

**BAZI BİTKİ EKSTRELERİNİN  
SIÇAN ENDOTEL HÜCRELERİ  
ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN  
*IN VITRO* ARAŞTIRILMASI**

Gönül ULUS

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Ağustos, 2006

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Gönül ULUS'un "Bazı Bitki Ekstrelerinin Sıçan Endotel Hücreleri Üzerine Olan Etkilerinin *In Vitro* Araştırılması" başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki Yüksek Lisans tezi 10.07.2006 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	:Yard. Doç. Dr. A. TANSU KOPARAL	.....
Üye	:Yard. Doç. Dr. MELİH ZEYTİNOĞLU	.....
Üye	:Yard. Doç. Dr. MEDİHA CANBEK	.....

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun  
..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

**ÖZET****Yüksek Lisans Tezi****BAZI BİTKİ EKSTRELERİNİN SIÇAN ENDOTEL HÜCRELERİ  
ÜZERİNE ETKİSİNİN *IN VITRO* ARAŞTIRILMASI****Gönül ULUS****Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı****Danışman: Yard. Doç. Dr. A. Tansu KOPARAL  
2006, 98 sayfa**

Bu tez çalışması *in vitro* ortamda yapılan deneysel çalışmaları içermektedir. Deneysel RATEC C2 klon hücreleri ile hücre kültürü tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma ile karvakrol, *Bifora radians*, dill, olivetorik asit ve fisodik asidin anjiyogenez sürecinin temel olayları olan hücre çoğalması, endotel hücre göçü ve tüp oluşumu olayları ile hücre hareketinde önemli rolü olan hücre iskeletinin aktin filamentlerine olan etkileri gösterilmiştir. Test maddelerinin uygulandığı hücrelerde doz arttıkça hücre çoğalmasında düşüş meydana geldiği, hücre göçünün durduğu, tüp oluşumunun engellendiği, hücre iskeletinin aktin filamentlerinde ve hücre morfolojisinde bozulmalar olduğu görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Bitki ekstresi, anjiyogenez, tüp oluşumu, endotel hücresi, aktin filamentleri

**ABSTRACT****Master of Science Thesis*****IN VITRO* INVESTIGATIONS OF SOME PLANT EXTRACT EFFECTS  
ON RAT ENDOTHELIAL CELLS****Gönül ULUS****Anadolu University  
Graduate School of Sciences  
Biology Program****Supervisor: Assist. Prof. Dr. A. Tansu KOPARAL  
2006, 98 pages**

This thesis study contains experimental studies done *in vitro* environment. Experiments are carried out with RATEC C2 clon cells by using cell culture technique. With this study it is showed that carvacrol, *Bifora radians*, dill, olivetoric acid, physodic acid has effect on cell proliferation, endothelial migration, tube formation that are important events in angiogenesis process and on cell skeleton which has important role in the cell movement. In these cells which test substances are applied as the dosage is decreasing of cell proliferation, stop of cell migration and inhibition of tube formation and to disorganisation of the cell skeleton and morphology have been observed.

**Keywords:** Plant extract, angiogenesis, tube formation, endothelial cell, actin filament

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca ihtiyaç duyduğum her an maddi ve manevi yardımlarını yanımda hissettiğim, her türlü desteği veren danışman hocam Sayın Yard. Doç. Dr. A. Tansu KOPARAL'a, tez çalışmalarımda kullandığım maddeleri sağlayan Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Prof. Dr. Ayşen TÜRK'e, Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nden Prof. Dr. Hayrettin TÜRK'e, Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can BAŞER'e ve Yard. Doç. Dr. Mine KÜRKÇÜOĞLU'na, fotoğraf çekimi için izin vererek yardımcı olan BİBAM'dan Prof. Dr. Rıdvan SAY'a ve Yard. Doç. Dr. Seval KORKMAZ'a, hayatımın her basamağında daima yanımda olan, her zaman ve her konuda bana destek olan değerli aileme, tez çalışmam boyunca bana her konuda yardımcı olan kardeşim Dr. Taner ULUS'a teşekkür ederim.

Gönül Ulus  
Ağustos, 2006

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

<b>ÖZET.....</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>II</b>
<b>TEŞEKKÜR.....</b>	<b>III</b>
<b>İÇİNDEKİLER.....</b>	<b>IV</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ.....</b>	<b>VII</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....</b>	<b>IX</b>
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Anjiyogenez.....	5
1.1.1 . Anjiyogenezde rol alan anahtar faktörler.....	8
1.2.1.1. Tümördeki endotel hücreleri.....	8
1.2.1.2. Dolaşımda bulunan endotel hücreleri.....	9
1.2.1.3. Perisitler.....	9
1.2.1.4. Tümörün mikroçevresi.....	10
1.1.2. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)'nün anjiyogenezdeki rolü.....	10
1.1.3. Tümörün neovaskularizasyonu.....	12
1.1.4. Tümör damarlarını yapısı.....	12
1.1.5. Tümör anti-anjiyogenezinin geleneksel sitotoksinlerin sistemsel vasküler toksisitesi ile karşılaştırılması.....	14
1.1.5.1. Doğrudan anti-anjiyogenez stratejilerinin dolaylı olanlar ile karşılaştırılması.....	14
1.1.5.2. Tesadüfi anti-anjiyogenez.....	15
1.1.6. Tümör anjiyogenezinde terapi yaklaşımları.....	16
1.1.6.1. Terapi yaklaşımları.....	16
1.2. Anjiyogenez-Kanser ilişkisi.....	17
1.3. Metastaz.....	20

1.4. Apoptosiz.....	22
1.5. Endotel Hücreleri.....	26
1.6. Hücre İskeleti.....	32
1.6.1. Hücre iskeletinin elemanları.....	33
1.6.1.1. Mikrotüpçükler.....	33
1.6.1.2. Mikrofilamentler.....	33
1.6.1.3. İntermediate filamentler.....	34
1.7. DeneYlerde Kullanılan Test Maddeleri.....	35
1.7.1. Karvakrol.....	35
1.7.2. <i>Bifora radians</i> .....	35
1.7.3. Dill.....	37
1.7.4. Olivetorik asit.....	38
1.7.4.1. Ekstrasyon işleMi.....	38
1.7.5. Fisodik asit.....	38
1.7.5.1. Ekstrasyon işleMi.....	39
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>40</b>
2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	40
2.2. Kullanılan Malzemeler.....	40
2.3. Kullanılan Aletler.....	40
2.4. DeneYlerde Kullanılan RATEC C2 Klon Hücreleri.....	40
2.5. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması.....	41
2.6. Test Maddelerinin dozlarının hazırlanması.....	41
2.6.1. Karvakrol dozlarının hazırlanması.....	41
2.6.2. <i>Bifora radians</i> dozlarının hazırlanması.....	41
2.6.3. Dill dozlarının hazırlanması.....	42
2.6.4. Olivetorik asit dozlarının hazırlanması.....	42
2.6.5. Fisodik asit dozlarının hazırlanması.....	42
2.7. <i>In vitro</i> Çalışmalar.....	42
2.7.1. RATEC C2 hücre kültürü.....	42
2.7.2. Hücre sayımları.....	43

2.7.3. Test Maddelerinin hücreler üzerindeki etkisini belirlemek için yapılan çalışmalar.....	43
2.7.3.1. Hücre çoğalımı deneyleri (MTT).....	43
2.7.3.2. F-aktin deneyleri.....	45
2.7.3.3. Hücre göçü deneyi.....	45
2.7.3.4. Tüp oluşumu deneyi.....	46
2.8. Mikroskopi.....	46
2.9. Fotoğrafi.....	47
2.10. İstatistiksel Değerlendirmeler.....	47
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>48</b>
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>73</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>79</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

3.1.	Karvakrol'un RATEC hücrelerinin çoğalması üzerine etkileri.....	48
3.2.a.	Karvakrol'un RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine olan etkilerinin görüntüleri.....	49
3.2.b.	Karvakrol'un RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine olan etkilerinin görüntüleri.....	50
3.3.	Karvakrolu'un RATEC hücrelerinin göçüne olan etkilerinin görüntüleri.....	51
3.4.	Karvakrol'un RATEC hücrelerinin tüp oluşturması üzerine olan etkilerinin görüntüleri.....	52
3.5.	Bifora radians'ın RATEC hücrelerinin çoğalması üzerine etkisi.....	53
3.6.a.	Bifora radians'ın RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine olan etkilerinin görüntüleri.....	54
3.6.b.	Bifora radians'ın RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine olan etkilerinin görüntüleri.....	55
3.7.	Bifora radians'ın RATEC hücrelerinin göçüne olan etkilerinin görüntüleri.....	56
3.8.	Bifora radians'ın RATEC hücrelerinin tüp oluşturması üzerine olan etkisinin görüntüleri.....	57
3.9.	Dill'in RATEC hücrelerinin çoğalması üzerine olan etkisi.....	58
3.10.a.	Dill'in RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine olan etkilerinin görüntüleri.....	59
3.10.b.	Dill'in RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine olan etkilerinin görüntüleri.....	60
3.11.	Dill'in RATEC hücrelerinin göçüne olan etkilerinin görüntüleri.....	61
3.12.	Dill'in RATEC hücrelerinin tüp oluşturması üzerine olan etkisinin görüntüleri.....	62
3.13.	Olivetorik asit'in RATEC hücrelerinin çoğalması üzerine olan etkisinin görüntüleri.....	63

3.14.a.	Olivetorik asit'in RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine olan etkilerinin görüntüleri.....	64
3.14.b.	Olivetorik asit'in RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine olan etkilerinin görüntüleri.....	65
3.15.	Olivetorik asit'in RATEC hücrelerinin göçüne olan etkilerinin görüntüleri.....	66
3.16.	Olivetorik asit'in RATEC hücrelerinin tüp oluşturması üzerine olan etkisinin görüntüleri.....	67
3.17.	Fisodik asit'in RATEC hücrelerinin çoğalması üzerine olan etkisi.....	68
3.18.a.	Fisodik asit'in RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine olan etkilerinin görüntüleri.....	69
3.18.b.	Fisodik asit'in RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine olan etkilerinin görün.....	70
3.19.	Fisodik asit'in RATEC hücrelerinin göçüne olan etkilerinin görüntüleri.....	71
3.20.	Fisodik asit'in RATEC hücrelerinin tüp oluşturması üzerine olan etkisinin görüntüleri.....	72

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>FBS</b>	: Fetal Bovine Serum
<b>HBSS</b>	: Hank's Balanced Salt Solution
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür)
<b>PBS</b>	: Fosfat tampon çözeltisi (Phosphate Buffer Saline)
<b>EDTA</b>	: Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>EBM-2</b>	: Endothelial Cell Basement Medium-2

## 1.GİRİŞ

Kanser sözcüğü Latince yengeç anlamına gelmekte ve tümörün bedenine herhangi bir bölgesine yengeç gibi ayrılmaz bir şekilde yapıştığını tanımlamak üzere kullanılmaktadır. Kalp ve damar hastalıklarından meydana gelen ölümleri, kanser nedeniyle meydana gelen ölümler izlemektedir. Bu nedenle kanserin kontrolü ve önlenmesi çok önemlidir.

Bir tümör hücrelerini kesin terimlerle tanımlamak mümkün değildir. Tümörler genelde hücrelerin anormal şekilde büyümeleri ile teşhis edilirler. Dolayısıyla makul olan tanım şudur: Tümör; normal dokuları aşan, normal dokularla koordine olmayan ve değişime uğradıktan sonra bile aynı şekilde aşırı büyümeye devam eden anormal doku kütesidir (Robbins, 1999).

Tümörler parazit gibi davranarak metabolik gereksinimleri için normal hücre ve dokularla yarışa girerler ve geliştikleri hastada enerji savurganlığına neden olurlar. Tümörler belirli ölçüde otonomiden hoşlanırlar ve lokal çevreleri ile konağın beslenme durumu ne olursa olsun az-çok sabit bir şekilde büyürler. Bu nedenle bunlar bir dereceye kadar kontrol edilmemiş büyümedir. Ancak otonomileri hiçbir zaman için tam değildir. Bazı tümörler endokrin desteğe ihtiyaç duyarlar ve bu tip bağımlılıklar bazen tümör için dezavantaj oluşturabilir. Ayrıca bütün tümörler beslenme ve kanlanma için konağa kritik bir şekilde bağımlıdırlar (Robbins, 1999).

Tüm tümörlerin kökeninde normal büyüme kontrollerine verilen yanıtın kaybolması yatmaktadır. Tümör hücreleri, normal hücre çoğalmasını kontrol eden düzenleyici etkilerden bağımsız şekilde çoğalırlar.

Tümörler üç ana grupta sınıflandırılabilir:

1. Bening tümörler herhangi bir dokuda ortaya çıkarlar ve genellikle bölgesel basınç veya blokaj sonucu hasara neden olurlar. Ancak ortak özellikleri uzak bölgelere dağılamamalarıdır.
2. In situ tümörler genellikle epitelyumda oluşurlar. Hücreler, kanser hücrelerinin morfolojik görünümüne sahip olmalarına rağmen epitel aşamasında kalırlar. Bazal membran ve mezenşim dokuya sirayet etmezler.

3. Kanserler, mezenşimi saran ve harap eden tamamen gelişmiş (kötü huylu) tümörlerdir. Tümör hücreleri normal dokulardaki kan dolaşımıyla sağlanan besine ihtiyaç duyarlar. Bazı tümörler bir takım proteinler üreterek kan damarlarının tümörün içine doğru büyümesini uyarırlar. Yeni damarlar düzgün şekilde oluşmadığından kolaylıkla hasara uğrayabilir ve bu nedenle tümörler bu damarların ve lenf kanallarının içine girerek yayılırlar. Tümör parçaları bu damarlar aracılığıyla bölgesel lenf düğümlerine veya uzak organlara taşınabilir ve ikincil tümörler oluşturabilirler (metastaz). Kanserler herhangi bir dokuda ortaya çıkabilir. Benignden kötü huylu olana doğru bir ilerleme görülmesine rağmen bu süreç değişkenlik gösterir. Birçok benign tümör hiçbir zaman kötü huylu tümöre dönüşmez (Franks ve Teich, 1996).

Tümörler büyüebilmek ve metastaz yapabilmek için kan kaynağına ihtiyaç duyarlar (Lin ve ark., 2003; Kahn ve ark., 2000; Fortier ve ark., 1999). Tümör büyümesinin anjiyogeneze bağlı olduğu kabul edilmektedir. Anjiyogenez, önceden var olan damarlardan yeni vasküler kapiller kanalların oluşmasıdır. (Xin ve ark., 1999; Lin ve ark., 2003). Bu olay tümör sitokinleri tarafından endotel hücre aktivasyonu (endotel hücreleri ile atasal damarlar arasındaki dengeli hücre-hücre bağlantılarının kaybolması) (Auerbach ve ark., 2003), matriks metalloproteinazlar tarafından ekstrasellüler matriks degradasyonu, integrinler olarak adlandırılan hücre membran adhezyon molekülleri aracılığı ile endotel hücre göçü ekstrasellüler matriks yayılması, endotel hücre çoğalması ve kapiller lümen formasyonu gibi birçok olaylar dizisinden oluşmaktadır. (Bussolino ve ark., 1997; Kahn ve ark., 2000; Fortier ve ark., 2001). Anjiyogenez, ekstrasellüler matriksi parçalayan matriks metalloproteinazlar (MMPs) ve endotel hücre migrasyonu ve proliferasyonunu ve yeni kan damarlarının oluşumunu stimüle eden vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi iki temel proanjiyogenik faktör tarafından kontrol edilir (Oak ve ark., 2005). Bu faktörler, tümör hücreleri tarafından salınırlar. Tümör anjiyogenezi herhangi bir kanser baskılayıcı gen tarafından kodlanan anjiyogenez-inhibe edici faktörün kaybı ile ilgili olabilir. Tümörlerin damarlanmadıkları takdirde 1-2 mm'lik çapı yada kalınlığı aşacak

şekilde büyümediklerine ilişkin çok sayıda deneysel ve klinik kanıt bulunmaktadır ( Ferrara, 2004; Su ve ark., 2005; Franks ve Teich, 1996).

Biyolojik araştırmalarda canlılar bir bütün olarak (*in vivo*) veya canlıdan alınan organ, doku veya hücre gibi yapıların laboratuvar şartlarında (*in vitro*) incelenmesi şeklinde yapılır.

Hayvan ve insanlar arasındaki biyolojik farklılıklar nedeniyle deneylerden elde edilen sonuçların insanlar üzerindeki geçerliliği kesin olmamaktadır. Bu nedenle bu tip çalışmalar için en uygun yöntem doku veya hücre kültürü tekniğidir (Ozban, 1988).

Doku kültürü, bir hayvandan veya bitkiden hücrelerin, dokuların veya organların çıkarılması ve bunların sonradan büyümeye olanak sağlayan yapay bir ortama yerleştirilmesini ifade eden genel bir terimdir. Süregelen fonksiyonlar ve gelişimler üzerine çalışma amacını gerçekleştirmek için sıvı veya yarı katı medyum içeren bu plastik kültür kaplarına organ kültürü denmektedir. Erişkinlik aşamasından önce veya bu aşama sırasında komşu hücreler ile olan normal ilişkilerini bozarak organ parçalarından hücrelerin çıkarılmasına hücre kültürü denmektedir.

Hücre kültürleri aşağıda belirtilen alanlar üzerine çalışmak için iyi bir model sistemi sağlamaktadır:

1. Temel hücre biyolojisi (hücreler arası haberleşme ve bağlantılar, hücre şekli, hücre bölünmesi, hücre iskeleti, çekirdek, protein sentezi, DNA replikasyonu)
2. Hastalığa neden olan ajanlar ile hücreler arasındaki etkileşim.
3. İlaçların hücreler üzerindeki etkileri.
4. Yaşlanma süreci ve tetikleyicileri
5. Beslenmeye ilişkin çalışmalar.

Bilinen kanser türleri nedeniyle gerçekleşen ölüm vakalarının sayısı hala tolere edilemeyecek kadar yüksektir. Karsinogenezde meydana gelen süreçlerin anlaşılmasında birçok tedavi ajanı bulunmasına rağmen, doğal ürünlerin, kimyasalların zararlı etkilerini önleyici ajanlar olarak kullanımına ilişkin tasarımların önemi yeniden gözden geçirilmediği sürece mevcut ölüm istatistikleri değişecek gibi görünmemektedir. Doğal veya yarı sentetik bileşikler, yayılma

eğilimi gösteren kanserlerin gelişimini durdurabilir, geriye döndürebilir veya önleyebilir. Hücrel karsinogenez; önleyici ürünlerin tanımlanması, bunların aktivitelerinin sonucu ve tedavinin başarısı veya başarısızlığı için biyolojik bir temel oluşturmaktadır ( Reddy ve ark., 2003).

Literatür, dünya çapında görülen yaygın kanser vakalarında doğal ürünlerin, kimyasalların zararlı etkilerine karşı koruyucu ajanlar olduklarını göstermektedir. Bu ürünlerin büyük bir çoğunluğunu oluşturan bir gruba, güçlü antioksidandır, bir kısmı ise doğal ortamlarında fenol içerenlerden oluşmaktadır; kalanlar ise reaktif gruba içeren koruyucu niteliklere sahip olanlardır. Bu doğal ürünler sebzelerde, meyvelerde, bitki özlerinde ve otlarda bulunur.

Prensip olarak anjiyogenik moleküllerin üretilmesinin inhibisyonu ya da bunlara verilen endotel hücre yanıtının engellenmesi tümör tedavisinde yararlı olabilir. Bu yaklaşımlara yönelik çabalar sürmektedir. Bu amaçla doğal ürünlerden ve kimyasal sentezlerden peptid inhibitörleri olarak; angiostatin, endostatin, canstatin, mikrobiyal metabolitlerden elde edilen düşük molekül ağırlıklı thalidomide, TNP470, radicicol ve FK228 gibi bileşikler, metalloproteinaz inhibitörleri olarak marimastat ve sesquicillin gibi birçok anjiyogenez inhibitörleri geliştirilmiştir (Jung ve ark., 2003).

Hedeflerine göre anjiyogenez inhibitörleri doğrudan ve dolaylı inhibitörler olarak ikiye ayrılabilirler. Dolaylı inhibitörler esas olarak anjiyogenik faktörlerin biyolojik aktivitesini bunların kendi aleyhine çeviren bileşikler kapsarlar. Tümörlerde birçok anjiyogenik faktörler ve sitokinler bulunmaktadır (Cao, 2004; Lu ve ark., 2004). Bu anjiyogenik faktörler arasında vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ailesi günümüz tümör anjiyogenezi araştırmalarında odak noktasını oluşturmaktadır, zira tümü olmasa da birçok tümör yüksek seviyede VEGF içermektedir (Cao, 2004). VEGF, diğer hücreleri değil ama sadece kan endotel hücrelerini hedef alan ve muhtemelen en yaygın olarak bilinen spesifik anjiyogenik faktördür (Cao, 2004; Semenza, 2003).

Folkman ve meslektaşlarının 1970'lerde yaptıkları klasik çalışmalar tümörlerin büyüme sürekliliğinin, devamlı yeni damar gelişimini gerektirdiğini ve anjiyogen tepkinin engellenmesinin tümörün uyku haline geçmesine neden olduğunu göstermiştir (Stetler-Stevenson ve Kleiner, 2001; Gimbrano ve ark.,

1972; Brem ve ark., 1976). Bu çalışmalar tümör hücrelerinin anjiyogen tepkiyi (anjiyogen faktörler) tetikleyen çözünür faktörler salgıladıklarını ileri sürmüştür. Bu süreç anjiyogen dönüşüm-nonanjiyogenden anjiyogen fenotipe dönüşüm olarak adlandırılır (Stetler-Stevenson ve Kleiner, 2001; Hanahan ve Folkman, 1996).

Anjiyogenezin engellenmesi, oksijen ve besin kaynağının kesilmesi aracılığıyla tümörün büyümesini durdurduğundan, tümör anjiyogenezini kanser terapisi için yeni hedefler sağlamaktadır. Anti-anjiyogenik terapinin, sitotoksik kanser ilaçlarının sık sık görülen ağır yan etkilerini taşımadığı düşünülmektedir. Ayrıca anti-anjiyogenik terapinin, sadece başlıca tümör dokularını yok etmediği aynı zamanda tümör metastazını da durdurduğu düşünülmektedir. Ancak bu terapinin sadece anjiyogenik olayları durdurduğundan dolayı mı tümörün gerilemesine neden olduğu kesin olarak bilinmemektedir. Son zamanlarda anti-neovasküler terapi (ANET) isimli yeni bir anti-anjiyogenik terapi gündeme gelmiştir. Sitotoksik anti-kanser ilaçları çoğalan yeni neovasküler endotel hücrelere ve aynı zamanda tümör hücrelerine zarar verdiğinden, bu terapi anjiyogenik damar sistemini hedefleyen anti-kanser ilaçlarını kullanmak suretiyle yeni oluşmuş kan damarlarına zarar vererek tümör hücrelerinde dolaylı öldürücü hasara yol açmaktadır. Bunun dışında yeni neovasküler endotel hücrelerinin ilaçlara dirençli olması da beklenmemektedir. Doğrudan tümör hücrelerini hedef alan geleneksel kemoterapinin ağır yan etkileri ve düşük özgüllük gibi potansiyel problemleri bulunmaktadır. Diğer yandan Shimizu ve Oku, (2004) ANET de yeni damarlara DDS (Drug Delivery System=İlaç Dağıtım Sistemi) teknolojisi ile geleneksel anti-kanser ajanları verildiğinde ağır yan etkiler baskılanarak durdurulabileceğini rapor etmişlerdir.

## 1.1. ANJİYOGENEZ

Anjiyogenez, önceden var olan damarlardan yeni kan damarlarının oluştuğu karmaşık bir olaylar dizisidir (Folkman, 1971; Folkman, 1990; Carmeliet ve ark., 2000; Okaji ve ark., 2004; Oak ve ark., 2005; Su ve ark., 2005; Folkman ve ark., 1992; Beloussow ve ark., 2002; Jung ve ark., 2003; Celec ve ark., 2005;



Folkman ve ark., 1995; Tong ve ark., 2004; Wang ve ark., 2004; Sing ve ark., 2002; Xin ve ark., 1999; Lin ve ark., 2003; Auerbach ve ark., 2003; Folkman,1986).

Anjiyogenez kelimesi ilk kez Hertig tarafından 1935 yılında isimlendirilmiş, mekanizması ise Folkman tarafından tümör anjiyogenezi çalışmalarında gösterilmiştir (Wang ve ark., 2004; Folkman, 1972; Folkman ve Klagsbrun, 1987).

Anjiyogenez doku kütleindeki ve bunun sonucu olarak besin ve oksijen ihtiyacındaki artışa cevap olarak oluşan karmaşık bir mekanizmadır (Tong ve ark., 2004). 2 mm. ye kadar olan tümörler besin ve oksijen ihtiyaçlarını basit difüzyon ile karşılayabilirler. Tümörün daha fazla büyüebilmesi için ev sahibi dokudan gelişecek kılcal damarlarla tümörün damarlanması gerekir (Ferrara, 2004; Franks ve Teich, 1996; Folkman, 2000). Anjiyogenezin başlaması proanjiyogenik ve anti-anjiyogenik uyaranlar arasındaki denge ile düzenlenir (Tong ve ark. 2004; Hanahan ve Folkman, 1996; Fidler 2001; Fidler ve Ellis, 1994; Liotta,1996). Bu moleküller anjiyogenez mekanizmasının birçok aşamasına aracılık ederler ve anjiyogenez ile ilişkili olmayan farklı nitelikteki hücre tiplerini de etkileyebilir. Anjiyogenik faktör daha sade bir biçimde endotel hücreleri ve bağlantılı kan damarlarının çevresindeki yapıların (örneğin perisitler, vasküler düz kas hücreleri) karakteristik özelliklerini belirgin şekilde değiştiren ancak diğer hücre tiplerinin fonksiyonlarını etkilemeyen bir faktör olarak tanımlanabilir. Tümör hücreleri temel olarak anjiyogenik faktörleri hücre yüzeyinde artık olarak bırakırlar veya dış uyaranlara tepki verirler. En etkili dış anjiyogenik faktör uyaran ise hipoksidir. Hipoksi, bir dokunun kötü bir şekilde üzerinin kapanmasının bir sonucudur ve teleolojik olarak hayatta kalmaya çalışan bir hücrenin bu olaya tepki vermesidir (Fidler ve ark., 2001). Tümör büyüdükçe ve tümörün merkezindeki hücrelerde hipoksi meydana geldikçe tümör, kendi kan ihtiyacını karşılamak için ikmale başlamaktadır. Bu sürece anjiyogenik dönüşüm denir ve çeşitli anjiyogenik faktörlerin salgılanmasına, anjiyogenez önleyicilerin ortadan kalkmasına veya baskılanmasına neden olmaktadır (Stetler, ve ark., 2001). Tümörün damarlaşması, tümörün metastatik potansiyelinin artmasında rol oynar (Oak ve ark., 2005).

Anjiyogenez, embriyogenez ve fetal gelişim sırasında kesintisiz olarak görülmektedir (Belaussow ve ark., 2001; Ferrara, 2004; Eun ve Koh, 2004; Andre ve ark., 1998). Yetişkinlerde ovulasyon, yara iyileşmesi, plasenta formasyonu, kemik tamiri gibi olaylar dışında sınırlanmıştır ve bu olaylar sırasında meydana gelen anjiyogenez, fizyolojik anjiyogenez olarak tanımlanmaktadır (Folkman, 1985; Auerbach ve Auerbach, 1994; Reynolds ve Redmer, 1998; Singh ve ark., 2002; Jung ve ark., 2003, Shao ve Guo, 2004). Tümör gelişimi, ilerlemesi, yayılması ve metastaz, diyabetik retinopati, yaşlanmaya bağlı makular dejenerasyon, sedef hastalığı, romatoid artrit, granülasyon doku formasyonu, hemanjiyo, kronik akciğer hastalıkları gibi hastalıkların gelişimi sırasında meydana gelen anjiyogenez ise patolojik anjiyogenez olarak adlandırılır (Folkman, 1971; Yamamoto ve ark., 1997; Carmeliet ve ark., 2000; Margeli ve ark., 2003; Eun ve Koh, 2004).

Anjiyogenezin başlaması; vasküler endotel büyüme faktörü ailesi (VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D), asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörü (aFGF, bFGF), trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF) gibi proanjiyogenik büyüme faktörlerinin endotel hücrelerini aktive etmesi ile tetiklenir (Jung ve ark.,2003; Tong ve ark., 2004; Margeli ve ark., 2003; Hanahan ve Folkman 1996; Bussolino ve ark., 1997; Kuwano ve ark., 2001; Bisacchi ve ark., 2003). Bu anjiyogenik faktörler tümör hücrelerinde ve komşu stromal hücrelerde üretilirler, bunlar çevredeki endotel hücrelerinde bulunan reseptörlerine bağlanırlar ve anjiyogenik sinyallerin aktarımını sağlarlar (Shimizu ve Oku, 2004). Daha sonra kan damarı oluşumu için gerekli olaylar dizisi başlar. İlk olarak ekstrasellüler matriks proteinleri matriks metalloproteinaz (MMPs) tarafından parçalanır. Endotel hücreleri CD31, CD144,  $\alpha\beta 3$  integrinler gibi hücre membran adhezyon molekülleri sayesinde bozulmuş ekstrasellüler matrikse göç ederler. Bu göçün ardından endotel hücreleri yeni kan damarı yapımı için gerekli hücre sayısını sağlamak amacıyla çoğalırlar. Bu çoğalmadan sonra üç boyutlu tubular yapı oluşumu gerçekleşmektedir (Oak ve ark., 2005; Xin ve ark., 1999; Auerbach ve ark., 2003; Bussolino ve ark., 1997; Kuwano ve ark., 2001; Ferrara, 2004; Kahn ve ark., 2000; Folkman, 1986; Liotta ve ark., 1991; Risau, 1997; Klagsbrun ve Moses 1999). Daha sonra damar ağında stabilizasyon için

bazal membranın yeniden yapılanması, hücre çoğalmasının durması, bağlantı komplekslerinin oluşması ve perisitlerin damar duvarlarını desteklemek üzere düzelmesi gibi anjiyogenez mekanizması sırasında meydana gelen olayların tersi meydana gelir (Ferrara N., 2004).

Tümör anjiyogenezi tümör kitlesinin yayılmasını ve kan yoluyla dağılmasını sağlamaktadır (Folkman, 1971; de Vos ark., 2004). Endotel hücreleri çoğalır, çevrelerinde bulunan tümör hücreleri hücre dışı matrikse göç eder ve daha sonra farklılaşırlar. Bu durumda endotel ağ ile birlikte geniş bir sinosoid ve kör uçlu damarlar ortaya çıkmaktadır (Dravok, ve ark., 1999; de Vos ve ark., 2004).

### **1.1.1. Anjiyogenezde rol alan anahtar faktörler**

#### **1.1.1.1. Tümördeki endotel hücreleri**

Endotel hücrelerinin damar duvarlarında bariyer olmanın ötesinde görevleri bulunmaktadır. Koagülasyon akışı sürecini düzenlerler, vazo-aktif unsurları üretirler (örneğin; endotel türevi relaxing faktör, nitrik oksit). Makro moleküllere karşı bir bariyer oluştururlar ve aynı zamanda hücrenin çevre dokulara doğru hareketini sağlarlar (de Vos ve ark., 2004; Fajardo, 1989). Tümörün endotel hücreleri, normal doku damarlarında sıralanan endotel hücrelerinden nitelik olarak farklılaşırlar. Bu farklılaşmanın sonucu olarak kopyalama ekspresyonu artar veya yok olur. Böylece farklı endotel işaretleyici oranı ile çevreleyen matrikste farklı protein konsantrasyonu ortaya çıkar (St Croix, 2000). Anjiyogenez, normal dokularda bulunan vasküler sistemden farklı bir tümör vasküler sistemin oluşmasına yol açar. Tümörlerde bol miktarda geniş bir sinosoid yapı ve kör uçlu damarlar bulunur. Kaotik yapı ve buna bağlı olarak gerçekleşen kan akışı paradoks oluşturarak tümörün anjiyogenezi başlatmasına neden olan hipokside ve ortam asitliğinde artışa neden olmaktadır (de Vos ve ark., 2004; Carmeliet, 2003).

### 1.1.1.2. Dolaşımda bulunan endotel hücreleri

İskemik doku VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor, Vasküler Endotel Büyüme Faktörü), PDGF(Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü) gibi büyüme faktörleri salgılar. Çevre hücrelerce büyüme faktörlerinin üretiminde meydana gelen bu artış, matriks metalloproteinaz 2, 3 ve 9 (MMP-2, MMP-3, MMP-9) ekspresyonuna neden olur (Heissing ve ark., 2002; Eriksson ve ark., 2002; de Vos ve ark., 2004). MMP-9, kemik iliğinde oluşmuş olan ve dolaşımda bulunan endotel hücrelerini iskemik dokuya doğru çekmektedir (Rafii ve Lyden, 2003). İskemi hastalıklarında veya habis dokuları olan hastalarda dolaşımda bulunan endotel hücrelerinin dağılımı değişime uğradığı gibi sayıları da farklılık göstermektedir. Ayrıca fibroblastlar, monositler ve makrofajlar gibi duvar hücrelerinin kimyasal düzeninden kaynaklanan çoğalması ve farklılaşması, tümör nekroz faktörü- $\alpha$  ve trombospondin-1 (TSP-1) gibi anti-anjiyogenik faktörlerin salınımına neden olmaktadır (de Vos ve ark., 2004; Rehman ve ark., 2003; Ezaki ve ark., 2003; de Vos ve ark., 2004).

### 1.1.1.3. Perisitler

Bu hücreler vasküler bazal membranda bulunurlar ve  $\alpha$ -düz kas hücresinde bulunan aktin ( $\alpha$ -SMA) gibi belirli olmayan işaretleyiciler olarak tanımlanırlar (Nehls ve ark., 1991; Abramsson ve ark., 2002; de Vos ve ark., 2004). Perisitler anjiyogenezin son safhası için önemlidirler. Çünkü VEGF ve PDGF üretimindeki artış perisitlerin aktivasyonunu hızlandırır (Benjamin ve ark., 1998; de Vos ve ark., 2004) Anjiyogenezin farklı safhalarında anti-anjiyogenik terapilerin kombinasyonunun endotel hücreleri ve perisitleri hedef alması genişlemiş tümörleri son safhalarında etkileyebileceği gibi ikincil büyümeleri de etkileyecektir (de Vos ve ark., 2004; Benjamin ve ark., 1998).

#### 1.1.1.4. Tümörün mikroçevresi

Yeni oluşan tümör vasküler ağı, birçok anjiyogenik faktör içeren ekstrasellüler matrikse (ECM) gömülü haldedir. Ekstrasellüler matriks birbirinden farklı bileşimlere sahip dört katmandan oluşmaktadır. Bunlar; bazal membran, elastik doku katmanı, kas dokusu katmanı ve bağ dokusu katmanıdır. Hipoksi yolağları ile anjiyogenez arasındaki etkileşim, ekstrasellüler matriksde meydana gelen reaksiyonun lokal metabolizmada ve fizyolojide sebep olduğu değişimlerin altını çizmektedir (de Vos ve ark., 2004).

#### 1.1.2. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)' nün anjiyogenezdeki rolü

Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) hem patolojik hem fizyolojik anjiyogenez olaylarında anahtar rol oynamaktadır (Margeli ve ark., 2003; Ferrara, 2004; Eubank ve ark., 2003; Eun ve Koh, 2004; Celec, 2005; Bisacchi, ve ark., 2003). VEGF ilk olarak damarsal geçirgenliğe neden olan çözünebilen bir faktör olarak tanımlanmıştır. VEGF'nin anjiyogenezdeki önemli rolü, VEGF kusuru bulunan hayvanların embriyogenezden sağ kurtulamaması ile tanımlanmıştır. Ama VEGF en bilinen rolünü insan kanserlerinde oynamaktadır. Vasküler endotel büyüme faktörü-vasküler geçirgenlik faktörü (VEGF/VPF), tümör hücrelerinin doku kültürü medyumuna veya *in vivo* (Fidler, 2001; Senger, 1983) asidoz sıvısına salgıladığı ilk faktör olarak tespit edilmiştir. Bu faktör moleküler ağırlığı 32 kD'dan 42 kD'a kadar uzanan heparin bağlayıcı bir protein olarak tanımlanmış ve VPF olarak adlandırılmıştır. Daha sonra VPF'nin endotel hücre bölünmesini de indüklediği görülmüştür (Fidler, 2001; Connolly, 1989). Ayrıca birçok araştırmacı grubu tarafından endotel hücre kültürleri için belirgin mitojenik aktiviteye sahip, VEGF olarak adlandırılan bir protein rapor edilmiştir (Fidler, 2001; Ferrara ve Henzel, 1989; Gospodarowicz, 1989). Aminoasit ve tamamlayıcı DNA dizisi analizleri sonucunda VEGF ve VPF'nin aynı protein olduğu görülmüştür (Fidler, 2001; Thomas, 1996). VEGF bu anjiyogenik faktörü tanımlamak için daha yaygın olarak kullanılan bir isimdir (Fidler, 2001). VEGF, endotel hücreleri için etkili bir mitojendir ve periferel damarların iskemik

hastalıklarını tedavi etmek için klinikte kullanılmaktadır (Margeli, 2003; Yamakawa, 2000).

Anjiyogenez çok aşamalı bir süreçtir ve VEGF birçok aşamada rol almaktadır (Ferrara, 2004).

1. VEGF damar endotel hücreleri için etkili bir mitojendir ama birkaç istisna dışında diğer hücre tipleri için mitojen değildir.
2. VEGF ekstrasellüler matriksin azalmasına neden olan enzimlerin aktivasyonuna ve salgılanmasına aracılık eder. Endotel hücrelerde VEGF; plazminojen aktivatörünün ve inhibitörünün ekspresyonuna, urokinaz reseptörünün ekspresyonuna ve doku metalloproteinaz 1 ve 2 enzimlerinin inhibitör seviyelerinin düşmesine neden olurken, dokular arasında kollojenaz ve jektinaz A matriks metalloproteinaz enzimlerinin ekspresyonuna neden olmaktadır.
3. VEGF apoptozin engellenmesi sırasında endotel hücreleri için kurtarıcı bir faktör olarak rol oynar. Bu faaliyet; antiapoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-A1 ekspresyonunun indüklenmesi, fosfotidilinositol 3-kinaz/Akt yolağının düzenlenmesi, fokal adhezyon kinaz enziminin fosforilasyonunun artması ve endotel hücrelerinin prostoglandin üretmeleri için uyarılması esnasında ortaya çıkmaktadır.
4. VEGF; kemik iliğinden türemiş endotel hücre öncülerinin hareketlenerek damarlaşmayı ilerletmesi için gereklidir.
5. VEGF, endotel hücrelerin bölünmesini ilerletmesine ek olarak anjiyogenez alanlarına göçün ayarlanmasında önemli bir role sahiptir (Ferrara, 2004).

Tümörlerin ürettiği VEGF miktarına bağlı olarak şu şekilde pozitif bir geribildirim döngüsü oluşmaktadır: VEGF kaynaklı anjiyogenez ilerlemesi tümörün gelişimini arttırır ki, bu da VEGF salgısının artışına neden olmaktadır. Bu tip gelişmeler, endotel hücrelerin VEGF reseptörleri ekspresyonunun VEGF aracılığıyla oluşturulması ile daha da arttırılabilir (Ferrara, 2004; Barleon, 1996).

Ayrıca tümör anjiyogenezi, kemik iliğinden türeyen endotel hücrelerini destekler; bu süreç de VEGF'ye bağlıdır.

VEGF sinyalinin engellenmesi tümör damarlarının duvarlarındaki tüm bileşenlerde güçlü ve süratli değişikliklere neden olabilir. 24 saat içerisinde damarsal sürgün baskılanır, luminal açıklık kaybolur ve bazı damarlardaki kan akışı durur. Bazı endotel hücreler apoptosize uğrar ve yok olur. 7 günde tümör damarlaşması %80'e yakın azalır. Tedaviden sonra sağ kalan tümör damarları endotel boşluktan yoksun kalır ve VEGFR-2 ve VEGFR-3 ekspresyonları azalır. Bu değişiklikler, anjiyogenez inhibitörlerinin bazı tümör damarlarını yok ettiği ve diğerlerini de normalizasyon olarak adlandırılan süreçle daha normal fenotiplere dönüştürdüğünü gösteren kanıtlarla uyumludur (Baluk, 2005).

### **1.1.3. Tümörün neovaskularizasyonu**

Sağlıklı dokularda olduğu gibi tümörün neovaskularizasyonu; anjiyogenez, vaskulogenez ve invaginasyon olaylarını içermektedir (Cao, 2004). Son zamanlarda, yeni oluşmuş kan damarlarına kök hücrelerden özelleşmiş dolaşım halindeki endotel hücrelerinin eklenmesi olarak adlandırılan vaskulogenezin tümör damarlaşmasında kritik bir öneme sahip olduğu keşfedilmiştir (Cao, 2004; Lyden, 2001). Ayrıca geniş ana damarların daha küçük yavru damarlara bölünmesi işlemi olarak adlandırılan invaginasyon olayının da tümör damarlarının büyümesinde rol aldığı bildirilmiştir (Cao, 2004; Dvarok, 2002). Tümörlere bağlı olarak ortaya çıkan bu çeşitli ve karmaşık anjiyogenik işlemler, tümörün yeni damar oluşumunu etkin bir biçimde bloke etmek için birden çok yaklaşımın gerekli olduğunu ortaya koymaktadır.

### **1.1.4. Tümör Damarlarının Yapısı**

Ev sahibi dokudan yeni kan damarı oluşturabilme yeteneklerine rağmen, tümör damarları ile ev sahibi dokunun damarları arasında esaslı farklar bulunmaktadır. Morfolojik olarak tümör damarları düzensiz, heterojen ve sızdırma özelliğinde olan damarlardır. Bu özellikler normal kan damarlarının bütünlüğünü

bozan başlıca işaretlerdir (Cao, 2004; McDonalds ve Baluk, 2002). Tümör kan damarları, normal damarlar gibi endotel hücreleri, duvar hücreleri (perisitler veya düz kas hücreleri) ve bazal membrandan oluşmaktadır. Tümörlerin kan damarlarında yapısal ve fonksiyonel çeşitli anormallikler vardır. Eşine az rastlanır şekilde dinamikler ve damarcıklanmaya, çoğalmaya, yeniden şekillenmeye veya gerilemeye maruz kalırlar. Damarlar düzensiz kıvrımlı olarak şekillenmişlerdir ve arteriol, kapiller ve venüllerin hiyerarşik düzenine sahip değildirler (Baluk ve ark. 2005). Tümörlerdeki endotel hücreleri de düzensizdir ve sıradışı şekillere sahiptirler, bazen birbirlerinin üzerlerine binebilirler ve damarcık oluşumuna neden olan tüp içindeki boşluktan dışarıya doğru uzanabilirler (Cao, 2004). Anormal gen ekspresyonuna sahiptirler, canlı kalmak için büyüme faktörlerine ihtiyaçları vardır ve plazma proteinlerine karşı bozulmuş bir bariyer işlevi görmektedirler (Baluk ve ark., 2005). Tümör damarlarını oluşturan endotel hücreleri normal endotel hücrelerden 20 ile 2000 kat daha hızlı çoğalırlar (Gong ve ark., 2004). Tümör damarlarındaki perisitler de anormallik göstermektedir. Anormal endotel hücreleri ve perisitler bozulmuş bir bazal membran oluşumuna neden olurlar (Baluk ve ark., 2005). Tümör damarlarında normal bariyer görevini yerine getirebilmek için gerekli olan endotel katman yoktur. Bu anormallik sızıntıya neden olmaktadır (Hatshizume ve ark. 2000; Baluk ve ark., 2005) ve lenfatik damarlar olmadan veya birkaç lenfatik damarla ve kasılabilir stromal unsurla birlikte dokular arası sıvı basıncını arttırmaktadır (Jain ve ark., 2002; Baluk ve ark., 2005). Tümör damarlarının yapısal anormallikleri ve dokular arası yüksek basınç, kan akışını tehlikeye sokabilir ve ilaç alımını engelleyebilir (Padera ve ark., 2004; Baluk ve ark., 2005). Lenfatik damarların tümörlerin içine doğru büyümesi potansiyel olarak dokular arasındaki sıvı basıncını azaltabilir ancak lokal lenf düğümlerine metastaz riskini arttırabilir (Baluk ve ark., 2005). Bu yüzden tümör damarlarının ve kan dolaşımının normalleştirilmesi, tümör dokusuna ilacın dağılımını geliştirecektir. Sağlıklı dokulardaki kan damarlarından farklı olarak tümör damarlarında, arterioller ve venüller arasında açık bir fark görülmemektedir. Bu anormal damar yapısının sonucu olarak da tümör damarlarındaki kan akışı kaotiktir. Örneğin, tek bir damar merkezden uzak tümör hücrelerine kanı taşıyabilir ve tümör dokularından kanı toplayabilir. Böylece



tümör dokusunda oksijen bakımından yetersiz kan dolaşımı nedeniyle görel olarak hipoksi görülür (Cao, 2004; Jain, 2002). Tümör damarlarının sıradışı sızdırma özelliği dokular arası basıncın yükselmesine neden olur ve bu şekilde tümör dokusuna temiz kanın girmesi daha fazla engellenir. Bundan dolayı tümör damarlarının ve kan dolaşımının normalleştirilmesi tümör dokusuna ilacın dağıtımını geliştirmektedir. Sızdıran tümör damarlarının normalizasyonunun da tümör hücrelerinin dolaşıma girmelerini sınırlayarak, kanserin metastaz yapmasını önlemesinin mümkün olduğu rapor edilmiştir (Cao, Y., 2004).

### **1.1.5. Tümör anti-anjiyogenezinin geleneksel sitotoksinlerin sistemsel vasküler toksisitesi ile karşılaştırılması**

#### **1.1.5.1. Doğrudan anti-anjiyogenez stratejilerinin dolaylı olanları ile karşılaştırılması**

Anjiyogenik sürecin hedeflenmesi sonucunda sistematik bir yaklaşımı ve ilaca karşı direnç problemini aşacak olası bir alternatifi içeren yeni bir tedavi modeline ihtiyaç duyulmuştur. Yapılan kapsamlı araştırmalar sonucunda çok sayıda yeni anjiyogenik inhibitörler keşfedilmiştir. Bunlar; büyüme faktörü inhibitörleri (Doll ve ark., 2001), endotel hücrelerin sinyal iletimi inhibitörleri (Maeshima ve ark., 2002), ve endotel hücrelerin çoğalmasını (Guo ve ark., 2001), canlı kalmasını (Reinmuth ve ark., 2001), kemik iliği endotel hücre öncüsünü ve endotel hücrelerin salınımını engelleyen inhibitörlerdir. Anjiyogenez, aynı zamanda tümör hücrelerine karşı dolaylı olarak ve spesifik olmayan sitotoksik etkiler ile de hedeflenebilir. Eğer tümörün büyümesi tümör hücrelerini hedef alan müdahaleler ile önlenirse, tümör hücrelerinin VEGF gibi faktörleri azalan miktarlarda üretmesi anjiyogenik anahtar anjiyogenez sürecinin önlemesi yönünde açar. Tümör anjiyogenezini baskılama düşüncesi ile geliştirilmemiş olsalar da; geleneksel veya klasik sitotoksikler gibi bir kısım ilaçların olası anjiyogenez inhibitörleri oldukları düşünülmektedir (de Vos, ve ark., 2004; Lennernas, ve ark., 2003). Geleneksel anti-kanser ilaçlarının, tümörün büyümesini bloke etme veya baskılama yoluyla ‘tesadüfi’ etkileme potansiyeli, anti-kanser ilaçlarının klinik

olarak tek başlarına mı yoksa diğer ilaçlarla birlikte mi kullanılacağı hususlarında yönlendiricidir (de Vos ve ark., 2004).

### 1.1.5.2. Tesadüfi anti-anjiyogenez

Çeşitli geleneksel veya yeni kanser ilaçlarının ve tedavi yöntemlerinin ‘tesadüfi’ anti-anjiyogenik etkisi büyük ihtimalle onkologlarca yıllardır kliniklerde anlaşılmasızın kullanılmaktaydı (Kerbel ve ark., 2000). Bu geleneksel sitotoksik ilaçların tedavi modeli, normal hücrelere mümkün olduğu kadar az ikincil hasar vererek tümör hücrelerinin yok edilmesi üzerine kuruludur. Ancak tümör hücresi olmayan hücrelere verilen bu hasarın, şimdilerde faydalı olduğu düşünülmektedir. Vasküler toksisiteler, potansiyel anti-anjiyogenik kabiliyetlerinin göstergeleri olarak, klasik sitotoksikler ile ilişkileri de gözönüne alınarak yeniden incelenmelidir. Son yıllarda yapılan bir kısım önlinik ve klinik çalışmalarda, klasik sitotoksiklerin toksik etkilerinin yanında tümör hücreleri ve endotel hücreler üzerinde faydalı etkileri olduğu gözlemlenmiştir (Belotti ve ark., 1996; Schirner ve ark., 1998; de Vos ve ark., 2004).

Kemoterapi ilaçlarının anti-anjiyogenik aktiviteler sırasındaki anti-tümör aktiviteleri için gerekli kriterler Miller ve arkadaşları (2001) tarafından son zamanlarda ileri sürülmüştür. Bu kriterler şöyledir:

1. Endotel sitotoksitesi, kanser hücreleri için gerekli toksik etkinin elde edilmesini sağlayacak dozdan daha azı kullanılarak gerçekleştirilmektedir (de Vos ve ark., 2004; Belotti ve ark., 1996; Vacca ve ark., 1999).
2. Kemoterapi ajanı, endotel hücrenin ölümüne neden olmadan hücrenin işlevlerine müdahale etmektedir (Clements ve ark., 1999).
3. Anjiyogenik süreçte ne kadar çok sayıda kritik safha etkilenirse o kadar iyi olduğu gözlenmiştir.(de Vos ve ark., 2004).
4. Kemoterapi ilaçlarının anti-anjiyogenik aktivitesi sadece *in vitro* değil, *in vivo* da da görülmektedir. Bu kriterler kesin bir standarda oturtulmamışsa da sitotoksiklerin anti-anjiyogenik özelliklerinin tanımlanmasında yardımcı olabilirler. Buna zıt olarak sitotoksiklerin anti-endotel etkileri bu ilaçların vasküler toksisitesi olarak da gözlemlenebilir. Varsayılan mekanizma esas

alınarak bu ilaçların kullanımından sonra gözlemlenen vasküler hasar farklı gruplar halinde kategorize edilebilir (Doll ve Yarbro, 1992). Bunlar; koagülasyon faktörlerinin aktivasyonu (Licciardello ve ark., 1985), otonom fonksiyon bozuklukları (Hansen, ve ark.,1990; Roca ve ark., 1985), kan damarlarında inflamasyon (vasculitis) ve fibroblastların uyarılması olarak sınıflandırılabilir (Moseley, ve ark., 1986). Bu tip hasarlar; akciğer venüllerinin tıkanması hastalığı, karaciğer venüllerinin tıkanması hastalığı, Raynaud fenomeni, miyokardiyal iskemi ve damar tıkanıklığı, serebrovasküler ataklar, toplardamar trombozisi, tromboembolik komplikasyonlar ve hipertansiyon gibi çeşitli vasküler toksisiteye yol açabilir (de Vos, ve ark., 2004; Doll, ve ark., 1994; Zafrani, 1997).

#### **1.1.6. Tümör anjiyogeneziinde terapi yaklaşımları**

Tümör anjiyogenezi kanser ilaçlarının en aktifi olmasa bile aktif alanlarından birini teşkil eder. Konunun çekiciliği, tümörün hipoksiye verdiği tepki sonucunda tümör anjiyogenezinin tetiklenmesinden kaynaklanmaktadır. Öte yandan kendi sonuçları itibariyle, konukçudan türeyen bir süreçtir ve bu suretle kanser tipi, varsayılan tümörün heterojenliği, genetik yada kromozom kaynaklı değişkenlik ve ilaca karşı direnç gibi diğer anti kanser terapi modellerinin çeşitli ve zorlu engellerinden uzaktır. Bu nedenle tümör anjiyogenezinin çeşitli solid kanser türleri ile karşılaştırılabilir olduğu düşünülmektedir. Bu doğru ise birçok durumda aktive edilmiş endotel hücre, bazal membranın şekil değiştirmesi ve perisitlerin işlevi gibi unsurlar üzerinde durulabilir ve tümör anjiyogenezinin biyolojisine ilişkin hızla artan kanıtlara dayanılarak terapi yöntemleri tasarlanabilir (Matter, 2001).

##### **1.1.6.1. Terapi yaklaşımları**

Tümör anjiyogeneziine dayalı terapi yaklaşımları iki ana sınıfta toplanabilir. Bunlardan birincisi yeni kan damarlarının oluşum sürecine karışan vaskülostatik ajanlardır. İkincisi ise yeni oluşmuş kan damarları unsurlarının toksik maddeleri

hedeflemek için kullanan vaskülotoksin ajanların yok edilmesi ve böylece antitümör etkiler yaratmaktır. Vaskülostatik yaklaşımlar arasında hedeflenen ve birçok araştırmacının dikkatini çeken bazı aileler bulunmaktadır (Matter, 2001). Bu aileler:

- Ligand-reseptör aileleri: Endotel hücre seviyesinde neovaskularizasyonu düzenlenlerler, bunun için (tirazin-kinaz reseptörünün kinaz aktivitesini engellemesi gibi) küçük moleküller de dahil olmak üzere çeşitli yaklaşımlar kullanılabilir.
- Antikorlar (Reseptörleri bloke etme veya ligandları nötralize etme)
- Antisense moleküller
- Antisense moleküllerin kullanılmasını öneren gen terapisi
- Reseptörlerin dominant-negatif mutantlarıdır.

Bu yaklaşımların pek çoğu hastalar üzerinde denenmektedir ve bazıları ileri klinik deneme safhasındadır (Matter, 2001).

## 1.2. ANJİYOGENEZ-KANSER İLİŞKİSİ

Kanserde tümörlerin büyümesi yeni kan damarlarının anjiyogen büyümesine bağlıdır (Fortier ve ark., 1999; Folkman, 1990). Tümörler, yeni damarların oluşumunu tahrik eden faktörleri salgılayarak büyürken damar düzenlerini oluştururlar. Damar gelişiminde baskın işlem anjiyogenez sayesinde mevcut damarlardan yeni damarcıkların oluşmasıdır (Carmeliet, 2000; Baluk ve ark., 2005; Verhaul, 2004). Burada endotel hücre bölünmesi ile apoptosiz arasındaki denge, çoğalma lehine bozulmaktadır (Baluk ve ark., 2005; Verhaul, 2004). Tümör damarlarının büyümesi, gelişmesi ile yaraların iyileşmesi ve diğer durumlar sırasında meydana gelen anjiyogenez arasında benzer özellikler bulunmaktadır ama genel düzenleyici mekanizmalar açısından benzemelerine rağmen uyarıcı faktörlerin sitometrilere muhtemelen tümörlere özgüdür. Tümörler, mevcut kan damarlarını asimile ederek (Baluk ve ark., 2005, Holash ve ark., 1999) veya mevcut hücrelerle kemik iliği öncü hücrelerini birleştirerek kan teminini

arttırabilirler. Öncü hücrelerin tümör damarlarındaki endotel hücrelere katkısının büyüklüğü hala belirsizdir, bağımsız rol oynadığına ilişkin hem lehte (Baluk ve ark., 2005; Lyden ve ark., 2001; Raffi ve ark., 2002) hem de aleyhte (Baluk ve ark., 2005; Machein ve ark., 2003; Rajentie ve ark., 2004) etkileyici kanıtlar bulunmaktadır. Alternatif olarak, öncü hücreler, endotel hücrelerden ziyade perisitlere dönüşüyor olabilirler veya damar duvarlarına katkıda bulunmadan anjiyogenezi tetiklemede yardımcı hücreler olarak görev alıyor olabilirler (Baluk ve ark., 2005; Rajentie ve ark., 2004).

Tümör oluşumunda ve büyümesinde de anjiyogenez önemli bir rol oynamaktadır. Katı bir tümörün büyümesi tümörün kanla beslenmesiyle sınırlıdır. Kılcal damarlarla sarılmadığı takdirde tümör çevresinden elde edebildiği besin difüzyonuna bağımlıdır ve birkaç mm.den fazla büyüyemez. Daha fazla büyüyebilmek için tümör, tümör kitlesini istila edecek kılcal damar ağı oluşumunu gerçekleştirmektedir. Tümörün büyüme oranı damarlar tümöre ulaştığında ani bir şekilde artmaktadır. Tüm bu olaylarda istilacı endotel hücreler kan desteğine ihtiyacı olan dokular tarafından verilen bir sinyale tepki veriyor olmalıdır. Endotel hücrelerin tepkisi en az üç bileşenden oluşmaktadır. Birincisi mevcut kan damarını saran bazal laminada endotel hücrelerce delik açılmalıdır; anjiyogenez sırasında endotel hücrelerin plazminojen aktivatör gibi proteaz salgıladıkları görülmüştür. Proteazlar; endotel hücrelerin, ana kılcal damarın veya küçük toplardamarların bazal laminasını parçalamasını sağlarlar. İkincisi, endotel hücreler sinyalin kaynağına doğru hareket etmelidir. Üçüncüsü, endotel hücreler çoğalmalıdır. Belirli şartlarda bu üç bileşenli tepkinin bir veya iki bileşeni olmadan da ortaya çıkabilir. Örneğin bazı yeni kılcal damarlar endotel hücre çoğalmasını tahrip nedeniyle bloke edilse dahi oluşmaktadır ve yaradan alınan sıvılarda bulunan bir faktörün endotel hücreleri çektiği ve çoğalmaları yönünde bir uyarıda bulunmadan proteaz salgılamasını sağladığı gösterilmiştir (Alberts ve ark., 1989).

Diğer faktörler endotel hücrelerin üç bileşenli tepkisini kendiliklerinden ortaya çıkarabilir. Buna örnek asidik fibroblast büyüme faktörü (aFGF) ve bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF)'dür. Bu iki protein bağımsız olarak farklı kaynaklardan elde edildiklerinden birçok farklı isimle anılırlar ve %55 oranında

benzer aminoasit sırasına sahiptirler. Endotel hücreleri üzerindeki çarpıcı etkilerine ek olarak fibroblastların ve diğer birçok hücre tipinin çoğalmasını tetiklerler ve embriyo gelişiminin ilk aşamalarında önemli düzenleyicilerdir. Günümüzde açık ve kesin hücrel orjinleri pek az anlaşılmıştır. Anjiyogenik faktör olarak rol alabilen diğer unsurlar ise doku tamiri, iltihap ve makrofaj, mast ve yağ hücreleri gibi değişik türden hücrelerin büyümesi sırasında salınmaktadır. Genel olarak hücre çoğalmasının kontrolünde olduğu gibi anjiyogenez de sadece tek bir sinyal ile değil, karmaşık –ve olasılıkla aşırı- sinyal kombinasyonları ile düzenlenmektedir (Alberts ve ark., 1989).

Tümör dokusuna yetersiz besin sağlandığından hem besin açlığına tolerans hem de anjiyogenez kanserin ilerlemesi için gereklidir. Normal dokularda kronik besin açlığı nadiren ortaya çıktığından, kanserin besin açlığına toleransı kanser tedavisi için yeni bir hedef sağlamalıdır.

Kanserler her zaman aşırı ve düzensiz tümör hücresi gelişimine bağlı olarak zayıf damar ve lenfatik sistemler ile birlikte uygun olmayan ve yetersiz anjiyogenezi deforme etmiştir. Bunun sonucunda kanserlerin perfüzyonu yetersizdir ve kanserler kısa süreli besin açlığına maruz kalmış bölgeleri içerirler (Lu ve ark., 2004; Semenza, 2003). Bu mikroçevresel yetersizlikler kanserlerin gelişimindeki erken aşamalardan beri mevcuttur ve neoplazm hala mikroskopik boyuttayken bu yetersizlikler tamamen giderilir (Lu ve ark., 2004; Rockwell ve ark., 2001). Tümör dokusundaki besin açlığı, fonksiyonel kan desteğinden (>100-200µm) uzakta gerçekleştiğinden tümörün canlı kalabilmesi için kısmen anjiyogenik faktörler aracılığıyla yeni kılcaldamarları oluşturabilme yeteneğine bağlıdır (Lu ve ark., 2004; Dang ve Semenza, 1999). Bu, tümör hücrelerine düşman bir çevrede (Lu ve ark., 2004; Papetti ve Herman, 2002), hayatta kalma ve çoğalma yeteneği kazandırır ve böylece kötü huylu tümör tarafından arttırılmış olan anjiyogenez zayıf bir prognozla ilişkilidir (Lu ve ark., 2004; Aebersold, 1998; Alvarez, 1999). Bu sebepten dolayı da antianjiyogenik terapi kanser tedavisinde büyük umut veren ve kendine özgü bir yaklaşım olarak varsayılmaktadır. Şu ana kadar tümör anjiyogenezi önlemek amacıyla kapsamlı çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Ancak son zamanlarda Yu ve arkadaşları (2002) antianjiyogenik terapinin, tümör damarlarındaki genetik olarak durağan endotel hücreleri hedeflediğini ve tümör hücrelerinin damarsal bağımlılığını indirgeyen genetik farklılıkların, tümörlerin bu terapiye vereceği tepkiyi etkileyebileceğini ileri sürerek tümörlerin anjiyogenez engelleyicilerinin etkilerini bertaraf edebilecekleri görüşünü ileri sürmüşlerdir (Lu ve ark., 2004).

Normal dokuya kan sağlanması karmaşık olarak düzenlenmiş olduğundan, dişi üreme sistemi haricinde normal sağlıklı yetişkin dokularında anjiyogenez nadiren faaliyete geçer (Lu ve ark., 2004; Yu ve ark., 2002). Besin açlığı için de aynı durum geçerlidir.

Tümörlerin birçok faktör nedeniyle anjiyogeneze neden olduğunu gösteren çok sayıda kanıt bulunmaktadır ve damarlanmamış tümörlere (carcinoma in situ) veya damarlanmanın zayıf olduğu tümörlere nazaran damarlanmış tümörlerin metastaz yapma eğilimi daha yüksektir (Raymond, 1995; Liotta ve ark., 1991). Anjiyogenez süreci üç fonksiyonu gerektirir: hareketlilik, proteinlerin parçalanması ve hücre çoğalması. Hareketlilik endotel hücrelerin anjiyogenik uyarana doğru hareket etmesi bakımından ve endotel dalların sıralanması veya dışa doğru büyümesi için gereklidir. Proteinlerin parçalanması ise endotel hücre tomurcuklarının ekstrasellüler matrikse girebilmesi için gereklidir. Endotel hücrelerin çoğalması ise dokudan beslenmeyi sağlayacak yeni kılcal damarların oluşması için gereklidir. Aynı süreç metastaz yapan kanser hücrelerince de kullanılmaktadır ve aynı mekanizma işlemektedir. Ayrıca tümör hücreleri, yeni bir hedef dokuyu ele geçirdikten sonra damarlanmayı destekleyen kendi anjiyogenez faktörlerini üretebilmektedirler. Bu nedenle antianjiyogenik ajanlar yeni kanser ilaçları için gelecek vaat eden adaylar olabilirler (Raymond, 1995).

### **1.3. METASTAZ**

Metastaz terimi primer tümörle devamlılığı olmayan, uzak dokularda yerleşebilen sekonder implantların (metastazlar) gelişmesi anlamına gelir. İstila ve metastaz habis tümörlerin biyolojik işaretleridir. Kanserden kaynaklanan hastalıkların ve ölümlerin en önemli nedenleridir ve bu nedenle de yoğunlukla

araştırılan konuları oluştururlar. Ana kitleden ayrılan tümör hücreleri kan damarlarına veya lenf damarlarına girer ve farklı bir bölgede ikincil bir büyümeye neden olurlar, bunun için bir dizi safhadan geçmek zorundadırlar. Bu sıralamadaki her bir safha çeşitli etkilere maruz kalır ve bu nedenle tümör kitlesinden ayrılan hücre bu sıralamanın herhangi bir noktasında canlı kalmayabilir (Kumar ve ark., 1992; Stetler ve ark., 2001; Kumar, ve ark., 2005).

Tümörün metastazı, kanser hastalıklarının tedavisindeki başarısızlığın en önemli nedeni ve kanserin ürkütücü ve ölümcül esas etkili faktörüdür (Stetler ve ark., 2001).

Metastatik odak primer tümörün gelişiminin erken safhalarında başlayabilen ve devamlılık gösteren bir süreçtir ve tümörün yüküne ve sürekliliğine bağlı olarak artar. Metastazlar başka organlarda yeni metastatik lezyonlar oluşturabilmek için parçalanabilirler (metastaz, metastaz yapar). Büyüklüğe, süreye, dağıldığı anatomik bölgeye ilişkin varyasyonlar ve metastazların heterojen bileşimi günümüzde uygulanan terapi yöntemleri ile metastatik hastalığın tamamen ortadan kaldırılmasını son derece güçleştirmektedir (Stetler, ve ark., 2001).

Fareler üzerinde yapılan araştırmalarda, ana tümörden dolaşıma her gün milyonlarca hücre katılsa da sadece bir kaç metastaz olduğu açığa çıkarılmıştır (Kumar ve ark., 2005).

Kanser hastalarının yönlendirilmesinde ve tümörün yayılmasını engellemek üzere etkili tedaviler geliştirebilmek için metastazın kaynağının kesin bir şekilde anlaşılması çok büyük önem taşımaktadır. Metastaz safhaları iki aşamaya bölünmüştür: (1) Hücre-dışı matriksin istila edilmesi ve (2) tümör hücrelerinin damarlara yayılması ve yerleşmesi (Kumar ve ark., 2005).

1. Hücre-dışı Matriksin İstila Edilmesi: Normal dokuların yapısal düzeni ve işlevleri geniş ölçüde hücreler arası etkileşime ve ekstrasellüler matrikse (ECM) bağlı olarak belirlenir. Dokular birbirlerinden iki tip ekstrasellüler matriks ile ayrılmıştır: bazal membran ve dokulararası bağ dokusu. Farklı şekilde organize edilmiş olsalar da her iki ekstrasellüler matriksin bileşenleri kollajenlerden, glikoproteinlerden ve proteoglikanlardan oluşmaktadır. Metastaz safhasının bir çok evresinde tümör hücreleri hücre-dışı matriksle



etkileşime girmektedir. Hücre-dışı matriksin istilası bir çok aşamadan oluşan aktif bir işlemdir:

- Tümör hücrelerinin birbirlerinden ayrılması
- Matriks bileşenlerine bağlanma
- Ekstrasellüler matriksin bozulması
- Tümör hücrelerinin göçü (Kumar ve ark., 2005).

2. Tümör Hücrelerinin Damarlara Yayılması ve Yerleşmesi: Dolaşıma giren tümör hücreleri adapte edilebilen bağışıklık sisteminin savunmasına karşı doğuştan savunmasızdır. Dolaşım esnasında tümör hücreleri küme halinde biraraya gelme eğilimindedirler. Biraraya gelme tümör hücrelerinin kendi aralarında olan homotipik yapışma olabileceği gibi; tümör hücreleriyle kan hücrelerinin ve bilhassa trombositlerin arasında olan heterotipik yapışma ile sağlanır (Kumar ve ark., 2005).

Tümör kitlesinin 2 mm.den daha fazla büyümesi ve metastaz yapması ancak anjiyogenez ile mümkündür.

#### 1.4. APOPTOSİZ

Apoptosis, içsel hücre intiharı programının aktif hale gelmesine neden olan ileri derecede düzenlenmiş hücre ölümü işlemidir (Huan-huan ve ark., 2004; Stetler, 1995; Willie, 1980). Apoptosis sırasında nükleus ve sitoplazma, makrofajlar veya komşu hücrelerce fagositoza uğratılan membran bağımlı apoptotik cisimler oluşturmak üzere yoğunlaşır. Endotel hücrelerin apoptosis birçok açıdan benzersizdir. (Huan-huan ve ark., 2004; Meredith ve ark., 1993; Re ve ark., 1994) Örneğin, (i) endotel hücreler ekstrasellüler matriksle olan etkileşimlere karşı aşırı hassasdırlar, bu etkileşimin bozulması apoptosizi tetikler; (ii) apoptotik endotel hücreler komşu hücrelerce fagositoza uğratılmaz, bunun yerine kan akışının neden olduğu basınç nedeniyle hücreler daha çok damar duvarlarından ayrılmaya eğilimlidirler ve ayrılan kısımların işlenebilmesi için akıntıyı embolize ederler. Bu ayırıcı özellikler ile endotel hücrelerin apoptosizi, endotel hücre ölümünün muhtemelen başlıca fizyolojik mekanizmasını ifade etmektedir (Huan-Huan ve ark., 2004).

Yetişkinlerin organlarında ve dokularında belirli sayıda hücreyi bulundurmak için hücre çoğalması, hücre ölümüyle dikkatli bir şekilde dengelenmiştir. Çoğu vakada hücre ölümü, tesadüfi bir travma sonucundan ziyade normal fizyolojik bir olgudur. Bu tür fizyolojik hücre ölümleri (programlanmış hücre ölümü) sadece hasara uğramış hücrelerin elenmesini ve belirli sayıda hücrenin mevcudiyetini devam ettirmekle kalmaz aynı zamanda normal gelişimde büyüyen dokularda oluşan istenmeyen hücrelerin de elenmesini sağlamada anahtar bir rol oynar. Hücre çoğalımı ve hücre ölümü arasında kurulmuş olan dengeye; hem gelişim hem de hayvan doku ve organlarının korunması için gereksinim vardır (Cooper, 1997).

Programlanmış hücre ölümü; hücre ölümünün yetişkin dokularının korunmasında ve embriyonik gelişimde anahtar rol oynayan normal fizyolojik bir şeklidir. Yetişkinlerde, programlanmış hücre ölümü, hücre çoğalımını dengelemekten ve hücrenin dönüşümü esnasında dokularda belirli sayıda hücrenin mevcudiyetini sağlamaktan sorumludur. Örneğin, insanlarda her gün yaklaşık olarak  $5 \times 10^{11}$  kan hücresi, kemik iliğinde süreklilik arzeden üretimleri ile dengelenmiş olarak programlanmış hücre ölümüyle elimine edilmektedir.

Programlanmış hücre ölümü, organizmanın tamamını ilgilendiren bazı hasara uğramış ve tehlike potansiyeli bulunan hücrelerin de elimine edilmesi için bir çeşit savunma mekanizması sağlar. Büyüme sırasında programlanmış hücre ölümü çeşitli dokularda istenmeyen hücrelerin elimine edilmesi için anahtar rol oynamaktadır (Cooper, 1997).

Hayvanlarda da diğer bazı hücre tiplerinin hayatta kalması benzer bir şekilde büyüme faktörüne veya komşu hücrelere ya da hücre dışı matrikse temas etmelerine bağlıdır bu nedenle programlanmış hücre ölümünün dokulardaki hücrelerin işbirliğini düzenlemede önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Akut yaralanmadan dolayı oluşan tesadüfi hücre ölümlerinin tersine programlanmış hücre ölümü, apoptosiz olarak bilinen ve belirgin morfolojik değişim olarak tanımlanan aktif bir süreçtir (Cooper, 1997).

Programlanmış hücre ölümü veya apoptosiz, kan hücreleri de dahil olmak üzere bir çok hücre tipinin farklılaşma programının önemli bir parçasıdır. Normal olarak farklılaşmamakla birlikte birçok kanserli hücre apoptosize girmez ve bu

nedenle normal kopyalarına kıyasla daha uzun süre yaşarlar. Kanser hücrelerinde programlanmış hücre ölümünün gerçekleşmemesi tümörün büyümesine önemli ölçüde yardımcı olur. Örneğin, normal hücrelerin hayatta kalması büyüme faktörlerinden veya apoptosizi önleyen hücre dışı matriksten gelen sinyallere bağlıdır. Tümör hücreleri ise normal kopyaları için gerekli olan büyüme faktörlerinin yokluğunda da hayatta kalabilmektedirler. Normal çevresel sinyallerden arındırıldığında tümör hücrelerinde apoptosiz gerçekleşmemektedir ve apoptosizin gerçekleşmemesi sadece tümörün büyümesinde etkili olmakla kalmayıp anormal doku bölgelerinde metastaz yapabilen hücrelerin hayatta kalmasında ve gelişmesinde de önemlidir. DNA'da meydana gelen hasarlardan dolayı birçok tümör hücresinde apoptosiz gerçekleşmezken; normal hücrelerde apoptosiz gerçekleşmektedir. Bu durumda, kanser hücrelerinin apoptosize girmemesi DNA'nın hasara uğratılması yoluyla etki eden radyasyon veya kemoterapi tedavisine direnç göstermesine yardımcı olmaktadır. Bu nedenle hayvanlarda kanser hücrelerinin durmaksızın büyümesinde, hücrelerin anormal bir şekilde hayatta kalması ve hücre çoğalması başlıca rolü oynamaktadır (Cooper, 1997).

Damar duvarlarındaki her endotel hücre yaşam lehine ve yaşam aleyhine sinyallere has karışımlara maruz kalır. Tüm bu sinyallerin toplamı, hücrenin canlı kalmasına ya da apoptosizi başlatarak intihar etmesine yol açar (Duval ve ark., 2003; Carmeliet, ark., 2003). Apoptosiz ve buna bağlı hücre yapılarının kaybıyla indüklenen anoikis gibi süreçler aktif enerji gerektiren programlardan oluşmuştur ve bu nedenle hücrenin aşırı hasar nedeniyle pasif yok edilişi olan nekrozdan ayrılır (Duval ve ark., 2003).

Endotel apoptosiz programı genel olarak iki sinyal yolağı ile başlatılır:

(i) Hücre yüzeyi reseptörlerinin tümör nekroz faktörü (TNF)-reseptör ailesine bağlanması ölüm reseptörleri yolağını başlatır. Bu durum kinazı, transkripsiyon faktörlerini ve caspase 8 gibi proteolitik enzimleri aktif hale getiren adaptör molekülleri etkinleştirir; (ii) Hücre içi hasar veya hücre dışı yaşam sinyallerinin kaybı mitokondriyal yolağının çalışmasını başlatır. Böylece mitokondriden sitozole moleküller salınır ve bu moleküller caspase 9 proteolitik enzimini etkin hale getirir. Ölüm reseptörü ve mitokondriyal ölüm yolağları diğer endotel

hücrelerin sinyalleşen yolağları ile ‘icracı’ caspase 3,6 ve 7’yi, nucleazlar, katepsinler (Duval, ve ark., 2003; Madge, ve ark., 2003), calpainler de (calcium activated neutral proteinase: kalsiyumla aktive olan nötral proteinaz) (Duval, ve ark., 2003; Porn-Ares, ve ark., 2003), dahil olmak üzere ve radyasyon nedeniyle gerçekleşen endotel hücre ölümünde keramidi etkinleştirmek üzere entegre olurlar (Duval, ve ark., 2003; Lin, ve ark., 2000). Bunlar, anahtar yapısal molekülleri, enzimleri ve nükleik asitleri, endotel hücreleri öldürmek ve kalıntılarını da membranın bütünlüğünü bozmadan fagositoz için paketlemeleri için bölerler. Ölüm reseptörlerinin yolağı; mitokondriyal yol ağı, bunun akış efektörleri (Duval, ve ark., 2003; Li, ve ark., 1998) ile adeta ‘karşılıklı iletişim’ görünümüne bürünür, tam tersi iletişim de (Duval, ve ark., 2003; Karsan, ve ark., 1996; Badrichani, ve ark., 1999) görülmektedir.

Moleküler apoptosiz programında bir takım biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler meydana gelir (Duval, ve ark., 2003; Kerr, ve ark., 1972). Bunlar (ortaya çıkışları yaklaşık olarak aynı sıradadır); hücrenin hücre iletişiminin ve matris iletişiminin kaybı, sitoplastik gerileme, sitokrom C’nin mitokondriden sitoplazmaya geçerek yer değiştirmesi, proteaz gruplarının aktivasyonu, Bid proteininin bölünmesi, plazma zarının fosfotidil serine maruz bırakılması, antikoagülan özelliklerin kaybı (Duval, ve ark., 2003; Bombeli, ve ark., 1997), zarın kabarcıklaşması ve kromatinin yoğunlaşmasıdır (Duval ve ark., 2003; Granville, ve ark., 1999). Apoptosiz halindeki endotel hücreler ya damar boşluğuna düşerler ki burada kan akış sitometresi ile tespit edilebilir ya da bazen komşu hücrelerin damar duvarları içinde fagositoz yoluyla tüketilebilirler (Duval, ve ark., 2003; Solovey, ve ark., 1999). İşin ilginç yanı ise apoptosiz halindeki endotel hücreler mikro partiküller bırakırlar; bunlar akış sitometresi ile tespit edilebilir ve karakteristik olarak büyük ölçüde CD31 ve CD105 yüzey antijenlerinin bulgularını taşırlar (Duval, ve ark., 2003; Jimenez, ve ark., 2003).

Endotel hücre apoptosizi anjiyogenez sürecinde önemli bir düzenleyici role sahiptir. Endotel hücrelerinde, anjiyogenik uyarın faktörlerinin, apoptosizin icrasını bloke etmek suretiyle endotel hücrelerin canlı kalmasını sağlayan çeşitli yolağlarının yardımıyla apoptosize karşı koruma etkileri bulunmaktadır. Buna karşılık, anjiyogenezin negatif düzenleyicilerinin sadece endotel hücrelerin

çoğalmasını, göçünü ve yeniden yapılanmasını etkilemediğini beraberinde endotelial apoptosizi de doğrudan veya dolaylı olarak uyardığı görülmüştür (Beloussow, ve ark., 2002; Dimmeler ve Zeiher, 2000). Aşırı apoptosiz, endotelial hücre çoğalmasını kısıtlayarak anjiyogenezi sınırlayabilir ve tümörün gerilemesine neden olabilir (Beloussow, ve ark., 2002).

Mitokondriler apoptosiz öncesi çeşitli sinyaller için odak noktalarıdır ve apoptosiz programının kontrolünde, yürütülmesinde anahtar role sahiptirler. Proapoptik uyarılar mitokondrial  $Ca^{2+}$  aşırı yükü ve oksidatif stress MPTP (Mitochondrial Permeability Transition Pore) olarak bilinen ve iç mitokondrial membrandan dış mitokondrial membrana uzanan spesifik olmayan bu gözenağın açılmasına neden olur. MPTP'nin açılmasıyla iç mitokondrial tüm küçük çözümler (<1,5 kDa) denkleşirler ve mitokondrinin şişmesine, dış membranının parçalanmasına, proton motivasyonlu kuvvetin azalmasına, oksidatif fosforilasyon bağının çözülmesine ve glikoliz ile üretilen ATP'nin hidrolizine yol açar. MPTP'nin geçici olarak açılması, mitokondrinin iç mebran alanından sitokrom C ve apoptosize neden olan faktörün salınımı ile sonuçlanır. Bunu sonucunda kaspaz mekanizması aktif hale gelir. Mitokondrial  $Ca^{2+}$  aşırı yükünün hızlı bir şekilde yayılmasında MPTP'nin fizyolojik bir rolü olduğu ileri sürülmüştür.

## 1.5. ENDOTEL HÜCRELERİ

Endotel terimi kan ve lenf damarlarını döşeyen epitel için kullanılır. Tek sıra, büyük yassı yada kübik hücrelerden oluşurlar. Endotel hücreleri kapillerleri kesintisiz olarak döşerler. Diğer yassı epitel hücrelerinden daha açık boyanması, çekirdeğinin biraz daha küçük ve daha ince uzun olması ile ayırdedilirler. İncelmiş sitoplazmalarında çok sayıda pinositik vezikül vardır. Belli yaşam süreleri vardır. Endotel hücrelerinin ayak şekilli sitoplazmik uzantıları bazal lamina ve membrana elastika internadan geçerek, düz kas hücreleriyle gap junction şeklinde bağlantı yaparlar (Paker, 1993).

Endotel hücreleri, damar sistemini tek katmanlı bir hat halinde saran ince, yassı hücrelerdir. F-aktinden oluşan hücre iskeletleri bulunmaktadır. Damarsal endoteliumun başlıca fonksiyonu kan plazması ve dokulararası sıvı arasında

suyun ve çözelti alışverişini kontrol etmenin yanında bunlar arasında arabuluculuk etmektedir. İltihaplanmada veya bağışıklık sisteminin reaksiyonları sırasında endotel hücreleri agonistlerin neden olduğu bir takım işlevsel ve morfolojik değişime uğrarlar. Agonistlerin bir çoğu iltihaplanma esnasında arabulucudur ve endotel hücrelerinin geçirgenliğini arttırmak için çalışırlar. Geçirgenlikteki bu artış, endotel hücrelerin F-aktin hücre iskeletindeki değişimlerle birlikte hücrelerarası boşlukların oluşumu ile de bağlantılıdır (Yamany ve ark., 1997; Khiani ve ark., 1996).

Endotel hücreleri aktin mikrofilamanları, vimentin ve tubulin mikrotüplerinden oluşan üç büyük hücre iskeletine sahiptirler. Mekanik özellikleri belirlemenin yanında; sabitleme zorunluluğunda olan hücre iskeleti, hücre şeklini ve arabulucuların büyümesini ve farklılaşmasını sağlayan mekansal olarak organize olmuş ve hücre dışı uzantılara cevap veren sinyalleşme mekanizmalarını belirler (Apostolova ve ark., 2003; Janmey, 1998). Hücre iskeleti aynı zamanda hücre dışı matrikse göçün ve hücrenin yapışması için gerekli olan hücre içi gerilimi sağlayamaya yardımcı olan en büyük etkendir (Apostolova ve ark., 2003; Ingber, 1991). Hücre iskeleti, kendi dinamiklerini düzenleyen sinyalleşen yolağları ile etkileşebildiğinden ve hCys (homocysteine) ile Cu-hCys (Copper-homocysteine complexes) bileşikleri tatbik edildikten sonra hücre dışı matriks proteinlerinde gözlemlenen değişiklikler nedeniyle hücre iskeletinin değişime uğramış cevaplarının meydana gelmesi halinde yeni çevreye adaptasyonun sağlanabilmesi için ihtiyacı belirten bir sinyal verebilmesi mümkün görünmektedir. Devam eden deneyler, bir çok hücrel cevaba neden olan sinyalleşen yolağları arasındaki karşılıklı etkileşimin doğasını açıklığa kavuşturacaktır (Apostolova ve ark., 2003).

Endotelyum kanda bulunan makro moleküllere karşı seçici bir bariyer oluşturur ve bu bariyerin hasara uğraması inflamasyon patogenezi ve arterioskleroz türü hastalıklar ile birlikte görülür. Endotel hücrelerinin geçirgenliği, esas olarak hücrenin şeklini belirleyen subsellüler matrikse hücrenin yapışmasını kolaylaştıran ve bağlantı yapısının oluşumunda rol oynayan hücre iskeletinin kısımlarınca kontrol edilir (Kolodgie ve ark., 1999; Savion ve ark., 1982; Gobliet ve ark., 1990; Wehlang ve ark., 1979; Wong ve Gobliet, 1986)

Hücre iskeletini oluşturan bölümlerin işlevleri, ikincil mesaj sistemleri olarak kabul edilen kalsiyumu, protein kinaz C ve periyodik nükleotidler ile düzenlenir (Kolodgie ve ark., 1999; Hoek ve ark., 1992).

Agonistlerin endotel hücreleri üzerindeki etkilerini otomatik olarak sınıflandırabilmek için, F-aktin dağılımı diğer agonistleri eleme işlemi için kullanılabilir. Güncel teknikler agonistlerin etkilerini tam olarak sınıflandırmak için geleneksel metanol ekstrasyon metodunu kullanmaktadırlar. Bu teknikler genellikle pahalıdır ve fazla zaman almaktadır. Ancak her agonistin hücredeki F-aktin fiberinin dağılımı ile ayırdedilebileceği bildirilmiştir. Otomatik sınıflandırıcının karşılaştığı diğer bir sorun ise görüntüleme işleminin bazı parametrelere karşı hassas olmasıdır; bunlar arasında mevcut sıcaklık, görüntülenen alanda bulunan agonist dozajının yüzdesi, ışık yoğunluğu, katman üzerindeki agonist dağılımının rastlantısallığı, floresan boyanın foto ağartma (photobleaching) etkisi ve agonistin yaşlanma etkisi bulunmaktadır.

Hemen hemen bütün dokuların kan desteğine ihtiyacı bulunmaktadır ve kan desteği de endotel hücrelerinin mevcudiyetine bağlıdır. Bu hücreler adapte edilebilen bir yaşam destek sistemi yaratırlar ve vücudun herhangi bir alanında damar oluşturabilirler. Kan damarlarını oluşturan ve modellendirebilen endotel hücreleri olmasaydı dokuların büyümesinin ve onarılmasının imkansız olduğu gözlenmiştir. (Alberts ve ark., 1980).

Endotel hücreleri, bir hücre kalınlığında tüm kardiyovasküler sistemi aralıksız olarak sarar ve çoğul olarak endotelyum olarak adlandırılırlar. Damar duvarlarının metabolik dengesini (homeostasis) ve normal dolaşım işlevini korumak için endotel hücrelerin yapısal ve işlevsel bütünlüğü çok büyük önem taşımaktadır. Endotel hücreleri kendilerine özgü 0.1 µm genişliğinde Weibel-Palade cisimciklerini, von Willebrand faktörünü (vWF) içeren 3 µm uzunluğunda membrana bağlı depolama organellerini bulundurmaktadır. Endotel hücreler PECAM-1 (endotelin birleşme kısmında bulunan ve CD31 de denilen bir proteindir), CD34 ve vWF ile anticisimcikler sayesinde immunohistokimyasal olarak teşhis edilebilmektedirler (Kumar ve ark., 2005).

Damarsal endotelyum çok yönlü, sentetik ve metabolik özelliklere sahip çeşitli işlevleri bulunan bir dokudur ve kan-doku etkileşimlerinin aktif bir

katılımcısıdır. Yarı geçirgen bir membran olarak endotelyum, büyük ve küçük moleküllerin damar duvarından geçişini kontrol eder. Hücre-içi birleşme kısımları normalde çoğu bölgede plazma proteinleri gibi büyük molekülleri geçirmez ancak endotellerin kendi aralarında bulunan değişken birleşim kısımları hemodinamik faktörlerin (yüksek kan basıncı gibi) ve vasoaktif ajanların (iltihabi olaylarda histamin gibi) etkisiyle genişleyebilir. Bunun ötesinde endotel hücreler; trombogenik olmayan kan-doku arayüzünü, kan akışının ayarını ve damarların direncini, hormonların metabolizmasını, bağışıklığın ve iltihaplara gösterilen tepkinin düzenini ve özellikle düz kas hücrelerinin gelişim düzenini korumada rol oynamaktadır. Endotel hücrelerinin kaybı (soyulma), tromboza ve düz kas hücrelerinin çoğalmasına neden olur (Kumar ve ark., 2005).

Bulunduğu anatomik bölgeye veya lokal çevrenin özelliklerine uyarlanmasına bağlı olarak endotel hücreler önemli fenotipik çeşitliliğe sahiptir. Örneğin, başlangıçtan itibaren farklı bölgelerde gelişen endotel hücre popülasyonları farklı özellikler taşıyabilirler. Lenf endotelyumu, lenfler tümör metastazında rol oynadığından önem taşımaktadır (Kumar ve ark., 2005).

Kan damarlarında sıralanmış olan endotel hücrelerinin, buldukları çevrenin ihtiyaçlarına göre kendi sayılarını ve düzenlerini dikkate değer bir şekilde adapte edebilme yetenekleri vardır (Alberts ve ark., 1989).

Bir yetişkinin damar sistemindeki endotel hücrelerinin, hücre bölünmesi ve hareket yeteneği vardır. Örneğin aort damarının bir bölümü hasara uğrar ve endotel hücrelerini yitirirse, komşu endotel hücreleri çoğalırlar ve hasara uğramış yüzeyi kaplamak için göç ederler. Endotel hücrelerinin çoğalımı, DNA sentezini yapan hücreleri sınıflandırmak için kullanılan <sup>3</sup>H-timidin kullanılarak gerçekleştirilir. Normal damarlarda sınıflandırılan endotel hücre oranı, özellikle atardamarların kollara ayrıldığı noktalarda yüksektir, buradaki turbulans ve endotel hücrelerin aşınması hücrenin geri dönmesine neden olur. Genel olarak endotel hücreleri çok yavaş dönüş yaparlar, bu dönüş hücre zamanına göre aylar hatta yıllar almaktadır (Alberts ve ark., 1989).

Endotel hücreleri sadece oluşturulan kan damarlarının sınırlarını onarmakla kalmaz aynı zamanda yeni kan damarlarını da oluşturur. Bu, normal yetişkin dokularını yinelenen modelleme döngüsünü ve yeniden yapılandırmayı



desteklemek, hasara uğramış yetişkin dokularında onarımı sağlamak, embriyonik dokularda büyüme hızına ayak uydurabilmek için gerçekleştirilmektedir (Alberts ve ark., 1989).

Yeni kan damarları her zaman mevcut küçük damarlarda gelişen kılcal damarlardan türer. Anjiyogenezde bu işlem belirli sinyallere tepki olarak meydana gelir. Hücre ilk önce katı bir damar sürgünüdür, daha sonra tüp haline gelmesi için içi boşalır. Bu işlem damar sürgünü bağlanacağı başka bir damarla karşılaşana kadar devam eder ve kan akışı sağlanır. Hücre kültüründe yapılan deneyler uygun büyüme faktörleri taşıyan medyuma konulan endotel hücrelerinin, diğer hücre tiplerinden izole edilseler dahi kendiliklerinden kapiller tüpler oluşturmaya devam ettiklerini göstermiştir. Kültürdeki tüp oluşumunun ilk işareti uzamış olan hücre içindeki boşluğun ilk olarak sitoplazmayla kuşatılmasıdır. Bitişik hücreler de benzer boşluklar oluştururlar ve sonuç olarak hücreler boşlukları ardarda dizilecek şekilde hizalanırlar. Böylece hücreden hücreye kesintisiz bir şekilde sıralanan bu boşluklar kılcal bir kanal oluştururlar. Saf endotel hücre kültüründe büyütülen kılcal tüpler kan içermez ve içlerinde herhangi birşey dolaşmaz ki bu durum kan akışının ve basıncının kılcal ağı oluşturmak için gerekli olmadığını göstermektedir (Alberts ve ark., 1989).

Canlı hayvanlarda gerekli olduğunda endotel hücreler kılcal damarları oluştururlar. Dokuların oksijensiz kaldıklarında yeni kılcal damarlar oluşturmak için anjiyogenik faktörler salgıladıkları düşünülmektedir. Büyük bir olasılıkla bu nedenle tüm omurgalılara ait hücreler, kılcal damarın 50 µm büyüklüğü kadar bir aralıkla dizilmişlerdir. Benzer şekilde yaralanmadan sonra hasar görmüş dokunun komşu dokuları uyarılarak kılcal damar oluşumunda artış meydana gelmektedir. Lokal tahrişler veya enfeksiyonlar da yeni kılcal damar oluşumunda artış meydana getirmektedir. Bu durumda iltihap azaldığında veya giderildiğinde bu yeni kılcal damarlar ya azalmakta ya da yok olmaktadır (Alberts ve ark., 1989).

Endotel hücreleri sadece oksijen ve besin girişini denetlemekle kalmaz aynı zamanda katabolitlerin çıkışını da denetler ve bu hücreler tümör hücreleri için mitojenleri ve hayatta kalma faktörlerini dikkatle hazırlarlar. Mikrovaskular endotel hücrelerin bu parakrin aktivitesi, bazik fibroblast büyüme faktörünün (bFGF) seferberliğini, trombosit kökenli büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme

faktörü-1 ve 2, interleukin-6, granulosit-makrofaj koloni uyarı faktörü gibi sitokinleri içerir. Damarsal endotel hücrelerin en az 20 parakrin faktör ürettiği bilinmektedir (Folkman, 2001).

Endotel hücre katmanının bütünlüğü, bariyerin korunması için önemli bir ihtiyaç olduğu gibi ödem oluşumunun önlenmesi için de gereklidir. Endotel hücre katmanının bütünlüğünde meydana gelebilecek herhangi bir bozulma dokulararası ödem oluşumuna yol açar ve bu durum biyoaktif ajanlar tarafından tetiklenebilir (Lee ve ark., 1998; Majno ve Palade, 1961; Majno ve ark., 1969; Sharma ve Cervos Navarro, 1990). Vasoaktif ajanların, hücre şeklindeki değişikliklerle birlikte endotel hücrelerin geçirgenliğini arttırdığı ve hücrelerarası boşlukların oluşmasına neden olduğu belirtilmiştir ( Lee ve ark., 1998; Rotrosen ve Gallin,1986; Phillips ve ark., 1989; Patterson ve ark., 1994; Goeckeler ve Wysolmeraki, 1995). Hücre şeklindeki bu değişimler; aktinde, kas hücresi olmayan hücrelerdeki ağırlıklı sitoplazmik mikrofilamanlarda meydana gelen değişimleri yansıtıyor olabilir ve bu biyofiziksel nitelikler yapısal bütünlüğün korunmasına katkıda bulunuyor olabilir. Bu nedenle; endotel hücrelerinin geçirgenliğinin belirlenmesinde hücre iskeletinin rolü önemli oranda rapor edilmiştir. Bir çok araştırmacı endotel hücrelerindeki aktinin ve miyozinin, hücre içi boşlukların genişliğinin belirlenmesinde başlıca rolü oynadığını; böylece vasküler geçirgenliğin hücrelerarası yolağını kontrol ettiğini göstermişlerdir (Lee ve ark., 1998 Shasby ve ark., 1982; Wong ve Gottlieb, 1986, Wong ve Gottlieb 1990; Schnittler ve ark., 1990; Gottlieb ve ark., 1991; Patterson ve ark., 1994). Ethchlorvynol ve cytochlasin D ilaçlarının hücre iskeletini böldüğünü; bunun sonucu olarak endotel hücrelerin geçirgenliğini arttırdığı (Lee ve ark., 1998 Shasby ve ark., 1982; Wysolmerski ve ark., 1984) ve phalloidin ve phalloidin ajanlarının hücre iskeletini stabilize ettiği, agonistlerin neden olduğu endotel hücre geçirgenlik artışını engellendiği bildirilmiştir (Lee ve ark., 1998; Alexander ve ark., 1988; Phillips ve ark., 1989; Langeler ve Van Hinsbergh, 1991; Alexander ve ark., 1993; Ma ve Pedram, 1996). Yapılan diğer çalışmalarda, 3', 5' periyodik adenosin monofosfat (cAMP: cyclic adenosine monophosphate) aktivasyonunun, in vitro olarak endotel makro moleküler bariyerin önemli bir belirleyicisi olduğu keşfedilmiştir. cAMP tarafından tetiklenmiş etkiler endotel hücrelerdeki

polimerleşmiş aktin havuzunda artışlarla ilişkilidir ( Lee ve ark., 1998, Bensch ve ark.,1983; Stelzner ve ark., 1989).

Endotelyum, damarsal homeostasise ilişkin çok çeşitli işlevleri bulunan aktif metabolik bir dokudur. Endotel hücrelerinin yapısı ve işlevleri hakkında bilinenlerin çoğu geniş damarların endotel hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda elde edilmiştir. İnsan karın damarı ve inek aort damarı bu hücreleri elde etmek için kullanılan başlıca kaynaklardır. Ancak geçirgenlik değişimleri ağırlıklı olarak mikro damar sistemi seviyesinde gerçekleşmektedir. İşlevleri arasında en önemli olanı dokularla kan arasında bulunan seçici bariyerin korunmasıdır. İltihaplanma sırasında endotelyumun gösterdiği tepki geçirgenliğin artmasıdır ve normal olarak damar bölümünde kalan büyük moleküller, endotelyumdan geçebilirler. İnsan göbek kordonundan elde edilen endotel hücreleri (HUVEC=Human Umbilical Vein Endothelial Cell) ve inek aort damarı endotel hücreleri ile yapılan *in vitro* çalışmalarda iltihaplanma sonucunda hücrenin geriye döndürülebilir bir şekilde yuvarlaklaştığı ve endotel hücreler arasında boşlukların oluştuğu görülmüştür (Budworth ve ark., 1999; Lum ve Malik, 1996). Periferal aktin mikrofilament yığınlarının hücrelerarası geçirgenlikle bağlantılı olarak stres fiberlerinin kasılmasında etkili olduğu belirtilmiştir (Budworth ve ark., 1999; Gotlieb ve ark., 1991).

## 1.6. HÜCRE İSKELETİ

Hücre sitoplazmasında sitoplazmik filamentler (mikrofilament ve ara filamentler) ve mikrotüpçük gibi ipliksi yapılar bulunmaktadır. Sitoplazmanın zemin maddesi üç boyutlu ince bir iplik ağından oluşmaktadır. Bu yapıya mikrotrabekül ağı denmektedir. Bu ağ hücre içindeki birçok organelin bulunduğu yerde asılı kalmasına yardımcı olmakta ve mikrofilamentlerle mikrotüpçükler arasında bir bağ kurmaktadır. Mikrotrabekül ağı, mikrotüpçükler ve mikrofilamentler bir arada sitoplazmik matriksi meydana getirir. Sitoplazmik matriks hücreye şeklini verir, hücreyi destekler ve hücre bölünmesi, hücre hareketi, sil ve kamçı hareketleri gibi hücre faaliyetlerinde görevlidir (Karol, 1988). Hücrenin şekli, hücre membranının, hücre iskeletinin ve dış güçlerin kendi

aralarındaki etkileşiminin bir sonucudur. Hücre membranı, zayıf, iki boyutlu sıvı bir yapıdır (Çekiç ve ark., 2002; Jacobson, 1983; Gruen ve Wolfe, 1982).

### **1.6.1. Hücre İskeletinin Elemanları**

#### **1.6.1.1. Mikrotüpçükler**

250 Å çapında tüp şeklinde yapılardır. Enine kesitleri yuvarlak ve duvarları 60 Å kalınlığındadır. Her mikrotüpçüğün duvarında 13 kadar subfilament bulunmaktadır. İçi boş düz silindire benzeyen mikrotüpçükler genel olarak sitoplazmada bulunmakla beraber sil, kamçı, sentriol gibi organellerin yapısına katılmaktadırlar. Sillerin yapısında bulunan tel kompleksi mikrotüpçüklerden oluşmaktadır. Silin yapısında 11 tane mikrotüpçük bir araya gelerek sili oluşturmaktadır (Karol, 1988).

Mikrotüpçükler birçok hücrede elastik çubuklardan oluşan bir hücre iskeleti oluşturmaktadırlar. Embriyogenez sırasında hücrenin şeklini belirleyen mikrotüpçükler, sitoplazmik materyalin yer değiştirmesine de yarayan kanallar oluşturmaktadırlar (Karol, 1988).

Mikrotüpçükler tübülün adı verilen 110.000 Dalton molekül ağırlığında bir protein kapsamaktadırlar. Tübülün 2 monomerden oluşan bir dimerdir. Kolşisin, vinblastin gibi alkaloid maddeler iğ ipliklerindeki tübülüne bağlanarak mitozu engellemektedirler. Bağlanma sırasında dimer monomerlerine ayrılırlar (Karol, 1988).

Mikrotüpçükler ilk olarak miyelinli sinir tellerinin aksoplazmasında gösterilmiştir. Bunlara nörotüpçükler adı verilmektedir. Nörotüpçükler 200-300Å çapında çok uzun, dallanmamış silindir şeklinde yapılardır (Karol, 1988)

#### **1.6.1.2. Mikrofilamentler**

Mikrofilamentler 40-70 Å çapında ipliksi yapılardır. Yapılan çalışmalarla mikrofilamentlerin sikloz, amöboid hareket gibi hücre faaliyetlerinde görev yapan kontraktıl bir sistem oldukları gösterilmiştir. Kas sistemi dışındaki hücrelerde

bulunan kontraktıl kas proteini olan bu mikrofilamentlere aktin adı verilmektedir. Kas sistemindekiler ise özelleşmiş olup bunlara miyofilament (kas ipliği) adı verilmektedir (Karol, 1988).

Bir hücrede bulunan aktin filamentler, mikrotüpüçklere göre daha fazladır ve bir hücrede aktif filamentlerin toplam uzunluğu mikrotüpüçüklerin tümünün uzunluğunun 30 katına eşittir (Koparal, 2001).

Aktin filamentler hücre hareketliliğinde, membrandan giriş çıkışlarda, hücre polaritesinin ve sitokinezin denetlenmesinde anahtar rol oynayan yapılardır (Witke, 2004).

Aktini bağlayan çok sayıda protein aktinin polimerizasyonunda ve filament diziliminde gösterdikleri aktiviteye göre sınıflandırılmaktadır. İlk protein grubu –profilinler- monomerik asidi ayırırlar, aktin monomerdeki nükleotit değiş-tokuşunu katalize eder ve sonuç olarak monomerleri aktin filamentlerin ucuna götürmektedirler. İkinci protein grubu –aktini depolimerize eden faktörler- ise tam tersi aktivite göstermektedir. Bu proteinler yaşlı aktin filamentleri tanımakta ve daha yavaş büyüyen uçtan bu filamentleri depolimerize etmektedirler (Witke, 2004).

### **1.6.1.3. İntermediate filamentler**

İntermediate filamentler yüksek yapılı ökaryotik hücrelerde üç temel filament sisteminden biridir (Strelkov ve ark., 2003). İntermediate filamentlerin moleküler yapısı dimetlerin filament oluşturmak üzere üç boyutlu bir şekilde bir araya gelmesiyle oluşmaktadır.

İntermediate filamentlerin fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte hücre iskeletinin komponenti olarak hücre bütünlük, şekil ve organel pozisyonlarının korunması, hücre ve hücre içi hareketlerin düzenlenmesi gibi görevleri olduğu ileri sürülmektedir. Sitokeratin filamentleri epitel hücrelerinde, vimentin filamentleri mezenşimal hücrelerde, demsin filamentleri kas hücrelerinde, nörofilamentler sinir hücrelerinde, glial fibriler asidik protein filamentleri de astrositlerde bulunmaktadır (Milli ve ark., 2000).

Molekül ağırlığı 55000 Dalton olan vimentin ve 57000 Dalton olan desmin hücre iskeletini oluşturan en stabil komponentlerdir. Bu iki filament hücre spesifik bir lokalizasyon gösterirler ve hücre farklılaşması olaylarına katılmaktadırlar. Vimentin bağ dokusu ve embriyonal hücrelerde geniş olarak dağılım gösterirken desminin dağılımı kas hücreleri ile sınırlı kalmaktadır (Korgun ve ark., 1999).

## 1.7. DENEYLERDE KULLANILAN TEST MADDELERİ

### 1.7.1. Karvakrol

Karvakrol, Labiatae familyasından *Origanum* türünden elde edilen aromatik bir terpen bileşiğidir. Günümüzde büyük ölçüde besin ve kozmetik sanayinde kullanılmaktadır. Ayrıca karvakrolun antibakteriyel, antifungal, böcek öldürücü (İpek ve ark., 2003; Didry ve ark., 1994; Thompson, 1996; Ultee ve ark., 1998), analjezik (İpek ve ark., 2004; Aydın ve ark., 1996), antioksidan (İpek ve ark., 2003; Aeschbach ve ark., 1994; Puertas-Mejia ve ark., 2002), aktiviteleri gösterilmiştir.

Karvakrolun çeşitli tümör tiplerinin oluşumunda inhibitör etkisi olduğu bulunmuştur (İpek ve ark., 2003). Karvakrolun ratlarda DMBA'nın neden olduğu tümör oluşumunu inhibe ettiği ve *in vitro* da melanomaların büyümesini engellediği görülmüştür (He ve ark., 1997; Zeytinoğlu ve ark., 1998). İnsan larinks karsinoma kökenli Hep-2 hücrelerinin karvakrol ile muameleden sonra apoptotik fenotip gösterdiği görülmüştür (Stammatis ve ark., 1999).

### 1.7.2. *Bifora radians*

*Bifora radians* son yıllarda Orta Anadolu'da hububat ekili alanlarda mücadelesi zorunlu bir yabancı ot olarak görülmektedir. Orta Anadolu çiftçisi tarafından 'kokarot', 'Rakıotu' veya 'Tosbağotu' olarak adlandırılan *Bifora radians*'ın en belirgin özelliği, çok uzaklardan bile duyulabilen ve çoğu kimse tarafından kötü olarak nitelendirilen bir koku yaymasıdır. Gövdesi köşeli, dik, iç kısmı boş ve boyu 100 cm'ye kadar çıkabilen bitkinin alt yaprakları maydanoz

bitkisinin yapraklarına, üst yaprakları ise dereotunun yapraklarına benzemektedir. Çiçekleri beyaz renkli olup çiçek toplulukları şemsiye şeklinde dizilmiştir. *Bifora radians* diğer yabancı otlar gibi kültür bitkisinin su, besin maddeleri ve ışık gibi vazgeçilmez ihtiyaçlarına ortak olarak zarar vermektedir (Yeğen, 1984).

*Bifora radians*'ın biyolojisi ve mücadelesi üzerinde yapılan çalışmalarda yapılan gözlemlerde *Bifora radians*'da herhangi bir fungal ya da bakteriyel hastalık etmenine rastlanmadığı gibi, bu yabancı otun çevresindeki buğday bitkilerinin de rekabet zararı dışında hastalık etmenlerinden pek etkilenmedikleri görülmüştür (Yeğen, 1984).

Yeğen, (1984) tarafından etrafına oldukça yoğun olarak yaydığı kendine has kokunun fungal hastalık etmenlerini etkileyip etkilemediği sorusunu cevaplamak üzere *Bifora radians*'ın kendine has kokusunu oluşturan bünyesindeki uçucu yağlar izole edilmiş ve bazı funguslara karşı fungitoksik potansiyelleri araştırılmıştır. Yapılan çalışmada kimyasal maddelerden oldukça az etkilenen bir patojen olan *Fusarium culmorum*'un besin ortamlarına çeşitli konsantrasyonlarda eklenen *Bifora radians* uçucu yağının bu fungusun misel gelişmesini %50 azalttığı görülmüştür. Bu çalışmada *Bifora radians*'un uçucu yağıyla yetiştiği ortamda doğrudan temas eden fungus miseline karşı yüksek fungitoksik potansiyele sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır (Yeğen, 1984.).

*Fusarium culmorum*'un geliştirildiği ortamın havasında *Bifora radians* uçucu yağ buharlarının bulunması durumunda ise bu fungusun 4 gün içinde misel gelişmesinin %40 dan fazla negatif yönde etkilendiği görülmüştür (Yeğen, 1984).

Yugoslavya'da yapılan bir çalışmada *Bifora radians*'ın tohumlarından salgılanan uçucu yağ niteliğinde 'Biforin' adlı bir madde saptanmış ve bu maddenin uygulandığı buğday bitkilerinin kök ve topraküstü organlarında normal bitkilere göre daha fazla büyümeye neden olduğu, bu büyüme farklılığına 'Biforin' uygulanmış buğday bitkisi bünyesindeki Tryptophan artışının neden olduğu ileri sürülmüştür (Yeğen, 1984).

*Bifora radians*'ın (kokarot) meyveleri mideyi kuvvetlendirici ilaç olarak ve karın gazı giderici ilaç olarak kullanılmasına rağmen kumarin içeren ilaç açısından zayıf ve yetersizdir. *Bifora radians*'ın ekstratı *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı oldukça etkilidir. *Bifora radians*'ın uçucu yağının bu

mikroorganizmalara karşı aktif olabileceği ancak bitkisel ve meyve özünün aktivite açısından daha az etkili olduğu düşünülmektedir (Yeğen, 1984).

### 1.7.3. Dill

*Anethum graveolens* L. (dill) tüylü yaprakları olan ve küçük sarı çiçekleri bulunan dağınık görümlü bir bitkidir (Hosseinzadeh H., ve ark., 2002). Dereotu soğuğa dayanıklı, bir yıllık bir bitkidir (de Carvalho ve da Fonseca, 2005). Dereotu tohumları %2.3-3.5 oranında yağ içermektedir ve bu yağın %40-60'ı karvon ihtiva ederken dereotu bitkisi, %0.4-0.8 oranında yağ içerir; bu yağ % 40 oranında karvon, %32 oranında limonen ve %20 oranında phellandrene içermektedir. Karvon hem anti-bakteriyel hem de anti-fungal aktiviteye sahiptir. Bulgaristan'da yetişen dereotu tohumlarından elde edilen ve 35 yıldan fazla bir süre boyunca saklanmış olan eterik yağ, *Aspergillus niger* mantarı ile *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida albicans* mayalarına karşı yüksek oranda antimikrobiyal etki göstermiştir (de Carvalho ve da Fonseca, 2005; Jirovetz ve ark., 2003). Karvon ve phellandrenenin *Candida albicans* mantarının küresel şekilden patojen hali olan iplik şekline dönüşümünü engellediği ve bu nedenle bu mantar sebebiyle ortaya çıkan enfeksiyonlara karşı iyi bir tedavi ajanı olduğu keşfedilmiştir (de Carvalho ve da Fonseca, 2005; McGeady ve ark., 2002). Karvon, eleutherobin isimli tümöre karşı etkili denizden elde edilen ajanın stereoselective sentezinde kullanılmıştır (de Carvalho, 2005; Carter ve ark., 2000). (+)-limonen ve (4S)-(+)-karvon, A/J dişi farelerde N-nitrosodiethylamine sebepli karsinogenezi önleme kapasitelerine bağlı olarak ön mide tümörlerini %60 oranında ve akciğer adenomasını %35 oranında azalttığı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. (de Carvalho, ve ark., 2005; Wattenberg, ve ark., 1989). Diyet amaçlı kullanılan monoterpenlerin kanserin hem önlenmesinde hem de tedavisinde yararlı olduğu keşfedilmiştir (de Carvalho ve da Fonseca, 2005; Crowell, 1999). Karvon son yıllarda aralarında bazı önemli tıbbi özelliği olan farklı bileşiklerin sentezi için de kullanılmaktadır (de Carvalho, 2005).

Dill'in antimikrobiyal, antihiperlipidemik ve antihiperkolesterolemik aktiviteler gibi bazı farmakolojik etkileri bildirilmiştir. Halk arasında ilaç olarak



kullanılan dill (dereotu) midede oluşan gaz, mide ağrısı ve buruntu gibi bazı gastrointestinal rahatsızlıklar için kullanılmaktadır. Dereotu meyvesinin gastrointestinal sistemin düz kasların kasılması üzerine etkisi bulunmaktadır (Hosseinzadeh ve ark., 2002).

#### 1.7.4. Olivetorik Asit

Liken materyalinin elde edildiği *Pseudevernia furfuracea* (var. *furfuracea* ve var. *ceratea*) Anadolu Üniversitesi Biyoloji bölümü tarafından *Pinus nigra* subsp. *pallasiana*'nın gövdesinden Eskişehir-Bozdağ'da 1200 m. yükseklikten toplanmıştır. Aynı morfolojiye sahip varyeteler C-spot testi ile tanımlanmış ve birbirlerinde ayrılmışlardır.

##### 1.7.4.1. Ekstraksiyon işlemi

10 g kurutulmuş ve öğütülmüş *Pseudevernia furfuracea* var. *furfuracea* örnekleri üzerine 100 ml aseton eklenmiş, karışım 30 dakika oda sıcaklığında ultrasonik banyoda tutulduktan sonra bir gece karanlıkta bekletilmiş ve sıvı faz beyaz bant süzgeç kağıdı ile süzülerek ekstrasyon ortamından ayrılmıştır. Ekstrat çözeltilinin çözücüsü rotari evaporatörde uçurularak katı liken ekstratı elde edilmiş ve *P. Furfuracea* için kloroform, etanol, dietil eter ve petrol eteri ile de ekstraksiyon işlemleri de yapılmış ve çözücüler uçurulduktan sonra ekstrat miktarları bulunmuştur.

#### 1.7.5. Fisodik Asit

Likene özgü polisakkaritlerin yanısıra primer maddeler (çeşitli proteinler, aminoasitler, aminler) ve sekonder metabolik ürünler (alifatik ve aromatik bileşikler) bulunmaktadır. Alifatik asitlerden fisodik asit gibi liken bileşiklerinin antibiyotik etkileri saptanmıştır (Vartia, 1950; Dülger ve ark., 1998)

*Hypogymnia enteromorpha*'nın bileşenlerinden biri olan fisodik asidin *Salmonella typhirium* TA98'deki benzo-a-pyrene ve heterosiklik aminlerinde

dahil olduğu dolaylı mutajenlerin mutajenitesini önlediği görülmüştür. Buna karşılık 6-nitropiperonal ve adriamycin gibi dolaylı mutajenler üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. Fisodik asidin antimutajenik etkisi serbest radikallerin ortadan kaldırılması veya antioksidan aktivitesi ile ilişkili değildir. Fisodik asit, hepatik mikrozomal oksidasyon sistemleri bloke etmek suretiyle reaktif metabolitlerin oluşumlarını önler. *Hypogymnia enteromorpha*'nın diğer bir komponenti olan fisodolik asidin de *Salmonella typhirium* TA98'de bir heterosiklik amin olan Trp-P-2'nin mutajenitesini de inhibe ettiği görülmüştür (Osawa ve ark., 1991).

#### 1.7.5.1. Ekstrasyon işlemi

10 g kurutulmuş ve öğütülmüş *Pseudevernia furfuracea* var. *furfuracea* örnekleri üzerine 100 ml aseton eklenmiş, karışım 30 dakika oda sıcaklığında ultrasonik banyoda tutulduktan sonra bir gece karanlıkta bekletildikten sonra karışım süzölmüş ve elde edilen ekstrat çözeltisinin çözücüsü rotari evaporatörde uçurulmuştur. Geriye kalan katı ekstrat yeterli miktarda asetonda çözüldükten sonra preparatif ince tabaka kromatografi yöntemi ile silikajel üzerinde saf maddelerine ayrılmıştır. Liken maddelerinin saflaştırılmasında yürütücü faz olarak A, B, C, E, F ve G çözeltileri olarak nitelenen standart çözeltiler kullanılmaktadır. Fisodik asidin *Pseudevernia furfuracea* ekstratından izolasyonu için A, B, C ve G çözeltileri kullanılmış ve en iyi ayırma, yürütücü olarak A çözeltisi kullanıldığında gerçekleşmiştir.

## **2. MATERYAL VE YÖNTEM**

### **2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Düşük glikozlu) (Sigma), Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma), Penicilin-Streptomycin (Sigma), 10X Trypsin-EDTA solüsyonu (Sigma), Sodyum Bikarbonat (Sigma), Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Meck), Metanol (Lab Scan), Triton X-100 (Sigma), May Grünwald Solution (Fluka), Gimsa (Sigma), Formaldehit (Sigma), TRITC Phalloidin (Tetramethylrhod amine B isothiocyanate Phalloidin Conjugate) (Sigma), MTT (Methylthiazoletetrazolium=Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) (Sigma), Tripkan Blue (Sigma), HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (Sigma), Endothelial Cell Basement Medium-2 (Clonetics), Matrigel Basement Membrane Matrix (Bioscience).

### **2.2. Kullanılan Malzemeler**

25 cm<sup>2</sup>'lik flasklar, 96 ve 6 kuyucuklu plakalar, Thoma lamı, çeşitli cam malzemeler, steril enjektör (20 ml), steril filtreler.

### **2.3. Kullanılan Aletler**

ELİSA cihazı, inverted mikroskop, su banyosu, soğutmalı ve yüksek devirli santrifüj (Heraus), kuru hava sterilizatörü (Nüve), otoklav, derin dondurucu, buzdolabı, CO<sub>2</sub> inkübatörü (Heraus), steril kabin (Heraus), sıvı azot kabı, otomatik pipetler, kar-buz makinesi.

### **2.4. Deneylerde kullanılan RATEC C2 klon hücreleri**

RATEC C2 klon hücreleri (Rat Adipose Tissue Endothelial Cell=sıçan yağ dokusu endotel hücreleri) Koparal ve arkadaşları tarafından (2004) F344 NS1c ırkı sıçanın testisi etrafındaki adipose (yağ) dokusundan (epididimal dokudan) elde

edilen hücre süspansiyonundan (stromal vascular fraction) endotel hücrelerinin izole edilmesi ile elde edilmiştir. Hücreler Dr. A.Tansu Koparal (Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) tarafından sağlanmıştır.

## **2.5. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması**

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

## **2.6. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması**

### **2.6.1. Karvakrol dozlarının hazırlanması**

Karvakrol, dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülerek 100 µM, 200 µM, 400 µM, 600 µM ve 800 µM’lık dozlar hazırlanmıştır. Karvakrol DMSO içinde çözüldüğü için pozitif kontrol olarak DMSO kullanılmıştır. DMSO oranı total inkübasyon hacminin %0.1’ini geçmemiştir. Karvakrol’un hazırlanan dozları (+4°C)’de saklanmıştır.

### **2.6.2. *Bifora radians* dozlarının hazırlanması**

*Bifora radians*, dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülerek 12,5 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM ve 100 µM’lik dozlar hazırlanmıştır. *Bifora radians*, DMSO içinde çözüldüğü için negatif kontrol olarak çözücü madde olan DMSO kullanılmıştır. DMSO oranı total inkübasyon hacminin %0.1’ini geçmemiştir. *Bifora radians*’ın hazırlanan dozları (+4°C)’de saklanmıştır.

### 2.6.3. Dill dozlarının hazırlanması

Dill, dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülerek 12,5 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM ve 100 µM'lik dozlar hazırlanmıştır. Dill, DMSO içinde çözüldüğü için negatif kontrol olarak çözücü madde olan DMSO kullanılmıştır. DMSO oranı total inkübasyon hacminin %0.1'ini geçmemiştir. Dill'in hazırlanan dozları (+4°C)'de saklanmıştır.

### 2.6.4. Olivetorik asit dozlarının hazırlanması

Olivetorik asit, metanol ve steril PBS (Phosphate Buffer Saline=Fosfat tamponlanmış tuz) (PBS: 137 µM NaCl, 2.7 µM KCl, 15 µM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 µM NaHPO<sub>4</sub>, pH 7.3) (1ml metanol, 9ml PBS) içinde çözülerek 25 µM, 50 µM, 100 µM 150 µM ve 200 µM'lik dozlar hazırlanmıştır. Çözücü madde olarak metanol ve PBS (1:9) kullanılmıştır. Metanol oranı total inkübasyon hacminin %0,1'ini aşmamıştır. Olivetorik asit'in hazırlanan dozları (+4°C)'de saklanmıştır.

### 2.6.5. Fisodik asit dozlarının hazırlanması

Fisodik asit, metanol ve steril PBS (Phosphate Buffer Saline=Fosfat tamponlanmış tuz) (1ml metanol, 9ml PBS) içinde çözülerek 25 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM ve 200 µM'lik dozlar hazırlanmıştır. Çözücü madde olarak metanol ve PBS (1:9) kullanılmıştır. Metanol oranı total inkübasyon hacminin %0,1'ini aşmamıştır. Fisodik asit'in hazırlanan dozları (+4°C)'de saklanmıştır.

## 2.7. *In vitro* Çalışmalar

### 2.7.1. RATEC C2 hücre kültürü

RATEC C2 hücreleri 37 °C de, nemli bir ortamda (%5 CO<sub>2</sub>, %95 hava), %10 FBS, % 9.2'lik NaHCO<sub>3</sub> ve %1 penisilin/streptomisin eklenmiş düşük

glikozlu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)) içinde 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda kültüre edilmişlerdir.

### **2.7.2. Hücre sayımları**

Flasklarda bulunan RATEC C2 hücreleri görünümüleri kaldırım taşlarını andırır biçimde flaskları %70 oranında doldurduklarında PBS-EDTA (Phosphate Buffer Saline-Ethylenediaminetetraacetic acid) (PBS: 137 µM NaCl, 2.7 µM KCl, 15 µM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 µM NaHPO<sub>4</sub>, pH 7.3, EDTA: 1M) ile yıkanmışlardır. Daha sonra Tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak flask yüzeyinden ve birbirlerinden ayrılmaları sağlanmıştır. Üzerlerine 800µl HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) ilave edilmiştir. 2 ml hacimli ependorf tüplere her bir örneğimiz için 0.5 ml %0.4'lük Tripkan mavisi solüsyonundan eklenmiş ve üzerine iyice pipetlenerek homojen hale getirilen hücre süspansiyonundan 0.5 ml ilave edilerek karıştırılmıştır. 10 dakika beklendikten sonra Trypan mavisi ile boyanmış RATEC C2 hücreleri Thoma lamı ile sayılmıştır. Sayımlar 3 kez tekrarlanmıştır.

### **2.7.3. Test maddelerinin hücreler üzerindeki etkilerini belirlemek için yapılan çalışmalar**

Aynı pasaj numarasına sahip RATEC C2 klon hücreleri flaskları %70 oranında kapladığında flasklardaki besiyeri uzaklaştırılmış ve Tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak hücrelerin flask tabanından ve birbirlerinden ayrılması sağlanmıştır. Daha sonra hücreler Thoma lamı ile sayılmışlardır. Test maddeleri uygun çözücüler içinde çözülmüş ve negatif kontrol, pozitif kontrol ile uygun dozları içeren deney setleri hücre çoğalımı, F-aktin iskeleti, hücre migrasyonu ve tüp oluşumu deneylerinde kullanılmıştır.

#### **2.7.3.1. Hücre çoğalımı deneyleri (MTT)**

MTT yöntemi hücre çoğalmasının ve mitokondrial fonksiyonun bir belirteci olarak kullanılır. MTT yöntemi direk ve hızlı bir şekilde başlıca

mitokondrilerde bulunan dehidrogenazların (süksinat dehidrogenaz) aktivitesini ölçer (Wu ve ark., 1999). MTT testi, sarı renkli suda çözünebilir tetrazolium tuzunun (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)) mor renkli çözünmeyen formazon tuzuna dönüşümüne dayalı, hızlı ve hassas kalorimetrik bir testtir. Tetrazoliumun formazona dönüşüm ürünleri NADP ve NADPH'nin indirgenmesi ile oluşur. NADH dehidrogenazlar primer olarak solunum siklusunun enerji üretim reaksiyonunda (glikoliz, TCA siklusu ve oksidatif fosforilasyon) görev alırlar. NADPH dehidrogenaz ise primer olarak biyosentezdeki indirgeyici reaksiyonda görev alır. MTT yönteminde canlı hücrelerin mitokondrial dehidrogenazı tetrazolium halkasını böler ve MTT sitotoksite yöntemi hücrenin, tetrazolium tuzunu formazon ürününe çevirebilme yeteneğini ölçer. Hücrenin canlılığı (metabolik aktivitesi) kaybolduğu zaman mitokondrial fonksiyon azalır ve sonuç olarak çevirebilme yeteneği azalır. Formazon miktarı birçok cell line hücrelerinde hücre sayısı ile orantılı olarak oluşur. Bu nedenle MTT testi hücre canlılığının ve çoğalmasının ölçülmesinde kullanılır. Bu teknik özellikle metabolik olarak aktif hücreler için kullanılmaktadır, çoğalmayan yada süspansiyon hücre kültürlerinde kullanılmaz (Mossmann, 1983; Alley ve ark., 1988; Wu ve ark., 1999; Putman ve ark., 2002).

Aynı pasaj numarasına sahip RATEC C2 klon hücreleri flaskların %70'ini kapladığında flasklardaki besiyeri uzaklaştırılmış ve Tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak hücrelerin tabanından ve birbirlerinden ayrılması sağlanmıştır. Daha sonra hücreler Thoma lamı ile sayılmışlardır. Hücre çoğalımı deneyleri için 96 kuyucuklu plakalar kullanılmıştır. Hücreler her kuyucuğa  $3 \times 10^3$  hücre gelecek şekilde 4 adet 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından besiyeri uzaklaştırılmıştır. Negatif kontrol, pozitif kontrol ve test maddelerinin belirlenen dozları hücrelere eklenmiştir. Deneyler 4 gün boyunca sürdürülmüştür. Hücreler gerekli sürelerde inkübasyona bırakılmıştır. Besiyeri gerekli inkübasyon sürelerinin sonunda hücrelerden uzaklaştırılmış ve MTT ilavesi yapılarak test maddelerinin hücre çoğalmasına olan etkileri saptanmıştır.

Hücreler  $5 \text{m/ml}^{-1}$  MTT stok solüsyonu ile 2 saat  $\text{CO}_2$  inkübatoründe inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda MTT içeren besiyeri kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve her kuyucuğa 100  $\mu\text{l}$  DMSO ilave edilmiştir. 5

dakika beklendikten sonra plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri ELISA cihazında 540 nm. dalga boyunda okutulmuştur (Bézivin ve ark., 2003; Holst ve Oredsson, 2005).

### 2.7.3.2. F-aktin deneyleri

25 cm<sup>2</sup> lik flasklarda büyütülen RATEC C2 klon hücreleri Tripsin-EDTA solüsyonu ile flask tabanından kaldırıldıktan sonra içlerine 2 adet steril yuvarlak lamel bulunan her bir kuyucuğa 3x10<sup>5</sup> hücre gelecek şekilde 6'lı plakalara ekilmişlerdir ve %95 hava ve %5 CO<sub>2</sub>'li gaz ortamında 37 °C'deki CO<sub>2</sub> inkübatöründe 24saat inkübe edilmiştir. Negatif kontrol, pozitif kontrol ile test maddelerinin belirlenen dozları hücrelere eklenmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından besiyerleri 6'lı plaka kuyucuklarından uzaklaştırılmıştır. Lameller üzerine yapışmış olan hücreler 1X'lik steril fosfat tampon tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanmışlar ve formaldehit ile 15 dakika 37 °C'de tespit edilmişlerdir. Bu tespit işleminden hücreler PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra Triton X-100 ile 5 dakika 37 °C'de muamele edilmiştir. Hücreler tekrar PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkanmışlardır. Bu yıkamanın ardından 5µg/ml TRITC-Phalloidin uygulanarak hücreler nemli bir ortamda, 37 °C'de 1 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda lameller 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkanmışlardır. Daha sonra lamaların üzerine 10µl PBS konularak lameller lam üzerine kapatılmış, lam ve lamel birbirlerine tırnak cilası ile yapıştırılmıştır.

### 2.7.3.3. Hücre göçü deneyi

25 cm<sup>2</sup> lik flasklarda büyütülen RATEC C2 klon hücreleri Tripsin-EDTA ile flask tabanından kaldırıldıktan sonra her bir kuyucuğa 3x10<sup>5</sup> hücre gelecek şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmişlerdir ve %95 hava ve %5 CO<sub>2</sub>'li gaz ortamında 37 °C'deki CO<sub>2</sub> inkübatöründe 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 6'lı plaka kuyucukları alt taraflarından kuyucuk boyunca cam kalemi ile çizilmiş ve bu çizgi boyunca kuyucuklardaki hücre tabakası sarı tip kullanılarak çizilmiştir. Daha sonra besiyeri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Negatif kontrol,



pozitif kontrol ve test maddelerinin belirlenen dozları hücelere verilmiştir. 48 saatlik inkübasyonun ardından hücreler May-Grünwald:Giemsa boyama tekniğine göre boyanmışlardır. Hücrelerin içinde bulunduğu kuyucuklardaki besiyeri tamamen alınmış ve hücreler steril PBS ile 2 kez yıkanmışlardır. Daha sonra %100'lük soğuk metanol ile 1 dakika muamele edilerek tespit edilmiştir. Hücreler May-Grünwald ile 2 dakika muamele edilmiş, 2 dakika sonunda boyanın yarısı alınmış ve kuyucuklarda kalan boyanın üzerine alınan boyaya eşit miktarda distile su ilave edilmiş ve 1 dakika bu boyama işlemi sürdürülmüştür. Bu işlemin ardından tüm boya alınmış ve hücreler 2 kez distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra hücreler %50 sulandırılmış Gimsa ile boyanmıştır. En son hücreler 3 kez distile su ile yıkanmıştır. En son yıkamada kullanılan suyun yarısı atılmamış, hücrelerin kurumaması için kuyucuklarda bırakılmıştır (Koparal, 2001).

#### **2.7.3.4. Tüp oluşumu deneyi**

96 kuyucuklu plakalar 50 µl/kuyucuk olacak şekilde matrijel ile kaplanmıştır. Plakalar 37 °C'de 20 dakika bekletilmiştir. Yaklaşık 4 saat %1 serum (FBS) içeren EBM-2 (Endothelial Cell Basement Medium) içinde serum açlığına maruz bırakılan hücreler  $1,5 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde %1 oranında serum ve test maddelerinin belirlenen konsantrasyonlarını içeren EBM-2 medyum içinde matrijellerin üzerine ekilmiş ve yaklaşık 12 saat kültüre edilmiştir. Tüp ağı oluşumları mikroskop altında rastgele seçilmiş 5 alandan fotoğraflanmıştır.

#### **2.8. Mikroskopi**

RATEC C2 hücreleri Soif XSZ-D<sub>2</sub> inverted mikroskobuyla incelenmiştir. Kültür hücreleri boyandıktan sonra Olympus BX50 araştırma mikroskobu altında ve değişik büyütmelelerde incelenmişlerdir. RATEC C2 hücrelerinin immünohistokimyasal yapıları Olympus U-UHK floresans mikroskobuyla incelenmiştir, tüp oluşumu Olupmus CKX41 floresan mikroskobuyla görüntülenmiştir.

## **2.9. Fotoğrafi**

RATEC C2 kültür hücrelerinin mikroskop altında saptanan uygun görüntüleri Olympus PM-30 otomatik fotomikrografi aracı kullanılarak fotoğraflanmıştır.

## **2.10. İstatistiksel Değerlendirmeler**

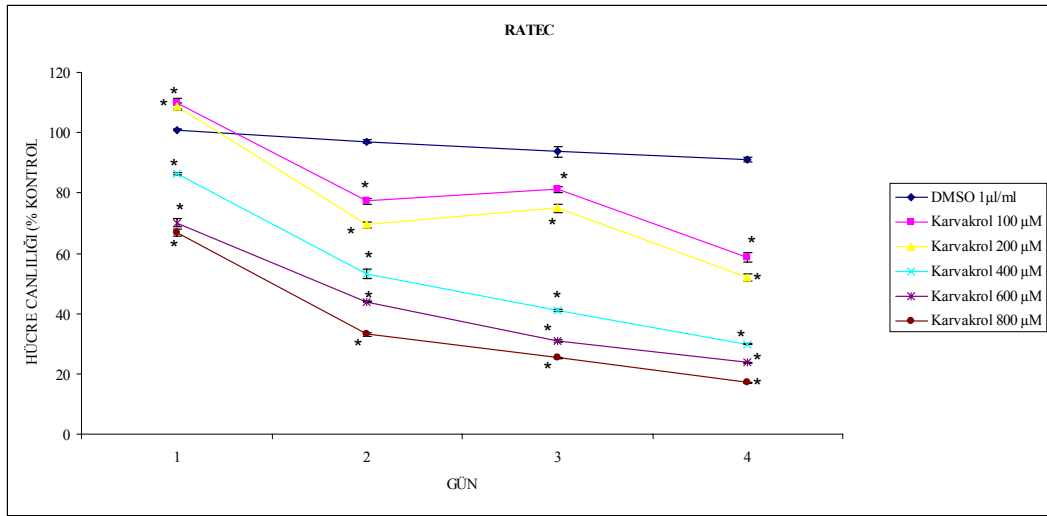
İstatistiksel değerlendirmeler için SPSS programı kullanılmıştır. Elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak  $p < 0.05$  kabul edilmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Karvakrol'un RATEC Hücreleri Üzerine Etkileri

##### 3.1.1. Karvakrol'un RATEC hücrelerinin çoğalması üzerine etkisi

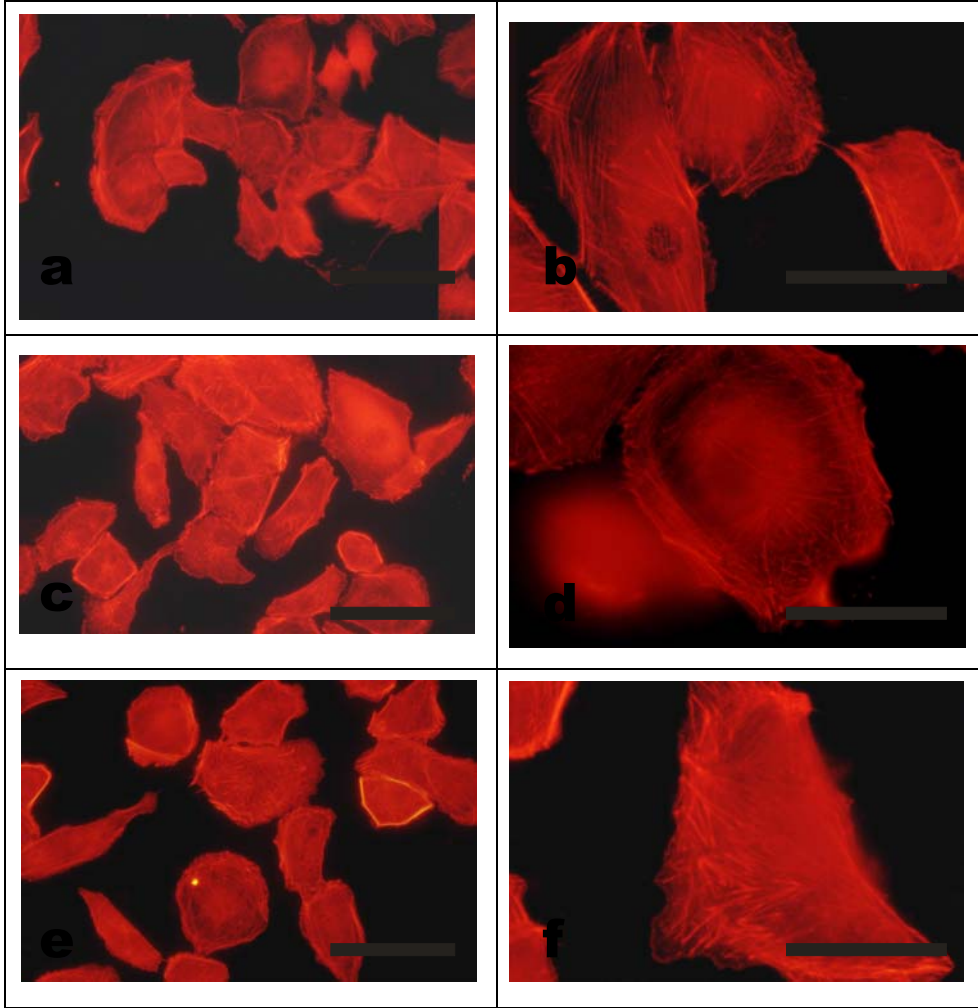
Hücre çoğalımı deneylerinde negatif ve pozitif kontrol gruplarındaki hücrelerin flasklarda bulunan hücreler gibi kaldırım taşı görünümünde oldukları, 100  $\mu$ M ve 200  $\mu$ M'lık dozlarda hücrelerin test maddesi etkisiyle iğsi bir görünüm kazandığı, 100  $\mu$ M ve 200  $\mu$ M'lık dozların 1. gün hücre sayısında artışa neden olduğu görülmüştür. Daha büyük dozlarda ise hücrelerin morfolojilerinin tamamen bozulduğu görülmüştür. 400  $\mu$ M, 600  $\mu$ M ve 800  $\mu$ M'lık dozlar 1. günden itibaren artan oranda hücre sayısında düşüşe neden olmuştur. 600  $\mu$ M ve 800  $\mu$ M'lık dozların etkileri birbirine yakın olduğu için 600  $\mu$ M'lık doz diğer deneylerde kullanılmamıştır (Şekil 3.1.).



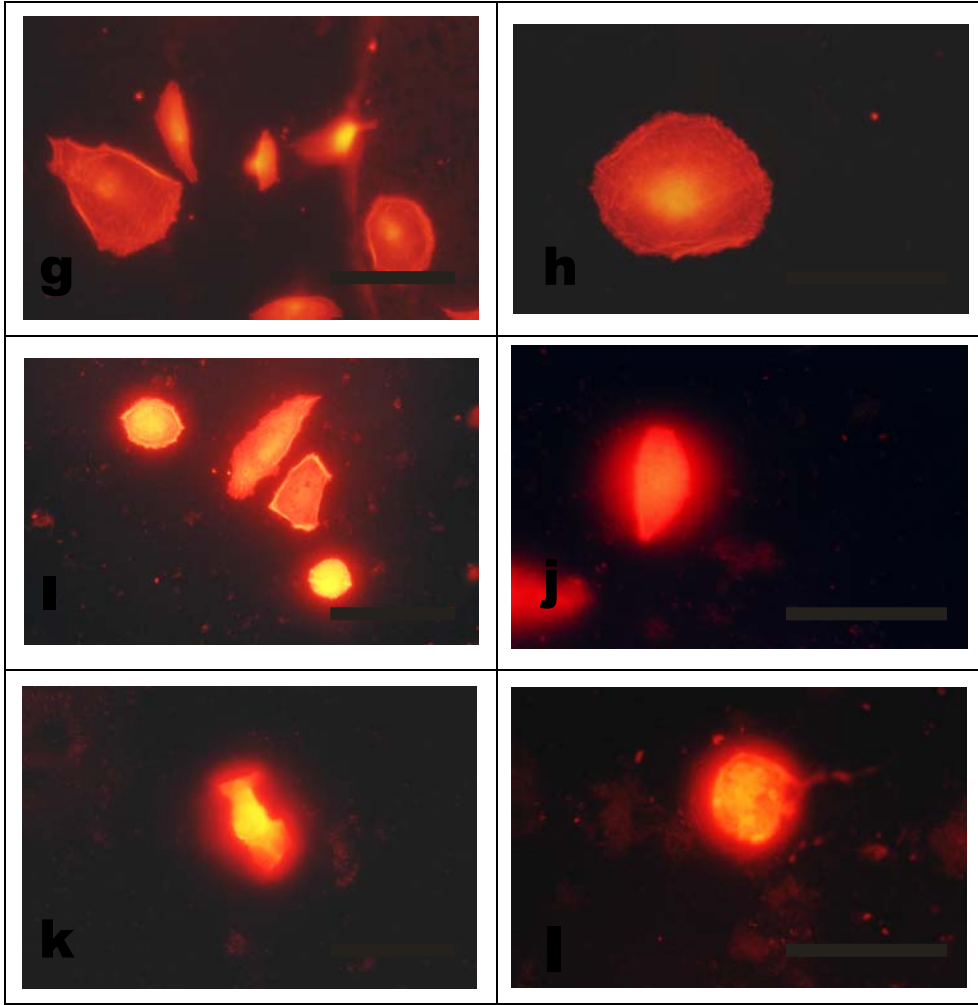
Şekil 3.1. Karvakrol'un RATEC hücrelerinin çoğalması üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. \*Tukey testi ile kontrol grubuna göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0.05$

### 3.1.2. Karvakrol'un RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine etkisi

Pozitif ve negatif kontrol gruplarında F-aktin hücre iskeletinde herhangi bir bozulma görülmemiş, besiyerlerine karvakrol eklenmiş hücrelerin 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozda kaybolmadığı, diğer dozlarda ise karvakrole yanıt olarak aktin filamentlerinin doza bağımlı depolimerizasyonu sonucu kaybolduğu gözlenmiştir (Şekil 3.2.a.).



Şekil 3.2.a. Karvakrol'un RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine etkisinin görüntüleri. F-aktin hücre iskeleti TRITC-phalloidin ile boyanmıştır. a-b) Negatif kontrol grubu, c-d) Pozitif kontrol grubu, e-f) 100 $\mu\text{M}$  karvakrol uygulanan grup. Ölçü birimi 125  $\mu\text{m}$

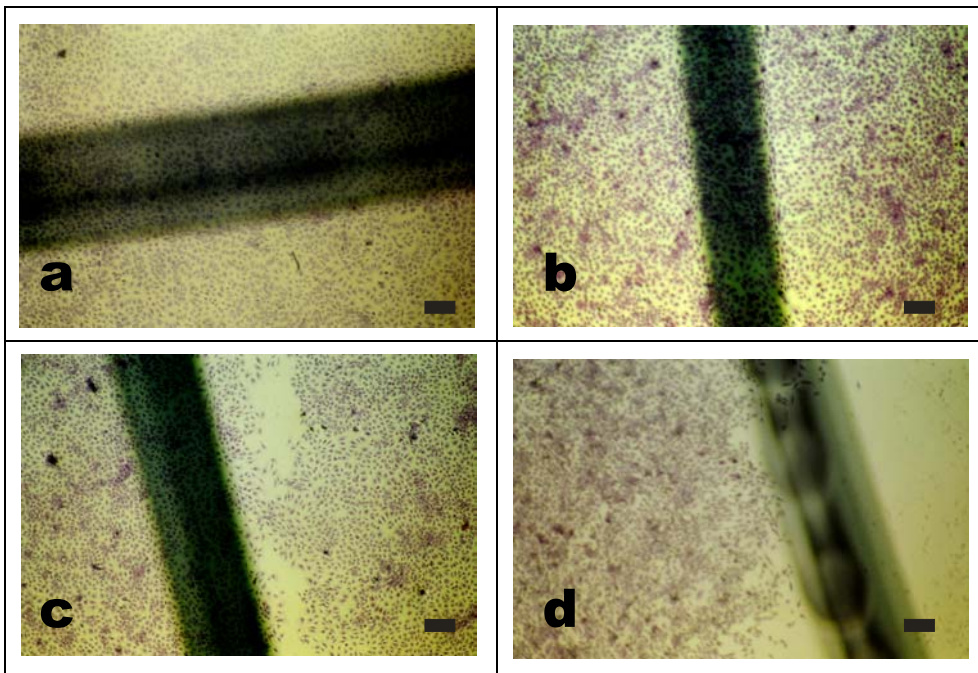


Şekil 3.2.b. Karvakrol'un RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine olan etkisinin görüntüleri. F-aktin hücre iskeleti TRITC-phalloidin ile boyanmıştır. g-h) 200  $\mu$ M karvakrol uygulanan grup, i-j) 400  $\mu$ M karvakrol uygulanan grup, k-l) 800  $\mu$ M karvakrol uygulanan grup. Ölçü birimi 125  $\mu$ m

200  $\mu$ M, 400  $\mu$ M ve 800  $\mu$ M'lık dozlarda pozitif ve negatif kontrol gruplarındaki düzenli F-aktin dağılımının kaybolduğu, hücre morfolojisinin bozulduğu görülmektedir (Şekil 3.2.b.).

### 3.1.3. Karvakrol'un RATEC hücrelerinin göçüne etkisi

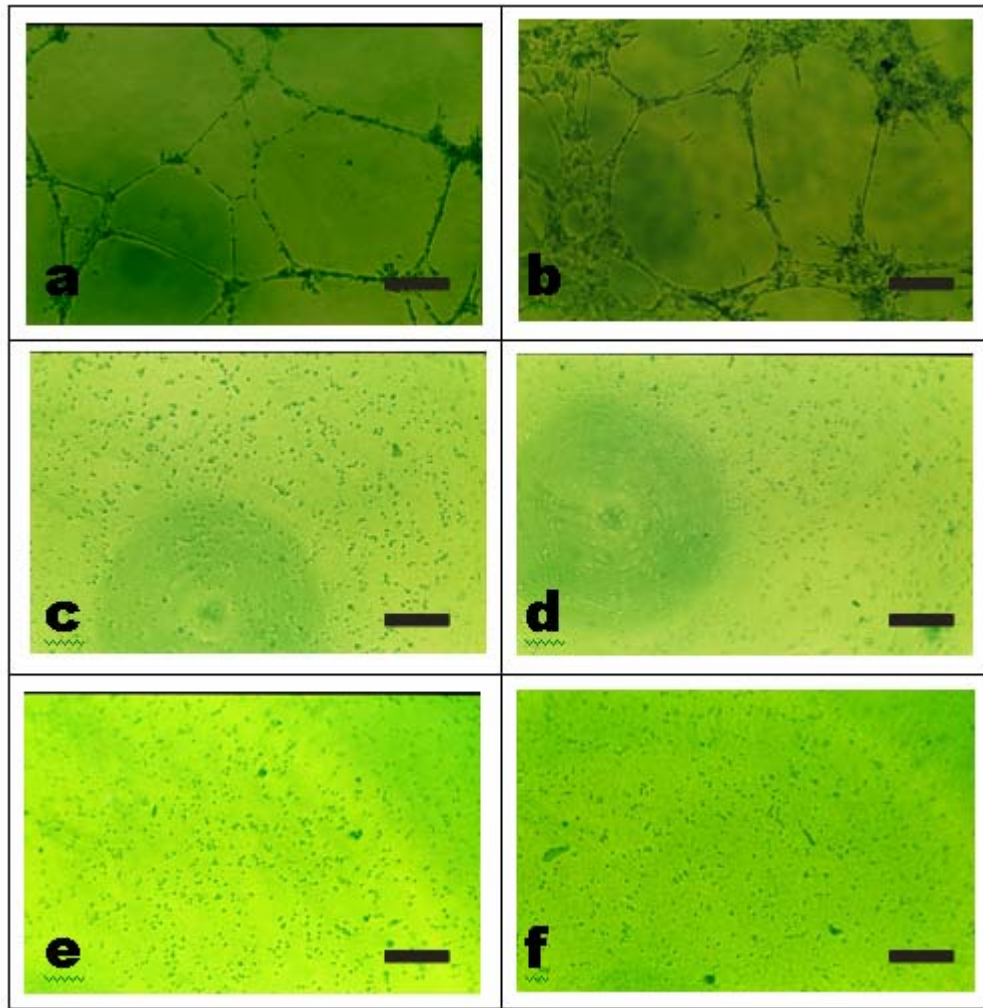
Hücre göçü deneyinde kuyucukları tamamen kaplamış ve kaldırım taşı görünümünde olan RATEC hücrelerinin negatif ve pozitif kontrol gruplarında oluşturulan kesiği kapatabildiği, 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozda kontrol gruplarına göre daha az da olsa kapatabildiği, 200  $\mu\text{M}$ 'lık dozda ise kesiği kapatamadığı görülmüştür. 400  $\mu\text{M}$ 'lık ve 800  $\mu\text{M}$ 'lık dozlarda ise hücrelerin tamamen öldüğü görülmüştür (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Karvakrol'un RATEC hücrelerinin göçüne olan etkisinin görüntüleri. RATEC hücreleri MayGrünwald-Gimsa ile boyanmışlardır. a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) 100  $\mu\text{M}$  karvakrol uygulanan grup, d) 200  $\mu\text{M}$  karvakrol uygulanan grup. Ölçü birimi 125  $\mu\text{m}$

### 3.1.4. Karvakrol'un RATEC hücrelerinin tüp oluşturmaya etkisi

Tüp oluşumu deneyinde besiyerinde test maddesi içermeyen ve açlığa mahkum edilmiş kontrol gruplarındaki RATEC hücrelerin tüp formu oluşturdukları görülürken, besiyerlerinde test maddesi içeren ve serum açlığına maruz kalan RATEC hücrelerinin tüp formu oluşturamadıkları gözlenmiştir (Şekil 3.4.).



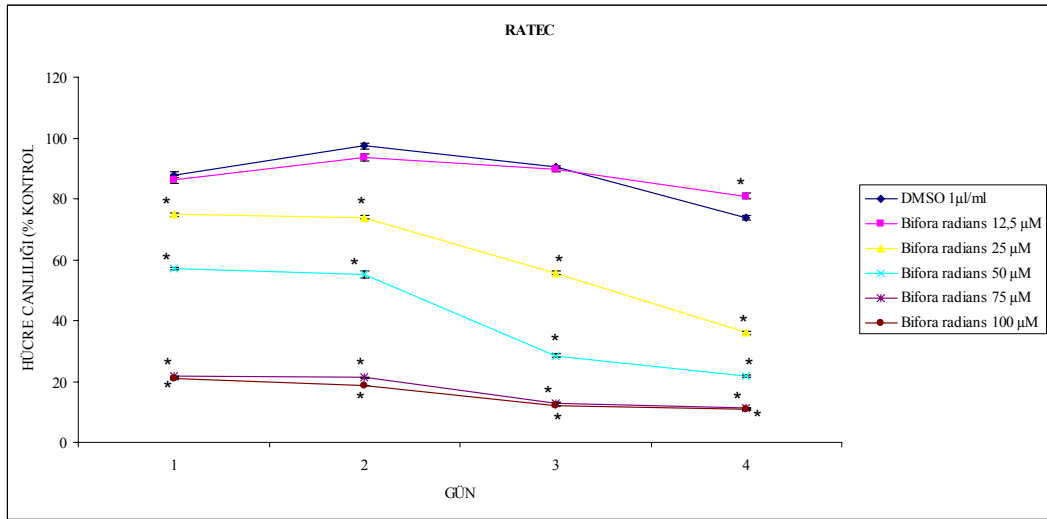
Şekil 3.4. Karvakrol'un RATEC hücrelerinin tüp oluşturmaya etkisinin görüntüleri. a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) 100µM karvakrol uygulanan grup, d) 200 µM karvakrol uygulanan grup, e) 400 µM karvakrol uygulanan grup, f) 800 µM karvakrol uygulanan grup. Ölçü birimi 125 µm



### 3.2. *Bifora radians*'ın RATEC Hücrelerine Etkileri

#### 3.2.1. *Bifora radians*'ın RATEC hücrelerinin çoğalması üzerine etkisi

MTT deneylerinde besiyerlerinde *Bifora radians* bulunan hücrelerin normal RATEC hücrelerine göre morfolojilerinde bozulmalar görülmüş ve hücreler canlılıklarını kaybetmişlerdir. Standart RATEC hücreleri birbirlerine sıkıca bağlanmış ve kaldırım taşı görünümünde olan hücrelerdir. *Bifora radians* ile muamele edilmiş hücrelerde ise bu görünüm düşük dozlarda iğsi hale dönüşürken yüksek dozlarda hücre silueti haline dönüşmüştür ve hücreler arası bağlantılar çözülmüştür. MTT testi sonucunda RATEC hücrelerinde doza bağımlı olarak birinci gün başlayıp dördüncü günde de devam eden bir düşüş gözlenmiştir. 75  $\mu\text{M}$  ve 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozlardaki düşüşlerin tüm günlerde paralel oldukları görülmüştür. 75  $\mu\text{M}$  ve 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozların etkileri birbirine yakın olduğu için 75  $\mu\text{M}$ 'lık doz diğer deneylerde kullanılmamıştır (Şekil 3.5.).

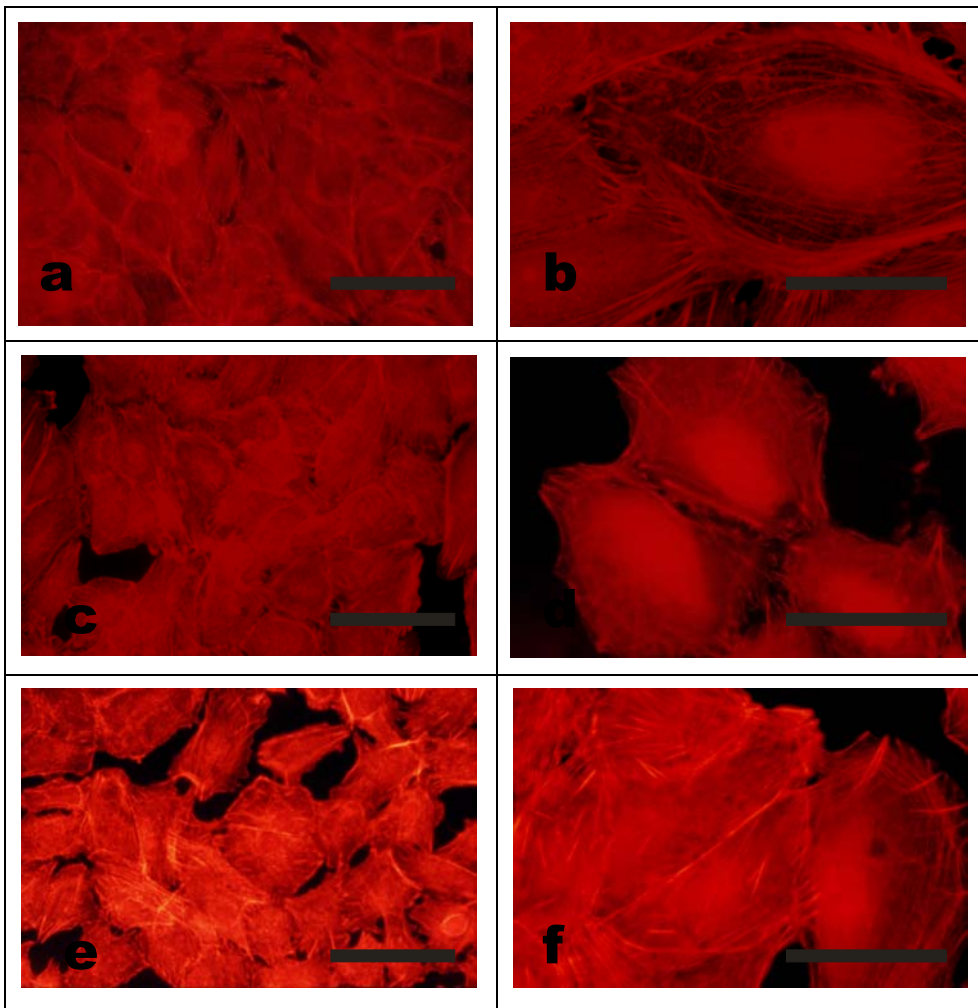


Şekil 3.5. *Bifora radians*'ın RATEC hücrelerinin çoğalması üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. \*Tukey testi ile kontrol grubuna göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0.05$

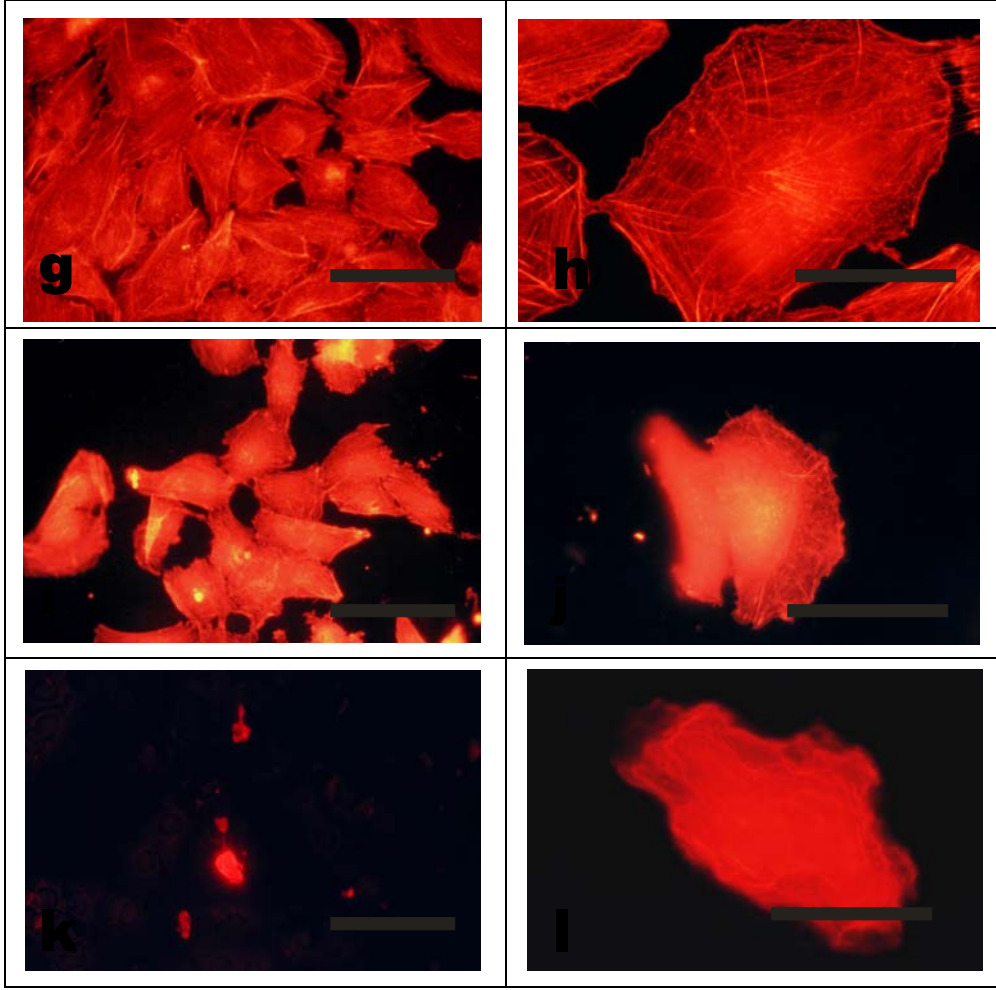


### 3.2.2. *Bifora radians*'ın RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine etkisi

Negatif kontrol grubunda aktin filamentleri sitoplazmada kalın bir korteks şeklinde ve sitoplazma boyunca uzanan daha ince fibriller şeklinde görülmektedir. Pozitif kontrol grubunda da aktin filamentler olağan görünümündedir. 12,5  $\mu$ M *Bifora radians* uygulanan RATEC hücrelerinin aktin filamentlerinin yapısı korunmuştur (Şekil 3.6.a.).



Şekil 3.6.a. *Bifora radians*'ın RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine olan etkisinin görüntüleri. F-aktin hücre iskeleti TRITC-phalloidin ile boyanmıştır. a-b) Negatif kontrol grubu, c-d) Pozitif kontrol grubu, e-f) 12,5  $\mu$ M *Bifora radians* uygulanan grup. Ölçü birimi 125  $\mu$ m

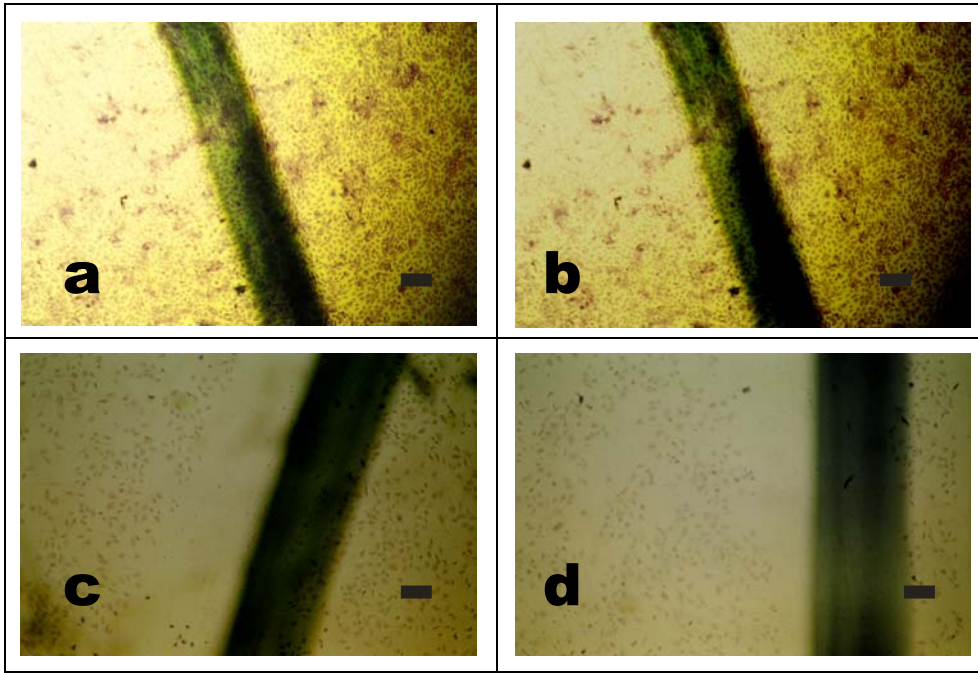


Şekil 3.6.b. *Bifora radians*'in RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine olan etkisinin görüntüleri. F-aktin hücre iskeleti TRITC-phalloidin ile boyanmıştır. g-h) 25  $\mu$ M *Bifora radians* uygulanan grup, i-j) 50  $\mu$ M *Bifora radians* uygulanan grup g-h) 100  $\mu$ M *Bifora radians* uygulanan grup. Ölçü birimi 125  $\mu$ m

25  $\mu$ M'lık dozda aktin filamentlerin düzenli yapıları devam etmektedir. 50  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M'lık dozların negatif kontrol ve pozitif kontrol grupları ile karşılaştırıldığında düzenli bir şekilde yerleşmiş aktin filamentlerin organizasyonunun bozulduğu görülmektedir (Şekil 3.6.b.).

### 3.2.3. *Bifora radians*'ın RATEC hücrelerinin göçü üzerine etkisi

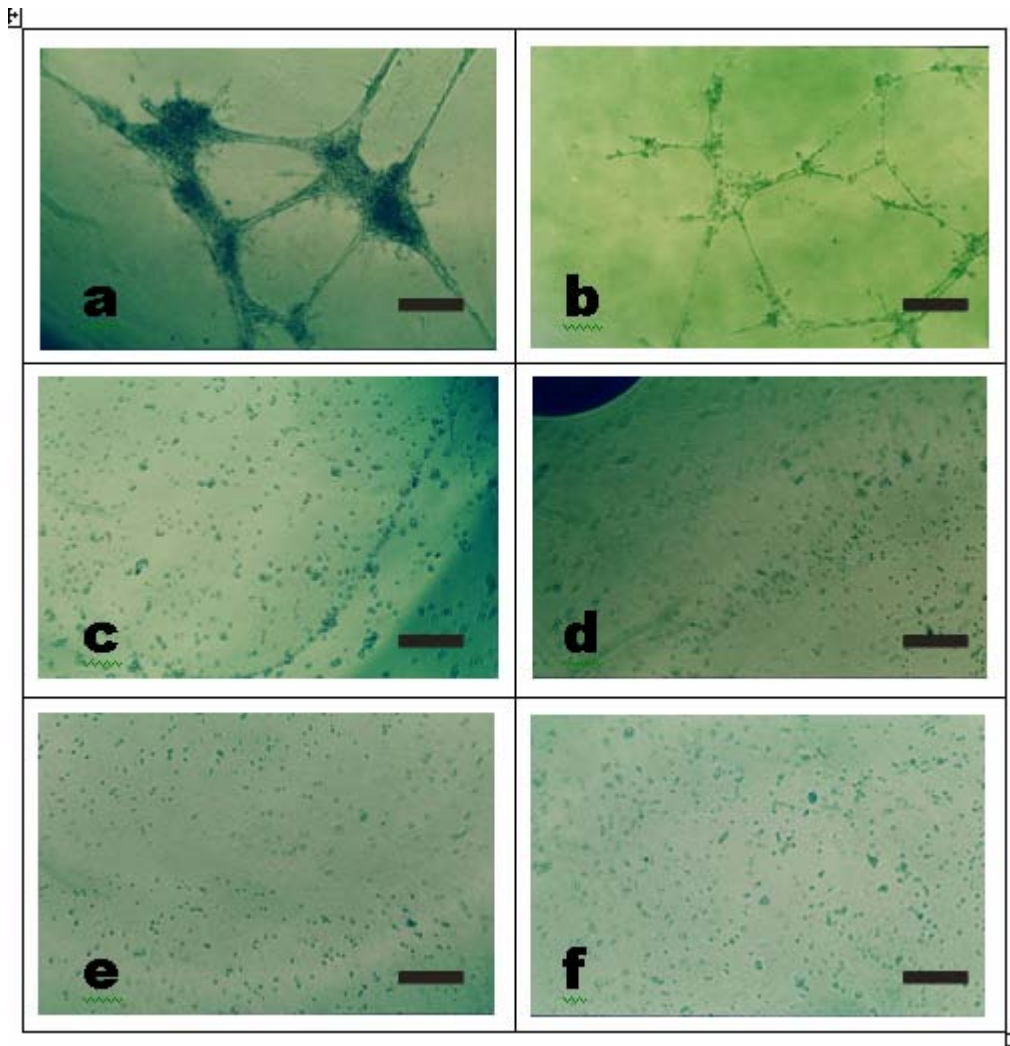
*Bifora radians* uygulanan RATEC hücrelerinin kontrol gruplarında oluşturulan kesiği kapatabildiği, 12,5  $\mu$ M ve 25  $\mu$ M'lık dozlarda kesiğin kapatılamadığı görülmüştür. Daha sonraki dozlarda hücrelerin tamamen öldüğü görülmüştür (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. *Bifora radians*'ın RATEC hücrelerinin göçüne olan etkisinin görüntüleri. RATEC hücreleri MayGrünwald-Gimsa ile boyanmışlardır. a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) 12,5  $\mu$ M *Bifora radians* uygulanan grup, d) 25  $\mu$ M *Bifora radians* uygulanan grup. Ölçü birimi 125  $\mu$ m

### 3.3.4. *Bifora radians*'ın RATEC hücrelerinin tüp oluşturmaya etkisi

%1 serum içeren EBM-2 ( Endothelial Cell Basement Medium-2) ile serum açlığına mahkum edilen RATEC hücrelerinde negatif ve pozitif kontrol gruplarında tüp oluşumunun gerçekleştiği, 12,5  $\mu$ M ve 25  $\mu$ M *Bifora radians* ile muamele edilmiş hücrelerin çok az oranda yan yana geldiği fakat tüp oluşumunun gerçekleşmediği görülmüştür. 50  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M'lık dozlarda ise hücrelerin yan yana gelmesi ve tüp oluşumu olayları gözlenmemiştir (Şekil 3.8.).

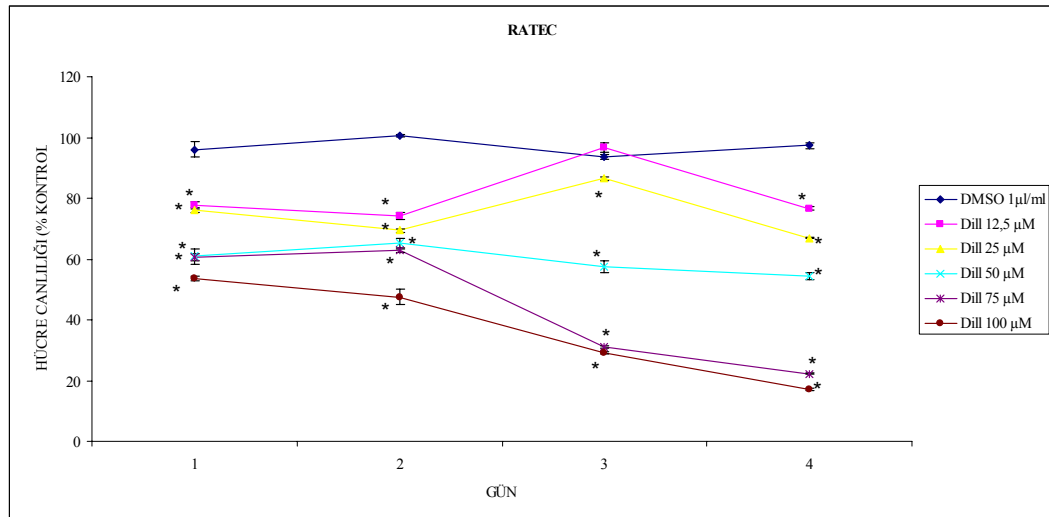


Şekil 3.8. *Bifora radians*'ın RATEC hücrelerinin tüp oluşturmaya üzerine olan etkisinin görüntüleri. a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) 12,5  $\mu$ M *Bifora radians* uygulanan grup, d) 25  $\mu$ M *Bifora radians* uygulanan grup, e) 50  $\mu$ M *Bifora radians* uygulanan grup, f) 100 $\mu$ M *Bifora radians* uygulanan grup. Ölçü birimi 125  $\mu$ m

### 3.3. Dill'in RATEC Hücreleri Üzerindeki Etkileri

#### 3.3.1. Dill'in RATEC hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkisi

RATEC hücreleri çeşitli konsantrasyonlardaki dill ile muamele edilmiş ve MTT deneyleri sonucu endotel hücrelerinin çoğalmasının durduğu ELİSA cihazında yapılan ölçümler sonucu tespit edilmiştir. Ayrıca negatif ve pozitif kontrol gruplarında hücre morfolojilerinde bir değişme gözlenmemesine rağmen düşük dozlarda dill eklenmiş hücrelerin iğsi bir forma dönüştüğü, daha büyük dozlarda dill eklenmiş hücrelerin tamamen canlılıklarını kaybettikleri, MTT ölçüm sonuçlarında 12,5  $\mu$ M ve 25  $\mu$ M'lık dozların birinci ve ikinci günlerde hücre sayısında azalmaya neden olduğu fakat üçüncü gün hücrelerde bir artışa neden olduğu, dördüncü gün tekrar hücrelerin düşüğe geçtiği görülmüştür. 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M'lık dozların doz ve gün artışına bağlı olarak hücre çoğalmasında düşüşler görülmüştür. Özellikle 75  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M lık dozlarda üçüncü ve dördüncü günlerde dill'in anti proliferatif etkisi maksimum olarak gözlenmiştir. 75  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M'lık dozların etkileri birbirine yakın olduğu için 75  $\mu$ M'lık doz diğer deneylerde kullanılmamıştır (Şekil 3.9.).

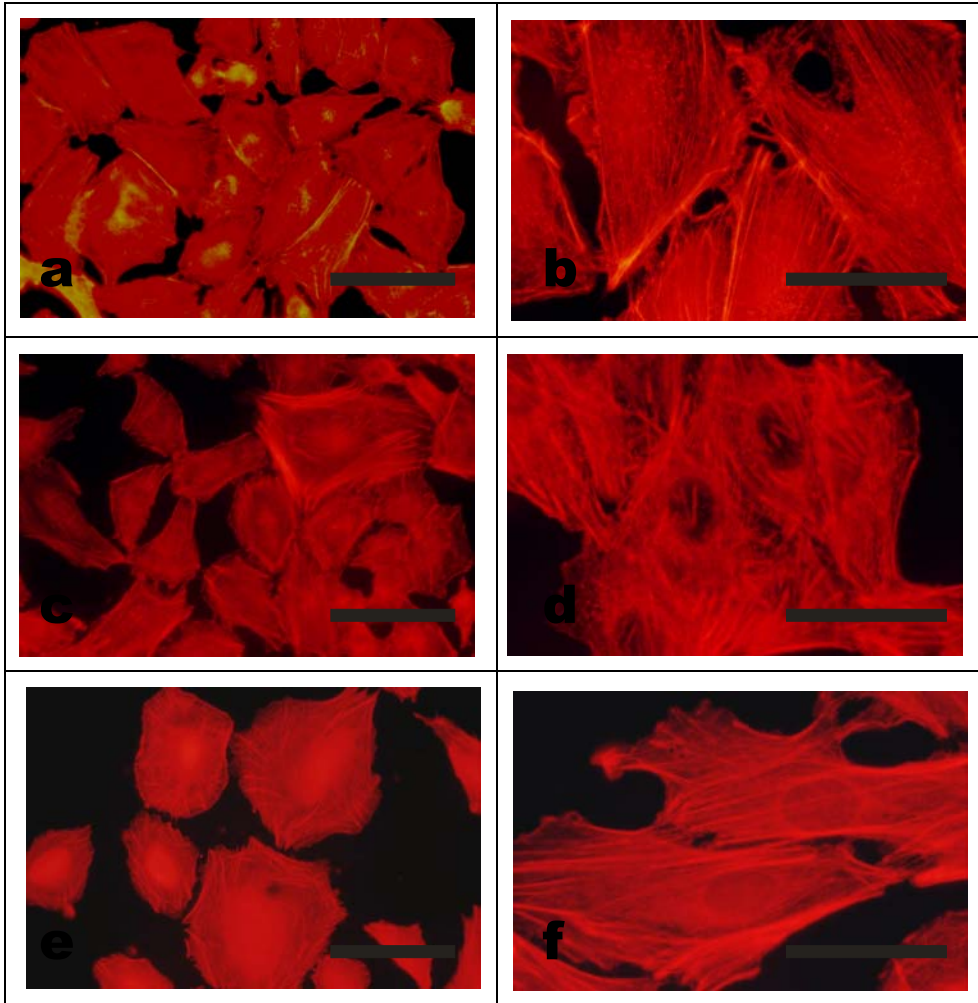


Şekil 3.9. Dill'in RATEC hücrelerinin çoğalması üzerine olan etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. \*Tukey testi ile kontrol grubuna göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0.05$

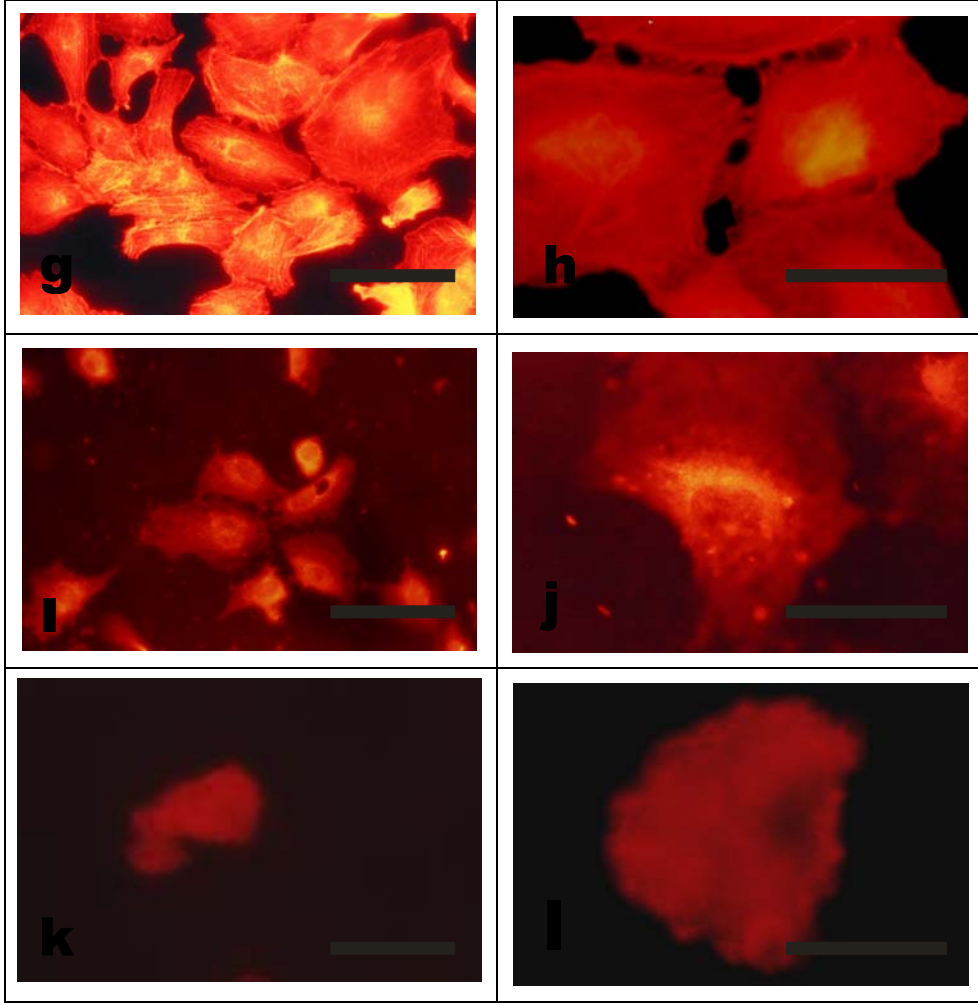


### 3.3.2. Dill'in RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine etkisi

Dill uygulanmış RATEC hücrelerinde negatif ve pozitif kontrol gruplarında aktin filamentlerin sitoplazma boyunca uzanan ince stres fiberleri şeklinde organize olduğu, 25  $\mu\text{M}$ 'lık dozda dill'in aktin filamentleri çok fazla etkilemediği, kontrol gruplarına paralel bir görünüm sergiledikleri görülmüştür (Şekil 3.10.a.).



Şekil 3.10.a. Dill'in RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine olan etkilerinin görüntüleri. F-aktin hücre iskeleti TRITC-phalloidin ile boyanmıştır. a-b) Negatif kontrol grubu, c-d) Pozitif kontrol grubu, e-f) 12,5  $\mu\text{M}$  dill uygulanan grup. Ölçü birimi 125  $\mu\text{m}$

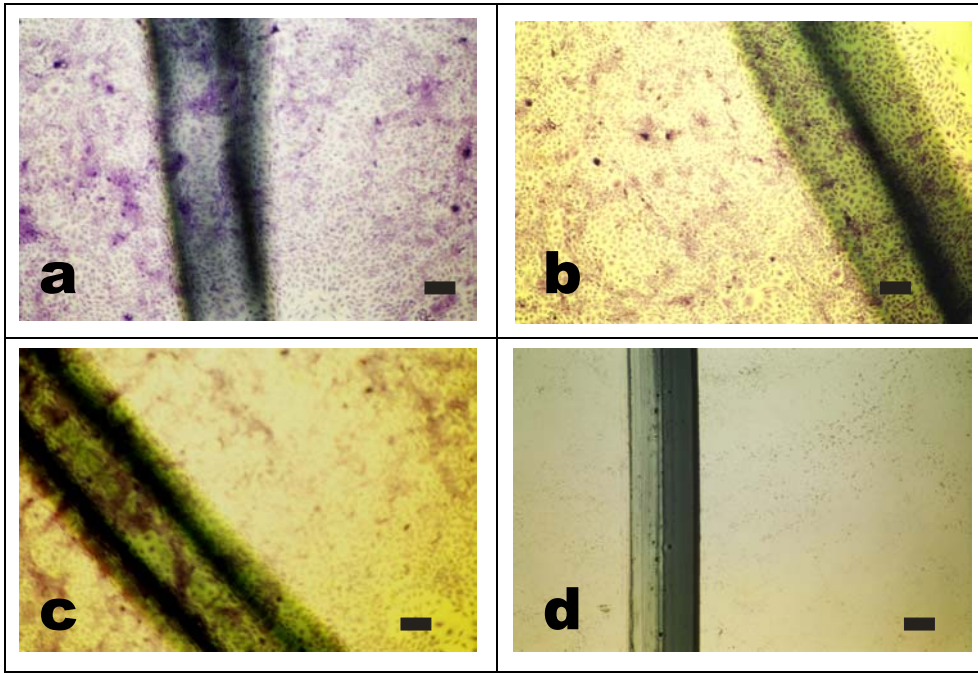


Şekil 3.10.b. Dill'in RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine olan etkilerinin görüntüleri. F-aktin hücre iskeleti TRITC-phalloidin ile boyanmıştır. g-h) 25  $\mu$ M dill uygulanan grup, i-j) 50 $\mu$ M dill uygulanan grup, k-l) 100  $\mu$ M dill uygulanan grup. Ölçü birimi 125  $\mu$ m

25  $\mu$ M'lık dozda polimer aktin fibrillerin sayısında azalma görülmüştür. Aktin filamentlerin dill'e yanıt olarak bozulması 50  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M'lık dozlarda da devam etmektedir (Şekil 3.10.b.).

### 3.3.3. Dill'in RATEC hücrelerinin göçüne etkisi

Dill uygulanmış RATEC hücrelerinin negatif ve pozitif kontrol grupları ile 12,5  $\mu\text{M}$ 'lık dozlarda kesici tamamen kapattığı gözlemiştir. 25  $\mu\text{M}$ 'lık dozda hücre sayısı çok azalmış ve kesik kapatılamamıştır. 50  $\mu\text{M}$  ve 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozlarda hücreler tamamem ölmüştür (Şekil 3.11.).

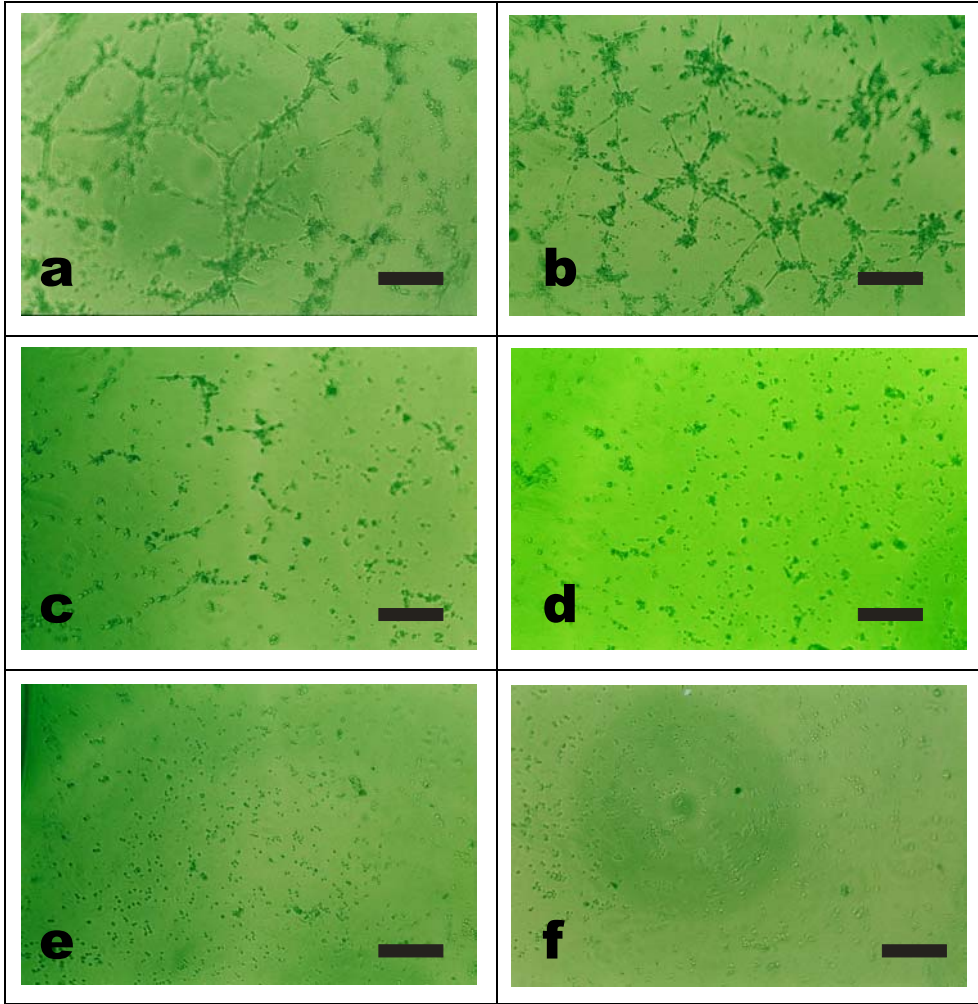


Şekil 3.11. Dill'in RATEC hücrelerinin göçüne olan etkilerinin görüntüleri. RATEC hücreleri MayGrünwald-Gimsa ile boyanmışlardır. a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) 12,5  $\mu\text{M}$  dill uygulanan grup, d) 25  $\mu\text{M}$  dill uygulanan grup. Ölçü birimi 125  $\mu\text{m}$



### 3.3.4. Dill'in RATEC hücrelerinin tüp oluşturmaya etkisi

Dill uygulanmış RATEC hücrelerinde pozitif ve negatif kontrol gruplarında tüp oluşumu tam olarak gerçekleşmiştir. 12,5  $\mu\text{M}$ 'lık dozda parçalanmış tüp izlenimi verecek şekilde hücrelerin yan yana geldiği, 25  $\mu\text{M}$ 'lık dozda hücrelerin 12,5  $\mu\text{M}$ 'lık doza göre daha az sayıda hücrenin yan yana gelerek kümeleştiği görülmüştür. 50  $\mu\text{M}$  ve 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozlarda hücrelerin sayısında doz artışına bağlı olarak azalma olduğu ve hücrelerin yanyana gelip küme oluşturmadıkları görülmüştür (Şekil 3.12.).

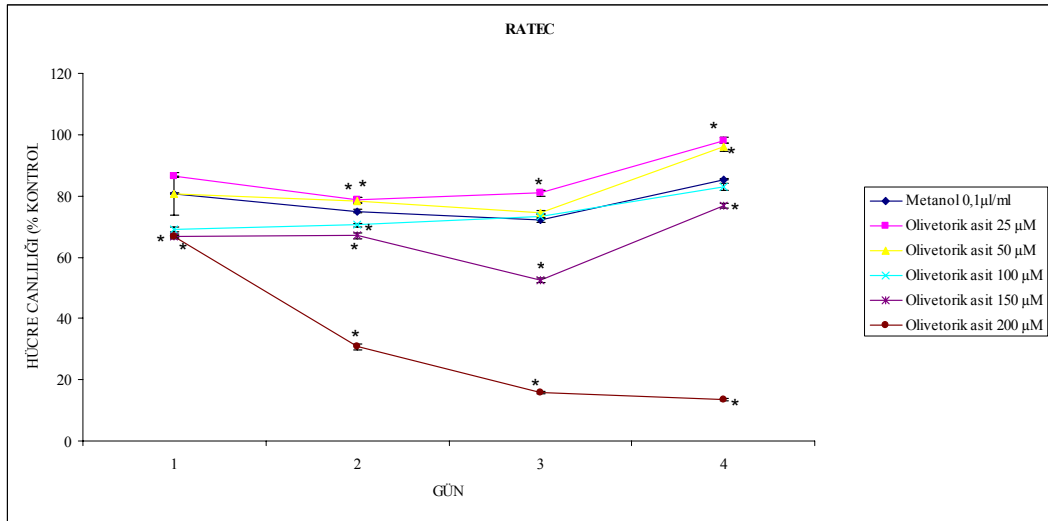


Şekil 3.12. Dill'in RATEC hücrelerinin tüp oluşturmaya üzerine olan etkisinin görüntüleri. a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) 12,5  $\mu\text{M}$  dill uygulanan grup, d) 25  $\mu\text{M}$  dill uygulanan grup, e) 50  $\mu\text{M}$  dill uygulanan grup, f) 100  $\mu\text{M}$  dill uygulanan grup. Ölçü birimi 125  $\mu\text{m}$

### 3.4. Olivetorik Asit'in RATEC Hücreleri Üzerine Olan Etkileri

#### 3.4.1. Olivetorik asit'in RATEC hücrelerinin çoğalması üzerine olan etkisi

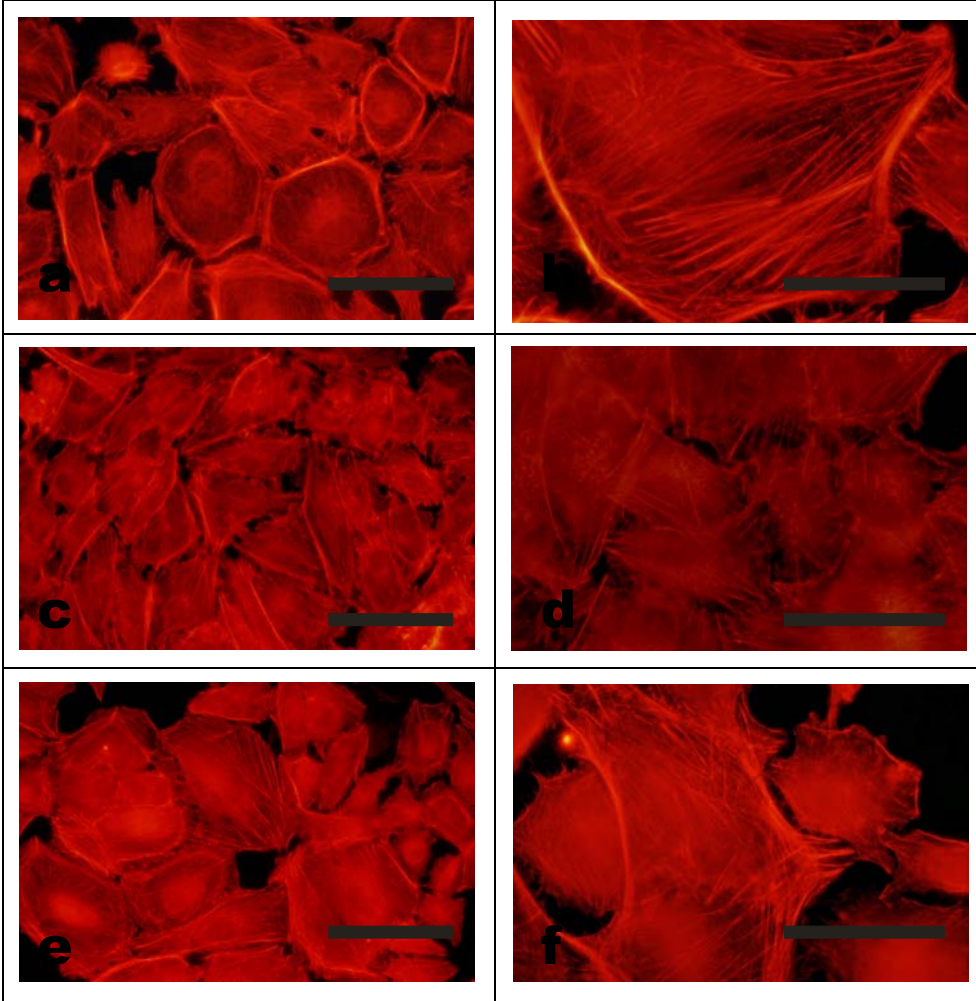
Olivetorik asit'in MTT testi sonucu RATEC hücrelerinin proliferasyonunu 25 ve 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozda tüm günlerde stimüle ettiği görülmüştür. 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozda ilk iki güne göre, üçüncü ve dördüncü günde olivetorik asit proliferatif bir etki göstermiştir. 200  $\mu\text{M}$ 'lık dozda birinci günden başlayarak hücre sayısında azalma görülmüştür. 200  $\mu\text{M}$ 'lık dozun RATEC hücreleri üzerinde maksimum sitotoksik etkisi dördüncü günde görülmüştür. 150 $\mu\text{M}$  ve 200  $\mu\text{M}$ 'lık dozların etkileri birbirine yakın olduğu için 150  $\mu\text{M}$ 'lık doz diğer deneylerde kullanılmamıştır (Şekil 3.13.).



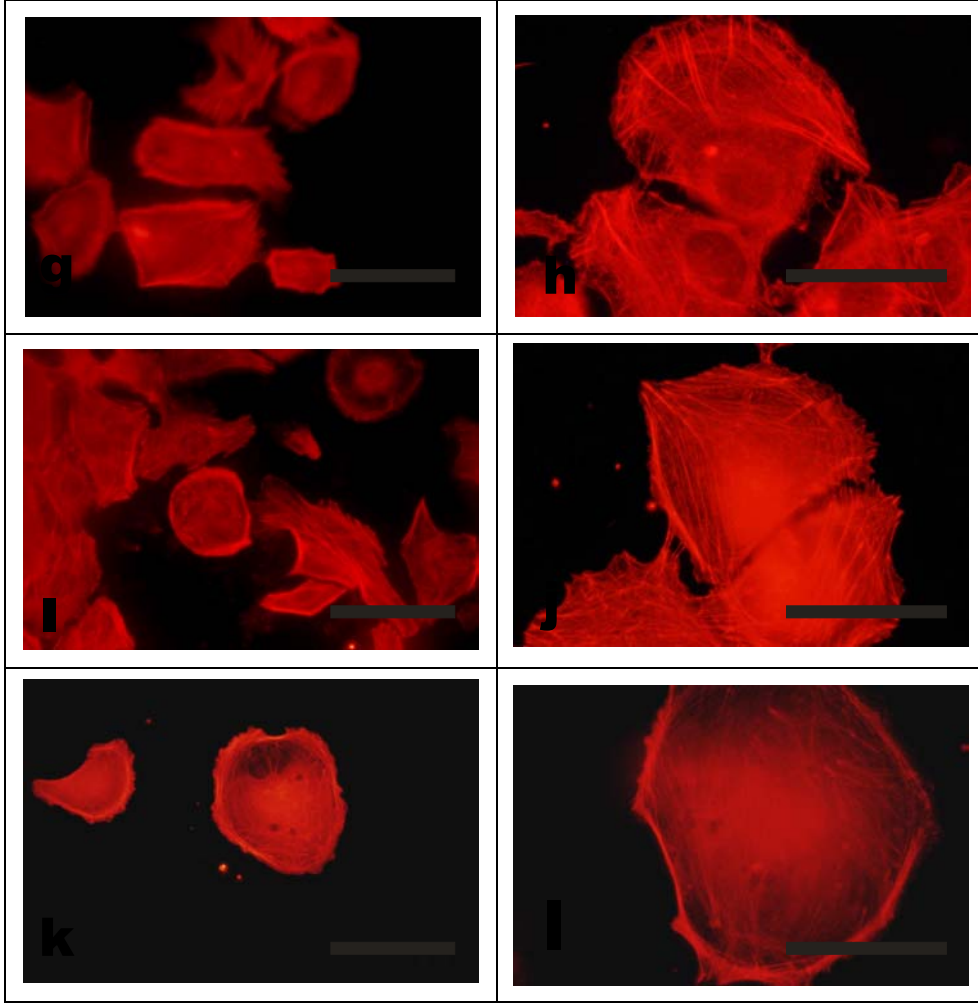
Şekil 3.13. Olivetorik asit'in RATEC hücrelerinin çoğalması üzerine etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. \*Tukey testi ile kontrol grubuna göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0.05$

### 3.4.2. Olivetorik asit'in RATEC hücrelerinin aktin filamentlerine etkisi

Negatif kontrol, pozitif kontrol ve 25  $\mu\text{M}$ 'lık olivetorik asit ile muamele edilmiş hücrelerin aktin filamentlerinin sitoplazma boyunca düzenli demetler şeklinde uzandığı görülmektedir (Şekil 3.14.a.).



3.14.a. Olivetorik asit'in RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine olan etkilerinin görüntüleri. F-aktin hücre iskeleti TRITC-phalloidin ile boyanmıştır. a-b) Negatif kontrol grubu, c-d) Pozitif kontrol grubu, e-f) 25  $\mu\text{M}$  olivetorik asit uygulanan grup. Ölçü birimi 125  $\mu\text{m}$

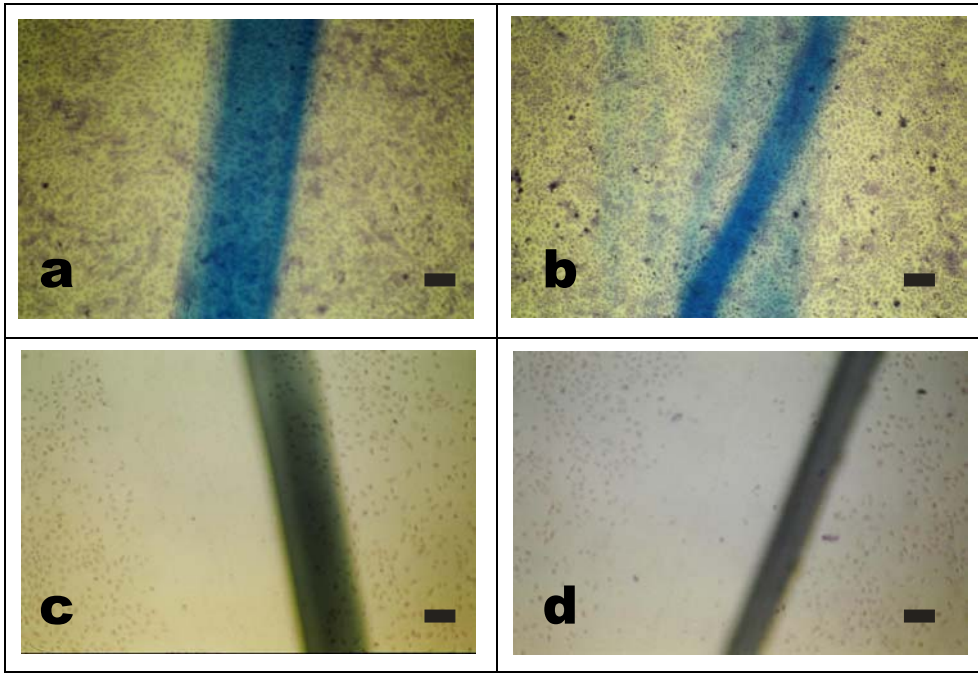


Şekil 3.14.b. Olivetorik asit'in RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine olan etkilerinin görüntüleri. F-aktin hücre iskeleti TRITC-phalloidin ile boyanmıştır. g-h) 50  $\mu$ M olivetorik asit uygulanan grup, i-j) 100  $\mu$ M olivetorik asit uygulanan grup, k-l) 200  $\mu$ M olivetorik asit uygulanan grup. Ölçü birimi 125  $\mu$ m

Olivetorik asit'in 200  $\mu$ M'lık dozunda aktin filamentlerinin yapısında bozulmalar görülmektedir (Şekil 3.14.b.).

### 3.4.3. Olivetorik asit'in RATEC hücrelerinin göçüne etkisi

Olivetorik asit uygulanmış RATEC hücrelerinin negatif ve pozitif kontrol gruplarında hücrelerin kesiği tam olarak kapattığı, 25  $\mu$ M ve 50  $\mu$ M'lık dozlarda hücre sayısının azalıp kesiğin tam olarak kapanmadığı görülmüştür. Daha yüksek dozlarda ise hücrelerin tamamen öldükleri görülmüştür (Şekil 3.15.).

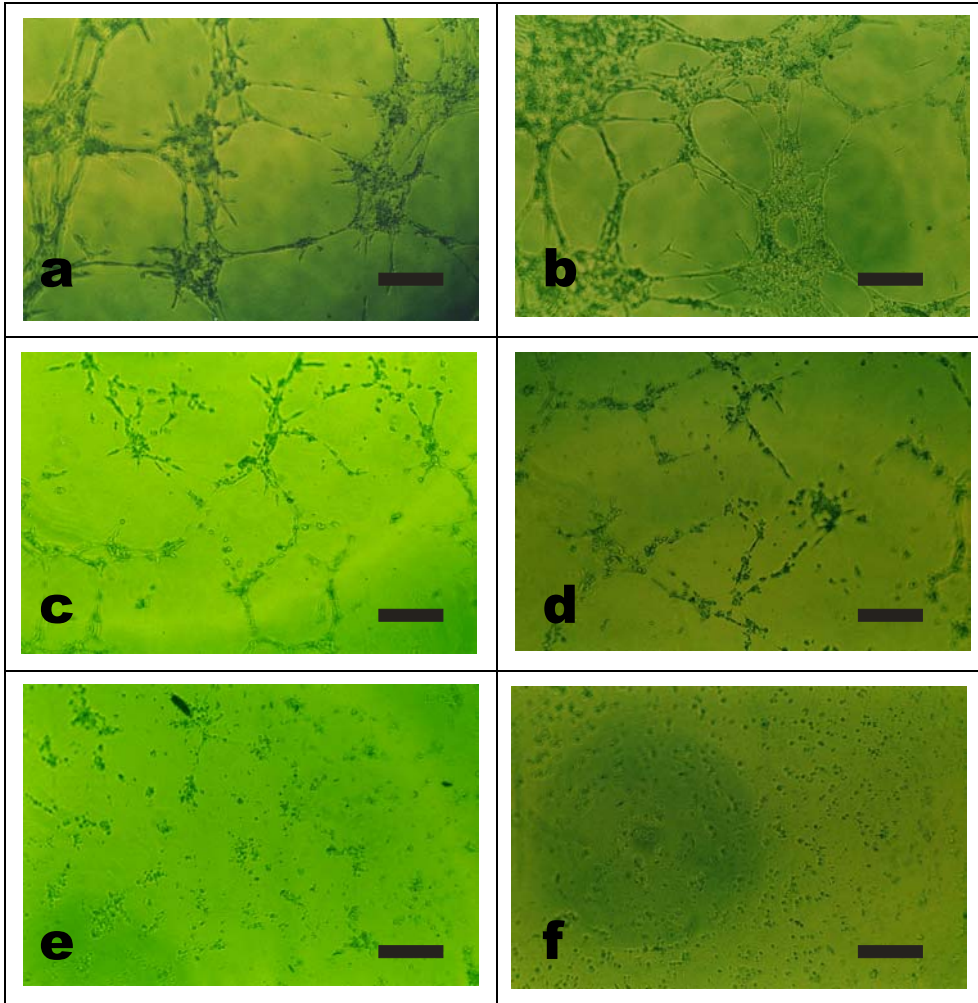


Şekil 3.15. Olivetorik asit'in RATEC hücrelerinin göçüne olan etkilerinin görüntüleri .RATEC hücreleri MayGrünwald-Gimsa ile boyanmışlardır. a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) 25  $\mu$ M olivetorik asit uygulanan grup, d) 50  $\mu$ M olivetorik asit uygulanan grup. Ölçü birimi 125  $\mu$ m



### 3.4.4. Olivetorik asit'in RATEC hücrelerinin tüp oluşturması üzerine etkisi

Olivetorik asit uygulanmış RATEC hücrelerinde negatif ve pozitif kontrol gruplarında tüp oluşumu tam olarak gerçekleşmiştir. 25  $\mu\text{M}$  ve 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozlarda yapısı bozulmuş tüp izlenimi veren yapılar oluşmuştur. 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozda hücreler küme oluşumu şeklinde bir araya gelmiş fakat tüp oluşumunu andıracak bir yapı oluşmamıştır. 200  $\mu\text{M}$ 'lık dozda tüp oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 3.16).

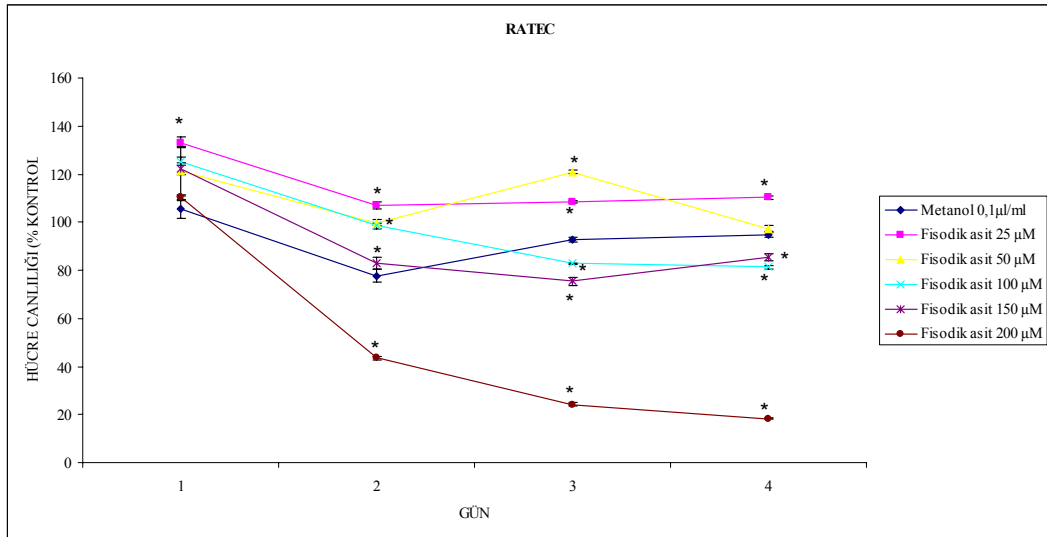


Şekil 3.16. Olivetorik asit'in RATEC hücrelerinin tüp oluşturması üzerine olan etkisinin görüntüleri. a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) 25  $\mu\text{M}$  olivetorik asit uygulanan grup, d) 50  $\mu\text{M}$  olivetorik asit uygulanan grup, e) 100  $\mu\text{M}$  olivetorik asit uygulanan grup, f) 200  $\mu\text{M}$  olivetorik asit uygulanan grup. Ölçü birimi 125  $\mu\text{m}$

### 3.5. Fisodik asit'in RATEC Hücreleri Üzerine Olan Etkileri

#### 3.5.1. Fisodik asit'in RATEC hücrelerinin çoğalması üzerine olan etkisi

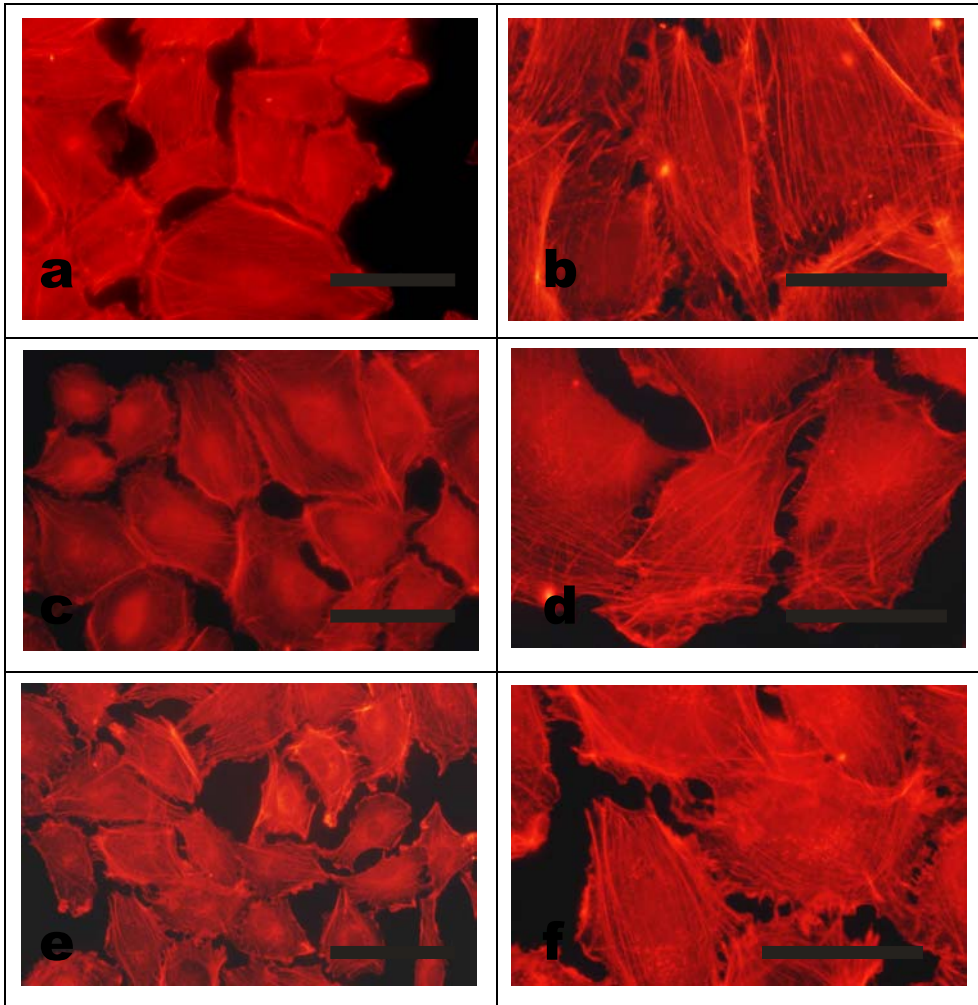
MTT deneylerinde fisodik asit'in tüm dozlarda 1. gün hücre sayısında artışa neden olduğu görülmüştür. Bu sonuç fisodik asit'in hücrelerin aktin filamentlere olan etkisi ile de uyuşmaktadır. 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozun diğer iki güne göre 3. gün hücre çoğalmasını daha fazla stimüle ettiği görülmüştür. 3.gün 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$  ve 200  $\mu\text{M}$ 'lık dozlar hücre sayısında düşüşe neden olmuştur. Maksimum sitotoksik etki 200  $\mu\text{M}$ 'lık doz ile 4.gün gözlenmiştir. 150  $\mu\text{M}$  ve 200  $\mu\text{M}$ 'lık dozların etkileri birbirine yakın olduğu için 150  $\mu\text{M}$ 'lık doz diğer deneylerde kullanılmamıştır (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. Fisodik asit'in RATEC hücrelerinin çoğalması üzerine olan etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. \*Tukey testi ile kontrol grubuna göre anlamlı farklılıklar. Anlamlılık değeri  $p < 0.05$

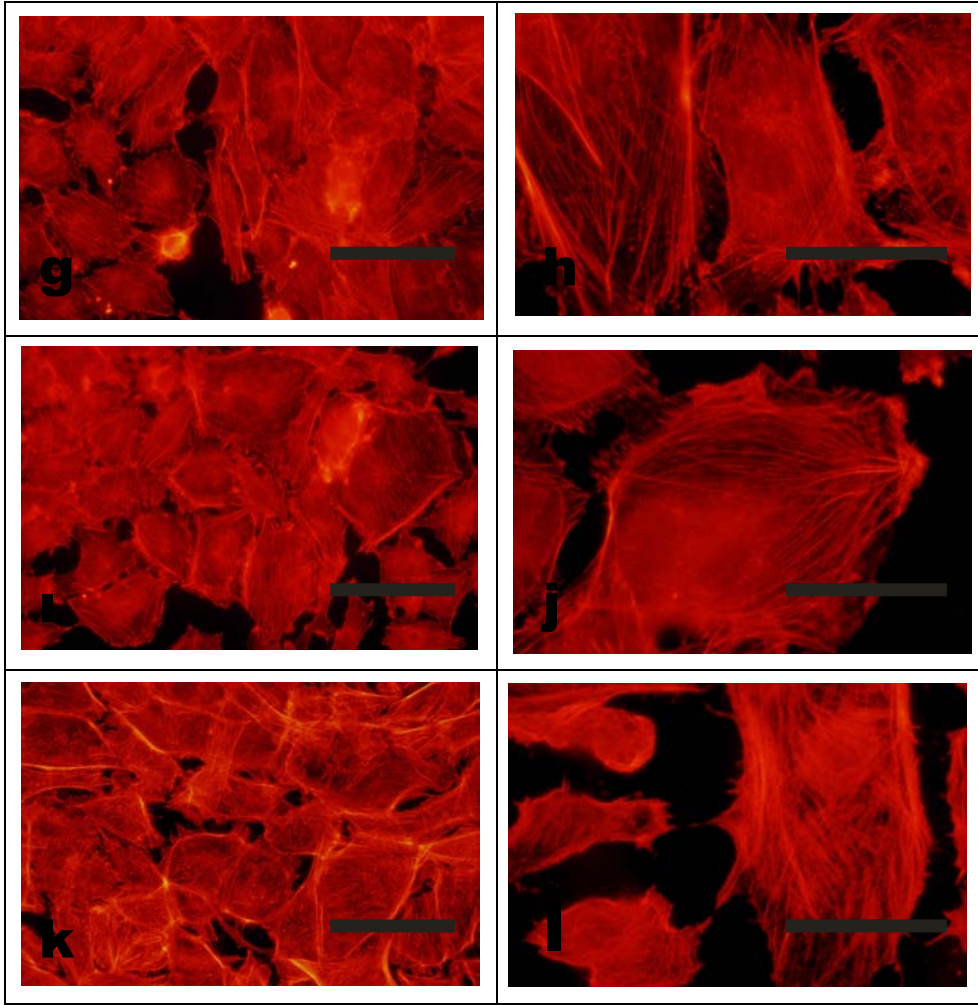
### 3.5.2. Fisodik asit'in RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine etkisi

F-aktin deneylerinde negatif ve pozitif kontrol gruplarında aktin filamentler sitoplazma boyunca birbirlerine paralel olarak uzanmışlardır. 25  $\mu$ M fisodik asit uygulanmış hücrelerde de bu düzenli aktin filament yapısı korunmuştur (Şekil 3.18.a.).



3.18.a. Fisodik asit'in RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine olan etkilerinin görüntüleri. F-aktin hücre iskeleti TRITC-phalloidin ile boyanmıştır. a-b) Negatif kontrol grubu, c-d) Pozitif kontrol grubu, e-f) 25  $\mu$ M fisodik asit uygulanan grup. Ölçü birimi 125  $\mu$ m



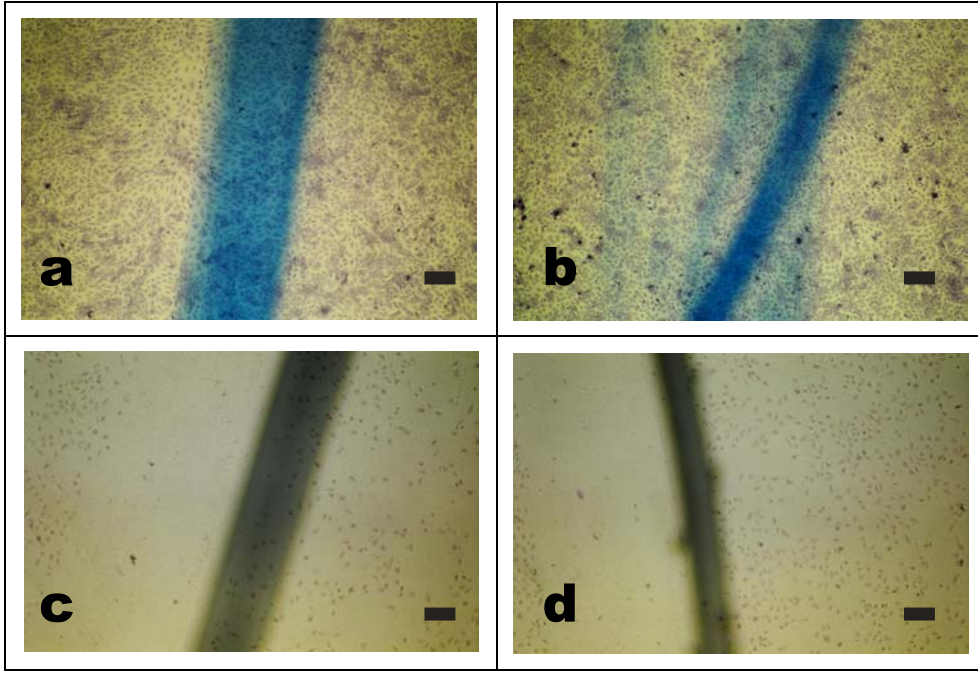


Şekil 3.18.b. Fisodik asit'in RATEC hücrelerinin aktin filamentleri üzerine olan etkilerinin görüntüleri. F-aktin hücre iskeleti TRITC-phalloidin ile boyanmıştır. g-h) 50  $\mu$ M fisodik asit uygulanan grup, i-j) 100  $\mu$ M fisodik asit uygulanan grup, k-l) 200  $\mu$ M fisodik asit uygulanan grup. Ölçü birimi 125  $\mu$ m

50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M'lık dozlarda düzenli aktin polimer demet yapısı korunmuştur (Şekil 3.18.b.).

### 3.5.3. Fisodik asit'in RATEC hücrelerinin göçüne etkisi

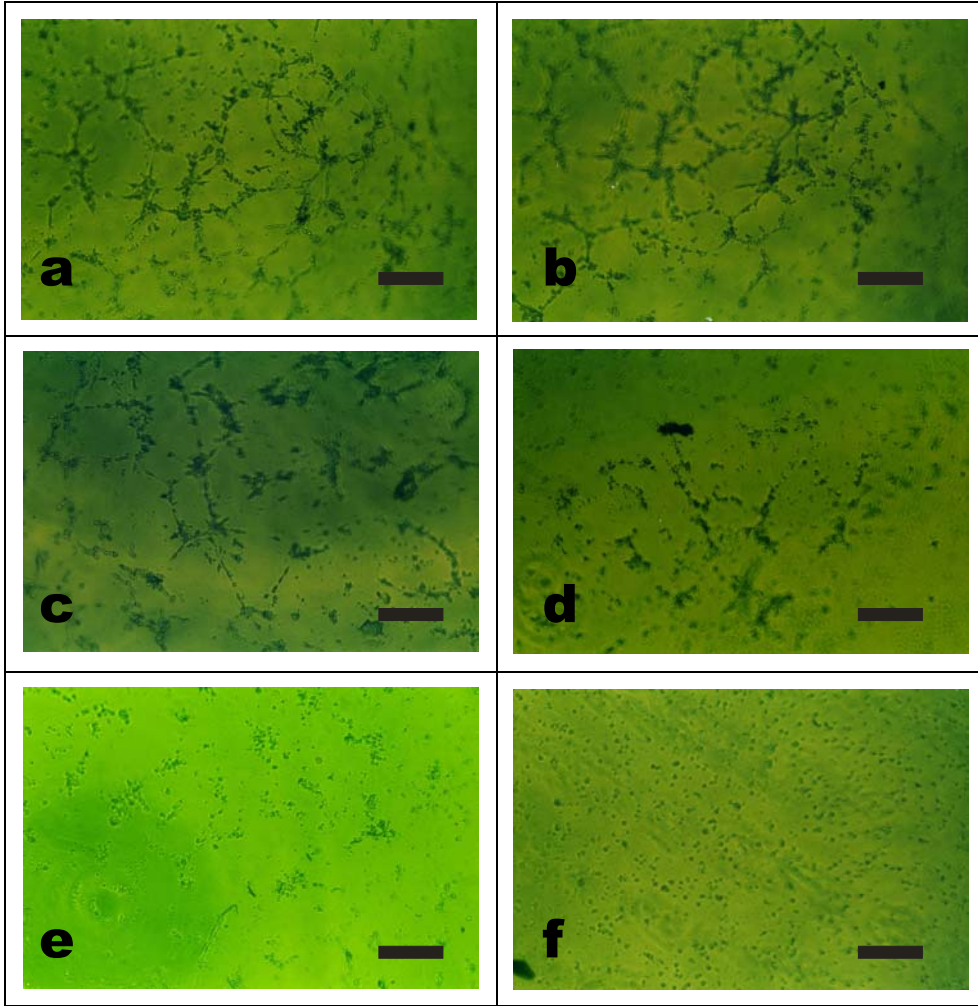
Fisodik asit uygulanmış RATEC hücrelerinin negatif ve pozitif kontrol gruplarında hücrelerin kesigi tam olarak kapattığı, 25  $\mu$ M ve 50  $\mu$ M'lık dozlarda hücre sayısının azalıp kesigin tam olarak kapanmadığı, 100 $\mu$ M ve 200  $\mu$ M'lık dozlarda ise hücrelerin tamamen öldükleri görülmüştür (Şekil 3.19.).



Şekil 3.19. Fisodik asit'in RATEC hücrelerinin göçüne olan etkilerinin görüntüleri. RATEC hücreleri MayGrünwald-Gimsa ile boyanmışlardır. a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) 25  $\mu$ M fisodik asit uygulanan grup, d) 50  $\mu$ M fisodik asit uygulanan grup. Ölçü birimi 125  $\mu$ m

### 3.5.4. Fisodik asit'in RATEC hücrelerinin tüp oluşturması üzerine olan etkisi

Fisodik asit uygulanmış RATEC hücrelerinin pozitif ve negatif kontrol gruplarında tüp oluşumunun tam olarak gerçekleştiği, 25  $\mu\text{M}$ 'lık dozda da tüp oluşumunun gerçekleştiği görülmüştür. 50  $\mu\text{M}$ 'lık dozda bozulmuş tüp yapısı izlenimi veren yan yana gelmiş hücreler gözlenmektedir. 100  $\mu\text{M}$ 'lık dozda hücrelerin kümeleştiği fakat tüp oluşumunu andıracak bir yapı oluşturamadıkları görülmektedir. 200  $\mu\text{M}$ 'lık dozda hücreler birbirinden bağımsız olarak bulunmaktadırlar (Şekil 3.20).



Şekil 3.20. Fisodik asit'in RATEC hücrelerinin tüp oluşturması üzerine olan etkisinin görüntüleri.  
 a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) 25  $\mu\text{M}$  fisodik asit uygulanan grup,  
 d) 50  $\mu\text{M}$  fisodik asit uygulanan grup, e) 100  $\mu\text{M}$  fisodik asit uygulanan grup,  
 f) 200  $\mu\text{M}$  fisodik asit uygulanan grup. Ölçü birimi 125  $\mu\text{m}$

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Anjiyogenez sonuçta yeni bir kan damarı oluşumuna neden olan bazal membran degradasyonu, endotel hücre göçü, çoğalması, tekrar düzenlenmesi ve diğer morfolojik değişiklikler gibi aşamaları içerir.

Bugün tümör büyümesinin anjiyogeneze bağımlı olduğu ve tümörün büyüme artışının, damarlaşma artışını gerektirdiği genel olarak kabul edilmektedir. Anjiyogenezin gerçekleşmediği tümörler süresiz olarak uyku halinde kalırlar. Süratli logaritmik büyümeyi, kan desteğinin kazanılması takip eder. Anjiyogenez, birçoğunu sitokinlerin oluşturduğu çeşitli faktörler aracılığıyla ilerler. Bu anjiyogenik faktörler tümör hücrelerinde ve komşu stromal hücrelerde üretilirler, bunlar, çevredeki endotel hücrelerinde bulunan reseptörlerine bağlanırlar ve anjiyogenik sinyallerin aktarımını sağlarlar. Buna bağlı olarak endotel hücreler çoğalma, hareket ve damar oluşturabilmek için istila etme yeteneği kazanırlar. Bu nedenle anjiyogenik sinyaller bloke edilirse, anjiyogenez engellenmiş ve tümörün büyümesi de dolaylı olarak durdurulmuş olur (Shimizu ve Oku, 2004).

Anjiyogenezin engellenmesi tümörü öldürmekten ziyade uyku haline geçmesine neden olabilir. Böylece antivaskular ajanların idaresi, hastalığı ilerlemiş metastaz safhasında olan ve diğer tedavi türlerine direnç kazanmış hastalarda uzun dönemli hafifleme sürecini sürdürmede etkili olabilir (Margeli, ve ark., 2003; Hayes, ve ark., 1999). Anti-anjiyogenezin bir tedavi aracı olabileceği düşüncesi 1970'lerin başlarına dayanmaktadır. Anjiyogenezin biyolojisini anlama yolundaki ilerlemeler; anjiyogenezin ilerletilmesi (örneğin koroner ve periferik iskemi, yaraların iyileştirilmesi), veya önlenmesi (örneğin tümörlerin büyümesinin) için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesini olanaklı kılmıştır (Margeli, ve ark., 2003; Kahn, ve ark., 2000). Birçok ilaca dirençli tümörlerin de antianjiyogenik kemoterapi ile etkili bir şekilde hedeflenmesi de mümkündür (Margeli, ve ark., 2003; Browder, ve ark., 2000; Klement, ve ark., 2000).

Geleneksel anti-anjiyogenik terapi; pro-anjiyogenik faktörlerin reseptörlere bağlanması, sinyal aktarımı, çoğalan endotel hücrelerinin göçü ve tüp oluşumu gibi anjiyogenik aşamaların engellenmesi üzerine kuruludur. Ne var ki bu aşamalardan herhangi birinin tamamen engellenmesinin tamamen anjiyogenezi

önlediği veya bu engellemenin tümörün gerilemesine yol açtığı kesin olarak ispatlanamamıştır. Daha da ötesi beklenmeyen yan etkiler de görülebilir. ANET (Anti-neovaskuler therapy), endotel hücreleri hedef alan yeni bir kemoterapi türüdür. Anjiyogenez sırasında hücreler çoğaldığından, bunlar anti-kanser ajanlarına karşı dayanıksızdırlar. ANET (Anti-neovaskuler therapy) anti-anjiyogenik terapi olarak kategorize edilse de yukarıda tanımlanan geleneksel anti-anjiyogenik terapiden farklıdır, çünkü bu terapi çoğalan endotel hücrelerini yok eder ve ayrıca tümörlerin gerilemesiyle sonuçlanan tümör dokularına gelen kan desteğinin tamamen bloke edilmesi sırasında tümör hücrelerini de yok ettiği düşünülmektedir. Bundan başka ANET'in ilaçlara direnç kazandırması beklenmemektedir. Sitotoksik anti-kanser ajanların kullanımına bağılı olarak bu terapiye potansiyel olarak eşlik eden yan etkiler bulunmasına rağmen bu yan etkiler DDS (Drug Delivery System=İlaç Taşıma Sistemi) teknolojisinin kullanımıyla ve dozajın düşürülmesine bağılı olarak azaltılabilir (Shıımızu ve Oku, 2004).

Tümör kan damarları geliştikleri tuhaf ortamdan kaynaklanan birçok anormalliğe sahiptir. Arteriollerin kılcal damarlara bağılandığı geleneksel damar hiyerarşisi tümörlerde bulunmaz. Tümör damarlarındaki endotel hücreler sıkı bir duvar oluşturmazlar ve perisitler gevşekçe bağılanmışlardır. Tümörlerin anjiyogenez inhibitörleri ile tedavi edilmesi yeni damar gelişimini durdurabilir, bazı damarları geriletebilir ve diğerslerini normalleştirebilir. Tümör damarlarının normalizasyonu tümör hücrelerine ilaç dağılımını arttırabilir. Perisitler ve endotel hücre gerilemesinden kurtulan damarsal bazal membran, tedavi durdurulduğunda yeni tümör damarlarının gelişmesi için bir tür yapı iskelesine dönüşebilir (Baluk, ve ark., 2005).

Kanser terapisi olarak anjiyogenezi kontrol eden ajanların gelecekteki hedefi kanser olarak ortaya çıkan patolojik anjiyogenezin karakteri olan alt üst olmuş anjiyogenez süreci aşamalarının terapisiidir. Anjiyo-önleyici ajanların amacı; tümör oluşumu esnasında yeniden doku oluşturma ve organizmanın tamamında iyileştirme gibi esaslı fonksiyonları tehlikeye düşürmeden yeni damarların teşkil etmesini önlemek olmalıdır (Bisacchi, ve ark., 2003).

İdeal anti-damar ajanların hem tümör hücreleri üzerinde hem de damarsal endotel hücreler üzerinde güçlü etkileri bulunabilmelidir (Gong, ve ark., 2004; Hill, ve ark., 1995). Ancak şu ana kadar test edilen ajanların güçlü bir zehirlenmeye (toksikite) neden oldukları görülmüştür ve bu sebep deneysel uygulamaların güncel değerlerini sınırlar (Gong, ve ark., 2004).

Endotel hücreleri, aktin mikrofilament, vimentin ve tübülün mikrotübüllerinden oluşan üç temel hücre iskeleti ağı içermektedir. Zemine bağlı hücrelerde hücre iskeleti hücrenin şeklini belirler ve ekstrasellüler sinyallere yanıt veren sinyal mekanizmaları aracılığıyla hücre büyümesi ve farklılaşmasını sağlamaktadır. Hücre iskeleti aynı zamanda ekstrasellüler matrikste hücre göçü ve hücre adezyonu için gerekli olan hücre içi gerilimin sağlanmasına da katkıda bulunmaktadır (Apostolova, ve ark., 2003).

Aktin filamentinin endotel hücrelerinin geçirgenlik bariyerinin korunması ve düzenlenmesi ile ilgili olduğu öne sürülmektedir. Birçok çalışmada endotel hücrelerde F-aktin filamentlerinin dağılımının trombin, bakteriyel lipopolisakkarrit (LPS) ve tümör nekrosiz faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gibi vasküler permeabilitiyeye etki eden ajanlarca düzenlenebildiği bildirilmektedir (Romero ve ark., 1997).

*In vitro* testler kullanışlıdır; süratle gerçekleştirilebilirler ve ölçülebilir sonuçlar verebilirler ancak çok dikkatli yorumlanmalıdırlar. *In vitro* testler kritik bilgi sağlarlar ve kabulün sağlanması için gerekli ilk aşamalardan biridirler. *In vitro* testlerden maksimum yararlanabilmek için birçok testin yapılması gereklidir. Endotel hücrelerin kemokinesizi, kemotaksisi, çoğalması ve tüp formu oluşturması *in vivo* doğrulanması gereken tamamlayıcı deneylerdendir. Genel olarak *in vivo* deneyler, ölçüm yapılması zor deneylerdir ancak *in vitro* deneylerin, özellikle anjiyogenik ve antianjiyogenik ajanlara ilişkin çalışmalar için çok önemli olan, ölçülebilirliğin sağlanmasına, damarların görüntülenmesi ve görüntü analizleri üzerine yeni metotların katkıda bulunabileceği ortaya çıkmaktadır (Auerbach, ve ark., 2003).

*In vitro* testlerden elde edilebilecek bilgi miktarından bağımsız olarak, *in vivo* testler anjiyogenezin doğru değerlendirilmesi için kayıtsız şartsız öneme sahiptir. *In vivo* testler daha zor gerçekleştirilebilir görünmektedir ve sık sık

cerrahi yetenekler gerektirdiğinden kolayca yapılabilecek testlerin sayısını da sınırlamaktadır (Auerbach, ve ark., 2003).

Biz bu çalışmamızda karvakrol, *Bifora radians*, dill, olivetorik asit ve fisodik asidin tümörün büyümesi ve metastaz yapması için gerekli bir olay olan anjiyogenezin temel adımları olan endotel hücre çoğalması, hücre göçü ve tüp oluşumunu durdurup durduramayacağını aynı zamanda hücre göçünde önemli bir rolü olan F-aktin hücre iskeletini olumsuz şekilde etkileyip etkilemeyeceğini dolayısıyla etkileri incelenen bitki ekstraktlarının doza bağımlı olarak anjiyogenez önleyici özelliklerini birkaç *in vitro* model kullanarak inceledik.

Loza-Tavera (2001), monoterpenlerin diyetle bulunan, efektif, nontoksik bir antitümoral olabileceğini belirtmişlerdir. Zeytinoğlu ve ark., (1998) tarafından ratlarda DMBA ile indüklenen tümör oluşumu üzerinde karvakrolün inhibitör etkisi gösterilmiştir.

Karvakrolün antibakteriyel, antifungal, böcek öldürücü (İpek ve ark., 2003; Didry ve ark., 1994; Thompson, 1996; Ultee ve ark., 1998), analjezik (İpek ve ark., 2004; Aydın ve ark., 1996), antioksidan (İpek ve ark., 2003; Aeschbach ve ark., 1994; Puertas-Mejia ve ark., 2002) aktiviteleri gösterilmiştir. Karvakrolün çeşitli tümör tiplerinin oluşumunda inhibitör etkisi olduğu bulunmuştur (İpek ve ark., 2003).

Koparal ve Zeytinoğlu (2003), tarafından yapılan bir çalışmada karvakrol'un doz artışına bağlı olarak A549 hücreleri üzerinde hücrelerinin çoğalmasını azaltıcı bir etki gösterdiği rapor edilmiştir.

Bizim çalışmamızda çeşitli konsantrasyonlardaki karvakrol dozları ile muamele edilmiş hücrelerin, doz arttıkça çoğalmasının ve canlılığının azaldığı, hücre göçü ve tüp oluşumunu gerçekleştirmediği, hücre morfolojisinin ve F-aktin hücre iskeletinin bozulduğu görülmüştür.

Sonuç olarak karvakrolün anjiyogenezin temel adımlarında hücreleri olumsuz etkilemesine dayanarak anti-kanserojenik etkiye sahip olabileceği ve kanser tedavisinde kullanılabilecek ilaç geliştirilmesinde bir etken madde olarak kullanılabileceğini söyleyebiliriz. Bununla birlikte karvakrolün kanser tedavisindeki muhtemel rolü ile ilgili pek çok araştırma yapmanın gerekli olacağını düşünüyoruz.

*Bifora radians*'ın uçucu yağıyla yapılan çalışmalar bu bitkinin yüksek fungutoksik etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca *Bifora radians*'ın meyvelerinin mideyi kuvvetlendirici ilaç olarak ve karın gazı giderici ilaç olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Yeğen, 1984)

Çalışmamızda kullandığımız *Bifora radians* ile muamele edilmiş hücrelerin anjiyogenezin temel basamakları olan hücre çoğalması, hücre göçü ve tüp oluşumu olaylarını gerçekleştiremediği görülmüştür. Tüm bu sonuçlar bize *Bifora radians*'ın anti-kanser ilaç gelişiminde kullanılabilecek bir madde olduğu fikrini uyandırmaktadır. Fakat bu konuda kesin bir sonuca ulaşmak için daha fazla araştırmalar yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Dill'in (dereotu) antimikrobiyal, antihiperlipidemik ve antihiperkolesterolemik aktiviteler gibi bazı farmakolojik etkileri bildirilmiştir. Halk arasında ilaç olarak kullanılan dill, midede oluşan gaz, mide ağrısı ve buruntu gibi bazı gastrointestinal rahatsızlıklar için kullanılmaktadır. Dereotu meyvesinin gastrointestinal sistemin düz kasların kasılımı üzerine etkisi bulunmaktadır (Hosseinzadeh ve ark., 2002).

Bizim çalışmamızda RATEC hücreleri çeşitli konsantrasyonlardaki dill ile muamele edilmiş ve MTT deneyleri sonucu endotel hücrelerinin çoğalmasının durduğu ELİSA cihazında yapılan ölçümlerle tespit edilmiştir. Ayrıca negatif ve pozitif kontrol gruplarında hücre morfolojilerinde bir değişme gözlenmemesine rağmen düşük dozlar eklenmiş hücrelerin içsi bir forma dönüştüğü, daha büyük dozlarda madde eklenmiş hücrelerin canlılıklarını kayb ettikleri görülmüştür.

Ayrıca dill ile muamele edilmiş RATEC hücrelerinin ilk dozlardan itibaren aktin filamentlerinin bozulduğu, hücrelerin çoğalmasının azaldığı, hücre göçünün durduğu ve tüp oluşumunun gerçekleşemediği görülmüştür. Deneylerimiz sonucunda besiyerine dill eklenmiş hücrelerin tüp formu oluşturamadıkları gözlenmiştir. Buna göre dill bir tümör kütlesi içinde yer alan ve besin ve oksijen gereksinimini karşılayamayan hücrelerin anjiyogenez olayını yapmasını engelleyecek ve tümörün büyüüp metastaz yapmasını önleyebilecektir. Bununla birlikte dill'in kanser tedavisindeki muhtemel rolü ile ilgili pek çok araştırma yapmanın gerekli olacağını düşünüyoruz.



Olivetorik asit ile ilgili olarak literatürde yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızda olivetorik asit'in ilk dozlarda sitotoksik açıdan fazla etkili olmamakla birlikte yüksek dozlarda hücrelerin çoğalması, hücre göçü, tüp oluşumu olaylarını olumsuz etkilediği, hücrelerin aktin filamentlerinin yapısında depolimerizasyona neden olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara dayanarak olivetorik asit'in anti-anjiyogenik etkili bir ilaç etken maddesi olabileceğini düşünüyoruz. Fakat daha kesin sonuçlar için daha kapsamlı çalışmalar yapılması gerektiğini düşünüyoruz.

Osawa ve ark., (1991) tarafından yapılan çalışmalarda fisodik asidin antimitojenik aktiviteleri gösterilmiştir. Ayrıca fisodik asit'in antibakteriyel etkisi belirtilmiştir (Vartia, 1950; Dülger ve ark., 1998).

MTT deneyleri sonucunda fisodik asit'in doz ve gün artışına bağlı olarak hücre sayısı ve canlılığında azalmaya neden olduğu görülmüştür. Fisodik asit'in ilk dozunda kontrol gruplarına göre daha az oranda olmak üzere tüp oluşumu gerçekleştiği fakat doz arttıkça tüp oluşumunun durduğu gözlenmiştir. Fisodik asit ile muamele edilmiş hücrelerin hücre iskeletinde bozulma görülmemiştir. Ayrıca doz artımına bağlı olarak fisodik asit ile muamele edilmiş hücrelerin göç edemedikleri görülmüştür.

Çalışmalarımız sonucu fisodik asit'in anjiyogenezin temel adımlarını olumsuz etkileyen bir madde olabileceğini ve anti-anjiyogenik tedavide kullanılabilecek ilaç geliştirilmesinde bir etken madde olarak kullanılabileceğini düşünüyoruz. Fakat kesin bir sonuca ulaşmak için daha fazla araştırmalar yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Deneysel çalışmalarımızdan elde ettiğimiz bulgulara göre karvakrol, *Bifora radians*, dill, olivetorik asit ve fisodik asitin birer antitümör, anti-anjiyogenik ajan prototipi olabilir, kanser, romatoid artrit gibi anjiyogenez olmadan gelişmeye devam edemeyecek patolojik durumların tedavisinde etkili bir terapötik ajan olarak kullanılabilir. Fakat anjiyogenik hastalıkların tedavisinde bu maddelerin anti-anjiyogenik aktivitesinin tam olarak ortaya konması için farklı dozlarda, değişik sürelerde, farklı hücre tiplerinde denenebilecek, araştırmaya uygun bir konu olduğunu düşünüyoruz.

## KAYNAKLAR

- Abramsson, A., Berlin, O., Papayan, H., Paulin, D., Shani, M. ve Betsholtz, C., (2002), *Analysis of mural cell recruitment to tumor vessels*, *Circulation*, **105**, 112-117.
- Aebersold, D.M., (1998), *Angiogenesis as prognostic factor in malignant tumors*, *Ther. Umsch.*, **55**, 462-3.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff M., Roberts, K. ve Watson, J.D., (1989), *Molecular Biology of The Cell*, 2nd Edition, Chapter 17, 962-966.
- Alexander, J.S., Hechtman, H.B. ve Shepro, D., (1988), *Phalloidin enhances endothelial barrier function and reduces inflammatory permeability in vitro*, *Microvasc. Res.*, **35**, 308-315.
- Alexander, J.S., Blaschuk, O.W. ve Haselton, F.R., (1993), *An N-cadherin-like protein contributes to solut barrier maintnance in cultured endothelium*, *J. Cell Physiol.*, **156**, 610-618.
- Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.C., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H. ve Boyle, M.R., (1988), *Feasibility of drug screening with panels of human tumour cell lines using a microculture tetrazolium assay*, *Cancer Res.*, **48**, 589-601.
- Alvarez, A.A., Krigman, H.R., Whitaker, R.S., Dodge, R.K. ve Rodriguez, G.C., (1999), *The prognostic significance of angiogenesis in epithelial ovarian carcinoma*, *Clin. Cancer Res*, **5**, 587-91.
- Andre, T., Chastre, E., Kotelevets, L., Vaillant, J.C., Louvet, C., Balosso, J., Gall, E.L., Prevot, S. ve Gespach, C., (1998), *Rev. Med. Interne*, **19**, 904.
- Apostolova, M.D., Bontchev, P.R., Ivonova, B.B., Russel, W.R., Mehandjiev, D.R., Beattie, J.H. ve Nachev, C.K., (2003), *Copper-homocysteine complexes and potential physiological actions*, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **95**, 321-333.
- Auerbach W. ve Auerbach R., (1994) *Angiogenesis inhibition: A rewiew*, *Pharmacol., Ther.*, **63**, 265-311
- Auerbach R., Lewis R., Shinnars B., Kubai L. ve Akhtar N., (2003), *Angiogenesis Assays:A Critical Overview*, *Clinical Chemistry*, **49**, 32-40.
- Ausprunk, D.H.ve Folkman, J., (1977), *Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis*, *Microvasc. Res.*, **14**, 53-65.

- Baatout, S., (1997), *Endothelial differentiation using matrigel*, Anticancer Res., **17**, 451-465.
- Badrichani, A.Z., Stroka, D.M., Bilboa, G., ve ark., (1999), *Bcl-2 and Bcl-XL serve an anti-inflammatory function in endothelial cells through inhibition of NF-kappaB*, J. Clin. Invest., **103**, 543-553.
- Baluk, P., Hashizume, H. ve McDONALS, D.M., (2005), *Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer*, Current Opinion in Genetics & Development, **15**, 1-10.
- Barbee K.A., Davies, P.F. ve Lal, R., (1994), *Shear stress-induced reorganization of the surface topography of living endothelial cells imaged by atomic force microscopy*, Circ. Res., **74**, 163-171.
- Barleon, B., Sozzani, S., Zhou, D., ve ark., (1996), *Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1*, Blood, **87**, 3336-3343.
- Battegay, E.J., (1995), Mol. Med., **73**, 333.
- Belotti, D., Vergani, V., Drudis, T., Ve Ark., (1996), *The microtubule-affecting drug paclitaxel has antiangiogenic activity*, Clin. Cancer Res., **2**, 1843-1849.
- Beloussow K., Wang L., Wu J., David A. ve Shen W.C., (2002), *Recombinant arginine deiminase as a potential anti-angiogenic agent*, Cancer Letters, **183**, 155-162.
- Benjamin, L.E., Hemo, I. ve Keshet, E., (1998), *A plasticity window for blood vessel remodeling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF*, Development, **25**, 1591-1598.
- Benn S.I., Whitsitt J.S., Broadloey, K.N., Nanney L.B., Perkins D., He L., Patel M., Morgan J.R., Swain W.F. ve Davidson J.M., (1996), *Particle-mediated gene transfer with transforming growth factor-beta1 cDNAs enhances wound perair in rat skin*, J. Clin. Invest., **98**, 2894-2902.
- Bensch, K.G., Davison, P.M.Ç. ve Karasek, M.A., (1983), *Factors controlling the in vitro growth pattern of human microvascular endothelial cells*, J. Ultrastruct. Res., **82**, 76-89.
- Bèzivin, C., Tomasi, S., Lohèzic-Le Dèvèhat, F. ve Boustie, J., (2003), *Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer lines*, Phytomedicine, **10**, 499-503.

- Bisacchi, D., Benelli, R., Vanzetto, C., Ferrara, N., Tosetti, F. ve Albini, A., (2003), *Anti-angiogenesis and angioprevention: mechanisms, problems and perspectives*, *Cancer Detection and Prevention*, **27**, 229-238.
- Bombeli, T., Karsan, A., Tait, J.F. ve Harlan, J.M., (1997), *Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant*, *Blood*, **89**, 2429-42.
- Brem, S. ve ark., (1976), *Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the virreous*, *Cancer Res.*, **36**, 2807.
- Browder, T., Butterfield, C.E., Kraling, B., Ve Ark., (2000), *Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer*, *Cancer Res.*, **60**, 1878-86.
- Budworth, R.A., Andreson, M., Clothier, R.H. ve Leach L., (1999), *Histamine-induced Changes in the Actin Cytoskeleton of the Human Microvascular Endothelial Cell Line HMEC-1*, *Toxicology in Vitro*, **13**, 789-795.
- Bussolino, F. ve Mantovani, A., Perciso G., (1997), *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 251.
- Cao, Y., (2004), *Antiangiogenic cancer therapy*, *Seminars in Cancer Biolaogy*, **14**, 139-145.
- Carmeliet, P., (2003), *Angiogenesis in health and disease*, *Nat. Med.*, **9**, 653-60.
- Carmeliet, P. ve Jain, R.K., (2000), *Angiogenesis in cancer and other diseases*, *Nature*, **407**, 249.
- Carter, R., Hodgetts, K., Mckenna, J., Magnus, P. ve Wren, S., (2000), *Studies on the stereoselective synthesis of the marine antitumor agent eleutherobin*, *Tetrahedron*, **56**, 4367-4382.
- Celec, P., Gardlik, R., Roland, P., Hodosy, J., Stuchlik, S., Drahovska, H., Stuchlikova, M., Minarik, G., Lukacs, J., Jurkovicova I., Hulin I., Turna J., Jakubovsky J., Kopani M., Danisovic L., Jandzk, D., Kudela, M. ve Yonemitsu, Y., (2005), *Medical Hypotheses*, **64**, 505-511.
- Chabner, B.A., (2002), *Cytotoxic agents in the era of molecular targets and genomics*, *Oncologist*, **7**, 34-41.
- Chang, Y.S., Yaccino, J.A., Lakshminarayanan, S., ve ark., (2000), *Shear-induced increase in hydraulic conductivity in endothelial cells is mediated by a nitric oxide-dependent mechanism*, *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol*, **20**, 35-42.
- Chnittler, A., Wilke, A., Gres, T., Suttorp, N. ve Drenckhahn, D., (1990), *Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium*, *J. Physiol*, **431**, 379-401.

- Chu, E., Grever, M.R. ve Chabner, B.A., (2001), *Cancer Drug Development, CANCER; Principles&Practice of Oncology, Chapter 19/2*, P:349-351.
- Clements, M.K., Jones, C.B., Cumming, M. ve Daoud, S.S., (1999), *Antiangiogenic potential of camptothecin and topotecan*, *Cancer Chemother. Pharmacol*, **44**, 411-416.
- Connolly, D.T., Heuvelman, D.M., Nelson, R., ve ark., (1989), *Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis*, *J. Clin. Invest.*, **84**, 1470.
- Cooper, G.M., (1997), *The Cell A Molecular Approach*, pp:51, 592, 593, 607, Oxford University Press.
- Crowell, P.L., (1999), *Orevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes*, *Journal of nutrition*, **129(3)**, 775-778.
- Çekiç, O., Ohji, M. ve Hayashi, A., (2002), *Effects of Humidified and dry air on corneal endothelial cells during vitreal fluid-air Exchange*, *Am. J. Ophthalmol*, **134**, 75-80.
- Dang, C.V. ve Semenza, G.L., (1999), *Oncogenic alterations of metabolism*, *Trends Bio. Sci.* **24**, 68-72.
- de Carvalho, Carla C.C.R. ve da Fonseca, M.M.R., Carvone: (2005), *Why and how should one bother to produce this terpene*, *Food Chemistry*.
- de Vos, F.Y.F.L., Willemsse, P.H.D., de Vries, E.G.E. ve Gietema, J.A., (2004), *Endothelial cell effects of cytotoxics: balance between desired and unwanted effects*, *Cancer Treatment Reviews*, 495-513.
- Dicarleto, P.E. ve Gimbrone, M.A., (1996), *Vascular endothelium. In 'Atherosclerosis and Coronary Artery Disease' (V. Fuster, R. Ross and E.J.Topol Eds.)*, Vol.1, pp.387-399. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Dimmeler, S. ve Zeiher, A.M., (2000), *Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression*, *Circulation Res.*, **87 (6)**, 434-439.
- Doll, D.C. ve Yarbrow, J.W., (1992), *Vascular toxicity associated with antineoplastic agents*, *Semin. Oncol.*, **19**, 580-596.
- Doll, D.C. ve Yarbrow, J.W., (1994), *Vascular toxicity associated with chemotherapy and hormone therapy*, *Curr. Opin. Oncol.*, **6**, 345-350.
- Doll, J.A., Reither, F.K., Crawford, S.E., Pins, M.R., Campbell, S.C. ve Bouck, N.P., (2001), *Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2 are key functional regulators of angiogenesis in the prostate*, *Prostate*, **49**, 293-305.

- Duval, H., Harris, M., Li, J., Johnson, N. ve Print, C., (2003), *New insights into the function and regulation of endothelial cell apoptosis*, *Angiogenesis*, **6**, 171-183.
- Dülger, B., Gücin, F., ve Aslan, A., (1998), *Cetraria islandica (L.) Ach. Likeninin Antimikrobial Aktivitesi*, *Tr. J. of Biology*. **22**, 111-118.
- Dvorak, H.F., (2002), *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy*, *J Clin Oncol*, **20**, 4368-4380.
- Eriksson, U. ve Alitalo, K., (2002), *VEGF receptor 1 stimulates stem-cell recruitment and new hope for angiogenesis therapies*, *Nat. Med.*, **8**, 775-777.
- Eubank, T.D., Galloway, M., Montagne, C.M., Waldman, W.J. ve Marsh, C.B., (2003), *M-CSF Induces Vascular Endothelial Growth Factor Production and Angiogenic Activity From Human Monocytes*, *The Journal of Immunology*, **171**, 2637-2643.
- Eun J.P. ve Koh G.Y., (2004), *Suppression of angiogenesis by plant alkaloid, sanguinarine*, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **30/317(2)**, 618-624.
- Ezaki, T., Baluk, P., Thurston, G., La Barbara, A., Woo, C., ve McDonalds, D.M., (2001), *Time course, of endothelial cell proliferation and microvascular remodeling in chronic inflammation*, *Am. J. Pathol.*, **158**, 2042055.
- Fajardo, L.F., (2000), *The complexity of endothelial cells. A review*, *Am. J. Clin. Pathol.*, **92**, 241-250.
- Ferrara, N. ve Henzel, W.J., (1989), *Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **161**, 851.
- Ferrara N., (2004), *Vascular Endothelial Growth Factor as a Target for Anticancer Therapy*, *The Oncologist*, **9(1)**, 1, 2-10.
- Fidler, I.J., Ellis, L.M., (1994), *The implications of angiogenesis to the to the biology and therapy of cancer metastasis*, *Cell*, **79**, 185.
- Fidler, I.J., Kerbel, R.S. ve Ellis, L.M., (2001), *CANCER; Principles&Practice of Oncology*, Chapter **9**, Page 137-140.
- Folkman, J., (1971), *Tumor Angiogenesis: therapeutic implications.*, *N. Engl. Med.*, **285**, 1182-1186.
- Folkman, J., (1972), *Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors*, *Annals of Surgery*, **175(3)**, 409-416.

- Folkman, J., (1985), *Adv. Cancer Res.*, **43**, 175.
- Folkman, J., (1986), *Cancer Res.*, **46**, 467-473.
- Folkman, J. ve Klagsbrun, M., (1987), *Angiogenic factors*, *Science*, **235(4787)**, 442-447.
- Folkman, J. ve Shing Y., (1992), *Angiogenesis*, *J. Biol. Chem.*, **267**, 10931-10934.
- Folkman, J., (1995), *Nat. Med.*, **1**, 27-31.
- Folkman, J., (1995), *Angiogenesis in cancer,vascular,rheumatoid and other disease*, *Nat. Med.*, 27-31.
- Folkman, J., (2000), *Incipient Angiogenesis*, *Journal of the National Cancer Institute*, **92(2)**, 94-95.
- Folkman, J., (2001), *CANCER Principles & Practice of Oncology*, Chapter 20.5, Section 6, Page 510.
- Fortier, A.H. ve Nelson, B., (1999), *Antiangiogenic Activity of Prostate Specific Antigen*, *Journal of the National Cancer Institute*, 91, 19, 1.J., Grella, D.K., Holaday J.W., 635-1640.
- Franks, L.M. ve Teich, N.M., (1996), *Cellular and Molecular Biology of Cancer*, 3rd. edition, Page 1, 4, 22, Oxford Univ. Press.
- Gimbrone, M.A.J., ve ark., (1972), *Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization*, *J.Exp. Med.*, **136**, 261.
- Gimbrone, Ma.. Jr., (1999), *Vascular endothelium, hemodynamic forces and atherogenesis*, *Am. J. Pathol.*, **155**, 1-5.
- Goeckeler, Z.M. ve Wysolmeraki, R.B., (1995), *Myosin light chain kinase-regulated endothelial cell contraction: the relationship between isometric tension, actin polymerization and myosin phosphorylation*, *J. Cell Biol.*, **130**, 613-627.
- Gong, Y.Q., Fan,Y., Wu, D.Z., Yang, H., Hu, Z.B. ve Wang, Z.T., (2004), *In vivo and in vitro evulation of erainin, a novel anti-angiogenic agent*, *European Journal of Cancer*, **40**, 1554-1565.
- Goode, B.L., Drubin, D.G. ve Barnes, G., (2000), *Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons*, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **12**, 63-71.

- Gospodarowicz, D., Abraham, J.A. ve Schilling, J., (1989), *Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells*, Proc. Natl, Acad. Sci. USA, **86**, 7311.
- Gotlieb, A.I., (1990), *The endothelial cytoskeleton: Organization in normal and regenerating endothelium*, Toxicol. Pathol., **18**, 603-617.
- Gotlieb, A.I., Langille, B.L., Wong, M.K. ve Kim, D.W., (1991), *Structure and function of endothelial cytoskeleton*, Lab. Invest., **65**, 123-137.
- Gotlieb, A.I., Langille, B.L., Wong, M.K.K. ve Kim, D.W., (1991), *Biology of disease: structure and function of the endothelial cytoskeleton*, Laboratory Investigations, **65**, 123-127.
- Granville, D.J., Shaw, J.R., Leong, S., ve ark., (1999), *Release of cytochrome c, Bax migration, Bid cleavage and activation of caspases 2,3,6,7,8 and 9 during endothelial cell apoptosis*, Am J Pathol, **155**, 1021-5.
- Gruen, D.W.R., Wolfe, J., (1982), *Lateral tensions and pressures in membranes and lipid monolayers*, Biochim. Biophys. Acta, **688**, 572-580.
- Guo, Y.L., Wang, S. ve Colman, R.W., (2001), *Kininostatin, an angiogenic inhibitor, inhibits proliferation and induces apoptosis of human endothelial cells*, Arterioscler. Thromb. Vas. Biol., **21**, 1427-1433.
- Hanahan D. ve Folkman J., (1996), *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*, Cell, **86**, 353-364.
- Handelman, G.J., (2001), *The evolving role of carotenoids in human biochemistry*, Nutrition, **17**, 818-822.
- Hansen, S.W., Olsen, N., Rossing, N. ve Rorth, M., (1990), *Vascular toxicity and the mechanism underlying Raynaud's phenomenon in patients treated with cisplatin, vinblastine and bleomycin*, Ann. Oncol., **1**, 289-292.
- Hathizume, H., Baluk, P., Morikawa, S., Mclean, J.W., Thurston, G., Roberge, S., Jain, R.K. ve McDonald, D.M., (2000), *Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness*, Am J Pathol, **156**, 1363-1380.
- Hayes, A.J., Li, L.Y. ve Lippman, M.E., (1999), *Antivascular therapy: A new approach to cancer treatment*, BMJ, **318**, 853-6.
- Heissing, B., Hattori, K., Dısa, S., ve ark., (2002), *Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand*, Cell, **109**, 625-637.



- Hill, S.A., Sampson, L.E. ve Chaplin, D.J., (1995), *Anti-vaskular approaches to solid tumour therapy: evaluation of vinblastine and flavone acetic acid*, Int J Cancer, **63**, 119-123.
- Hlatky, L., Hahnfeldt, P. ve Folkman, J., (2002), *Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us.*, J. Natl. Cancer Inst., **94**, 883-893.
- Hoek, J.B., (1992), *Intracellular signal transduction and the control of endothelial permeability*, Lab, Invest, **67**, 1-4.
- Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D. ve Wiegand, S.J., (1999), *Vessel cooption, regression and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF*, Science, **284**, 1994-1998.
- Holst, C.M. ve Oredsson, M.S., (2005), *Comparison of three cytotoxicity tests in the evaluation of the cytotoxicity of a spermine analogue on human breast cancer lines*, Toxicology in vitro, **19**, 379-387.
- Hosseinzadeh, H., Karimi, G.R. ve Ameri, M., (2002), *Effects of Anethum graveolens L. seed extracts on experimental gastric irritation models in mice*, BMC Pharmacology, **2**, 21.
- Huan-Huan, C., Li-Li, Y. ve Shang-Bin, L., (2004), *Artesunate reduces chicken choriocarcinoma membrane neovascularisation and exhibits antiangiogenic and apoptotic activity on human microvascular dermal endothelial cell*, Cancer Letters, **211**, 163-173.
- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Cartwright, T., et al., (2003), *Bevacizumab (a monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor) prolongs survival in first-line colorectal cancer (CRC): results of a phase II trial of bevacizumab in combination with bolus IFL (irinotecan, 5-fluorouracil, leucovorin) as first-line therapy in subjects with metastatic CRC.*, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. **22**, (Abstract#3646).
- Ingber, D., (1991), Curr. Opin. Cell Biol, **3**, 841.
- İpek, E., Tüylü-Ayaz, B. ve Zeytinoğlu, H., (2003), *Effects of carvedilol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures*, Cytotechnology, **43**, 145-148.
- Jacobson, B.S., (1983), *Interaction of plasma membrane with the cytoskeleton: an overview*, Tissue cell, **15**, 829-852.
- Jain, R.K., Munn, L.L. ve Fukumura D., (2002), *Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy*, Nat Rev Cancer, **2**, 266-276.

- Jain, R. K., (2002), *Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor*, Semin. Oncol., **29**, 2-3.
- Jakoby, B.W. ve Pastan, H.I., (1979), *Cell Culture*, Academic Press Ltd., San Diego, USA, 642.
- Janmey, P.A., (1998), *Physiol. Rev.*, **78**, 763.
- Jimenez, J.J., Jy., W. ve Mauro, L.M., (2003), *Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis*, Thromb Res, **109**, 175-180.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoyanova, A.S., Georgiev, E.V. ve Damianova, S.T., (2003), *Composition, quality control and antimicrobial activity of the essential oil of long-time stored dill (*Anethum graveolens* L.) seeds from Bulgaria*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, **51**, 3854-3857.
- Jo, H., Dull, R.O., Hollis, T.M. ve ark., (1991), *Endothelial albumin permeability is shear dependent, and reversible*, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., **260**, H1992-H1996.
- Jung H.J., Lee H.B., Lim C.H., Kim C.J. ve Kwon H.J., (2003), *Cochlioquinone A1, a New Anti-Angiogenic Agent from *Bipolaris zeicola**, Bioorganic&Medicinal Chemistry **11**, 4743-4747
- Kahn, J., Mehraban, F., Ingle, G., ve ark., (2000), *Gene expression profiling in an in vitro model of angiogenesis*, Am. J., Pathol., **156**, 1887-900.
- Karsan, A., Yee, E. ve Harlan, J.M., (1996), *Endothelial cell death induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  is inhibited by the Bcl-2 family member, A1*, J. Biol. Chem, **271**, 27201-27204.
- Kastan, M.B. ve Skapek, S.X., (2001), *CANCER Principles & Practice of Oncology*, Chapter 6, Page 104-105.
- Kerbel, R.S., Vitoria-Petit, A., Klement, G. ve Rak, J., (2000), *'Accidental' anti-angiogenic drugs: anti-oncogene directed signal transduction inhibitors and conventional chemotherapeutic agents as examples*, Eur. J. Cancer, **36**, 1248-1257.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. ve Currie, A.R., (1972), *Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*, Br J Cancer, **26**, 239-57.
- Khiani, K.J., Yamany, S.M., Farag, A.A., Ehringer, W.D. ve Miller, F.N., (1996), *Classification of the effects of F-actin under treatment of drugs in endothelial cells*, In: Proc. ANNIE-96, Rolla, MO.

- Kim, N., Lee, S., Yi, K.Y., Yoo, S., Kim, G., Lee, C.O., Park, S.H. ve Lee, B.H., (2003), *Identification of a Novel Antiangiogenic Agent; 4-(N-Imidazol-2-ylmethyl)amino Benzopyran Analogues*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **13**, 1661-1663.
- Klagsbrun M., Moses M.A., (1999), *Molecular angiogenesis*, Chem. Biol., **6**, R217-R224.
- Klement, G., Baruchel, S., Rak, J., ve ark, (2000), *Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity*, J. Clin. Invest., **105**, R15-24.
- Kohler, T.R., Jawier, A., (1992), *Flow affects development of intimal hyperplasia after arterial injury in rats*, Circ. Res., **12**, 963-971.
- Kolodgie, F.D., Wilson, Mergner, W.J. ve Virmani, R., (1999), *Cocaine-induced increase in the permeability function of human vascular endothelial cell monolayers*, Experimental and Molecular Pathology, **66**, 109-122.
- Komissarova, E.V., Saha, S.K. ve Rossman, T.G., (2005), *Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example*, Toxicology and Applied Pharmacology, **202**, 99-107.
- Koparal, A.T., (2001), *Hücrelerdeki Transformasyon Gelişiminin Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi.
- Koparal, A.T. ve Zeytinoğlu, M., (2003), *Effects of carvacrol on a non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line, A549*, Cytotechnology, **43**, 149-154.
- Koparal, A. T., Yamaguchi, H., Kaoru, O. ve Kitagawa, S.Y., (2004), *Differential effects of green tea catechins on three endothelial cell clones isolated from rat adipose tissue and human umbilical vein endothelial cells*, Cytotechnology, **46**, 25-36.
- Korgun, E. T., Asar, M., Demir, N. ve Demir, R., (1999), *Erken Gebelik döneminde sıçan endometriumunda vimentin ve desminin dağılımı*, Tr. J. of Biology, **23**, 249-259.
- Kraiss L.W., Kirkman, T.R., Kohler, T.R. ve ark., (1991), *Shear stress regulates smooth muscle proliferation and neointimal thickening in porous polytetrafluoroethylene grafts*, Arterioscler, Thromb., **11**, 1844-1851.
- Kumar, V., Cotran, R.S. ve Robbins, S.L., (1999), Basic Pathology, 5 th edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.
- Kumar, V., Abbas, A.K. ve Fausto, N., (2005), Robbins And Cotran, Pathologic Basis of Disease, 7 th edition, 513.

- Kuwano, M., Fukushi, J., Okamoto, M., Nishie, A., Goto, H., Ishibashi, T. ve Ono, M., (2001), *Intern. Med.*, **40**, 565.
- Langelier, E.G. ve Van Hinsbergh, V.W.M., (1991), *Norepinephrine and iloprost improve barrier function of human endothelial cell monolayers: role of Camp*, *Am. J. Physiol.*, **260**, C1052-C1059.
- Langille, B.L., Graham, J.J.K., Kim, D., ve ark., (1991), *Dynamics of shear-induced redistribution of F-actin in endothelial cells in vivo*, *Arterioscler. Thromb.*, **11**, 1814-1820.
- Langille, B.L., (1995), *Blood Flow-induced remodeling of the artery wall*. In Bevan J.A., Kaley, G., Rubanyi, G., eds., *Flow-dependent Regulation of Vascular Function* New York, Oxford, pp:277-299.
- Lee, H.Z., Lin, W.C., Yeh, F.T., Wu ve C.H., (1998), *2-Phenyl-4-quinolone prevents serotonin-induced increases in endothelial permeability to albumin*, *European Journal of Pharmacology*, **354**, 205-213.
- Lennernas, B., Albertsson, P., Lennernas, H. ve Norrby, K., (2003), *Chemotherapy and anti-angiogenesis: drug-specific, dose-related effects*, *Acta Oncol.*, **42**, 294-303.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. ve Yuan, J., (1998), *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis*, *Cell*, **94**, 491-501.
- Licciardello, J.T., Mosake, J.L., Rudy, C.K., Karp, D.D. ve Hong, W.K., (1985), *Elevated plasma von Willebrand factor levels and arterial occlusive complications associated with cisplatin-based chemotherapy*, *Oncology*, **42**, 296-300.
- Lin, X., Fuks, Z. ve Kolesnick, R., (2000), *Ceramide mediates radiation-induced death of endothelium*, *Crit. Care Med.*, **28**, N87-93.
- Lin M.T., Yen M.L., Lin C.Y. ve Kuo M.L., (2003), *Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Angiogenesis by Resveratrol through Interruption of Src-Dependent Vascular Endothelial Cadherin Tyrosine Phosphorylation*, *Mol.Pharmacol*, **64**, 1029-1036.
- Liotta, L.A., Steeg, P.S. ve Stetler-Stevenson W.G. (1991), *Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation*, *Cell*, **64**, 327-336
- Los, M. ve Voest, E.E., (2001), *The potential role of antivasular therapy in the adjuvant and antiadjuvant treatment of cancer*, *Semin. Oncol.*, **28**, 93-105.

- Lu, J., Kunimoto, S., Yamazaki, Y., Kaminishi, M. ve Esumi, H., (2004), *Kigamicin D, a novel anticancer agent based on a new anti-austerity starategy targeting cancer cells'tolerance to nutrient starvation*, *Cancer Sci.*, **95(6)**, 547-552.
- Lum, S.M. ve Malik, A.B., (1996), *Mechanisms of increased endothelial permeability*, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **74**, 787-800.
- Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L., Chadbum, A., Heissig, B., Marks, W., Witte, L., ve ark., (2001), *Impared recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth*, *Nat. Med.*, **7**, 1194-1201.
- Ma, T.Y. ve Pedram, A., (1996), *16,16-Dimethyl prostaglandin E2 modulation of endothelial monolayer paracellular barrier function*, *J. Cell Physiol.*, **167**, 204-212.
- Machein, M.R., Renninger, S., De Lima-Hahn, E. ve Plate, K.H., (2003), *Minor contribution of bone marrow-derived endothelial progenitors to the vascularization of murine gliomas*, *Brain Pathol.*, **13**, 582-597.
- Madge, L.A., Li, J.H., Chei, J. ve Pober, I.S., (2003), *Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase sensitizes vascular endothelial cells to cytokine initiated cathepsin-dependent apoptosis*, *J. Biol. Chem.*, **278**, 21295-21306.
- Maeshima, Y., Sudhakar, A., Lively, J.C., ve ark., (2002), *Tumstatin, an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis*, *Scineces*, **295**, 1409-143.
- Majno, G. ve Palade, G.E., (1961), *Studies on inflammation. The effect of histamine and seratonin on vascular permeability: an electron microscopic study*, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **11**, 571-605.
- Majno, G., Shea, S.M. ve Leventhal, M., (1969), *Endothelial contraction induced by histamine type mediators: an electron microscope study*, *J. Cell, Biol*, **42**, 647-672.
- Malek, A.M., Jiang, L. ve Lee, I., (1999), *Induction of nitric oxide synthase mRNA by shear stres requires intracellular calcium and G-protein signals and is modulated by PI 3 kinase*, *Biochem Biophys. Res. Commun*, **254**, 231-242.
- Margeli, A., Kouraklis G. ve Theocharis S., (2003), *Peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) ligands and angiogenesis*, *Kluwer Academic Publishers, Angiogenesis* **6**, 165-169.,

- Mattsson, E.J., Kohler, T.R., Vertgel, S.M. ve ark., (1992), *Increased blood flow induced regression of intimal hyperplasia*, *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, **17**, 2245-2249.
- Mccue, S., Noria, S. ve Langille, B.L., (2004), *Shear-Induced Reorganization of Endothelial Cell Cytoskeleton and Adhesion Complexes*, *Trends Cardiovasc Med*, **14**, 143-151.
- Mcdonalds, D.M. ve Baluk, P., (2002), *Significance of blood vessel leakiness in cancer*, *Cancer Res.*, **62**, 5381-5.
- Mcgeady, P., Wansley, D.L. ve Logan, D.A., (2002), *Carvone and perillaldehyde interfere with the serum-induced formation of filamentous structures in Candida albicans at substantially lower concentrations than those causing significant inhibition of growth*, *Journal of Natural Products*, **65**, 953-955.
- Meredith, J.E., Fazeli, B. ve Schwartz, M.A., (1993), *The extracellular matrix as a cell survival factor*, *Mol. Biol. Cell*, **4**, 953-961.
- Miller, K.D., Sweeney, C.J., Sledge ve Jr. G.W., (2001), *Redefining the target: chemotherapeutics as antiangiogenics*, *J. Clin. Oncol.*, **19**, 1195-1206.
- Mills, J.W. ve Mandel, L., (1994), *Cytoskeletal regulation of membrane transport events*, *FASEB J.*, **8**, 1161-1165.
- Mivhaud, D.S., Feskniçh, D, Rimm, E.B., Colditz, G.A., Speizer, F.E., Willett, W.C., ve Giovannucci, E., (2000), *Intake of specific carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts*, *Am J Clin Nutr*, **72**, 990-997.
- Milli, U. H., Hazıroğlu, R., Aydın, Y. ve Gülbahar, M. Y., (2000), *Köpek meme tümörlerinde sitokeratin, vimentin ve alfa-düz kas aktin intermedier ve mikrofilamentlerin immunohistokimyasal lokalizasyonu*, *Türk J. Vet. Anim. Sci.*, **24**, 81-92.
- Moseley, P.L., Hemken, C. Ve Hunninghake, G.W., (1986), *Augmentation of fibroblast proliferation by bleomycin*, *J. Clin. Invest.*, **78**, 1150-1154.
- Mossman, T., (1983), *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*, *J. Immunol. Meth.*, **65**, 55-63.
- Nehls, V. ve Drenckhahn, D., (1991), *Heterogeneity of microvascular pericytes for smooth muscle type alpha-actin*, *J. Cell Biol.*, **113**, 147-154.
- Noria, S., Cowan, D.B., Gotlieb, A.I. ve ark., (1999), *Transient and steady-state effects of shear stress on endothelial cell adherens junctions*, *Circ. Res.*, **85**, 504-514.

- Noria, S.F., Xu, F., Mccue, S. ve ark., (2004), *Assembly and reorientation of stress fibers drives morphologic changes to endothelial cells exposed to shear stres*, Am. J. Pathol., **164**, 1211-1223.
- Oak M.H., Bedoui, J.E. ve Schini-Kerth V.B., (2005), *Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea*, Journal of Nutritional Biochemistry, **16**, 1-8.
- Okaji Y., Tsuno N.H., Kitayama J., Saito S., Takahashi T., Kawai K., Yazawa K., Asakage M., Tsuchiya T., Sakurai D., Tsuchiya N., Tokunaga K., Takahashi K. ve Nagawa H., (2004), *A novel method for isolation of endothelial cells and macrophages from murine tumours based on Ac-LDL uptake and cd16 expression*, Journal of Immunological Methods, **295**, 183-193.
- Osawa, T., Kumon, H., Reece, C.A. ve Shibamoto, T., (1991), *Inhibitory effects of lichen constituents on mutagenicity induced by heterocyclic amines*, Environ Mol. Mutagen, **18(1)**, 35-40.
- Ozban, N., (1988), *Hücre*, 2.Baskı, İstanbul Üniversitesi Yayınları, Fen Fakültesi Basımevi, 283.
- Özerdem, Uğur ve Stallcup, W.B., (2003), *Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation*, Angiogenesis, **6**, 241-249.
- Padera, T.P., Stoll, B.R., Tooredman, J.B., Capen, D., Di, Tomaso, E. ve Jain, R.K., (2002), *Pathology: cancer cells compress intratumour vessels*, Nature, **427**, 675.
- Paker, Ş., (1993), *Histoloji*, 2. baskı, Uludağ Üniv., Araş. Uyg. Merk., Yayın No:32.
- Papetti M. ve Herman, I.M., (2002), *Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis*, Am. J. Physiol, Cell Physiol, **282**, 947-70.
- Passaniti, A., Taylor, R.M., Pili, R., ve ark., (1992), *A simple quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agent using reconstituted basement membrane, heparin and fibroblast growth factor*, Lab. Invest., **67**, 519-528.
- Patterson, C.E., Davis, H., Schaphorst, K.L. ve Garcia, J.G.N., (1994), *Mechanism of cholera toxin prevention of thrombin- and PMA-induced endothelial cell barrier dysfunction*, Microvasc. Res., **48**, 212-235.
- Phillips, P.G., Lum, H., Malik, A.B. ve Tsan, M., (1989), *Phallicidin prevents thrombin-induced increases in endothelial permeability to albumin*, Am. J. Physiol., **257**, C562-C567.

- Phongkitkarun, S., Kobayashi, S., Kan, Z., Lee, T.Y. ve Charnsangavej, C., (2004), *Quantification of Angiogenesis by Functional Tomography in a Matrigel Model in Rats*, Acad. Radiol, **11**, 573-582.
- Pollard T.D. ve Borisy, G.G., (2003), *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments*, Cell, **112**, 453-465.
- Porn-Ares, I., Saido, T.C., Andersson, T. ve Ares, M.P., (2003), *Oxidised low-density lipoprotein induces calpain-dependent cell death and ubiquitination of caspase-3 in HMEC-1 endothelial cells*, Biochem. J., **374**, 403-411.
- Rafii, S., Lyden, D., Benezra, R., Hattori, K., ve Heissing, B., (2002), *Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy?*, Nat. Rev., Cancer, **2**, 826-835.
- Rafii, S. ve Lyden, D., (2003), *Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration*, Nat. Med., **9**, 702-712.
- Rajantie, I., Ilmonen, M., Alminate, A., Ozerdem, U., Alitalo, K. ve Salven, P., (2004), *Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis, comprise precursors for periendothelial vascular mural cells*, Blood, **104**, 2084-2086.
- Raymond, W.R., (1995), Cancer Biology, 3 rd edition, Chapter 11, Page 419.
- Re, F., Zanetti, A., Sironiğ, N., Poleutarutti, N., Lanfrancone, L., Dejana, E. ve Colotta, F., (1994), *Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells*, J. Cell Biol., **127**, 537-546.
- Reddy, L., Odhav, B. ve Bhoola, K.D., (2003), *Natural products for cancer prevention: a global perspective*, Pharmacology & Therapeutics, **99**, 1-13.
- Rehman, J., Li, J., Orrschell, C.M. ve March, K.L., (2003), *Peripheral blood 'endothelial progenitor cells' are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors*, Circulation, **107**, 1164-1169.
- Reinmuth, N., Stoeltzing, O., Liu, W., ve ark., (2001), *Endothelial survival factors as targets for antineoplastic therapy*, Cancer J., **7(Supply 3)**, 109-119.
- Resnick, N., Yahav, H., Shay-Salit, A., ve ark., (2003), *Fluid shear stress and the vascular endothelium for better and for worse*, Prog. Biophys. Mol. Biol., **81**, 177-199.



- Resnick, N., Yahav, H., Shay-Salit, A., ve ark., (2003), *Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse*, Prog. Biophys. Mol. Biol., **81**, 177-199.
- Reynolds L.P. ve Redmer D.A., (1998), *Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary*, J. Anim. Sci., **76**, 1671-1681.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K. ve ark., (2003), *Cell migration: integrating signals from front to back*, Science, **302**, 1704-1709.
- Risau W., (1997), *Mechanism of angiogenesis*, Nature, **386**, 671-674.
- Roca, E., Bruera, E., Politi, E.M., ve ark., (1985), *Vinca alkaloid-induced cardiovascular autonomic neuropathy*, Cancer Treat Rep., **69**, 149-151.
- Rockwell, S., Yuan J., Peretz, S. ve Glazer, P.M., (2001), *Genomic instability in cancer*, Novartis Found Symp, **240**, discussion 142-51.
- Rotrasen, D. ve Gallin, J.L., (1986), *Histamine type I receptor occupancy increases endothelial cytosolic calcium, reduces F-actin and promotes albumin diffusion across cultured endothelial monolayers*, J. Cell Biol., **103**, 2379-2387.
- Savion, N., Vlodaysky, I., Greenburg, G. ve Gospodarowicz, D., (1982), *Synthesis and distribution of cytoskeletal elements in endothelial cells as a function of cell growth and organization*, J. Cell Physiol, **110**, 129-141.
- Schirner, M., Hoffman, J., Menrad, A. ve Schneier, M.R., (1998), *Antiangiogenic chemotherapeutic agents: characterization in comparison to their tumor growth inhibition in human renal cell carcinoma models*, Clin. Cancer Res., **4**, 1331-1336.
- Segura, I., Serrano, A., De Bufrago, G.G., Gonzalez, M.A., Abad, J.L., Claveria, C., Gomez, L., Bernad, A., Martinez-A, C. ve Riese, H.H., (2002), *Inhibition of programmed cell death impairs in vitro vascular-like formation and reduces in vivo angiogenesis*, The FASEB Journal, **16**, 833-84.
- Semenza, G.L., (2003), Annu. Rev. Med., **54**, 17.
- Semenza, G.L., (2003), *Targeting HIF-1 for cancer therapy*, Nat. Rev. Cancer, **3**, 721-32.
- Senger, D.R. ve Galli, S.J., Dvarok, A.M., ve ark., (1983), *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid*, Science, **219**, 983.

- Shao R. ve Guo X., (2004), *Human microvascular endothelial cells immortalized with human telomerase catalytic protein: a model for the study of in vitro angiogenesis*, Biochemical and Biophysical Research Communications, **321**, 788-794.
- Sharma, H.S. ve Cervos Navarro, J., (1990), *Brain oedema and cellular changes induced by acute heat stress in young rats*, Acta Neurochir. Suppl. Wien., **51**, 383-386.
- Shasby, D.M., Shasby, S.S., Sullivan, J.M. ve Peach, M.J., (1982), *Role of endothelial cell cytoskeleton in control of endothelial permeability*, Circ. Res., **51**, 657-661.
- Shimizu K. ve Oku, N., (2004), *Cancer Anti-angiogenic Therapy*, Biol. Pharm. Bull., **27(5)**, 599-605.
- Singh A.K., Seth P., Anthony P., Husain M.M., Madhavan S., Mukhtar H. ve Maheshwari, R.K., (2004), *Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate inhibits angiogenic differentiation of human endothelial cells*, Archives of Biochemistry and Biophysics, **401**, 29-37.
- Solovey A., Gui, L., Ramakrishnan, S., ve ark., (1999), *Sickle cell anemia as a possible state of enhanced anti-apoptotic tone: Survival effect of vascular endothelial growth factor on circulating and unanchored endothelial cells*, Blood, **93**, 3824-3830.
- St. Croix, B., Rago, C., Velculescu, V., ve ark., (2000), *Genes expressed in human tumor endothelium*, Science, **289**, 1197-1202.
- Stelzner, T.J., Weil, J.V. ve O'brien, R.F., (1989), *Role of cyclic adenosine monophosphate in the induction of endothelial barrier properties*, J. Cell Physiol., **139**, 157-166.
- Stetler, H., (1995), *Mechanism and genes of cellular suicide*, Science, **267**, 1445-1448.
- Stetler-Stevenson W.G. ve Kleiner D.E., (2001), *CANCER Principles & Practice of Oncology*, Chapter 8, Page 123-126.
- Strelkov, S. V. Ve Hermann, H., Aebi, U., (2003), *Bioessays*, **25**, 243-251.
- Su S.J., Yeh T.M., Chuang W.J., Ho C.L., Chang K.L., Cheng H.L., Liu H.S., Cheng H.L., Gsu P.Y. ve Chow N.H., (2005), *The novel targets for anti-angiogenesis of genistein on human cancer cells*, Biochemical Pharmacology, **69**, 307-318.

- Swerlick, R.A. ve Lawley, T.J., (1993), *Role of microvascular endothelial cells in inflammation*, Journal of Investigative Dermatology, **100**, 111S-115S.
- Swerlick R.A., (1995), J. Dermatol. **22**, 845.
- Theriot, J.A. ve Mitchison, T.J., (1991), *Actin microfilament dynamics in locomoting cells*, Nature, **352**, 126-131.
- Thomas, K.A., (1996), *Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent*, J. Biol. Chem., **271**, 603.
- Tong Y., Zhang X., Tian F., Yi Y., Xu Q., Li L., Tong L., Lin L. ve Ding J., (2001), *Phalinopside a, a novel marine-derived compound possessing dual anti-angiogenic and anti-tumor effects*, International Journal of Cancer.
- Tong, Y., Zhang, X., Zhao, W., Zhang, Y., Jingyu, L., Shi, Y., Tan, W., Li, M., Zhang, Y., Tong, L., Lu, H., Lin, L. ve Ding, J., (2004), *Anti-angiogenic effects of Shiraiachrome A, a compound isolated from a Chinese folk medicine used to treat rheumatoid arthritis*, European Journal of Pharmacology, **494**, 101-109.
- Tzima, E., Del Pozo, A., Shattil, S.J. ve ark., (2001), *Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment*, Embo. J., **20**, 4639-4647.
- Vacca, A., Iurlaro, M., Ribatti, D., ve ark., (1999), *Antiangiogenesis is produced by nontoxic doses of vinblastine*, Blood, **94**, 4143-4155.
- Vartia, K.O., (1950), *Antibiotics in Lichens*, I-Ann. Med. Ex; tl. Biol. Fenn., **27**, 46-54, II- Ebenda, **28**, 7-19.
- Verhaul, H.M., Voest, E.E. ve Schlingemann, R.O., (2004), *Are tumours angiogenesis-dependent?*, J. Pathol., **202**, 5-13.
- Wang S., Zheng Z., Weng Y., Yu Y., Zhang D., Fan W., Dair. ve Hu, Z., (2002), *Angiogenesis and anti-angiogenesis activity of Chinese medicinal herbal extracts*, Life Sciences Elsevier, **74**, 2467-2478.
- Wattenberg, L.W., Spornins, V.L. ve Barany, (1989), *Inhibition of N-nitrosodiethylamine carcinogenesis in mice by naturally occurring organosulfur compounds and monoterpenes*, Cancer Research, **49**, 2689-2694.
- Wehland, J., Osborn, M., Weber, K., (1979), *Cell-to-substratum contacts in living cells: a direct correlation between interference-reflexion and indirect-immunofluorescence microscopy using anti-bodies against actin-and alpha-actinin*, J. Cell Sci, **37**, 257-273.

- Willie, A.H., Kerr, J.F.R. ve Currie, A.R., (1980), *Cell death: the significance of apoptosis*, Int. Rev. Cytol., **68**, 251-308.
- Witke, W., (2004), *Role of the actin cytoskeleton in cell migration and mouse physiology*, EMBL Research Reports.
- Wojciak-Stothard, B. ve Ridley, A.J., (2003), *Shear stress-induced endothelial cell polarization is mediated by Rho and Rac but not Cdc42 or PI 3-kinases*, J. Biol. Chem, **161**, 429-439.
- Wong, M.K.K. ve Gottlieb, A.I., (1986), *Endothelial cell monolayer integrity: I. Characterization of dense peripheral band of microfilaments*, Arteriosclerosis, **6**, 212-219.
- Wong, M.K.K. ve Gottlieb, A.I., (1990), *Endothelial cell monolayer integrity I. Characterization of dense peripheral band of microfilaments*, Arteriosclerosis, **10**, 410-420.
- Wong, M.K.K. ve Gottlieb, A.I., (1990), *Endothelial cell monolayer integrity. Perturbation of F-actin filaments and the dense peripheral band-vinculin network*, Arteriosclerosis, **10**, 76-84.
- Wysolmerski, R.B., Lagunoff, D. ve Dahms, T., (1984), *Ethchlorvynol-induced pulmonary edema in rats. An ultrastructural study*, Am. J. Pathol., **115**, 447-457.
- Xin X., Yang S., Kowalski J. ve Gerritsen M.E., (1999), *Peroxisome Proliferator-activated Receptor Ligands Are Potent Inhibitors of Angiogenesis in Vitro and in Vivo*, J.Biol.Chem, **274(13)**, 9116-9121.
- Yamakawa, K., Hosoi M., Koyama, H. ve ark., (2000), *Peroxisome Proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonist increase vascular endothelial growth factor expression in human vascular smooth muscle cells*, Biochem. Biophys. Res. Commun, **271**, 571-574.
- Yamamoto S., Konishi I., Tsuruta Y., Nanbu K., Mandai M., Kuroda H., Matsushita K., Hamid A.A., Yura Y. ve Mori T., (1997), *Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) during folliculogenesis and corpus luteum formation in the human ovary*, Gynecol. Endocrinol., **11**, 371-381.
- Yeğen, O., (1984), *Kokarot (Bifora radians) bünyesindeki uçucu yağın fungitoksik potansiyeli*, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Yayın no:909.
- Yu, J.L., Rak, J.W., Coomber, B.L., Hicklin, D.J. ve Kerbel, R.S., (2002), *Effects of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy*, Science, **295**, 1526-1528.

Zafrani, E.S., (1997), *Drug-induced vascular lesions of the liver*, Anat. Pathol., **2**, 135-145.

Zheng, S., Yang, H., Zhang, S., Wang, X., Yu, L., Lu, J. ve Li, J., (1997), *Initial study on naturally occurring product from traditional Chinese herbs and vegetables for chemoprevention*, J Cell Biochem Suppl, **27**, 106-112.