

**İnsan Meme Kanseri MCF7 Hücre Dizisinde Fumagillinin
Antikanserojenik Etkilerinin Araştırılması**

Adnan YARAMIŞ

Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Eylül, 2011

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Adnan YARAMIŞ'ın “İnsan Meme Kanseri MCF7 Hücre Dizisinde Fumagillinin Antikanserojenik Etkilerinin Araştırılması” başlıklı İleri Teknolojiler Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 18.08.2011 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) : Yrd. Doç. Dr. Miriş DİKMEN	
Üye : Doç. Dr. A. Tansu KOPARAL	
Üye : Yrd. Doç. Dr. Emel ERGENE	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İNSAN MEME KANSERİ MCF7 HÜCRE DİZİSİNDE FUMAGİLLİNİN ANTİKANSEROJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Adnan YARAMIŞ

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr Miriş DİKMEN
2011, 75 sayfa

Meme kanseri, kadınlar arasında kanser nedenli ölümlerin başında yer almaktadır. Meme kanseri, semptomlarını göstermeden metastaz yapabilir. Özellikle, nonsteroidal anti-östrojen tedavide kullanılan tamoksifenin, meme kanser hastalarının yalnızca 1/3'ünde etkili olduğu açıklanmıştır. Bu gözlemler, meme kanserinin tedavisinde ve önlenmesinde yeni alternatif ajanların araştırılmasına ihtiyaç göstermektedir. Son zamanlarda, tüm dikkatler, *Aspergillus fumigatus*tan izole edilmiş fumagillin gibi sekonder metabolitler üzerine yoğunlaşmıştır. Özellikle anjiyogenez başta olmak üzere, fumagillin *in vivo* tümör büyümesi ve birçok kanser metastazında güçlü inhibitör etkiye sahip olduğu bilinmektedir.

Bu tez çalışmasında; fumagillinin (25, 50, 75 ve 100 μ M) sitotoksik, apoptotik ve anjiyogenik etkileri, MCF7 insan meme kanseri hücreleri üzerinde araştırılmıştır. Fumagillinin MCF7 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktiviteleri 24, 48 ve 72. saatte WST-1 (stabil tetrazolyum tuzu) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonunda da, apoptotik etkiyi belirlemek için Poli (ADP-Riboz) Polimeraz (PARP) yarıklanma ELİZA kiti ve anjiyogenik etkiyi belirlemek için de vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ELİZA kiti kullanılmıştır. Çalışmanın sonunda, zamana ve konsantrasyona bağımlı olarak fumagillinin, MCF7 hücreleri üzerinde önemli derecede sitotoksik etkiye sahip olduğu, özellikle yüksek fumagillin konsantrasyonlarında PARP yarıklanma miktarları önemli düzeyde artarken, VEGF miktarlarında ise önemli düzeyde azalma olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada, fumagillinin konsantrasyon ve inkübasyon süresine bağımlı olarak, MCF7 hücrelerinde önemli düzeyde sitotoksik, apoptotik ve antianjiyogenik etki yaptığı belirlenmiştir. Bu nedenle fumagillinin, MCF7 hücrelerinde moleküler antikanserojenik mekanizmaları, tekli ya da kemoterapötik ajanlarla kombine çalışılarak, meme kanseri tedavisi için yeni kemoterapötik ve kemopreventif ajanların gelişimine önemli katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Fumagillin, VEGF, PARP, WST-1, MCF7

ABSTRACT**Master of Science Thesis****INVESTIGATION OF FUMAGILLIN'S ANTICANCEROGENIC EFFECTS
ON HUMAN BREAST CANCER MCF7 CELL LINES****Adnan YARAMIŞ****Anadolu University
Graduate School of Sciences****Department of Advanced Technologies****Advisor: Assist. Prof. Dr. Miriş DİKMEN
2011, 75 pages**

Breast cancer is the most common cancer among women. Breast cancer can be metastasis without showing any symptoms. It's shown that especially no steroidal anti-estrogen drugs can affect solely 1/3 of patients. These findings lead us alternative ways to prevent and cure to breast cancer. Recently, fumagillin, one of the secondary metabolites isolated from *Aspergillus fumigatus*, catches all the attention on it. Angiogenesis inhibitor, fumagillin, has strong inhibitory activities against *in vivo* tumor growth and metastasis in a wide variety of tumors.

In this study, we investigated cytotoxic, apoptotic and antiangiogenic effects of fumagillin (25, 50, 75 and 100 μ M) on MCF7 human breast adenocarcinoma cells. Cytotoxic activities of fumagillin on MCF7 cells were measured by Cell Proliferation Reagent WST-1 (stable tetrazolium salt) for 24, 48 and 72h. After 24h incubation, apoptotic and antiangiogenic effects were determined by using the Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) cleavage ELISA kit and the levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) Human ELISA Kit, respectively. We found that fumagillin had significant time- and concentration-dependent cytotoxic effects. Especially, while fumagillin concentrations were increased, PARP level was increased, VEGF level was decreased. In conclusion, a significant cytotoxic, apoptotic, and antiangiogenic effects were observed on the MCF7 human breast cancer cell lines. Therefore, the molecular mechanisms of fumagillin should be studied as a single or combination chemotherapeutic agents, we believe these studies will provide an important contribution to the development of new chemotherapeutic and chemopreventive agents for the treatment of breast cancer.

Keywords: Fumagillin, VEGF, PARP, WST-1, MCF7

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve yüksek lisans eğitimimin tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen deneyim ve eşsiz bilgilerinden yararlandığım tez danışmanım her yönüyle örnek akademisyen Yrd. Doç. Dr. Miriş Dikmen'e,

Bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağı bulduğum Öğrt. Gör. Zerrin Kahraman Cantürk'e,

Tez çalışmam süresince bilgisi ve birikimi ile bana yardımcı olan ve katkılarını paylaştan çok değerli laboratuvar arkadaşlarım Şafak Ulusoylar Yıldırım ve Şennur Görgülü'ye,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında dostluğunu ve desteğini esirgemeyen Buket Demirtaş ve Selin Engür'e

Manevi ve maddi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, tüm sıkıntılarımı paylaştan Ailem'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Adnan YARAMIŞ

Eylül, 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix

1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser.....	1
1.2. Kanser Oluşumu, Gelişimi ve Yayılması.....	2
1.3. Kanser ve Hücre Döngüsü.....	3
1.3.1. Onkogenler	4
1.3.2. Tümör baskılayıcı genler.....	5
1.4. Meme Kanseri	6
1.4.1. <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> genleri	8
1.5. Apoptoz	9
1.5.1. Apoptoz ve Nekroz	12
1.6. Poli (ADP-Riboz) Polimeraz (PARP)'ın Yapısı	13
1.6.1. Poli (ADP-Riboz) polimeraz (PARP)'ın apoptozdaki rolü.....	14
1.7. Anjiyogenez (Yeni Kan Damarı Oluşumu).....	17
1.7.1. Anjiyogenez mekanizması	19
1.7.2. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), yapısı ve anjiyogenezdeki rolü.....	21
1.7.3. Tümör anjiyogenezinde önemli terapötik hedef moleküller	25

1.8. Funguslar ve Sekonder Metabolitler	26
1.8.1. Fumagillin.....	26
1.9. Hücre Kültüründe Sitotoksosite Testlerinin Önemi	29
2. MATERYAL VE YÖNTEM	31
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	31
2.2. Kullanılan Malzemeler	31
2.3. Kullanılan Aletler	32
2.4. Deneylerde Kullanılan MCF7 Hücreleri	32
2.4.1. MCF7 hücrelerinin kökeni	32
2.4.2. MCF7 hücrelerinin kullanımı.....	33
2.5. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması	33
2.5.1. Kullanılan malzemelerin steril edilmesi.....	33
2.5.2. Fumagillinin dozlarının hazırlanması	33
2.6. <i>In vitro</i> Çalışmalar.....	34
2.6.1. MCF7 hücre kültürü	34
2.6.2. Hücre sayımları	34
2.6.3. WST-1 yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi	34
2.6.4. Apoptoz ile ilişkili olarak PARP yarıklanmasının belirlenmesi	35
2.6.5. Anjiyogenezle ilişkili olarak VEGF miktarının belirlenmesi	38
2.7. İstatistiksel Değerlendirmeler	41
3. BULGULAR	42
3.1. Deney Gruplarına Ait MCF7 Hücrelerinin İnvert-Mikroskop Görüntüleri.....	42
3.2. Fumagillinin MCF7 Hücrelerinde Sitotoksik Etkisinin WST-1 Yöntemi ile Değerlendirilmesi	50
3.3. Fumagillinin MCF7 Hücrelerinde Apoptotik Etkisinin PARP Yarıklanma Miktarına Göre Değerlendirilmesi	52

3.4. Fumagillinin MCF7 Hücrelerinde Antianjiojenik Etkisinin VEGF Miktarına Göre Değerlendirilmesi	54
4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Tek bir hücrenin çoğalmasıyla kanser oluşumu.....	3
1.2. Hücre döngüsünün bölümleri	4
1.3. Apoptoz ve nekroz sırasında hücrenin yapısındaki değişiklikler.....	13
1.4. Poli (ADP-Riboz) Polimeraz (PARP)1'in yapısı.....	14
1.5. Poli (ADP-Riboz) Polimeraz (PARP)'in apoptozdaki rolü ve şematik gösterimi.....	15
1.6. PARP'ın hücre ölümündeki rolü.....	16
1.7. Anjiyogenez oluşumunun aşamaları	18
1.8. VEGF ve izoformları.	22
1.9. Tümör anjiyogenezindeki aşamalar ve VEGF'in anjiyogenezdeki rolü.....	24
1.10. Fumagillin ve analogu TNP-470'in kimyasal yapısı.	28
2.1. MCF7 hücrelerinin mikroskop görüntüsü.....	32
3.1. MCF7 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon sonundaki morfolojik görüntüleri...	42
3.2. MCF7 hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon sonundaki morfolojik görüntüleri....	44
3.3. MCF7 hücrelerinin 72 saatlik inkübasyon sonundaki morfolojik görüntüleri....	47
3.4. Fumagillin Konsantrasyonlarının, MCF7 Hücrelerinde WST-1 Yöntemine Göre Hesaplanan % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	51
3.5. PARP standartlarının ELİZA da ölçülen absorbans değerleri ve PARP yarıklanma miktarları.	53
3.6. Fumagillin konsantrasyonlarının MCF7 hücreleri üzerinde PARP yarıklanmasına etkisi ve karşılık gelen PARP yarıklanma miktarları	54
3.7. VEGF standartlarının ELİZA da ölçülen absorbans değerleri ve VEGF miktarları	55
3.8. Fumagillinin konsantrasyonlarının MCF7 hücreleri üzerinde VEGF miktarına etkisi (ELİZA da ölçülen absorbans değerlerine karşılık gelen VEGF miktarları	56

TABLÖLAR DİZİNİ

2.1. PARP Yarıklanma kitine göre standart absorbens değerlerine karşılık gelen standart PARP yarıklanma miktarları.	38
2.2. VEGF kitine göre standart absorbens değerlerine karşılık gelen standart VEGF miktarları.....	41
3.1. Fumagillin konsantrasyonlarının, MCF7 hücre dizisinde WST-1 yöntemine göre hesaplanan % hücre canlılık değerleri.	52

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

DMSO	: Dimetil Sülfoksit
ELİZA	: Enzim Bağlı İmmunosorbent Yöntem
FADD	: Fas İlişkili Ölüm Domaini
FBS	: Fetal Bovin Serum
FLIP	: Caspase-8
HIF	: Hipoksi İndüklenmiş Transkripsiyon Faktörü
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
NaHCO₃	: Sodyum Bikarbonat
PARP	: Poli (ADP-Riboz) Polimeraz
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltilisi (Phosphate buffer saline)
RPMI	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
SAPK	: Stres Aktiviteli Protein Kinaz
TRADD	: Tümör Necroz Faktör Reseptör İlişkili Ölüm Domaini
VEGF	: Vaskular Endotel Büyüme Faktörü
WST	: 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzenedisulfonate

1. GİRİŞ

Meme kanseri, kadınlar arasında kanser nedenli ölümlerinin başında yer almaktadır. Meme kanseri, semptomlarını göstermeden metastaz yapabilir. Özellikle, nonsteroidal anti-östrojen tedavide kullanılan tamoksifenin, meme kanser hastalarının yalnızca 1/3'ünde etkili olduğu açıklanmıştır. Bu gözlemler, meme kanserinin tedavisinde ve önlenmesinde yeni alternatif ajanların araştırılmasına ihtiyaç göstermektedir. Son zamanlarda, tüm dikkatler, fumagillin gibi sekonder metabolitler üzerine yoğunlaşmıştır. Birçok kemoterapötik ajan, kanser hücrelerinde apoptozun indüksiyonu ve hücre döngüsünün devamlılığının bozulması olayında, fitokimyasal bileşiklerle aynı etkileri göstermektedir. Bu nedenle bizde bu tez çalışmasında; fumagillinin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak, MCF7 insan meme kanser hücrelerinde sitotoksik etki olarak hücre canlılığına etkilerini araştırmayı, PARP yarıklanmasını belirleyerek MCF7 hücrelerinde apoptozu indükleyip indüklediğini, VEGF miktarlarını belirleyerek de MCF7 hücrelerinde antianjiyojenik etkilerini, deney sonuçlarının anlamlılığına bağlı olarak da, meme kanserine karşı tedavide, fumagillinin potansiyel anti kanser ajan olabilme özelliğine yeni bir bakış açısı getirmeyi amaçladık.

1.1. Kanser

Dünya sağlık örgütüne göre kanser; vücudun tümünü ya da bir bölümünü etkileyen hastalıklar için kullanılan genel bir terim olarak ifade edilir. Habis tümörler ve neoplazmlar da kanser yerine kullanılan isimlerdir. Kanserlerin belirleyici özelliği hücrelerin her zamanki sınırları dışında büyümesi, yakınında bulunan hücreleri istila etmesi ve diğer organlara da yayılmasıdır. Bu tür süreçler metastaz olarak ifade edilmektedir ve metastaz; kanserden ölümlerin en önemli nedenidir (Dünya Sağlık Örgütü, WHO, 2011).

Kanser, kontrolsüz büyüme ve anormal hücrelerin yayılma ile ilgili hastalık gruplarındandır. Eğer yayılma kontrol edilmezse ölümle sonuçlanabilmektedir. Kanser hem tütün, çeşitli kimyasallar ve radyasyon gibi dışsal faktörlerden; hem de genetik mutasyonlar, hormonlar, bağışıklık durumu ve metabolizmada oluşan mutasyonlar gibi içsel faktörlerden kaynaklanabilmektedir. Bazı faktörler birleşerek ya da sıra ile kanser oluşumunu başlatabilir. Kansere neden olan dışsal faktörlere maruz kalma süresi azaltılarak ya da muhtemel içsel kanser riskinin belirlenmesiyle kansere erken tedavi uygulanabilir. Kanser cerrahi operasyonlar, radyoterapi, kemoterapi, hormon yardımı ve immunoterapi yardımıyla tedavi edilebilmektedir (Amerikan Kanser Derneği, 2011).

1.2. Kanser Oluşumu, Gelişimi ve Yayılması

Kanser başlangıcı; kansere neden olan bir ajanın kısa süreli etkisiyle olmaktadır, bu etki, mitotik döngüdeki inaktif hücre içinde değişikliğe yol açmaktadır. Sonra, tümör oluşumu geri döndürülemede, başlangıç ajanı bir yıldan sonra verilse bile yüksek yüzdeyle tekrar elde edilebilmektedir. Yani, kanserin başlangıç aşaması çok az bir süre gerektirmektedir, başladıktan sonra tekrar geri dönüşümü olmadığı ve yavru hücrelere de aktarıldığı için kalıtsaldır. Kanser gelişme evresi, başlangıç evresinin aksine yavaş, adım adım ilerleyen bir süreçtir ve hücrede tümöre neden olan ajana hücrenin daha uzun süre maruz kalması gerekmektedir. Bu evre, kanser oluşumundaki kuluçka evresinin çoğunu oluşturmaktadır ve kısmen geri döndürülebilir. Tümör gelişme evresinde hücre çoğalmaktadır, başlatılmış olan zarar yayılmaktadır ve bu klonal hücreler belli bir alanda birikmektedir. Kanser gelişiminin olduğu çoğu doku için çoğu ajan mitojendir (Pelengaris ve Khan, 2006). Tümör gelişimi klonal hücrelerin çoğalmasını gerektirmektedir ve bu aşamada hücre bölünme kontrolü bozulmuştur. Tümör gelişiminden sonraki aşama ilerleme aşamasıdır. Bu aşamanın da geri dönüşümü olmamaktadır çünkü genomdaki değişiklikler bu faza neden olmaktadır. Saf ajanlar ile ilerlemeye neden olan ajanların birbirinden ayrıtılması zordur. Ancak, serbest radikal oluşturan benzoyilperoksitin deneysel

epidermal kanser oluşumunu ilerlettiği gözlemlenmiştir (O’Connell ve ark. 1986). İlerleme aşamasında, kanser hücresi haline gelmiş klonal hücreler büyüme avantajı sağlamışlardır, genetik olarak sabit değillerdir. Düzenli olmayan hücre çoğalması, apoptozdan kaçınma, farklılaşma kaybı vardır. Hücreler saldırgan hale gelmişlerdir, yeni damarlanmaya ihtiyaçları vardır. Hücre klonları genellikle heterozigot genetik materyale sahiptirler (Şekil 1.1) (Pelengaris ve Khan, 2006).

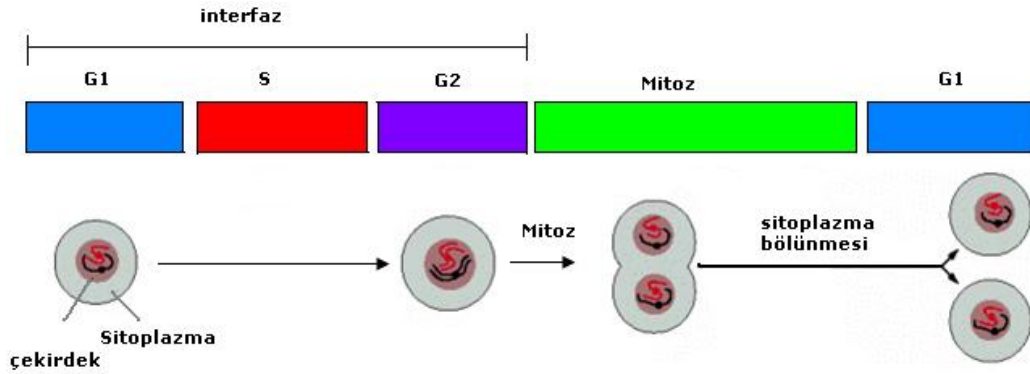


Şekil 1.1. Tek bir hücrenin çoğalmasıyla kanser oluşumu ([http: 1](http://1))

1.3. Kanser ve Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, çoğalmak (prolifere olmak) üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir. Bir döngüye giren hücre, morfolojik ve genetik olarak birbirine tıpa tıp benzeyen iki hücre oluşumuyla döngüyü tamamlar. Hücre proliferasyonu hücre döngüsü içinde yer alan bazı kontrol noktaları (“check-points”) tarafından düzenli olarak kontrol edilir (Ulukaya, 2006). Kanserde, hücre bölünmesinin genetik kontrolündeki değişiklikler, hücre bölünmesinin sonsuz olmasını sağlamaktadır. Genel olarak genetik ve epigenetik değişimler iki sınıf genle oluşturulmaktadır. Bunlar; Proto onkogenler ve Tümör baskılayıcı genlerdir. Normal hücrelerde proto onkogenler tarafından kodlanan proteinler hücre çoğalmasını uyaran sinyal yollarında görev yapmaktadırlar. Mutasyona uğramış proto onkogenler veya onkogenler tümör oluşumunu

sağlarlar. Rb ve p53 genleri gibi tümör baskılayıcı genlerin inaktif olması; hücre döngüsünü engelleyen düzenleyici yolların kaybına neden olmaktadır (Pelengaris ve Khan, 2006). Hücreler bir bölünme sinyali almadıkları sürece hücre döngüsünün aktif (G1, G2, S ve M) fazlarına girmezler ve istirahat fazı denilen G0 fazında beklerler. Hücrelerin ikiye bölünmesi mitoz (veya gonadlarda mayoz)’la gerçekleşir. Hücreler mitoz girmeden önce bir hazırlık safhası geçirirler ve bu safhada hücreler hacimce büyürler. Bu hazırlık safhasında bölünme için gerekli olan çeşitli düzenleyici proteinler (Örn. Siklin’ler) ve makromoleküller (Örn. Deoksiribonükleik asit’ler) sentezlenir. Bu hazırlık safhasına da interfaz denir. İnterfaz kendi içinde G1, S, ve G2 olmak üzere çeşitli alt bölümlerden (fazlardan) oluşur(Ulukaya, 2006). Mitoz ve interfaz beraberce hücre döngüsü olarak bilinen bir süreci oluştururlar. Dolayısıyla, bir hücre döngüsü, fazların işleyiş sırasına göre; G1, S, G2 ve M fazlarından oluşur. G1 ve G2 kısaltmaları “gap” (ara, boşluk) sözcüğünden gelmektedir. S ise DNA sentezi (replikasyonu) fazını gösterir. M ise mitoz anlamına gelmektedir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Hücre döngüsünün bölümleri

1.3.1. Onkogenler

Deneyisel koşullarda tümör oluşumuna neden olan genlere onkogenler denir ve birçok ökaryotik hücrede mevcuttur. İlk kez, tümör yapıcı virüslerden elde edilmiştir. Protoonkogenler, hücre farklılaşması, hücre düzenlenmesi ve

gelişiminde görev yaparlar. Protoonkogenler, onkogenlere dönüşürken mutasyonlar, kromozomların karşılıklı değişimleri ve gen amplifikasyonları sonucunda oluşmaktadırlar (Üçkuyu, 2000). Hücre çoğalması ve yaşamında çok önemli role sahip normal genler olan protoonkogenlerden oluşan birçok onkogen keşfedilmiştir. Hücre bölünmesinin uyarılması için büyüme faktörüne ihtiyacı vardır. Aktifleştiği zaman, *sis* onkogeni sürekli olarak büyüme faktörünün salgılanmasını kodlar. Sonuçta, aktif *sis* onkogenli hücre kendi çoğalması için büyüme faktörünü salgılar, yani kendi hücre bölünmesini uyarır. İkinci olarak, *erb-B* onkogeni, büyüme faktör reseptörünün anormal versiyonunu kodlar. Bu anormal reseptör, büyüme faktörü olmasa bile büyüme faktörüne her zaman bağlıymış gibi davranır. Üçüncü olarak, büyüme faktörü ve reseptör bağlandıktan sonra, hücre içindeki moleküller iletişime devam ederler. *Srs* ve *ras* onkogenleri anormal miktarda intrasellüler sinyal molekülleri üretirler bu moleküller sinyal almadıkları halde diğer molekülleri üretmeye devam ederler. Sonunda kimyasal yoldaki sinyal kromozomlara ulaşır ve gen ekspresyonu etkilenir. *c-myc* ve *c-fos* onkogenleri doğrudan DNA'ya bağlanan ve genlerin fonksiyonlarını düzenleyen transkripsiyon faktörleri üretmektedirler. Bu faktörler gen ekspresyonunu fazla uyarır ve çok fazla çoğalma gerçekleşir. Sonuçta, hücreler bölünerek yeni hücre oluşturma ya da ölme arasında çok narin bir çizgi içinde yaşarlar. *Bcl-1* onkogeni hücre ölümüne neden olan bir proteini kodlar. *Bcl-1* aktifken, zarar görmüş hücreler ölmesi gerekirken bölünmeye devam ederler ve zarar görmüş hücre popülasyonu artar. Proto onkogenler, hücre çoğalmasında çok kritik bir düzenleme fonksiyonu üstlenirler. Onkogen haline geldiklerinde, anormal olarak çalıştığında, hücrenin aşırı miktarda bölünmesini uyarırlar (Bozzone, 2007).

1.3.2. Tümör baskılayıcı genler

Kanser gelişiminde iki çeşit gen rol almaktadır buranlardan birisi onkogenler diğeri ise tümör baskılayıcı genlerdir. Onkogen aktivitesi genelde hücre bölünmesini yönetirken, tümör baskılayıcı genler hücre çoğalmasını durdurmak için çalışırlar. Fonksiyonel tümör baskılayıcı genler, hücrenin yaşayıp yaşamayacağını eğer yaşarsa çoğalıp çoğalmayacağını kontrol eden proteinleri

kodlarlar. Her bir insan hücresinde yaklaşık 30,000 gen olmasına rağmen, ancak birkaç düzinesi tümör baskılayıcı gen kodlamaktadır. Ama yine de sadece bir tane baskılayıcı genin bile kaybı çok ciddi sağlık sonuçlarına neden olmaktadır. Tümör baskılayıcı genler kapı bekçisi olarak düşünülmekte ve kapıların açılması aşırı hücre çoğalmasına neden olmaktadır. Tümör baskılayıcı genlerin etkisini hücreler üzerinde gösterdiği birçok yöntem vardır. Baskılayıcı gen tarafından kodlanan proteinin dört fonksiyonel kategoriye ayrılmaktadır. Birincisi, hücre bölünmesi ve büyümesinin evrelerinde hücre döngüsünün ilerlemesini engelleyen proteinlerdir. Bunlar, hücre bölünmesini hücre içinde oluşan gerekli olayların gerçekleşmesini durdururlar. İkincisi, hücreye bölünmemesi gerektiğini söyleyen ve hormonlara veya kimyasal sinyallere bağlanarak reseptör olarak görev yapan proteinlerdir. Üçüncüsü, DNA'nın hasar görmesi veya kromozomların anormalliğinde hücre bölünmesini durduran proteinlerdir. Sonuncusu ise; apoptozda hücre ölümüne ya da tamir edilemeyecek derecedeki kromozom hatalarını başlatan proteinlerdir. Bu tümör baskılayıcı genler tarafından yapılan dört çeşit protein; hücrenin yaşayıp yaşamamasını veya bölünüp bölünmemesini değerlendirirler (Bozzone, 2007). İki adet önemli tümör baskılayıcı gen vardır. Bunlar; *p53* geni ve *Rb* genleridir. Tümör baskılayıcı genler hücre proliferasyonu ve doku homeostazisi için önemli birçok işlevi yerine getirmektedirler. En çok çalışılan genlerden bir tanesi *p53* genidir ve bu gen hücre transformasyonunun engellenmesi ve hücre döngüsünde kanser hücrelerinin baskılanmasında rol alır (Hollstein ve ark. 1994). *Rb* geni, kaybında retinoblastoma ve osteosarkoma hastalıklarına neden olmaktadır ve tümör baskılayıcı genlerin en çok çalışılmış olanlarından. 1979 yılında, retina blastomalarındaki kromozom 13q14 bölgesindeki nükleotid delesyonundan kaynaklandığı belirtilmiştir. Bazı insan tümörlerinde *Rb* mutasyonlarının sıklığı oldukça yüksektir. Örneğin, mesane kanseri % 33, meme kanseri % 10, akciğer karsinomlarında % 85 oranında görülmektedir (Weinberg, 1989).

1.4. Meme Kanseri

Tüm kanser ölüm vakalarının % 18'ini oluşturur ve akciğer kanserinden sonra ikinci sıradadır. Ülkemizde meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser

türüdür (Ulgey, 1999; Dincol, 1991). Meme kanseri, kadınlar arasında kanser nedeni ölümünün başında yer almaktadır. Meme kanseri, semptomlarını göstermeden metastaz yapabilir. Özellikle, nonsteroidal anti-östrojen tedavide kullanılan tamoksifen'nin, meme kanser hastalarının yalnızca 1/3'ünde etkili olduğu açıklanmıştır. Bu gözlemler, meme kanserinin tedavisinde ve önlenmesinde yeni alternatif ajanların araştırılmasına ihtiyaç göstermektedir (Dikmen, 2008). Meme kanserinin sebebi tam bilinmemektedir, ancak bu hastalığa yakalanma riskini, radyasyona maruz kalma, ailede meme kanserine yakalanmış bireyin olması, yaşın ilerlemiş olması, hormonal faktörler, gebelik yaşı, kadınlarda menstrüal yaşamın uzunluğu gibi faktörler artırmaktadır (Amerikan Kanser Derneği, 2011). Meme kanserinin tedavisi oldukça zordur, çünkü tedaviye farklı cevaplar sergileyen, farklı tümör sınıfları söz konusudur. Normal meme gelişiminde, hücre çoğalması ve apoptoz arasında kontrollü bir denge vardır. Bu denge, kemoterapiye, radyoterapiye ve hormonal tedaviye cevapta tümörün büyümesi ve genişlemesinde hayati öneme sahiptir (Sun ve Liu, 2005; Lowe ve Lin, 2000; Patron ve ark. 2001; Yu ve ark. 2005).

Meme kanserinin risk faktörleri; yetersiz beslenme, az miktarda fiziksel aktivite, meme gelişimi sırasında radyasyona maruz kalma, cinsel hormonlar ve genetik yatkınlığı içermektedir. Erken teşhis, meme kanserinden kurtulmanın anahtarıdır denilebilir. Mamografi ile görüntüleme en çok kullanılan teşhis yöntemlerindendir. MRI tanının konulmasında çok öneli rol oynamaktadır. *Brca1* ve *brca2*'nin de içinde bulunduğu germline mutasyonları ancak aileden gelen kanser vakalarının % 15 - % 20'sini oluşturmaktadır ve tüm meme kanseri vakalarının % 5'ini oluşturmaktadır. Bu genetik yatkınlık genleri, farklı bireylerde hormon metabolize genlerinin ekspresyonu, DNA onarım genleri, androjen reseptör genlerinden dolayı farklı dağılım göstermektedir. Popülasyon çalışmalarında *brca1* mutasyonunun meme kanseri gelişiminde % 36 ile % 80 oranında etkili olduğu gözlenmiştir. Meme kanseri riski, yaşla birlikte artmaktadır. Meme kanseri ilerlemesi ve patogenezinde bazı anahtar genler belirlenmiştir. Bunlar; kromozomun 13q, 9p bölgesindeki heterozigotluk ve *Rb* geninin de bulunduğu 16q bölgesidir (King ve Robins, 2006).

Meme kanserinde üzerinde en fazla çalışılan genler, *Bcl-2* ailesi (apoptoz inhibitör ve promotörlerini içeren) ve *p53* tümör baskılayıcı genidir. Meme kanserinde *Bcl-2*, yaklaşık % 80 oranında sentez (ekspresse) edilir ve bu sentez, östrojen ve progesteron reseptörleriyle ilişkilidir. Ayrıca azalan *Bax* sentezi, metastatik meme kanserlerinde, zayıf kemoterapötik cevapla ilişkilidir. Son yıllarda, çok işlevli bir protein olan BAG-1'in, erken safha meme kanserlerinde apoptozu durdurduğu açıklanmıştır (Jeune ve ark. 2005).

Erken teşhis ve terapiye rağmen, meme kanserlerinde ilaç direncinin oluşması, hastanın tedavisini engelleyen en önemli mekanizmalardan biridir. Son yıllardaki çalışmalar, kullanılan terapötik ajanların, apoptotik hücre ölümü ve dolayısıyla da apoptotik sinyal yolları üzerindeki etki mekanizmaları üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu nedenle kanser tedavisinde yeni stratejilerin gelişmesi için, normal ve kanser hücrelerinde farklı şekilde düzenlenen apoptotik yollardaki moleküler hedeflerin belirlenmesi gerekmektedir. İnsan meme kanser hücrelerinde, *Bax* gibi tümör hücrelerini apoptoza sürükleyen proapoptotik proteinlerin yüksek seviyede, *Bcl-2* ailesinin *Bcl-2* ve *Bcl-XL* gibi antiapoptotik proteinlerin ise düşük seviyelerde sentez edildiği açıklanmıştır. Ancak, *Bcl-2* ailesinin antiapoptotik proteinlerinin aşırı sentezi ise kemoterapötik ajanlara karşı kemorezistans geliştiğini göstermektedir. Bu nedenle kanser tedavisinde, yeni terapötik hedefler ve tedaviler geliştirmek için, meme kanser hücrelerini apoptoza götüren mekanizmalar üzerinde yeni çalışmalara ihtiyaç vardır (Grzmil ve ark. 2006).

1.4.1. *BRCA1* ve *BRCA2* genleri

Meme kanser genleri olarak bilinen *BRCA1* ve *BRCA2*, 1994 ve 1995'te keşfedilmişlerdir, kalıtsal meme kanserli hastaların tedavileri konusunda birçok soru ortaya atılmasına ve risk altındaki popülasyon için kanser görüntüleme yöntemlerinin gelişmesinde patlamaya sebep olmuştur. Gerçekte normal genetik yapının bir parçası olarak herkes bu genleri taşımaktadır, meme kanseri açısından risk altındaki kişiler ise bu genlerde mutasyona sahip olanlardır. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonlar, heterozigot taşıyıcılar için meme ve ovaryum

kanseri açısından kuvvetli risk faktörlerindendir (Chodosh, 1998). *BRCA1* ve *BRCA2* genleri, DNA hasarına karşı oluşan hücresel yanıtta rol oynayan proteinleri kodlar. *BRCA* genleri DNA tamir mekanizmasında rol oynadığı için bu genlerdeki herhangi bir arızadan dolayı bu genin ürünü olan *BRCA* proteini hatalı oluşur veya oluşamaz ve tamir mekanizmasında üstlendiği görevi yerine getiremez. Yani homolog rekombinasyon yoluyla onarılan DNA onarılamayacağı için çift zincir kırığı orada kalır ve bu hasar meme kanserine sebep olur.

BRCA1 geni kromozom 17q21 kromozomu üzerinde yerleşiktir. 24 ekzonu vardır (22 kodlama ekzonu, alternatif 5'UTR ekzonları, 1a ve 1b). *BRCA1*'in ekzon 11'i (3.4 kb), 1863 amino asitlik proteinin % 61'ini kodlar (Lee ve ark. 1999). *BRCA2*, kromozom 13q12.3 üzerinde yerleşiktir. 27 ekzondan oluşmuştur, en büyüğü (4.9 kb) ekzon 11'dir. Geniş bir dizi insan dokusu, en yüksek oranda meme ve timüs olmak üzere, *BRCA1*'inkine çok benzer bir şekilde, *BRCA2*'yi eksprese ederler. Daha az oranda ise akciğer, ovaryum ve dalakta bulunur (Tavtigian ve ark. 1996). Normal hücrelerde, *BRCA2*, özellikle hücre döngüsünün geç-G1/erken-S fazında eksprese edilen nükleer bir proteindir (Chodosh, 1998).

1.5. Apoptoz

Dünya sağlık örgütünün tanımına göre apoptoz; DNA degradasyonu sırasında gerçekleşen hücre ölümüne denir ve hücre veya DNA hasarı sırasında normal olarak gerçekleşmektedir (Amerikan Kanser Derneği, 2011). Apoptoz, yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen bir programlı hücre ölümüdür. Fizyolojik olarak oluşan hücre ölümü uzun yıllardır bilinmesine rağmen "apoptoz" terimi ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie adındaki patologlar tarafından kullanılmıştır. Yunancada 'apo' =ayrı, 'ptosis' =düşen anlamındadır (Lowe ve Lin, 2000; Öztürk, 2002; Sunguroğlu ve ark. 1996; Zimmermann ve ark. 2001; Zimmermann ve Gren, 2001).

Apoptoz mekanizması dört aşamada gerçekleşmektedir. Bunlar; Apoptozun başlatılması, hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu, hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması ve fagositoz. Hücrenin apoptoza gidebilmesi için ilgili genetik mekanizmanın hücre tarafından harekete geçirilmesi gereklidir. Bu mekanizma hücrenin içinden ya da dışından gelen sinyaller yardımıyla harekete geçer. Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu, hücre içi ve dışı birtakım sinyaller yardımıyla aktive olur, aktive olan bu proteazlara kaspaz denir.

Her saniye yaklaşık bir milyon hücremiz, apoptozla vücuttan uzaklaştırılmakta ve bunların yerine yenileri yapılmaktadır. Yapım (mitoz) ile yıkım (apoptoz) arasında kontrollü bir denge vardır. İşte bu dengenin apoptozun lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın patogeneze katkıda bulunur. Olmaması gerekirken gerçekleşen apoptoz (hızlanmış ya da yavaşlamış apoptoz), organizma için tehlikelidir. Apoptozun gereksiz olduğu veya hızlandığı hastalıklara örnek olarak; AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, insüline bağımlı diyabet, hepatit C enfeksiyonu, miyokard enfarktüsü, ateroskleroz gibi hastalıklar; apoptozun yavaşladığı hastalıklara örnek olarak ise; otoimmün hastalıklar ve kanser verilebilir. Dolayısıyla apoptoz; yenilenme (rejenerasyon) ve tamir olaylarında, hücresel dengenin (homeostazın) sağlanmasında ve organ büyüklüklerinin korunmasında önem taşımaktadır (Öztürk, 2002; Sunguroğlu ve ark. 1996).

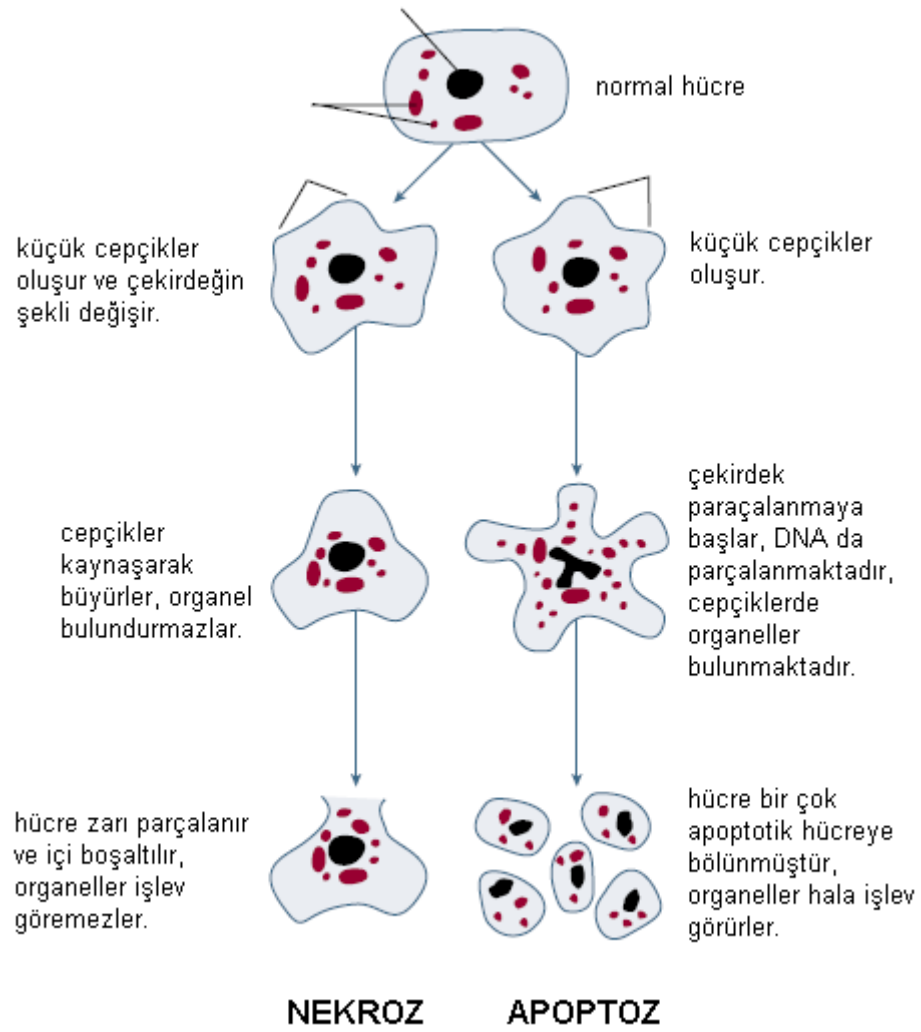
Tümör gelişimi sırasında apoptozu büyüme/hayatta kalma faktör oranının bozulması, hipoksi, radyasyon ve hücre matriks etkileşimlerinin kaybı tetikler. DNA hasarı, telomer yapısının bozulması, onkogenik mutasyonlar tarafından oluşturulan uygunsuz çoğalma sinyalleri de hücre içindeki dengesizliklere örnektir ve sonuçta apoptozu tetikler (Lowe ve Lin, 2000).

Apoptoz, çok sayıda ve çeşitte araçlar tarafından düzenlenir. Bunlar arasında, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (c-myc), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitokondri) bulunmaktadır. Bazı aracı moleküller hücre tipine özgündür, bazıları da apoptotik uyarının çeşidine göre farklılık gösterebilir (Lowe ve Lin, 2000; Öztürk, 2002; Sunguroğlu ve ark. 1996; Zimmermann ve ark. 2001; Zimmermann ve Gren, 2001) .

Apoptoz; kemoterapi, ölüm reseptörlerinin uyarılması, büyüme faktörü eksikliği, adezyon kaybı, radyasyon, aşırı oksidatif stres gibi ajanlar tarafından başlatılır. Hücre tarafından alınan bu apoptotik sinyal, hücreyel *p53*, *Bcl-2* familyası, *sitokrom-c*, *FADD* (Fas associated death domain), *TRADD* (Tumor necrosis factor receptor associated death domain), *FLIP* (Fadd-like ICE inhibitory protein = Caspase-8), *Mdm2*, seramid gibi düzenleyiciler tarafından, ‘kaspazlar’ adını alan ilgili proteinlere iletilir. Kaspazlar da, hücredeki ilgili substratlarını (proteinler, DNA gibi) etkiler ve apoptotik ölüm gerçekleşir. Memeli hücrelerinde sonu apoptoz ile sonuçlanan iki önemli kaspaz yolu tanımlanmıştır. Mitokondrial yolda, *Bax* ve *Bid*, hücre ölüm faktörleridir (apoptotik sinyal iletim kaskadını iletirler). Bu ölüm faktörleri mitokondri zarının geçirgenliğini artırarak, sitokrom-c’nin sitozole salınımına neden olurlar. *Bcl-2* (B hücre lenfoma-2: B-cell lymphoma 2: Bcl-2 family proteins), *Bcl-XL* (Bcl-x’in uzun formu: Long form of Bcl-x) ve BAG-1 (Bcl-2 antagonisti) adını alan antiapoptotik faktörler (sinyal iletim kaskadını engellerler), mitokondri üzerindeki *Bax* (Bcl-2 ilişkili x proteini) ve *Bid* (BH-3 Interacting Domain Death agonist)’in etkisini inhibe eder. Apoptoz bir geri iletim (downstream) düzenleyicisi olan *Apaf-1*, *sitokrom c* ile birlikte, sitoplazmadaki kaspaz-9’la ilişki kurar ve kaspaz-9’un aktivasyonu ile apoptozom oluşumu gerçekleşir. Oluşan apoptozom, efektör kaspazların (kaspaz 3, 6 ve 7) kaskadını başlatır. Kaspaz-3, DNA fragmentasyon faktörünü aktive eder ve böylece, DNA’nın nükleozomal yarıklanması ve ardından da hücre ölümü gerçekleşir. Ölüm reseptör yolu ise, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen *Fas* (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1(TNFR-1)’in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi sonucu tetiklenir. Böylece bir ölüm sinyalinin, hücre ölüm reseptörleri ile etkileşime girmesi sonucu kaspaz-8 aktivasyonuna neden olur, böylece kaspaz kaskadı ve apoptoz gerçekleşir (Patron ve ark. 2001; Yu ve ark. 2005). İlaç etkili apoptozda, ya hücre yüzey reseptörlerin aktivasyonu ile ya da doğrudan mitokondrinin hedeflenmesiyle başlatılır (Soto-Cerrato ve ark. 2005).

1.5.1. Apoptoz ve Nekroz

Sonuçları aynı olsa da apoptoz ve nekrozla hücre ölümlerinin işleyişlerinde önemli derece farklar vardır. Apoptozda hücre, hücre ölüm yolundaki biyokimyasal reaksiyonlara aktif olarak katılmaktadır ve bundan dolayı hücre intiharı da denilmektedir. Nekrozda ise hücre ölümü hücre için uygun olmayan ortamlardaki değişiklikler sonucu gerçekleşmektedir. Bundan dolayı nekrozda hücre, ‘biyolojik bir kaza’ sonucu ‘ölümle sonuçlanan’ ‘masum bir kurban’ olarak görülebilir (Rosser ve Gores, 1995). Apoptoz ve nekrozun hem yapı hem de metabolik işleyişleri bakımından karakteristik farklılıkları vardır. Nekrozda hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plazma membranı yırtılır. Sitoplazma materyali hücre dışına geçerek inflamasyona neden olur. Apoptoz sırasında ise plazma membranı yırtılmaz. Apoptozun gerçekleşebilmesi için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptoz veya nekroz ile öleceğine yön verir. Bu da mitokondrinin önemini apoptozun erken fazında göstermektedir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir (Yılmaz, 2005). Nekroz patolojik bir olaydır. Apoptoz ise fizyolojik veya patolojik uyaranlarla oluşabilir. Nekrozda, hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken, apoptozda tam tersine hücre küçülür. Nekrozda, kromatin paterni hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir ancak apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır ve yoğunlaşır (Erdoğan, 2003). Nekrotik hücrenin plazma membranı, bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına doğru hücre içi materyalinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı üzerinde küçük cepçikler oluşur. Nekrotik hücre lizise uğrarken apoptotik hücre küçük cisimciklere parçalanır. Bunlar zar ile kaplıdır, değişken miktarlarda nükleus veya diğer hücre içi yapılar içerir (Cooper, 1994). Nekrozda hücre içeriği dış ortama salındığından inflamasyon reaksiyonu uyarılır. Apoptozda ise apoptotik hücre veya cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz (Erdoğan, 2003) (Şekil 1.3).



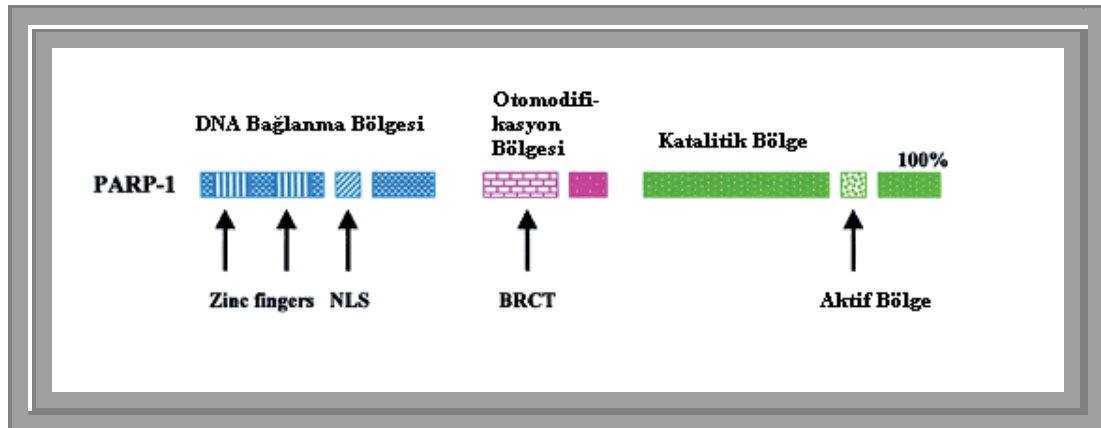
Şekil 1.3. Apoptoz ve nekroz sırasında hücrenin yapısındaki değişiklikler

1.6. Poli (ADP-Riboz) Polimeraz (PARP)'ın Yapısı

Poli (ADP-Riboz) Polimeraz (PARP)lar, DNA tamirine ek olarak çoklu hücrel işlemleri yerine getiren enzim ailesindendir. PARP1 en iyi karakterize edilmiştir ve iki DNA hasarı ile aktive olan PARP'lardan birisidir. Poli (ADP-Riboz) Polimeraz (PARP, MW: 116 kDa) çekirdekteki en fazla bulunan proteinlerden birisidir. Hedef hücrel proteinlerdeki NAD^+ moleküllerinden ADP-riboz'un polimerizasyonunu doğrusal ya da dallanmış polimerlere tutunarak katalizlemektedir. Bu 116 kDa protein, üç ana domainden oluşmaktadır. Bunlar;

amino N-terminal DNA- bağı domain (DBD), otomodifikasyon domain ve bir de karboksi C-terminal katalitik domainidir. PARP çoğu molekülde ve hücrel süreçlerde birçok rol üstlenmektedir, bunlar; DNA hasar belirlenmesi ve onarımı, kromatin modifikasyonları, transkripsiyon ve hücrel ölüm yollarıdır. Bu süreçler; genom onarımı, karsinogenez, yaşlanma, iltihaplanma ve nöron fonksiyonları gibi fizyolojik ve patolojik sonuçlarda çok kritiktir (Invitrogen ELISA PARP Kit, 2011).

PARP1 üç fonksiyonel gruptan oluşan hücrel bir proteindir (Şekil 1.4). Amino terminal DNA bağlanma bölgesi ve iki adet ‘zinc finger bölgesi’ içermektedir ve bunlar PARP1’in DNA’nın tek ve çift zincir hasarlarına bağlanmada önemli rol üstlenmektedir. Merkezi oto modifikasyon bölgesi ADP-Riboz’u çekerek, enzimler tarafından poli(ADP ribozil)’in kendini sindirmesini sağlar. C- terminal bölgesi, NAD^+ ’nın alt birimindeki ADPRiboz’u protein alıcılarına gönderir (Rouleau ve ark. 2010).

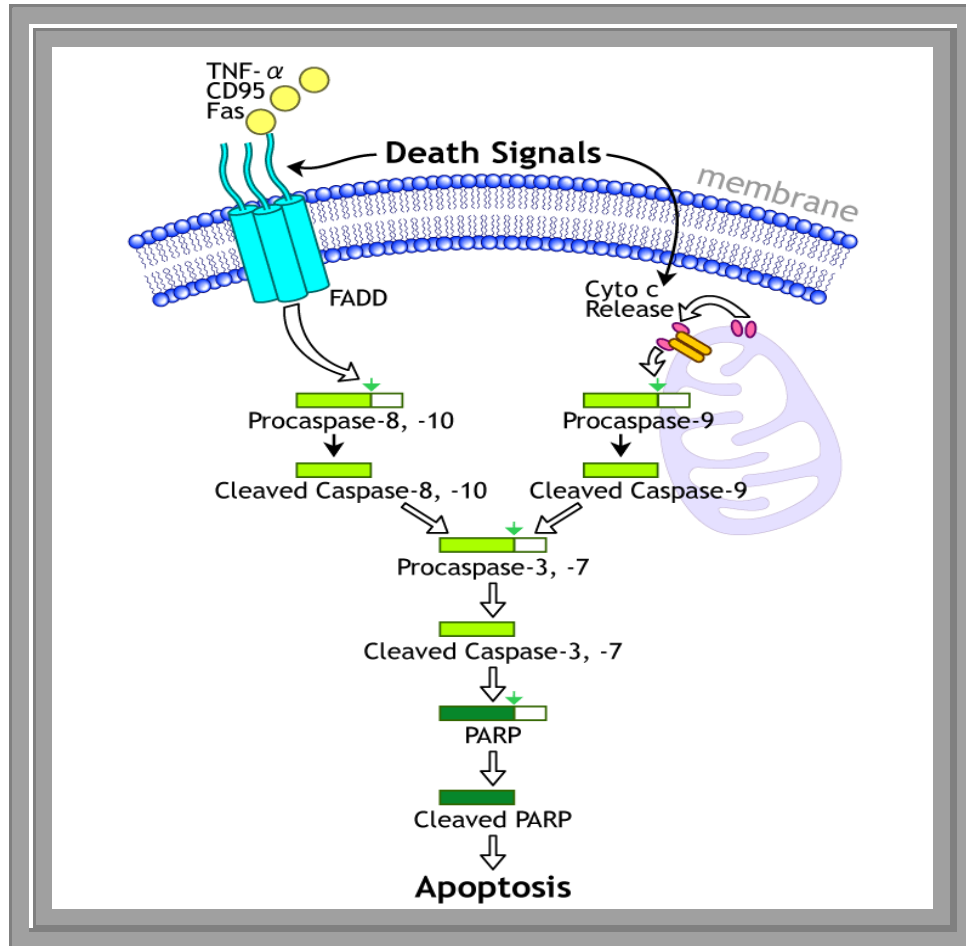


Şekil 1.4. Poli (ADP-Riboz) Polimeraz (PARP)1’in yapısı

1.6.1. Poli (ADP-Riboz) polimeraz (PARP)’ın apoptozdaki rolü

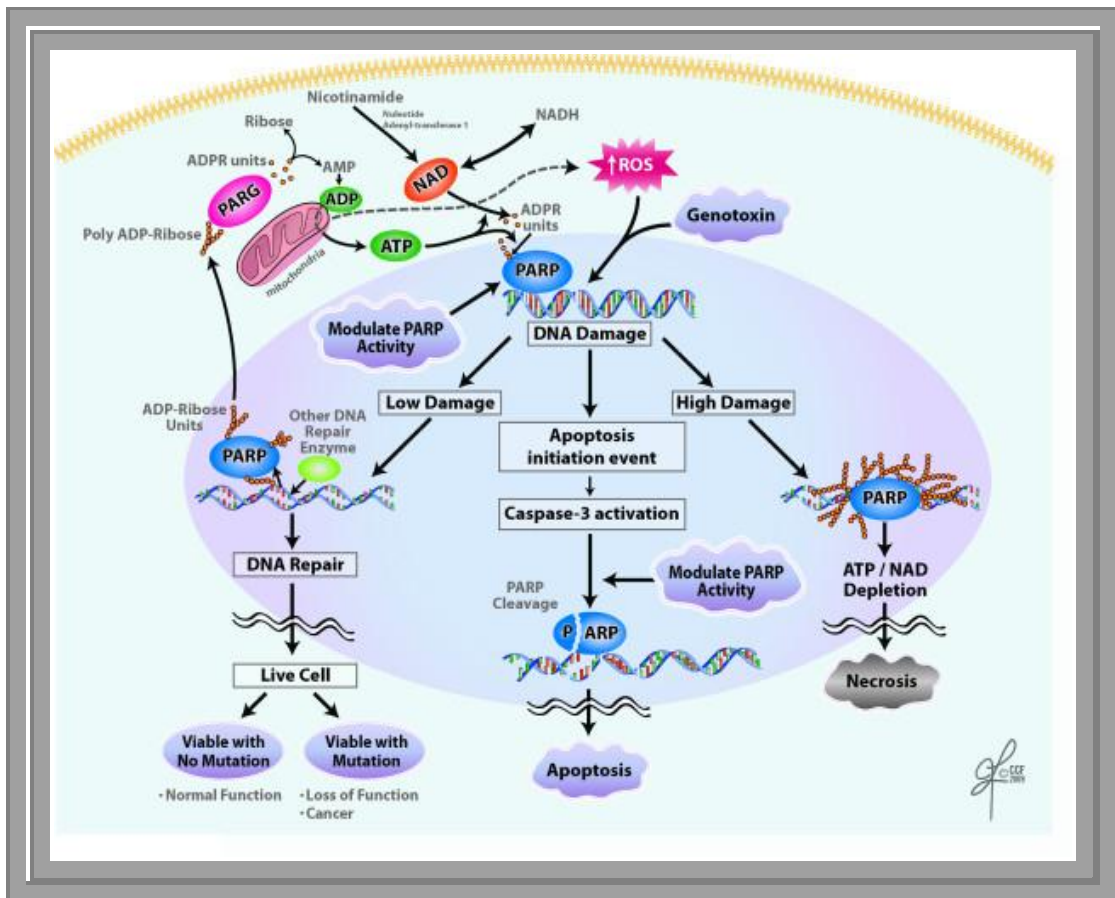
Kaspazın ilk belirlenmiş substratlarından olan PARP; özellikle, apoptoz ve nekrozda görev almaktadır ve biyologlar tarafından “ölüm substratı” olarak tanınmaktadır, çünkü kaspaz substratlarının ilk tespit edilenlerindendir. Apoptoz

sürecinde, kaspaz 7 ve kaspaz 3, Asp214 ve Gly215 arasında PARP'ı yarmaktadır ve p85 ve p25 parçalarına ayırmaktadır. PARP yarıklanması DBD ile katalitik domaini birbirinden ayırır ve enzimleri inaktif hale getirir. Bu işlem apoptoz sırasında DNA parçalanmasına karşılık olarak PARP aktivasyonunu yok etmektedir ve nekrotik hücre ölümünde gerekli ATP tüketimi ve DNA onarım için gerekli boşuna çabalara engel olmaktadır. Bundan dolayı, PARP yarıklanması hücrenin, apoptotik yola girmesi için yardımcı olur ve apoptozun ayırt edici özelliği olarak kabul edilmektedir (Şekil 1.5) (Chiarugi ve ark. 2002; Invitrogen ELISA PARP Kit, 2011).



Şekil 1.5. Poli (ADP-Riboz) Polimeraz (PARP)'ın apoptozdaki rolü ve şematik gösterimi

DNA'daki hasar miktarına göre PARP görev yapmaktadır. Eğer DNA'daki hasar çok yüksek ise PARP, ATP/NAD tüketimiyle hücreyi nekroza götürür. Eğer DNA'daki hasar az miktarda ise diğer DNA onarım enzimleriyle birlikte PARP DNA onarımında görev alarak hücrenin yaşamasını sağlar, kaspaz ailesinden apoptozda çok kritik rol üstlenen ve PARP'ın yarıklanmasının ana sorumlusu olan kaspaz 3 (Boulares ve ark. 1999) aktifleşmiş ise PARP yarıklanması gerçekleştirilerek, hücre apoptozda gitmektedir (Şekil 1.6).



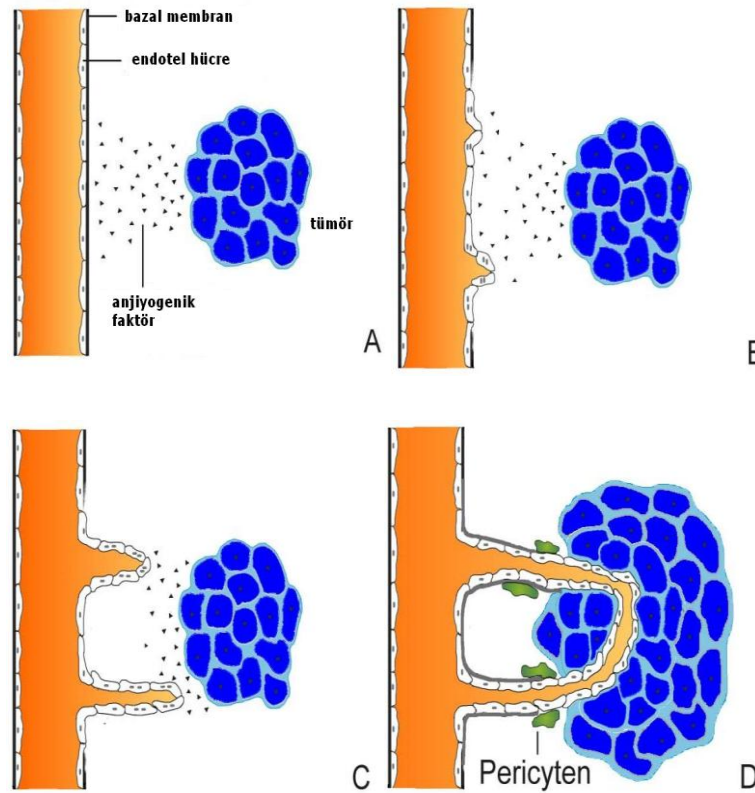
Şekil 1.6. PARP'ın hücre ölümündeki rolü (Agarwal ve ark. 2009)

1.7. Anjiyojenez (Yeni Kan Damarı Oluşumu)

Anjiyojenez, daha önceden bulunan damardaki yeni formasyonlarla yeni damarlanmanın olmasıdır. Yara iyileşmesi gibi çoğu fizyolojik durumlarda anjiyojenez geçicidir ve görevini yerine getirdikten sonra yeni damarlanma geri çekilmektedir. Ancak, ikincil tümörlerin yerleşmesinde damarlanma devam eder. Mikro dolaşım, hücre zarının alt kısmındaki endotel hücrelerinin tüpleri olan kılcal damarlardan oluşmuştur. Anjiyojenez ilk olarak hücre göçü ve endotel hücre çoğalmasının uyarılmasını içerir. Sonra da düz kas hücreleri gibi diğer hücrelerinde olaya dahil olmasıyla morfogenez ve yeni damar tamiriyle olmaktadır. Tümör gelişimi ve metastaz için birçok anjiyojenik faktör vardır ve en önemli tedavi yöntemi de anjiyojenezdir (Sasaki ve ark. 1998).

Anjiyojenez, insan vücudunda doğal fizyolojik bir olay olabildiği gibi patolojik de olabilen bir olaydır. Anjiyojenezin moleküler mekanizması çözülebilirse, tümörler başta olmak üzere birçok hastalık için yeni tedavi yaklaşımları geliştirilebilecek ve bu hastalıkların tedavisinde başarılı sonuçlar alınabilecektir. Anjiyojenez büyüme faktörleri, sitokinler ve bunların reseptörlerinin rol oynadığı karmaşık bir olaydır. Endotel hücreleri bu olayda temel rol oynamaktadır (Konukoğlu ve ark. 2005). Antianjiyojenik yaklaşımların hedefi ise homojen ve neoplastik olmadığı için daha az dirençli olan endotel hücreleri ve damar duvarına ait diğer yardımcı hücrelerdir. Bunun dışında başka birçok özellik anti-anjiyojenik terapiyi kemoterapiye göre üstün kılmaktadır.

Anjiyojenez, tümör kütlesi 1–2 mm³ olduğunda çok önemli rol üstlenmektedir. Tümör metastazı kanser hastalarındaki ölüm oranının en önemli nedenidir. Tümör metastazı beş ana adımdan oluşan karmaşık bir işlemler dizisi sonucunda oluşur. Bu adımlar; anjiyojenez, endotel hücrenin zarına tutunma, hücre zarının lokal proteolitik yıkımı, ikincil bölgeye göç, ikincil bölgenin proliferasyonu ve tekrar yeni kan damarının oluşumu metastaz için gerekli olur (Şekil 1.7). İşte bu yüzden anjiyojenez inhibisyonu kanser çeşitleri için güçlü ve seçici bir tedavi şekli olmaktadır (Singh ve ark. 1997).



Şekil 1.7. Anjiyoenez oluşumunun aşamaları. Endotel hücre reseptörlerine büyüme faktörü bağlandıktan sonra aktifleşirler (A). Bu durum proteazlar tarafından kan damarlarının bazal membranının bozulmasıyla devam eder (B), Artık endotel hücreler anjiyojenik uyarı yapılmış bölgeye göç edebilir ve orada çoğalabilirler, bazal membran üzerinde prematüre damarlar oluşur (C), yeni oluşmuş iki damar birleşir ve tümör damar sistemine katılmış olur (D) (Diemer ve Rétey, 2011)

Anjiyoenez, çoğunlukla peptitlerden oluşan anjiyojenik faktörlerle uyarılmaktadır. Çoğu anjiyojenik faktör aynı zamanda fibroblast büyüme faktörü (FGF), vaskular endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörüdürler. Anjiyojenik faktörler birçok normal dokudan çok az miktarda üretilmektedirler. Üretilmeleri oksijen yetersizliği ve tümörler tarafından düzenlenmektedir. Oksijen yetmezliği (Hypoxia) serin/threonin protein kinazlarını (stres aktiviteli protein kinazları, SAPK) aktive eder ve bunlar hipoksi indüklenmiş transkripsiyon faktörleri (HIF) tarafından özel bir geni uyarır. Tümör baskılayıcı gen, VHL (von Hippel–Lindau), diğer proteinlerden oluşan bir kompleks pVHL proteinini kodlar. Bu kompleks oksijene bağımlı durumlarda HIF’i indirger. pVHL proteini az olan

hücreler oksijene bağımlı olarak HIF'i indirgeyemez. HIF, VEGF gibi anjiyojenik faktörlerin üretimini kontrol ettiğinden, indirgenme gerçekleşmediğinde kontrolsüz hücre çoğalması ve tümör kan damarı oluşumu gerçekleşir. VEGF, büyük bir glikoprotein olarak salgılanır. FGF gibi VEGF de ECM (heparin gibi proteoglikanlar) proteoglikanlarla birlikte inaktif kompleksler olarak depolanır.

VEGF'in parakrin etkisi, sadece endotel hücrelerde bulunan transmembran reseptörleri tarafından iletilir ve VEGF sadece bu bölgede mitojenik etkiye sahiptir. FGF reseptörleri daha geniş bir alana yayılmıştır. VEGF ve FGF endotel hücrelerinde karşılıklı etkiye sahiptirler. VEGF reseptörleri, dimerizasyon, sitoplazmik domainde tirozin fosforilasyonu ve SH domain proteinlerinin alımını gerektiren tipik kinaz reseptörleridir. Alınan SH domain proteinleri, fosfolipaz C, GAP ve fosfatidil inozitol-3-kinaz (phosphatidyl inositol-3-kinase)ları içermektedir ve her biri endotel hücre çekirdeğindeki çoğalma sinyalini dönüştürme yeteneğine sahiptirler. VEGF reseptör genleri, HIF cevap elementini içerir ve hipoksi tarafından aktive edilirler. Bu etkilerin yanında VEGF ayrıca serin proteinazları ve metalloproteinazların salgılanmasını organize eder, integrinlerin salgılanmasını sağlar. Birçok deneyin sonucunda, hızlı tümör gelişiminden önce tümör içerisindeki damar gelişiminin önemli derecede arttığı gözlenmiştir. Aynı şekilde elde edilen kanser kitleleri içerisinde, kanserin safhalarına bağlı olarak kılcal damar yoğunluğunun arttığı gözlenmiştir. Bunlar da göstermektedir ki; anjiyojenez tümör gelişimi için çok önemlidir (King ve Robins, 2006).

1.7.1. Anjiyojenez mekanizması

Tümörün büyümesini etkileyen faktörlerden biri de tümörün beslenebilmesi için kanlanmadır. Çevre konakçı doku tarafından kapiller ağı yapılabilmesi ve anjiyojenezin gerçekleşmesi için farklı uyarıcı ve inhibitör moleküller sentezlenir. Tümörün büyümesi avasküler ve vasküler faz olmak üzere iki aşamadan oluşur. Ayrıca anjiyojenez için çeşitli uyarıcı maddeler gereklidir. ve anjiyojenez sürecinde birçok uyarıcı ve baskılayıcı moleküller görev almaktadır. Bunlar epitel hücre göçünü ve poliferasyonunu düzenler. Fibroblast

büyüme faktörü ve vasküler endotel büyüme faktörü yeni ve duyarlı markırlar olarak değerlendirilmekte olup önemli anjiyogenez indükleyici, tümörün progresyonu, metastazı ve prognozunu belirlemede kullanılmaktadır (Karaağaç, 2006).

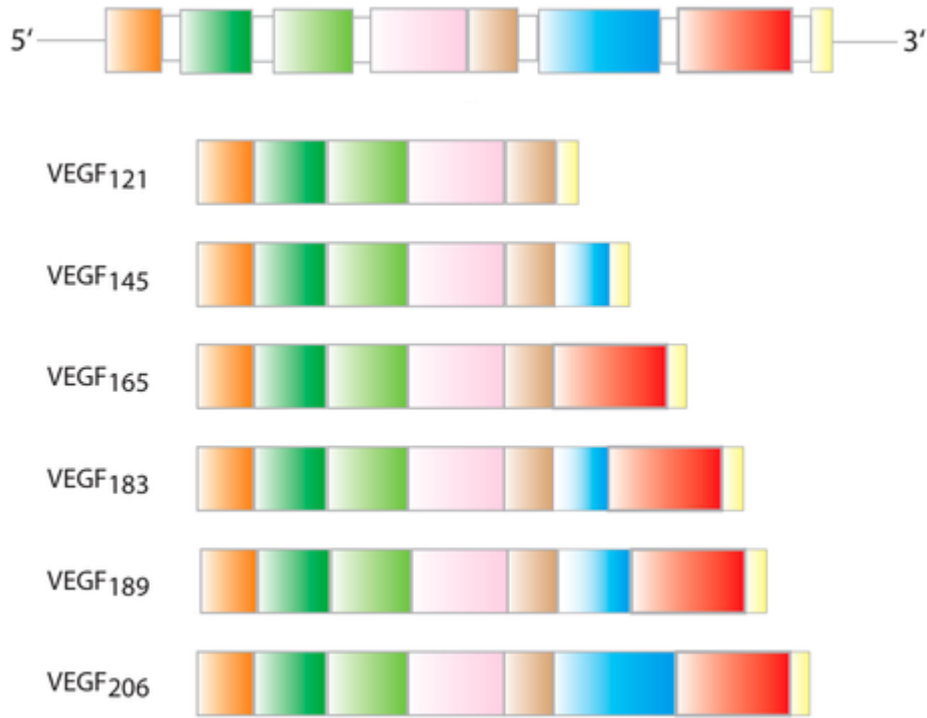
Anjiyogenez, yara iyileşmesi, fertilizasyondan sonra plasenta gelişmesi, menstruasyondan sonra uterus iç tabakasının yenilenmesinde yer alır. Pro anjiyojenik ve anti-anjiyojenik faktörler arasındaki denge bozulduğunda anjiyogenez kontrol edilemez ve özellikle de tümör hücrelerinin yayılmasına neden olan bir mekanizma halini almaktadır (Konukoğlu ve ark. 2005)

Anjiyogenezin engellenmesi kanser tedavilerinde önemli bir rol oynadığı için son yıllarda anjiyogenez yol açan sinyal yollarının ortaya çıkarılması araştırmacıların ilgi alanı olmuştur. Tümör hücrelerinde, yüksek metabolik hızın yol açtığı düşük oksijenli ortam (hipoksiya) sonucu hücresel dengeler bozulur. Düşük oksijenli ortam tümör gelişiminin ilk safhalarından itibaren görülmektedir. Tümör büyümesi ve yayılmasına yol açan yeni damar oluşumlarından sonra da tümörün oksijen isteği yeterince karşılanamamakta, düşük oksijenli ortam varlığını sürdürmektedir. Bu sebeple tümör hücresinin düşük oksijenli ortama gösterdiği tepkinin önemli basamaklarını, genler üzerinde etkili hücre içi sinyal yollarını etkileyerek karşılamaktadır. Hipoksiya bağımlı transkripsiyon faktörü (HIF), anjiyogenez ile ilişkili sinyal iletiminde rol oynayan en önemli faktörlerden biridir. HIF, hipoksiya yoluyla aktive olan bir transkripsiyon faktörüdür ve vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi bazı özel gen faktörlerinin üretimi üzerinde etkiye sahiptir. VEGF, tümör anjiyogenezindeki en önemli moleküllerden biridir. VEGF, vasküler endotel hücrelerinin sayıca artmalarını, yeni oluşan damarda yaşamlarını sürdürmelerini, anjiyogenez ve yayılmaya yol açan matriks metalloproteinaz (MMP) gibi matriks parçalayıcı enzimlerin artışı sağlamaktadır. Tümör hücrelerinin metastaz yapma özelliği kazanmalarında bu anjiyojenik etkinin önemli olduğu bildirilmiştir (Durak ve ark. 2005). Anjiyogenez sırasında birçok gen ve hücresel mekanizma rol oynamaktadır. VEGF reseptörlerinin aktivasyonu; fosfolipaz-C, fosfoinositol-3 kinaz ve ras GTPaz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve diferansiyasyonunu

sağlar. Nitrik oksit (NO) ise anjiyogenezin VEGF-bağımlı bir mediyatörüdür. VEGF'in NO sentez enzimi üzerindeki uyarıcı etkisi sonucu oluşan NO, endotel hücre migrasyonunda rol alır. Başta *RAS*, *SRC* ve *HER-2* onkogenleri olmak üzere VEGF düzeyi; p53 gen mutasyonu, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-13, FGF-4, PDGF, TGF- β , IGF-1, TNF- α ve NO gibi birçok endojen ajan ile düzenlenmekte ve tümör hücrelerinde VEGF ekspresyonu artmaktadır (Paul ve ark. 2009; Kountouras ve ark. 2005). Düşük glikoz seviyesi, oksidatif stres ve özellikle hipoksik ortamda düzeyi hızla artan hypoxia-inducible transkripsiyon faktör-1 (HIF-1) de VEGF salınımında etkili rol oynamaktadır. Ayrıca, VEGF muhtemel temel anjiyogenik faktör olma özelliği yanında; VEGF'e maruz kalan damarlar da, endotel hücreleri arasında penetrasyon, vesiküler organeller ve transselüler boşluk oluşumuna olanak sağlayarak hücrelerel geçirgenliğini artırır. Endotel hücreleri için migrasyon özelliğinin yanı sıra VEGF; hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteazlar ile ürokinaz ve doku-tipi plazminojen aktivatörlerinin salınımını da uyarır. Böylelikle invazyon ve metastazı da kolaylaştırır. Anti-anjiyogenik ilaçlar yeni damar oluşumunu engelleyici iken, damar hedefli bileşikler var olan damarları tahrip edicidir (Yücel ve ark. 2005).

1.7.2. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), yapısı ve anjiyogenezdeki rolü

Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) anjiyogenezde çok önemli bir rol üstlendiğinden üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. VEGF büyüme faktörlerindendir ve beş farklı izoformu bulunmaktadır. Bunlar; VEGF 121, 145, 165, 189 ve 206'dir (Şekil 1.8).



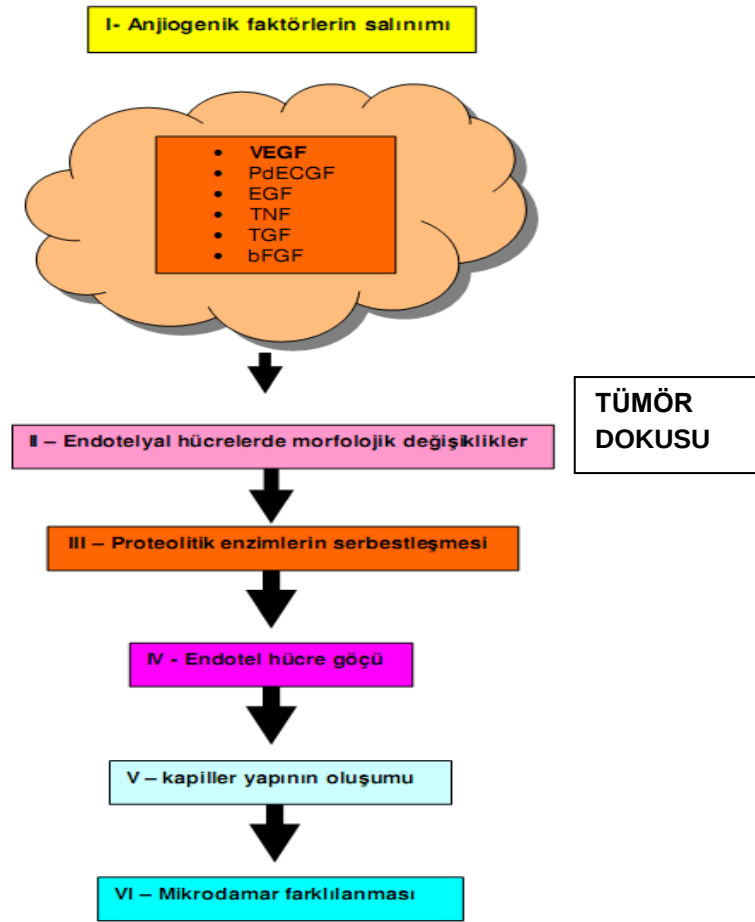
Şekil 1.8. VEGF ve izoformları

Bu izoformların hepsi heparine bağlanır ve VEGF 121 hariç dimerik yapıya sahiptirler. İnsan VEGF 165, 46 kDa homodimer ve 23 kDa monomer olarak sentezlenir. Bütün izoformlar uyarı dizisine sahiptir VEGF 189 ve 206 salgılatılırken; VEGF 121, 145 ve 165 hem salgılatılır hem de geçirgen bir yapıya sahiptir. VEGF 121 ve 165’de bulunmayan ekzon 6 amino grup asitçe zengin bir bölgedir. Bu izoformların biyolojik aktiviteleri ve reseptör bağlanma özellikleri birbirinden farklılık göstermektedir ve bu farklılıklar heparin sülfat proteoglikanlara olan farklı bağlanma kapasitelerinden kaynaklanmaktadır. VEGF monomerleri paralel olmayan ve kovalent bağlı disülfid köprülerinden oluşmaktadır. VEGF’in KDR (VEGF reseptör 2) reseptörlerine bağlanma bölgeleri, diğerlerin sonunda bulunan iki adet bağlanma yüzeyinde yerleşmiştir. VEGF için yüksek afiniteli iki adet (Flt-1/ VEGF-RI, KDR/VEGF-R2) protein tirozin kinaz (PTK) reseptörü belirlenmiştir. Bu iki reseptör birbiriyle % 44 oranında aminoasit benzerliği bulunmaktadır. VEGF reseptörlerinin domain

yapısı, PTK (class III) reseptörleriyle benzer özellik göstermektedir (Zachary, 1998).

VEGF ve reseptörü tirozin kinaz anjiyojenezde çok önemli rol üstlenmektedir. En çok çalışılmış VEGF izoformu VEGF-A'dır ve hücre göçü, proliferasyonu, yaşamasında çok önemli rol oynamaktadır. VEGF-A'nın bilinen izoformları VEGF 121, VEGF 165, VEGF 189 ve VEGF 206'dır ve bu izoformlar arasında en çok çalışılmış olanı da VEGF165'dir. VEGF-A'nın ilk kez vasküler geçirgenlik yeteneğini artırıcı özelliği çalışılmıştır ve bundan dolayı vasküler geçirgenlik faktörü (VPF)31 denilmiştir. Daha sonra vasküler endotel hücrelerinin büyümesini artırdığı belirlenmiştir. VEGF tümör hücrelerinden salgılandığında vasküler endotel hücrelerinde bulunan hücre yüzey reseptörleriyle (VEGFR-1 ve 2) etkileşmektedir. VEGFR-1'in çözünabilir formu VEGF-A'nın VEGFR-2 üzerindeki sinyal yolunu engelleyerek yalancı reseptör olarak çalışmaktadır. VEGF-A165 birçok insan tümöründe fazla salgılanmaktadır ve bu salgılanma kanser ilerlemesi, invazyonu, metastazı, mikro damar yoğunlaşması ve hastanın yaşam şansının azalması ile doğrudan ilişkilendirilmektedir (Cook ve Figg, 2010).

Şekil 1.9'da VEGF'in, vasküler geçirgenliği artırarak; iyonların geçişini düzenlediği, hücre göçü ve proliferasyonunu artırdığı, ayrıca tümör invazyonunu sağlayan proteazların salınımına yardımcı olduğuna dair aşamalar özetlenmiştir (Çalık, 2008).



Şekil 1.9. Tümör anjiyojenezindeki aşamalar ve VEGF'in anjiyojenezdeki rolü (Çalık, 2008)

Anjiyojenez, daha önceden bulunan damardaki yeni formasyonlarla yeni damarlanmanın olmasıdır. Yara iyileşmesi gibi çoğu fizyolojik durumlarda anjiyojenez geçicidir ve görevini yerine getirdikten sonra yeni damarlanma geri çekilmektedir. Ancak, ikincil tümörlerin yerleşmesinde damarlanma devam eder. Mikro dolaşım, hücre zarının alt kısmındaki endotel hücrelerinin tüpleri olan kılcal damarlardan oluşmuştur. Anjiyojenez ilk olarak hücre göçü ve endotel hücre çoğalmasının uyarılmasını içerir. Sonra da düz kas hücreleri gibi diğer hücrelerinde olaya dahil olmasıyla morfogeneze ve yeni damar tamiriyle olmaktadır. Tümör gelişimi ve metastaz için birçok anjiyojenik faktör vardır ve en önemli tedavi yöntemi de anjiyojenezdir (Sasaki ve ark. 1998).

Anjiyojenez, insan vücudunda doğal fizyolojik bir olay olabildiği gibi patolojik de olabilen bir olaydır. Anjiyojenezin moleküler mekanizması çözülebilirse, tümörler başta olmak üzere birçok hastalık için yeni tedavi yaklaşımları geliştirilebilecek ve bu hastalıkların tedavisinde başarılı sonuçlar alınabilecektir. Anjiyojenez büyüme faktörleri, sitokinler ve bunların reseptörlerinin rol oynadığı karmaşık bir olaydır. Endotel hücreleri bu olayda temel rol oynamaktadır (Konukoğlu ve ark. 2005). Antianjiyojenik yaklaşımların hedefi ise homojen ve neoplastik olmadığı için daha az dirençli olan endotel hücreleri ve damar duvarına ait diğer yardımcı hücrelerdir. Bunun dışında başka birçok özellik anti-anjiyojenik terapiyi kemoterapiye göre üstün kılmaktadır.

Anjiyojenez, tümör kütlesi 1–2 mm³ olduğunda çok önemli rol üstlenmektedir. Tümör metastazı kanser hastalarındaki ölüm oranının en önemli nedenidir. Tümör metastazı beş ana adımdan oluşan karmaşık bir işlemler dizisi sonucunda oluşur. Bu adımlar; anjiyojenez, endotel hücrenin zarına tutunma, hücre zarının lokal proteolitik yıkımı, ikincil bölgeye göç, ikincil bölgenin proliferasyonu ve tekrar yeni kan damarının oluşumu metastaz için gerekli olur. İşte bu yüzden anjiyojenez inhibisyonu kanser çeşitleri için güçlü ve seçici bir tedavi şekli olmaktadır (Singh ve ark. 1997).

1.7.3. Tümör anjiyojenezinde önemli terapötik hedef moleküller

Tümör anjiyojenezini engelleyen birçok potansiyel terapötik hedef belirlenmiştir. Bunlar birçok alt sınıfa ayrılırlar.

1. Proto anjiyojenik faktörler veya reseptörleri (VEGF, Ang-1, bFGF, PDGF).
2. Proteaz inhibitörleri (MMP).
3. ECM üretim inhibitörleri ya da hücre-ECM yapışmasına ihtiyaç duyan damar stabilizasyonu ve reseptörleri (TGF- β , α V β 3 ve α V β 5 integrinler);
4. Doğal inhibitörler (thrombospondin, angiostatin, endostatin)
5. HIF-1 α üretimini durduran ajanlar (King ve Robins, 2006).

1.8. Funguslar ve Sekonder Metabolitler

Mantarlar eşsiz biyokimyasal yollara sahip birçok tür içermektedir. Bu biyokimyasal yolların ürünleri; penisilin, siklosporin, statinler, aflotoksin, fumagillin gibi ürünlerdir. Diğer düşük molekül ağırlıklı fungal metabolitlerle birlikte bu doğal ürünlere, sekonder metabolitler denilmektedir. Sekonder metabolitler, fungusların temel metabolizmaları için gerekli değildir. Genellikle biyoaktif, düşük molekül ağırlıktadırlar ve üretimleri morfolojik değişimin belli bir döneminde gerçekleşir (Keller ve ark. 2005). *Aspergillus fumigatus* birçok bilim adamı tarafından araştırılmış ve birçok sekonder metabolit ürettiği bildirilmiştir (Turner, 1971; Turner ve Aldrich, 1983; Cole ve Cox, 1981; Cole ve Schweikert, 2003a ve 2003b; Cole ve ark. 2003; Rementeria ve ark. 2005). Fumagillin de, *Aspergillus fumigatus fresenius*'dan elde edilmiş olan bir antibiyotik türevidir (sekonder metabolit) (Ataergin ve ark. 1999).

Funguslar, klorofil içermeyen heterotrofik, ökaryotik bir organizma grubudur. Hücre çeperine sahip olmaları, hareketsiz olmaları ve sporlar aracılığıyla çoğalmaları gibi özellikleriyle bitkilere benzerler. Ancak, yüksek bitkilerdeki gibi gövde, kök ve yapraklara sahip değildirler ve karmaşık bir vasküler sistem gelişmemiştir, başlıca karbonhidrat depo ürünleri glikojendir. Funguslar genel olarak ipliksi (filamentli) bir yapıya sahiptirler. Çekirdekleri küçük olmasına rağmen ayırtedilebilmektedir. Fungal metabolitlerden anjiyojenez inhibitörü yeni metabolitlerin keşfedilmesi, kanser tedavilerinde kemoterapiyi zorlaştıran ve hastanın yaşam süresini kısaltan metastaz ve invazyon mekanizmalarını ortadan kaldırmak için son yılların çalışma konusu haline gelmiştir (Ingber ve ark. 1990).

1.8.1. Fumagillin

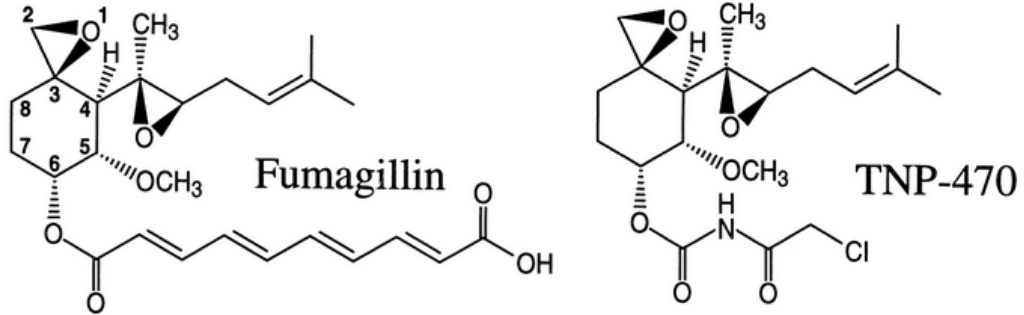
Anjiyojenik terapötikleri, tümör damarlarını bulmada çok cazip bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. En önemli potansiyel anjiyojenik ajan ise Folkman laboratuvarlarında *Aspergillus fumigatus*'den izole edilmiş fumagillindir. Fumagillin kimyasal olarak ilaç adayı olması için modifiye edilmiş (TNP-470) ve

Kaposi's sarkoma, renal hücre karsinoma, beyin kanseri, meme kanseri, boğaz kanseri ve prostat kanseri için faz I/II denemeleri yapılmıştır. Yi Zhang ve ark. kimyasal genetik yöntemleri kullanarak, metiyonin aminopeptidazın fumagilline doğrudan bağlandığını göstermiş ve yayınlamışlardır. Hem fumagillin hem de TNP-470, MetAP-2'ye bağlanmakta ve aktivitesini inhibe etmektedir (Zhang ve ark. 2006).

Fumagillin, 1951 yılında *Aspergillus fumigatus*'den izole edilmiştir birçok ilginç biyolojik aktivite göstermektedir. Fumagillin ilk başta antimikrobiyal ajan olarak tanımlanmıştır ancak, son zamanlarda Folkman ve ark. tarafından yapılan çalışmalar bu maddenin potansiyel ve seçici anjiyojenez inhibitörü olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Yakın zamanda fumagillinin analogu olan TNP-470, fumagillinden daha iyi terapötik etki gösterdiği keşfedilmiştir. Bu son çalışma fumagillinin metiyonin aminopeptidazı inhibe ettiğini ortaya çıkarmıştır. Fumagillin ve MetAP-2 kompleksinin X-ray yapısı fumagillin ve analoglarının sentez ilgisini artırmıştır (Picoul ve ark. 2003).

Fumagillinin, moleküler formülü $C_{26}H_{34}O_7$ ve moleküler ağırlığı 458,5 gr/mol'dür. Endotel hücrelerin proliferasyonunda, anti tümör aktiviteli ve metiyonin-aminopeptidaz MetAP-2'ye kovalent bağlanabilme özellikleri göstermektedir. Fumagillin, *Aspergillus fumigatus fresenius*'dan elde edilmiş olan bir antibiyotik türevidir (sekonder metabolit). *In vitro* olarak endotel proliferasyonunu, *in vivo* olarak ise anjiyojenezi inhibe eder. TNP-470 (AGM-1470), fumagillinden daha etkin ve daha az toksin özelliği olan bir fumagillin analogudur (Şekil 1.10). Anti-anjiyojenez aktivitesi ve endotel hücre proliferasyonunu inhibe etme özelliği fumagillinden daha fazladır. Pikomolar konsantrasyonlarda çoğalmış endotel hücrelerini inhibe ederken, 100-10.000 kat yüksek konsantrasyonlarda pek çok tümör hücresinin büyümesi inhibe olur. Anjiyostatin gibi spesifik bir inhibitör olmamasına rağmen, endotel hücrelerine karşı oldukça seçici bir anjiyojenez inhibitörüdür. Kolon kanseri ve diğer bazı solid tümörlerde çalışmaları devam etmektedir (Ataergin ve ark. 1999). AGM-1470 sistemik olarak verildiğinde implante edilmiş gliomlarda anjiyojenezin azaltılarak büyümenin durdurulduğu (Taki ve ark. 1994), intrakranial gliomların inhibe olduğu ve hastaların yaşam süresinin uzadığı gözlenmiştir (Takamiya ve

ark. 1994). Fumagillinden başka azaspiren metaboliti de Neosartorya türlerinden izole edilmiştir.



Şekil 1.10. Fumagillin ve analogu TNP-470'in kimyasal yapısı

Aspergillus fumigatus antianjiyojenik etki potansiyeli olan birçok sekonder metabolit üretmektedir. Bunlardan en iyi çalışılmış olanı fumagillindir. Fumagillin vasküler endotel büyüme faktörünü azaltıcı etki göstermektedir (Kontoyiannis, 2010).

Bir fungal metabolit olan fumagillin yeni kan damarı oluşumunu baskılamaktadır. Sentetik analogu TNP-470 ve fumagillol, antikanser ajan olarak klinik deneme aşamasındadır. Fumagillinin spesifik moleküler hedefi MetAp-2'dir ve bu özellik genetiği değiştirilmiş mantar türleriyle de doğrulanmıştır. Fumagillin analoglarının *in vitro* olarak MetAp-2'yi inhibe etme özelliği; MetAp-2'nin fumagillin temelli terapötik ajanların hedefi olduğunu göstermektedir (Liu ve ark. 1998).

Kanserlerde yeni tedavi yaklaşımlarında, büyüme faktörleri ve reseptörleri, sinyal iletim yolları, anjiyojenez ve ECM hedef alınarak hedefe yönelik tedavi yapılmaya çalışılmaktadır (Cao, 2001). Anjiyojenezde en önemli mediatör VEGF'dir. Dolayısı ile anjiyojenez tedavisinde en önemli hedef VEGF ve VEGF reseptörleridir. Avastin VEGF inhibitörü ve Sugen, VEGF reseptör inhibitörü olup kanser tedavisi çalışmalarında kullanılmaktadır (Turner ve ark. 1983). Monoklonal EGF Reseptör antikoru olan C225 (cetuximab) ile çalışmalar

devam etmektedir. Tek bir anjiyojenez inhibitörü ile yapılan tedaviler, daha fazla inhibitörle yapılan çalışmalara göre daha kötü sonuç vermiştir. Çünkü tümör hücreleri birçok anjiyojenik faktör salgılamaktadır (Brown, 1958). Yapılan çalışmalar antianjiyojenik ilaçların kemoterapi ile kullanıldığında daha iyi sonuçlar verdiğini göstermiştir. Dolayısı ile anjiyojenik ajanların kemoterapi ile kombine edilerek kullanıldığı çalışmalar devam etmektedir (Cao, 2001).

Fungal metabolitlerden anjiyojenez inhibitörü yeni metabolitlerin bulunması kanser tedavilerinde hep sorun yaratan ve hastaların hayatta kalma süresini kısaltan metastaz, invazyon sorununu ortadan kaldırmak için bir umut olacaktır.

1.9. Hücre Kültüründe Sitotoksitite Testlerinin Önemi

Son yıllarda, hücre kültüründe hücrenin canlılığını ve çoğalmasını çalışabilmek için birçok yöntem geliştirilmiştir (Cook ve Mitchell, 1989). Bu yöntemlerden en kullanışlı olanlar, 96 kuyucuklu plakaların kullanıldığı modern deneylerdir. Bu yöntemler birçok örneğin seri ve hızlı bir şekilde analizi imkanı sunmaktadır. Kolorimetrik ve luminesans temelli yöntemler, örneklerin mikropkala kullanarak doğrudan ELİZA plaka okuyucuda okunma imkanı sağlamaktadır. Sitotoksitite yöntemleri hücre ölümü ve çoğalmasıyla ilgili olan çeşitli parametreler kullanılmak üzere geliştirilmiştir (Dikmen, 2008; Barutca, 2006; Weyermann ve ark. 2005).

Sitotoksitite, kimyasalların hücre ve dokulardaki mekanizmalarını anlayabilmek için çok önemlidir. Sitotoksitite, kanser oluşumu ve iltihaplanma gibi patolojik süreçlerde çok önemli rol üstlenmektedir ve serbest radikaller, irritantlar ve genotoksinler gibi birçok ajanın aktivitelerini düzenleyebilmektedir (Bombick ve ark. 1998).

Sitotoksitenin *in vitro* testler ile ölçülmesinin birçok faydası bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi hayvan kullanımının en aza indirmesidir. Diğer bir avantajı da hücre ve organa özel toksin mekanizmanın belirlenebilmesidir (Bridges ve ark. 1983).

Yeni ürünlerin toksisitesinin *in vitro* yöntemlerle üretimin erken evrelerinde belirlenebilmesi, harcanan para, zaman ve deney hayvanlarından kazanç sağlayabilir (Knox ve ark. 1986).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Roswell Park Memorial İnstitute Medyum (RPMI-1640 besiyeri) (Invitrogen Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Almanya), penisilin-streptomisin (Invitrogen), 10X Tripsin-EDTA solüsyonu (Sigma), dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma-Aldrich, Fransa); L-glutamin (Sigma-Aldrich, Almanya); potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Merck, U.S.A); sodyum karbonat (Merck, U.S.A); sodyum bikarbonat (Merck, U.S.A); sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) (Merck, U.S.A); sodyum hidroksit (Reidel deHaen, Almanya); sodyum klorür (Merck, U.S.A); sodyum piruvat (Biochrom, Almanya); tripan mavisi (Sigma-Aldrich, Fransa), Vascular Endotel Growth Faktör (VEGF) kit (Invitrogen - Katalog No: KHG0111, Kalifornia), Cleaved PARP kit (Invitrogen - Katalog No: KHO0741, Kalifornia), WST-1(Water soluble Tetrazolium salts) (Katalog No: 11644807001, Roche- Almanya), Fumagillin (BioChemica-A7737, Almanya).

2.2. Kullanılan Malzemeler

Hücre kültür flaskı (25 cm^2 - 75 cm^2 'lik) (TPP, Almanya); kriyotüp (2 mL) (TRP, İsviçre); kültür plakası (6 ve 96 kuyucuklu) (TRP, İsviçre); Thoma lamı, çeşitli cam malzemeler, steril enjektör (20 mL), filtre ($0,22\text{ }\mu\text{m}$ milipor) (TRP-Almanya); mikropipet ucu (silikonlu 10, 200, 1000 μL) (Eppendorf); santrifüj tüpleri (15, 50 mL) (TPP, Almanya); şarjlı pipet (Isolab, Almanya); tek kullanımlık dereceli pipet (5-10-25mL) (HBG, Almanya); 12 kanallı otomatik pipet (Eppendorf, Kanada).

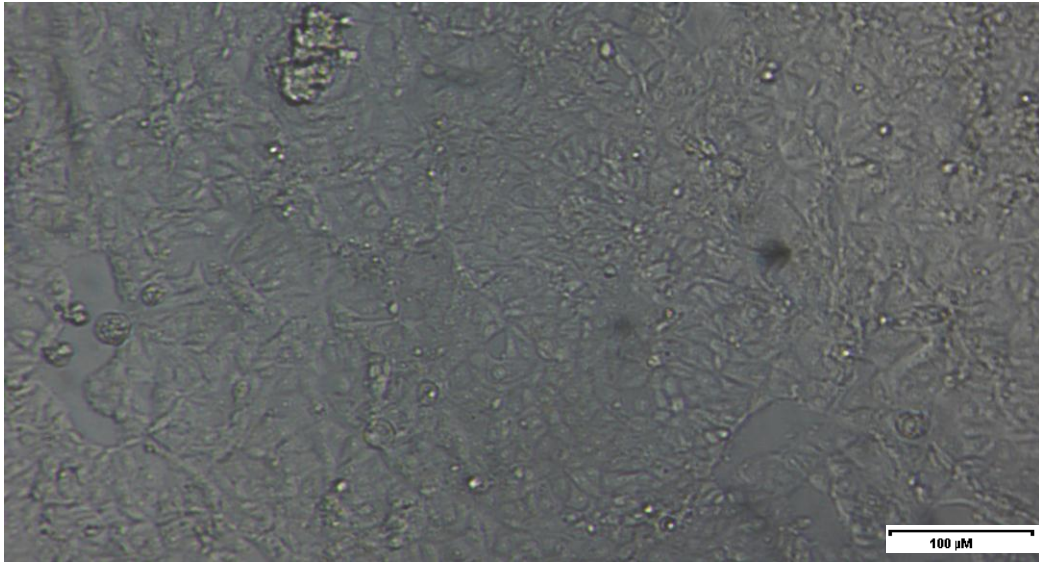
2.3. Kullanılan Aletler

Cedex (Innovatis), xCELLigence (Roche), ELİZA cihazı (BioTek), inverted mikroskop (Leica), su banyosu (Nuve), yüksek devirli santrifüj (Eppendorf), kuru hava sterilizatörü (Nüve, FN 500), otoklav (Alp), derin dondurucu buzdolabı (Altus), CO2 inkübatörü (Thermo Scientific), steril kabin (Heal Force), sıvı azot kabı, otomatik pipetler, hassas terazi (Ohaus, İsviçre).

2.4. Deneylerde Kullanılan MCF7 Hücreleri

2.4.1. MCF7 hücrelerinin kökeni

MCF7 hücreleri ilk defa 1970 yılında 69 yaşındaki bir kadının meme dokusundan izole edilmiştir. Kadının her iki memesi de alınmıştır, ilkinde söylenen kanserin iyi huylu olduğu; beş sene sonraki ikinci operasyonda alınan MCF7 hücrelerinde kötü huylu kanser tespit edilmiştir.



Şekil 2.1. MCF7 hücrelerinin mikroskop görüntüsü (Mikroskop Büyütmesi 40X)

2.4.2. MCF7 hücrelerinin kullanımı

MCF7 hücreleri, *in vitro* meme kanser çalışmalarında oldukça fazla tercih edilmektedir. MCF7 hücreleri hücre sitoplazmasında östrojeni östradiyol olarak işlemektedir ve bu özellik MCF7 hücrelerini östrojen pozitif reseptör yapmaktadır. Buna ek olarak MCF7 hücrelerinin *in vitro* üretiminde hücreler epitel hücrelere benzeyen tek tabaka halinde ürerler (Şekil 2.1).

2.5. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması

2.5.1. Kullanılan malzemelerin steril edilmesi

Çalışmalarda kullanılacak cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180°C’de 2 saat, sıvı solüsyonlar ise 121°C, 1.5 atm/Hg’de 20 dakika steril edilmiştir. Kullanılan tüm sıvı kimyasallar selüloz nitrat filtreden geçirilerek steril edilmiştir (Jakoby ve Pastan, 1979).

2.5.2. Fumagillinin dozlarının hazırlanması

Toz halindeki fumagillin (BioChemica - A7737, Almanya) dimetilsülfoksit (DMSO; Sigma) içinde çözülerek 100 mM konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Bu stok solüsyondan, kültür medyumuna ile çeşitli seyreltme işlemleri yapılarak, 25, 50, 75 ve 100 µM fumagillin konsantrasyonları hazırlanmıştır. En yüksek fumagillin konsantrasyonunda, DMSO oranı % 0.1 oranında olduğu için, kontrol grubuna da besiyeri içinde % 0.1 oranında DMSO uygulanmıştır. Fumagillinden hazırlanan ana stok -20°C’de saklanmıştır. Deneyde kullanılan fumagillin konsantrasyonları da her deney tekrarında taze hazırlanarak kullanılmıştır.

2.6. *In vitro* Çalışmalar

2.6.1. MCF7 hücre kültürü

Stoktan çıkarılan MCF7 hücreleri, inaktif hale getirilmiş % 10'luk Fetal Bovine Serum ve % 1 Penisilin-Streptomisin içeren RPMI-1640 (% 1 L-glutamin, % 1 sodyum pirüvat ve sodyum bikarbonat içeren) besiyeri içinde 25 cm²'lik flasklarda % 95 hava ve % 5 CO₂'li gaz ortamında ve 37°C'deki inkübatöründe (Thermo Scientific) kültüre edilmiştir. Çoğalan hücreler yeni 25 ve 75 cm²'lik flasklara pasajlanmış ve deneylerde kullanılmak üzere yeni hücre stokları hazırlanmıştır.

2.6.2. Hücre sayımları

Flasklarda bulunan MCF7 hücreleri görünümleri kaldırım taşlarını andırır biçimde flaskları % 70 oranında doldurduklarında sırasıyla PBS ve PBS-EDTA (Fosfat Tamponlu-Etilen Diamin Tetraasedik Asit) (PBS: 137 µM NaCl, 2.7 µM KCl, 15 µM KH₂PO₄, 8 µM NaHPO₄, pH 7.3, EDTA: 1M) ile yıkanmıştır. Kültür kabının büyüklüğüne ve hücrenin yoğunluğuna bağlı olarak, 250-450 µL 1X tripsin EDTA konmuş, bir iki dakika etüvde bekletilerek hücrelerin yapıştıkları flasktan kalkmaları sağlanmıştır. Tripsinin etkisini nötralize etmek için, kalkan hücrelerin üzerine hemen besiyeri ilave edilerek, besiyeri-hücre karışımı santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj sonrasında, pelet üzerine besiyeri eklenmiş ve pipetleme yapılmıştır. WST-1, PARP ve VEGF yöntemleri uygulanmadan önce MCF7 hücreleri tripan mavisi solusyonu ile boyanarak, hem Thoma lamı hem de hücre sayım cihazında (Cedex) sayılmıştır.

2.6.3. WST-1 yöntemi ile sitotoksisitenin belirlenmesi

WST-1 bir tetrazolyum tuzu olup, canlı hücrelerin mitokondrilerinde süksinat-dehidrogenaz enzimine spesifik olarak bağlanır ve suda çözünmeyen formazan tuzları oluşturur. WST-1 yönteminde spektrofotometrik olarak ölçülen

absorbans değeri, kültürdeki hücrelerin metabolik aktivitelerini gösterir ve bu değer de yaşayan hücre sayısı ile ilişkilidir. Proliferasyon arttıkça, formazan tuzu oluşumuna bağlı olarak absorbans değeri de artış gösterir (Carmicheal ve ark. 1987; Lian ve ark. 2003).

MCF7 hücreleri % 10'luk Fetal Bovine Serum ve % 1 Penisilin-Streptomisin içeren RPMI-1640 ortamında, 37°C' de % 5 CO₂ inkübatöründe kültüre edilmiştir. Hücrelerin yeterince çoğalınca hücre sayımı yapılarak, hücreler 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 5.000 hücre olacak şekilde besiyeri ortamında ekilmiş ve yapışmaları için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. DMSO'da çözülerek hazırlanmış olan fumagillin stok solüsyonundan hücre kültür besiyeri içinde gerekli seyreltmeler yapılarak uygun fumagillin konsantrasyonları (25, 50, 75 ve 100 µM) hazırlanmıştır. Daha sonra plakaların içindeki eski besiyeri atılmış ve kuyucuklara taze olarak kültür besiyerinde hazırlanan fumagillin konsantrasyonları uygulanmıştır. Kontrol grubundaki hücrelere de % 0,1 oranında DMSO içeren besiyeri uygulanmıştır. Daha sonra plakalar 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda her bir 96'lık kuyucuktaki hücreler üzerine, WST-1 kit (Invitrogen) prosedürü talimatlarına göre 10 µL WST-1 reaktifi ilave edilerek, hücreler 3 saat inkübatörde inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda absorbanslar 420 nm dalga boyunda ELİZA cihazında, her bir grupta 7 kuyucuk olacak şekilde okunmuştur. Deneyler bir birinden bağımsız 3 tekrar olarak çalışılmıştır. Renk oluşumuna göre alınan absorbans değerleri, hücre canlılığı ile direkt olarak ilişkilendirilmiştir (ELİZA İnsan VEGF Kit, Katalog No: KHG0111, 2011).

2.6.4. Apoptoz ile ilişkili olarak PARP yarıklanmasının belirlenmesi

PARP, DNA onarımı, hasarının belirlenmesi, kromatin değişimleri, hücre ölüm reaksiyonları gibi birçok moleküler ve hücresel olayda çok önemli role sahiptir. PARP, kaspazın ilk belirlenmiş substratlarından; apoptoz sırasında kaspaz 7 ve kaspaz 3, PARP (Asp214/Gly215) proteinleri arasında yarıklanmaya neden olur ve bunun sonucunda 85 ve 25 kDa'luk fragmentler oluşur. PARP yarıklanması katalitik domaininden DBD'yi (DNA bağlanma bölgesi) ayırır ve

enzimi inaktif hale getirir. Böylece PARP yarıklanması, hücrelerin apoptoz reaksiyonlarına girmesine neden olur (Neufeld ve ark. 1999).

ELİZA PARP yarıklanma kitinde, kuyucukları özel bir antikor (116 kDa ve 85 kDa) ile kaplanmış plakalar kullanılmaktadır. Plakada kit içerisinde bulunan standart konsentrasyonlar ve örnekler çalışılmaktadır. İlk inkübasyon sırasında PARP yarıklanma antijeni, deteksiyon antikoruna tutunur. Yıkamadan sonra, anti-rabbit IgG (anti-rabbit IgG-HRP) eklenerek, deteksiyon antikoruna tutunur ve dört katlı bir sandiviç oluşturulur. İkinci inkubasyondan ve yıkamadan sonra bir substrat çözeltisi eklenir ve anti-rabbit IgG enzime bağlanıp renk oluşturur. Bu rengin yoğunluğu (okunan absorbans) doğrudan PARP yarıklanmasının konsantrasyonu ile orantılıdır (Elisa Cleaved PARP Kit, 2011).

24 saat fumagillin konsantrasyonu ile inkübe edilmiş MCF7 hücreleri tripsin kullanarak kalkmaları sağlanmış ve her bir örnek ayrı ayrı tüplere toplanmıştır. Hücreler iki kere soğuk 1X PBS ile yıkanmıştır. Hücreleri içeren her bir örnek tüpüne ekstraksiyon tamponu (Sigma-Aldrich, Almanya) ilave edilmiş ve örnekler 30 dakika buz içinde bekletilmiştir. Bu süre içinde 10 dakika aralıklarla tüpler vortekslenmiştir. Konulan hücre ekstraksiyon tamponu, hücre miktarına göre değişmektedir. Örneğin; 10^6 hücre için 1 mL ekstraksiyon tamponu kullanılır.

30 dakika ekstraksiyon süresinin sonunda, hücre ekstraksiyon örnekleri (lizat) mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve 13.000 rpm de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Her bir örneğin hücre lizatı yeni tüplere konmuş ve -80 derecede depolanmıştır.

Kit içerisinde bulunan standartlardan tampon için ayıracağımız kuyucuğa 50 µL standart seyreltme tamponu eklenmiştir. Kromojen için ayrılan kuyucuklar boş bırakılmıştır. Her bir standartın 50 µL'si kendisi için ayrılan standart kuyucuklara eklenmiştir. Örnek kuyucuklarına ise, 50 µL örnek (hücre lizatı) eklenerek karışması sağlanmıştır. Kromojen için ayrılan kuyucuk haricindeki kuyucuklara 50 µL PARP yarıklanma deteksiyon antikoruna eklenmiştir. Plakanın üzeri filmle kaplanır ve 3 saat orbital karıştırıcıda 400-600 rpm'de oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sonunda plaka ters çevrilerek ve içindeki sıvının dökülmesi sağlanmıştır. Daha önceden hazırlanmış olduğumuz yıkama tamponuyla 4 kere yıkanmıştır. Kromojen için boş bırakılan kuyucuk haricindeki

kuyucuklara 100 μ L Anti-Rabbit IgG HRP çalışma çözeltisi eklenmiştir. Tekrar plaka ince filmle kaplanarak 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda plaka ters çevrilerek ve içindeki sıvı kurutma kağıdına emdirilmiştir. Yıkama tamponuyla 4 kere yıkanarak herbir kuyucuğa 100 μ L stabilize edilmiş kromojen eklenmiştir, kuyucuklardaki sıvının rengi maviye dönmeye başlamalıdır. Daha sonra 30 dakika karanlıkta, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda bütün kuyucuklara durdurma (stop) çözeltisi eklenmiştir. Yavaşça karıştırılarak ve kuyucuklardaki rengin, sarıya dönmesi beklenmiş ve hemen plaka 450 nm dalga boyunda ELİZA cihazında okunmuştur. Tablo 2.1’de kit içerisinde verilen PARP standartlarına ait absorbans ve miktarları görülmektedir.

Tablo 2.1. PARP Yarıklanma kitine göre standart absorbens değerlerine karşılık gelen standart PARP yarıklanma miktarları (ng/mL).

Standart PARP Yarıklanma Miktarları (ng/mL)	450 nm Dalga Boyundaki Absorbans Değeri
10	3.01
5	2.19
2.5	1.43
1.25	0.85
0.625	0.49
0.312	0.3
0.156	0.2
0	0.09

2.6.5. Anjiyogenezle ilişkili olarak VEGF miktarının belirlenmesi

Kanser tedavisinde yeni ufuklar vaat eden anjiyogenez inhibitörleriyle tedavide, kapiller endotel hücrelerinin proliferasyonunu önlemek amaçlanmaktadır. Anjiyogenezde en önemli aracı molekül VEGF'dir. VEGF, vasküler endotel hücrelerinin sayıca artmalarını, yeni oluşan damarda yaşamlarını sürdürmelerini, anjiyogeneze ve yayılmaya yol açan matriks metalloproteinaz (MMP) gibi matriks parçalayıcı enzimlerin artışını sağlamaktadır. Tümör hücrelerinin metastaz yapma özelliği kazanmalarında bu anjiyogenik etkinin önemli olduğu bildirilmiştir (Durak ve ark. 2005). Anjiyogenez sırasında birçok gen ve hücrel mekanizma rol oynamaktadır. VEGF reseptörlerinin aktivasyonu; fosfolipaz-C, fosfoinositol-3 kinaz ve ras GTPaz aktivatör proteinleri gibi bir dizi

hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon, ve diferansiyasyonunu sağlar (Ataergin ve ark. 1999; Chiarugi ve ark. 2002).

Bu tez çalışmasında, MCF7 hücreleri fumagillinin belirli konsantrasyonları ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, her bir gruba ait hücre kültür süpernatantlarında VEGF miktarları, insan-VEGF ELİZA kit yöntemine göre ölçülmüştür. Bu yöntemde kuyucukları insan VEGF proteinine özgü bir poliklonal antikorla kaplı plaka kuyucukları kullanılmıştır ve gruplara ait absorbans değerleri ELİZA da kolorimetrik yöntemle ölçülmüş ve örneklerle ait VEGF miktarları, VEGF standart grafiği kullanılarak pg/mL olarak hesaplanmıştır.

2.6.5.1. VEGF ölçümünde ELİZA yönteminin prensibi

ELİZA VEGF kitinde, kuyucukları özel bir poliklonal antikor ile kaplanmış plakalar kullanılmaktadır. Plakada kit içerisinde bulunan standart konsantrasyonlar ve örnekler çalışılmaktadır. İlk inkübasyon sırasında insan kit içerisindeki kullanmış olduğumuz VEGF antijeni, antikora tutunur. Yıkamadan sonra, insan VEGF için spesifik olan biotinlenmiş monoklonal bir antikor eklenir, yıkama işleminden sonra Streptavidin-Peroxdaz (enzim) eklenir bu enzimde biyotinlenmiş antikora bağlanarak dört katlı sandviç tamamlamış olur. Üçüncü inkübasyondan ve bağlanmamış enzimleri yıkadıktan sonra, renk üretebilmek için enzime bağlanmış bir substrat solüsyonu eklenir. Bu rengin yoğunluğu doğrudan ilk örnekte bulunan insan VEGF konsantrasyonu ile orantılıdır (ELISA Human VEGF Kit, 2011).

2.6.5.2. Vasküler endotel büyüme faktörü ELİZA kit yönteminin uygulanması

Plakanın çalışılacak bütün kuyucuklarına 50 µL inkübasyon tamponu eklenmiştir. Kit içerisinde bulunan standartların uygulanacağı kuyucuklara 100

μL standart seyreltme tamponu eklenmiştir. Kromojen için ayrılan kuyucuklar boş bırakılmıştır. Her bir standartın $100\ \mu\text{L}$ 'si kendisine ayrılan standart kuyucuklara eklenmiştir. Örnek kuyucuklarına ise, $50\ \mu\text{L}$ standart seyreltme tamponu ve $50\ \mu\text{L}$ örnek (hücre süpernatantı) olacak şekilde her bir örneğin kendi kuyucuklarına eklenmiştir. Plakanın üzeri filmle kaplanarak ve 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu inkübasyon sonunda plaka ters çevrilmiş ve içindeki sıvının dökülmesi sağlanmıştır. Daha önce hazırlanmış olan yıkama tamponuyla 4 kere yıkanmış, kromojen için boş bırakılan kuyucuk haricindeki kuyucuklara $100\ \mu\text{L}$ biyotinlenmiş Hu-VEGF (Biotin Konjugat) çalışma çözeltisi eklenmiştir. Yavaşça sarsarak iyice karışması sağlanmıştır. Tekrar plaka ince filmle kaplanarak 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda plaka ters çevrilerek ve içindeki sıvı kurutma kağıdına emdirilmiştir. Yıkama tamponuyla 4 kere yıkanmış. Daha sonra kromojen için ayrılan kuyucuklar haricinde diğer kuyuların herbirine (standartlar ve örnekler) $100\ \mu\text{L}$ Streptavidin-HRP çalışma çözeltisi eklenerek ve plaka kapatılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda plaka ters çevrilerek ve içindeki sıvının dökülmesi sağlanmış, yıkama tamponuyla 4 kere yıkanmıştır. Her bir kuyucuğa $100\ \mu\text{L}$ stabilize kromojen eklenmiştir. Kuyucuklardaki sıvının rengi maviye dönmeye başlamalıdır. 30 dakika karanlıkta, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda bütün kuyucuklara $100\ \mu\text{L}$ durdurma(stop) çözeltisi eklenmiştir. Yavaşça karıştırılarak ve kuyucuklardaki rengin renginin sarıya dönmesi beklenmiş ve hemen plaka $450\ \text{nm}$ dalga boyunda ELİZA cihazında okunmuştur. Tablo 2.2'de kit içerisinde verilen VEGF standartlarına ait absorbans ve miktarları görülmektedir.

Tablo 2.2. VEGF kitine göre standart absorbans değerlerine karşılık gelen standart VEGF miktarları (pg/mL)

Standart VEGF Miktarları (pg/mL)	450 nm Dalga Boyundaki Absorbans Değeri	
	En az	En fazla
0	0.06	0.063
23.4	0.105	0.11
46.9	0.147	0.153
93.8	0.251	0.257
188	0.48	0.472
375	0.879	0.847
750	1.633	1.608
1500	2.617	2.634

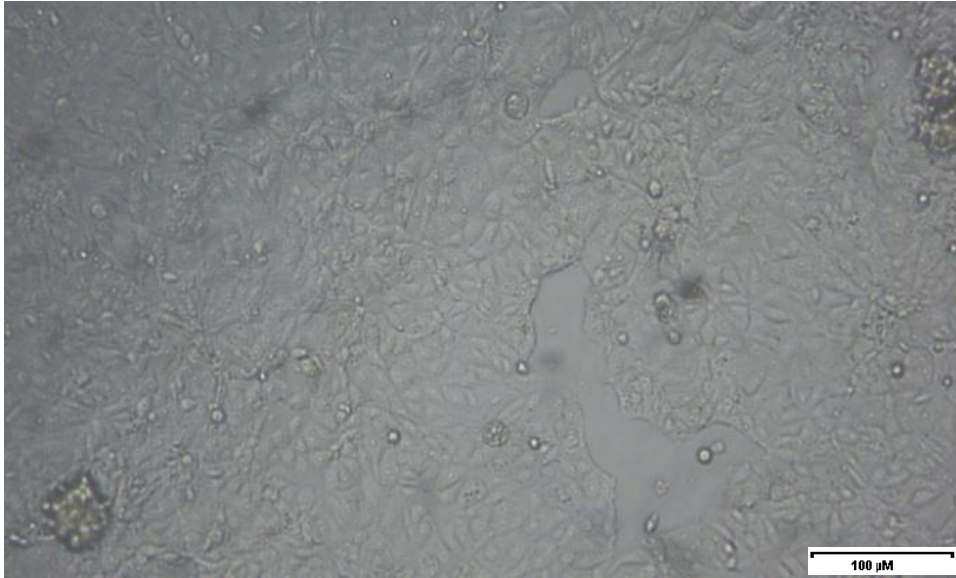
2.7. İstatistiksel Değerlendirmeler

İstatistiksel değerlendirmeler için SPSS16.0 programı kullanılmıştır. Elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değerleri; $p > 0,05$ fark yok, $p < 0,05^*$ fark var, $p < 0,01^{**}$ önemli derecede fark var, $p < 0,001^{***}$ çok önemli derecede fark var olarak değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

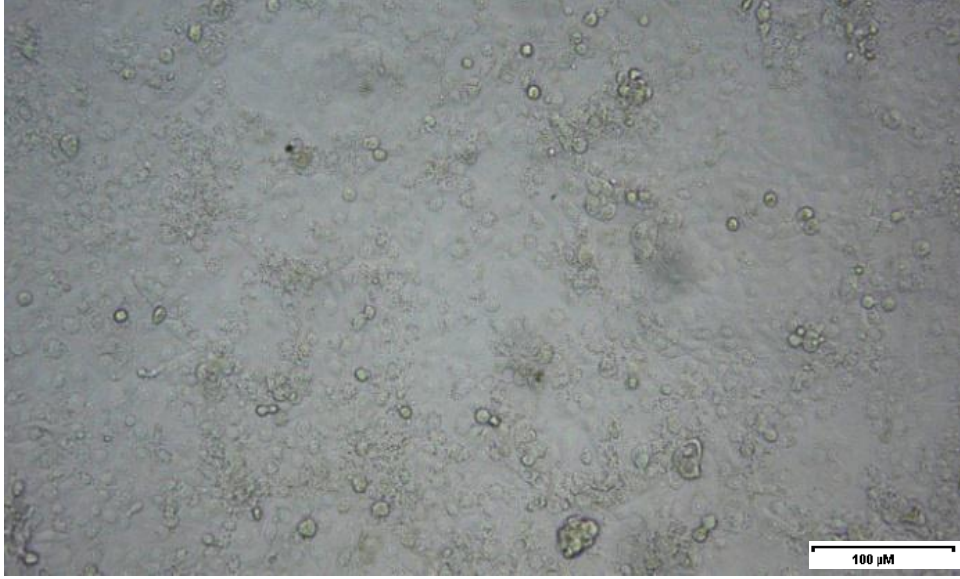
3.1. Deney Gruplarına Ait MCF7 Hücrelerinin İvert-Mikroskop Görüntüleri

Şekil 3.1, 3.2, 3.3.'de kontrol ve 25, 50, 75, 100 μ M fumagillin konsantrasyonları uygulanan MCF7 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonundaki morfolojik görüntüleri verilmiştir. Fumagillin konsantrasyon ve inkübasyon zamanı arttıkça hücre canlılığının ve proliferasyonunun azaldığı görülmektedir.

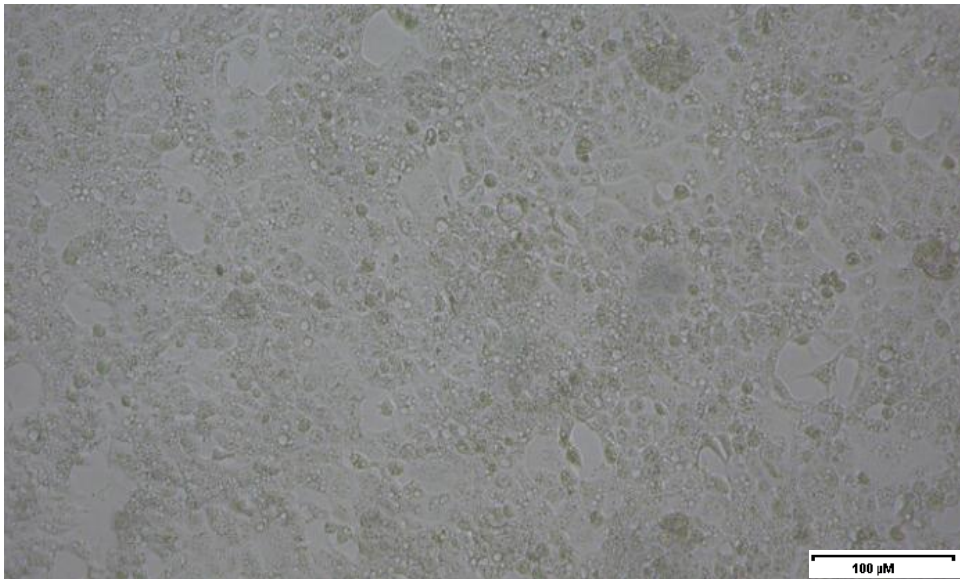


(a)

Şekil 3.1. Kontrol (a) grubuna uygulanan MCF7 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon sonundaki morfolojik görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi 40X)

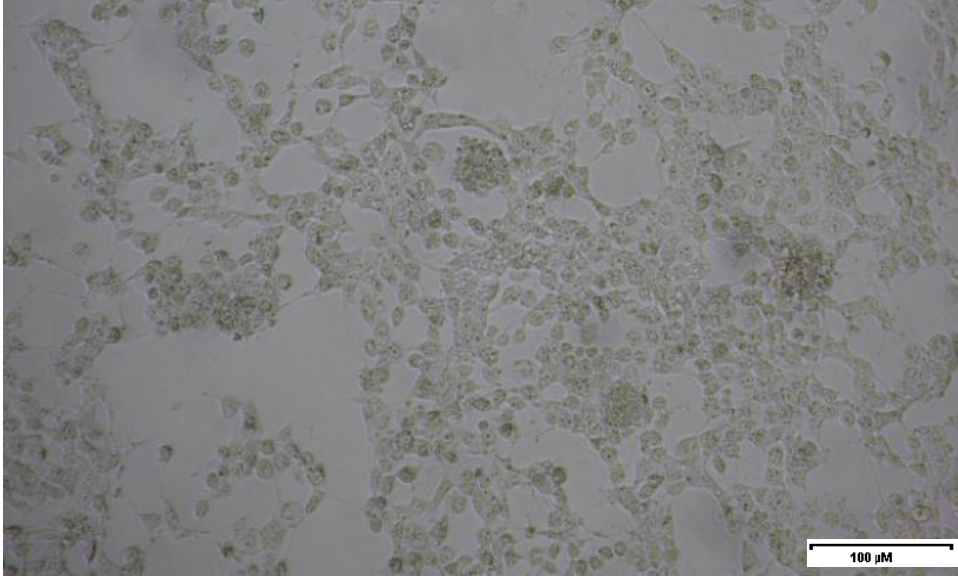


(b)

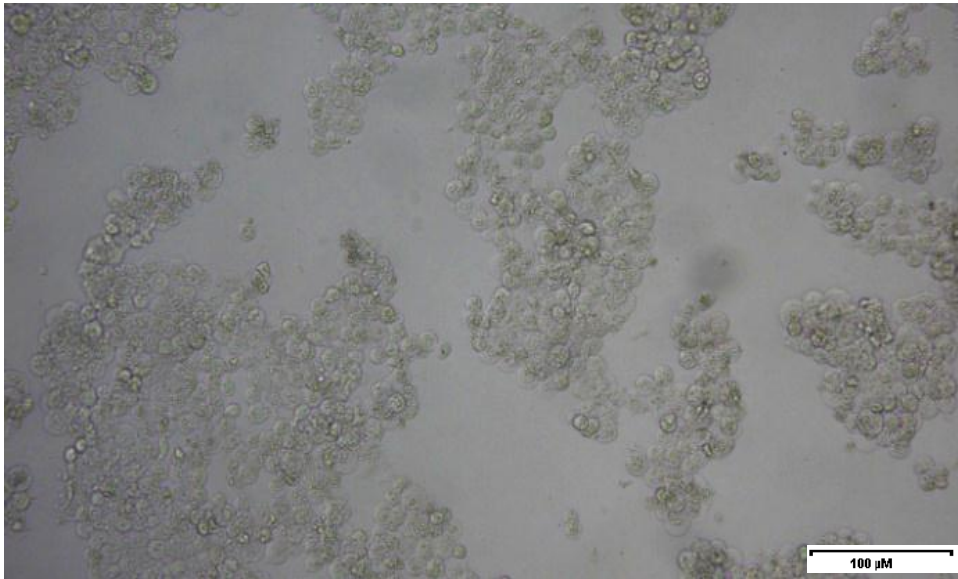


(c)

Şekil 3.1. (Devam) 25(b) ve 50 μM (c) fumagillinin konsantrasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon sonundaki morfolojik görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi 40X)

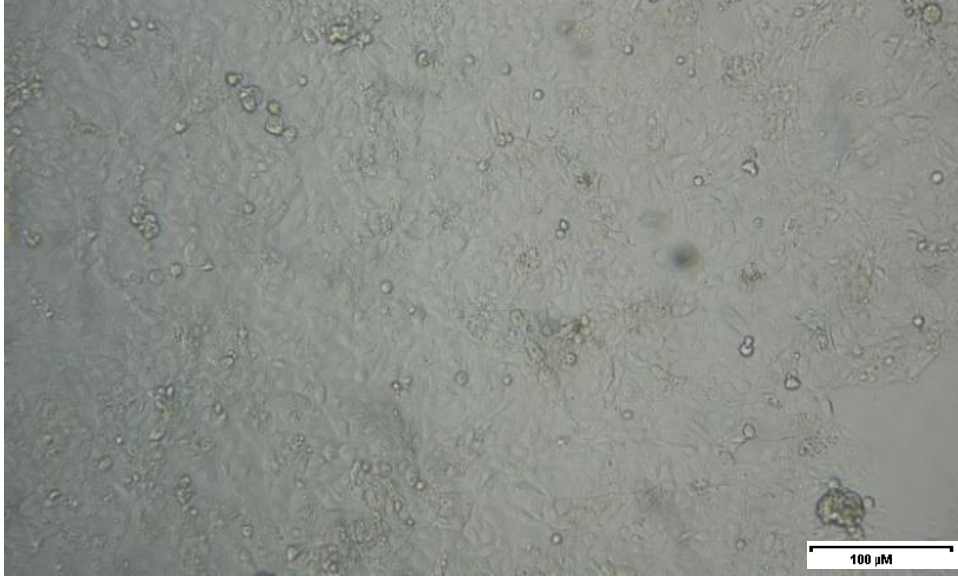


(d)

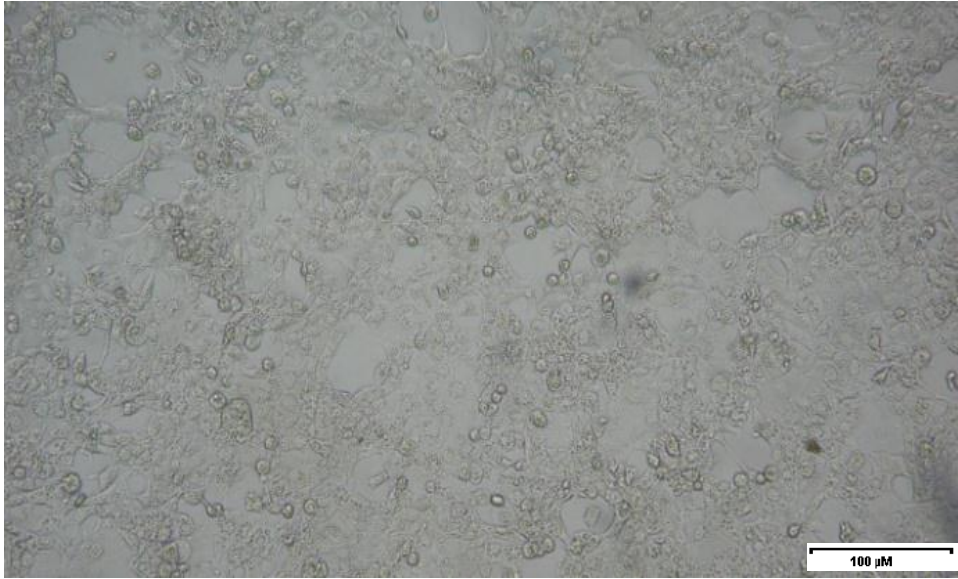


(e)

Şekil 3.1. (Devam) 75 (d) ve 100 μM (e) fumagillin konsantrasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon sonundaki morfolojik görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi 40X)

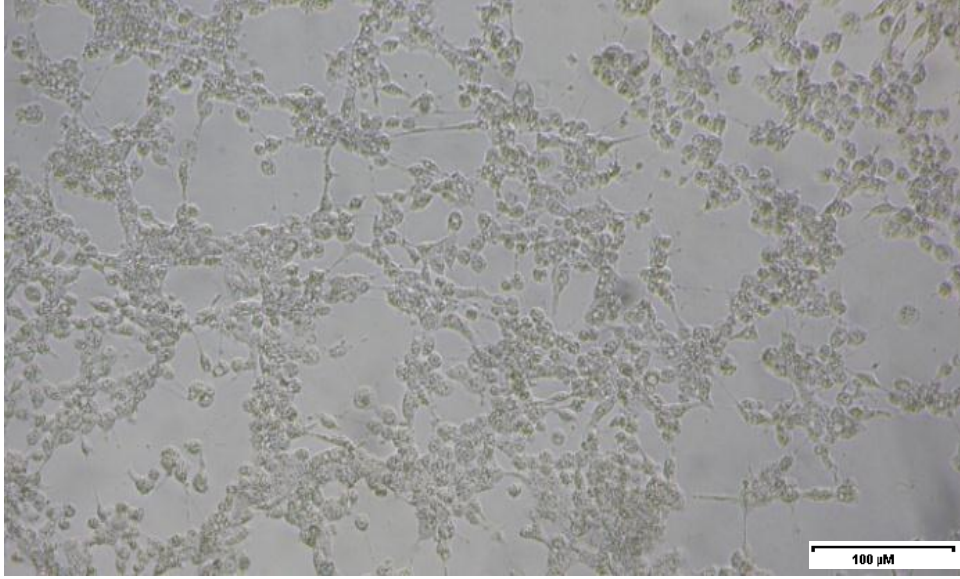


(a)

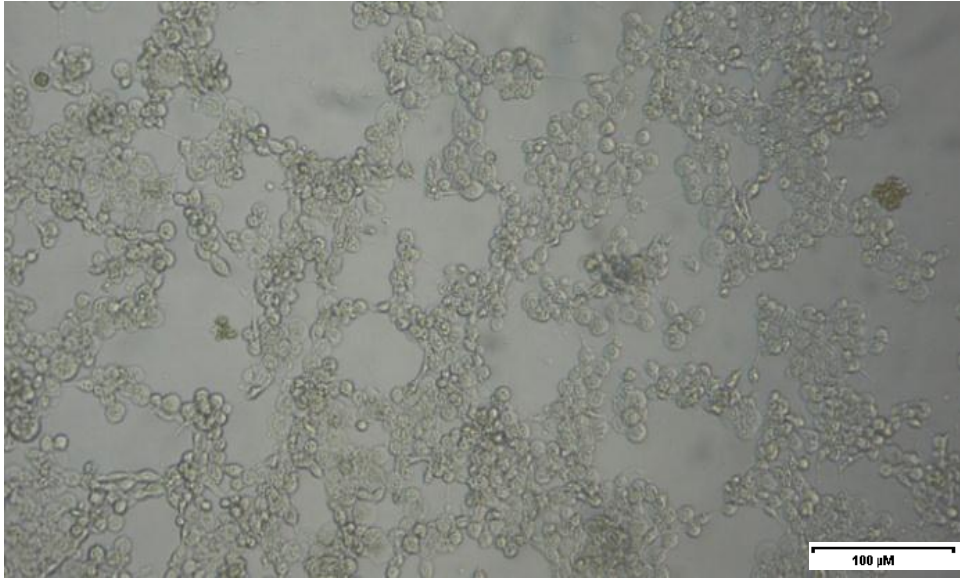


(b)

Şekil 3.2. Kontrol (a) ve 25 µM (b) fumagillinin konsantrasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon sonundaki morfolojik görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi 40X)

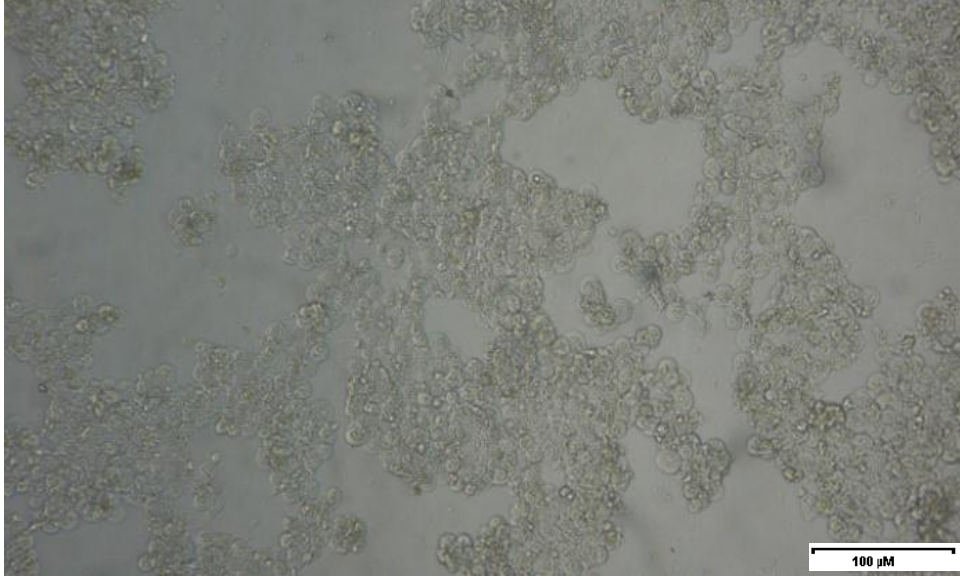


(c)



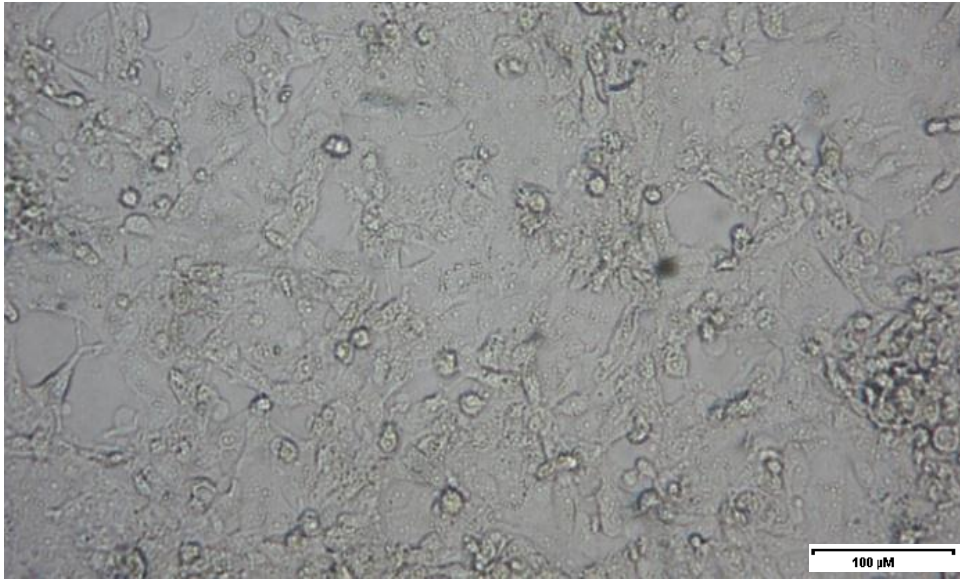
(d)

Şekil 3.2. (Devam) 50 (c) ve 75 μM (d) fumagillinin konsantrasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon sonundaki morfolojik görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi 40X)



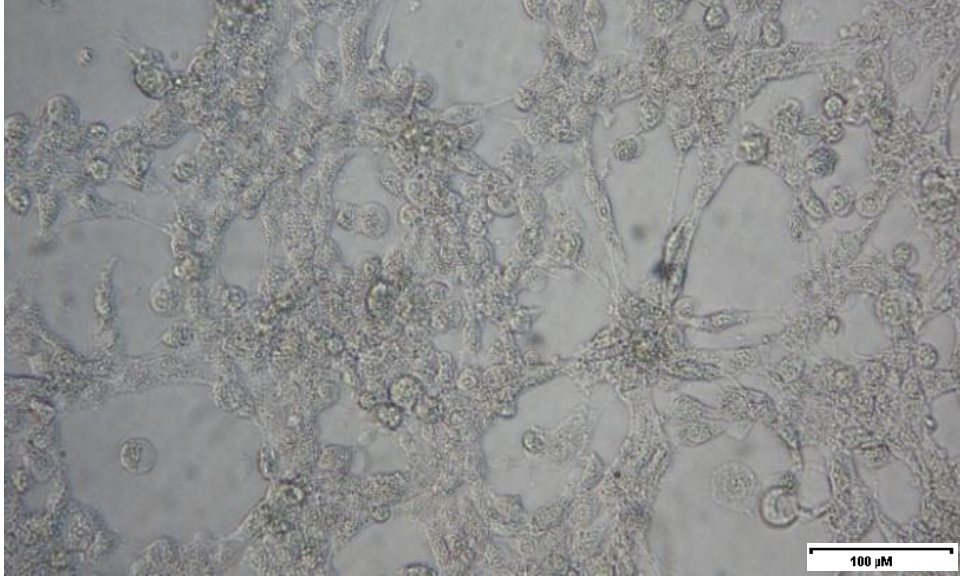
(e)

Şekil 3.2. (Devam) 100 μ M (e) fumagillin konsantrasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinin 48 saatlik inkübasyon sonundaki morfolojik görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi 40X)

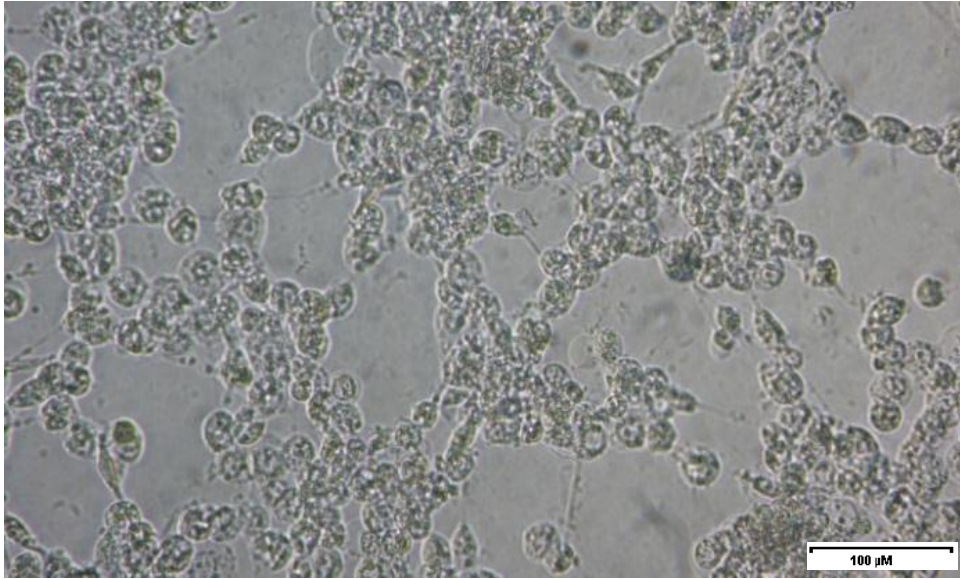


(a)

Şekil 3.3. Kontrol (a) grubu MCF7 hücrelerinin 72 saatlik inkübasyon sonundaki morfolojik görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi 40X)

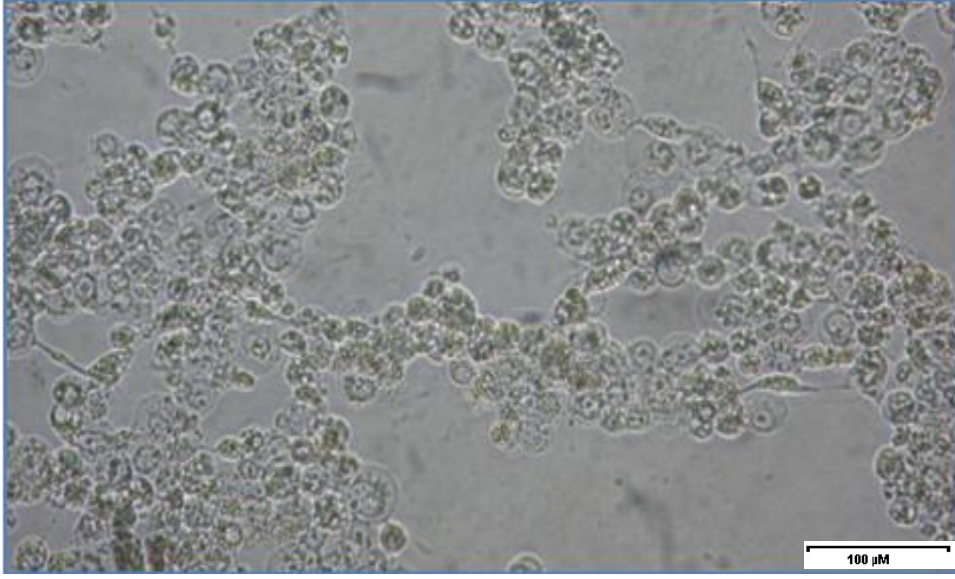


(b)

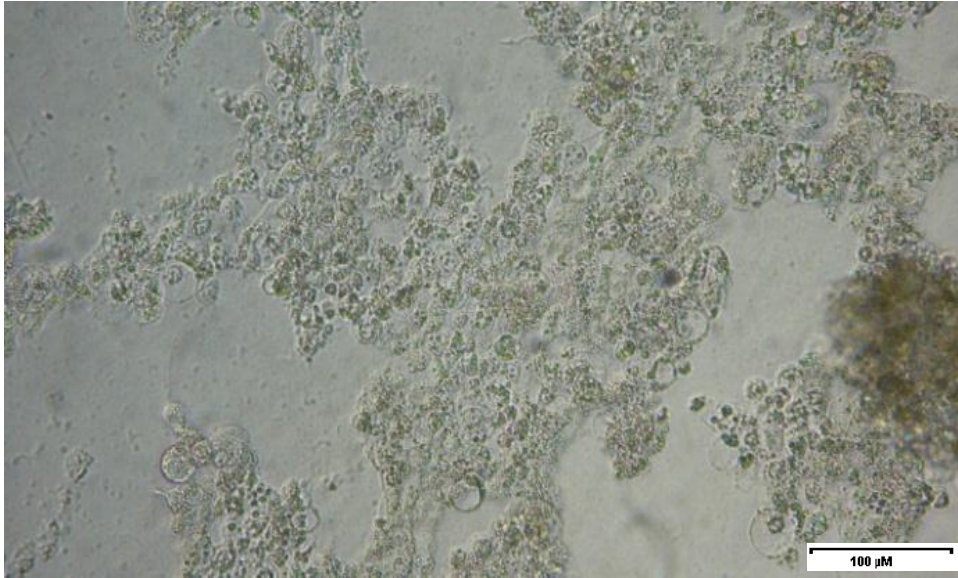


(c)

Şekil 3.3. (Devam) 25 (b) ve 50 μM (c) fumagillinin konsantrasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinin 72 saatlik inkübasyon sonundaki morfolojik görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi 40X)



(d)



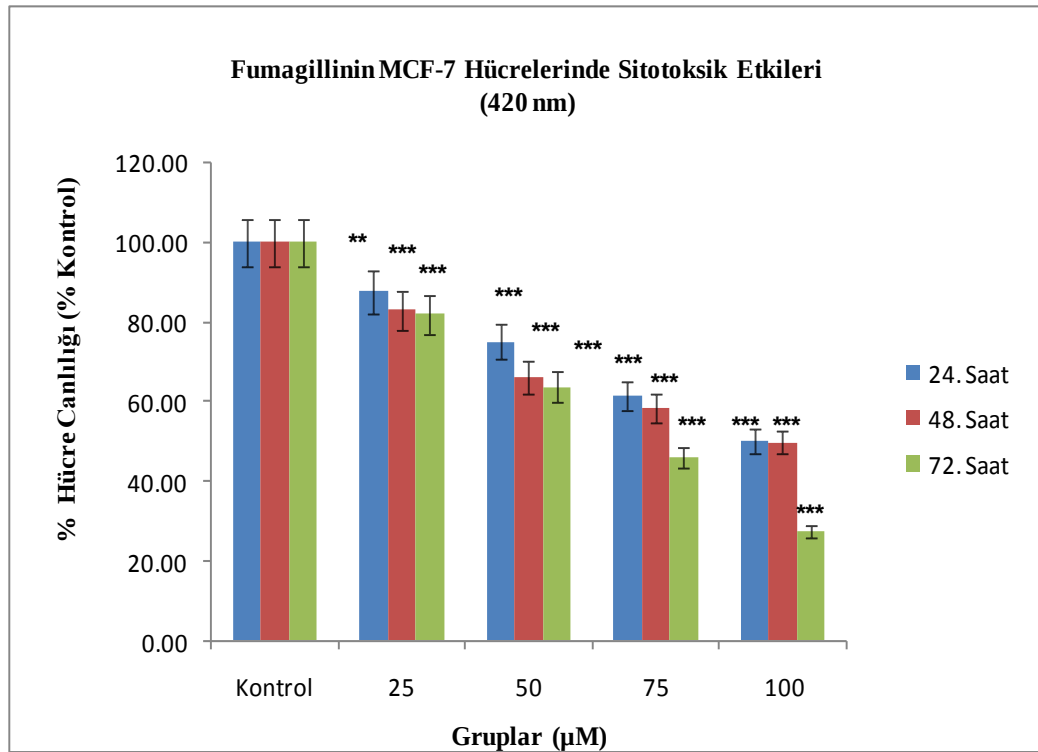
(e)

Şekil 3.3. (Devam) 75 (d) ve 100 µM (e) fumagillinin konsantrasyonu uygulanan MCF7 hücrelerinin 72 saatlik inkübasyon sonundaki morfolojik görüntüleri (Mikroskop Büyütmesi 40X)

3.2. Fumagillinin MCF7 Hücrelerinde Sitotoksik Etkisinin WST-1 Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Fumagillinin 25, 50, 75 ve 100 μ M konsantrasyonları uygulanan MCF7 hücreleri 24, 48 ve 72. saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Her bir inkübasyon sonunda fumagillinin MCF7 hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri WST-1 yöntemi ile belirlenmiştir. Kontrol ve 25, 50, 75, 100 μ M fumagillin gruplarına ait WST-1 (mitokondriyal absorbans) sonuçları ELİZA (Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Yöntemi) cihazında 420 nm dalga boyunda okutulmuştur. Daha sonra her bir gruba ait 24, 48 ve 72. saatlik % hücre canlılık değerleri hesaplanmıştır. Renk oluşumuna göre alınan absorbans değerleri, hücre canlılığı ile direkt olarak ilişkilendirilmektedir. Gruplara ait % canlılık değerleri sonuçları Şekil 3.4. ve Tablo 3.1' de verilmiştir.

Fumagillin konsantrasyonlarının MCF7 hücrelerinde, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak önemli sitotoksik etkileri belirlenmiştir. WST-1 analizi sonucunda, Şekil 3.4'de görüldüğü gibi fumagillin konsantrasyon ve inkübasyon artışına paralel olarak % hücre canlılık değerlerinde önemli derecede azalmalar görülmektedir ($p < 0.001^{***}$).



Şekil 3.4 Fumagillin Konsantrasyonlarının, MCF7 Hücre Dizisinde WST-1 Yöntemine Göre Hesaplanan 24, 48 ve 72. Saat % Canlılık Değerleri ve İstatistiksel olarak değerlendirilmesi (Ortalama $\pm$ Standart Sapma) (n=7) ($p < 0,01$ ** önemli derecede fark var, $p < 0,001$ *** çok önemli derecede fark var)

24 saatlik % hücre canlılık değeri kontrol grubuna göre 25, 50, 75 ve 100 µM fumagillin konsantrasyonlarında sırasıyla % 87.50, 75.07, 61.58 ve 50.00 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri, kontrol grubuna göre 25 µM fumagillin konsantrasyonunda $p < 0.01$ **, 50, 75 ve 100 µM konsantrasyonlarda da $p < 0.001$ *** belirlenmiştir.

48 saatlik % canlılık değeri kontrol grubuna göre 25, 50, 75 ve 100 µM fumagillin konsantrasyonlarında sırasıyla % 84.36, 66.81, 58.17 ve 49.87 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri, kontrol grubuna göre tüm fumagillin konsantrasyonunda $p < 0.001$ *** belirlenmiştir.

72 saatlik % canlılık değeri kontrol grubuna göre 25, 50, 75 ve 100 µM fumagillin konsantrasyonlarında sırasıyla % 81.88, 63.60, 45.93 ve 27.30 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri, kontrol grubuna göre tüm fumagillin konsantrasyonunda $p < 0.001$ *** belirlenmiştir.

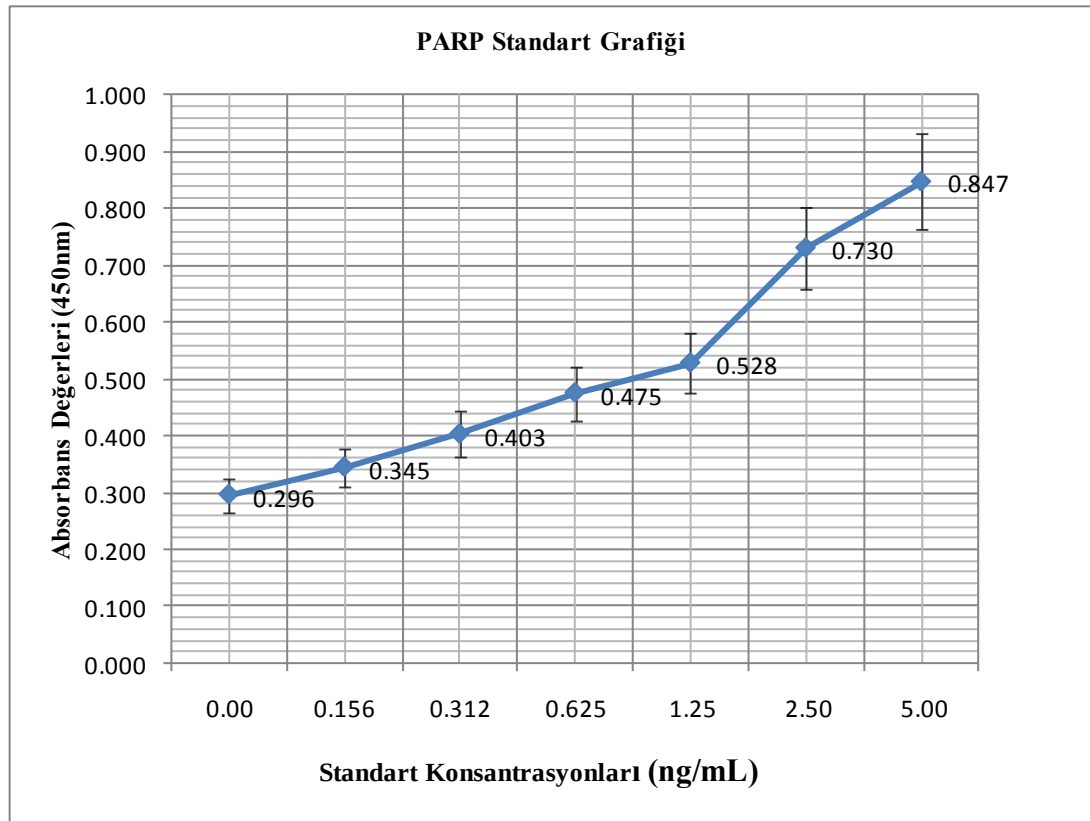
Tablo 3.1. Fumagillin konsantrasyonlarının, MCF7 hücre dizisinde WST-1 yöntemine göre hesaplanan % hücre canlılık değerleri (n=7)

% HÜCRE CANLILIK DEĞERLERİ (% Kontrol)			
GRUPLAR	24. Saat (Ort. $\pm$ St.Sapma)	48. Saat (Ort. $\pm$ St. Sapma)	72. Saat (Ort. $\pm$ St. Sapma)
Kontrol (% 0.1 DMSO)	100 $\pm$ 0.223	100 $\pm$ 0.256	100 $\pm$ 0.444
25 μM Fumagillin	87.5 $\pm$ 0.263	84.36 $\pm$ 0.292	81.88 $\pm$ 0.217
50 μM Fumagillin	75.07 $\pm$ 0.355	66.81 $\pm$ 0.483	63.6 $\pm$ 0.243
75 μM Fumagillin	61.58 $\pm$ 0.401	58.17 $\pm$ 0.366	45.93 $\pm$ 0.149
100 μM Fumagillin	50.00 $\pm$ 0.249	49.87 $\pm$ 0.490	27.30 $\pm$ 0.110

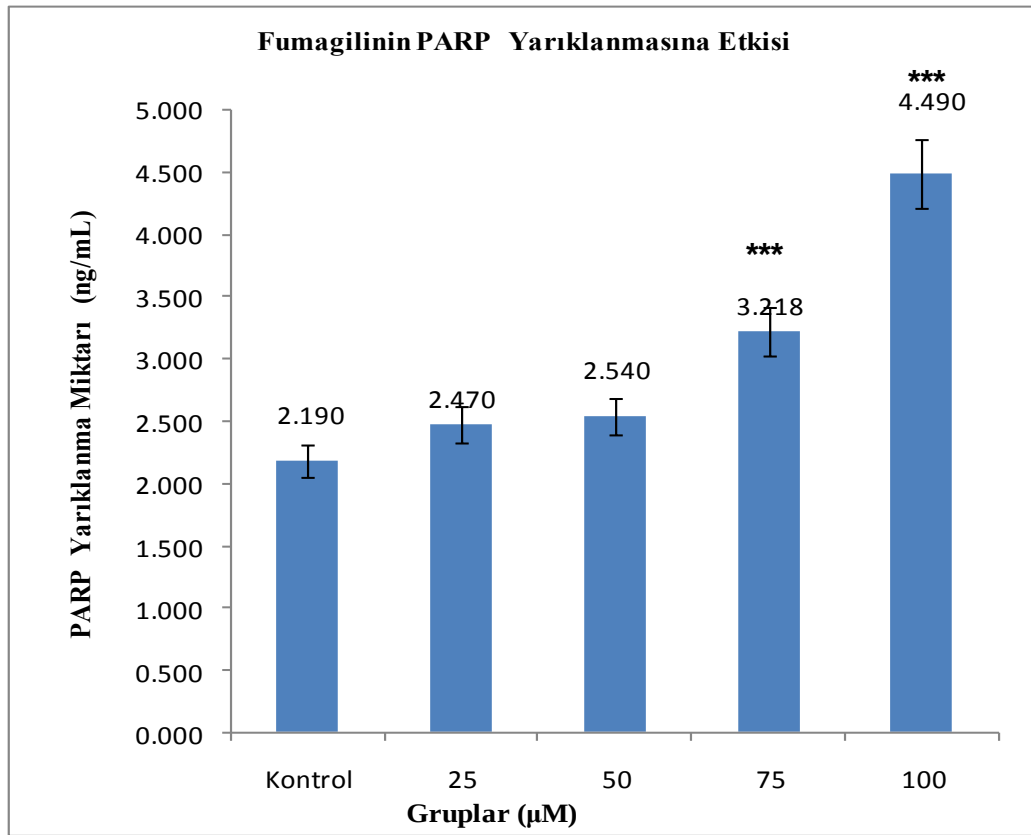
3.3. Fumagillinin MCF7 Hücrelerinde Apoptotik Etkisinin PARP Yarıklanma Miktarına Göre Değerlendirilmesi

Fumagillinin, apoptoz ile ilişkisini açıklamak için bu tez çalışmasında, farklı fumagillin konsantrasyonu uygulanan (25, 50, 75 ve 100 μ M) MCF7 hücre ekstraktlarında, PARP proteinin yarıklanma miktarları ELİZA yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. PARP yarıklanma miktarını belirlemek için önce kit içeriğinde bulunan belirli PARP standartları ile yöntemde detayı açıklanmış olan kit presedürüne göre çalışılmış ve bir standart eğri hazırlanmıştır (Şekil 3.5). Bu eğrinin hazırlanmasında kit içeriğinde yer alan ve PARP yarıklanması bilinen standartlar kullanılmıştır. Çalışmamız sonucunda standartlara ait okuduğumuz absorbans sonuçları ile kit içeriğinde verilen standartlara ait absorbans sonuçları karşılaştırılarak, çalışmanın doğruluğu belirlenmiştir. Daha sonra PARP yarıklanması bilinen standartlardan hazırlanan standart grafikten (Şekil 3.5),

fumagillin konsantrasyonları uygulanan MCF7 hücre ekstraktlarına ait örneklerin absorbanslarına karşılık gelen PARP yarıklanma miktarları hesaplanmıştır (Şekil 3.6). Fumagillin konsantrasyonlarının MCF7 hücreleriyle yapılan 24 saatlik inkübasyonu sonunda, konsantrasyona artışına bağlı olarak PARP yarıklanmasında artışın meydana geldiği belirlenmiştir. PARP yarıklanma miktarları, kontrol grubunda 2.19 ng/mL , fumagillin konsantrasyonunda (25, 50, 75 ve 100 μ M) da sırasıyla 2.47, 2.54, 3.22 ve 4.49 ng/mL olarak hesaplanmıştır. PARP yarıklanma miktarları bakımından istatistiksel anlamlılık değerleri, kontrol grubuna göre 25 ve 50 μ M fumagillin konsantrasyonunda $p>0,05$ iken, 75 μ M ve 100 μ M konsantrasyonlarda $p<0,001^{***}$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 3. 5. PARP standartlarının ELİZA da ölçülen absorbans değerleri (450 nm) ve PARP yarıklanma miktarları (ng/mL) (Ortalama $\pm$ Standart Sapma) (n=5)

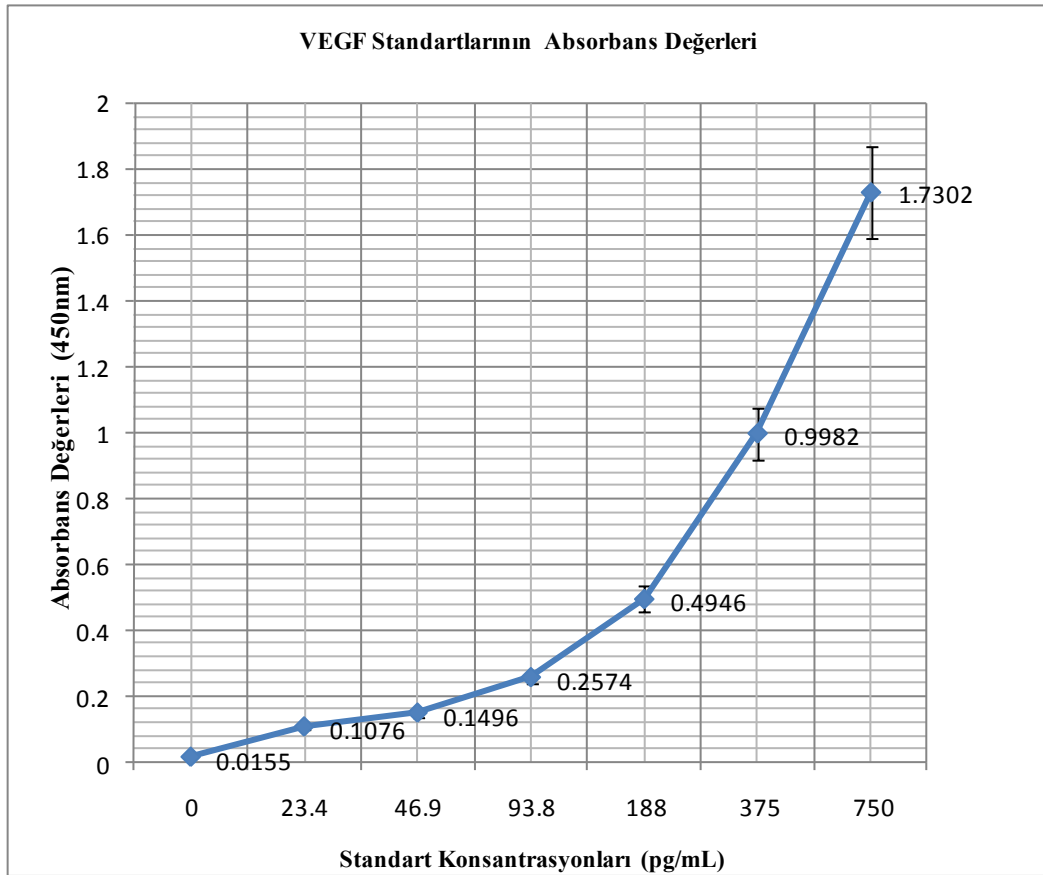


Şekil 3.6. Fumagillin konsantrasyonlarının MCF7 hücre dizisi üzerinde PARP yarıklanmasına etkisi (ELİZA da ölçülen absorbens değerleri (450 nm) ne karşılık gelen PARP yarıklanma miktarları (ng/mL) (Ortalama $\pm$ Standart Sapma) (n=5) ($p < 0,001$ *** :çok önemli derecede fark var)

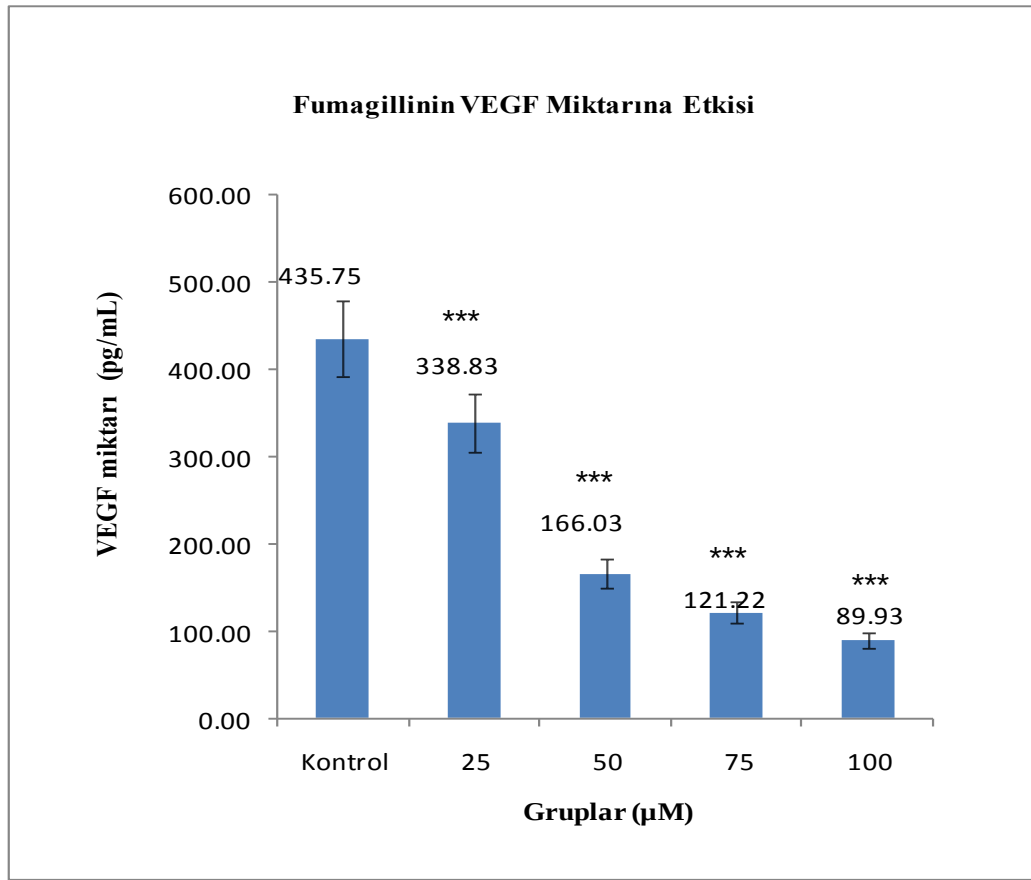
3.4. Fumagillinin MCF7 Hücrelerinde Antianjiojenik Etkisinin VEGF Miktarına Göre Değerlendirilmesi

Fumagillinin, anjiyojenez ile ilişkisini açıklamak için bu tez çalışmasında, farklı fumagillin konsantrasyonu içeren (25, 50, 75 ve 100 μ M) MCF7 hücre süpernatantında VEGF miktarları ELİZA yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. VEGF miktarını belirlemek için önce belirli VEGF standartlarına göre bir standart eğri hazırlanmıştır (Şekil 3.7). Bu eğrinin hazırlanmasında kit içeriğinde yer alan ve VEGF miktarı bilinen standartlar kullanılmıştır. Çalışmamız sonucunda standartlara ait okuduğumuz absorbens sonuçları ile kit içeriğinde verilen

standartlara ait absorbans sonuçları karşılaştırılarak, çalışmanın doğruluğu belirlenmiştir. Daha sonra VEGF miktarı bilinen standartlardan hazırlanan grafikten, fumagillin konsantrasyonları uygulanan MCF7 hücre ekstraktlarına ait örneklerin absorbanslarına karşılık gelen VEGF miktarları hesaplanmıştır (Şekil 3.8). Fumagillin konsantrasyonlarının MCF7 hücrelerinde 24 saatlik inkübasyonu sonunda, konsantrasyona ve zamana bağlı olarak VEGF miktarında azalma olduğu belirlenmiştir. VEGF miktarları, kontrol grubunda 435.75 pg/mL, fumagillin konsantrasyonlarında (25, 50, 75 ve 100 μ M) da sırasıyla 338.83, 166.03, 121.22 ve 89.93 pg/mL olarak hesaplanmıştır. VEGF azalma miktarları bakımından istatistiksel anlamlılık değerleri, kontrole grubuna göre tüm gruplarda $p<0,001^{***}$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.7. VEGF standartlarının ELİZA da ölçülen absorbans değerleri (450 nm) ve VEGF miktarları (pg/mL) (Ortalama $\pm$ Standart Sapma) (n=5)



Şekil 3. 8. Fumagillinin konsantrasyonlarının MCF7 hücre dizisi üzerinde VEGF miktarına etkisi (ELİZA da ölçülen absorbens değerlerine (450 nm) karşılık gelen VEGF miktarları (pg/mL) (Ortalama $\pm$ Standart Sapma) (n=5) ($p < 0,001$ *** : çok önemli derecede fark var)

4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması, *in vitro* deneyler içeren bir hücre kültürü çalışmasıdır. Hücre kültürü yöntemleri deney hayvanı kullanılan yöntemlerine göre, kullanılan maddenin etkisini kısa sürede ve doğrudan doğruya göstermektedir. Hücre kültür çalışmalarında, hayvan deneyleri gibi etik kurul gereksinimi olmaksızın çok fazla sayıda hücrenin kullanımı söz konusu olduğundan dünya genelinde çok yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu nedenle moleküler biyoloji çalışmaları, kanser araştırmaları, sitogenetik, biyokimya, kök hücre çalışmalarında sık sık kullanılmaktadır (Gad, 2000; Putnam, 2002).

In vitro sitotoksitite testleri, toksik kimyasalların hücrelerin temel fonksiyonlarını nasıl ve ne kadar etkilediği temeline dayanmaktadır. Ölçümler hücresel zararın değerlendirilmesine göre yapılmaktadır. Bu testlerin geliştirilmesi, birçok bileşiğin toksik etkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır (Barile ve ark. 1994; Davila ve ark. 1990; Todd ve ark. 1999). Kültüre edilen hücreler kullanılarak yapılan *in vitro* çalışmaları, bileşiklerin toksisitesinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Monteiro-Riviere ve ark. 2009). Bu tür çalışmalarda, kültür edilmiş hücrelerde sitotoksiteyi belirlemek için çeşitli testler kullanılmaktadır. Bunlar, membranın bütünlüğünü değerlendirerek hücre canlılığının belirlenmesini sağlayan MTT, XTT ve WST-1 vb. testleridir (Işık, 2010, Monteiro-Riviere ve ark. 2009). MTT, Nötral Red ve WST-1 testleri en fazla kullanılan yöntemler arasındadır (Fotakis ve Timbrell, 2005; Kroll ve ark. 2009).

Çalışmamıza ait, Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3'deki mikroskopik görüntüler ve Şekil 3.4 ve Tablo 3.1 incelendiğinde, MCF7 hücreleri üzerine fumagillinin uygulanmasından sonra, artan konsantrasyonlarına bağlı olarak, MCF7 hücrelerinin canlılığında önemli azalmalar görülmüştür.

Bu tez çalışmasında, fumagillinin sitotoksik etkileri, WST-1 yöntemi kullanılarak araştırılmış ve fumagillinin zaman ve konsantrasyona bağımlı olarak insan MCF7 meme kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkiler meydana getirdiği belirlenmiştir. WST-1 absorbans sonuçları kullanılarak, kontrol grubuna göre, her bir grubun % hücre canlılık değerleri hesaplanmıştır. 25 ve 50 μ M fumagillin

konsantrasyonları arasında inkübasyon zamanına göre % hücre canlılık değerlerindeki azalma çok önemli olmasa da, her bir inkübasyon süresi içinde kontrole göre, 25 ve 50 μM fumagillin konsantrasyonlarındaki % hücre canlılık değerindeki azalmalar önem taşımaktadır (Şekil 3.4). Fumagillin konsantrasyon miktarı arttıkça sitotoksik etkinin de doğru orantılı olarak arttığı, ancak 75 ve 100 μM 'lik konsantrasyonlarda önemli derecede bir hücre ölümünün gerçekleştiği görülmektedir. 48 ve 72. saatlerde de sitotoksik etkinin 50, 75 ve 100 μM fumagillin konsantrasyonlarında önemli düzeyde artmış olduğu dikkati çekmektedir. Özellikle 24. saatte kontrole göre % hücre canlılığının, 75 ve 100 μM fumagillin konsantrasyonunda sırasıyla % 61.58 ve 50.00, 48. saatte % 58.17 ve 49.87 ve 72. saatte de % 45.93 ve 27.30 olarak bulunmuştur.

Bizim bulgularımıza paralel olarak, fumagillinin ve analoglarının farklı kanser hücreleri üzerine anti kanserojen etkilerinin araştırıldığı farklı çalışmalar mevcuttur. Stevanovic ve ark. (2008), fumagillinin sitotoksik etkisini insan periferik kan lenfositleri üzerinde incelemişler ve değerlendirmek için mitotik indeks, proliferasyon indeksi ve hücre bölünme indeksini hesaplamışlardır. Bunun için fumagillinin beş konsantrasyonunu (0.34, 0.68, 1.02, 3.07 ve 9.20 $\mu\text{g/mL}$) kullanmışlardır. Sonuç olarak, hücreler üzerinde kullanılan en yüksek üç konsantrasyonun sitotoksik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Miller ve ark. (2004), fumagillin ile HUVEC hücreleri üzerinde, hücre proliferasyonunu belirlemek için yapmış olduğu bir çalışmada XTT metodunu kullanmışlardır. Sonuçta fumagillinin hücreler üzerinde önemli derecede proliferasyonu azalttığını göstermişlerdir.

Hotz ve ark. (2001), anjiyojenez inhibitörü olan fumagillinin analogu TNP-470 ile HUVEC hücreleri üzerinde *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarında, TNP-470'in 1 pg/mL 'den 100 $\mu\text{g/mL}$ 'ye kadar konsantrasyonlarını kullanmışlardır. Hücre proliferasyonunu değerlendirmek için MTT sitotoksitite yöntemini kullanmışlardır. 100 $\mu\text{g/mL}$ 'de HUVEC hücre proliferasyonunun önemli derecede azaldığı görülmüştür.

Yamamoto ve ark. (1999), farklı insan meme kanser hücreleri üzerinde (MDA-MB-231, T-47D, MCF7, KPL-1 ve MKL-F), eikosapentaenoik asit (EPA) ve TNP-470 ile kanser hücrelerinin büyümesini araştırmak için yapmış olduğu

çalışmada, EPA ve TNP-470'nin yaklaşık 1µg/mL konsantrasyonda bağımsız olarak bütün hücre türlerinde hücre büyümesini engellediği, birlikte etkisinin ise daha yüksek konsantrasyonlara kaydığını MTT testi yaparak rapor etmişlerdir.

Lin Xia ve ark. (1997), fumagillol (0.01, 0.1, 1, 10, 50 ve 100 µg/mL) ile hepatoselüler karsinoma (HCC) hücreleriyle yapmış olduğu MTT sitotoksitite testi sonucunda, 43 µg/mL'nin fumagillin inhibitör konsantrasyon olarak belirlemişlerdir.

Ueda ve ark. (1999), antianjiyogenik ajan olan TNP-470 (0, 5, 10 ve 50 µg/mL) ile SCC hücreleri üzerinde anti tümör etkisini araştırmak üzere yapmış olduğu MTT testinde, inhibitör konsantrasyonunu (IC₅₀) 3-10 µg/mL olarak belirlenmiştir. Ayrıca artan konsantrasyona bağlı olarak tümör büyümesinde önemli derecede azalma olduğu gözlemlenmiştir.

Hou ve ark. (2009), yaptıkları bir çalışmada fumagillinin farelerde, tümör ağırlığı, mikro damar yoğunluğu ve pulmoner metastatik odak sayısı üzerine etkileri ile insan göbek endotel hücreleri üzerinde siklin E2, ICAM-1 (aktifleşmiş lökosit hücre adezyon molekülü) ve ALCAM (hücreler arası adezyon molekülü) gen ekspresyonları üzerine etkilerini araştırmışlardır. Sonuç olarak fumagillin verilmiş farelerde daha küçük tümör kütlesi ile akciğerde daha az metastaz olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, HUVEC (insan göbek endotel hücresi) hücreleri üzerinde fumagillinin (0.1mg/kg), *in vitro* hücre proliferasyonunda ve tüp formasyon oluşumlarında azalma meydana getirdiğini açıklamışlardır.

Pyun ve ark. (2004), fumagillinin analogu olan TNP-470'i MetAP-2 inhibitörü olarak kullandıkları bir çalışmada, HUVEC hücrelerinde fumagillinin antianjiyogenik etki gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Sasaki ve ark. (1998), TNP-470'in kemik metastazı üzerindeki etkisini, nude farelerde intrakardiyak enjekte ederek insan meme kanseri hücre dizisinde MDA-MB-231 (MDA-231) incelemişlerdir. Bir aylık sürede haftada üç kez 30 mg/kg TNP-470 uyguladıktan sonra osteolitik kemik metastazını azalttığını gözlemlemişlerdir.

Didier (1997)'de fumagillin, albendazol ve TNP-470 ile yaptığı *in vitro* çalışmada, *E. intestinalis* ve *Vittaforma corneae* üzerindeki antiparazitlik etkilerini MTT sitotoksitite testi kullanarak araştırmış ve sonuçta IC₅₀ TNP-470'in

0.35-0.38, fumagillinin 0.515-0.81 ve albendazolün ise 8.0 ng/mL olarak bulunmuştur.

Yasukawa ve ark. (1999) TNP-470-PVA konjugatının, endotel hücre proliferasyonuna etkisini araştırmak üzere yapmış olduğu bir çalışmada, XTT metodunu kullanmış ve HUVEC hücrelerinin çoğalmasını önemli derecede inhibe ettiğini açıklamışlardır.

Bizim çalışmamızda MCF7 hücrelerinde fumagillin konsantrasyonlarının apoptotik etkileri PARP yarıklanma miktarları ölçülerek araştırılmıştır. Bu nedenle önce, PARP standartlarına karşılık absorbans değerlerinden standart grafiği oluşturulmuş (Şekil 3.5) ve bu grafikten yararlanarak fumagillin konsantrasyonlarının PARP absorbans değerlerine karşılık gelen PARP yarıklanma miktarları hesaplanmıştır (Şekil 3.6). WST-1 bulgularımızla da uyumlu olarak, fumagillin; konsantrasyonuna bağlı olarak hücreler üzerinde apoptotik etki yaptığı belirlenmiştir. Kontrole göre 25, 50, 75 ve 100 μ M'lik konsantrasyonlarda PARP yarıklanma miktarının belirgin derece artmış olduğu görülmüştür. Yapılan literatür taramasına göre, fumagillinin MCF7 hücreleri üzerinde PARP yarıklanmasının ELİZA yöntemi kullanılarak araştırıldığı benzer bir çalışma mevcut değildir.

Apoptoz sırasında DNA parçalanmaktadır. Apoptoz sırasında kaspaz-7 ve kaspaz-3, PARP'ı iki parçaya ayırmaktadır. Bunlar p89 kDa'luk katalitik otomodifikasyon bölgesi ve p24 kDa'luk DNA bağlanma bölgesidir. Bu ayrılma, DNA bağlanma bölgesini katalitik bölgeden ayırırlar, sonuçta enzim inaktif hale gelmektedir ve yarıklanmış olan parçalar PARP aktivitesini bastırmaktadırlar (Smulson ve ark. 1998; Vrag ve Szabo 2002; Tewari ve ark. 1995; Germain ve ark. 1999; Lazebnik ve ark. 1994; Kim ve ark. 2000) PARP inaktivasyonu apoptozun düzenli bir şekilde işlemesi için çok önemli bir rol üstlenmektedir. PARP yarıklanması, DNA parçalanması sayesinde PARP'ın aktivasyonunu engellemektedir. Bu da apoptozdaki ATP' ye duyarlı adımlarda hücresel enerjinin korunmasını sağlamaktadır.

Literatür bilgileri incelendiğinde, PARP'ın apoptozda rol aldığı, yarıklanmasının DNA tamir enzimlerinin çalışmasını engellediğinden, PARP'ın da aktivasyonunu engelleyerek apoptozu artırdığı görülmektedir. Kim ve ark.

(2000), PARP'ın C-terminal ucunun biyokimyasal rolünü HeLa hücrelerinde UV - aracılı apoptozla incelemişlerdir. Sonuçlar PARP'ın bu kısmının PARP homodimerizasyonunu blokladığı ve hücrel aktivitesini engellediği, PARP'ın hücrel aktivitesinin bloklanması sonucunda, hücrel NAD^+ indirgenmesi ve uyarılmasının engellendiğini göstermişlerdir. Tentori ve ark. (2002), PARP'ın DNA tamiri sırasında hafif hasarlı DNA onarımında görev aldığını, DNA hasarının büyük olduğu durumlarda ise PARP-1'in aktivasyonu hücre ölümü sırasındaki NAD^+/ATP tüketimini artırdığını ve nekroza neden olduğunu belirtmişlerdir. PARP-1'in aşırı aktivitesi; felç, miyokard enfarktüsü gibi birçok klinik durumda ortaya çıktığı ve bu yüzden PARP-1'in kemoterapide antitümör amacıyla potansiyel hedef olarak kullanıldığı belirtilmektedir.

Smulson ve ark. (1998) apoptoz sırasında DNA'daki PARP'ın p24 ve p89 proteinlerine yarıklanmasından faydalanan PARP'ın kaspaz-3 tarafından parçalanın 24 kDa'luk parçasının DNA onarım enzimlerini bloklayarak DNA'nın onarımını engellediğini göstermişlerdir.

Pink ve ark. (2000)'de b-Lapakon (b-lap) ile MCF7 ve T47D hücre dizilerinde yapmış olduğu bir çalışmada düşük konsantrasyonlarda, PARP yarıklanması görülmezken konsantrasyona bağımlı olarak PARP yarıklanma miktarının ve dolayısıyla da apoptozun arttığını açıklamışlardır.

Benjamin ve ark. (1999) MCF7 hücreleri üzerinde etoposidin kaspazları aktive edip etmediğini araştırdıkları çalışmada, sonuç olarak kullanılan maddenin 100 μM 'ının kaspazları aktive ettiğı, DNA hasarının endojen kaspaz substratları tarafından uyarıldığını doğrulamak için de PARP yarıklanmasını görüntülemişlerdir. PARP yarıklanma ürünlerini 10 μM konsantrasyona kadar Western Blot yöntemiyle göstermişlerdir.

Jo ve ark. (2004) licorice kökünün, MCF7 hücreleri üzerinde zaman ve konsantrasyona bağılı olarak hücrelerin proliferasyonunu azalttığını ve DNA parçalanmasına neden olduğunu göstermişlerdir. Western Blot analizi sonucunda apoptoz sırasında *Bax* ve *Bcl* gen ekspresyonları ve PARP yarıklanma miktarının anlamlı olduğunu rapor etmişlerdir.

Li ve ark. (2006), resveratrol ile MCF7 hücrelerinde yapmış olduğu çalışmada PARP'ın yarıklandığı ve apoptozu 0-24 saat arası 200 µg/mL konsantrasyonda önemli düzeyde arttırdığını göstermişlerdir.

Tümör anjiyogenezi, kanser tedavisi için yeni hedefler oluşturmaktadır. Çünkü anjiyogenезin bastırılması gerekli besin ve oksijenin engellenmesiyle sağlanmaktadır. Antianjiyogenik tedavilerde, genelde anti kanser ilaçlarda görülen toksite kaynaklı yan etkilerin olmadığı düşünülmektedir ve aynı zamanda bu tedaviler sadece primer tümörleri yok etmekle kalmayıp, tümör metastazını da baskılamaktadırlar (Shimizu ve Oku, 2004).

Tümör tarafından üretilmiş anjiyogenik faktörlerin toplu etkisine karşı kullanılabilecek alternatif bir yöntem de anjiyogeneز inhibitörleridir. Bu inhibitörler fumagillinin sentetik türevleri gibi sentetik endotel hücre proliferasyon inhibitörleri veya endojen anjiyogeneز inhibitörleri olabilirler (Hayes ve ark. 1999).

Tümör gelişiminde damar gelişimini birçok faktörün sağlama ihtimali olmasına rağmen, VEGF; damar gelişimini sağlayan en iyi endojen aday olarak görülmektedir. VEGF ve VEGF reseptörlerinin tümör anjiyogeneزinde rol aldığıyla ilişkili olarak, farklı tümör çeşidinde VEGF ve VEGF reseptörlerinin ekspresyonu ile açıklanan birçok çalışma mevcuttur (Ferrara ve ark. 1991; Warren ve ark. 1993)

Aspergillus fumigatus antianjiyogenik etki potansiyeli olan birçok sekonder metabolit üretmektedir. Bunlardan en iyi çalışılmış olanı fumagillindir. Fumagillin vasküler endotel büyüme faktörünü azaltıcı etki göstermektedir (Kontoyiannis, 2010).

Bir fungal metabolit olan fumagillin yeni kan damarı oluşumunu baskılamaktadır. Sentetik analogu TNP-470 ve fumagillol, antikanser ajan olarak klinik deneme aşamasındadır. Fumagillinin spesifik moleküler hedefi MetAp-2'dir ve bu özellik genetiği değiştirilmiş mantar türleriyle de doğrulanmıştır. Fumagillin analoglarının *in vitro* olarak MetAp-2'yi inhibe etme özelliği; MetAp-2'nin fumagillin temelli terapötik ajanların hedefi olduğunu göstermektedir (Liu ve ark. 1998).

Bizim çalışmamızda, çeşitli konsantrasyonlardaki fumagillin dozları ile muamele edilmiş MCF7 hücre süpernatantlarında, fumagillin konsantrasyonu arttıkça VEGF miktarının da önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Bu bulgumuz fumagillinin MCF7 meme kanser hücreleri için antianjiyojenik bir ajan olduğunu göstermektedir.

Singh ve ark. (1998), JYG-A, JYG-B, DD-762, BALB/c-MC, KPL-1, MDA-MB-231 ve MKL-F meme kanseri hücre dizilerinde yapmış olduğu bir çalışmada fumagillinin analoğu olan fumagillol'ün, metastatik ve anti tümör aktivitesini değerlendirmişlerdir. Konsantrasyona bağımlı olarak tümör büyümesinin baskılandığı ve metastazın kontrole göre azaldığı görülmüş ve TNP-470'in meme kanser tedavisinde alternatif antikanserojen ilaç olarak kullanılabileceği açıklanmıştır.

Fujimoto ve ark. (1994), fumagillolün neovaskularizasyon, metastaz ve invazyondaki etkisini fibroblast büyüme faktör ekspresyonu ve mRNA ekspresyonunu, endometrial kanser hücrelerinde araştırmış ve fumagillolün tedavilerde etkili olabileceğini belirtilmiştir.

Yoshida ve ark. (1998), TNP-470 ile karaciğer kanserli fareler üzerinde yapmış olduğu *in vivo* çalışmada mikro damarlanmanın azaldığı, TNP-470'in tümör büyümesi, göçünü ve vasküler endotel büyüme faktörü üretimini engellediği ifade edilmiş ve apoptozu uyardığı belirtilmiştir.

Kawano ve ark. (2001), KB (insan kafa ve boyun karsinom hücre dizisi) hücrelerinde TNP470 ve anti-IL-8 (interlokin) ile kombine tedavi uyguladıkları bir çalışmalarında, hücre proliferasyonunun azaldığını göstermişlerdir. Fareler üzerinde yaptıkları çalışmada da, kontrol grubuna göre tümör hacminin önemli derece azaldığını rapor etmişlerdir.

Connolly, (1991); yaptığı bir çalışmada *in situ* hibridizasyon yöntemiyle VEGF mRNA'sının birçok doku ve organda yayılmasını inceleyerek, VEGF'in vasküler endotel hücrelerinin büyümesinde çok önemli rol üstlendiğini açıklamışlardır.

Plate ve ark. (1992), endotel hücre spesifik mitojeni olan VEGF'in ekspresyonu, astrostroma hücreleri tarafından uyarılmıştır fakat glioblastoma hücrelerinin farklı alt dizilerinde yeniden düzenlenmiştir. VEGF, normal beyin

hücresinde sentezlenmezken; *in vivo* tümör endotel hücrelerinde sentezlendiği gözlemlenmiştir ve VEGF'in tümör anjiyogenezinde potansiyel anjiyogenez faktörü olduğunu göstermişlerdir.

Sonuç olarak biz bu çalışmada, fumagillinin konsantrasyon ve inkübasyon süresine bağımlı olarak, MCF7 hücrelerinde önemli düzeyde sitotoksik, apoptotik ve antianjiyogenik etki yaptığını gösterdik. Bu tez çalışması, fumagillinin MCF7 hücreleri üzerindeki WST-1 yöntemi ile sitotoksik etkisinin olduğunu, apoptoz ile ilişkili olarak PARP yarıklanma miktarındaki artışı ve anjiyogenez ile ilişkili olarak VEGF miktarında azalmayı açıkladığı için; fumagillinin antikanserojenik etkisini göstermek açısından özgün bir çalışmadır. Bu nedenle fumagillinin, MCF7 hücrelerinde moleküler antikanserojenik mekanizmaları, tekli ya da kemoterapötik ajanlarla kombine çalışılarak, meme kanseri tedavisi için yeni kemoterapötik ve kemopreventif ajanların gelişimine önemli katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- Agarwal, A., Desai, N.R., Kesari, K.K., (2009), *Pathophysiology of cell phone radiation: oxidative stress and carcinogenesis with focus on male reproductive system*, Reproductive Biology and Endocrinology, **7**:114 doi:10.1186/1477-7827-7-114
- Amerikan Kanser Dernegi, (2011), *Global cancer facts & figures 2nd edition*, Atlanta, A.B.D.
- Andrabi, S.A., Dawson, T.M., Dawson, V.L., (2008), *Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos*. Ann. N. Y. Acad. Sci. **1147**, 233–241.
- Ataergin, A.S., Özet, A., Arpacı, F., (1999), *Kanser tedavisinde anjiyogenez inhibitörlerinin yeri*, T Klin J Med Sci, **19**:100-105, 29-30.
- Barile, F.A., Dierickx, P.J., Kristen, U. (1994), *In vitro cytotoxicity testing for prediction of acute human toxicity*, Cell Biology and Toxicology, **10**: 155-162.
- Barutca, B., (2006), *Bazı bitki ekstrelerinin memeli hücre kültürlerinde sitotoksik aktivitelerinin in vitro araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Benjamin, C.W., Hiebsch, R.R., Jones, D.A., (1998), *Caspase activation in MCF7 cells responding to etoposide treatment*, Molecular Pharmacology, **53**:446–450.
- Bombick, B., Bombick, P.H., Ayers, K., Putnam, J., Avalos, M.F. D.J. Doolittle, (1997), *Evaluation of the genotoxic and cytotoxic potential of mainstream whole smoke and smoke condensate from a cigarette containing a novel carbon filter*. Fundamental and Applied Toxicology **39**, 11–17.
- Boulares, A.H., Yakovlev, A.G., Ivanova, V., Stoica, B.A., Wang, G., Iyer, S., Smulson, M., (1999), *Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP)*

- Cleavage in Apoptosis*, The Journal of Biological Chemistry, **274**, 33, 22932–22940.
- Bozzone, D.M., (2007), *Cancer genetics the biology of cancer*, Infobase Publishing, New York, A.B.D.
- Bridges, J.W., Benford, D.J., Hubbard, S.A., (1983), *The design and use of in vitro toxicity tests*. Turner (Ed.), Macmillian, London, **47**.
- Brown, J., (1958), *Soil fungi of some British sand dunes in relation to soil type and succession*, The Journal of Ecology: **641-664**.
- Cao, Y., (2001), *Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications*,. Int J Biochem Cell Biol **33**:357-369.
- Carmicheal, J., DeGrafit W. G., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Mitchell, J.B., (1987), *Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing*, Cancer Research, **47**: 936-942.
- Chiarugi, A., Moskowitz, M. A., (2002), *Cell biology. PARP-1-a perpetrator of apoptotic cell death?*, Science, **297**(5579): 200-201.
- Chodosh, L.A., (1998), *Ekspression of BRCA1 and BRCA2 in normal and neoplastic cells*. J Mammary Gland Biol Neoplsia, **3**:389-402.
- Cole, R.J., Cox, R.H. (1981), *Handbook of toxic fungal metabolites*. Academic Press., New York, A.B.D.
- Cole, R.J., Jarvis, B.B., Schweikert, M.A. (2003), *Handbook of secondary fungal metabolites*, vol. III., Academic Press., Amsterdam, Hollanda.
- Cole, R.J., Schweikert, M.A. (2003a), *Handbook of secondary fungal metabolites*, vol. I., Academic Press., Amsterdam, Hollanda.
- Cole, R.J., Schweikert, M.A. (2003b), *Handbook of secondary fungal metabolites*, vol. II., Academic Press., Amsterdam, Hollanda.
- Connolly, D.T. (1991), *Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function*. J. Cell Biochem. **47**:219–223.

- Cook, J.A., Mitchell, J.B. (1989), *Viability measurements in mammalian cell systems*. Anal. Biochem. **179**, 1–7.
- Cook, K.M., Figg, W.D. (2010), *Angiogenesis inhibitors – current strategies and future prospects*, CA Cancer J Clin. **60**(4): 222–243.
- Cooper, G.M., (1994), *Programmed cell death. The cell*, Washington: ASM Pres; **592-596**.
- Corey, E. J., Guzman-Perez, A., Noe. M. C., (1994), *Short enantioselective synthesis of (-)-ovalicin, a potent inhibitor of angiogenesis, using substrate-enhanced catalytic asymmetric dihydroxylation*, J. Am. Chem. Soc. **116**, 12109.
- Çalık, I., (2008), *Meme kanserlerinde VEGF ve CD44 ekspresyonu ile prognostik parametrelerin karşılaştırılması*, Uzmanlık Tezi, Tıp Fakültesi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Davila, J.C., Reddy, C.G., Davis, P.J. ve Acosta, D. (1990), *Toxicity assessment of paraverine hydrochloride and papaverine-derived metabolites in primary cultures of rat hepatocytes*, In vitro Cell Dev Biol **26**:515-524.
- Didier, E.S. (1997), *Effects of albendazole, fumagillin, and TNP-470 on microsporidial replication in vitro*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **1541–1546**.
- Diemer, T., Rétey, J. (2011), *Avoiding angiogenesis by inhibition of human methionin aminopeptidase 2 (MetAP-2) by fumagillin analogues*, <http://www.ioc.uni-karlsruhe.de/Professoren/Retey/tanjae.html>
- Dikmen, M., Öztürk, N., Öztürk, Y., (2008), *Nar meyve kabuğu ekstresinin MCF7 hücre proliferasyonu üzerine sitotoksik ve inhibitör etkileri*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, **37**(3)179-190.
- Dincol, D., (1991), *Aksilla pozitif premenapozal meme kanseri olgularında dna ploidi ile prognoz ilişkisi ve tümör içi heterojenitenin değerlendirilmesi*, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, **6**.

- Durak, D., Cingi, A., Manukyan, M., Kaya, H., Özdemir, A., Yeğen, C., (2005), *Kolu-rektal kanserlerde vasküler endolial büyüme faktörü (VEBF) ekspresyonunun prognoz üzerine etkisi*, Marmara Medical Journal; **18**(2);53-58.
- Elisa Cleaved PARP Kit, (2011), Katalog No: KHO0741, Invitrogen Corporation, Kalifornia, A.B.D. (www.invitrogen.com)
- Elisa Human VEGF Kit, (2011), Katalog No: KHG0111, Invitrogen Corporation, Kalifornia, A.B.D. (www.invitrogen.com)
- Erdoğan, B.B., (2003), Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fasfasl bağımlı apoptozis, Akciğer Arşivi, **4**: 165-174.
- Ferrara, N., K.A. Houck, L.B. Jakeman, J. Winer, and D.W. Leung. (1991), *The vascular endothelial growth factor family of polypeptides*. J. Cell Biochem. **47**:211–218.
- Folkman. J., Ingber, D., Fujita, T., Kishimoto, S., Sudo, K., Kanamaru, T., Brem, H., (1990), *Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth*, Nature **348**, 555.
- Fotakis, G. ve Timbrell, J.A. (2006), *Cytotoxicity assays: comparison of LDH, Neutral Red, MTT and Protein Assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride*, Toxicol. Lett. **160**, 171-177.
- Fujimoto, J., Hori, M., Ichigo, I., Hirose, R., Sakaguchi, H., Tamaya, T., (1997), *Plausible novel therapeutic strategy of uterine endometrial cancer with reduction of basic fibroblast growth factor secretion by progestin and O-(chloroacetyl-carbamoyl) fumagillol (TNP-470; AGM- 1470)*, Cancer Letters **113**;187-194.
- Gad, S.C. (2000), *Alternatives to In vivo Studies in Toxicology*, Second Edition, Taylor & Francis, New York.
- Germain, M., Affar, E.B., D'Amours, D., Dixit, V.M., Salvesen, G.S., Poirier, G.G., (1999), *Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase*

during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J Biol Chem* **274**:28379–28384.

Grzmil, M., Kaulfuss, S., Thelen, P., Hemmerlein, B., Schweyer, S., Obenauer, S., Kang, T.W., Burfeind, P., (2006), *Expression and functional analysis of Bax inhibitor-1 in human breast cancer cells*. *Journal of pathology*, **208**:340-349.

Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M.S., Soussi, T.R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R., Harris, C.C., (1994), *Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines*, *Nucleic Acids Research*, **22**, 17 3551-3555

Hotz, H.G., Reber, H.A., Hotz, B., Sanghavi, P.C., Yu, T., Foitzik, T., Buhr, H.J., Hines, H.J., (2001), *Angiogenesis inhibitor TNP-470 reduces human pancreatic cancer growth*, *Journal of Gastrointestinal Surgery*, **5**, 2.

Hou, L. Mori, D., Takase, Y., Meihua, P., Kai, K., ve Tokunaga, O., (2009), *Fumagillin inhibits colorectal cancer growth and metastasis in mice: In vivo and in vitro study of anti-angiogenesis*, *Pathology International* **59**:448–461.

http: 1. <http://www.healthcentral.com>.

Ingber, D.E, Fujita, T., Kishimoto, S., Sudo, K., Kanamaru, T., Brem, H., Folkman, J., (1990), *Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth*. *Nature*, **348**:555- 557.

Işık, K., (2010), *Farklı özellikteki ZnO nanopartiküllerinin fibroblast hücreleri üzerindeki etkilerinin in vitro olarak değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

Jakoby, Y., Pastan, I.H., (1979), *Cell culture*, Academic Press, San Diego, Kalifornia, A.B.D.

Jeune, M.A.L, Kumi-Diaka, J., Brown, J., (2005), *Anticancer activities of Pomegranate extract and genistein in human breast cancer cells*, *Journal of Medicinal Food.*, **8**(4):469-475.

- Jo, E.H., Hong, H.H., Ahn, N.C., Jung, J.W., Yang, S.R., Park, J.S., Kim, S.H., Lee, Y.S., Kang, K.S., (2004), *Modulations of the Bcl-2/Bax Family were involved in the chemopreventive effects of Licorice Root (Glycyrrhizauralensis Fisch) in MCF7 human breast cancer cell*, J. Agric. Food Chem., **52**, 1715-1719.
- Karaağaç, E. (2006), *Lokal ileri ve metastatik meme kanseri olan hastalarda bir Apoptozis göztergesi olan serum kırılmış sitokeratin 18 düzeylerinin, tedaviye yanıtla ilişkisinin incelenmesi*, Uzmanlık Tezi, Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Bursa, **43-44**.
- Kawano, T., Yanoma, Y., Nishimura, G., Tsukuda, M., (2001), *The inhibitory effects of TNP470 on tumour growth of head and neck carcinoma cell producing interleukin-8*, The Journal of Laryngology & Otology, **115**, 802–807.
- Keller, N.P., Turner, G., Bennett J.W. (2005), *Fungal secondary metabolism From biochemistry to genomics.*, Nature Reviews Microbiology. **3**, 937-947.
- Kim, J.W., Kim, K., Kang, K., ve Joe, C.O., (2000), *Inhibition of homodimerization of poly(ADP-ribose) polymerase by its C-terminal cleavage products produced during apoptosis*. J Biol Chem **275**:8121–8125.
- King, J. B.R., Robins, M.W., (2006), *Cancer biology*, 3. Baskı, Pearson Education Limited, Essex, İngiltere.
- Knox, P., Uphill, P.F., Fry, J.R. , Benford D. ve Balls, M., (1986), *The FRAME multicentre project on in vitro cytotoxicity*. Food and Chemical Toxicology **24**, 457–463.
- Kontoyiannis, D.P., (2010), *Manipulation of host angiogenesis A critical link for understanding the pathogenesis of invasive mold infections?*, Virulence **1:3**, 192-196.

- Konukoğlu D, Turhan S. M., (2005), *Molecular basis of angiogenesis mechanisms and tumor angiogenesis*. Cerrahpaşa J Med; **36**: 42-48.
- Kountouras, J., Zavos, C., Chatzopoulos, D., (2005), *Apoptotic and anti-angiogenic strategies in liver and gastrointestinal malignancies.*, J. Surg Oncol. Jun **15**;90(4):249-59.
- Kroll, A., Pillukat, M.H., Hahn, D., Schnekenburger J., (2009), *Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, **72**, 370–377.
- Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., ve Earnshaw, W.C., (1994), *Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE*. Nature (Lond) **371**:346–347.
- Lee, W.Y., Jin, Y.T., Chang, T.W., (1999), *Immunolocalization of BRCA1 protein in normal breast tissue and sporadic invasive ductal carcinomas: a correlation with other biological parameters*. Histopathology, **34**:106-112.
- Li, Y., Liu, J., Liu, X., Xing, K., Wang, Y., Li, F., Yao, L., (2006), *Resveratrol-induced cell inhibition of growth and apoptosis in MCF7 human breast cancer cells are associated with modulation of phosphorylated akt and caspase-9*, Applied Biochemistry and Biotechnology, **135**.
- Lian, Z., Niwa, K., Gao, J., Tagami, K., Mori, H, Tamaya, T., (2003), *Association of cellular apoptosis with anti-tumor effects of the Chinese herbal complex in endocrine-resistant cancer cell line*, Cancer Detection and Prevention, **27**: 147-154.
- Liu, S., Widom, J., Kemp, C.W., Crews, C.M., Clardy, J., (1998), *Structure of human methionine aminopeptidase-2 complexed with fumagillin*, Science, **282**.
- Lowe, S.W., Lin, A.W., (2000), *Apoptosis in cancer*, Carcinogenesis, **21**(3):485-495.

- Miller, W.J., Kayton, M.K., Patton, A., O'Connor, S., He, M., Vu, H., Baibakov, G., Lorang, D., Knezevic, W., Kohn, E., Alexander, H.R., Stirling, D., Monteiro-Riviere N.A., Inman A.O. ve Zhang L.W. (2009), *Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line*, Toxicology and Applied Pharmacology, **234**, 222–235.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., Poltorak, Z., (1999), *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*, FASEB J, **13**:9-22.
- O'Connell, J.F., Klein-Szanto, A.J.P., Di Giovanni, D.M., Fries, J.W, ve Slaga, T.J., (1986), *Enhanced malignant progression of mouse skin tumors by the free-radical generator benzoyl peroxide*. Cancer Res **46**:2863.
- Öztürk, F., (2002), *Apoptoz*, İnönü Üniversitesi Tıp Fak Dergisi, **9**(2):143-148.
- Patron, M., Dowsett, M, Smith, L., (2001), *Studies of apoptosis in breast cancer*, BMJ, **322**:1528-15325.
- Paul, J., Cozzi, Y., Li, (2009), *Angiogenesis as a strategic target for prostate*, Cancer Therapy and Medicinal Research Reviews, Wiley Periodicals, Inc, **30**(1) 23-66.
- Payvandi, F., Muller, G.W., Libutti, S.K., (2004), *A novel technique for quantifying changes in vascular density, endothelial cell proliferation and protein expression in response to modulators of angiogenesis using the chick chorioallantoic membrane (CAM) assay*, Journal of Translational Medicine, **2**:4.
- Pelengaris, S., Khan, M, Steward, W., Blasco, M., Yee, C., Shima, D., Streuli, C., deWit, N.C.J., Rudd, N., Ruhrberg, C., Thomas, A., Waterhouse, E., Roussel, M., (2006), *The molecular biology of cancer*, Blackwell Publishing, Massachusetts, A.B.D., **6-309**.
- Picoul, W., Bedel, O., Haudrechy, A., Langlois, Y., (2003), *Progress in fumagillin synthesis*, Pure Appl. Chem., **75**, 235–249.)

- Pink, J.J., Davis, S.W., Tagliarino, C., Planchon, S.M., Yang, X.H., Froelich, C.J., Boothman, D.A., (2000), *Activation of a cysteine protease in MCF7 and T47D breast cancer cells during b-Lapachone-mediated apoptosis*, Experimental Cell Research **255**, 144–155.
- Plate, K.H., G. Breier, H.A. Weich, and W. Risau. (1992), *Vascular endothelial growth factor is a potential tumor angiogenesis factor in human gliomas in vivo*. Nature (Lond.). **359**:845–848.
- Putnam, K.P., Bombick, D.W. ve Doolittle, D.J. (2002), *Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate*, Toxicology In Vitro, **16**, 599-607.
- Pyun, H.J., Fardis, M., Tario, J., Yang, C.Y., Ruckman, J., Henninger, D., Jin, H., ve Kim, C.H. (2004), *Investigation of novel fumagillin analogues as angiogenesis inhibitors*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **14**: 91–94.
- Rosser, B.G., Gores, G.J.. (1995), *Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications*, Gastroenterology. **108**(1):252-75.
- Rouleau, M., Patel, A., Hendzel, M.J., Kaufmann, S.H., Poirier, G.G.,(2010), *PARP inhibition: PARP1 and beyond*, Nat Rev Cancer. April ; **10**(4): 293–301.
- Ruddon, R.W., (2007), *Cancer biology*, Oxford University Press, New York, A.B.D., **21**.
- Sasaki, A., Alcalde, R.E., Nishiyama, A., Lim, D.D., Mese,H., Akedo, H., Matsumura, T., (1998), *Angiogenesis inhibitor TNP-470 inhibits human Breast cancer osteolytic bone metastasis in nude mice through the reduction of bone resorption*, Cancer Research, **58**, 462-467.
- Shimizu, K. ve Oku, N., (2004), *Cancer anti-angiogenic therapy*, Biol. Pharm. Bull., **27**(5), 599-605.
- Singh, Y., Shikata, N., Kiyozuka,Y., Nambu,H., Morimoto, J., Kurebayashi,J., Hioki K., Tsubura, A., (1997), *Inhibition of tumor growth and metastasis by*

angiogenesis inhibitor TNP-470 on breast cancer cell lines in vitro and in vivo, Breast Cancer Research and Treatment **45**: 15–27.

Smulson, M.E., Pang, D., Jung, M., Dimtchev, A., Chasovskikh, S., Spoonde, A., Simbulan-Rosenthal, C., Rosenthal, D., Yakovlev, A., ve Dritschilo, A., (1998), *Irreversible binding of Poly(ADP)Ribose Polymerase cleavage product to DNA ends revealed by atomic force microscopy: possible role in apoptosis*, Cancer Res **58**; 3495.

Soto-Cerrato, V., Montaner, B., Martinell, M., Vilaseca, M., Giralt, E., Perez-Tomas, R., (2005), *Cell cycle arrest and proapoptotic effects of the anticancer cyclodepsipeptide serratamolide (AT514) are independent of p53 status in breast cancer cells*. Biochemical pharmacology, **71**:32-41.

Stevanovic, J., Stanimirovic, Z., Radakovic, M., Stojic, V., (2008), *In vitro evaluation of the clastogenicity of fumagillin*, Environmental and Molecular Mutagenesis **49**:594-601.

Sun, J., Liu, R.H., (2005), *Cranberry phytochemical extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in human MCF7 breast cancer cells*, Cancer letters, **20**:1-11.

Sunguroğlu, A., Erdemli, E.A., Tekelioğlu, M., (1996), *Programlanmış hücre ölümü*, T Klin Bilimleri, **16**: 333-337.

Takamiya, Y., Brem H, Ojeifo J, Mineta T, Martuza RL., (1994), *AGM- 1470 inhibits the growth of human glioblastoma cells in vitro and in vivo*, Neurosurgery, **34**:869-875.

Taki, T., Ohnishi, T., Arita, N., Hiraga, S., Saitoh, Y., Izumoto, S., Mori, K., Hayakawa, T., (1994), *Anti-proliferative effects of TNP-470 on human malignant glioma in vivo: potent inhibition of tumor angiogenesis*. J Neurooncol **19**:251-258.

Tavtigian, S.V., Simard, J., Rommens, J., (1996), *The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds*. Nat Gener, **12**:333-337.

- Tentori, L., Portarena, I., Graziani, G., (2002), *Potential clinical applications of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors*, Pharmacological Research, **45**, 2.
- Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S., ve Dixit, V.M., (1995), *Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase*. Cell **81**:801–809.
- Todd, M.D., Lin, X., Stankowski, L.F., Desai, M. ve Wolfgang, G.H.I., (1999), *Toxicity Screening of a Combinatorial Library: Correlation of Cytotoxicity and Gene Induction to Compound Structure*, J Biomolec. Screen **4**:259-268.
- Turner, W.B. (1971) *Fungal metabolites.*, Academic Press. London, İngiltere.
- Turner, W.B., Aldridge D.C. (1983) *Fungal metabolites II.*, Academic Press., London.
- Ueda, N., Kamata, N., Hayashi, E., Yokoyama, K., Hoteiya, T., Nagayama, M., (1999), *Effect of anti-angiogenic agent, TNP-470, on the growth of oral squamous cell carcinomas*, Oral Oncology **35**, 554-560.
- Ulgey, A.G., (1999), *Meme kanseri cerrahisinde meme koruyucu girişimler ve sonuçları.*, Uzmanlık Tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Ankara., 7.
- Üçkuyu, A., (2000), *Menopozun ve hormon replasman tedavisinin endometriumda estrogen ve progesteron reseptörleri ile Bcl-2 ve C-myc proto-onkogen proteinlerine etkilerinin immünohistokimyasal yöntemle incelenmesi*, Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Ankara.
- Vrag, L., Szabo, C., (2002), *The therapeutic potential of Poly(ADP-Ribose) polymerase inhibitors*, The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics Pharmacol Rev **54**:375–429.
- Waksman, S., (1922), *A method for counting the number of fungi in the soil*. J. Bact **7**: 339-341.

- Warren, R.S., H. Yuan, M.R. Matli, N.A. Gillett, N. Ferrara. (1993), *Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis*. J. Clin. Invest. **95**: 1789–1797.
- Weinberg, R.A., (1989), *Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis*, Cancer Res.;**49**:3713-3721.
- Weyermann, J., Lochmann, D., ve Zimmer, A., (2005), *A practical note on the use of cytotoxicity assays*, International Journal of Pharmaceutics, **288**, 369-376.
- Xia, J.L., Yang, B.H., Tang,Z.Y., Sun, F.X., Gao, D.M., (1997) , *Inhibitory effect of the angiogenesis inhibitor TNP-470 on tumor growth and metastasis in nude mice bearing human hepatocellular carcinoma* , J. Cancer Res Clin Oncol, **123**:383-387.
- Yamamoto, D., Kiyozuka, Y., Adachi, Y., Takada,H., Hioki, K., Tsubura, A., (1999), *Synergistic action of apoptosis induced by eicosapentaenoic acid and TNP-470 on human breast cancer cells*, Breast Cancer Research and Treatment **55**: 149–160.
- Yasukawa, T., Kimura,H., Tabata, Y., Miyamoto, H., Honda,Y., Ikada,Y., Ogura, Y., (1999), *Targeted delivery of anti–angiogenic agent TNP-470 using water-soluble polymer in the treatment of choroidal neovascularization*, Investigative Ophthalmology & Visual Science, **40**, 11.
- Yılmaz İ., Çek M., (2005), *Erişkin ratlarda deneysel varikosel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinin apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselmiş olan apoptozisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin TUNEL yöntemi ile değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği.
- Yoshida, T., Kaneko, Y., Tsukamoto, A., Han, K., Ichinose, A., Kimura, S., (1998), *Suppression of hepatoma growth and angiogenesis by a fumagillin derivative TNP470: possible involvement of nitric oxide synthase*, Cancer Research, **58**, 3751-3756.

- Yu, F.Y., Liao, Y.C., Chang, C.H., Liu, B.H., (2006), *Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of mitochondrial pathway*, Toxicology Letters, **20**;161(2):143-51.
- Yücel, M.A., Kurnaz, I.A., (2005), *Biochemical model for the interactions between tumor cell mass and vascular epithelial cells leading to angiogenesis*, Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı, Biyomut, İstanbul,Türkiye, **185-190**.
- Zachary, I., (1998), *Molecules in focus vascular endothelial growth factor*, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **30**, 1169-1 174.
- Zhang, Y., Yeh, J.R., Mara, A., Ju, R., Hines, J.F., Cirone, P., Griesbach, H.L., Schneider, I., Slusarski, D.C., Holley, S.A., Crews, C.M., (2006), *A Chemical and genetic approach to the mode of action of fumagillin*, Chem Biol. ; **13**(9): 1001–1009.
- Zimmerman, K.C., Gren, D.R., (2001), *How cells die: apoptosis pathways*, J Allergy Clin Immunol, **108** (4): 99-103.