G., ELLERBY, L.M., ELLERBY, H.M. and BREDESEN, D.E. 2001. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: Mechanism of caspase activation. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 869–874.

REHN, M., VEIKKKOLA, T., KUKK-VALDRE, E., NAKAMURA, H., ILMONEN, M., LOMBARDO, C., PIHLAJANIEMI, T., ALITALO, K. and VUORI, K. 2001. Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Science*, 98: 1024–1029.

ROMERO, ACUNA, L., LANGHI, M. and PEREZ, J. 1999. Vinorelbine and paclitaxel as first-line chemotherapy in metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 17(1):74–81.

SAARELA, J., REHN, M., OIKARINEN, A., AUTO-HARMAINEN, H. and PIHLAJANIEMI T. 1998. The short and long forms of type XVIII collagen show clear tissue specificities in their expression and location in basement membrane zones in humans. *American Journal of Pathology*, 153: 611–626.

SCHULZ, J.B., WELLER, M. and MOSKOWITZ, M.A. 1999. Caspases as treatment targets in stroke and neurodegenerative diseases. *Annals of Neurology*, 45:421–429

SHICHIRI, M. and HIRATA, Y. 2001. Antiangiogenesis signals by endostatin. *FASEB Journal*, 15(6):1044-53.

SHERIDAN, J.P., MARSTERS, S.A., PITTI, R.M., GURNEY, A., SKUBATCH, M., BALDWIN, D., RAMAKRISHNAN, L., GRAY, C.L., BAKER, K., WOOD, W.I., GODDARD, A.D., GODOWSKI, P. and ASHKENAZI, A. 1997. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*, 277: 818–821.

- SONG, Q., LEES-MILLER, S.P., KUMAR, S., ZHANG, Z., CHAN, D.W. and SMITH, G.C. 1996. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: A target for an ICE-like protease in apoptosis. *The EMBO Journal*, 15: 3238–3246.
- SOOD, A.K., SEFTOR, E.A., FLETCHER, M.S., GARDNER, L.M.G., HEIDGER, P.M., BULLER, R.E., SEFTOR, R.E.B. and HENDRIX, M.J.C. 2001. Molecular determinants of ovarian cancer plasticity. *American Society for Investigative Pathology*, 158: 1279–1288.
- SRINIVASULA, S.M., AHMAD, M., FERNANDES-ALNEMRI, T., LITWACK, G. and AINEMRI, E.S. 1996. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: The Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proceedings of National Academy Science*, 93: 14486–91.
- STADLER, W. and WILDING, G. 2003. Angiogenesis inhibitors in genitpurinary cancers. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 46: 41–47.
- SUGANUMA, M., OKABE, S., MARINO, M.W., SAKAI, A., SUEOKA, E. and FUJIKI, H. 1999. Essential role of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in tumor promotion as revealed by TNF-alpha-deficient mice. *Cancer Reserch*, 59: 4516–8.
- SULLIVAN, R.J. and ATKINS, M.B. 2009. Molecular-targeted therapy in malignant melanoma. *Expert Review Anticancer Therapy*, 9: 567–81.
- SUN, S.Y., YUE, P., HONG, W.K. and LOTAN, R. 2000. Augmentation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by the synthetic retinoid 6-[3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphthalene carboxylic acid (CD437) through up-regulation of TRAIL receptors in human lung cancer cells. *Cancer Resech*, 60: 7149–7155.

- THOMAS, G.M. 1999. Improved treatment for cervical cancer: Concurrent chemotherapy and radiotherapy. *The New England Journal of Medicine*, 340: 1198–1200.
- THOMAS, J.P., ARZOOMANIAN, R.Z., ALBERTI, D., MARNOCHA, R., LEE, F., FRIEDL, A., TUTSCH, K., DRESEN, A., GEIGER, P., PLUDA, J., FOGLER, W., SCHILLER, J.H. and WILDING, G. 2003. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 21: 223–231.
- MILLER, D. K., MOLINEAUX, S. M., WEIDNER, J. R., AUNINS, J. R., ELLISTON, K. O., AYALA, J. M., CASANO, F. J., CHIN, C. J., DING, G. J.-F., EGGER, L. A., GAFFNEY, E. P., LIMJUCO, G., PALYHA, O. C., RAJU, S. M., ROLANDO, A. M., SALLEY, J. P., YAMIN, T.-T., LEE, T. D., SHIVELY, J. E., MACCROSS, M. M., MUMFORD, R. A., SCHMIDT, J. A. and TOCCI, M. J. 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*, 356: 768–774.
- THORNBERRY, N.A., RANO, T.A., PETERSON, E.P., RASPER, D.M., TIMKEY, T. and CALVOM, G. 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 17907 - 17911.
- ULUKAYA, E. 2003. Apoptozis ders notları. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 15–26.
- VASSILOMANOLAKIS, M., KOUMAKIS, G., BARBOUNIS, V., DEMIRI, M., PATERAS, H. and EFREMIDIS, A.P. 2000. Vinorelbine and cisplatin in metastatic breast cancer patients previously treated with anthracyclines. *Annals Oncology*, 11(9): 1155–60.

- VASSILOMANOLAKIS, M., KOUMAKIS, G., DRUFAKOU, S., APERIS, G., DEMIRI, M., BARBOUNIS, V., MISSITZIS, J. and EFREMIDIS, A.P. 2003. Vinorelbine and docetaxel as first-line chemotherapy in metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 51(2): 179–83.
- VICI, P., COLUCCI, G., GEBBIA, V., AMODIO, A., GIOTTA, F., BELLI, F., CONTI F., GEBBIA, N., PEZZELLA, G., VALERIO, M. R., BRANDI, M., PISCONTI, S., DURINI, E., GIANNARELLI D. and LOPEZ M. 2002. First-line treatment with epirubicin and vinorelbine in metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 20(11): 2689–94.
- WEIGEL, M. T., MEINHOLD-HEERLEIN, I., BAUERSCHLAG, O., SCHEM, C., BAUER, M., JONAT, W., MAASS, N. and MUNDHENKE, C. 2009. Combination of imatinib and vinorelbine enhances cell growth inhibition in breast cancer cells via PDGFR signalling *Cancer Letters*, 273: 70–79.
- WEIR B, ZHAO X and MEYERSON M. 2004. Somatic alterations in the human cancer genome. *Cancer Cell*, 6(5): 433-8.
- WELT, A., MINCKWITZ, G. and OBERHOFF, C. 2005. Phase I/II study of capecitabine and vinorelbine in pretreated patients with metastatic breast cancer. *Annals Oncology*, 16(1): 64–9.
- WEN, W., MOSES, M.A., WIEDERSCHAIN, D., ARBISER, J.L. and FOLKMAN, J. 1999. The generation of endostatin is mediated by elastase. *Cancer Research*, 59: 6051–6056.
- WILEY, S.R., SCHOOLEY, K., SMOLAK, P.I., DIN, W.S., HUANG, C.P., NICHOLL, J.K., SUTHEDAND, G.R., SMITH, T.D., RAUCH, C. and SMITH, C.A. 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 3: 673–682.
- XUE, D., SHAHAM, S. and HORVITZ, H.R. 1996. The *Caenorhabditis elegans* cell death protein CED-3 is a cysteine protease with substrate specificities similar

to those of the human CPP32 protease. *Genes and Development*, 10: 1073–1083.

YALCIN, O., ULKER, P., YAVUZER, U., MEISELMAN, H.J. and BASKURT, O.K. 2008. Nitric oxide generation by endothelial cells exposed to shear stress in glass. *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*, 294: H2098–H2105.

YUAN, J., SHAHAM, S., LEDOUX, S., ELLIS, H.M. and HORVITZ, H.R. 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, 75: 641–652.

ZAMBETTI, M., MARIANI, G., DEMICHELI, R., VERDERIO, P., POTEPA, F. And GARBAGNATI, F. 2000. Five-day infusion fluorouracil plus vinorelbine in women with breast cancer previously treated with anthracyclines and paclitaxel. *Breast Cancer Research and Treatment*, 62(2):135–9.

ZEYBEK, N.D., INAN, S., EKERBICER, N., VATANSEVER, H.S., KARAKAYA, J. and MUFTUOGLU, S. 2011. The effects of Gemcitabine and Vinorelbine on inducible nitric oxide synthase (iNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) distribution of MCF-7 breast cancer cells. *Acta Histochemica*, 113: 62–67.

ZHENG, L., FISHER, G., MILLER, R.E., PESCHON, J., LYNCH, D.H. and LENARDO, M.J. 1995. Induction of apoptosis in mature T cells by tumor necrosis factor. *Nature*, 377: 348–51.

ZORNIG, M., HUEBER, A.O., BAUM W. and EVAN, G. 2001. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1551: 1–37.

ZOU, H., HENZEL, W.J., LIU, X., LUTSCHA, A. and WANG, X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C.elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, 90: 405–13.

ÖZGEÇMİŞ

Ayşegül Cansu KİLİT; 1986 yılında Isparta’da doğdu. İlk Öğretimini, Burdur Gazi İlkokulunda tamamladı. Orta ve lise Öğretimini Antalya Metin-Nuran Çakallıklı Anadolu Lisesinde tamamladıktan sonra, 2005 yılında Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nde lisans eğitime başladı. 2009 yılında mezun olduğu Akdeniz Üniversitesi’nde, aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsüne Bağlı Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğretime başladı. 2009 yılı, Eylül ayından beri Yüksek Lisans Eğitime devam etmektedir.