



T.C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FENRETİNİDE MOLEKÜLÜNÜN ANJİYOGENEZ İLE  
İLİŞKİLİ MİKRORNA'LAR ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

Elif Işıl YÜCEL  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN

GAZİANTEP

2019

**T.C.**  
**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

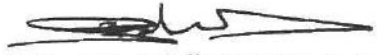
**FENRETİNİDE MOLEKÜLÜNÜN ANJİYOGENEZ İLE İLİŞKİLİ**  
**MİKRORNA'LAR ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**ELİF İŞİL YÜCEL**

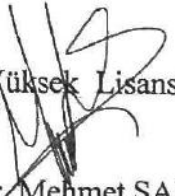
Tez Savunma Tarihi: 13.06.2019  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof.Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir "Yüksek Lisans" derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

  
Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir "Yüksek Lisans" tezi olarak kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN  
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir "Yüksek Lisans" tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi**  
Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN

Dr. Öğr. Üyesi Abu Shameem Md. Saadat KHANDAKAR

Dr. Öğr. Üyesi Elif PALA

  
İmza

## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

**09.05.2019**

**Elif Işıl YÜCEL**

## TEŞEKKÜR

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yaptığım yüksek lisans boyunca, deneyimleri ve bilgisiyle bana destek olan tez Danışmanım Prof. Dr. Mehmet Şahin'e,

Yine deneyimleri ve bilgileri ile yardımcı olan bölümde görevli bütün öğretim üyelerine,

Ayrıca bu süreçte her türlü pratik ve teorik deneyimlerini benim ile paylaşan ve destekleri ile yanımda olan Seçil Eroğlu, Zeynep Ulukütük ile her türlü teknik ve bilişimsel desteği sağlayan Nur Yücel'e,

Yüksek lisans boyunca maddi ve manevi, her şekilde yanımda olan aileme teşekkürü bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------|-----|
| BEYAN.....                                                    | i   |
| TEŞEKKÜRLER.....                                              | ii  |
| İÇİNDEKİLER.....                                              | iii |
| KISALTMALAR VE SİMGELER.....                                  | vi  |
| TABLO LİSTESİ.....                                            | ix  |
| ŞEKİL LİSTESİ.....                                            | x   |
| ÖZET.....                                                     | 1   |
| ABSTRACT.....                                                 | 2   |
| 1.GİRİŞ ve AMAÇ.....                                          | 3   |
| 2.GENEL BİLGİLER.....                                         | 6   |
| 2.1.Anjiyogenez.....                                          | 6   |
| 2.1.1. Anjiyogenez Nedir?.....                                | 6   |
| 2.1.2. Anjiyogenik ve Anti-Anjiyogenik Faktörler.....         | 8   |
| 2.1.2.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF).....       | 9   |
| 2.1.2.2. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF).....                 | 11  |
| 2.1.2.3. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF).....        | 12  |
| 2.1.2.4. Transforme Edici Büyüme Faktörü (TGF- $\beta$ )..... | 12  |
| 2.1.2.5. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF).....                  | 12  |
| 2.1.2.6. Anjiyogenin (Ang).....                               | 13  |
| 2.1.2.7. Hipoksi İndükleyici Faktör (HIF).....                | 13  |
| 2.1.2.8. İnterlökin-8 (IL-8).....                             | 14  |
| 2.1.2.9. Trombospondin-1 ve Trombospondin-2.....              | 15  |
| 2.1.2.10. Anjiyostatin ve Endostatin.....                     | 15  |

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| 2.1.2.11. Vazostatin.....                                | 16 |
| 2.1.2.12. Prolaktin.....                                 | 16 |
| 2.1.2.13. Retinoik Asid.....                             | 16 |
| 2.1.3. Kanser ve Anjiyogenez.....                        | 17 |
| 2.2. mikroRNA.....                                       | 18 |
| 2.2.1. mikroRNA Nedir?.....                              | 18 |
| 2.2.2.mikroRNA ve Kanser.....                            | 20 |
| 2.2.3. mikroRNA ve Anjiyogenez.....                      | 21 |
| 2.3. Fenretinide Molekölü.....                           | 22 |
| 2.3.1. Fenretinide Molekölü Nedir?.....                  | 22 |
| 2.3.2. Fenretinide Molekölü'nün Kanserdeki Etkileri..... | 24 |
| 2.3.3. Fenretinide Molekölü ve Anjiyogenez.....          | 24 |
| 2.3.4. Fenretinide Molekölü ve mikroRNA'lar.....         | 25 |
| 3.GEREÇLER VE YÖNTEMLER.....                             | 26 |
| 3.1.GEREÇLER.....                                        | 26 |
| 3.1.1.Kullanılan Hücre Hattı.....                        | 26 |
| 3.1.2.Kimyasallar ve Çözeltiler.....                     | 26 |
| 3.1.3.Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....                 | 27 |
| 3.2.YÖNTEMLER.....                                       | 27 |
| 3.2.1.Hücre Kültürü.....                                 | 27 |
| 3.2.2.Fenretinide Molekölünün Hazırlanması.....          | 28 |
| 3.2.3.Hücreden RNA İzolasyonu.....                       | 28 |
| 3.2.4.Elde Edilen RNA'nın Kalite ve Miktar Tayini.....   | 29 |

|                                           |    |
|-------------------------------------------|----|
| 3.2.5.RNA'dan cDNA eldesi.....            | 30 |
| 3.2.5.1.Pol(A) Kuyruğu Reaksiyonu.....    | 30 |
| 3.2.5.2.Adaptör Ligasyonu Reaksiyonu..... | 30 |
| 3.2.5.3.Rt Reaksiyonu.....                | 31 |
| 3.2.5.4.miR-Amp Reaksiyonu.....           | 32 |
| 3.2.6.Primer Seçimi.....                  | 32 |
| 3.2.7. miRNA qRT-PCR .....                | 33 |
| 3.2.8.Hücre Proliferasyonu.....           | 34 |
| 3.2.9.Hücre Migrasyonu.....               | 34 |
| 3.2.10.Kapiller Benzeri Tüp Oluşumu.....  | 35 |
| 3.2.11.Gen qRT-PCR .....                  | 36 |
| 3.2.12. İstatistiki Değerlendirme.....    | 37 |
| 4.BULGULAR.....                           | 38 |
| 4.1.Hücre Proliferasyonu.....             | 38 |
| 4.2.Hücre Migrasyonu.....                 | 39 |
| 4.3.Kapiller Benzeri Tüp Oluşumu.....     | 41 |
| 4.4.miRNA Taraması.....                   | 42 |
| 4.5.Gen Tarama Sonuçları.....             | 44 |
| 5.TARTIŞMA.....                           | 47 |
| 6.KAYNAKLAR.....                          | 51 |

## KISALTMALAR ve SİMGELER

|               |                                           |
|---------------|-------------------------------------------|
| VEGF          | Vasküler endotelyal büyüme faktörü        |
| TGF           | Transforme edici büyüme faktörü           |
| PDGF          | Trambosit kökenli büyüme faktörü          |
| TNF- $\alpha$ | Tümör nekrozis faktör- $\alpha$           |
| IL            | İnterlökinler                             |
| FGF           | Fibroblast büyüme faktörü                 |
| VEGF-A        | Vasküler endotelyal büyüme faktörü-A      |
| miRNA         | mikro RNA                                 |
| mRNA          | mesajcı RNA                               |
| 3' UTR-5' UTR | 3'-5' untranslation region                |
| RAR           | Retinoik asit reseptörleri                |
| RXR           | Retinoid X reseptörleri                   |
| MMP           | Matriks metaloproteinaz                   |
| PA            | Plazminojen aktivatör                     |
| PIGF          | Plasenta büyüme faktöründen               |
| VEGFR-1       | VEGF reseptörü-1                          |
| VEGFR-2       | VEGF reseptörü-2                          |
| NP-1 ve NP2   | Nöropilin reseptörlerini 1 ve 2           |
| uPA           | Ürokinaz plazminojen aktivatörü           |
| tPA           | Serin proteazları                         |
| FGF-1         | Fibroblast büyüme faktörü-1               |
| FGF-2         | Fibroblast büyüme faktörü-2               |
| FGFR-1        | Fibroblast büyüme faktör reseptörü-1      |
| FGFR-4        | Fibroblast büyüme faktörü-4               |
| HSPG          | Heparan sülfat proteoglikanlardır         |
| EGF           | Epidermal büyüme faktörü                  |
| HIF           | Hipoksi ile indüklenen faktör             |
| TGF- $\alpha$ | Transforme edici büyüme faktörü- $\alpha$ |
| TGF- $\beta$  | Transforme edici büyüme faktörü- $\beta$  |
| HGF           | Hepatosit büyüme faktörü                  |
| IL-8          | İnterlökin-8                              |
| GCSF          | Granülosit koloni uyaran faktör           |

|                 |                                              |
|-----------------|----------------------------------------------|
| PI3K / Akt      | Fosfatidilinositid 3-kinaz / protein kinaz B |
| ERK1 / 2        | Hücre dışı sinyal düzenleyen kinaz-1/2       |
| Ang             | Anjiyostatin                                 |
| TF              | Transkripsiyon faktörleri                    |
| HIF-1           | Hipoksi ile indüklenen faktör-1              |
| HIF-1 $\alpha$  | Hipoksi ile indüklenen faktör-1 $\alpha$     |
| HIF-1 $\beta$   | Hipoksi ile indüklenen faktör-1 $\beta$      |
| HRE             | Hipoksi duyarlı elemanlar                    |
| ATP             | Adenozin trifosfat                           |
| pH              | Power of Hydrogen                            |
| CXCR1           | Kemokin reseptörü-1                          |
| CXCR2           | Kemokin reseptörü-2                          |
| NF- $\kappa$ B  | Nükleer faktör- $\kappa$ B                   |
| TSP-1           | Trombospondin-1                              |
| TSP-2           | Trombospondin-2                              |
| CD47 ve CD36    | İntegrin ile ilişkili proteinler             |
| NO              | Nitrik oksit                                 |
| Bcl-2 ve Bcl-XL | Antiapoptotik proteinler                     |
| PRL             | Prolaktin                                    |
| PHD2            | Prolil hidroksilaz domaini protein 2         |
| VHL             | Von Hippel-Lindau                            |
| PA-1            | Plazminojen aktivatörü-1                     |
| EPO             | Eritropoietin                                |
| FOXM1           | Forkhead box M1                              |
| CDH5            | Kadherin 5                                   |
| eNOS            | Nitrik oksit sentaz                          |
| GLUT-1          | Glukoz taşıyıcısı-1                          |
| RNA pol II      | RNA polimeraz II                             |
| pri-miRNA       | Öncü miRNA                                   |
| AGO2            | Argonat proteini                             |
| siRNA           | Kısa girişimci RNA                           |
| Onkomir         | Onkogenik miRNA                              |
| ECM             | Ekstrasellüler matriks                       |
| EC              | Endotel hücreler                             |

CAM

Civciv korioallantoik zarı

KS

Kaposis sarkoma

KLL

Kronik lenfositer lösemi



## TABLÖLER

### Sayfa numarası

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 1: Anjiyogenezin fizyolojik mekanizması.....                          | 6  |
| Tablo 2: Anjiyogenik faktörler.....                                         | 9  |
| Tablo 3: Anti-anjiyogenik faktörler.....                                    | 14 |
| Tablo 4: Pol(A) bileşen oranları.....                                       | 30 |
| Tablo 5: Pol(A) PCR döngü ve sıcaklık ayarları.....                         | 30 |
| Tablo 6: Adaptör ligasyon reaksiyonu bileşenlerinin oranları.....           | 31 |
| Tablo 7: Adaptör ligasyon reaksiyonu PCR sıcaklık ve zaman ayarı.....       | 31 |
| Tablo 8: RT Reaksiyon bileşen oranları.....                                 | 31 |
| Tablo 9: RT PCR sıcaklık ve zaman ayarı.....                                | 32 |
| Tablo 10: miR-Amp reaksiyon bileşenlerinin oranları.....                    | 32 |
| Tablo 11: miR-Amp PCR sıcaklık ve zaman ayarı.....                          | 32 |
| Tablo 12: miRNA için qRT-PCR bileşen oranları.....                          | 33 |
| Tablo 13: miRNA için qRT-PCR tepkime koşulları.....                         | 34 |
| Tablo 14: Genler için gerçekleştirilen qRT-PCR bileşen oranları.....        | 36 |
| Tablo 15: Genler için gerçekleştirilen qRT-PCR tepkime koşulları.....       | 36 |
| Tablo 16: Fenretinide molekülünün miRNA miktarları üzerindeki etkileri..... | 44 |

## ŞEKİLLER

### Sayfa numarası

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Anjiyogenez aşamaları.....                                                                              | 7  |
| Şekil 2. VEGF reseptör ve ligandları.....                                                                        | 11 |
| Şekil 3. Tümör ve normal dokuda damarlaşmanın farkları .....                                                     | 18 |
| Şekil 4. miRNA biyogenezi.....                                                                                   | 20 |
| Şekil 5. Fenretinide molekülünün kimyasal yapısı.....                                                            | 23 |
| Şekil 6. Fenretinide molekülünün hücrelerin doluluk oranına yüzde (%) bazında etkisi.....                        | 38 |
| Şekil 7. Fenretinide molekülü muamele öncesi açılan boşluklar.....                                               | 39 |
| Şekil 8. Fenretinide molekülünün migrasyona etkisi.....                                                          | 40 |
| Şekil 9. Fenretinide molekülü ile muamele öncesi ve sonrası boşlukların dolma oranı.....                         | 40 |
| Şekil 10: Fenretine molekülünün kapiller benzeri tüp oluşumu üzerindeki etkileri .....                           | 41 |
| Şekil 11: Fenretinide molekülü muamelesi ile oluşan tüplerin uzunluklarının piksel olarak karşılaştırılması..... | 42 |
| Şekil 12. Fenretinide molekülünün miR-10b miktarına etkisi.....                                                  | 43 |
| Şekil 13. Fenretinide molekülünün miR-126 miktarına etkisi.....                                                  | 43 |
| Şekil 14. Fenretinide molekülünün eNOS geninin ekspresyonu üzerindeki etkileri.....                              | 45 |
| Şekil 15. Fenretinide molekülünün CDH5 geninin ekspresyonu üzerindeki etkileri....                               | 46 |
| Şekil 16. Fenretinide molekülünün FOXM1 geninin ekspresyonu üzerindeki etkileri..                                | 46 |

## ÖZET

### FENRETİNİDE MOLEKÜLÜNÜN ANJİYOGENEZ İLE İLİŞKİLİ MİKRORNA'LAR ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Elif Işıl YÜCEL

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN

Haziran 2019, 66 sayfa

Anjiyogenez çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullarda rol oynayan yeni damar oluşum prosesidir. Bu süreç organizmadaki pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik mediatörler arasındaki denge ile kontrol edilmektedir. Solid tümörün büyümesi ve metastazı için anjiyogeneze ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, kanserlerde anti-anjiyogenik tedavi yaklaşımı ilgi çekici bir seçenek olarak görülmektedir. Fenretinide sentetik bir retinoik asit analogu olup anjiyogeneze karşı etkileri birkaç çalışmada bildirilmesine rağmen moleküler mekanizmasının aydınlatılması yönünde eksikler bulunmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada fenretinide molekülünün anjiyogenez ile ilişkili bazı miRNA'lar ve CDH5, FOXM1 ve eNOS genleri üzerindeki etkilerini araştırmak amaçlanmıştır. Ayrıca bu molekülün HUVEC hücre proliferasyonuna, hücre migrasyonuna ve kapiller benzeri tüp oluşumuna etkileri gösterilmiştir. Çalışmamızda 24 ve 48 saatlik sürelerde hücrelere uygulanan fenretinide molekülünün doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu, hücre migrasyonunu ve tüp oluşumunu baskıladığı görülmüştür. Fenretinide'nin miRNA'lar ve belirtilen genler üzerine etkilerini incelemek için, 1  $\mu$ M ve 5  $\mu$ M konsantrasyonlar ile muamele edilen hücrelerden total RNA izolasyonu yapıldı. Bu RNA'lar ile gerçekleştirilen eş zamanlı PCR analizi sonucunda, miR-10b'nin anlamlı olarak azaldığı, miR-126'nın ise arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, çalışmamızda fenretinide ile muamele edilen endotel hücrelerinde CDH5, FOXM1 ve eNOS genlerinin seviyelerinde anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür. Yaptığımız bu çalışma, fenretinide molekülünün anjiyogenez üzerine gösterdiği baskılayıcı rollerinin moleküler mekanizmasını aydınlatmak için literatüre destek olabilecektir.

**Anahtar sözcükler:** Anjiyogenez, Fenretinide, CDH5, eNOS, FOXM1, miRNA

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE EFFECT OF FENRETINIDE MOLECULE ON miRNAs KNOWN TO BE EFFECTIVE IN ANGIOGENESIS

Elif Işıl Yücel

Master of Science Department of Medical Biology

Supervisor Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN

June 2019, 66 pages

Angiogenesis is a new vessel formation process that plays a role in various physiological and pathological conditions. This process is controlled by the balance between pro-angiogenic and anti-angiogenic mediators in the organism. Angiogenesis is needed for the growth and metastasis of solid tumor. Therefore, the anti-angiogenic treatment approach is seen as an interesting option in cancers. Fenretinide is a synthetic retinoic acid analog and its effects against angiogenesis has been reported in several studies but there are deficiencies in the elucidation of its molecular mechanism. In this study, we aimed to investigate the effects of the fenretinide molecule on some miRNAs and CDH5, FOXM1 and eNOS genes associated with angiogenesis. In addition, the effects of this molecule on HUVEC cell proliferation, cell migration and capillary-like tube formation were shown. In our study, it was observed that the fenretinide molecule applied to the cells in 24 and 48 hour periods suppressed cell proliferation, cell migration and tube formation depending on dose. Total RNA was isolated from cells treated with 1  $\mu$ M and 5  $\mu$ M concentrations to investigate the effects of fenretinide on miRNAs and indikatalog noed genes. As a result of simultaneous PCR analysis which is made with these RNAs, it was found that miR-10b decreased significantly and miR-126 increased. In addition, in our study, a significant decrease was observed in the levels of CDH5, FOXM1 and eNOS genes in endothelial cells treated with fenretinide. This study may support the literature to illuminate its molecular mechanism of suppressor roles of the fenretinide molecule on angiogenesis.

**Key words:** Angiogenesis, CDH5, eNOS, Fenretinide, FOXM1, miRNA

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Anjiyogenez, yeni kan damarlarının oluştuğu temel fizyolojik bir sũreçtir. Yara iyileşmesi, bũyũme, folikũl gelişimi, menstrual dũngũ ve hamilelikte implantasyon gibi birũok fizyolojik durumda gereklidir (1). Anjiyogenez sadece fizyolojik koşullar altında değil, diyabetik retinopati, romatoid artrit ve kanser gibi œeřitli hastalıklarda da ȃnemli bir biyolojik sũreçtir (2). Anjiyogenezin normal koşullar altında sıkı bir kontrolũ vardır. Gereken koşullarda, kısa sũreliđine aktive edilir ve daha sonra tekrar baskılanır. Bũylece, kontrolsũz damar oluşumu engellenmeye œalıřılır. Fakat patofizyolojik durumlarda bu kontrol aksayabilmektedir (1).

Anjiyogenezi uyaran birũok biyokimyasal molekul tanınlanmıştır (3). Ȗrnek olarak; vaskũler endotelyal bũyũme faktȃrũ (VEGF) ailesinin ũyeleri, anjiyopoietinler, transforme edici bũyũme faktȃrleri (TGF), trombosit kȃkenli bũyũme faktȃrũ (PDGF), tũmȃr nekrozis faktȃr- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interlȃkinler (IL) ve fibroblast bũyũme faktȃrũ (FGF) ailesinin ũyelerini verebiliriz. Vaskũler endotelyal bũyũme faktȃrũ-A (VEGF-A) bugũne kadar etkisi en iyi bilinen pro-anjiyogenik proteindir (4). Endotel hũcrelerin proliferasyonunu, filizlenmesini ve tũp oluşumunu uyarır (2). Pro-anjiyogeniklerin yanı sıra anjiyogenezi inhibe eden anti-anjiyogenik olarak bilinen biyokimyasal molekũller de mevcuttur. Bu molekũllerden en iyi bilineni angiostatindir (4). Plazminojenin proteolitik bir parœası olan angiostatin, endotelyal hũcreler ũzerinde gũçlũ bir antiproliferatif etkiye sahiptir. Bu peptidin farelerde primer tũmȃrlerin bũyũmesini baskıladığı bildirilmiştir (3).

Tũmȃr bũyũmesi ve metastaz anjiyogeneze bağlıdır (2). Bir tũmȃr, bũyũmek iœin yeni kılcal kan damarlarının oluşumunu sũrekli olarak uyarır. Ayrıca, bir tũmȃre gȃmũlen yeni kan damarları, tũmȃr hũcrelerinin dolaşıma girmesini ve karaciğer, akciğer, kemik gibi uzak dokulara metastaz yapması iœin bir ađ geœidi sağlar (1).

Tũmȃre besin ve oksijen desteğinin kesilmesi iœin anjiyogenezi baskılamaya yȃnelik olarak ȃrneđin, bevacizumab (Avastin®), Sunitinib (Sutent®) ve Pazopanib (Votrient®) gibi ilaœ tedavileri kullanılmaktadır (5, 6, 7). Kullanılan bu ilaœların sınırlı etkinlikleri ve ilaca geliştirilen direnœ henũz aşılmamış zorluklar olarak karşımıza çıkmaktadır (4).

Bu yüzden farklı anjiyogenez inhibitörleri yoğun olarak araştırılmaktadır. Anjiyogenez biyolojisinin daha iyi anlaşılması ile yeni inhibitörlerin keşfi mümkün olabilir ve bu karmaşık süreçle ilişkili kanser tedavisinde yeni hedefler ortaya çıkabilir (4).

İnsan genomunun sadece yaklaşık %2'si protein kodlamaktadır. Geri kalan kodlamayan kısmın bir bölümünün epigenetik düzenleyiciler olarak davrandığı bilinmektedir. MikroRNA (miRNA)'lar, genom üzerinde protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkripsiyonu sağlanan, fakat proteine translasyonu gerçekleştirilmeyen, fonksiyonel RNA molekülleridir (8). Kısa RNA'lar olarak bilinen miRNA'lar yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda tek zincirli kodlamayan RNA'lardır. Hedefledikleri genlerin mRNA'larının 3'-UTR ya da 5'-UTR (translasyona uğramayan bölge; untranslated region) bölgesiyle etkili bir baz eşleşmesi yaparak, mRNA'nın yıkımına ya da proteine çevrilmesinin (translasyon) baskılanmasına sebep olurlar (8, 9). miRNA'lar hücre çoğalması, gelişim ve farklılaşma, anjiyogenez, hücre metabolizması, kromatin yapısının modülasyonu, transkripsiyon ve translasyon sonrası süreçlerin düzenlenmesi ve epigenetik modifikasyonlar gibi hücresel ve moleküler biyolojik süreçlerinin hemen hemen her alanında düzenleyiciler olarak yer alırlar (10)

Fenretinide, sentetik olarak üretilmiş bir retinoik asit analogudur. Retinoik asit izomerleri gelişimde ve hücre farklılaşmasında rol oynayan nükleer hormon reseptör ligandlarıdır (11).

Etkilerini retinoik asit reseptörleri ve retinoid X reseptörler (RAR/RXR) üzerinden gerçekleştirirler. Sentetik olarak üretilmiş türev bir molekül olan fenretinide'nin, meme kanserinde anti-proliferatif özelliğinin olduğu kanıtlanmış ve anti-anjiyogenik olabileceği bazı çalışmalar ile desteklenmiştir (11, 12, 13, 14). Fenretinide özellikle tümör anjiyogenezini engellemekte ve tümör büyümesini yavaşlatarak ilerlemesini baskılamaktadır (11).

Yapılan az sayıdaki çalışma ile fenretinide molekülünün kapiller benzeri tüp oluşumu, hücre proliferasyonu ve hücre göçünü baskılayıcı özelliği bildirilmiştir (15,16). Fenretinide, günümüzde prostat kanserine karşı kemopreventif olarak ve kontralateral meme kanseri gelişme riski olan kadınlarda, oral olarak kullanılmaktadır.

Bu molekül, RAR'a bağlanır ve reseptörü aktive eder, böylece bazı tümör hücre tiplerinde hücre farklılaşmasını ve apoptozisi indükleyebilmektedir. Bu reaktifin ayrıca anjiyogenezle ilişkili büyüme faktörlerini ve reseptörlerini modüle ederek, tümör büyümesini inhibe ettiği ve retinoid reseptörden bağımsız apoptotik özellikler sergilediği de gösterilmiştir (17).

Birçok miRNA'nın pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik özellikleri bulunmuş olup, büyük bir kısmının ise etkileri hâlâ araştırılmaktadır. Örneğin, miR-9 endotelial hücrelerde, pro-anjiyogenik olduğu kanıtlanmış, nadir çalışılan miRNA'lardan biridir (18). Bununla beraber, en çok araştırma anti-anjiyogenik miRNA'lar üzerinde yapılmıştır. Bunlardan bazıları miR-206, miR-126, miR-29c, let-7a ve miR-340' dur (19, 20, 21, 22, 23).

Bu çalışmada, fenretinide molekülünün anjiyogenezdeki etkileri ortaya konulmuş miRNA'lar üzerindeki etkileri ve eNOS, FOXM1 ve CDH5 genleri üzerinde etkileri gösterilmiştir.



## 2. GENEL BİLGİLER

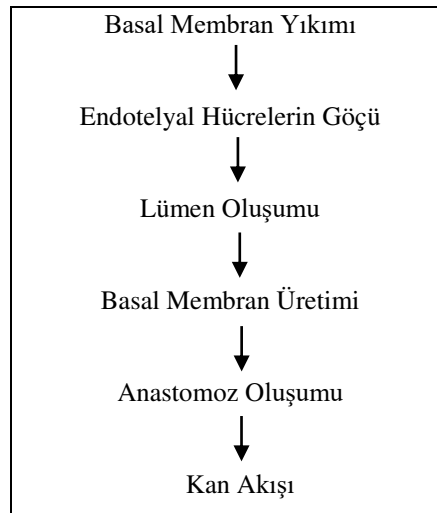
### 2.1. Anjiyogenez

#### 2.1.1. Anjiyogenez nedir?

Besin maddelerinin ve oksijenin dokulara ve hücrelere ulaştırılması ve canlıların metabolik faaliyetlerinin gerçekleşmesi için geniş bir damar ağına ihtiyaç vardır (24). Kan damarları, vücuttaki işlevlerini yansıtan farklı morfolojik yapılara sahip arterler, venler ve kılcal damarlar olarak düzenlenirler (24).

Vasküler sistem iki farklı süreçte gerçekleşir: vaskülojenez ve anjiyogenez (25). Kan damar sisteminin ortaya çıkması olarak bilinen vaskülojenez, embriyogenezdeki en erken olaylardan biridir (3). Erken embriyonik gelişim sırasında, mezodermal hücreler gelişimin ilerki safhalarında endotelial hücreleri oluşturacak olan anjiyoblastlara dönüşürler. Anjiyoblastlar ise kan damarlarının oluşumuna yol açan hematopoietik ve endotelial hücrelerin progenitörleri olan hemanjiyoblastlara dönüşürler (26).

**Tablo 1:** Anjiyogenezin fizyolojik mekanizması

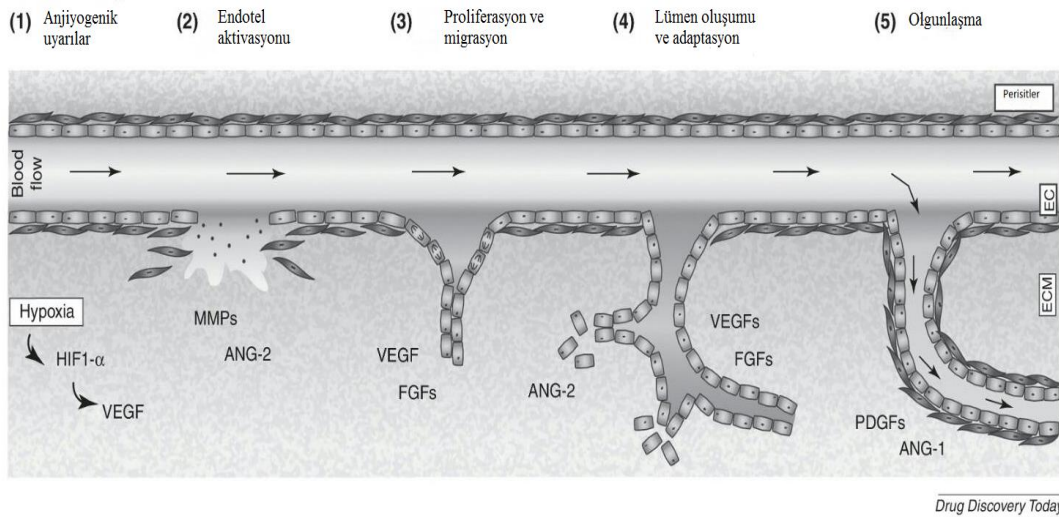


Yetişkinlerde yeni kan damarlarının büyümesi arteriyogenez ve anjiyogenez ile meydana gelmektedir (1,3).

Arteriyogenez, kollateral damarların büyümesi olarak tanımlanırken anjiyogenez ise var olan kan damarlarından yeni damarlar oluşması olarak tanımlanmaktadır (1,3). Karmaşık bir mekanizmaya sahip olan anjiyogenez süreci filizlenme yoluyla veya filizlenme gerçekleşmeksizin iki şekilde gerçekleşir (27).

Filizlenme olmadan gerçekleşen anjiyogenez mekanizmaları ile ilgili fazla bir bilgi olmamasına rağmen, var olan kan damarlarındaki endotel hücrelerinin çoğalması ve ekstraselüler matriksin yeniden oluşumu ile gerçekleşmesi olarak bilinir (28). Bu sürecin sonucunda varolan damar ikiye ya da daha çok kılcal damarlara bölünür. Bu anjiyogenez mekanizması genelde organogenez esnasında akciğerde görülür (28).

Filizlenme ile gerçekleşen anjiyogenezin başlangıcı, bazal membranı oluşturan proteoglikanlar (heparan sülfat vb.) ve glikoproteinler (lamin, kollajen) gibi bileşenlerin proteaz enzimleri ile yıkımı ile başlar (29). Membrandaki hücrelerde bir çoğalma meydana gelmesi için endotel hücreleri uyarılır. Normal zamanda, yayılma göstermeyen ve tek tabaka oluşturan endotel hücreleri, anjiyogenez esnasında yayılma gösterirler (Tablo 1 ve Şekil 1) (30). Hasarlı veya normal dokuda salgılanan anjiyogenik büyüme faktörleri, yakın dokulara difüze olur (31).



Şekil 1. Anjiyogenez aşamaları (32).

Endotelial hücreler, yeni damar oluşumundaki temel hücrelerdir. Perisitler ve endotel hücreleri bir araya gelerek kapiller damarların duvarlarını oluştururlar ve bunun için gerekli olan genetik bilgiyi taşırlar (1,33). Anjiyogenik büyüme faktörleri, var olan damarların endotel hücrelerindeki kendilerine özgü reseptörlerine bağlanırlar (26).

Reseptöre bağlanan büyüme faktörleri tarafından aktive edilen proteolitik enzimler, endotel hücrelerin ve bazal membranın düzenini sağlayan ekstraselüler matriks (ECM) yapısının yıkılmasını sağlarlar. ECM ile etrafındaki endotel hücrelerinden salgılanan birçok büyüme faktörü ve buralardaki reseptörleri ile sitokinler, anjiyogeneizde önemli rollere sahiptirler (31). ECM'nin yıkımından sonra, endotel hücrelerin uyarımı ve kapiller filizlenme meydana gelir (30). Anjiyogenik uyarı ile oluşturulan proteolitik yıkımdan hemen sonra endotel hücreleri aktive olur (31). Endotel hücrelerinin göçü için matriks metaloproteinaz (MMP) ve plazminojen aktivatörün (PA) birlikte aktive olmasını gerekir (34,35). ECM'ye göç eden endotel hücreleri çoğalır. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) bu sürecin en önemli anjiyogenik faktörüdür (36). Çoğalan endotel hücrelerin ECM bileşenleriyle bir araya gelmesi için gerçekleşen ekstraselüler proteolizin ortadan kaldırılması gereklidir (37). Ortadan kalkan proteoliz sayesinde endotelin göçü ile hücreler arasında damar oluşturacak lümenler gelişir (37). Bu sayede, sırayla gerçekleşen aktivasyon ve inhibisyonlar sonucu kapiller yapı oluşur. Endotel hücrelerin göçünün gerçekleşmesi ve perisitlerin toplanması ile yeni bazal membran oluşur. Anjiyogenik faktörler damar olgunlaşmasıyla azalırken, anti-anjiyogenik faktörlerde artış gözlenir. Bu sayede, endotel hücrelerin ilerlemesi durur ve kan akımına hazır damarlar son halini almış olur (38).

Anjiyogeneze yara iyileşmesi gibi fizyolojik durumlarda çok sıkı denetlenir ve bunun dışındaki süreçlerde çok sınırlı gerçekleşir (39). İhtiyaç duyulduğu anda aktive edilip işlem sonlandığında hemen inhibe edilen anjiyogenezin bu sıkı denetimi birçok büyüme faktörü ve düzenleyici proteinler tarafından gerçekleştirilir (1). Bu aktivasyon-inhibisyon mekanizmasında çıkan herhangi bir aksama çeşitli patolojik durumları ortaya çıkarabilir (31).

Anjiyogenezin bu sıkı denetimi, birçok gen tarafından kontrol edilir. Bu genlerden en önemlileri VEGF, fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi büyüme faktörleridir. Bunun dışında onkogenik transkripsiyon faktörü forkhead box M1 (FOXM1), endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve cadherin 5 (CDH5) gibi genlerin de anjiyogenezi etkilediği bilinmektedir. Aşırı eksprese edildiğinde anjiyogenezi arttırdığı bilinen CDH5, eNOS ve FOXM1 genleri pro-anjiyogeniktir (145, 149, 150).

### **2.1.2. Anjiyogenik ve Anti-Anjiyogenik Faktörler**

Anjiyogenezin moleküler mekanizmasını anlaşılması için büyüme faktörleri kullanımı konusunda uzun yıllar yoğun çalışmalar yapılmıştır (4).

Bu alışmalar sonucunda anjiyogenez ile ilişkili birçok molekül bulunmuştur. Bu molekülleri anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler olarak ikiye ayırabiliriz (Tablo 2 ve Tablo 3) (40).

**Tablo 2:** Anjiyogenik faktörler

| <b>Anjiyogenik Faktörler</b>                               |
|------------------------------------------------------------|
| VEGF (Vasküler endotelyal büyüme faktörü)                  |
| FGF (Fibroblast büyüme faktörü)                            |
| FGF-3 (Fibroblast büyüme faktörü-3)                        |
| FGF-4 (Fibroblast büyüme faktörü-4)                        |
| EGF (Epidermal büyüme faktörü)                             |
| HIF ( Hipoksi ile indüklenen faktör)                       |
| PGF (Plasental büyüme faktörü)                             |
| TGF- $\alpha$ (Transforme edici büyüme faktörü- $\alpha$ ) |
| TGF- $\beta$ (Transforme edici büyüme faktörü- $\beta$ )   |
| HGF (Hepatosit büyüme faktörü)                             |
| IL-8 (İnterlökin-8)                                        |
| PDGF (Trambosit kaynaklı büyüme faktörü)                   |
| TNF- $\alpha$ (Tümör nekroz faktör- $\alpha$ )             |
| GCSF (Granülosit koloni uyaran faktör)                     |
| Proliferin                                                 |
| Anjiyogenin                                                |

#### **2.1.2.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)**

VEGF ailesi, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve plasenta büyüme faktörü (PGF) olarak beş ayrı büyüme faktöründen oluşmaktadır (41). Kromozom 6' nın kısa kolu üzerinde yer alan VEGF geni, sekiz ekzondan oluşur. Ayrıca, aminoasit sayısına göre de beş farklı izoformu bulunmaktadır. Bunlar; VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 ve VEGF206'dır (3).

VEGF165, baskın izoformu olup çeşitli solid tümörlerde fazla sentezlenir. Çeşitli kanser tiplerindeki vaskülarizasyon için en etkili izoformunun VEGF189 olduğu düşünülmektedir (42).

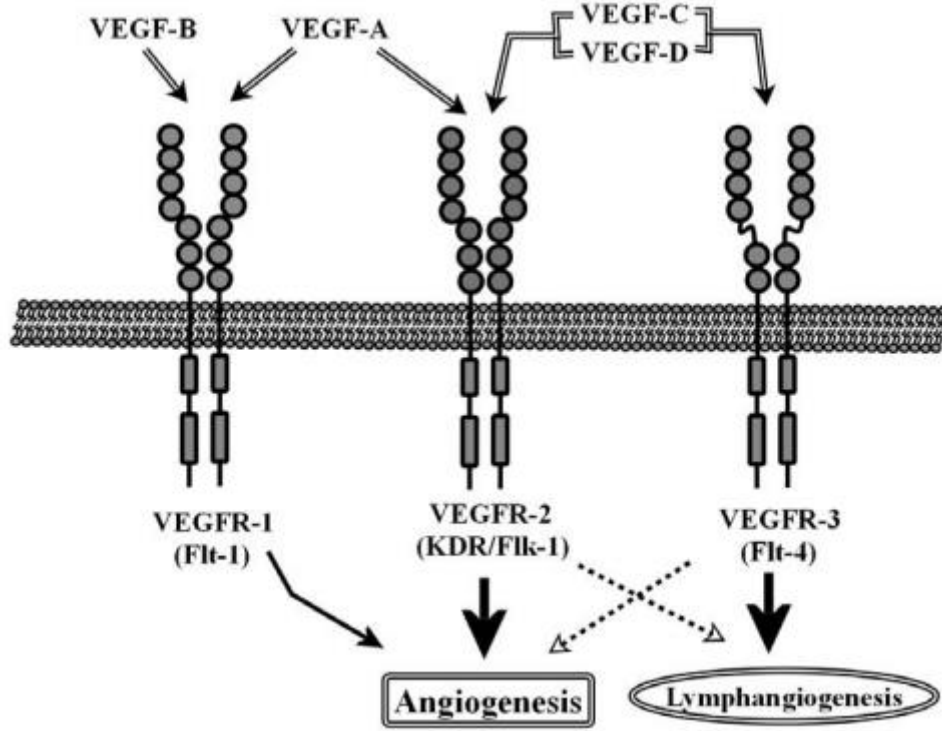
VEGF-A, hücre yüzeyi reseptörleri ile etkileşime girer (43). Bu reseptörler, transmembran tirozin kinaz reseptörleri olup endotel hücreler üzerinde seçici olarak eksprese edilen VEGF reseptörü-1 (VEGFR-1), VEGF reseptörü-2 (VEGFR-2) ile nöronlar ve vasküler endotelium üzerinde eksprese edilen nöropilin reseptörlerini (NP-1 ve NP2) içerir (Şekil 2) (43).

VEGF-A' nın hücre yüzeyindeki reseptöre bağlanması ile hücre içi reseptör tirozin kinazların dimerizasyonu ve otofosforilasyonundan sonra aşağı akım proteinleri dizisi aktive edilir. VEGFR-2, VEGF-A' nın pro-anjiyogenik etkilerine aracılık etmekte sorumlu ana reseptör gibi görünmektedir (Şekil 2) (41,46). VEGF-A, bugüne kadar tarif edilen en güçlü pro-anjiyogenik moleküldür. Endotel hücrelerin proliferasyonunu, filizlenmesini ve tüp oluşumunu indükler (45). Ayrıca VEGF-A, yara iyileşmesi, ovulasyon, kan basıncının korunması, menstrasyon döngüsü ve hamilelik de dâhil olmak üzere önemli sayıda anjiyogenik işlemi etkilediği bilinmektedir (46).

VEGFR-1' e bağlanan VEGF-B' nin in vivo mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen yapılan nakavt fare çalışmalarında anjiyogenezi destekleyici bir rol üstlendiği gösterilmiştir (47).

VEGF-C ve VEGF-D, VEGF-A ile daha az benzerlik gösterirler (48). Her iki büyüme faktörü de anjiyogenezi in vitro ve in vivo olarak uyarmaktadır (49,50). Bu büyüme faktörleri, hem embriyonik hem de erişkin gelişiminde anjiyogenezin düzenlenmesinden sorumludur (4).

VEGF ailesi ayrıca kan damarlarının geçirgenliğinde önemli bir rol oynar. Vazodilatasyon ve yara iyileşmesi sırasında yeni kan damarı büyümesini stabilize ettiği gösterilmiştir. Bundan dolayı, VEGF tedavilerinin klinik ortamlarda uygulanması, kısmen tedavinin neden olduğu vasopermeabiliteye bağlı olarak sınırlı kalmıştır (51). Kritik ekstremité veya miyokardiyal iskemide anjiyogenezi güçlendirmek için rekombinant VEGF-A kullanılarak birkaç klinik çalışma gerçekleştirilmiştir (52, 53, 54). Ancak VEGF tedavisinin klinik yararları sınırlıdır ve daha ileri çalışmalar yapılmamıştır. VEGF' nin etkileri, sadece endotel hücrelerin mitojenik aktivasyonunu değil, aynı zamanda bazı serin proteazların (uPA ve tPA) ve kolajenazların indüklenmesini, artmış endotel kemotaksiyi ve vazodilatasyonu da kapsamaktadır (49).



Şekil 2. VEGF reseptör ve ligandları (55).

#### 2.1.2.2. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

Fibroblast büyüme faktörleri (FGF), anjiyogenezde önemli bir rol oynadığı düşünülen heparin bağlayıcı protein mitojenlerdir. FGF, en az 18 üye ile geniş bir büyüme ve farklılaşma faktörleri ailesini temsil eder. En önemlisi, %50'den fazla yapısal homolojiyi paylaşan FGF-1 ve FGF-2'dir. Her iki tip faktörün de proliferasyonu ve migrasyonu arttırdığı, ayrıca plazminojen aktivatörü ve kollajenaz üretimini uyararak endotelial hücrelerin fonksiyonlarını modüle ettiği ve apoptozisi inhibe ettiği bilinmektedir (3, 56, 57).

FGF için hem yüksek hem de düşük afiniteli reseptörler vardır. Yüksek afiniteli reseptör ailesi, tirozin kinaz reseptörleri olan ve sinyal fonksiyonları gösteren FGFR-1 ve FGFR-4 ile temsil edilir (58). Düşük afiniteli reseptörler, ligandın stabilizasyonunda rol oynarlar ve bunların çoğu heparan sülfat proteoglikanlardır (HSPG). Ayrıca biyolojik sıvılar ve ECM alanında çözünebilir formda bulunurlar (59).

ECM'nin yıkılması anjiyogenez sürecinin ilk aşamalarında önemli bir adımı temsil eder. Plazmin-PA sistemi ve MMP'ler bu yıkılma işbirliği yaparlar (60).

uPA plazminojeni, fibrin ve diğer matriks proteinlerini yıkan bir serin proteaz olan plazmine dönüştürür ve birkaç MMP'yi aktive eder (61).

FGF1, FGF2 ve FGF4 ekstrasellüler bölgede uPA ve MMP'lerin üretimini artırır (62). Ayrıca, FGF'ler, EC yüzeyi üzerindeki uPA reseptörünün ekspresyonunu modüle eder ve hücre göçünün olduğu tarafa doğru proteolitik yıkımı başlatır (62).

#### **2.1.2.3. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)**

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) başlangıçta trombositlerden tanımlandıktan sonra keratinositler, fibroblastlar, astrositler, epitelyal hücreler ve diğer hücre tiplerinde de tanımlanmıştır (45). PDGF'ler, A ve B zincirlerinden oluşan heterodimerler (PDGF-AB) veya homodimerler (PDGF-AA veya PDGF-BB) olarak bulunurlar. Son araştırmalarda, preosteoklastlar tarafından salgılanan trombosit kaynaklı büyüme faktörü-BB (PDGF-BB)'nin anjiyogenezi düzenlediği gösterilmiştir (63).

PDGF reseptörleri,  $\alpha$  ve  $\beta$  alt tiplerinin yaptığı komplekslerden oluşur. Shc, Nck, Crk ve GAB gibi diğer bağdaştırıcıları bağlayarak çok sayıda farklı alt akış sinyalleme molekülü ile etkileşimlere aracılık eder (64,65). Bu sinyal yollarının aktivasyonu, hücre canlılığı, proliferasyon, anjiyogenez ve hücre göçüne yol açar (20).

#### **2.1.2.4. Transforme Edici Büyüme Faktörü- $\beta$ (TGF- $\beta$ )**

Transforme edici büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), ilk olarak insan plasentasından saflaştırılarak karakterize edilmiştir (66). TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 ve TGF- $\beta$ 3 gibi yüksek oranda homolojiye sahip izoformları vardır.

TGF- $\beta$ 'nin hücre proliferasyonunu in vitro olarak uyardığı gösterilmiş olup, hücre tipi ve kültür koşullarına bağlı olarak hücresel farklılaşmayı ve hücre göçünü engellediği veya başlattığı gösterilmiştir (67). Engelleyici etki oldukça geniş olup, epitelyal, endotelyal ve hematopoetik hücreleri hedefler.

TGF- $\beta$ , anjiyogenez, proliferasyon, kollajen ve fibronektin gibi matriks proteinlerinin degradasyonu gibi doku onarımı ve hastalığında yaygın olan birçok işlemi düzenler (68). Anjiyogenik özelliğinden çok anti-anjiyogenik özelliği ile bilinir. Monositleri harekete geçirerek IL-1, PDGF ve FGF gibi faktörlerin salgılanmasını uyarır (68).

#### **2.1.2.5. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)**

Epidermal büyüme faktörü (EGF), anjiyogenez için umut veren bir başka büyüme faktörüdür (4). Erken klinik çalışmalar, rekombinant EGF ile tedavi edilen yaralarda iyileşme sürelerinin azaldığını ve yeniden epitelizeasyonun arttığını göstermiştir (69).

EGF'nin, fosfatidilinositol 3-kinaz / protein kinaz B (PI3K / Akt) ve hücre dışı sinyal düzenleyen kinaz-1/2 (ERK1/2) yoluyla ve VEGF aracılı yollarla anjiyogenezi arttırdığı gösterilmiştir (161). EGF, kanser hücrelerinde tümör anjiyogenezi arttırmak için VEGF-A üretimini indükleyebilir. Ayrıca keratinosit migrasyonu için yaranın yeniden epitelizasyonunu indükleyici güçlü bir kemoatraktandır. Heparine bağlı EGF en güçlü formlardan biridir (70, 71, 72).

#### **2.1.2.6. Anjiyogenin (Ang)**

Angiogenin (Ang) insan tümöründen elde edilen ilk protein olup kan damarlarının büyümesini uyarmaktadır. Ang, Folkman'ın 'tümör büyümesinin anjiyogeneze bağımlı olduğu' hipotezine yönelik ilk doğrudan destekleyici kanıtı sağlamaktadır (73). Ang, VEGF, bFGF, aFGF ve EGF dahil olmak üzere diğer anjiyogenik faktörler tarafından indüklenen anjiyogenezi kolaylaştıran bir faktördür (74). Yapılan çeşitli deneysel hücre modellerinde Ang'ın hücre çoğalmasını, göçünü, yapışmasını ve farklılaşmasını düzenlediği gösterilmiştir (75,76).

#### **2.1.2.7. Hipoksi İndükleyici Faktör (HIF)**

Hipoksi, hücrelerde, dokularda veya organlarda oksijen eksikliği olarak tanımlanmaktadır. Hipoksik durumlar, anemi ya da arızalı bir kan damarı ağı yoluyla azalan oksijen kaynağından veya kanserde bulunan yüksek proliferatif duruma bağlı olarak artan oksijen arzı ile meydana gelen aşırı tüketim nedeniyle gelişebilir (77).

Akut hipoksiye hücresel yanıt, düşük oksijene karşı fizyolojik cevabı tetikleyen ve evrimsel olarak korunan transkripsiyonel faktörlerin bir ailesi olan hipoksi ile indüklenen faktörlerin (HIF) ekspresyonu ile gerçekleşir.

HIF-1, HIF ailesinin bir üyesi olup stabil beta (HIF-1 $\beta$ ) ve kararsız alfa (HIF-1 $\alpha$ )' dan oluşan iki alt gruba sahiptir (77). Hipoksik bir durumda, HIF-1 $\alpha$  alt birimi, HIF-1 $\beta$  ile stabil bir kompleks oluşturur. Aktif HIF-1 hipoksiye duyarlı genlerin promotor bölgesi üzerinde bulunan hipoksi duyarlı elemanların (5'-RCGTG-3') sekanslarına bağlanır (77). Hücresel HIF-1 aktivasyonu, besin yetersizliği ve hücre hasarı gibi stres koşullarında hücre çoğalmasını ve hayatta kalmasını sağlamak için ATP üretimini tetikler. Bunu ise glukoz kullanımını uyararak gerçekleştirir (78). HIF-1' in transkripsiyonel aktivasyonu sonucu hipoksik hücrenin metabolik regülasyonuna aracılık eden genlerin ekspresyonu ve hipoksik doku etrafında anjiyogenez indüklenerek hücre sağkalımı desteklenir (79).

Hipoksik koşullar altında, HIF-1, büyüme, anjiyogenez, proliferasyon, glukoz transportu, metabolizma, pH regülasyonu ve hücre ölümü ile ilişkili çoklu genlerin transkripsiyonunu düzenler (79).

#### **2.1.2.8. İnterlökin-8 (IL-8)**

IL-8, başlangıçta bir lökosit kemoatraktan olarak tarif edilen ancak daha sonra güçlü bir anjiyogenik ve büyüme faktörü olarak tanımlanan proinflamatuvar bir sitokindir (80). İki yüzey reseptörü olan CXCR1 ve CXCR2 ile etkileşime girerek gerçekleştirdiği aktivasyon, endotel hücrelerin ve kanser hücrelerinin proliferasyonuna, hayatta kalmasına ve artmış motilitesine yol açar. Kanserlerde IL-8' in tümör anjiyogenezini, tümörojenisiteyi, lenf nodu tutulumunu ve özellikle tümör büyümesinin erken fazında metastaz oluşumunu indüklediği gösterilmiştir (81).

Mesane kanseri biyolojisi üzerindeki IL-8 etkileri, en azından kısmen MMP seviyesi ile bağlantılı ancak IL-8 aktivitesi VEGF veya bFGF' den bağımsız görünmektedir (81,82). IL-8'in ifadesi, transkripsiyon faktörü NF-κB ile doğrudan düzenlenir (83). Prostat kanseri modellerinde NF-κB' nin bloke edilmesinin VEGF ve IL-8' in ekspresyonunu azalttığı ve daha sonra anjiyogenez, invazyon ve metastazı baskıladığı gösterilmiştir (83).

**Tablo 3:** Anti-anjiyogenik faktörler

#### **Anti-anjiyogenik Faktörler**

|                                               |
|-----------------------------------------------|
| Trombospondin- 1                              |
| Anjiostatin                                   |
| Endostatin                                    |
| Vazostatin                                    |
| Vasküler endotelial büyüme faktörü inhibitörü |
| Prolaktin                                     |
| Restin                                        |
| Metalloproteinaz doku inhibitörleri           |
| Plazminojen aktivatör inhibitör 1             |
| Retinoik asit                                 |

### **2.1.2.9. Trombospondin-1 (TSP-1) ve Trombospondin-2 (TSP-2)**

Trombospondinler yani TSP-1 ve TSP-2, anjiyogenezin güçlü endojen inhibitörleridir. Endotelial hücrenin migrasyonu, proliferasyonu, sağkalımı ve apoptozisi üzerinde doğrudan etkilidirler. VEGF aktivitesini antagonize ederek anjiyogenezi inhibe ederler. TSP-1 ve TSP-2' nin etkilerine aracılık eden membran reseptör sistemlerinin ve sinyal iletim moleküllerinin birçoğu açıklığa kavuşturulmuştur. TSP-1 ve TSP-2 molekülleri etkilerini CD36, CD47 ve integrinler aracılığıyla doğrudan göstermektedir. Son veriler, CD36 ve  $\beta 1$  integrinlerin, TSP-1 ve TSP-2 tarafından başlatılan sinyalleri iletmek için işbirliği yaptığını göstermektedir (84). Ayrıca, bu reseptörler, anjiyogenezi etkileyen pozitif ve negatif sinyallerin entegrasyonu için bir platform oluşturmak üzere VEGFR2 ile ilişkilendirilirler. Pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik sinyal transdüksiyon yolları arasındaki çapraz etkileşim, TSP-1 ve TSP-2'nin, apoptotik yolları aktive ederken, hayatta kalma yollarını antagonize ederek anjiyogenezi inhibe edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca, CD36 ve CD47, nitrik oksit (NO) bastırılmasında da rol oynamaktadır. TSP tarafından anjiyogenezin moleküler regülasyonunun anlaşılmasındaki ilerlemeler, kanserlerin deneysel tedavisinde inovasyonların yolunu açmıştır ve muhtemelen diğer hastalık süreçlerinde keşif için geniş yollar sunmaya devam edecektir (85).

### **2.1.2.10. Anjiostatin ve Endostatin**

Endostatin ve anjiyostatin, anti tümör özellikleri olan güçlü endojen anjiyostatik sitokinlerdir. Endostatin, kollajen XVIII' in bir iç fragmanıdır ve ilk olarak bir murin hemanjiyotelioma hücre dizisinin koşullu ortamından izole edilmiştir (86). Her ne kadar kesin etki mekanizmaları iyi tanımlanmamış olsa da tümör baskılayıcı özellikleri kısmen tümör ile ilişkili anjiyogenezin inhibisyonuna bağlanmaktadır (87).

Endostatin, antiapoptotik proteinler Bcl-2 ve Bcl-XL' nin ekspresyonunu azaltır ve düşük afiniteli glipikan veya yüksek afiniteye özgü endotelial hücre yüzey reseptörleri ve  $\alpha 5$  integrinleri ile etkileşime girebilir, apoptozisi teşvik edebilir ve spesifik olarak endotelial hücrelerin göçünü inhibe edebilir (87).

Anjiostatin, plazminojenin bir bölünme ürünüdür ve ilk olarak insan Lewis akciğer karsinom hücrelerinin bir alt klonundan izole edilmiştir (88). Anjiostatin, endostatine benzer bir şekilde, proliferatif vasküler endotelial hücre popülasyonlarının apoptozisini tetikler (89). Bu etki, fokal adhezyon kinazın, tirozin kinaz aktivitesinin artırılması ile sağlanmaktadır (86).

Ek olarak, anjiostatin, endotelial hücrelerin yüzeyi üzerindeki ATP sentazının  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimlerine bağlanarak göç ve proliferasyonu inhibe etmektedir (86). Doku plazminojen aktivatörüne bağlanması, plazminojen aktivasyonunu önler ve aynı zamanda hücrel migrasyon ve invazyonu azaltmaktadır. Bunlara ek olarak, anjiostatin VEGF ekspresyonunun aşağı-regülasyonunu ise arttırdığı bildirilmiştir (90,91).

#### **2.1.2.11. Vazostatin**

1~180 arası aminoasit içeren kalretikülinin N-terminal alanı olan vazostatin, Epstein-Barr virüsü ile ölümsüzleştirilmiş bir hücre dizisinin kültür süpernatantlarından izole edilen potansiyel bir anjiyogenez inhibitörüdür. Saflaştırılmış rekombinant vazostatinin, in vitro bFGF ile indüklenmiş endotelial hücre proliferasyonunu ve in vivo bFGF kaynaklı anjiyogenezini inhibe ettiği gösterilmiştir (92).

#### **2.1.2.12. Prolaktin**

Prolaktin (PRL) normal insan memesindeki büyüme ve gelişmeden sorumludur ve meme kanseri riskinde rol oynar. Postmenopozal kadınlardan ileriye dönük olarak toplanan serumlardaki yüksek PRL seviyeleri, meme kanseri gelişme riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (93).

PRL, hem hipofiz bezi hem de normal meme epitelyal hücreleri ve meme tümörü hücreleri gibi uzak dokularda sentezlenebilir. Bu molekül otokrin / parakrin tarzında hareket eden bir hormon gibi çalışır (94).

Dolaşımda çoklu PRL izoformları tespit edilmiş olup 23 kDa'luk izoformu en yaygın görülen tipidir (95). PRL'nin in vitro ve in vivo çalışmalarının büyük çoğunluğu özellikle meme bezinde 23 kDa'luk izoformuna odaklanmıştır. Proliferasyon, apoptozis, migrasyon ve farklılaşma fonksiyonlarına ek olarak 23 kDa PRL' nin pro-anjiyogenik olduğu gösterilmiştir (96). Buna rağmen, bir başka izoform olan 16 kDa PRL'nin dramatik olarak anti-anjiyogenik olduğu ve 23 kDa PRL'ye doğrudan karşı işlev gördüğü gösterilmiştir (97).

#### **2.1.2.13. Retinoik Asit**

Retinoidler, genetik, proliferatif ve farklılaşma sürecini etkileyen geniş bir A vitamini türevleri ailesidir (98). Retinoidlerin etkilerine belirli reseptörler aracılık etmektedir (99).

Retinoidlerin, kültüre edilen keratinositlerdeki transkripsiyonel seviyede TPA- aracılı VEGF gen uyarımını inhibe ettiği ve VEGF' nin neden olduğu mikrovasküler geçirgenliği bloke ettiği gösterilmiştir (100,101).

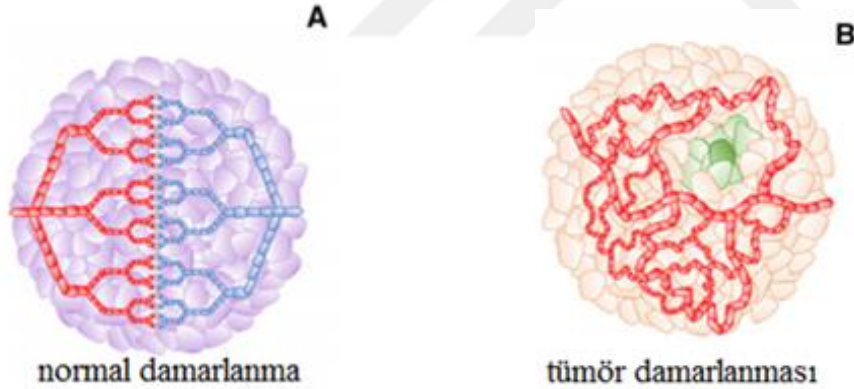
### **2.1.3. Kanser ve Anjiyogenez**

Tümör çalışmalarında en çok merak edilen konulardan biri tümörlerin eski kan damarlarından mı yoksa yeni damarlar oluşturarak mı beslendiği sorusuna cevap aramaktı (31). 1939' da Ide ve ark. (102) yaptıkları bir çalışmada, yaralanma ile gerçekleşen damar oluşumunun bir müddet sonra durduğunu fakat tümörün bulunduğu bölgedeki damar oluşumunun azalmadığı hatta arttığını göstermişlerdir (102). Algire ve ark. (103) 1945 yılında yaptıkları bir çalışmada ise tümör bölgesinde var olan damarlardan yeni damarlar oluştuğunu bildirmişlerdir (103). Folkman' nın 1971'de yaptığı açıklamada tümör oluşumunun anjiyogeneze bağlı olduğunu vurgulamasıyla, tümör anjiyogenezi üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır (104). İlerleyen yıllarda yapılan birçok çalışmada Folkman'ı destekler nitelikte olmuştur. Tümör belli bir büyüklüğe ulaşana kadar anjiyogeneze ihtiyaç duymazken 0,5 mm<sup>3</sup> büyüklüğün üstüne çıktığında besin ve oksijene ulaşabilmek ve tümör proliferasyonunu arttırabilmek için anjiyogenezin tetiklenmesine ihtiyaç duyar. Bu süreçte normal fizyolojik sürecin tersine inhibitörler ve anjiyogenik faktörler arasındaki denge bozulur (31).

Tümör büyümesi için birden fazla anjiyogenik faktörün aşırı ekspresyonu gerektiği gibi anjiyogenezi inhibe eden faktörlerde de azalma gerçekleşmelidir (24,31). Metastaz yapabilen tümör hücrelerinin anjiyogeneze ihtiyacı vardır. Çünkü bu sayede kan dolaşımına girerek hedef dokuya ulaşabilirler (24). Metastaz miktarının anjiyogenez miktarına bağlı olduğu yapılan çalışmalarla da gösterilmiştir (105,106). Tümör oluşumu için tetiklenen damar yapısı, doku kan damarlarıyla karşılaştırıldığında, tümörün damar yapısı atipik morfolojik özellikler göstermektedir. Kıvrımlı ve düzensiz kan damarlarıyla karakterize edilen tümör vasküler ağı olgunlaşmamıştır ve hücre birlikteliğinin eksikliğinden dolayı aşırı geçirgenliğe, zayıf perfüzyona ve hipoksiye neden olmaktadır. Ayrıca, tümörler yüksek derecede bir vasküler heterojenite gösterirler. Perisitler ve vasküler düz kas hücrelerinden oluşan perivasküler hücreler kan akış regülasyonuna katılır ve damar geçirgenliğinin sınırlandırılmasına katkıda bulunur. Tümörlerde, perivasküler hücrelerin bazal membran ile endotelial hücreler arasındaki bağlantısı bozulmuştur (24). Tümörle ilişkili perisit hücrelerinin yoğunluğu, normal dokuya kıyasla düşük değildir, fakat anormal morfoloji sergilerler (24).

Tümör kitlesi, oksijensiz ve besinsiz kaldığı zaman hipoksi gelişmektedir ve bu durum, tümör anjiyogenezinin ana faktörüdür. Normoksik koşullar altında prolin hidroksilaz domein protein 2 (PHD2) proteini hipoksi ile indüklenebilir transkripsiyon faktörlerini hidrolize etmek için kullanır ve bunları Von Hippel-Lindau (VHL) kompleksi tarafından ubiquitinasyon için hedefler ve böylece proteazom kompleksi tarafından yıkılmalarına yol açar. Hipoksik koşullar altında ise PHD2 inaktif hale gelir, HIF-1' in yıkımdan kurtulmasına ve HIF hedef genlerinde bulunan bir DNA sekansı motifi olan hipoksi yanıt elementlerine (HRE) bağlamasına izin verir (24). Artan HIF protein seviyeleri, anjiyogenez, hayatta kalma, hücre çoğalması ve glukoz metabolizması gibi kronik veya akut hipoksiye karşı hücrel adaptasyonda yer alan genlerin transkripsiyonuna yol açar (24). Ekspresyonu HIF-1 tarafından düzenlenen genler, VEGF, TGF- $\beta$ , PDGF-B, plazminojen aktivatörü-1 (PA-1), eritropoietin (EPO) ve GLUT-1'dir (107).

Anjiyogenik süreç ve VEGF üretimi, aktive olmuş onkogenlerin ekspresyonunun artmasına veya tümör baskılayıcı genlerin kaybına yol açan mutasyonlarla da desteklenebilir. Bunlar gibi birçok sebep ile gerçekleşen tümör anjiyogenez, normal doku anjiyogenezine göre düzensizlikler ve yapısal bozukluklar gösterir (Şekil 3) (24).



**Şekil 3.** Tümör ve normal dokuda damarlaşmanın farkları A) Normal dokuda damar oluşumu B) Tümör hücresinde damar oluşumu(24).

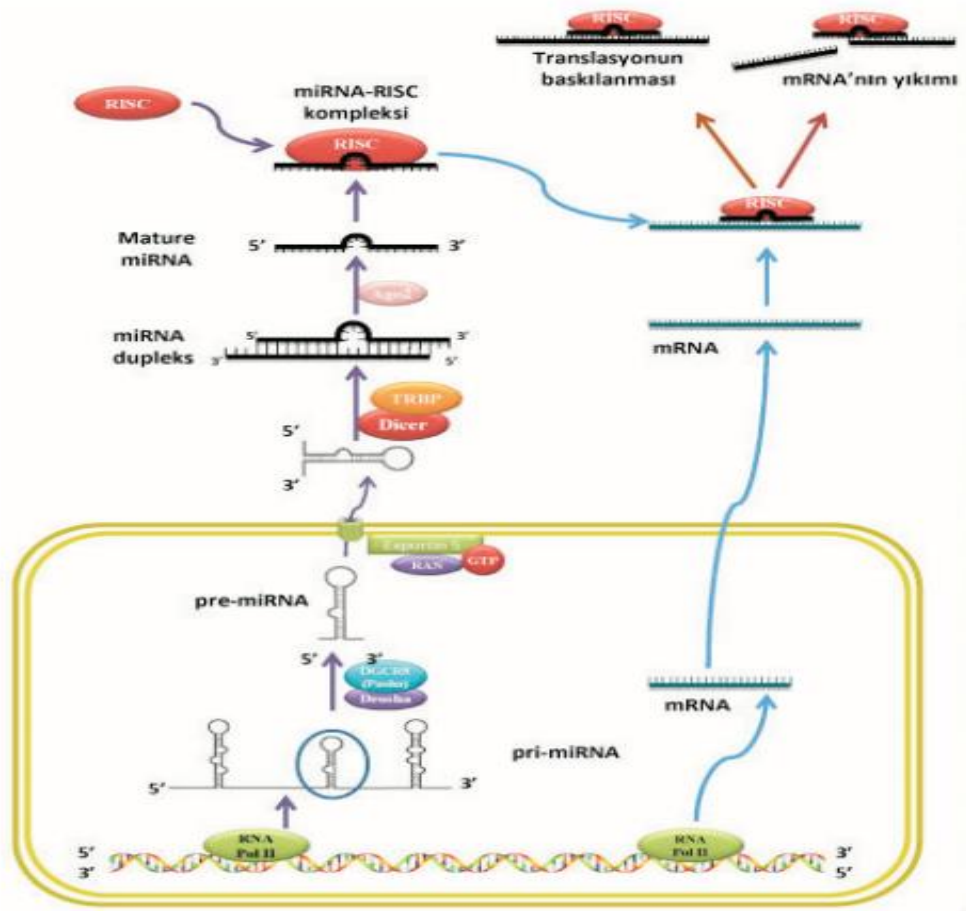
## 2.2. mikroRNA'lar

### 2.2.1. mikroRNA Nedir?

Küçük kodlamayan RNA'lar olarak bilinen mikroRNA'lar (miRNA), yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda ve gen ifadesini post-transkripsiyonel düzeyde kontrol eden moleküllerdir (108). İnsanlarda binlerce bulunan miRNA'ların birçok biyolojik olayda düzenleyici olarak görev aldığı gösterilmiştir (109, 110).

Bu oligonükleotid yapılar mRNA'lara bağlanıp transkripsiyonel inhibisyonuna ya da onların yıkımına neden oldukları için önemlidir (111). Fizyolojik birçok düzenlemeyi gerçekleştirmelerinin yanı sıra onkogenik ve tümör baskılayıcı görevleri de olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle tümör ilerlemesi ve metastaz gibi durumlar için düzenleyicidirler (109).

miRNA sentezi, RNA polimeraz II (RNA pol II) enziminin miRNA genlerinden öncü miRNA olarak pri-miRNA sentezlenmesiyle başlar. Oluşan pri-miRNA, nükleusta bir mikroşlemci olan Drosha ve DGCR8/Pasha kompleksine bağlanır. Böylece 60-70 nükleotidlik pre-miRNA'lara dönüşürler (109). Pre-miRNA'lar Exportin-5 proteininin yardımıyla sitoplazmaya geçiş yaparlar (112). Burada bulunan RNA pol-III'ün bir türevi olan Dicer, bu pre-miRNA'yı 20-25 nükleotid uzunluğundaki olgun miRNA'lara ve kompleksleri halinde olacak şekilde kesimini gerçekleştirir. İlerleyen aşamada ise helikaz tarafından bu miRNA ve kompleks ikilisi ayrılır. Argonat proteini (AGO2), çeşitli proteinler ve olgun miRNA'dan oluşan RISC kompleksi hedef mRNA'ya doğru yönelir (Şekil 4). Hedef mRNA'ların tanınması ise RISC içindeki miRNA'lar tarafından mRNA'ların 3'-UTR uçlarına bağlanmasıyla gerçekleştirir. miRNA'ların hedef mRNA'ların 3'-UTR uçlarına komplementerliğine göre ya mRNA degrade olur ya da translasyonu baskılanır (109).



Şekil 4. miRNA biyogenezi.(109)

### 2.2.2. mikroRNA ve Kanser

miRNA'ların apoptozis ve hücre büyümesini etkilediği gösterilmiş ve buna ilaveten bazı miRNA'ların kanserle ilişkili olduğu düşünülen genlerin yakınlarında bulunduğu gösterilmesiyle miRNA ve kanser arasındaki ilişki araştırılmak için önemli bir başlık haline gelmiştir (113).

Yapılan araştırmalar, miRNA'ların bazılarının tümör gen ifadesini arttırırken, bazı miRNA'ların ise tümör baskılayıcı işlev gördüğü gösterilmiştir (113). miRNA'lar bunu hedefledikleri mRNA dizisine göre gerçekleştirir. Eğer tümör aktivasyonunu arttıran bir mRNA'yı hedef aldıysa tümör baskılayıcı miRNA, tümör baskılayıcı mRNA'ları hedeflediye onkogenik miRNA(onkomir) olarak adlandırılırlar (109).

Calin ve ark. (114) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ilk defa miRNA'lar ile kanser arasındaki ilişki ortaya konulmuştur. Yapılan bu çalışmada kronik lenfositler lösemi (KLL) hastalarının yarısında gözlemlenen 13q14 delesyonunun, mir-15 ve mir-16'yı hedeflediği gösterilmiştir (114).

Lamy ve ark. (115), prostat ve kolon kanserinde DNA kopya sayısının arttığı yerlerde miRNA miktarının da yüksek olduğunu, mesane kanserinde ise bu ilişkinin ters orantılı olduğunu bulmuşlardır (115). Başka bir çalışmada ise Bcl-2 anti-apoptotik geninin iki miRNA tarafından yönlendirildiği ve bu sebeple aşırı ekspresyonunun baskılandığı gösterilmiştir (116). Tiroid kanseri, meme kanseri, malign beyin tümörleri gibi birçok kanser türünde miRNA seviyelerinde farklılıklar gözlemlenmiştir (109).

Kanserde genlerin tek başına incelenmesinden genel bir ekspresyon analizi tanı için önemlidir. İşte bunun için miRNA ekspresyon düzeylerinin analizi önem kazanmaktadır (109).

### **2.2.3. miRNA ve Anjiyogenez**

Yetişkinlerde yeni kan damarlarının büyümesi, arteriyogenez, anjiyogenez ve vaskülogenez ile meydana gelir. Anjiyogenez sırasında, stabil durumdaki endotel hücreleri anjiyogenik faktörlerle aktive edilir ve hücreler göçmeye, çoğalmaya ve tübül oluşturmak için organize olurlar (117).

Vaskülogenez terimi ise başlangıçta anjiyoblastlardan kan damarlarının embriyonik de novo oluşumunu ve endotel progenitör hücreler veya diğer yetişkin kök hücreler tarafından kan damarlarının oluşumu olarak bilinir (117).

Anjiyogenez ve vaskülogenez, gelişim sırasındaki fizyolojik süreçlerdir. İskemik dokularda, kan akışının geri kazanılmasında önemli rol oynar ve tümör büyümesindeki temel adımlardan biridir. Anjiyogenezin ve neovaskülarizasyonun artırılması, örneğin kritik iskemi hastalarında, potansiyel bir terapötik strateji olarak tanımlanmıştır. Tümör anjiyogenezinde ise aksine bu işlemlerin inhibisyonu, tümör büyümesinin baskılanmasına yol açar (117). miRNA'lar, bir hedef mRNA'ya bağlanarak gen ekspresyonunu düzenleyen ve böylece bozulmaya veya translasyonel baskılamaya neden olan küçük kodlayıcı olmayan RNA'lardır (117).

miRNA'lar, RNase III endonükleaz sınıfına ait iki enzim olan Dicer ve Drosha'nın aracılık ettiği iki aşamalı bir işlenme yolunda üretilir (Şekil 4). Dicer, endotel hücrelerinde yapısal olarak eksprese edilir ve ekspresyonu, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi uyarıcılara cevap olarak veya hücre proliferasyon durumu ile değişmez (117).

Araştırmalar, Dicer'in in vivo ve in vitro olarak anjiyogenezde çok önemli bir rolü olduğunu göstermiştir (118).

Örneğin, embriyolar ve yumurta sarısı keselerinin Dicerex1/2 mutant farelerde anjiyogenik kusurlar gösterdiği, ancak vaskülojenez ve anjiyogenezin ilk aşamalarının normal şekilde ilerlediği gösterilmiştir (118). Benzer şekilde, zebra balığı, Dicer mutantlarında kan dolaşımının bozulduğu bilinmektedir (119). Bu veriler, insan HUVEC ve EA.hy.926 endotel hücrelerinde Dicer'ı susturmak için siRNA kullanılan iki çalışmada da in vitro olarak doğrulanmıştır (117).

miRNA'ların ekspresyonu sıkı bir şekilde kontrol edilir ve farklı organlara ve hücre tiplerine spesifik oldukları görülür. Endotel hücre fonksiyonunun kontrolünde rol alan miRNA'ları tanımlamak için yapılan birkaç çalışmada endotel hücrelerdeki miRNA'ların ekspresyonu belirlenmiştir. HUVEC hücrelerinde yüksek oranda ifade edildiği bilinen ve anjiyogenezde etkili olduğu kanıtlanan bu miRNA'lar; let7b, miR-16, miR-21, miR-23a, miR-29, miR-100, miR-221 ve miR-222'dir (117, 120, 121).

Endotel hücrelerinin miR-221 ve miR-222 ile transfeksiyonunun tüp formasyonunu ve göçü bloke ederek, in vitro anjiyogenezi inhibe ettiği ve endotel hücrelerinin in vitro yara iyileşmesini azalttığı bulunmuştur (120). miR-15b ve miR-16'nın, özellikle tümör anjiyogenezinde rol oynayan kilit bir pro-anjiyojenik faktör olan VEGF ekspresyonunu kontrol ettiği gösterilmiştir (122).

miR-17-92 ailesi güçlü bir tümör anjiyogenez indükleyici olarak bilinen bir miRNA kümesidir. MiR-17-5p, miR-17-3p, miR18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b ve miR-92-1'den oluşan bu kümenin bir protoonkogen olan Myc'nin neden olduğu tümörlerde, önemli ölçüde arttığı ve spesifik olarak anti-anjiyogenik proteinleri hedef aldığı gösterilmiştir (123).

Prospektif olarak, in vivo anjiyogenezi modüle etmek için büyüme faktörlerini kodlayan mRNA'ların 'mükemmel' karışımını hedefleyen spesifik miRNA'ların incelenmesi önemlidir (117).

## **2.3. Fenretinide Molekülü**

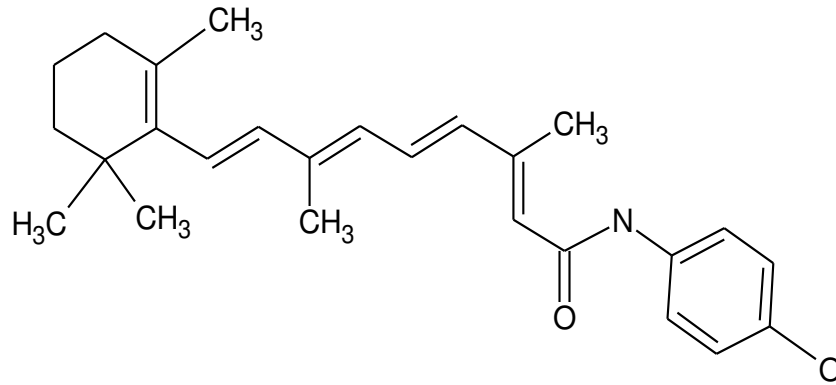
### **2.3.1. Fenretinide Molekülü Nedir?**

"Kanser kemoprevensiyon" terimi Sporn ve ark. (126) tarafından, "karsinogenez sürecini engelleyen veya tersine çeviren farmakolojik ajanların kullanılmasıyla kanserin önlenmesi" olarak tanımlanmıştır. Kemoprevensiyon hızla büyüyen bir onkoloji alanıdır (124).

Karsinogenez, genler ve çevresel faktörler arasındaki etkileşimi içeren ve sonuçta hücre çoğalmasına ve ölümüne yol açan karmaşık aynı zamanda çok aşamalı bir süreçtir. Kanser kemoprevensiyonu, neoplastik hastalık ilerlemesinin önlenmesi için kanserojen olaylar kaskadı içindeki süreçlere müdahale etmeye odaklanır (124, 126).

Transforme hücrelerin öldürülmesini hedefleyen kemoterapinin aksine, kemoprevensiyon, premalign hücrelerin önlenmesi veya tedavi edilmesini amaçlar (124). Kemoprevensiyonların en ilginç bileşiklerden biri olan A vitamini veya retinol, hem hayvansal hem de bitkisel besinler içinde yer alan, yağda çözünen bir vitamindir. A vitamini eksikliği, farklı seviyelerde körlüğe, cilt değişikliklerine, bağırsak veya akciğer enfeksiyonlarına yol açmaktadır (125). Bunun yanı sıra vitamin A'nın varlığı anti-kanser, anti-anjiyogenik, apoptotik vb. özellikler taşır. Fenretinide, 1960'ların sonlarında Amerika Birleşik Devletleri'nde Gander tarafından sentezlenmiştir (Şekil 5).

Kimyasal olarak sıçanlarda indüklenen meme karsinomunun fenretinide ile inhibisyonu ilk olarak 1979'da gösterilmiştir (127). Sentetik bir retinoid olan Fenretinide (N-(4-hydroxyphenyl) retinamide; 4-HPR), birçok in vitro ve hayvan çalışmasının yanı sıra kemoprevensiyon çalışmalarında umut verici bir anti-kanser ajanı olarak çalışılmaktadır (128). Aynı zamanda, fenretinide'nin anti-anjiyogenik etkileri olduğu da yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (11).



**Şekil 5.** Fenretinide molekülünün kimyasal yapısı

Mevcut deneysel veriler, fenretinide'in hem reseptöre bağımlı hem de reseptörden bağımsız mekanizmalar tarafından çalışabileceğini göstermektedir.

Fenretinide'in karakteristik bir özelliği, farklılaşmadan ziyade apoptozis indüksiyonu yoluyla, hücre büyümesini inhibe edebilmesidir (124).

### **2.3.2. Fenretinide Molekölü Kanserdeki Etkileri**

Keşfedildiklerinden beri, A vitamininin doğal ve sentetik türevleri olan retinoidlerin, hücrel ve doku farklılaşmasında çok önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Ancak zayıf klinik toleransları, bu ajanların anti-kanserojen olarak yaygın kullanımını engellemektedir (124).

Bazı faz II ve III klinik araştırmaları, meme kanserine özel önem vererek, farklı kanser bölgelerinin, hem önlenmesinde hem de terapötik ortamda fenretinide'in etkinliğini değerlendirmiştir (11). Faz III denemeler arasında, bugüne kadar en büyüğü, Milano'daki Istituto Nazionale dei Tumori'de koordine edilen çok merkezli, randomize kemoprevention klinik araştırmasıdır.

Meme kanserinin I. evresindeki kadınlarda kontralateral tümör insidansı üzerine fenretinide'nin etkisini değerlendirmek için 1987'de başlatılan araştırmanın sonunda, fenretinide uygulandığı sürece BRCA-1 mutasyonu ile ortaya çıkan yumurtalık kanserine sahip kadınlarda koruyucu bir etki sağladığı ancak ilaç kesildikten sonra etkinin de durduğu gözlenmiştir. Ayrıca fenretinide'nin menopozal ve yaşa bağlı olmakla birlikte hormonal değişikliklerde farklı tepki verdiği gösterilmiştir (11).

İlginç bir şekilde, daha sonra yapılan bir çalışmada, meme kanseri nedeniyle cerrahi olarak ameliyat edilen postmenopozal kadınlarda (yaş >55) düşük retinol (<2.08 M / L) düzeylerinin kötü prognoz ile korele olduğu gösterilmiştir (11).

Fenretinide'in, malign hematopoetik, nöroblastom, servikal, meme, yumurtalık, melanom, baş ve boyun bölgeleri dahil olmak üzere apoptozisi indüklediği gözlenmiştir (129, 130, 131, 132, 124).

### **2.3.3. Fenretinide Molekölü ve Anjiyogenez**

Fenretinide, tümörlerin büyümesini yavaşlatan tümör öncesi lezyonları azaltan ve tümörün ilerlemesini baskılayan bir moleküldür (11). Retinoidler düşük dozlarda birçok hücre tipinin çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenleyen çeşitli biyolojik etkileri ile bilinir ve malign hastalıkların önlenmesi ile tedavisinde etkinlik göstermektedir (133). Doğal retinoidlerin, birkaç in vitro ve in vivo çalışmada anti-anjiyogenik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (133).

Tüm trans-retinoik asit'ler, akut promyelositik lösemi modelinde tek başına veya IFN $\alpha$  ile kombinasyon halinde in vitro VEGF aracılı anjiyogenezi baskılayabilmiştir. Ayrıca insan baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomunda bir anti-anjiyogenik ajan olarak görev yaptığı gösterilmiştir (11, 134, 135).

Kapsamlı deneysel kanıtlar, fenretinide'nin anti-anjiyogenik etkisinin kemopreventif ve terapötik aktivitesine önemli ölçüde katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Bu aktivite doğrudan endotel hücre fonksiyonlarını hedefleyen veya anjiyogenik süreci düzenleyen spesifik büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin üretimine, salımına ve aktivasyonuna etki eden, böylece yeni damar oluşumuna elverişsiz olan mikro ortamdaki yerel koşulları yaratan mekanizmalarla ilişkilidir (11).

1993 yılında, fenretinide'nin, sıçan modelinde prostat karsinogenezini önemli ölçüde azalttığı ve çeşitli anjiyogenez analizlerinde neovaskülarizasyonu düşürdüğü gösterilmiştir. Fenretinide molekülünün tümör büyümesini kontrol ettiği mekanizmalardan birinin anti-anjiyogenez özelliği sayesinde olabileceği ortaya konulmuştur (136). Ayrıca fenretinide'nin, civciv korioallantoik zarı (CAM) deney modelinde, nöroblastoma hücreleri tarafından indüklenen anjiyogenezin baskılanmasını etkileyen anti-anjiyogenik bir aktivite sergilediği gösterilmiştir (137, 138).

Kaposi sarkoma hücrelerinin fenretinide ile muamelesinin, VEGF ve VEGFR2'nin aşağı-regüle edilmesi yoluyla RAR (retinoik asit reseptörü) ekspresyonunu tetikleyerek, anjiyogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir (15).

#### **2.3.4. Fenretinide Molekülü ve mikroRNA'lar**

Yakın zamanlarda fenretinide molekülünün kanser hücre hatlarında hangi genleri etkilediğinin yanı sıra miRNA'lar üzerindeki etkileri de araştırılmaktadır. ARPE-19 hücrelerinde yapılan bir çalışmada, fenretinide' nin HMOX1 ve GADD153 genlerin ekspresyonundaki artışı ile karakterize apoptozisi arttırdığı gösterilmiştir. Bunun yanı sıra miR-9 ifadesinde iki kat bir artış gözlenmiştir. Ayrıca, miR-9 kadar olmasada miR-16, miR-26b, miR-23a ve miR-15b'nin de arttığı gözlenmiştir (139, 140).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

#### 3.1 GEREÇLER

##### 3.1.1 Kullanılan Hücre Hattı

- HUVEC: İnsan göbek kordon ven endotel hücre
  - Çalışma için gerekli hücre hattı

##### 3.1.2 Kimyasallar ve Çözeltiler

- EBM (katalog no: CC-3121)
  - Hücrelerin ihtiyaç duyduğu besin ortamı
- EGM single Quots (katalog no: CC-4133)
  - HUVEC'lerin büyümesi için ideal ortamı sağlamak için gereken destekleyici büyüme faktörleri
- FBS (katalog no: S181H500)
  - Hücrelerin çoğalmasını destekleyici fetal sıgır serumu
- Fenretinide (katalog no: Sigma- H7779/5mg)
  - Anjiyogeneze ve miRNA düzeyine etkisi araştırılan molekül
- Qiagen miRNeasy Mini Kit (katalog no: 217004)
  - RNA izolasyonu
- DMSO (katalog no: Sigma-PHR1309 )
  - Fenretinide molekülü için çözücü
- TaqMan® Advanced miRNA Assays cDNA Synthesis Kit (katalog no: A28007)
  - RNA'dan cDNA eldesi
- Qiagen miScript SYBR Green PCR Kiti (katalog no: 218073)
  - miRNA taraması
- MTT (katalog no:M5655)
  - Hücre canlılığını ölçmek için kullanılan tetrazolium tuzu

- HCl (katalog no:K21218914)
  - MTT'den oluşan formazan kristallerini çözmek için asidik izopropanol eldesi
- İzopropanol (katalog no: K43940334-243)
  - Formazan kristallerini çözmeye yardımcı
- Matrigel Matrix (katalog no: 354234, Corning)
  - Kapiller benzeri tüp oluşumu

### 3.1.3 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Hücre kültürü sınıf II güvenli kabin (Thermo Scientific, USA)
- Karbondioksit inkübatörü (Thermo Scientific, USA)
- Epoch Micro-Volume Spectrophotometer System (BioTek, Winooski, United States)
- Veriti™ Dx 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)
- qRT-PCR Rotor-Gene Q (Qiagen)
- Spektrofotometre (Thermo Scientific Multiskan GO, USA)
- Mikroskop (Leica DFC450, USA)

## 3.2 YÖNTEMLER

### 3.2.1. Hücre Kültürü

Çalışma, Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı laboratuvarında bulunan hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada ticari olarak temin edilen HUVEC (insan göbek kordonu ven endotel hücreleri; Human Umbilical Vein Endothelial Cells) hücreleri kullanılmıştır.

Hücrelerin ideal yaşam ortamını sağlamak için; endotelial basal medium (EBM) içine kullanımdan önce %2 fetal sıgır serumu (FBS) ve endotel hücreler için optimize edilen hazır destek solüsyon kiti EGM single Quots eklendi.

EGM single Quots içindekiler; hidrokortizon, GA-1000 (gentamisin sülfat), ascorbik asid, sıgır beyin ekstraktı, rekombinant insan epidermal büyüme faktörü (rhEGF) ve 100 U/ml penisilin.

Hücreler 25 ml'ik flasklarda hazırlanan besiyeri kullanarak, hücrelerin yaşaması ve çoğalması için gerekli olan 37°C %5 CO<sub>2</sub> ve nemli ortamı sağlayan inkübatörlere yerleştirildi.

Hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışma için etik kurul iznine gerek yoktur.

### **3.2.2. Fenretinide Molekülünün Hazırlanması**

Ticari olarak temin edilen fenretinide 1ml DMSO (Dimetil sülfoksit) ile çözündürülüp - 20°C derin dondurucuya kaldırıldı.

### **3.2.3. Hücreden RNA İzolasyonu**

6 kuyucuklu petrilere ekimi yapılan HUVEC'lerin besiyerine 1/10 FBS ile seyreltilmiş fenretiniden belirlenen konsantrasyonlar da deney grupları oluşturuldu. Gruplar 24 ve 48 saat olarak belirlendi. Her grup kendi içinde 4 gruba ayrıldı.

Gruplar:

24 saatlik uygulama grupları;

1. Grup: Kontrol, % 0.1 DMSO muamelesi yapılacak hücreler
2. Grup: 1 µM fenretinide mualemesi gerçekleştirilecek hücreler
3. Grup: 5 µM fenretinide mualemesi gerçekleştirilecek hücreler
4. Grup: 10µM fenretinide mualemesi gerçekleştirilecek hücreler

48 saatlik uygulama grupları;

1. Grup: Kontrol, % 0.1 DMSO muamelesi yapılacak hücreler
2. Grup: 1 µM fenretinide mualemesi gerçekleştirilecek hücreler
3. Grup: 5 µM fenretinide mualemesi gerçekleştirilecek hücreler
4. Grup: 10µM fenretinide mualemesi gerçekleştirilecek hücreler

Hazırlanan gruptaki hücreler 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ve nem içeren inkübatöre kaldırıldı.

24 saat sonunda ve 48 saat sonunda oluşturulan bu 8 gruptan RNA izolasyonu, Qiagen miRNeasy Mini Kit kullanılarak yapıldı.

Kitin protokolüne uygun şekilde aşağıdaki protokol uygulanmıştır.

1. Süresi dolan hücreler inkübatörden alınıp içindeki mediumlar uzaklaştırıldı ve her kuyuya 700µl qiazol eklenip 5 dakika oda sıcaklığında pipetaj yapılarak hücreler patlatıldı.
2. Qiazol ile lizize uğrayan hücreler 1,5 ml'lik ependorflara alınarak her birine 140 µl kloroform eklenip iyice vortekslendi. Oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletildi.
3. +4°C santrifüjünde 12.000 g'de 15 dakika santrifüj yapıldı.
4. Üstte bulunan süpernatant kısmı temiz 1,5 ml'lik ependorfa alıp, alınan miktarın 1,5 katı kadar %100 etanol ilave edilip iyice pipetaj yapıldı.
5. Bu karışımdan 700 µl olacak şekilde kit içinde çıkan RNeasy mini kolona konularak 12.000 g'de oda sıcaklığında 15 saniye santrifüj yapıldı. (Bu işlem karışım bitene kadar tekrarlanır.)
6. Kolonun altındaki toplama tüpünde biriken sıvı boşaltıldı.
7. Kolona 700 µl Buffer RWT eklenip 12.000 g'de 15 saniye santrifüj yapıldı.
8. Toplama tüpünde biriken sıvı boşaltıldı.
9. Kolona 500 µl Buffer RPE eklenip 12.000 g'de 15 saniye santrifüj yapıldı.
10. Toplama tüpünde biriken sıvı boşaltıldı.
11. Kolona 2. defa 500 µl Buffer RPE eklenip 2 dakika santrifüj yapıldı.
12. Toplama tüpünde biriken sıvı boşaltıldı.
13. Kolona bir şey eklenmeden boş bir şekilde 12.000 g'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
14. Kolonlar yeni 1,5 ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi.
15. 30 µl RNase içermeyen su eklenen kolonlara 1 dakika 12.000 g'de santrifüj yapıldı.(Bu işlem 2 kere tekrarlandı)
16. Toplama tüpündeki birikinti total RNA'yı içermektedir.
17. Elde edilen RNA'lar -80°C 'de saklanmak üzere kaldırıldı.

Bu çalışma 3 kez tekrarlandı.

#### **3.2.4. Elde Edilen RNA'nın Kalite ve Miktar Tayini**

cDNA eldesi için elde edilen RNA örneklerinin kalite ve miktarının belirlenmesi için spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Bunun için Epoch Micro-Volume Spectrophotometer System (BioTek, Winooski, United States) cihazı kullanıldı.

### 3.2.5. Total RNA'dan cDNA eldesi

cDNA'lar (kalıp, complementary DNA), TaqMan® Advanced miRNA Assays cDNA Synthesis Kiti kullanılarak elde edildi. Toplamda 4 reaksiyonda gerçekleştirildi.

- 1) Pol(A) kuyruğu reaksiyonu
- 2) Adaptör ligasyonu reaksiyonu
- 3) RT reaksiyonu
- 4) miR-Amp reaksiyonu

#### 3.2.5.1. Pol(A) kuyruğu reaksiyonu

- Tablo 4'deki gibi hazırlanan mix hafifçe vortexlenip, spin atıldı. Her örnek için 3uL 200uL'lik ependorflara ayrıldı.
- Üzerlerine ilgili RNA örnekleri konuldu. Hafif bir vortex ile spin yapıldı.
- Tablo 5'deki gibi ayarlanan PCR'a yerleştirildi.
- Çıkan PCR ürününü bekletmeden hemen diğer aşamaya geçildi.

**Tablo 4:** Pol(A) bileşen oranları

| Bileşenler          | Tepkime Hacmi | Son Konsantrasyon |
|---------------------|---------------|-------------------|
| 10x Pol(A) Buffer   | 0,5 µl        | 4,4 µl            |
| ATP                 | 0,5 µl        | 4,4 µl            |
| Pol(A) enzim        | 0,3 µl        | 2,64 µl           |
| RNase Free Water    | 1,7 µl        | 14,96 µl          |
| <b>Toplam Hacim</b> | <b>3,0 µl</b> | <b>26,4 µl</b>    |

**Tablo 5:** Pol(A) PCR döngü ve sıcaklık ayarları

| Step            | Sıcaklık | Zaman |
|-----------------|----------|-------|
| Polyadenilasyon | 37°C     | 45 dk |
| Reaksiyon sonu  | 65°C     | 10 dk |
| Hold            | 4°C      | Hold  |

#### 2.3.5.2. Adaptör ligasyonu reaksiyonu

- Tablo 6'daki gibi reaksiyon mix'i hazırlandı.
- PCR'dan çıkan tüplere bu mix'den 10 uL eklendi ve tablo 7'deki gibi ayarlanan PCR'a yerleştirildi.

- PCR biter bitmez diğer aşamaya geçildi.

NOT: 50% PEG 8000 bileşeni önceden oda sıcaklığına çıkartıldı.

**Tablo 6:** Adaptör ligasyon reaksiyonu bileşenlerinin oranları

| Bileşenler           | Tepkime Hacmi | Son Konsantrasyon |
|----------------------|---------------|-------------------|
| 5xDNA ligase buffer  | 3 µl          | 26,4 µl           |
| 50% PEG 8000         | 4,5 µl        | 39,6 µl           |
| 25x ligation adaptör | 0,6 µl        | 5,28 µl           |
| RNA ligase           | 1,5 µl        | 13,2 µl           |
| RNase free water     | 0,4 µl        | 3,52 µl           |
| <b>Toplam Hacim</b>  | <b>10 µl</b>  | <b>88 µl</b>      |

**Tablo 7:** Adaptör ligasyon reaksiyonu PCR sıcaklık ve zaman ayarı

| Step     | Sıcaklık | Zaman |
|----------|----------|-------|
| Ligation | 16°C     | 60dk  |
| Hold     | 4°C      | Hold  |

### 3.2.5.3. RT reaksiyonu

- Tablo 8'e göre reaksiyon mix'i hazırlandı.
- PCR'dan çıkan PCR ürünü bu mix'den 15 µl eklendi ve tablo 9'daki ayarlara göre PCR'a yerleştirildi.

**Tablo 8:** RT Reaksiyon bileşen oranları

| Bileşenler              | Tepkime Hacmi | Son Konsantrasyon |
|-------------------------|---------------|-------------------|
| 5x RT Buffer            | 6 µl          | 52,8 µl           |
| dNTP Mix                | 1,2 µl        | 10,56 µl          |
| 20x Universal RT primer | 1,5 µl        | 13,2 µl           |
| 10x RT enzim mix        | 3 µl          | 26,4 µl           |
| RNase free water        | 3,3 µl        | 30 µl             |
| <b>Toplam Hacim</b>     | <b>15 µl</b>  | <b>132,96 µl</b>  |

**Tablo 9:** RT PCR sıcaklık ve zaman ayarı

| Step           | Sıcaklık | Zaman |
|----------------|----------|-------|
| RT             | 42°C     | 15 dk |
| Reaksiyon sonu | 85°C     | 5 dk  |
| Hold           | 4°C      | Hold  |

**3.2.5.4. miR-Amp reaksiyonu**

- Tablo 10'a göre reaksiyon mix'i hazırlandı.
- Yeni 200 µl'lik eppendorlara PCR'dan çıkan üründen 5µl hazırlanan mix'den 45 µl konularak tablo 11'deki ısı sıcaklık döngüsüne göre ayarlanmış PCR'a yerleştirildi.
- PCR'dan çıkan cDNA'lar -20°C'ye kaldırıldı.

**Tablo 10:** miR-Amp reaksiyon bileşenlerinin oranları

| Bileşenler             | Tepkime Hacmi | Son Ksantrasyon |
|------------------------|---------------|-----------------|
| 2x miR-Amp Master Mix  | 25 µl         | 220 µl          |
| 20x miR-Amp Primer Mix | 2,5 µl        | 22 µl           |
| RNase Free Water       | 17,5 µl       | 154 µl          |
| <b>Toplam Hacim</b>    | <b>45 µl</b>  | <b>396 µl</b>   |

**Tablo 11:** miR-Amp PCR sıcaklık ve zaman ayarı

| Step              | Sıcaklık | Zaman | Döngü |
|-------------------|----------|-------|-------|
| Enzim aktivasyonu | 95°C     | 5 dk  | 1     |
| Denatürasyon      | 95°C     | 3 sn  | 14    |
| Bağlanma          | 60°C     | 30 sn |       |
| Reaksiyon sonu    | 99°C     | 10 dk | 1     |
| Hold              | 4°C      | Hold  | 1     |

**3.2.6. Primer Seçimi**

miRNA ve gen primerleri seçimi yapılırken literatür taraması yapıldı. Taramada, anjiyogenezle ilişkisi olduğu bilinen miRNA'lar ve genler arasından fenretinide moleküllü ile çalışılmamış olanlar seçildi. Seçilen miRNA'lar ve genler ticari olarak satılan primer assay'ler olarak temin edildi. Seçilen miRNA'lar ve genler aşağıdaki gibidir;

- miR-126(katalog no: MS00003430)

- miR-21(katalog no: MS00009079)
- miR-340(katalog no: MS00031759)
- miR-31(katalog no: MS00003290)
- miR-10b(katalog no: MS00031269)
- miR-101(katalog no: MS00008372)
- miR-29c(katalog no: MS00003269)
- miR-206(katalog no: MS00003787)
- miR-146a(katalog no: MS00003535)
- FOXM1- forward (katalog no: 20190225-9)
- FOXM1 - reverse ( katalog no: 20190225-10)
- eNOS- reverse ( katalog no: 20190220-190)
- eNOS- forward (katalog no: 20190220-189)
- CDH5- reverse (katalog no: 20190220-192)
- CDH5- forward ( katalog no: 2019220-191)

### 3.2.7. miRNA qRT-PCR (Real Time-PCR, Gerçek Zamanlı-PCR)

1. qRT-PCR için gerekli tepkime bileşenleri Qiagen miScript SYBR Green PCR Kiti kullanılarak elde edildi.
2. Buz bloğu üzerinde tepkime bileşenlerinin her bir örnek için hacimleri tablo 12'ye göre hazırlandı.

**Tablo 12:** miRNA için qRT-PCR bileşen oranları

| Bileşenler                      | Hacim         |
|---------------------------------|---------------|
| 2x QuatiTect SYBR Green PCR mix | 6,25µl        |
| 10x miScript Universal Primer   | 1,25µl        |
| 10x miScript Primer Assay       | 1,25µl        |
| RNase içermeyen su              | 2,5 µl        |
| Kalıp cDNA                      | 1,5µl         |
| <b>Toplam Hacim</b>             | <b>12,5µl</b> |

3. Her cDNA örneği için ayrı bir şekilde 0,1 ml'lik strip tüpler hazırlandı ve qRT-PCR Rotor-Gene Q (Qiagen) cihazına yüklendi.
4. qRT-PCR tablo 13'deki tepkime koşullarında gerçekleştirildi.

Bu çalışma 3 kez tekrarlandı.

**Tablo 13:** miRNA için qRT-PCR tepkime koşulları

| Sıcaklık (°C) | Zaman |            |
|---------------|-------|------------|
| 95            | 15 dk |            |
| 94            | 15 sn | } 40 döngü |
| 55            | 30 sn |            |
| 70            | 30 sn |            |

### 3.2.8. Hücre Proliferasyonu

Hücre canlılığı hakkında fikir veren kolorimetrik ölçüme dayalı bir yöntemdir.

NAD (P) H-bağımlı hücresel oksidoredüktaz enzimler, tetrazolyum boya MTT 3- (4,5-dimetil tiyazol-2-yl) -2,5-difenil tetrazolyum bromit, mor renkte olan çözünmez formazanına indirgeyebilir. Bu renkli bileşiğin absorbanşı 500-600 nm dalga boyları arasında spektrofotometrik olarak ölçülür.

1. Çalışmaya hazırlık aşamasında 24 kuyucuklu petrinin 4 kuyusuna, her kuyuda  $5 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekim yapıldı.
2. Hücreler %60-65 doluluk oranına geldiğinde besiyeri FBS'siz olan ile değiştirildi.
3. Yaklaşık 6-7 saat sonra hücrelere daha önce belirlenen konsantrasyonlarda fenretinide molekülü muamelesi yapıldı.
  - 1.Grup: Kontrol, fenretinide muamelesi yapılmamış hücreler (% 0.1 DMSO)
  - 2.Grup: 1  $\mu$ M fenretinide muamelesi yapılan hücreler
  - 3.Grup: 5  $\mu$ M fenretinide muamelesi yapılan hücreler
  - 4.Grup: 10 $\mu$ M fenretinide muamelesi yapılan hücreler
4. 5 mg/ml olacak şekildi PBS ile MTT stok solüsyonu hazırlandı.
5. 0,04 M HCl içeren izopropanol hazırlandı.
6. Hücre yaklaşık 24 ve 48 saat sonra inkübatörden alınıp ılık PBS ile yıkandı.
7. Daha önceden hazırlanana MTT stok solüsyonu 1/10 oranında PBS ile dilüe edildi.
8. PBS ile yıkanan hücrelere dilüe edilen MTT working solüsyonundan her kuyuya 500  $\mu$ l (24 well için) konulup 37°C inkübatöre kaldırıldı.

9. 2-3 saat sonra inkübatörden alınan hücrelerden MTT working solüsyonu uzaklaştırıldı.
10. Her kuyuya 500 µl asidik izopropanol eklenip iyice pipetaj yapıldı.
11. Kuyulardaki örnekler 1,5 ml'lik ependorflara alınıp 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı.
12. Süpernatant yeni 24 well'lere alındı ve 570 nm'de Thermo Scientific, Multiskan GO cihazında okutuldu.

Bu çalışma 3 kez tekrarlandı.

### **3.2.9. Hücre Migrasyonu**

Hücre migrasyonu(göçü), çok hücreli organizmaların doğru organizasyonu gerçekleştirebilmesi için gerekli bir süreçtir. Boyden chamber, scratch gibi methodlar mevcuttur. Bu çalışmada çizgi çekerek boşluk oluşturma yöntemi kullanıldı.

12 kuyucuklu petrilere ekilen hücreler %100 doluluğa ulaştığında 1000µl'lik pipet ucu yardımıyla kuyuların tam ortasından çizgi çekilerek o bölgedeki hücreler kaldırıldı.

1. Medium ile kaldırılan hücreler uzaklaştırıldı.
2. Daha önce belirlenen konsantrasyonlarda fenretinide ile muamele yapıldı.
  - 1.Grup: Kontrol, fenretinide muamelesi yapılmamış hücreler (% 0.1 DMSO)
  - 2.Grup: 1 µM fenretinide muamelesi yapılan hücreler
  - 3.Grup: 5 µM fenretinide muamelesi yapılan hücreler
  - 4.Grup: 10µM fenretinide muamelesi yapılan hücreler
3. Belirli saat aralıklarla mikroskop altında görüntü alınıp yaklaşımlar karşılaştırıldı.

Bu çalışma 3 kez tekrarlandı.

### **3.2.10. Kapiller Benzeri Tüp Oluşumu**

Anjiyogenezin yeniden düzenleme aşamasını modellemek için en yaygın kullanılan in vitro deneylerden biri, tüp oluşturma deneyidir. Test, kapiller benzeri yapılar oluşturmak için uygun hücre dışı matris desteği ile endotelial hücrelerin kabiliyetini ölçer. Bu çalışmada uygun ortamı Corning Matrigel Matrix ile elde ettik.

1. Matrigel bir gece öncesinden buz üzerinde +4°C'ye kaldırıldı. Aynı şekilde steril 1000µl'lik pipet ucu ve 24 well -20°C'ye kaldırıldı.
2. Ertesi gün 24 well'e 290µl matrigel konulup 37°C inkübatöre kaldırıldı.

3. Kuyucuklarda katılaşılan matrigelin üzerine her kuyucuğa 40.000 hücre gelecek şekilde fenretinide ilave edilerek kuyuların tam ortaya bırakıldı ve “+” işareti çizerek kuyuya dağıtıldı.
- 1.Grup: Kontrol, fenretinide muamelesi yapılmamış hücre (% 0.1 DMSO)
- 2.Grup: 1  $\mu$ M fenretinide muamelesi yapılan hücre
- 3.Grup: 5  $\mu$ M fenretinide muamelesi yapılan hücre
- 4.Grup: 10 $\mu$ M fenretinide muamelesi yapılan hücre
4. Yaklaşık 18-20 saat sonrasında mikroskopta tüp oluşumlarının görüntüsü alındı.

Bu çalışma 3 kez tekrarlandı.

### 3.2.11. Gen qRT-PCR (Real Time-PCR, Gerçek Zamanlı-PCR)

1. qRT-PCR için gerekli tepkime bileşenleri Qiagen miScript SYBR Green PCR Kiti kullanılarak elde edildi.
2. Buz bloğu üzerinde tepkime bileşenlerinin her bir örnek için hacimleri tablo 14’ye göre hazırlandı.

Bu çalışma 3 kez tekrarlandı.

**Tablo 14:** Genler için gerçekleştirilen qRT-PCR bileşen oranları

| Bileşenler                      | Hacim                      |
|---------------------------------|----------------------------|
| 2x QuatiTect SYBR Green PCR mix | 7 $\mu$ l                  |
| Forward Primer                  | 0,8 $\mu$ l                |
| Reverse Primer                  | 0,8 $\mu$ l                |
| RNase içermeyen su              | 3,4 $\mu$ l                |
| Kalıp cDNA                      | 2 $\mu$ l                  |
| <b>Toplam Hacim</b>             | <b>14<math>\mu</math>l</b> |

**Tablo 15:** Genler için gerçekleştirilen qRT-PCR tepkime koşulları

| Sıcaklık (°C) | Zaman |            |
|---------------|-------|------------|
| 95 °C         | 15 dk |            |
| 95 °C         | 15 sn | } 45 döngü |
| 57°C          | 30 sn |            |
| 72 °C         | 30 sn |            |

### 3.2.12. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler için GraphPad Prism Programı (San Diego, CA) kullanıldı. Verilerin ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) değerlerinin analizi, tanımlayıcı istatistiklerden Column Statistics testi ile yapıldı.

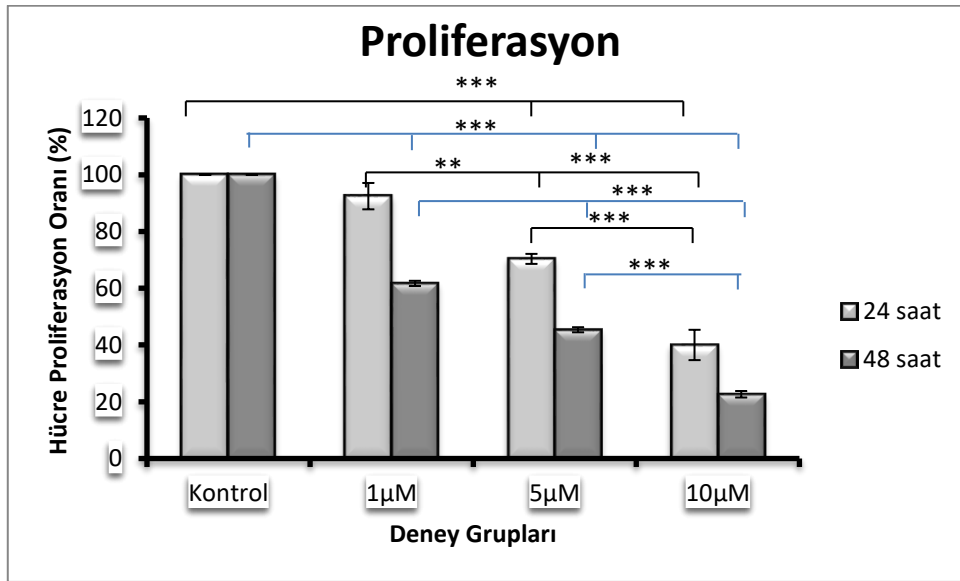
Deney gruplarının karşılaştırılması için non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ve Post-Hoc analizler için Dunn's test yapılmıştır.  $p < 0.05$  değerleri anlamlı kabul edilmiştir.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Hücre Proliferasyonu

Hücre proliferasyonu çalışmasını gerçekleştirmek için 24 kuyucuklu petrinin 4 kuyusuna ekimi yapılan hücrelerle, fenretinide muamelesi yapılmayan kontrol grubu ve 1  $\mu$ M, 5 $\mu$ M ve 10 $\mu$ M konsantrasyonlarda fenretinide muamelesi yapılan deney grupları oluşturuldu. 24 saat ve 48 saat sonunda, kuyulardaki hücrelerin doluluk oranı %65 civarına ulaştığında, besi yeri FBS'siz besiyeri ile değiştirildi. Belirlenen miktarlarda MTT çalışma solüsyonu kuyulara eklendi. 3 saat boyunca 37°C inkübatörde kalan hücrelerden MTT çalışma solüsyonu uzaklaştırılıp, önceden hazırlanan asidik izopropanol eklenerek iyice pipetaj yapıldı. Asidik izopropanol ile muamele edilen hücreler daha sonra 1,5  $\mu$ l'lik ependorflara alınıp santrifüj yapıldı. Süpernatantlar 96 kuyucuklu yeni bir petriye alındı ve spektrofotometrede 570 nm'de ölçümler gerçekleştirildi. Yapılan bu çalışmanın sonucu, fenretinide molekülünün hem 24 hem de 48 saatlik sürelerde doza bağlı olarak proliferasyonu anlamlı bir şekilde baskıladığını göstermiştir (Şekil 6). Fenretinide molekülünün uygulanan dozları arasında da anlamlı farklar bulunmuştur (Şekil 6).

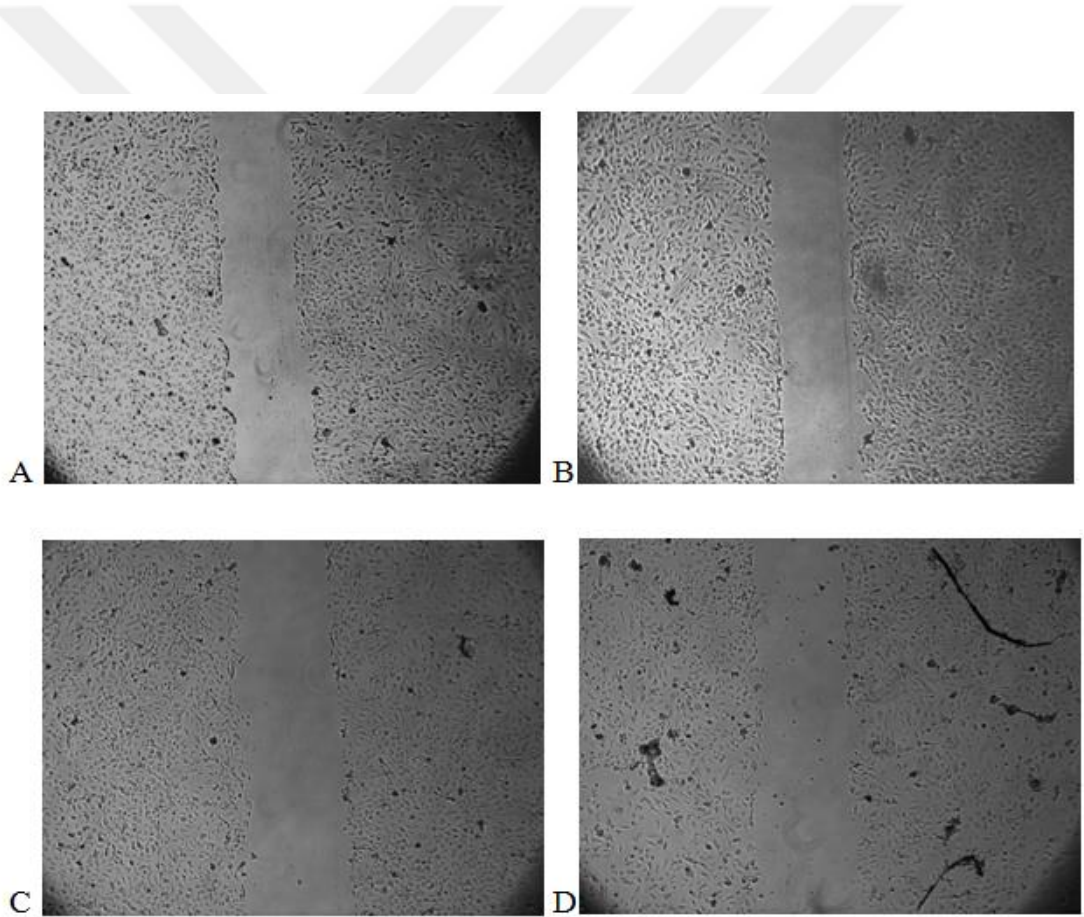


**Şekil 6.** Fenretinide molekülünün hücrelerin proliferasyon yüzdesine etkisi. (\*\* ve \*\*\*: fenretinide uygulanan grupların kontrole göre ve konsantrasyonların kendi aralarındaki anlamlılığı göstermektedir, sırasıyla  $p < 0.01$  ve  $p < 0.001$ )

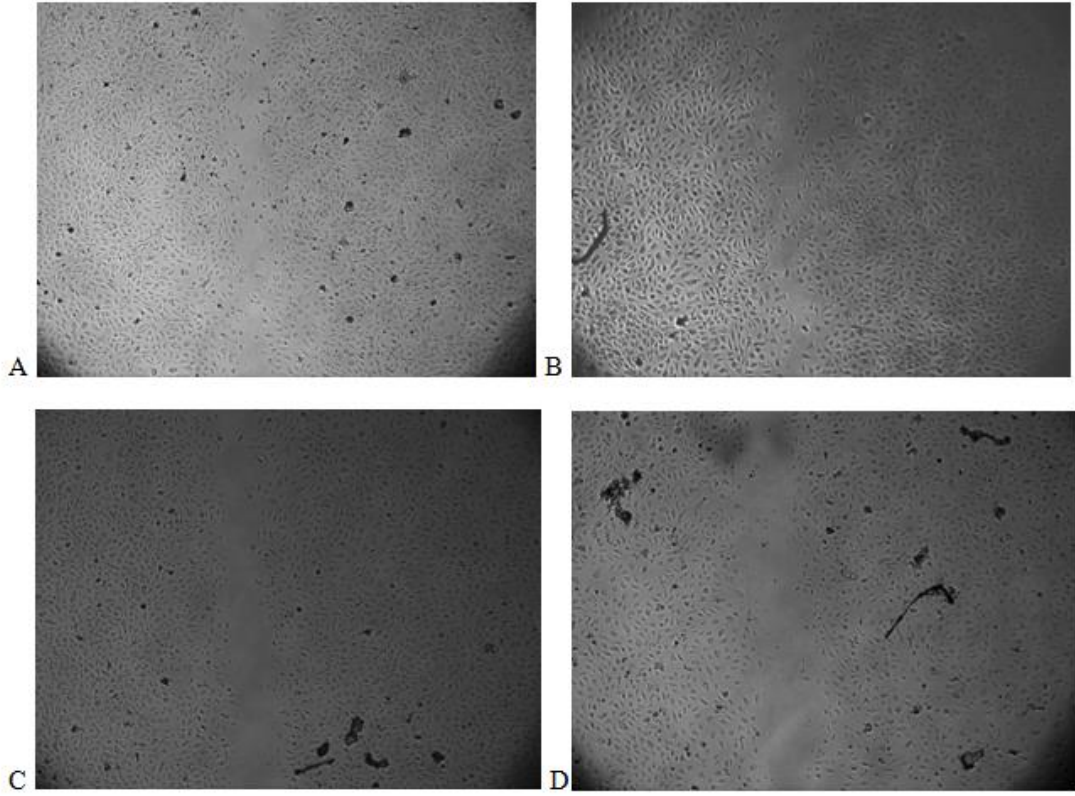
#### 4.2. Hücre Migrasyonu

Migrasyon çalışmasını için 12 kuyucuklu petrilere hücre ekimi yapıldı. Hücreler, fenretinide muamelesi yapılmayan kontrol grubu ve 1  $\mu$ M, 5 $\mu$ M ve 10 $\mu$ M konsantrasyonlarda fenretinide molekülü ile muamale edilen deney gruplarına ayrıldı.

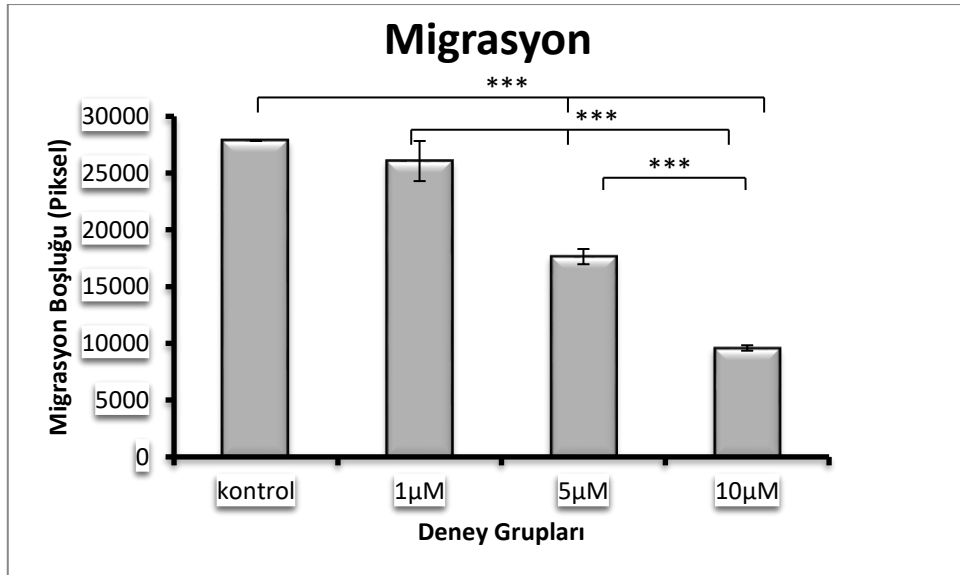
Ekimi yapılan hücrelerin doluluk oranı %100 olduğunda çalışma başlatıldı. Kontrollü bir şekilde 1000 $\mu$ l'lik pipet ucu ile kuyuların tam ortalarından çizgi çekilerek boşluklar oluşturuldu. Oluşturulan bu boşlukların dolması belirli aralıklarla mikroskop altında izlendi. 6 saat sonunda görüntü alındı. Alınan görüntülerde fenretinide molekülünün konsantrasyonu ile migrasyonun ters orantılı olduğunu saptadık (Şekil 7 ve Şekil 8). Ayrıca, fenretinide molekülünün konsantrasyon artışına bağlı olarak da hücre migrasyonunu baskıladığını gözlemledik (Şekil 9).



**Şekil 7.** Fenretinide molekülü muamele öncesi açılan boşluklar. A) kontrol B) 1  $\mu$ M C) 5  $\mu$ M D) 10  $\mu$ M



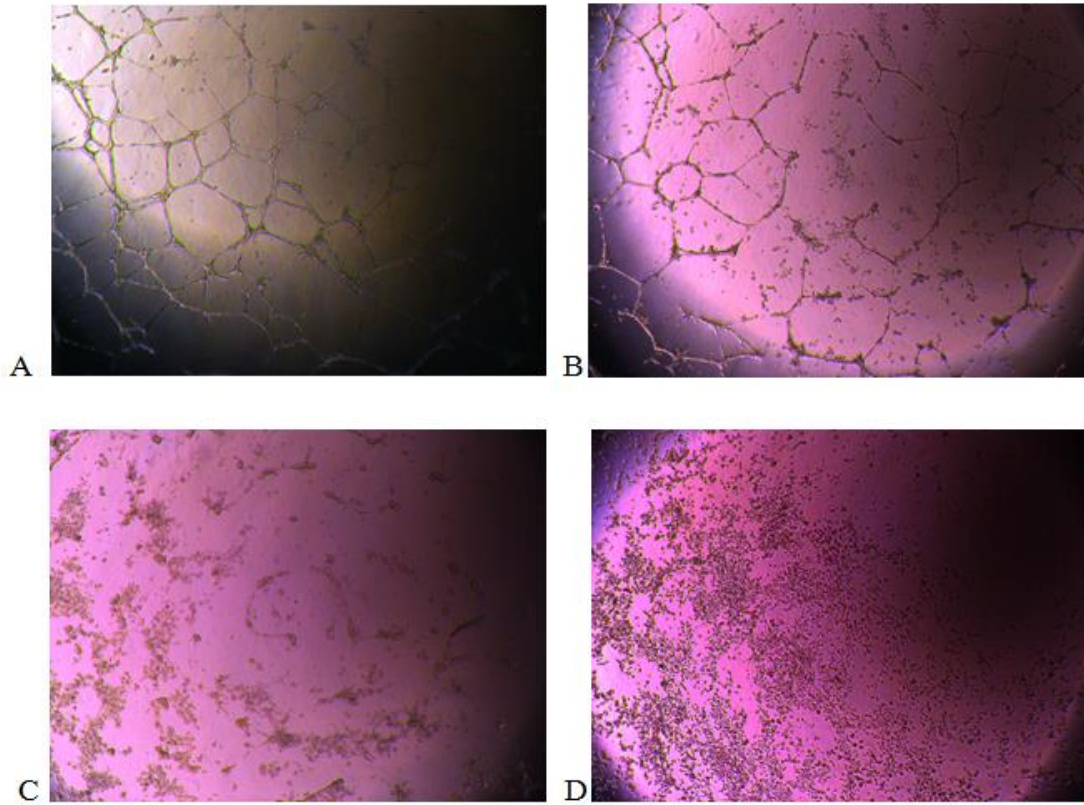
**Şekil 8.** Fenretinide molekülünün migrasyona etki. A) kontrol B) 1  $\mu$ M C) 5  $\mu$ M D) 10  $\mu$ M



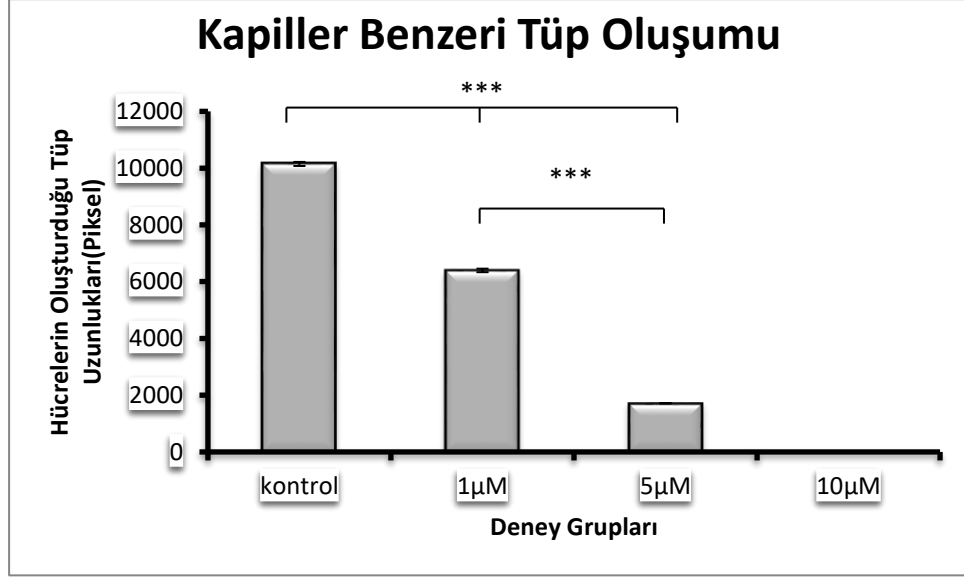
**Şekil 9.** Fenretinide molekülü uygulanan hücrelerin piksel olarak migrasyon aralığı. (\*\*\*: fenretinide uygulanan grupların kontrole göre ve konsantrasyonların kendi aralarındaki anlamlılığını göstermektedir,  $p < 0.001$ )

#### 4.3. Kapiller Benzeri Tüp Oluşumu

Çalışma için önceden 24 kuyucuklu petrilere dökülen matrigel-matriksin jel kıvamına gelmesi için 30-40dk. 37°C inkübatöre kaldırıldı. Fenretinide molekülü muamelesi yapılmayan kontrol grubu ve 1  $\mu$ M, 5 $\mu$ M ve 10 $\mu$ M konsantrasyonlarda fenretinide molekülü ile muamele edilen deney grubu hücreleri kuyucuklara ekildi. Yaklaşık 15 saat sonra tüp oluşumlarının görüntüsü mikroskop ile alındı. Görüntülerdeki tüp uzunlukları ImageJ Software programı ile piksel olarak hesaplandı. Fenretinide molekülü doza bağlı olarak tüp oluşumunu bloke etmiştir. İlacın 10  $\mu$ M'lık dozunda neredeyse hiç tüp oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 10 ve Şekil 11).



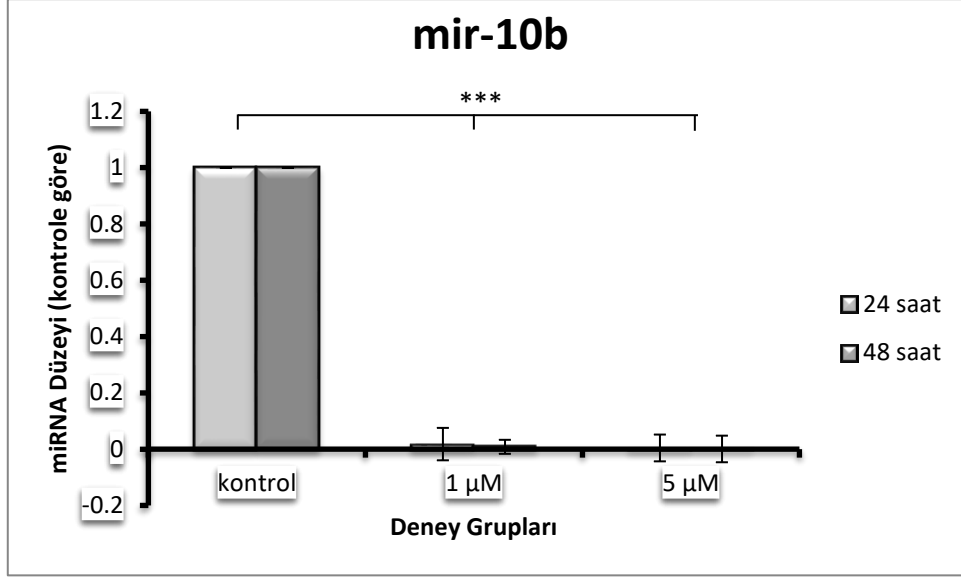
**Şekil 10:** Fenretine molekülünün kapiller benzeri tüp oluşumu üzerindeki etkileri A) Kontrol grubu B) 1 $\mu$ M'lık konsantrasyonda fenretinide muamelesi yapılan grup C) 5 $\mu$ M'lık konsantrasyonda fenretinide muamelesi yapılan grup D) 10 $\mu$ M'lık konsantrasyonda fenretinide muamelesi yapılan grup.



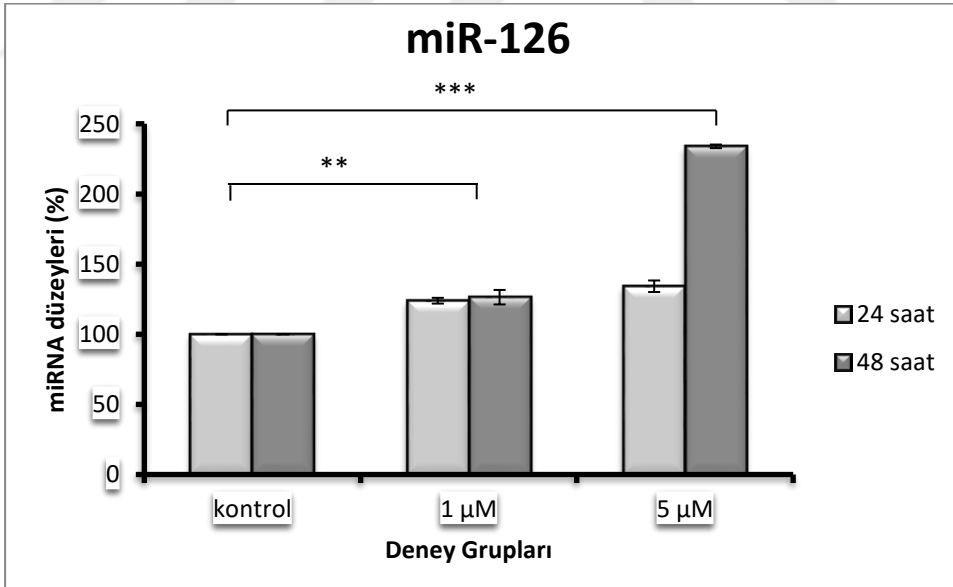
**Şekil 11.** Fenretinide molekülü muamelesi ile oluşan tüplerin uzunluklarının piksel olarak karşılaştırılması.(\*\*\*: fenretinide uygulanan grupların kontrole göre ve konsantrasyonların kendi aralarındaki anlamlılığını göstermektedir,  $p < 0.001$ )

#### 4.4. miRNA Taraması

MiRNA düzeylerini saptamak için, 6 kuyucuklu petrilerde, 24 ve 48 saatlik iki ana grup ayarlandı. Bu iki ana grup altında, fenretinide ile muamele yapılmayan kontrol grubu ve 1 µM, 5µM ve 10µM konsantrasyonlarda fenretinide ile muamele edilen deney grupları oluşturuldu. 24 saat ve 48 saat sonunda elde edilen total RNA'ların miktar tespiti nanodrop spektrofotometre ile yapıldı. Tüm RNA örnekleri en düşük konsantrasyondaki RNA'ya RNase içermeyen su ile dilüe edilerek eşitlendi. Konsantrasyonları eşitlenen RNA'lardan miRNA için özelleştirilmiş kit yardımı ile cDNA'lar elde edildi. Elde edilen cDNA'lar 1:10 oranında dilüe edilerek miRNA'ların taranması için qRT-PCR için kullanıldı. Yapılan deneyler sonucunda miR-10b ve miR-126'da anlamlı sonuçlar elde ederken diğer miRNA'larda anlamlı bir veri elde edilemedi (Tablo 16). Pro-anjiyogenik olan miR-10b'de azalma gözlenirken (Şekil 12) anti-anjiyogenik olan miR-126'da artış gözlenmiştir (Şekil 13).



**Şekil 12.** Fenretinide molekülünün miR-10b miktarına etkisi. (\*\*\*: fenretinide uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir,  $p < 0.001$ )



**Şekil 13.** Fenretinide molekülünün miR-126 miktarına etkisi. (\*\* ve \*\*\*: fenretinide uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, sırasıyla  $p < 0.01$  ve  $p < 0.001$ )

**Tablo 16:** Fenretinide molekülünün miRNA miktarları üzerindeki etkiler

| miRNA    | Artma/Azalma |
|----------|--------------|
| mir-126  | Arttı        |
| mir-31   | NA           |
| mir-21   | NA           |
| mir-101  | NA           |
| mir-340  | NA           |
| mi-r29c  | NA           |
| mir-10b  | Azaldı       |
| mir-206  | NA           |
| mir-146a | NA           |

#### 4.5. Gen Taraması

eNOS, FOXM1 ve CDH5 genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişimi incelemek için, 6 kuyucuklu petrilerde, 24 ve 48 saatlik iki ana grup ayarlandı. Bu iki ana grup altında, fenretinide ile muamele yapılmayan kontrol grubu ve 1  $\mu\text{M}$ , 5 $\mu\text{M}$  ve 10 $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda fenretinide ile muamele edilen deney grupları oluşturuldu. 24 saat ve 48 saat sonunda elde edilen total RNA'ların miktar tespiti nanodrop spektrofotometre ile yapıldı. Tüm RNA örnekleri en düşük konsantrasyondaki RNA'ya RNase içermeyen su ile dilüe edilerek eşitlendi. Konsantrasyonları eşitlenen RNA'lardan ticari kit yardımı ile cDNA'lar elde edildi. Elde edilen cDNA'lar 1:5 oranın da dilüe edilerek genlerin taranması için qRT-PCR için kullanıldı.

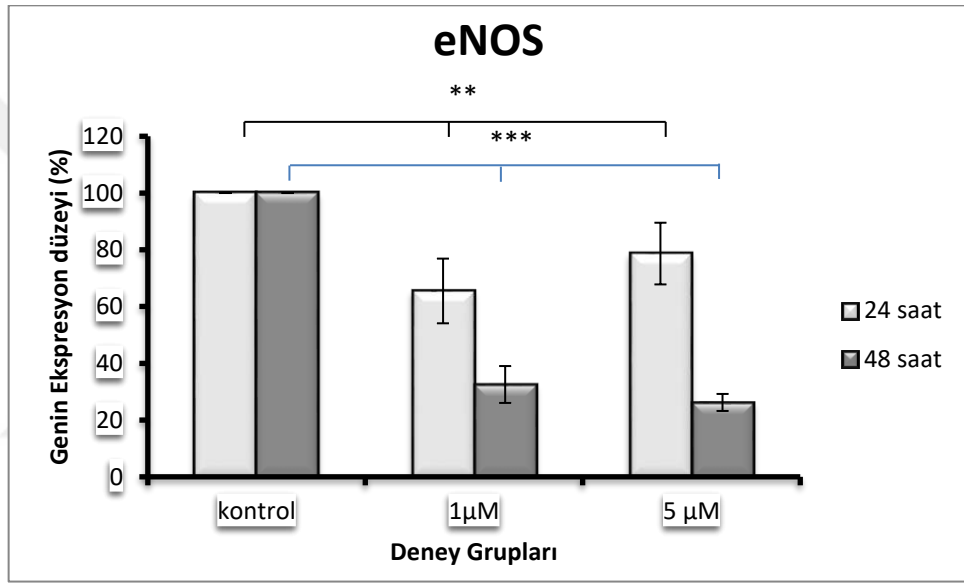
24 saatlik deney grubunun, 1  $\mu\text{M}$  konsantrasyon fenretinide ile muamele yapılan hücrelerinde eNOS geninde anlamlı düşüşler gözlenirken 5  $\mu\text{M}$  konsantrasyon fenretinide ile muamelesi yapılan hücrelerinde eNOS geninde kontrole göre azalma görülürken 1  $\mu\text{M}$ 'a göre hafif bir artış görülmüştür (Şekil 14). 48 saatlik deney grubunun, 1  $\mu\text{M}$  ve 5  $\mu\text{M}$  konsantrasyon fenretinide ile muamelesi yapılan hücrelerinde anlamlı azalmalar meydana gelmiştir (Şekil 14).

24 saatlik deney grubunun, 1  $\mu\text{M}$  ve 5  $\mu\text{M}$  konsantrasyondaki fenretinide ile muamelesi yapılan hücrelerin CDH5 geninde anlamlı bir azalma görüldü (Şekil 15).

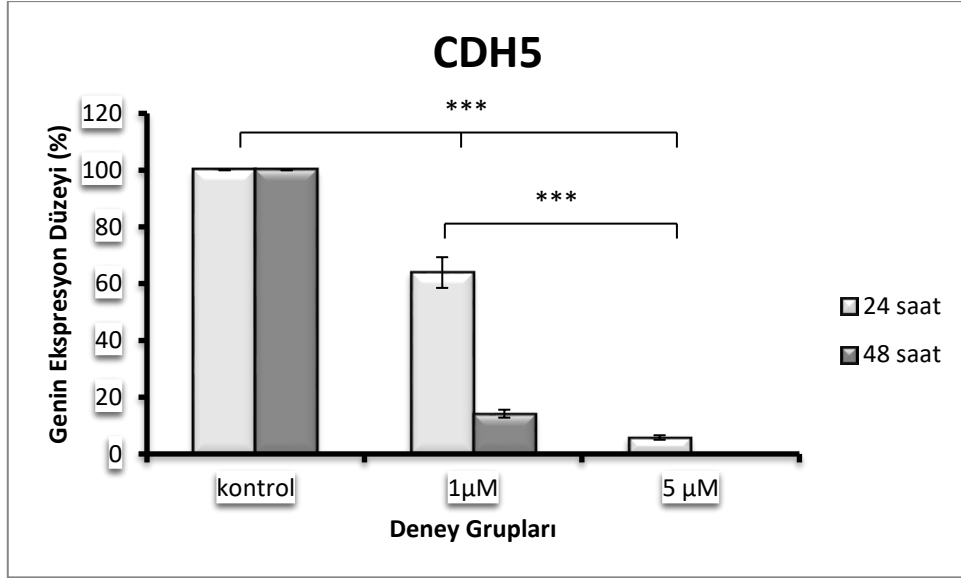
48 saatlik deney grubunun 1  $\mu$ M ve 5  $\mu$ M konsantrasyon fenretinide ile muamelesi yapılan hücrelerinde anlamlı azalmalar gözlenmiştir (Şekil 15).

24 ve 48 saatlik deney gruplarının, 1  $\mu$ M ve 5  $\mu$ M konsantrasyondaki fenretinide ile muamelesi yapılan hücrelerinde FOXM1 geninde anlamlı düşüşler meydana gelmiştir (Şekil 16).

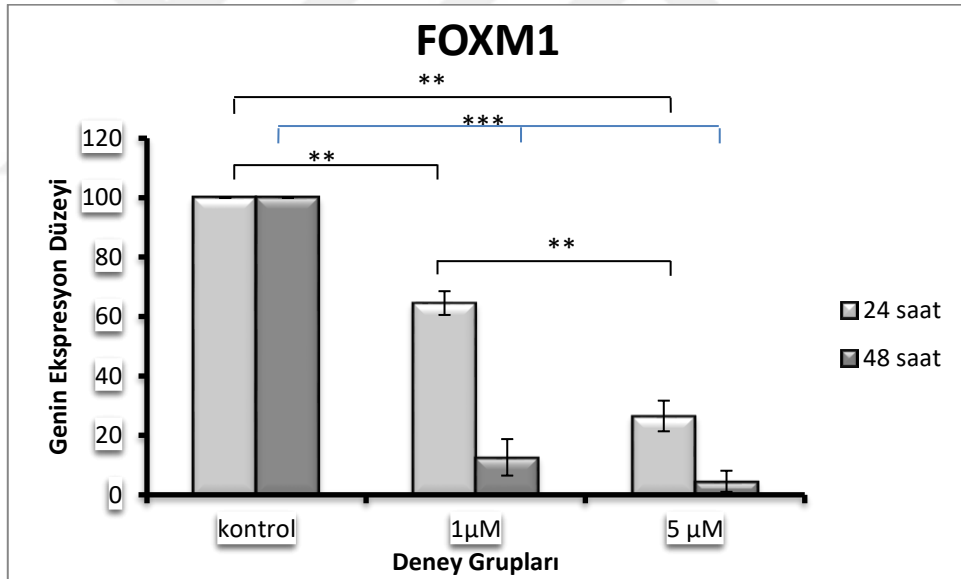
Yine 24 saatlik deney grubunun 1  $\mu$ M ve 5  $\mu$ M konsantrasyon fenretinide ile muamelesi yapılan hücreleri de eNOS, FOXM1 ve CDH5 genlerinin ekspresyon düzeylerinde anlamlı düşüşler gözlemlenmiştir.



**Şekil 14.** Fenretinide molekülünün eNOS geninin ekspresyonu üzerindeki etkileri. (\*\* ve \*\*\*: fenretinide uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, sırasıyla  $p<0.01$  ve  $p<0.001$ )



**Şekil 15.** Fenretinide molekülünün CDH5 geninin ekspresyonu üzerindeki etkileri. (\*\*\*: fenretinide uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir,  $p<0.001$ )



**Şekil 16.** Fenretinide molekülünün FOXM1 geninin ekspresyonu üzerindeki etkileri(\*\* ve \*\*\*: fenretinide uygulanan grupların kontrole göre anlamlılığını göstermektedir, sırasıyla  $p<0.01$  ve  $p<0.001$ )

## 5. TARTIŞMA

Anjiyogenez, var olan damarlardan yeni damarların oluşması sürecidir (1). Canlı vücudunun temel bir fizyolojik süreci olan anjiyogenez normal koşullar altında sıkı kontrol edilen bir mekanizmaya sahiptir. Bununla birlikte, patolojik bazı süreçlerde bu kontrol devre dışı kalır ve kontrolsüz bir damarlanma meydana gelir (1). Kanseri, retinopati ve romatoid artrit gibi patolojik durumların anjiyogenez ile ilgili araştırmaları üzerinde yoğunlaşmıştır (2, 141, 142). Yapılan kanser çalışmalarında, tümör kitlesinin 0,5 mm'nin üzerine çıkması ile kitlenin ekstra damarlanmaya ihtiyaç duyduğu ve bu nedenle tümörün bulunduğu bölgede anormal anjiyogenezin başladığı gösterilmiştir (1, 2). Anjiyogenez çalışmalarında en çok dikkati çeken büyüme faktörü VEGF olup anjiyogenezin temel uyaranlarından ve bu genin aşırı ekspresyonunun anjiyogenezi arttırdığı bilinmektedir (3). VEGF gibi FGF, HIF ve EGF gibi diğer bazı büyüme faktörleri de anjiyogenezde önemli roller oynarlar.

Fenretinide molekülü bir nükleer hormon reseptör ligandı olan retinoik asit ailesinin sentetik bir analogudur ve anjiyogenez ile ilgili genlerin üzerindeki etkileri merak konusudur. Fenretinide molekülü ile yapılan araştırmalarda, anjiyogenezle ilişkili büyüme faktörlerini ve reseptörlerini modüle ederek tümör büyümesini inhibe ettiği ve retinoid reseptörlerden bağımsız olarak apoptotik özellikler sergilediği gösterilmiştir (17). Çalışmamızda seçtiğimiz FOXM1, CDH5 ve eNOS genleri anjiyogenezi dolaylı yollardan etkileyen genlerdir (143, 144, 145). HUVEC'lerin fenretinide molekülü ile belirli konsantrasyonlarda muamelesi sonucunda, seçtiğimiz bu genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler gözlemlendik. eNOS genindeki bir ekspresyon artışının anjiyogenezi indüklediği bilinmektedir (150). Yaptığımız çalışmada, HUVEC'lerin 24 saat 1  $\mu$ M fenretinide muamelesi sonucunda eNOS geninin ekspresyonunda kontrole göre %60 azalma gözlenirken, 5  $\mu$ M fenretinide muamelesi yapılan grupta ise %50 bir azalma meydana gelmiştir. 48 saat 1  $\mu$ M fenretinide ile muamele edilen grupta kontrole göre %40 azalma gözlenirken, 5  $\mu$ M fenretinide ile muamele edilen grupta %20 azalma meydana gelmiştir (Şekil 14). Çalışmamızda, fenretinide molekülünün anjiyogenezi baskılayan bir ajan olarak eNOS gibi pro-anjiyogenik bir genin ifadesini düşürmesi bizim hipotezimizi desteklemektedir.

eNOS geni, anjiyogenezde rol alan kısa süreli bir sinyal molekülü olan nitrik oksit (NO)'in üretimini katalizler. Damarlar oluştuktan sonra endotelyal hücrelerin morfolojisi ve diğer bazı etkenlerin damarlarda sıvı kaçıışı stresini oluşturması veya hücre-hücre teması gibi birçok etken NO salınımını ve eNOS ekspresyonunu uyarır (150). Yani eNOS, anjiyogenez sürecinde birçok dış etmen tarafından uyarılır. Çalışmamızda elde ettiğimiz eNOS geninin ifade seviyesindeki baskılanmanın moleküler mekanizması ile ilgili ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

FOXM1 geni anjiyogenezi teşvik eden bir gendir (149). Yaptığımız çalışmada, 24 saatlik deney grubunda fenretinide molekülü ile muamele edilen hücrelerde FOXM1 ekspresyonu 1  $\mu$ M ve 5  $\mu$ M'lık konsantrasyonlarda kontrole göre sırasıyla %35 ve %50'lik bir azalma göstermiştir. 48 saatlik deney grubunda ise fenretinide uygulaması kontrole göre sırasıyla %85 ve %95 bir baskılama göstermiştir (Şekil 16). Çalışmamız, anti-kanser ilaçları için bir hedef olarak görünen FOXM1 genine fenretinide molekülünün moleküler etkisini araştırmak için umut vaad eden öncü bir çalışmadır.

CDH5 geni, anjiyogenezi indükleyen bir gendir (145). 24 saatlik deney grubunun 1  $\mu$ M'lık konsantrasyonunda kontrole kıyasla %40 düşüş, 5  $\mu$ M'da ise %90'a yakın bir düşüş vardır. 48 saatlik deney grubunda ise 1  $\mu$ M'da %80, 5  $\mu$ M'da %98'e yakın bir düşüş görülmüştür (Şekil 15). CDH5 geninin ekspresyonu hipoksik koşullarda indüklenebilmektedir. Fenretinide molekülü hipoksik koşullar altında HIF geninin ekspresyonunu düşürdüğü (159) gibi CDH5 geninin'de ekspresyonunu düşürmüş olabilir.

Elde ettiğimiz verilere göre, fenretinide molekülü FOXM1, eNOS ve CDH5 genlerinin ifadelerinde, kurduğumuz hipotezi destekler nitelikte bir azaltma meydana getirmiştir. Fakat bu azalışın nedenin direkt genlere ait mRNA'ları hedefleyerek mi yoksa ilgili geni etkileyen başka bir mekanizma ile mi gerçekleştirdiği araştırmaya açık bir konudur.

Literatür taramasında, fenretinide molekülünün, insan retinal pigment epiteli (ARPE-19) hücrelerinde, miR-9 üzerindeki etkilerine bakılmış ve sonuçta miR-9'un fenretinide konsantrasyonları ile doğru orantılı bir şekilde arttığı bulunmuştur (139).

Bunun dışında, fenretinide molekülünün miRNA'lar üzerine etkisini inceleyen başka bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Yaptığımız çalışmada, fenretinide molekülünün yine literatür taraması ile belirlediğimiz 24 ve 48 saatlik gruplarında, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M ve 10  $\mu$ M'lık konsantrasyonlarda alt deney grupları oluşturuldu. 10  $\mu$ M'lık konsantrasyonun toksik etki göstermesi nedeni ile o gruptan sonuç alınamadı. Bununla birlikte, 1  $\mu$ M ve 5  $\mu$ M'lık konsantrasyon alt gruplarından elde ettiğimiz RNA'lar ile q-RT PCR gerçekleştirildi. Taramada yer alan miR'lerden sadece miR-10b ve miR-126'dan anlamlı sonuçlar elde ederken diğer miRNA'lardan anlamlı veriler elde edilememiştir. miR-10b pro-anjiyogenik bir miRNA'dır (154) ve miR-126 ise anti-anjiyogenik bir miRNA'dır (160). Çalışmamızda, anti-anjiyogenik özellikler gösteren fenretinide molekülünün miR-10b'yi azalttığını miR-126'yı ise arttırdığını gösterdik. Yaptığımız çalışma bu yönüyle literatür ile uyumludur (Şekil 12 ve Şekil 13).

Fenretinide molekülünün terapötik etkisi, kanser ve diyabet gibi bazı hastalıklarda gösterilmişken hangi moleküler mekanizmalara etki ettiği tam olarak bilinmemektedir (157). Eğer fenretinide'nin moleküler mekanizması iyi anlaşılabilirse farmakolojik alanda yapılan çalışmalarda biyoyararlanım artırılabilir. Bu da kanser, obezite, diyabet ve bazı oküler rahatsızlıklar gibi birçok patolojik konuda yeni bir tedavi hattı oluşturmaya fırsat sağlayabilir.

Literatürdeki birkaç çalışmada, fenretinide molekülünün hücre migrasyonunu, proliferasyonunu ve kapiller benzeri tüp oluşumunu bloke ettiği gösterilmiştir (145, 147, 148). Yaptığımız çalışmada da endotelial hücre proliferasyonu, migrasyonu ve kapiller benzeri tüp oluşumuna fenretinide'nin etkilerini inceledik. Yapılan migrasyon deneyinde açtığımız boşlukları, hücrelerin doldurma kapasitelerini ölçtük. Sonuç olarak, hücreleri muamele ettiğimiz fenretinide konsantrasyonu arttıkça, hücrelerin boşlukları doldurma kapasitelerinin azaldığını göstermiş olduk (Şekil 7 ve Şekil 8). Yine migrasyon çalışmasında, kontrol grubu, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M ve 10  $\mu$ M fenretinide muamelesi yapılan grupların, 6 saat sonunda açık kalan boşluklarının piksel ölçümü yapıldı. Sonuç olarak, fenretinide molekülünün endotel hücre migrasyonunu doza bağlı olarak azalttığını kantitatif olarak da gösterdik (Şekil 9).

Hücre proliferasyonu için MTT yöntemini uyguladığımız çalışmamızda, fenretinide muamelesi yapılan hücrelerin kontrole göre çoğalmasının baskılandığı sonucu elde edilmiştir (Şekil 6).

Ayrıca, 48 saat fenretinide muamelesi yapılan hücrelerdeki proliferasyonun 24 saatlik muamele yapılan hücrelere göre anlamlı bir şekilde daha da azaldığını gösterdik.

Kapiller benzeri tüp oluşumu çalışmasında, hücrelerin matrigel matriks üzerinde kapiller yapı oluşturma yeteneklerine fenretinide muamelesinin etkisini inceledik. Yaptığımız çalışmada, fenretinide molekülü dramatik olarak doza bağlı bir şekilde endotel hücrelerin kapiller benzeri yapı oluşturmalarını baskılamıştır. (Şekil 10). Bunun yanı sıra fenretinide'nin tüp oluşumunu azalttığını kantitatif olarak göstermek için gruplardan elde ettiğimiz görüntülerdeki tüplerin uzunluklarını piksel olarak ölçtüğkten sonra bu baskılama verilerinin grafiğini elde ettik (Şekil 11).

Fenretinide molekülü gerçekten araştırılması ve moleküler mekanizması aydınlatılması gereken önemli bir moleküldür. Gelecekte yapılacak olan moleküler çalışmalar ile anjiyogenez üzerine etkisi spesifik olarak ortaya çıkarılabilecek olan fenretinide molekülü için çalışmamız literatüre katkı sağlayacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

1. Folkman, Judah, and Yuen Shing. Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 1992; 267(16): 10931–34.
2. Otrrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis*. 2007 May-Jun;38(3):258-68.
3. Zygmunt M, Herr F, Münstedt K, Lang U, Liang OD. “Angiogenesis and Vasculogenesis in Pregnancy.” *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*. 2003; 110: 10–18.
4. Veith AP, Henderson K, Spencer A, Sligar AD, Baker AB. Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018; S0169-409X(18)30246-1.
5. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(5):391-400.
6. Raymond E, Dahan L, Raoul JL, Bang YJ, Borbath I, Lombard-Bohas C, Valle J, Metrakos P, Smith D, Vinik A, Chen JS, Hörsch D, Hammel P, Wiedenmann B, Van Cutsem E, Patyna S, Lu DR, Blanckmeister C, Chao R, Ruzsniowski P. Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*. 2011;364(6):501-13.
7. Tailor TD, Hanna G, Yarmolenko PS, Dreher MR, Betof AS, Nixon AB, Spasojevic I, Dewhirst MW. Effect of pazopanib on tumor microenvironment and liposome delivery. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(6):1798-808.
8. Faruk Saydam, İrfan Değirmenci, Hasan Veysi Güneş. MikroRNA’lar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi*. 2011; 38 (1): 113-120.
9. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor. *Cancer Metastasis Rev*. 2009 Dec;28(3-4):369-78.
10. David L.Nelson, Michael M. Cox. Lighinger Biyokimyanın İlkeleri. RNA metabolizması bölümü. Y. Murat Elçin.5. Baskıdan çeviri. Palme Yayıncılık 2013; p. 1021- 1064.

11. Sogno IJ, Venè R, Ferrari N, De Censi A, Imperatori A, Noonan DM, Tosetti F, Albini A. Angioprevention with fenretinide: targeting angiogenesis in prevention and therapeutic strategies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010;75(1):2-14.
12. Jr, Robert W Curley, and Margaret Clagett-dame. 4-HPR Is an Endoplasmic Reticulum Stress Aggravator and Sensitizes Breast Cancer Cells Resistant to TRAIL / Apo2L. 2018; 4416: 4403–16.
13. Allyson L. Anding, Jason S. Chapman, Derek W. Barnett, Robert W. Curley Jr. and Margaret Clagett-Dame. The Unhydrolyzable Fenretinide Analogue 4-Hydroxybenzylretinone Induces the Proapoptotic Genes GADD153 (CHOP) and Bcl-2-Binding Component 3 (PUMA) and Apoptosis that Is Caspase-Dependent and Independent of the Retinoic Acid Receptor. 2007; 153(13): 6270–78.
14. Massimiliano Cazzaniga, Clara Varricchio, Chiara Montefrancesco, Irene Feroce, and Aliana Guerrieri-Gonzaga. Fenretinide (4-HPR): A Preventive Chance for Women at Genetic and Familial Risk. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 172897
15. Nicoletta Ferrari, Monica Morini, Ulrich Pfeffer, Simona Minghelli, Douglas M. Noonan and Adriana Albini. Inhibition of Kaposi's Sarcoma in Vivo by Fenretinide. 2003; 9: 6020–29.4.
16. Nicoletta Ferrari, Ulrich Pfeffer, Raffaella Dell'Eva, Claudia Ambrosini, Douglas M. Noonan and Adriana Albini. The Transforming Growth Factor- $\beta$  Family Members Bone Morphogenetic Protein-2 and Macrophage Inhibitory Cytokine-1 as Mediators of the Antiangiogenic Activity of N-(4-Hydroxyphenyl) Retinamide. 2005; 11(16): 4610–20.
17. William Samuel R. Krishnan Kutty, Sahrudaya Nagineni, Camasamudram Vijayasarathy, Roshantha A.S. Chandraratna, Barbara Wiggert. N-(4-hydroxyphenyl)retinamide induces apoptosis in human retinal pigment epithelial cells: Retinoic acid receptors regulate apoptosis, reactive oxygen species generation, and the expression of heme oxygenase-1 and Gadd153. 2006; 854–65.
18. Guanglei Zhuang, Xiumin Wu, Zhaoshi Jiang, Ian Kasman, Jenny Yao, Yinghui Guan, Jason Oeh, Zora Modrusan, Carlos Bais, Deepak Sampath, Napoleone Ferrara. Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and

- angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway. *The EMBO Journal* (2012) 31, 3513-3523.
19. Jianzhong Hu, Lei Zeng, Jianghu Huang, Guan Wang, Hongbin Lu. miR-126 promotes angiogenesis and attenuates inflammation after contusion spinal cord injury in rats. *Brain Research*. 2015; 191-202.
  20. Zhuoqing Xu, Congcong Zhu, Chun Chen, Yaping Zong, Hao Feng, Di Liu, Wenqing Feng, Jingkun Zhao, Aiguo Lu. CCL19 suppresses angiogenesis through promoting miR-206 and inhibiting Met/ERK/Elk-1/HIF-1 $\alpha$ /VEGF-A pathway in colorectal cancer. *Cell Death & Disease* volume 9, 2018: 974.4.
  21. Lipin Liu, Nan Bi, Lihong Wu, Xiao Ding, Yu Men, Wei Zhou, Lin Li, Weimin Zhang, Susheng Shi, Yongmei Song and Luhua WangEmail author. MicroRNA-29c functions as a tumor suppressor by targeting VEGFA in lung adenocarcinoma. *Molecular Cancer*. 2017; 16(1): 50.
  22. Amin Isanejad, Ali Mohammad Alizadeh, Sadegh Amani Shalamzari, Hamid Khodayari, Saeed Khodayari, Vahid Khori, Najmeh Khojastehnjad. MicroRNA-206, let-7a and microRNA-21 pathways involved in the anti-angiogenesis effects of the interval exercise training and hormone therapy in breast cancer. *Life Sciences*. 2016; 151: 30–40.
  23. Tomohiro Umezu, Satoshi Imanishi, Kenko Azuma, Chiaki Kobayashi, Seiichiro Yoshizawa, Kazuma Ohyashiki and Junko H. Ohyashiki. Replenishing exosomes from older bone marrow stromal cells with miR-340 inhibits myeloma-related angiogenesis. *Blood Advances* 2017 1:812-823.
  24. Claire ViallardBruno Larrivée. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*. 2017; 409–426.
  25. Thomas J. Poole J. Douglas Coffin. Vasculogenesis and angiogenesis: Two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. 1989; 251(2):224-31.
  26. Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. 2008; 73(7):751-62.
  27. Rasim Hamutoğlu, Ozan Önder. Fizyolojik ve patolojik koşullarda anjiyogenezin rolü. *FNGBilim Tıp Transplantasyon Dergisi*. 2017
  28. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386(6626):671-4.
  29. Mignatti P, Rifkin DB. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme and Protein*. 1996;49(1-3):117-37.

30. Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvascular Research*. 1977;14(1):53-65.
31. Dildar Konukoğlu, Mehtap Sultan Turhan. Anjiyogenezin temel moleküler mekanizmaları ve tümör anjiyogenezi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*. 2005; 36(1): 42-48
32. Clara Sanz, Nogués Timothy O'Brien. In vitro models for assessing therapeutic angiogenesis. *Drug Discovery Today*. 2016; pages 1495-1503.
33. Cleaver O, Melton DA. Endothelial signaling during development. 2003; 9(6):661-8.
34. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis. *Int J Cancer*. 1997; 72: 1-22.
35. Stepanova VV, Tkachuk VA. Urokinase as a multidomain protein and polyfunctional cell regulator. *Biochemistry (Mosc)*. 2002; 67: 109- 118.
36. Quoc T. Ho, Calvin J.Kuo. Vascular endothelial growth factor: Biology and therapeutic applications. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007, Pages 1349-1357.
37. Senger, Donald R, George E Davis. Angiogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2011; 1-19
38. Pepper, MS. Positive and negative regulation of angiogenesis; from cell biology to the clinic. *Vasc. Med*. 1996; 1, 259-266
39. Raghu Kalluri. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer* volume3. 2003; 422-433.
40. Stephan Barrientos, Olivera Stojadinovic, Michael S. Golinko, Harold Brem, Marjana Tomic-Canic. Growth factors and cytokines in wound healing. *Perspective article*. 2008; 1285
41. N. Ferrara, H.P. Gerber, J. LeCouter, The biology of VEGF and its receptors, *Nat. Med*. 9. 2003; 669-676.
42. Marie AstridHervé, Hélène Buteau Lozano, Roger Vassy, Ivan Bieche, Guillaume Velasco, Marika Pla, Gérard Perret, Samia Mourah, Martine Perrot Applanat. Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor 189 in Breast Cancer Cells Leads to Delayed Tumor Uptake with Dilated Intratumoral Vessels. *The American Journal of Pathology* Volume 172. 2008; 167-178.

43. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. 2002; 20(21):4368-80.
44. Michael J. Cross, Johan Dixelius, Taro Matsumoto, Lena Claesson Welsh. VEGF-receptor signal transduction. Trends in Biochemical Sciences. 2003; 488-494.
45. Otrrock, Zaher K., R. Mahfouz, Jawad A. Makarem, Ali I. Shamseddine. Understanding the Biology of Angiogenesis: Review of the Most Important Molecular Mechanisms. Blood Cells, Molecules, and Diseases. 2007; 39(2): 212–20.
46. L. F. Brown, K. T. Yeo, B. Berse, T. K. Yeo, D. R. Senger, H. F. Dvorak, L. van de Water. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. Journal of experimental medicine. 1992; 1359–1375.
47. Arne W. Mould, Ian D. Tonks, Marian M. Cahill, Allison R. Pettit, Ranjeny Thomas, Nicholas K. Hayward, Graham F. Kay. Vegfb gene knockout mice display reduced pathology and synovial angiogenesis in both antigen-induced and collagen-induced models of arthritis. Arthritis Rheum. 2003; 2660–2669.
48. C.J. Robinson, S.E. Stringer, The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors, Journal of Cell Science. 2001; 853–865.
49. Lucia Marconcini, Serena Marchiò, Lucia Morbidelli, Elena Cartocci, Adriana Albini, Marina Ziche, Federico Bussolino, and Salvatore Oliviero. c-fos-induced growth factor/vascular endothelial growth factor D induces angiogenesis in vivo and in vitro. Proceeding of the National Academy of Science. 1999; 9671–9676.
50. Michael S. Pepper, Stefano J. Mandriota, Michael Jeltsch, Vijay Kumar, Kari Alitalo. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C synergizes with basic fibroblast growth factor and VEGF in the induction of angiogenesis in vitro and alters endothelial cell extracellular proteolytic activity. Journal of Cellular Physiology. 1998; 439–452.
51. Michael Simons, J. Anthony Ware. Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. Nature Reviews Drug Discovery volume2. 2003; 863–872.
52. Jeffrey M. Isner, Ann Pieczek, Robert Schainfeld, Richard Blair, Laura Haley, Takayuki Asahara, Kenneth Rosenfield, Syed Razvi, Kenneth Walsh, James F. Symes. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of

- phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *The Lancet* Volume 348. 1996; 370-374.
53. Anne Arveschoug, and Knud S. Christensen. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Correspondence*. 1998; 97(12):1114-23.
  54. Timothy D. Henry, Krishna Rocha Singh, Jeffrey M. Isner, Dean J. Kereiakes, Frank J. Giordano, Michael Simons, Douglas W. Losordo, Robert C. Hendel, Robert O. Bonow, Stephen M. Eppler, Thomas F. Zioncheck, Eric B. Holmgren, Edward R. McCluskey. Intracoronary administration of recombinant human vascular endothelial growth factor to patients with coronary artery disease. *American Heart Journal*. 2001; 872-880.
  55. Sahin M., Sahin E., Koksoy S. Angiogenesis: insights from a systematic overview. Chapter 13: Angiogenesis in tumor microenvironment: Potential approaches in cancer therapy (pp. 239-272), 1st July 2013. Editor: Gaetano Santulli, Publ: Nova Science Publishers, Inc., NY, United States of America (ISBN: 978-1-62618-114-4).
  56. D. Gospodarowicz, J.A. Abraham, J. Schillin. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proceeding of the National Academy of Science* . 1989; 7311–7315.
  57. Birgit Millauer, Susanne Witzmann Voos, Harald Schnürc, Ricardo Martinez, Niels Peter H. Møller, Werner Risau, Axel Ullrich. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*. 1993; 835–846.
  58. Baird A, Klagsbrun M. The fibroblast growth factor family. *Cancer Cells* 1991; 3(6):239–43.
  59. Klagsbrun M. Mediators of angiogenesis: The biological significance of basic fibroblast growth factor (bFGF)-heparin and heparan sulfate interactions. *Semin Cancer Biology*. 1992; 3(2):81–7.
  60. L.A. Liotta, P.S. Steeg, W.G. Stetler-Stevenson. Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell*. 1991; 327–336.

61. Nobuaki Hiraoka, Edward Allen, Ingrid J. Apel, Margaret R. Gyetko, Stephen J. Weiss. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell*. 1998; 365–377.
62. P. Mignatti, D.B. Rifkin. Nonenzymatic interactions between proteinases and the cell surface: Novel roles in normal and malignant cell physiology. *Advances in Cancer Research*. 2000; 103–157.
63. Hui Xie, Zhuang Cui, Long Wang, Zhuying Xia, Yin Hu, Lingling Xian, Changjun Li, Liang Xie, Janet Crane, Mei Wan, Gehua Zhen, Qin Bian, Bin Yu, Weizhong Chang, Tao Qiu, Maureen Pickarski, Le Thi Duong, Jolene J Windle, Xianghang Luo, Eryuan Liao, Xu Cao. PDGF-BB secreted by preosteoclasts induces angiogenesis during coupling with osteogenesis. *Nature Medicine* 20. 2014; 1270–1278.
64. Natalia Papadopoulos, Johan Lennartsson. The PDGF/PDGFR pathway as a drug target. *Molecular Aspects of Medicine* 62. 2018; 75-88.
65. Heldin CH. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Kommunikatalog noion and Signaling*. 2013.
66. C.A. Frolik, L.L. Dart, C.A. Meyers, D.M. Smith, M.B. Sporn Purifikatalog noion and initial characterisation of a type beta transforming growth factor from human placenta *Proceeding of the National Academy of Science*, 80. 1983; 3676-3680
67. A.B. Roberts, M.B. Speared the transforming growth factors  $\beta$  M.B. Speared, A.B. Roberts (Eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology. Peptide Growth Factors and Their Receptors*. Springer. 1990; 419-472.
68. R.Govinden and K.D.Bhoola. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor- $\beta$ . *Pharmacology & Therapeutics Volume* 98. 2003; 257-265.
69. V. Falanga, W.H. Eaglstein, B. Bucalo, M.H. Katz, B. Harris, P. Carson. Topical use of human recombinant epidermal growth factor (h-EGF) in venous ulcers. *Journal of Dermatologic Surgery and Oncology banner*. 1992; 604-606.
70. H. van Cruijsen, G. Giaccone, K. Hoekman. Epidermal growth factor receptor and angiogenesis: Opportunities for combined anticancer strategies. *Int J Cancer*, 117. 2005; 883- 888.
71. N.R. Johnson, Y. Wang. Controlled delivery of heparin-binding EGF-like growth factor yields fast and comprehensive wound healing. *Journal of*

controlled release: Official journal of the Controlled Release Society, 166. 2013; 124-129.

72. Y. Shirakata, R. Kimura, D. Nanba, R. Iwamoto, S. Tokumaru, C. Morimoto, K. Yokota, M. Nakamura, K. Sayama, E. Mekada, S. Higashiyama, K. Hashimoto. Heparin-binding EGF like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. *Journal Cell Science*, 118. 2005; 2363-2370.
73. Jinghao Sheng and Zhengping Xu. Three decades of research on angiogenin: a review and perspective. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2016; 48(5): 399–410.
74. Koji Kishimoto, Shumei Liu, Takanori Tsuji, Karen A Olson, Guo-fu Hu. Endogenous angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene* volume 24. 2005; 445–456.
75. Shuping Li, Jinghao Sheng, Jamie K. Hu, Wenhao Yu, Hiroko Kishikawa, Miaofen G. Hu, Kaori Shima, David Wu, Zhengping Xu, Winnie Xin, Katherine B. Sims, John E. Landers, Robert H. Brown, Jr. Guo-fu Hu. Ribonuclease 4 protects neuron degeneration by promoting angiogenesis, neurogenesis, and neuronal survival under stress. *Angiogenesis*. 2013; 387–404.
76. Gao X, Xu Z. Mechanisms of action of angiogenin. *Biochimica et Biophysica Sinica* banner. 2008 ;40(7):619-24.
77. D. Tarade, M. Ohh. The HIF and other quandaries in VHL disease. *Oncogene*. 2018; 139-147.
78. S. Chen, N. Sang. Hypoxia-inducible factor-1: A critical player in the survival strategy of stressed cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2016; 267-278.
79. Afsane Bahrami, Stephen L. Atkin, Muhammed Majeed, Amirhossein Sahebkar. Effects of curcumin on hypoxia-inducible factor as a new therapeutic target. *Pharmacological Research*. 2018; 159-169.
80. Lukasz Piotr Fus, Barbara Górnicka. Role of angiogenesis in urothelial bladder carcinoma. *Cent European J Urol*. 2016; 69(3): 258–263.
81. Keiji Inoue, Joel W. Slaton, Sun Jin Kim, Paul Perrotte, Beryl Y. Eve, Menashe Bar-Eli, Robert Radinsky and Colin P. N. Dinney. Interleukin 8 Expression Regulates Tumorigenicity and Metastasis in Human Bladder Cancer. *Cancer Research*. 2000; 15;60(8):2290-9.

82. Paul Zarogoulidis, Fotini Katsikogianni, Theodora Tsiouda, Antonios Sakkas, Nikolaos Katsikogiannis, Konstantinos Zarogoulidis. Interleukin-8 and interleukin-17 for cancer. *Journal Cancer Investigation*. 2014; 32(5):197-205.
83. Suyun Huang, Curtis A Pettaway, Hisanori Uehara, Corazon D Bucana & Isaiah J Fidler. Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene*. 2001; 20:4188–4197.
84. Sarah M. Short, Alexandrine Derrien, Radha P. Narsimhan, Jack Lawler, Donald E. Ingber, Bruce R. Zetter. Inhibition of endothelial cell migration by thrombospondin-1 type-1 repeats is mediated by  $\beta 1$  integrins. *Journal of cell biology*. 2005; 168(4):643-53.
85. Patrick R. Lawler<sup>1</sup> and Jack Lawler . Molecular Basis for the Regulation of Angiogenesis by Thrombospondin-1 and -2. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012; 2(5): a006627
86. K. S. Balagun, K. Binley, M. Esapa, R. E. MacLaren, S. Iqbal, Y. Duran, R. A. Pearson, O. Kan, S. E. Barker, A. J. Smith, J. W. B. Bainbridge, S. Naylor, R. R. Ali. EIAV vector-mediated delivery of endostatin or angiostatin inhibits angiogenesis and vascular hyperpermeability in experimental CNV. *Gene Therapy* volume13. 2006; 1153–1165.
87. Michael S. O'Reilly, Thomas Boehm, Yuen Shing, Naomi Fukui, George Vassios, William S. Lane, Evelyn Flynn, James R. Birkhead, Bjorn R. Olsen, Judah Folkman. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*. 1997; 88: 277–285.
88. Michael S. O'Reilly, Lars Holmgren, Yuen Shing, Katalin Novosyadina, Rosalind A. Rosenthal, Marsha Moses, William S. Lane, Yihai Cao, Helene Sage, Judah Folkman. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*. 1994; 79: 315–328.
89. Danielle Hari, Michael A. Becketta, Vikas P. Sukhatme, Mohanraj Dhanabal, Edwardine Nodzenski, Hua Lu, Helena J. Mauceri, Donald W. Kufe, Ralph R. Weichselbaum. Angiostatin induces mitotic cell death of proliferating endothelial cells. *Molecular Cell Biology Research Communications*. 2000; 3: 277–282.

90. Sima J, Zhang SX, Shao C, Fant J, Ma JX. The effect of angiostatin on vascular leakage and VEGF expression in rat retina. *FEBS Lett.* 2004; 564: 19–23.
91. Lalita Yadav, Naveen Puri, Varun Rastogi, Pranali Satpute, Vandana Sharma. Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review. *J Clin Diagn Res.* 2015; 9(6): XE01–XE05.
92. F Xiao, Y Wei, L Yang, X Zhao, L Tian, Z Ding, S Yuan, Y Lou, F Liu, Y Wen, J Li, H Deng, B Kang, Y Mao, S Lei, Q He, J Su, Y Lu, T Niu, J Hou & M-J Huang. A gene therapy for cancer based on the angiogenesis inhibitor, vasostatin. *Gene therapy.* 2002; 1207–1213.
93. Jessica M. Faupel-Badger, Erika Ginsburg, Jodie M. Fleming, Leah Susser, Teresa Doucet, Barbara K. Vonderhaar. 16-kDa Prolactin Reduces Angiogenesis, but not growth of human breast cancer tumors in vivo. *Hormones and Cancer.* 2010; 71–79.
94. Ginsburg E, Vonderhaar BK. Prolactin synthesis and secretion by human breast cancer cells. *Cancer Research.* 1995; 55:2591–2595
95. Fonseca ME, Ochoa R, Moran C, Zarate A. Variations in the molecular forms of prolactin during the menstrual cycle, pregnancy and lactation. *Journal Endocrinol Invest.* 1991; 14:907–912.
96. Goldhar AS, Vonderhaar BK, Trott JF, Hovey RC. Prolactin-induced expression of vascular endothelial growth factor via Egr-1. *Molecular Cell Endocrinol.* 2005; 232:9–19.
97. Clapp C. González C. Macotela Y. Aranda J. Rivera J. García C. Guzmán J. Zamorano M. Vega C. Martín C. Jeziorski M. de la Escalera G. Vasoinhibins: a family of N-terminal prolactin fragments that inhibit angiogenesis and vascular function. *Front Horm Res.* 2006; 35:64–73.
98. L. Altucci, H. Gronemeyer. The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat. Rev. Cancer,* 2001; 181-193.
99. Sebastian Hoffmann, Andreas Rockenstein, Anette Ramaswamy, Ilhan Celik, Anette Wunderlich, Susanne Lingelbach, Lorenz C. Hofbauer, Andreas Zielke. *Molecular and Cellular Endocrinology.* January ,Volume 264, Issues 1–2, 29. 2007; 74-81.
100. B.V. Diaz, M.C. Lenoir, A. Ladoux, C. Frelin, M. Demarchez, S. Michel. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes by retinoids. *J. Biol. Chem,* 275. 2000; 642-650.

101. S. Pal, M.L. Iruela-Arispe, V.S. Harvey, H. Zeng, J.A. Nagy, H.F. Dvorak, D. Mukhopadhyay. Retinoic acid selectively inhibits the vascular permeabilizing effect of VPF/VEGF, an early step in the angiogenic cascade *microvasc. Res.*, 60. 2000; 112-120.
102. Ide AG, Bake NH, Warren SL. Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am J Roentgenol.* 1939; 42: 891–899.
103. Algire GH, Chalkey HW, Legallais FY, Park H. Vascular reactions of normal and malignant tumours in vivo. *JNCI.* 1945; 6: 73–85
104. Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971; 285: 1182-1186.
105. Rosen LS. Clinical experience with angiogenesis signalling inhibitors: Focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. *Cancer Control.* 2002; 9: 36-44.
106. Manders P, Beex LV, Tjan-Heijnen VC, Geurts-Moespot J, Van Tienoven TH, Foekens JA, Sweep CG. The prognostic value of vascular endothelial growth factor in 574 node-negative breast cancer patients who did not receive adjuvant systemic therapy. *Br J Cancer.* 2002; 87: 772 -778.
107. Ian A. Darby, Tim D. Hewitson. Hypoxia in tissue repair and fibrosis. *Cell and Tissue Research*, Volume 365, Issue 3. 2016; 553–562.
108. Vikram Agarwal, George W Bell, Jin-Wu Nam, David P Bartel. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife.* 2015.
109. Dilek Aşçı Çelik, Pınar Aslan Koşar, Nurten Özçelik. MikroRNA'lar ve kanser ile ilişkisi. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.* 2013; 20(3)/121-127.
110. Jackson RJ, Standart N. How do microRNA's regulate gene expression. *Sci STKE.* 2007; 1:367.
111. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, vol 116, pg 281-297. 2007; 131:1129.
112. Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med.* 2006; 12(12):580-7.
113. Nagehan Ersoy Tunalı, N. Ozan Tiryakioğlu. Kanserde MikroRNA'ların Rolü. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2010;30(5):1690-700.
114. George Adrian Calin, Calin Dan Dumitru, Masayoshi Shimizu, Roberta Bichi, Simona Zupo, Evan Noch, Hansjuerg Aldler, Sashi Rattan, Michael Keating,

- Kanti Rai, Laura Rassenti, Thomas Kipps, Massimo Negrini, Florencia Bullrich, and Carlo M. Croce. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002; 99(24):15524-9.
115. Lamy P, Andersen CL, Dyrskjöt L, Tørring N, Ørntoft T, Wiuf C. Are microRNAs lokatalog noed in genomic regions associated with cancer. *Br J Cancer* 2006; 95 (10): 1415-8.
116. Amelia Cimmino, George Adrian Calin, Muller Fabbri, Marilena V. Iorio, Manuela Ferracin, Masayoshi Shimizu, Sylwia E. Wojcik, Rami I. Aqeilan, Simona Zupo, Mariella Dono, Laura Rassenti, Hansjuerg Alder, Stefano Volinia, Chang-gong Liu, Thomas J. Kipps, Massimo Negrini, and Carlo M. Croce. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005; 102(39):13944-9.
117. Angelika Kuehbach, Carmen Urbich, Stefanie Dimmeler. Targeting microRNA expression to regulate angiogenesis. *Cell press* Volume 29, Issue 1. 2008; 12-15.
118. Wei J. Yang, Derek D. Yang, Songqing Na, George E. Sandusky, Qing Zhang and Genshi Zhao. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J. Biol. Chem.* 2005; 280, 9330–9335.
119. Antonio J. Giraldez, Ryan M. Cinalli, Margaret E. Glasner, Anton J. Enright, J. Michael Thomson, Scott Baskerville. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science.* 2005; 308, 833–838.
120. Laura Poliseno, Andrea Tuccoli, Laura Mariani, Monica Evangelista, Lorenzo Citti, Keith Woods, Alberto Merkatalog noanti, Scott Hammond and Giuseppe Rainaldi. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood.* 2006; 108, 3068–3071.
121. Yajaira Suárez, Carlos Fernández-Hernando, Jordan S. Pober, William C. Sessa. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ. Res.* 2007; 100, 1164–1173.
122. Zhong Hua, Qing Lv, Wenbin Ye, Chung-Kwun Amy Wong, Guoping Cai, Dayong Gu, Yanhong Ji, Chen Zhao, Jifeng Wang, Burton B. Yang, Yaou Zhang. miRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PLoS ONE.* 2006; 1. e116

123. Letizia Venturini, Karin Battmer, Mirco Castoldi, Beate Schultheis, Andreas Hochhaus, Martina U. Muckenthaler, Arnold Ganser, Matthias Eder and Michaela Scherr. Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells. *Blood* 109. 2007, 4399–4405.
124. Rosalba Torrisi, Andrea Decensi. Fenretinide and cancer prevention. *Current Oncology Reports*, Volume 2, Issue 3. 2000; 263–270.
125. Ilaria Sogno, Roberta Venè, Cristina Sapienza, Nicoletta Ferrari, Francesca Tosetti, Adriana Albini. Anti-angiogenic properties of chemopreventive Drugs: Fenretinide as a Prototype. *Cancer Prevention II* pp 71-76.
126. Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, Smith JM . Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc* 1979; 35: 1332–1338.
127. Richard C. Moon, Henry J. Thompson, Peter J. Becci, Clinton J. Grubbs, Robert J. Gander, Dianne L. Newton, Joseph M. Smith, Sandra L. Phillips, William R. Henderson, Larry T. Mullen, Charles C. Brown and Michael B. Sporn. N-(4-hydroxyphenyl)retinamide, a new retinoid for prevention of breast cancer in the rat. *Cancer Res* 1979; 39: 1339–1346.
128. N. Hail Jr. H. J. Kim, R. Lotan. Mechanisms of fenretinide-induced apoptosis. *Apoptosis*. 2006; 11: 1677–1694.
129. Shi-Yong Sun, Wanbo Li, Ping Yue, Scott M. Lippman, Waun K. Hong and Reuben Lotan. Mediation of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in human cancer cells by different mechanisms. *Cancer Res* 1999; 59:2493–2498..
130. Mirco Ponzoni, Paola Bocca, Valeria Chiesa, Andrea Decensi, Vito Pistoia, Lizzia Raffaghello, Carla Rozzo and Paolo Giuseppe Montaldo. Differential effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and retinoic acid on neuroblastoma cells: Apoptosis versus differentiation. *Cancer Res* 1995; 55: 853–861.
131. Nobuhiko Oridate, Seigo Suzuki, Masahiro Higuchi, Michele F. Mitchell, Waun K. Hong, Reuben Lotan. Involvement of reactive oxygen species in N-(4-hydroxyphenyl) retinamide induced apoptosis in cervical carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1191–1198.
132. Paolo G. Montaldo, Gabriella Pagnan, Fabio Pastorino, Valeria Chiesa, Lizzia Raffaghello, Marc Kirchmeier, Theresa M. Allen, Mirco Ponzoni. N-(4-

- hydroxyphenyl)retinamide is cytotoxic to melanoma cells in vitro through induction of programmed cell death. *Int J Cancer* 1999; 81: 262–267.
133. Lippman SM, Lotan R. Advances in the development of retinoids as chemopreventive agents. *J Nutr.* 2000; 130: 479–82.
  134. Lingen MW, Polverini PJ, Bouck NP. Retinoic acid induces cells cultured from oral squamous cell carcinomas to become anti-angiogenic. *Am J Pathol.* 1996; 149: 247–58.
  135. Lingen MW, Polverini PJ, Bouck NP. Retinoic acid and interferon alpha act synergistically as antiangiogenic and antitumor agents against human head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 5551–8.
  136. Pienta KJ, Nguyen NM, Lehr JE. Treatment of prostate cancer in the rat with the synthetic retinoid fenretinide. *Cancer Res.* 1993; 53: 224–6.
  137. Domenico Ribatti, Giulio Alessandri, Manuela Baronio, Lizzia Raffaghello, Emilio Cosimo, Danilo Marimpietri, Paolo Giuseppe, Montaldo, Giuseppe De Falco, Arnaldo Caruso, Angelo Vacca, Mirco Ponzoni. Inhibition of neuroblastoma-induced angiogenesis by fenretinide. *Int J Cancer.* 2001; 94: 314–21.
  138. Domenico Ribatti, Lizzia Raffaghello, Danilo Marimpietri, Emilio Cosimo, P. Giuseppe Montaldo, Beatrice Nico, Angelo Vacca, Mirco Ponzoni. . Fenretinide as an antiangiogenic agent in neuroblastoma. *Cancer Lett.* 2003; 197: 181–4.
  139. R. Krishnan Kutty, William Samuel, Cynthia Jaworski, Todd Duncan, Chandrasekharam N. Nagineni, Nalini Raghavachari, Barbara Wiggert, T. Michael Redmond. MicroRNA expression in human retinal pigment epithelial (ARPE-19) cells: Increased expression of microRNA-9 by N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide. *Mol Vis.* 2010; 16: 1475–1486.
  140. David Herrero Martín, Aleksandar Boro, Beat W. Schäfer. Cell-based small-molecule compound screen identifies fenretinide as potential therapeutic for translocation-positive rhabdomyosarcoma. *PLoS One.* 2013; 8(1): e55072.
  141. Burak Tutgut, Mete Güler, Tamer Demir, Peykan Türkçüoğlu, Ülkü Çeliker. Anjiyogenezde Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünün Rolü. *Türkiye Klinikleri J Ophthalmol.* 2007; 16(1): 38-46.
  142. Yeliz Özkaya Eker. Romatoid artritli hastalarda anti-silik sitrüllinlenmiş peptid antikorları sıklığı, klinik bulgular ve anjiyogenz parametreleri ile ilişkisi. 2010,

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, uzmanlık tezi, 68 sayfa, Edirne (Doç. Dr. Ömer Nuri PAMUK).

143. Andrei L. Gartel. A new target for proteasome inhibitors: FOXM1. *Expert Opin Investig Drugs*. 2010; 19(2): 235–242.
144. Sunyoung Park, Christine M. Sorenson, Nader Sheibani. PECAM-1 isoforms, eNOS, and endoglin axis in regulation of angiogenesis. *Clin Sci (Lond)*. 2015; 129(3): 217–234.
145. Du J, Yang Q, Luo L, Yang D. C1qr and C1ql redundantly regulate angiogenesis in zebrafish through controlling endothelial Cdh5. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017; 483(1):482-487.
146. Xin Li, Wen Ling, Angela Pennisi, Sharmin Khan, Shmuel Yaccoby. Fenretinide inhibits myeloma cell growth, osteoclastogenesis and osteoclast viability. *Cancer Lett*. 2009; 284(2): 175–181.
147. Vladislav Golubkov, Agustin Garcia, Francis S. Markland. Action of fenretinide (4-HPR) on ovarian cancer and endothelial cells. *Anticancer Res*. 2005; 25(1A): 249-53.
148. Barbara Bassani, Desirée Bartolini, Arianna Pagani, Elisa Principi, Massimo Zollo, Douglas M. Noonan, Adriana Albini, Antonino Bruno. Fenretinide (4-HPR) targets caspase-9, ERK 1/2 and the Wnt3a/β-Katalog noenin pathway in medulloblastoma cells and medulloblastoma cell spheroids. *PLoS One*. 2016; 11(7): e0154111.
149. Andrei L. Gartel. A new target for proteasome inhibitors: FOXM1. *Expert Opin Investig Drugs*. 2010; 19(2): 235–242.
150. SunYoung Park, Christine M. Sorenson, Nader Sheibani. PECAM-1 Isoforms, eNOS, and Endoglin Axis in Regulation of Angiogenesis. *Clin Sci (Lond)*. 2015; 129(3): 217–234.
151. Merrigan SL, Kennedy BN. Vitamin D receptor agonists regulate ocular developmental angiogenesis and modulate expression of dre-miR-21 and VEGF. *Br J Pharmacol*. 2017; 174 (16): 2636-2651.
152. Deng HT, Liu HL, Zhai BB, Zhang K, Xu GC, Peng XM, Zhang QZ, Li LY. Vascular endothelial growth factor suppresses TNFSF15 production in endothelial cells by stimulating miR-31 and miR-20a expression via activation of Akt and Erk signals. *FEBS Open Bio*. 2016; 7(1):108-117.

153. Hu J, Zeng L, Huang J, Wang G, Lu H. miR-126 promotes angiogenesis and attenuates inflammation after contusion spinal cord injury in rats. *Brain Res.* 2015; 1608:191-202.
154. Xia Liu, Yong Guan, Li Wang, Yun Niu. MicroRNA-10b expression in node-negative breast cancer-correlation with metastasis and angiogenesis. *Oncol Lett.* 2017; 14(5): 5845–5852.
155. Tang XR, Wen X, He QM, Li YQ, Ren XY, Yang XJ, Zhang J, Wang YQ, Ma J, Liu N. MicroRNA-101 inhibits invasion and angiogenesis through targeting ITGA3 and its systemic delivery inhibits lung metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Death Dis.* 2017; 8(1):e2566.
156. Yun Hu, Feng Deng, Jinlin Song, Juhong Lin, Xue Li, Yuying Tang, Jie Zhou, Tian Tang, Leilei Zheng. Evaluation of miR-29c inhibits endotheliocyte migration and angiogenesis of human endothelial cells by suppressing the insulin like growth factor 1. *Am J Transl Res.* 2015; 7(5): 866–877.
157. Poliakov E, Samuel W, Duncan T, Gutierrez DB, Mata NL, Redmond TM. Inhibitory effects of fenretinide metabolites N-[4-methoxyphenyl]retinamide (MPR) and 4-oxo-N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (3-keto-HPR) on fenretinide molecular targets  $\beta$ -carotene oxygenase 1, stearoyl-CoA desaturase 1 and dihydroceramide  $\Delta 4$ -desaturase 1. *PLoS One.* 2017 Apr 27;12(4):e0176487.
158. Cooper JP, Reynolds CP, Cho H, Kang MH. Clinical development of fenretinide as an antineoplastic drug: Pharmacology perspectives. *Exp Biol Med (Maywood).* 2017 Jun;242(11):1178-1184.
159. Masanori Yasuo, Shiro Mizuno, Jeremy Allegood, Donatas Kraskauskas, Harm J. Bogaard, Sarah Spiegel, Norbert F. Voelkel. Fenretinide causes emphysema, which is prevented by sphingosine 1-phosphate. *PLoS One.* 2013; 8(1): e53927.
160. Jing BQ, Ou Y, Zhao L, Xie Q, Zhang YX. Experimental study on the prevention of liver cancer angiogenesis via miR-126. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017 Nov;21(22):5096-5100.
161. V.B. Mehta, G.E. Besner. HB-EGF promotes angiogenesis in endothelial cells via PI3 kinase and MAPK signaling pathways. *J Growth Factors*, 25 (2007) 253-263.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** ELİF İŞİL YÜCEL

**Unvan:** Biyolog, Moleküler Biyolog,

**Doğum Tarihi:** 2 EYLÜL 1994

**Telefon:** +90 555 077 2979

**E-mail:** elifisilyucel@gmail.com

| Akademik unvan/<br>Derece | Bölüm / Program                  | Üniversite                     | Yıl        |
|---------------------------|----------------------------------|--------------------------------|------------|
| Lisans                    | Moleküler Biyoloji<br>ve Genetik | Erzurum Teknik<br>Üniversitesi | 2012-2016  |
| Yüksek Lisans             | Tıbbi Biyoloji                   | Gaziantep<br>Üniversitesi      | 2016-Halen |

### Yüksek Lisans Tez Başlığı

Fenretinide Molekülünün Anjiyogenez ile ilişkili mikroRNA'lar Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.

**Tez Danışmanı:** Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN

### Projelerde Yaptığı Görevler:

**Proje 1:** Fenretinide Molekülünün Anjiyogenez ile ilişkili mikroRNA'lar Üzerindeki Etkisinin Araştırılması. Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi, Araştırmacı, 2018

### Lisans Sonrası Yurtiçi/Yurtdışı Eğitimler ve Kitap Bölümleri

11. İÜGEN Uluslar Arası Katılımlı Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu, İstanbul Üniversitesi, 2014, İstanbul
- Deney Hayvanları Araştırmaları Uygulama ve Etik Kursu, Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, 2017, İzmir
- Protein Ekspresyonu ve Enzim Biyoteknolojisi Uygulamalı Eğitim Kursu, Erzurum Teknik Üniversitesi ile Chung Hsing Üniversitesi ortak eğitimi, 2016, Erzurum
- Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar ve Biyogüvenlik Kitabı, Pegem Yayınları, 2017