TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTİ-ANJİYOGENİK İLAÇ TEDAVİSİNİN TÜMÖR İMMÜNİTESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Samira ABDİ ABGARMİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan AKBULUT

ANKARA
2017

TÜRKİYE CUMHURİYETİ

ANKARA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTİ-ANJİYOGENİK İLAÇ TEDAVİSİNİN TÜMÖR İMMÜNİTESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Samira ABDİ ABGARMİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan AKBULUT

Bu araştırma TÜBİTAK-114S496 ve BAP-17L0230003 ile desteklenmiştir.

ANKARA

2017

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Anti-anjiyogenik İlaç Tedavisinin Tümör İmmünitesi üzerindeki Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Samira ABDİ ABGARMİ

Tarih: 11.08.2017

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları Anabilim Dalında Samira Abdi Abgarmi tarafından hazırlanan "Anti-anjiyogenik İlaç Tedavisinin Tümör İmmünitesi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile kabul/~~ret~~ edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11.08.2017

İmza

Prof. Dr. Ahmet DEMİRKAZIK

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

İMZA

Prof. Dr. Hakan AKBULUT

Ankara Üniversitesi

Üye

İMZA

Prof. Dr. Ahmet ÖZET

Gazi Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Mehmet AKAN

Sağlık Blimleri Enistitüsü Müdür V.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN **İ**
KABUL VE ONAY **İİİ**
İÇİNDEKİLER **İİİ**
ÖNSÖZ **V**
SİMGELER VE KISALTMALAR **Vİ**
ŞEKİLLER **Vİİİ**
ÇİZELGELER **X**

1. GİRİŞ **1**
1.1. Kanser 1
1.1.1. Kanser türleri 1
1.1.2. Kanserin Etiyolojisi 2
1.1.3. Kanser Epidemiyolojisi 4
1.1.4. Kanser Tedavisi 5
1.1.4.1. Bevacizumab 7
1.1.4.2. Axitinib 7
1.2. Kanser ve İmmün Sistem 8
1.3. T-Hücresi ve Antijen Sunan Hücreler 9
1.4. Anjiyogenez 11
1.4.1. Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü (VEGF) 12
1.4.2. VEGF'nin İmmün Sistem Baskılaması 12
1.4.2.1. Dendritik Hücre Baskılanması 12
1.4.2.2. T-Hücre Baskılanması 13
1.4.2.3. Immünoregülator Hücrelerin Birikimi 14

2. GEREÇ VE YÖNTEM **17**
2.1. Malzeme Listesi 17
2.2. Hücre Kültürü Çalışmaları 18
2.2.1. Tümör Hücresi 18
2.2.2. Hücre Canlılık Ölçümü (MTT) 18
2.2.3. Belirlenen Dozların Hücre Uygulaması 19
2.3. Moleküler Çalışmalar 20
2.3.1. RNA İzolasyonu 20
2.3.1.1. Spektrofotometre 20

2.3.2. cDNA Sentezi 20
2.3.3. Primer ve Prob Tasarımı 21
2.3.4. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu 22
2.3.4.1. EZ-PZR Ürünlerinin Agaroz Elektroforezi İle Kontrolü 23
2.3.5. ELİZA 23
2.3.6. Nitrik Oksit Deneyi 24
2.3.7. Akım Sitometrisi 24
2.4. İstatistik 25

3. BULGULAR 26
3.1. Bevacizumab ve Axitinib Sitotoksite Sonuçları 26
3.2. RNA Örnekleri Saflık ve Konsantrasyonları 28
3.3. Bevacizumab, Axitinib ve VEGF' nin Tümör Hücrelerinde İmmüno-supresif Genlerin İfadeleri Üzerindeki Etkileri 41
3.3.1. NOS-3 Gen İfadesi 31
3.3.2. TGF-beta Gen İfadesi 34
3.3.3. IDO Gen İfadesi 36
3.3.4. IL-17 Gen İfadesi 38
3.3.5. IL-10 Gen İfadesi 39
3.3.6. IL-6 Gen İfadesi 40
3.3.7. EZ-PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü 40
3.4. Bevacizumab, Axitinib ve VEGF'nin Tümör Hücrelerinde İmmüno-supresif Protein İfadeleri 41
3.4.1. NO 43
3.4.2. TGF-B Protein 45
3.4.3. IDO Protein 47
3.4.4. IL-17 Protein 49
3.4.5. IL-10 Protein 51
3.4.6. IL-6 Protein 53
3.5. Akım Sitometrisi ile VEGFR1 ve VEGFR2 İfade Oranları 55
4. TARTIŞMA 60
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 65
ÖZET 66
SUMMARY 67
KAYNAKLAR 68
ÖZGEÇMİŞ 74

ÖNSÖZ

Danışmanım Prof. Dr. Hakan AKBULUT'a yüksek lisansım boyunca teşviki, yorumları ve hiçbir zaman desteğini esirgemediği için çok teşekkür ederim. Bana bilimsel araştırma becerileri kazandıran, anlayışlı, ilgili ve yol gösteren bir rehber oldu. Öğrenciniz ve ekibinizin bir parçası olmak benim için herzaman bir ayrıcalıktır.

Prof. Dr. Gonca AKBULUT'a desteği ve güler yüzü için çok teşekkür ederim.

Labratuar sorumlumuz Nalan AKGÜN'e güzel kalbi, tatli sohbeti ve desteği için teşekkür ederim. Laboratuvar arkadaşlarım Müge ÖÇAL, Gizem SONUGÜR ve Cansu BABAHAN'a yardımları, arkadaşlıkları ve huzurlu bir çalışma ortamı sağladıkları için çok teşekkür ederim. Sizlerle çalışmak çok keyifli.

Sinem D. BUDAK ve Tutku ÜNVER'e bu zor tez yazım döneminde yanımda olup destekledikleri için çok teşekkür ederim. Benim için her zaman özelsiniz.

Annem Sorraya MALEKI sabrı ve bana verdiği huzur için, babam Jamaladdin ABDI varlığı ve maddi manevi desteği için, ablam Shabnam ABDI her fırsatta yanımda olduğu ve verdiği motivasyon için, abim Javid ABDI ve kardeşim Nasim ABDI'ye verdikleri destek için çok teşekkür ederim. Sizin gibi bir ailem olduğu için kendimi çok şanslı hissediyorum.

Hayatim boyunca her daim bana sabırlı ve olumlu olmam için destek olan ve varlıklarıyla bana huzur veren annem ve ablam, bu tez size ithaf olmuştur.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACTB	βeta aktin
APC	Antijen Sunan Hücreler
Axa	Axitinib
bp	Baz çifti
BSA	Sığır serum albumin
Beva	Bevacizumab
5-FU	5-florourasil
cDNA	Komplementer DNA
$CD8^+$	Sitotoksit T-hücreleri
$CD4^+$	Yardımcı T-hücreleri
D	İlaç dozu
Da	Dalton
dk	Dakika
°C	Derece celcius
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
ECM	Ekstraselüler matriks
ELISA	Enzim bağımlı immunosorbent deneyi
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentetaz
EZ-PZR	Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
FBS	Fetal sığır serumu
FLT1/VEGFR1	Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü 1
gr	Gram
HIV	Aids hastalığına yol açan virüs
HRP	Horseradish peroksidaz
HT-29	İnsan kolon adenokarsinom hücre hattı
kDa	Kilo dalton
KDR/VEGFR2	Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü 2
λ	Lamda
L	Litre
LNCaP	İnsan prostat kanser hücre hattı
MCF-7	İnsan Meme Kanseri Hücresi
MHC	Major Histokompatibilite Kompleksi
ml	Mililitre
mRNA	Mesajcı ribo nükleik asit

MTT bromide	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium
µL	Mikro litre
µmol	Mikro mol
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
ng	Nanogram
NK	Doğal oldurucu Hücre
nm	Nanometre
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentetaz
RNA	Ribo nükleik asit
RTK	Reseptör tirozin kinaz
TCR	T-Hücre Reseptoru
TGF	Dönüştürücü büyüme faktörü
TMB	3,3’,5,5’-Tetramethylbenzidine
UV	Ultraviyole
VEGF-A	Vasküler endotelyal büyüme faktörü A
VEGF-A	Vasküler endotelyal büyüme faktörü-A
VEGFR	Vasküler endotelyal büyüme faktör reseptörü
%	Yüzde

ŞEKİLLER

Şekil 1. 1. Kanserde Etiyolojik Ajanlarin Dağilimi. 4
Şekil 1. 2. Erkeklerde en Sık Görülen Kanserlerin Toplam Sayisi ve Yüzde Dağilimi. 5
Şekil 1. 3. Kadinlarda en Sık Görülen Kanserlerin Toplam Sayisi ve Yüzde Dağilimi. 5
Şekil 1. 4. Anti-anjiyogenik Ilaç Olan Bevacizumab ve Axitinib Etki Mekanizmasi 7
Şekil 1. 5. Pro-anjiyogenik ve Anti-Anjiogenik Dengesi. 11
Şekil 1. 6. Pro-anjiyojenez Faktörü Olan VEGF-A Tümörlerde Immün supresifitenin Gelişimini Indükler. 15
Şekil 2. 1. Deney Planinin Şematik Gösterimi. 17
Şekil 3. 1. MCF-7 Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinibin Hücre Canliliğina Etkisi. 27
Şekil 3. 2. HT-29 Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinibin Hücre Canliliğina Etkisi. 27
Şekil 3. 3. LNCaP Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinibin Hücre Canliliğina Etkisi. 28
Şekil 3. 4. MCF-7 Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Uygulamasi Sonrasi NOS-3 Gen Ifade Düzeyleri. 32
Şekil 3. 5. HT-29 Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Uygulamasi Sonrasi NOS-3 Gen Ifade Düzeyleri. 33
Şekil 3. 6. LNCaP Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Uygulamasi Sonrasi NOS-3 Gen Ifade Düzeyleri. 33
Şekil 3. 7. MCF-7 Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Uygulamasi Sonrasi TGF-B Gen Ifade Düzeyleri. 35
Şekil 3. 8. HT-29 Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Uygulamasi Sonrasi TGF-B Gen Ifade Düzeyleri. 35
Şekil 3. 9. LNCaP Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Uygulamasi Sonrasi TGF-B Gen Ifade Düzeyleri. 36
Şekil 3. 10. MCF-7 Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Uygulamasi Sonrasi IDO Gen Ifade Düzeyleri. 37
Şekil 3. 11. HT-29 Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Uygulamasi Sonrasi IDO Gen Ifade Düzeyleri. 37
Şekil 3. 12. LNCaP Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Uygulamasi Sonrasi IDO Gen Ifade Düzeyi. 38
Şekil 3. 13. MCF-7 Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Uygulamasi Sonrasi IL-17 Gen Ifade Düzeyi. 39
Şekil 3. 14. MCF-7 Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Uygulamasi Sonrasi IL-10 Gen Ifade Düzeyi. 40
Şekil 3.3. 1. Eş Zamanli Pzr Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez Ile Kontrolü. 41

Şekil 3. 15. MCF-7 Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Dozlarının NO Düzeyine Etkisi. 44
Şekil 3. 16. HT-29 Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Dozlarinin NO Düzeyine Etkisi. 44
Şekil 3. 17. LNCaP Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Dozlarinin NO Düzeyine Etkisi. 45
Şekil 3. 18. MCF-7 Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Dozlarinin TGF-B Protein Düzeyine Etkisi. 46
Şekil 3. 19. HT-29 Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Dozlarinin TGF-B Protein Düzeyine Etkisi 46
Şekil 3. 20. LNCaP Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Dozlarinin TGF-B Protein Düzeyine Etkisi. 47
Şekil 3. 21. MCF-7 Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Dozlarinin IDO Protein Düzeyine Etkisi. 48
Şekil 3. 22. HT-29 Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Dozlarinin IDO Protein Düzeyine Etkisi. 48
Şekil 3. 23. LNCaP Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Dozlarinin IDO Protein Düzeyine Etkisi. 49
Şekil 3. 24. MCF-7 Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Dozlarinin IL-17 Protein Düzeyine Etkisi 50
Şekil 3. 25. HT-29 Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Dozlarinin IL-17 Protein Düzeyine Etkisi. 50
Şekil 3. 26. LNCaP Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Dozlarinin IL-17 Protein Düzeyine Etkisi. 51
Şekil 3. 27. MCF-7 Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Dozlarinin IL-10 Protein Düzeyine Etkisi. 52
Şekil 3. 28. HT-29 Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Dozlarinin IL-10 Protein Düzeyine Etkisi. 52
Şekil 3. 29. LNCaP Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Dozlarinin IL-10 Protein Düzeyine Etkisi. 53
Şekil 3. 30. MCF-7 Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Dozlarinin IL-6 Protein Düzeyine Etkisi. 51
Şekil 3. 31. HT-29 Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Dozlarinin IL-6 Protein Düzeyine Etkisi. 54
Şekil 3. 32. LNCaP Hücrelerinde Bevacizumab ve Axitinib Ilaç ve VEGF Protein Dozlarinin IL-6 Protein Düzeyine Etkisi. 55
Şekil 3. 33. MCF-7 Hücrelerinde VEGFR1 ve VEGFR2 Ifade Eden Hücre Oranları. 57
Şekil 3. 34. HT-29 Hücrelerinde VEGFR1 ve VEGFR2 Ifade Eden Hücre Oranları. 58
Şekil 3. 35. LNCaP Hücrelerinde VEGFR1 ve VEGFR2 Ifade Eden Hücre Oranlari. 59

ÇİZELGELER

Çizelge 1. 1. NO, TGF-B, IDO, IL-17, IL-10 ve IL-6 Sitokinlerin Kaynak Hücreleri ve Ana Fonksiyonlari. 10
çizelge 2. 1. Bevacızumab, Axitinib ve VEGF için Kullanilacak Ilaç Dozları 19
Çizelge 2. 2. Eş Zamanli PZR Deneyinde Kullanilan Primer ve Probe Dizileri. 22
Çizelge 2. 3. EZ-PZR Reaksiyonu 23
Çizelge 3. 1. Hücre Canlılık Testi Için MCF-7, HT-29 ve LNCaP Hücrelerine Uygulanan 9 Farklı Bevacizumab ve Axitinib Ilaç Dozları. 26
Çizelge 3. 2. MCF-7, HT-29 ve LNCaP Hücreleri Için Çizelge 3.1. de Verilen Ilaç Dozlarinin Uygulanmasi Ile Yapilan MTT Sonuçları. 26
Çizelge 3. 3. MCF-7 Hücresi için Belirlenen Dozlar Ve Kontrol Örnekleri için RNA Izolasyon Sonrasi Spektrofotometre ile Saflık ve Konsantrasyon Olçumu. 29
Çizelge 3. 4. HT-29 Hücresi için Belirlenen Dozlar ve Kontrol Örnekleri için RNA Izolasyon Sonrasi Spektrofotometre ile Saflık ve Konsantrasyon Olçumu. 29
Çizelge 3. 5. LNCaP Hücresi için Belirlenen Dozlar ve Kontrol Örnekleri için RNA Izolasyon Sonrasi Spektrofotometre ile Saflık ve Konsantrasyon Olçumu. 29
Çizelge 3. 6. MCF-7 Hücrelerinde Beva, Axa ve VEGF Uygulamasi Sonrası ΔΔCt Metodu ile Kontrol Gruplarına Göre Gen Ifade Düzeyleri (Ortalama ± Standart Hata). 30
Çizelge 3. 7. HT-29 Hücrelerinde Beva, Axa ve VEGF Uygulaması Sonrası ΔΔCt Metodu ile Kontrol Gruplarina Göre Gen Ifade Düzeyleri (Ortalama ± Standart Hata). 31
Çizelge 3. 8. LNCaP Hücrelerinde Beva, Axa ve VEGF Uygulamasi Sonrası ΔΔCt Metodu ile Kontrol Gruplarina Göre Gen Ifade Düzeyleri (Ortalama ± Standart Hata). 31
Çizelge 3. 9. MCF-7 Hücrelerinde Beva, Axa ve VEGF Uygulaması Sonrası NO ve Sitokin Düzeyleri (Ortalama ± Standart Hata) 42
Çizelge 3. 10. HT-29 Hücrelerinde Beva, Axa ve VEGF Uygulaması Sonrası NO ve Sitokin Düzeyleri (Ortalama ± Standart Hata) 42
Çizelge 3. 11. LNCaP Hücrelerinde Beva, Axa ve VEGF Uygulaması Sonrası NO ve Sitokin Düzeyleri (Ortalama ± Standart Hat). 43
Çizelge 3. 12. MCF-7, HT-29 ve LNCaP Hücrelerinde, Bevacizumab, Axitinib ve VEGF'nin Farklı Dozlarının Hücre Yüzeyinde VEGFR1 Ve VEGFR2 Ekspresyonlarına olan Etkisi'nin (VEGFR1, VEGFR2 ve her iki Reseptörü Birlikte Eksprese Eden Hücrelerin) Yüzdeleri. 56

1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Kanser kontrolsüz büyüme ve anormal hücre yayılması ile karakterize bir hastalık grubudur. Kanserin kitle olarak büyüyebilmesi ve vücuda yayılabilmesinde yeni damar oluşumu olarak adlandırılan anjiyogenez çok önemli bir süreçtir. Klinik olarak saptanabilir duruma gelen kanserin çoğalması durdurulamaz ve vücuda yayılımı kontrol altına alınamaz ise bu durum hastanın ölümüne neden olabilir.

1.1.1. Kanser türleri

Kanser daha çok epitelyal dokulardan kaynaklanan malign tümörler için kullanılan bir kelime olsa da genel olarak benign tümörleri ifade etmede de yaygın olarak kullanılmaktadır. Kanserler, köken aldıkları hücrenin türüne göre başlıca 5 ana kategoriye gruplandırılabilir:

- **Karsinom**: Ciltte veya doku içinde başlayan ve epitel tabakasından kaynaklanan kanserlere denir. Adenokarsinoma, bazal hücreli karsinom, skuamoz hücreli karsinom ve geçiş hücreli karsinom, karsinomanın alt tipleridir.
- **Sarkom**: Kemik, kıkırdak, yağ, kas veya kan damarları gibi bağ veya destek dokularından köken alan malign tümörlerdir.
- **Lösemi:** Kemik iliği gibi kan yapan dokularda başlayan ve çok sayıda anormal kan hücresinin üretilmesi ile karakterize malignitelerdir.
- **Lenfoma ve miyelom:** Bağışıklık sisteminin hücrelerinde köken alan malignitelerdir.
- **Glial Tümörler:** Merkezi sinir sistemi tümörleri olarak bilinir ve sinir dokusundan köken alırlar.

1.1.2. Kanserin Etiyolojisi

Kanser genellikle birden fazla faktöre bağlı olarak basamaklı bir süreçte ortaya çıkar. Doğrudan kanser yapan ajanlar karsinojen olarak adlandırılmaktadır. Doğrudan kansere neden olabilen karsinojenler arasında kimyasal ajanlar, radyasyon, bazı viral ve bakteriyel ajanlar sayılabilir. Ayrıca bazı genetik ve kalıtsal durumlar, immün yetmezlikler ve bazı hormonal değişiklikler de kanser gelişimini ciddi ölçüde arttırabilmektedir.

Kimyasal Karsinojenler

Kimyasal maddelerin kansere neden olabildiği uzun zamandan beri bilinmektedir. Özellikle deneysel kanser oluşturma modelleri olarak da araştırmalarda uzun süre kullanılmıştır. Bazı kimyasal maddelerin belirli kanser türleriyle bağlantılı olduğu çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin tütün kullanımının pek çok organda kanser gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Dünyada görülen akciğer kanserinin yaklaşık % 90'ının nedeni tütün olarak hesaplanmaktadır. Sigarada kansere yol açtığı bilinen 30'un üzerinde kimyasal madde tanımlanmıştır.

İyonize Radyasyon

Fiziksel ajanların da kansere neden olduğu bilinmektedir. Röntgen ışınlarının tıpta kullanılmaya başlaması ile ilk radyologlarda cilt kanserlerinin görülmesi, radyumun sanayide kullanılması ile bu iş yerlerinde çalışanlarda sarkomların görülmesi ve son olarak da atom bombası sonrası birçok kanser türünün sıklığının artması ile radyasyon kanser etiyolojisinde önemli bir faktör olarak yer almıştır. Yine mediasten bölgesine radyoterapi uygulanan genç hastalarda daha sonra meme kanseri gelişmesi terapötik radyasyonun da kanser nedeni olabileceğinin ilk klasik örneklerindendir. Radon gazı ve güneşten gelen mor ötesi radyasyona uzun süre maruz kalma melanoma ve diğer cilt

malignitelerine neden olabilmektedir. Uzun süre asbest liflerine maruz kalma mezotelyoma riskini ciddi olarak arttırmaktadır.

Viral ve Bakteriyel Enfeksiyonlar

Virüslerin daha çok kuşlarda ve küçük memelilerde çeşitli kanserlere neden olduğu uzun zamandır bilinmekle birlikte insanlarda kansere neden olan virüs sayısı sınırlıdır. Bunlar arasında, Hepatit B ve C`ye bağlı karaciğer kanseri, İnsan Papilloma Virüsü (HPV) enfeksiyonlarına bağlı rahim ağzı kanseri; Epstein-Barr virüsüne bağlı bazı lenfoma türleri sayılabilir. Bakteriyel ajanlardan ise insanda *Helicobacter pylori* enfeksiyonuna bağlı gastrik lenfoma ve mide kanseri riskinin arttığı gösterilmiştir.

Genetik veya Kalıtsal Kanserler

Özellikle tümör baskılayıcı gen fonksiyonlarındaki kayıp durumlarında bazı kanserler daha erken yaşlarda sık olarak görülmektedir. Retinoblastom gen kaybında retinablastom ve bazı sarkomlar sık görülmektedir. Ailesel yatkınlık gösteren meme kanseri ve over kanserli hastalarda BRCA1 ve BRCA2 genlerinde sıklıkla mutasyon saptanmaktadır. Yine Down sendromlu bireylerde lösemi ve testis kanseri gibi maligniteler sık izlenmektedir.

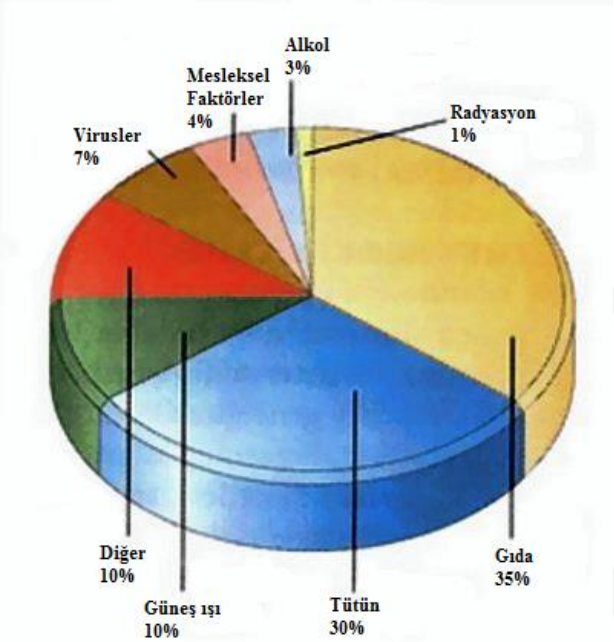
Hormonal Değişiklikler

Hücre proliferasyonun hormonlardan çok etkilendiği organlarda, yüksek ve uzun süreli hormonal uyarının kanser riskini arttırabileceği gösterilmiştir. Kadınlardaki östrojen hormonunun aşırı artışının, rahim kanserini uyardığı bilinmektedir.

İmmün Sistem Disfonksiyonu

Organ nakli yapılan hastalarda bazı kanserlerin sık görülmesi, özellikle immün sistemin denetim fonksiyonunu yeterince yapamamasından dolayı

vücuttaki kanser hücrelerinin elimine edilememesi ve sonuçta kanser gelişiminin hızlanmasına bağlanmaktadır. Yine HIV enfeksiyonu nedeni ile bağışıklık sistemi bozukluğu olan hastalarda, Kaposi sarkomu, non-Hodgkin lenfoma, anal kanser ve rahim ağzı kanserlerinin arttığı gösterilmiştir.

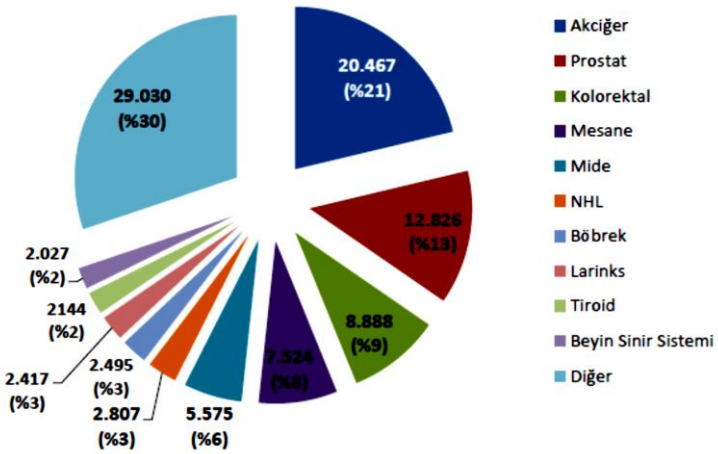


Şekil 1. 1. Kanserde etiyolojik ajanların dağılımı (*Articles4health., 2017).*

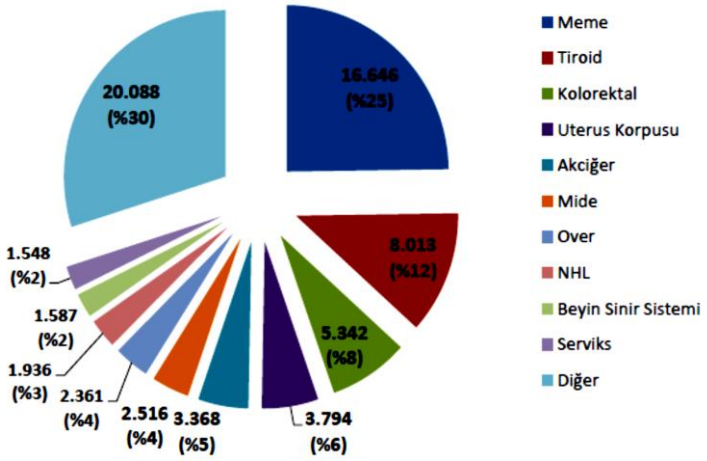
1.1.3. Kanser Epidemiyolojisi

Dünya genelinde, her yedi ölümden biri kanserden dolayı gerçekleşir, ayrıca kanser AIDS, tüberküloz ve sıtmadan daha fazla ölüme neden olur. Ülkeler gelir düzeylerine göre gruplandırıldıklarında, yüksek gelirli ülkelerde kanser kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci ölüm sebebidir, düşük ve orta gelirli ülkelerde ise kalp-damar hastalıkları ile bulaşıcı ve parazit hastalıklarını takiben üçüncü sırada yer almaktadır. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı' nın (IARC) araştırmalarına göre, 2012 yılında dünya çapında 14,1 milyon yeni kanser vakasının görüldüğü ve bunlardan 8 milyonunun, dünya nüfusunun yaklaşık %82'sini oluşturan ve ekonomik açıdan gelişmekte olan ülkelerde meydana geldiğini hesaplamıştır. 2030 yılına gelindiğinde de, küresel boyutta yılda 21,7 milyon yeni kanser vakasının tanı alması beklenmektedir (AmericanCancerSociety., 2012). Ülkemizdeki en son resmi

rakamlar değerlendirildiğinde bir yıl içerisinde yaklaşık 96.200 erkek ve 67.200 kadının kanser teşhisi aldığı tahmin edilmektedir. Son 5 yıl verileri değerlendirildiğinde kanser sıklığında herhangi bir artış ya da azalış olmadığı söylenebilir.



Şekil 1. 2. Erkeklerde en sık görülen kanserlerin toplam sayısı ve yüzde dağılımı ***(Kanser.gov.tr, 2017).***



Şekil 1. 3. Kadınlarda en sık görülen kanserlerin toplam sayısı ve yüzde dağılımı (Kanser.gov.tr, 2017).

1.1.4. Kanser Tedavisi

Kanser tedavisinde kullanılan yöntemler genel olarak cerrahi, radyoterapi ve ilaç tedavisi olmak üzere 3 ana gruba ayrılır. Hastalara uygulanacak olan tedavi seçeneğini daha çok hastalığın yaygınlık durumunu gösteren evresi belirler. Hastalığın vücuda

yayılmadığı evrelerde cerrahi yöntemi genellikle hastalığın tamamen ortadan kaldırılmasını, yani şifayı amaçlar. Küçük hücreli akciğer kanseri ve baş-boyun kanserleri gibi bazı kanser türlerinde radyoterapi erken evrelerde şifa amacıyla kullanılan bir tedavi seçeneğidir. Lokal ileri evrelerde ise genellikle radyoterapi ile birlikte ilaç tedavisi esas seçenek olarak uygulanmaktadır. İleri evrelerdeki hastalarda veya nüks etmiş hastalarda ise tedavi seçeneği ilaç tedavisidir. Fakat bu evredeki hastalarda ilaç tedavisi genellikle şifa ile sonuçlanmaz. Kanserde ilaç tedavileri klasik olarak kullanılan ve sitotoksik etki gösteren kemoterapinin yanı sıra hormonal ajanlar ve son yıllarda daha yaygın olarak kullanılmaya başlanan hedefe yönelik küçük moleküllü ajanlar, monoklonal antikorlar ve immünoterapiler ile gittikçe artan bir çeşitlilik göstermektedir.

Son yıllarda 'hassas tıp' olarak da adlandırılan 'precision medicine' kavramı ile hastaların tümör hücrelerinde izlenen genetik değişikliklerinin taranarak ilaç seçimi fikri önem kazanmıştır. Henüz ilk klinik çalışmalar çok başarılı sonuçlar vermemiş olsa da popülarite kazanmaktadır. Hedefe yönelik tedavilerden günümüzde başarılı ve yaygın olarak kullanılan ajanlar arasında anjiyogenez hedefli tedaviler (bevacizumab ve VEGFR yolağını hedefleyen tirozin kinaz inhibitörleri), monoklonal antikorlar ve immünoterapiler sayılabilir.

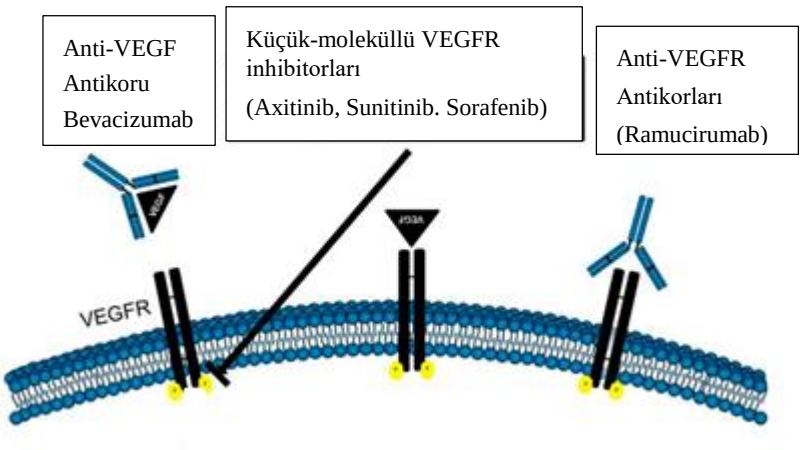
Anti-anjiyogenik tedaviler arasında vasküler endotelyal büyüme faktörünü (VEGF) bağlayan monoklonal antikor bevacizumab ve rekombinant bir peptid olan aflibercept ile VEGF reseptörünü bağlayan ramicirumab monklonal antikoru FDA onayı alarak klinikte kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca VEGFR yolağını hedefleyen egorafenib, Sorafenib, Sunitinib, axitinib gibi tirozin kinaz inhibitörleri de pek çok kanser türüne anti-anjiyogenik etkilerinden dolayı başarı ile kullanılmaktadır. Bu tez çalışmamızda anjiyogenez yolağının ana ligandı olan VEGF`yi bağlayan bevacizumab monoklonal antikoru ile VEGFR yolağında tirozin kinaz inhibitörü olan axitinib kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

1.1.4.1. Bevacizumab

Ülkemizde Altuzan ticari adı altında satılan bevacizumab, çeşitli kanser türlerini tedavi etmek için kullanılan bir ilaçtır. Bevacizumab, yüksek özgünlük ile VEGF'ye bağlanarak VEGF aracılı sinyal yolaklarını ve dolayısıyla anjiyogenezi bloke eden, hümanize bir immünoglobulin G monoklonal antikordur. Klinik araştırmalar bevacizumabın standart kemoterapi ile kombine edildiğinde metastatik kolorektal kanserli hastalarda sağkalımı uzatmada etkili olduğunu göstermiştir (Lipp., 2007). Kolon kanserinin yanı sıra over kanserinin ikinci basamak tedavisinde ve Glial tümörlerde kemoterapi ile birlikte kullanılmaktadır.

1.1.4.2. Axitinib

Ülkemizde Inlyta ticari adı ile ruhsatlı olan axitinib bir kinaz inhibitörüdür. Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörleri olan VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3`ün tirozin kinazlarını inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu reseptörler patolojik anjiyogenez, tümör büyümesi ve kanser ilerlemesinde önemli rol oynar. Inlyta, bir önceki sistemik tedavinin başarısız olduğu hastalarda ileri evredeki renal hücreli karsinomanın tedavisi için onay almıştır ve bu amaçla ülkemiz dahil tüm dünyada kullanılmaktadır (Centerwatch., 2017).



Şekil 1. 4. Anti-anjiyogenik ilaç olan bevacizumab ve axitinib etki mekanizması (Medinger and Passweg, 2014).

1.2. Kanser ve İmmün Sistem

Hanahan ve Weinberg'in 2000 yılında 6 ana basamakta toparladığı mekanizmalar kanser gelişme süreci içinde çok önemli rol oynamaktadır. Bunlar; proliferatif sinyal vermeyi sürdürme, büyümeyi baskılayıcı sinyallerden kaçınma, hücre ölümüne direnme, ölümsüzleştirmeyi sağlama, anjiyogenez indükleme ve invazyon ve metastazı aktive etme mekanizmalarıdır. Daha sonraki yıllarda hücresel enerjinin düzenlenmesi ve bağışıklık sistemi yıkımından kaçmanın da karsinogenezde ana mekanizmalar olduğu kabul edilmiştir (Hanahan and Weinberg, 2011). Özellikle immün sistemin kanser gelişimindeki rolü, son yıllarda immünoterapilerin başarılı bir şekilde tedavide kullanılmaya başlanması ile daha çok önem kazanmıştır. Kanser hücreleri, normalde tümörlerin gelişimini kısıtlayan bağışıklık sisteminin gözetiminden kaçabildiklerinde hastalık geliştirebiliyorlar. Kanserde immün gözetimin önemi deneysel ve klinik çalışmalarla vurgulanmıştır. Lenfositleri veya IFN tip I sinyali bozuk olan farelerin, mutasyon geçirmemiş wild tip farelere kıyasla kanser gelişimine daha duyarlı olduğu saptanmıştır (Shankaranve ark., 2001). İnsanlarda, bağışıklığı baskılanmış hastalarda (organ nakli olan hastalar veya HIV hastaları) tümör insidansı artmıştır (Buellve ark., 2005, Frischve ark., 2001). Tersine, T veya NK hücreleri tarafından infiltre olan kolorektal veya yumurtalık tümörlü hastalarda iyi bir prognoz gözlemlenmiştir (Galon ve ark., 2006; Coca ve ark., 1997).

Bağışıklık sistemi, hastalıklara karşı vücudu korur ve bu sistemde yer alan hücreler, bir dizi reaksiyon ile yabancı maddelere karşı yanıt oluşturur ya da bu maddelerin zarar verdiği hasarlı hücreler ile savaşır. Temel olarak, bağışıklık sisteminin savunmasında iki hat vardır: doğal bağışıklık ve adaptif bağışıklık. Doğal bağışıklık, spesifik olmayan (antijenden bağımsız) ilk immünolojik savunma mekanizmasıdır. Vücuda giren yabancı maddeler ile ilk mücadele eden doğal bağışıklık sistemi elemanlarıdırlar. Yabancı madde girişinden itibaren birkaç dakika veya saat sonra meydana gelen hızlı ve hiçbir hafızası olmayan bir immünolojik tepkidir. Kazanılmış bağışıklık olarak da adlandırılan adaptif bağışıklık ise antijene bağımlı ve spesifiktir. Hafızaya sahip olduğu için ikinci defa aynı antijene maruz kalındığında hızlı ve etkili bir bağışıklık tepkisi oluşturur. Doğal bağışıklık enfeksiyon

ajanlarının ortadan kaldırılması için mücadele ederken, adaptif bağışıklık devreye girer ve ajanı ortadan kaldırır. Tümörlere karşı vücudu korumada ve oluşan tümörleri ortadan kaldırmada daha çok adaptif bağışıklık rol oynar. Adaptif immün sistem esas olarak antijen sunan hücreler (APC) ile T hücreleri ve B hücrelerini içerir (Warringtonve ark., 2011).

1.3. T-Hücresi ve Antijen Sunan Hücreler

T-hücreleri kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerinden oluşup timusa göç ederek orada olgunlaşırlar. Bu hücrelerin yüzeyinde T-hücre reseptörü (TCR) olarak bilinen antijene özel reseptörler vardır. T-hücre reseptörlerinin belirli bir antijeni tanıyıp bağlanabilmesi için antijen sunan hücrelere ihtiyaç vardır. APC hücrelerinin büyük çoğunluğunu dendritik hücreler oluşturmakla birlikte, makrofajlar, B hücreleri, fibroblastlar ve epitel hücreleri de antijen sunma görevi yapabilmektedir. APC hücrelerinin üzerinde majör histokompatibilite kompleksi (MHC) olarak bilinen hücre-yüzeyi proteinleri vardır. APC hücreleri bir antijen ile karşılaştıkları zaman onu yutup sindirdikten sonra MHC proteinleri ile hücre üzerinde sergilerler, böylelikle T hücreleri bu yabancı maddeleri tanıyıp aktive olurlar. MHC-antijen kompleksi TCR'ı aktive ettikten sonra T hücresi bir takım sitokinler salgılayarak bağışıklık sistemini kontrol eder. Bu antijen sunumu işlemi sonucunda T hücreleri sitotoksik T hücrelerine ($CD8^+$ hücreler) ya da yardımcı T (Th) hücrelerine ($CD4^+$ hücreleri) farklılaşmak için uyarılırlar. Sitotoksik T-hücreleri, yabancı ajanlar ile enfekte olmuş hücreleri ya da tümör hücrelerini ortadan kaldırmaya çalışır. Ancak Th hücreleri, diğer hücreleri yönlendirerek bağışıklık yanıtının oluşup devam ettirilmesinde "aracılık" ederler. Th hücreleri aktive oldukları zaman birçok hücre tipini aktive edecek sitokinler salgılamaya başlar (Warringtonve ark., 2011).

İmmün sistem hücreleri, normal hücrelere göre yüzey özellikleri az da olsa değişmiş olan tümör hücrelerini tanıyarak ve onları ortadan kaldırmaya çalışarak kanser hastalığının gelişmesini engeller. Vücudu kansere karşı koruyan en önemli mekanizmalardan biri olan bu süreç İmmünolojik Sürveyans olarak adlandırılır.

Kanser hücrelerinin büyüyerek hastalık yapabilmesi için bu denetiminden kaçması gerekmektedir. Kanser hücreleri, büyüyüp yayılabilmek için başlıca üç mekanizma aracılığıyla immün sistem denetlemesinden kaçabilirler:

1. Tümör hücreleri yüzeylerinde bağışıklık sistemi tarafından tanınmalarını kolaylaştıracak tümör antijenlerinin veya MHC antijenlerinin ekspresyonunu azaltır.

2. Bağışıklık sisteminin antijeni tanıması ve ona karşı savunmasında rol oynayan APC ve T-hücreleri gibi hücrelerin ifadesini ve olgunlaşmasını azaltırlar.

3. İmmün sistemi baskılayan tümör ilişkili makrofajlar (TAM), miyeloid kökenli supresor hücreler (MDSC) ve regülatör T hücreleri (Treg) gibi immün sistemi baskılayan hücrelerin yapımını arttırarak onları tümör ortamına (mikroçevresine) getirirler. Bu hücreler tümör mikroçevresinde immün supresif faktörler üretirler. Tümör mikroçevresindeki bu hücrelerin yanı sıra tümör hücrelerinin kendileri ve stroma hücreleri de bağışıklık sistemini baskılamak için immün baskılayıcı sitokinleri üretir. İmmün baskılayıcı sitokinler çok geniş bir grup içerisinde yer almakla birlikte en çok çalışılan ve bilinenleri NO, TGF-β, IDO, IL-17, IL-10 ve IL-6'dır. Çizelge 1.1'de bu sitokinlerin üretildikleri hücreler ve başlıca fonksiyonları gösterilmiştir (Voronve ark., 2014).

Çizelge 1. 1. NO, TGF-β, IDO, IL-17, IL-10 ve IL-6 sitokinlerin kaynak hücreleri ve ana fonksiyonları (Voron et al., 2014).

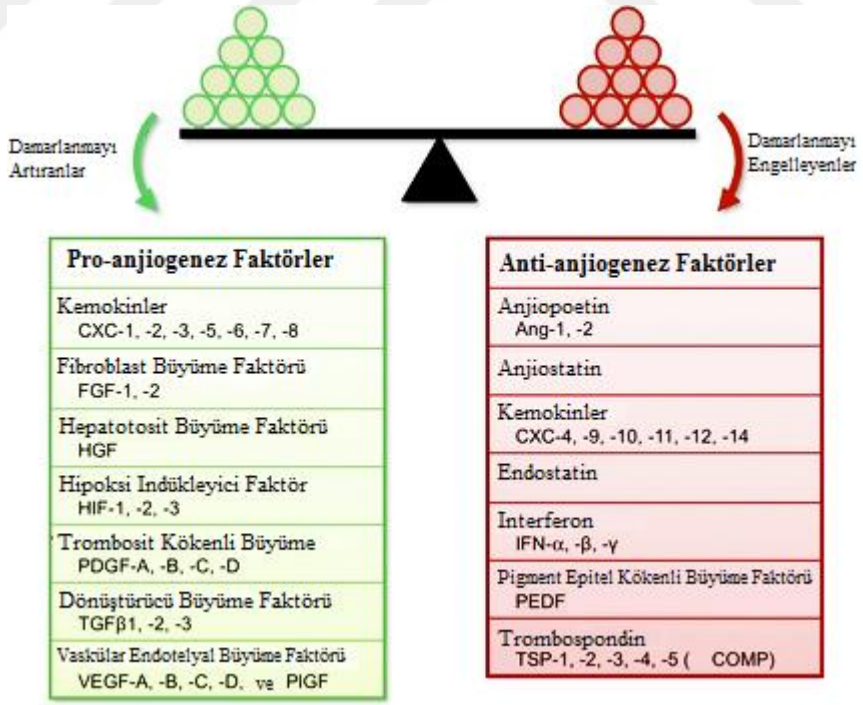
Sitokin	Hücre Kaynağı	Ana fonksiyonları
NO	Tümör hücreleri, damar endotel hücresi, MDSC, BEC	ICAM-1 ve VCAM-1 kusurlu kümelenme ve T hücreleri üzerindeki integrin alıcıları için düşük bir afinite oluşması.
TGF-β	Tümör hücreleri, Regülatör NK-hücresi, MDSC, DC, Regülatör T-hücresi, T-hücreleri	T hücresi ve makrofaj fonksiyonlarını azaltır, Treg hücrelerinin proliferasyonunu artırır ve adaptif bağışıklık tepkisini baskılar.
IDO	Tümör hücreleri, TAM	Triptofan tükenmesi ile T hücresi aktivasyonunu inhibe edilir.
IL-17	Tümör hücreleri, CD8+, T-hücreleri, NK-hücreleri, NKT hücreleri, nötrofiller	Belli koşullar altında IL-6 üretimini artırabilir ve tümör büyümesini indükleyebilir. Proinflamatuar sitokinlerin ve kemokinler indüksiyonu.
IL-10	T hücreleri, B hücreleri, monositler, MDSC, DC'ler, makrofajlar, regülatör T-hücreleri, tümör hücreleri	Th1 hücreleri, NK hücreleri ve makrofajlar aktivitesini inhibe ederek bağışıklık sistemini bastırma.
IL-6	Tümör hücreleri, endotel hücreleri, fibroblastlar, monositler / makrofajlar, MDSC, DC, T-hücreleri	TH1 hücre farklılaşmasını azaltır, VEGFA üretimini artırırır. Karaciğerde: akut faz proteinlerinin sentezi; lökosit geçişini, aktive edilmiş T hücresi üretimi; IgG, IgM, IgA hemopoeziste farklılaşması.

1.4.

1.4. Anjiyogenez

Anjiyogenez mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının oluşumudur. Bu işlem, kan damarlarının iç duvarını kaplayan endotel hücrelerinin göçü, büyümesi ve farklılaşmasını kapsar. Anjiyogenez süreci, vücuttaki kimyasal sinyaller tarafından kontrol edilir. Bu sinyaller hem hasarlı kan damarlarının onarılmasını hem de yeni kan damarlarının oluşumunu teşvik edebilir.

Anjiogenez tümör büyümesinde, tümörün yayılmasında ve metastaz oluşumunda hayati rol oynamaktadır. Anjiyogenez esas olarak anjiyogenezi uyaran (pro-anjyogenik) ve baskılayan (anti-anjyogenik) faktörler arasındaki denge ile düzenlenir. Kanser gelişmesinde rol oynayabilen proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörlerden bir kısmı Şekil 1.5'de gösterilmiştir. Anjiyogenezi uyaran faktörler arasında, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve onun reseptörlerinin oluşturduğu yolak, tümör anjiyogenezinin en önemli indükleyicilerinden birini temsil eder (Pragerve ark., 2012).



Şekil 1. 5. Pro-anjiyogenik ve anti-anjiogenik dengesi (Logsdon et al., 2014).

1.4.1. Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü (VEGF)

VEGF anjiyogenezde çok önemli rol oynayan ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) süper gen ailesine ait bir sitokindir. Bu ailede VEGF-A'nın yanı sıra, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve VEGF-E (viral için kodlanmış bir protein) yer alır ve VEGF-A ile değişen derecelerde homoloji gösterirler. VEGF geninin sentezlenmesi östrojen, nitrik oksit (NO) ve çeşitli büyüme faktörleri örneğin, TGF-b ve keratinosit büyüme faktörü, IL-6, IL-1b ve insülin-benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) gibi birçok uyaran tarafından indüklenir (Shibuya, 2001). VEGF, fonksiyonlarını tirozin kinaz aktivitesine sahip iki reseptör; VEGFR-1 ve VEGFR-2 aracılığıyla gerçekleştirmektedir. VEGF ile bu reseptörlerin aktive edilmesi sonucunda sinyal iletim yolağının üzerinde bulunan birçok protein fosforilasyona uğrar (Ferrarave ark., 2003). VEGF'nin VEGFR-1'e daha yüksek afinite ile bağlanmasına rağmen, VEGF sinyal yolağının anjiyogenez açısından esas rol oynayan reseptörü VEGFR-2'dir (Toive ark., 2001).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, pro-anjiyogenik bir faktör olan vasküler endotelyal büyüme faktörü A (VEGF-A)'nın sadece anjiyogenezi arttırarak tümör büyümesi ve metastazı kolaylaştırmakla kalmayıp aynı zamanda immün sistemi de baskılayabildiğini göstermiştir.

1.4.2. VEGF'nin İmmün Sistem Baskılaması

1.4.2.1. Dendritik Hücre Baskılanması

Olgun DC'ler anti-tümör bağışıklıkta kritik unsurlardır ancak, kanser hastalarında, genellikle DC farklılaşması ve olgunlaşmasında sorun vardır. Bu nedenle, olgun olmayan DC' ler tümör antijenlerini naif T-hücrelerine etkili bir şekilde sunamadıkları için bağışıklık toleransı uyarılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, kanser hastalarının kanındaki olgunlaşmamış DC'lerin plazmadaki VEGF-A seviyesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Fanve ark., 2003). Bir in vitro modelde VEGF-A'ya maruz kalan

embriyonik kök hücrelerinden farklılaşan dendritik hücrelerinin, VEGFR1 aracılı olgunlaşmalarının ve VEGFR2 aracılı farklılaşma süreçlerinin engellendiğini gösterilmiştir. Ayrıca, olgunlaşmamış dendritik hücreler TGF-b' ya bağımlı bir şekilde Treg farklılaşmasını ve çoğalmasını arttırabilmektedir (Kusmartsevve ark., 2004). Fare modeli üzerinde yapılan bir çalışmada, VEGF'nin Flt-1 reseptörü (VEGFR-1) üzerinden dendritik hücrelerinin T hücrelerini aktive etme yeteneğini ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (Laxmananve ark., 2005). Lynn ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, VEGF'nin, CD80 ve CD86'nın azaltılmış ekspresyonu ve artmış apoptosis yoluyla DC'lerin lipopolisakkarit ile indüklenen olgunlaşmalarını baskıladığını bulmuşlardır (Lynn ve ark., 2010).

1.4.2.2. T-Hücre Baskılanması

VEGF-A'nın, T hücrelerinin timusta gelişimlerini inhibe edebildiği gösterilmiştir (Ohmve ark., 2003). T-hücrelerin timusta olgunlaşmasının inhibisyonu, VEGFR2 üzerinden meydana gelmektedir (Alfarove ark., 2009). VEGF'nin anormal damarlar oluşturarak T-hücrelerinin damar dışına geçmelerini engellediği bulunmuştur. Hastalarda yapılan çalışmalarda, kanserli hastaların asit sıvısı ve periferik kanlarından alınan T lenfositlerin proliferasyonları ve sitotoksiteleri gibi efektör fonksiyonlarının VEGF-A etkisi ile azaldığı gösterilmiştir (Alfarove ark., 2009). Diğer yandan, tümör hücrelerinin hipoksiye maruz kalmaları, onların sitotoksik T-hücreleri tarafından lizise uğramalarını önleyebilmektedir. Burada hipoksik ortamda pro-anjiyogenik faktör yapımında artış olmasından dolayı T hücreleri üzerinde olası bir baskılayıcı etki söz konusudur (Nomanve ark., 2009).

1.4.2.3. Immünoregülator Hücrelerin Birikimi

1.4.2.3.1. Baskılayıcı Miyeloid Hücreler

VEGF-A, myeloid kökenli baskılayıcı hücrelerin (*MDSC)* birikimini uyarabilmektedir. Miyeloid progenitör hücreler (MDSC) ve olgun myeloid hücreler (makrofajlar, granülositler, ve dendritik hücreler) bağışıklık sistemini baskılama özelliğine sahip hücrelerdir. MDSC hücrelerinin tümör mikro çevresinde birikmesi, T-hücre yanıtını farklı şekillerde baskılamasına yol açar. Bazı MDSC hücreleri tümör mikroçevresinde NO üretimine sebep olur bu da T hücrelerinin çoğalmasını bloke eder ve apoptoza uğramasına neden olur ve böylelikle tümörün içine giren T-hücre sayısı azalır. MDSC'ler radikal süperoksit gibi, indolamin 2, 3 dioksigenaz, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üreterek immünsupresif özellikler gösterebilir (Kusmartsevve ark., 2004). Sonuç olarak, MDSC tarafından üretilen radikal süperoksit ve NO arasında gelişen reaktivite sonucunda tümör mikroçevresinde serbest radikal olan proksi nitrit oluşur ki bu da T hücrelerinin spesifik peptid / MHC kompleksini tanıma özelliğini engeller.

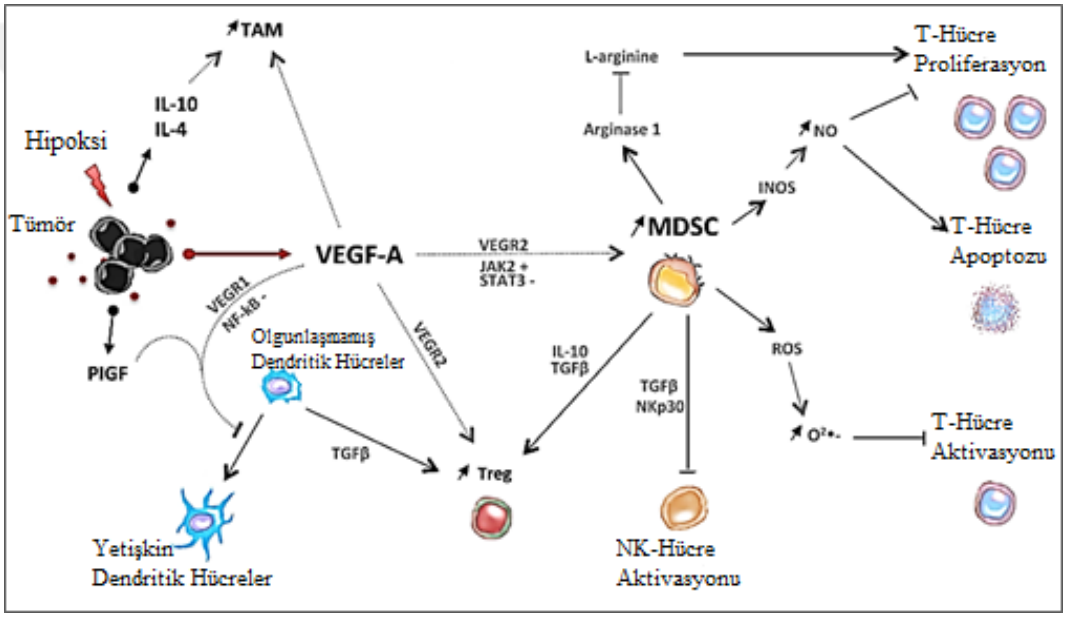
1.4.2.3.2. Regülator T-Hücreleri

Pro-anjiogenik faktörler, dolaylı ya da dolaysız mekanizmalar yoluyla, tümör taşıyan konakçılarda ortama regülatör T-hücrelerini (Treg) çekerek immün sistemi baskılarlar. Bu nedenle, VEGF ile geliştirilmiş MDSC, TGF-b'ye bağımlı veya bağımsız, $FoxP3^{+}$ Treg gibi diğer bağışıklık baskılayıcı hücrelerin de-novo olarak gelişimlerini tetikleyebilir (Serafinive ark., 2008). Örneğin kalın bağırsak karsinomlu bir fare modelinde MDSC' lerin IL-10 ve TGF-b üreterek Treg gelişimine aracılık ettiği gösterilmiştir (Huangve ark., 2006). Olgunlaşmamış DC'de TGF-b'ye bağımlı bir şekilde Treg farklılaşmasına ve çoğalmasına neden olabilir (Ghiringhellive ark., 2005). Son zamanlarda yapılan araştırmalara göre, tümör taşıyan farelerde ve metastatik kolorektal kanserli hastalarda, VEGFR2'ye bağımlı bir şekilde regülatör T hücrelerin çoğalmasının doğrudan VEGF-A tarafından indüklenebildiği gösterilmiştir.

Tümör taşıyan farelerdeki Treg hücrelerinin yüzeyinde VEGFR2 ekspresyonun arttığı buna karşılık tümörsüz farelerde Treg üzerinde VEGFR ekspresyonunun olmadığı gösterilmiştir (Termeve ark., 2013).

1.4.2.3.3. Tümor İlişkili Makrofajlar

Kötü prognoz ile ilişkili olan tümör-ilişkili makrofajlar (TAM) VEGF-A ile uyarılabilir. Tümör hücrelerinden üretilen IL-10 ve IL-4 gibi sitokinlerin TAM hücrelerinin gelişimini uyarabildiği gösterilmiştir (Voronve ark., 2014).



Şekil 1. 6. Pro-anjiyojenez faktörü olan VEGF-A tümörlerde immünsupresifitenin gelişimini indükler(Voron et al., 2014).

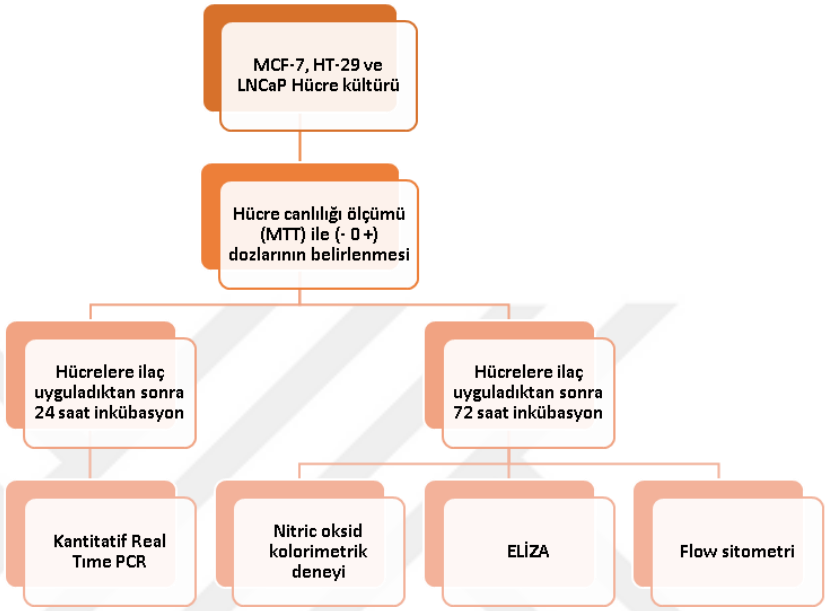
Karsionegenez sürecinde çok önemli rol oynayan anjiyogenez ve immün sistem gibi iki ana mekanizmanın birbirleriyle etkileşimi kanser tedavilerinde kullanılan ve bu iki mekanizmayı hedefleyen ilaçların daha rasyonel kullanımı konusunda önemli ipuçları sağlayabilecek potansiyeldedir. Henüz klinikte bu iki tedavi modalitesinin birlikte kullanımı ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır.

Bu tezde kanser tedavisinde kullanılan bevacizumab ve axitinib ilaçlarının ve tümör anjiyogenezinde önemli rolü olan VEGF proteininin tümör hücrelerinde immünosupresif faktör salgısı üzerindeki etkilerini in vitro olarak araştırmayı

amaçladık. Bu tez çalışması ile her iki tedavi modalitesinin daha rasyonel bir şekilde kullanılabilmesi için bir temel oluşturmayı hedefledik.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Tez çalışmamız aşağıdaki akış şemasına uygun olarak düzenlendi ve gerçekleştirildi.



Şekil 2. 1. Deney planının şematik gösterimi.

2.1. Malzeme Listesi

Kullanılan Tümör Hücreleri:

- **MCF-7:** İnsan meme kanseri hücresi, Epitel morfoloji, Yapışık hücre kültürü (ATCC, İngiltere).
- **HT-29:** İnsan Kolon Kanseri Hücresi, Epitel morfoloji, Yapışık hücre kültürü (ATCC, İngiltere).
- **LNCaP:** İnsan Prostat Kanseri Hücresi, Epitel morfoloji,Yapışık hücre kültürü (ATCC, İngiltere).

Kullanılan Hücre kültürü vasatları:

- **DMEM:** MCF-7 için kullanıldı (Biological Industries, 01-052-1A).
- **McCoy`s 5A:** HT-29 için kullanıldı (CAPRİCORN SCIENTIFIC, MCC-A).
- **RPMI-1640:** LNCaP için kullanıldı (CAPRİCORN SCIENTIFIC, RPMI-A).

Kullanılan Hücre kültürü kimyasalları:

- **FBS:** fetal sığır serumu (Biological Industries, 04-001-1A).
- **Penisilin-Streptomisin:** (Biological Industries, 03-031-1B).
- **Tripsin/EDTA solüsyonu:** (Biological Industries, 03-050-1B).
- **DMSO:** (Merck, 102952).
- **MTT:** 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid, (Chemicon International, ABD)
- **VEGF:** (SIGMA-ALDRICH, V7259 SIGMA)

Kullanılan ilaçlar:

- **Bevacizumab**: piyasadan temin edildi (Roche, Altuzan 400 mg/16ml)
- **Axitinib:** (SIGMA, PZ0193-5MG)
- **5-Fluorourasil:** piyasadan temin edildi (Fluro-S DEVA, eKY1174E_01)

2.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

2.2.1. Tümör Hücresi

Hücreler -150°C dondurucudan çıkartılıp hemen 37°C su banyosuna alınarak 3/2'si eritildi. Sonrasında eritilen hücreler %10 FBS ve %1 antibiyotik-antimikotik içeren hücre kültür besiyerlerine eklenerek %5 CO_2 içeren 37°C inkübatörde çoğalması için inkübe edildi.

2.2.2. Hücre Canlılık Ölçümü (MTT)

MCF-7, HT-29 ve LNCaP hücrelerini 96`lık kültür kaplarında kuyucuk başına $5x10^4$ hücre olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra belirlenen ilaç dozları (bevacizumab için 0.008 ile 2.5 mg/ml aralığında, axitinib için 10^{-3} ile 10^5 nM aralığında 9 farklı doz ve VEGF için de çizelge 2.1 deki dozlar) besi ortamları ile birlikte hazırlanıp hücreler üzerine eklendi ve 72 saat 5% CO_2 içeren 37°C inkübatorde inkübe edildi. 72 saatlik

sürecin sonunda canlı hücre oranını saptamak için MTT testi yapıldı. MTT'den 20 µl, 50 µl de vasat her kuyucuğa eklendi. Canlı hücrelerde oluşan formazan kristallerini çözmek için her kuyuya 150 µl DMSO eklenip çalkalayıcı üzerinde yaklaşık 1 saat bekletildi. Kristaller çözüldükten sonra ELISA plak okuyucuda 590 ve 620 nm' de alınan değerler ile hücre proliferasyonu ölçüldü. İlaç uygulanmamış kuyucukların absorbans değeri kontrol değeri olarak alınıp ilaç uygulanmış kuyuların absorbans oranını hesaplamada kullanıldı.

2.2.3. Belirlenen Dozların Hücre Uygulaması

Kullanılan ilaçlarda belirgin bir sitotoksisite gözlenmediği için bevacizumab ve axitinib içinde hücre canlılığında kontrole göre %0 ve ±%10 değişiklik yapan 2 farklı doz ve insanda kullanılan ortalama doza karşılık gelecek bir doz da gen ifade çalışmaları için seçildi. VEGF proteini için de literatürden farklı dozlara karşılık gelecek şekilde, 100 ng/µl, 50 ng/µl ve 10 ng/µl olmak üzere üç farklı doz seçildi (Çizelge 2.1).

Çizelge 2. 1. Bevacizumab, axitinib ve VEGF için kullanılacak ilaç dozları

	D1	**D2**	**D3**
BEVACİZUMAB	1.25 mg/ml	0.15625 mg/ml	0.00976 mg/ml
AXİTİNİB	103 nM	10 nM	10-2 nM
VEGF	100 ng/µl	50 ng/µl	10 ng/µl

Belirlenen ilaç dozlarını tümör hücresinde uygulamak için MCF-7, HT-29 ve LNCaP hücreleri 6 kuyulu plaklara, her ilaç dozuna 2 tekrar olacak şekilde kuyu başına $5x10^5$ hücre ekildi. Hücreler tutunup üresinler diye plaklar 24 saat boyunca %5 CO2 içeren 37°C inkübatörde inkübe edildi. Devamında besi ortamları aspire edildi ve belirlenen ilaç dozları taze medyum içinde plaklara eklendi ve %5 CO2 içeren 37°C inkübatöre kaldırıldı. Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyon (EZ-PZR) deneyinde 24 saat sonunda gen ifadeleri araştırmak için hücreler toplanıldı ve -86°C ye kaldırıldı.

Ayrıca Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) testi ile besiyerine salgılanan immünsupresif faktörlerin düzeylerini belirlemek için eş zamanlı olarak benzer şekilde hazırlanan plaklar bu defa 72 saat inkübe edildikten sonra besiortamları toplanarak -86°C'de çalışma yapılana kadar saklandı.

2.3.1. RNA İzolasyonu

Eş zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (EZ-PZR) için toplanılan hücrelerden ticari kitin (BioRad, 732-6820) prosedürüne uygun olarak total RNA izolasyonu yapıldı. Kısaca, hücre pelleti RNaz inhibitörü içeren lizis tamponu ile parçalandıktan sonra kitte bulunan kolonlar aracılığı ile saflaştırıldı. Saflaştırılan total RNA konsantrasyon ve saflığı ölçülmek üzere 2 µl RNA örneklerinden alındı ve geri kalanı -86 °C`a kaldırıldı.

2.3.1.1. Spektrofotometre

RNA saflıklarını ve konsantrasyonlarını ölçmek üzere ayrılan 2 µl RNA üzerine 98 µl saf su eklendi ve ölçülmek için 100µl olarak spektrofotometre cihazının (Beckman DU 730) kuyusuna yüklendi ve cihaza yerleştirildi. Örneklerden saflığı $2.1 \geq \lambda_{260}/\lambda_{280} \geq 1.85$ arasında olanlar çalışmaya alındı.

2.3.2. cDNA Sentezi

RNA izolasyonundan sonra tüm örneklerden 250 ng RNA alınacak şekilde kitin (BioRad, 170-8891) içerdiği random hexamer primerler, oligo-dT ve reverse transkriptaz enzimi kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezi yapıldı. Reaksiyon sonunda 20 µl cDNA elde edildi ki buda RNaz-DNaz içermeyen su (Qiagen, Almanya) ile 100 µl`ye tamamlanıp EZ-PZR`de kullanılacak üzere -20°C kaldırıldı.

2.3.3. Primer ve Prob Tasarımı

Anjiyogenez ve immün sistem etkileşiminde rol oynadığı düşünülen ve immünosüpresif sitokin olan İnterlökin 17 (IL-17), İnterlökin 10 (IL-10), İnterlökin 6 (IL-6), Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), Transforme edici büyüme faktörü beta (TGF-b) ve Nitrik oksit sentaz 3 (NOS3) gen ifade düzeylerini belirleyebilmek amacıyla EZ-PZR deneyinde kullanılmak üzere ileri (forward) ve geri (reverse) primer ve FAM-TAMRA boyalı olan Probe tasarımları yapıldı. Tasarlamada gen dizisini elde etmek için Ensembl (http://www.ensembl.org/index.html) sitesi kullanıldı. Devamında Primer ve Probu tasarlamak için Primer3web (version 4.0.0) (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) sitesinden yararlanıldı. Tasarlanan primer ve probların çalışılacak gen dizileri ile uyumluluklarından emin olmak için Primer Blast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) ve NCBI Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) web sitelerinden kontrol edildi. Ayrıca primer ve probların hairpin ve primer dimer yapılarının oluşturup oluşturmadıkları IDT (https://eu.idtdna.com/site) web sitesinden yararlanılarak kontrol edildi. Çalışmada kullanılmak üzere Çizelge 2.2'de belirtilen primer ve problar tasarlanıp sipariş edildi.

Çizelge 2. 2. Eş Zamanlı PZR deneyinde Kullanılan Primer ve Probe Dizileri.

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
IL-17	5'-CACCTTGGAATCTCCACCGCAA-3'	5'-CTGCGCAGGACCAGGATCTC-3'
IL-10	5'-CCAAGCCTTGTCTGAGATGATC-3'	5'-TGCTCTTGTTTTCACAGGGAAG-3'
IL-6	5'-GAGTAGTGAGGAACAAGCCAG-3'	5'-GCAGGACATGACAACTCATCT-3'
IDO	5'-ACGGTCTGGTGTATGAAGGG-3'	5'-ATGTCCTGGAGGAACTGAGC-3'
TGF-B	5'-GTGGACATCAACGGGTTCACT-3'	5'-TCCGTGGAGCTGAAGCAATAG-3'
NOS-3	5'-TGAAGCACCTGGAGAATGAG-3'	5'-TTGACCATCTCCTGATGGAA-3'
	Probe	
IL-17	5'-TGCCGCCACTTGGGCTGCAT-3'	
IL-10	5'-AGACATCAAGGCGCATGTGAACTC-3'	
IL-6	5'-TCTAGATGCAATAACCACCCCTGA-3'	
IDO	5'-CAGCGTCTTTCAGTGCTTTGACGT-3'	
TGF-B	5'-CCGGCCTTTCCTGCTTCTCATGG-3'	
NOS-3	5'-CGATCCAGGCCCAGTCTGCA-3'	

2.3.4. Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Tasarlanan primer ve problar öncelikle optimize edildi. Yapılan optimizasyon sonucunda bölüm 2.3.2`de sentezlenen tüm cDNA örneklerinden 4µl optimum miktar olarak belirlendi. Bunun üzerine EZ-PZR`nin 'ortak karışımı' master miksi (Solis Biodyne 5x Hot FirePol Probe Mix Plus (No Rox)) 6 µl olarak dağıtılacak şekilde hazırlanıp 96`lık plaka dağıtıldı. cDNA içermeyen negatif kontrol kuyucuklarına da karışım dağıtıldıktan sonra 4 µl RNaz-DNaz içermeyen su (Qiagen, Almanya) eklenerek son hacim 10 µl'ye tamamlanmıştır. Örnekler kit proserüdündeki gibi Çizelge 2.3'de belirtilen reaksiyonlarla amplifiye edilmiştir.

Çizelge 2. 3. EZ-PZR reaksiyonu

	Sıcaklık	Süre	Siklus Sayısı
Polimeraz Aktivasyonu	95°C	15 dakika	1 siklus
Denatürasyon	95°C	20 saniye	40 siklus
Bağlanma-Uzama	60°C	60 saniye	
Soğuma	37°C	10 dakika	1 siklus

2.3.4.1. EZ-PZR Ürünlerinin Agaroz Elektroforezi İle Kontrolü

EZ-PZR ile amplifiye edilen ürünler %2'lik agaroz jelde yürütülerek test edilmiştir. 50 bp DNA ladder (Bioron, 304007) ve 5X'lik yükleme boyası (Promega, M791A) kullanılarak örnekler %2'lik agaroz jelde yürütüldü ve jel görüntüleme cihazında (Bio-Rad Gel Doc XR, ABD) görüntülendi.

2.3.5. ELİZA

Yöntem 2.2.3.'de anlatılan 72 saat sonra toplanılan hücre süpernatanlarından NOS-3, TGF-b, IDO, IL-17, IL-10 ve IL-6 miktarlarını tespit etmek için ticari kit (YH Biosearch ELISA Kits, Çin) kullanıldı. Standart dilüsyonlar kit prosedürüne göre hazırlandı ve 50 µl olarak standart kuyucuklarına dağıtıldı. Hücre supernatantları -86°C den çıkarılıp oda ısısına getirildi. Örneklerden 40 µl 96`lık kap üzerinde belirlenen kuyucuklara eklendi ve üzerlerine ilgili spesifik antikordan 10 µl eklendi. Devamında standart ve örnek kuyucuklarına 50 µl streptavidin-HRP eklenerek antikorun bağlanması için plak 37°C'de inkübe edildi. Beş kez yıkama sonunda bağlanmayan ve spesifik olmayan molekülleri uzaklaştırıldı. Renk oluşumu sağlamak için yıkama sonunda kuyucuklara TMB substratı eklendi. Oluşan renk değişimleri belirlemek için örneklerin absorbansları 650 nm referans alınarak 450 nm'de ELIZA plate okuyucuda (Thermo Scientific, MULTİSKAN GO) okundu.

2.3.6. Nitrik Oksit Deneyi

Tümör hücreleri tarafından üretilen nitrik oksit (NO) tayini için ticari kit (Biovision, K262-200) kullanıldı. Kullanılan kitte NO oluşturulduktan sonra hızlı bir şekilde nitrit ve nitrata dönüşümü ölçüm kriteri olarak alınıp bunun üzerinden NO seviyesi belirlendi. Deneyde, Yöntem 2.2.3.'de anlatılan 72 saat sonra toplanılan hücre süpernatantları kullanıldı. Kit protokolüne dayanarak standartlar hazırlandı ve 96'lık kap üzerinde belirlenen kuyulara dağıtıldı. Devamında örnekler de belirlenen kuyulara dağıtımları yapıldı ve üzerlerine sırasıyla deney tamponu, nitrat redüktaz enzimi, enzimin kofaktörü eklenip 1 saat inkübe edildi. Sonrasında enhancer ile Griess reaktifleri eklendi. ELIZA plate okuyucuda (Thermo Scientific, MULTİSKAN GO) 540 nm'de ölçüm yapıldı.

2.3.7. Akım Sitometrisi

Deneylerde kullanılan tümör hücrelerindeki VEGFR1 ve VEGFR2 ifadesi akım sitometrisi ile belirlendi. Uygulanılacak ilaç sayısı ve dozlar göz önünde bulundurarak MCF-7, HT-29 ve LNCaP hücreleri ekimi yapıldı. Yirmi dört saat sonra belirlenen ilaç dozları hücrelere uygulandı ve 72 saat inkübasyon için flasklar 5% CO_2 içeren 37 °C inkübatore kaldırıldı. 72 saat sonra hücreler Cell Dissociation Solution (BI, 03-071-1B) ile kaldırıldı ve Thoma lamında sayılarak 1.5 x 10^6 hücre olacak şekilde 15 ml`lik deney tüplerine alındı. Hücre yıkaması için 'Flow buffer' Ca^{2+} Mg^{2+} içermeyen PBS, 2% FBS içeren PBS, 2mM EDTA ve 0.09% Na-Azide kullanılarak hazırlandı. Hücreler 'Flow Buffer' ile yıkandı. 500 RPM'de 5 dakika 4 °C'de santrifüj edildikten sonra süpernatan atıldı, pellet üzerine 1 ml 'flow buffer' eklendi ve örnekler 1.5 ml ependorflara alınarak 300 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatan atıldı ve hücreler süspansyon hale getirilerek üzerine 85 µl flow buffer ve 7.5 µl FITC işaretli anti-VEGFR1 (biorbyt, orb141549) ve 7.5 µl PE işaretli anti-VEGFR2 (Biolegend, 359904) antikoru eklendi. Oda sıcaklığında 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 1 ml flow buffer eklenerek 300 xg de 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra hücre pelleti 'flow buffer' ile süspansiyon haline getirildi ve VEGFR1 ve

VEGFR2 ifade eden hücre oranları sayım cihazından (Beckman Coulter Vavias Flow Cytometry) (A.Ü.T.F. Hematoloji Laboratuvarı) elde edildi.

2.4. İstatistik

Bevacizumab, axitinib ve VEGF dozlarına bağlı olarak yapılan EZ-PZR, ELIZA, nitrik oksit ve akım sitometresi deneylerinden elde edilen kantitatif verilerin analizinde tek yönlü ANOVA testi, Mann-Whitney U ve T testi testleri kullanıldı. Analizler için SPSS 10.0 programı kullanıldı. P değerleri <0,05 olan sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Bevacizumab ve Axitinib Sitotoksite Sonuçları

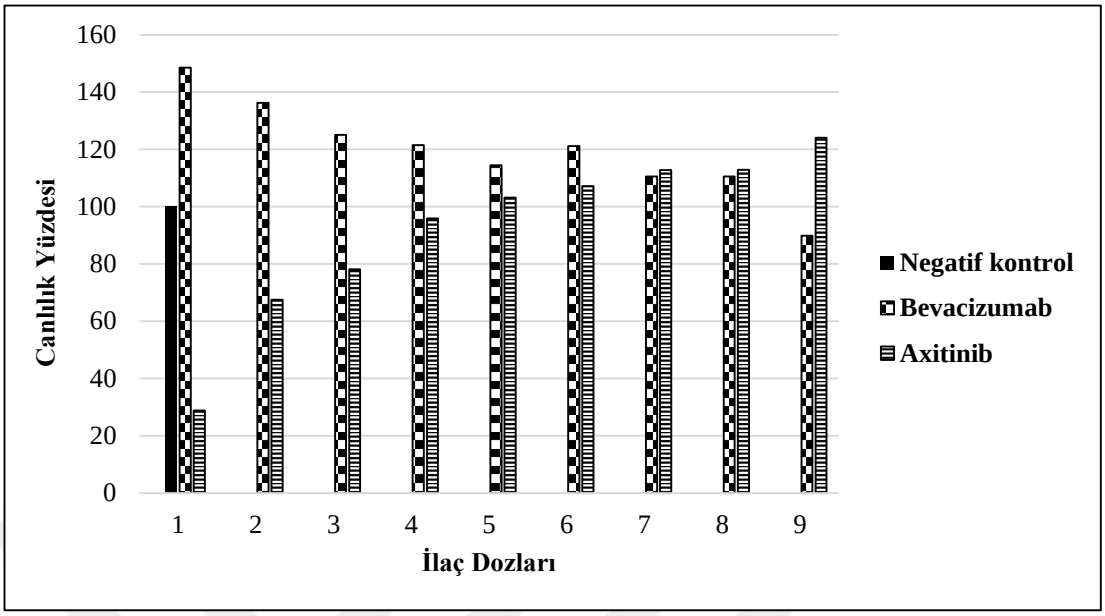
MCF-7, HT-29 ve LNCaP hücrelerine Çizelge 2.1'de verilen konsantrasyon aralıklarında 9 doz olarak uygulanan bevacizumab ve axitinib ilaçlarının in-vitro doza bağlı hücre canlılık eğrileri Çizelge 3.2., Şekil 3.1.–3.3'de gösterildi. 1 en yüksek ve 9 en düşük doz olarak uygulandı. İlaç uygulanmayan kuyucukların absorbans değerleri referans olarak alınıp canlılık oranı %100 olarak alındı.

Çizelge 3. 1. Hücre canlılık testi için MCF-7, HT-29 ve LNCaP hücrelerine uygulanan 9 farklı bevacizumab ve axitinib ilaç dozları.

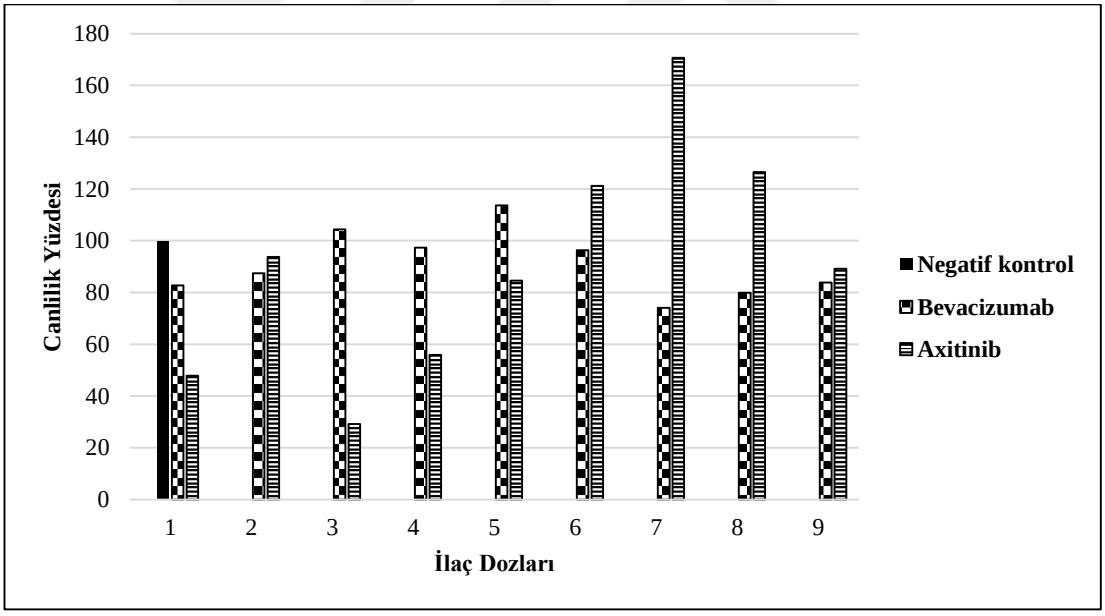
	D1	**D2**	**D3**	**D4**	**D5**	**D6**	**D7**	**D8**	**D9**
Bevacizumab	2.5 mg/ml	1.25 mg/ml	0.625 mg/ml	0.313 mg/ml	0.156 mg/ml	0.078 mg/ml	0.039 mg/ml	0.019 mg/ml	0.0096 mg/ml
Axitinib	10^5 nM	10^4 nM	10^3 nM	10^2 nM	10 nM	1 nM	10^{-1} nM	10^{-2} nM	10^{-3} nM

Çizelge 3. 2. MCF-7 HT-29 ve LNCaP hücreleri için çizelge 3.1. de verilen ilaç dozlarının uygulanması ile yapılan MTT sonuçları.

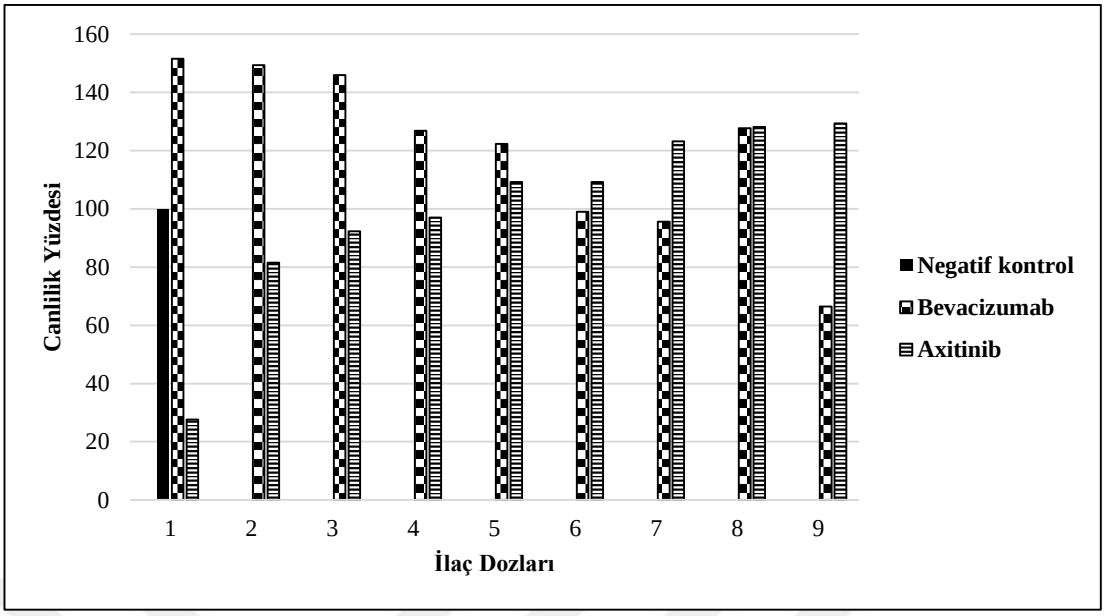
MTT	**İlaç**	**D1**	**D2**	**D3**	**D4**	**D5**	**D6**	**D7**	**D8**	**D9**
MCF-7	Beva	148.6 ± 0.01	136.2 ± 0.01	125.1 ± 0.01	121.5 ± 0.01	114.5 ± 0.004	121.1 ± 0.01	110.5 ± 0.01	110.5 ± 0.01	89.8 ± 0.01
	Axa	28.76 ± 0.01	67.45 ± 0.007	78.14 ± 0.09	95.86 ± 0.004	103.2 ± 0.01	107.2 ± 0.01	112.8 ± 0.004	112.8 ± 0.01	124.1 ± 0.01
HT-29	Beva	82.78 ± 0.02	87.45 ± 0.02	104.3 ± 0.05	97.32 ± 0.04	113.8 ± 0.06	96.28 ± 0.03	74.10 ± 0.01	79.88 ± 0.04	83.89, ± 0.01
	Axa	47.89 ± 0.01	93.74 ± 0.02	29.18 ± 0.02	55.89 ± 0.01	84.56 ± 0.03	121.2 ± 0.02	170.7 ± 0.04	126.6 ± 0.05	89.21 ± 0.02
LNCaP	Beva	151.6 ± 0.02	149.4 ± 0.007	146.0 ± 0.007	126.8 ± 0.03	122.4 ± 0.02	99.06 ± 0.009	95.59 ± 0.008	127.7 ± 0.02	66.46 ± 0.006
	Axa	27.61 ± 0.001	81.57 ± 0.007	92.28 ± 0.0004	97.00 ± 0.02	109.3 ± 0.016	109 ± 0.0007	123.2 ± 0.02	128.2 ± 0.02	129.4 ± 0.009



Şekil 3. 1. MCF-7 hücrelerinde bevacizumab ve axitinibin hücre canlılığına etkisi.



Şekil 3. 2. HT-29 hücrelerinde bevacizumab ve axitinibin hücre canlılığına etkisi.



Şekil 3. 3. LNCaP Hücrelerinde bevacizumab ve axitinibin hücre canlılığına etkisi.

Şekil 3.1. ve Şekil 3.3`de görüldüğü üzere MCF-7 ve LNCaP hücrelerinde bevacizumab ve axitinibde benzer cevaplar elde edilmiştir. Bevacizumab her iki hücre tipinde de yüksek dozlarda (D1-D3) hücre proliferasyonunu uyarırken düşük dozlarda anlamlı bir değişiklik yapmamıştır. Axitinib ise tersine yüksek dozlarda (D1, D2) bu hücrelerde sitotoksik etki gösterirken düşük dozlarda hücrede sitotoksik etki izlenmemiştir. HT-29 hücrelerinde ise bevacizumab hücre çoğalması üzerinde çok belirgin bir etki göstermemiştir. Buna karşılık axitinib HT-29 hücrelerinde değişken etki göstermiştir (Şekli 3.2.). Axitinibin yüksek dozlarında hücre canlılığı daha az iken düşük dozlarda canlılıkta bir artış izlenmiştir.

3.2. RNA Örnekleri Saflık ve Konsantrasyonları

İzole edilen RNA örneklerinin spektrofotometrede ölçülen saflık ve konsantrasyonları Çizelge 3.3. – 3.4.‘de gösterildi. Elde edilen total RNA örnekleri EZ-PZR reaksiyonu için yeterli kalite ve miktarda idi.

Çizelge 3. 3. MCF-7 Hücresi için belirlenen dozlar ve kontrol örnekleri için RNA izolasyon sonrası spektrofotometre ile saflık ve konsantrasyon olçumu.

MCF-7	**Beva D1**	**Beva D2**	**Beva D3**
Saflık	1.789	2.147	2.057
Konsantrasyon	675.04 µg/ml	484.85 µg/ml	464.34 µg/ml
	Axa D1	**Axa D2**	**Axa D3**
Saflık	2.077	2.046	2.082
Konsantrasyon	497.48 µg/ml	515.92 µg/ml	455.08 µg/ml
	VEGF D1	**VEGF D2**	**VEGF D2**
Saflık	2.092	2.093	2.128
Konsantrasyon	417.26 µg/ml	506.77 µg/ml	456.46 µg/ml
	Kontrol		
Saflık	2.088		
Konsantrasyon	494.64 µg/ml		

Çizelge 3. 4. HT-29 hücresi için belirlenen dozlar ve kontrol örnekleri için RNA İzolasyon sonrası spektrofotometre ile saflık ve konsantrasyon olçumu.

HT-29	**Beva D1**	**Beva D2**	**Beva D3**
Saflık	2.033	2.020	2. 050
Konsantrasyon	598.85 µg/ml	890.42 µg/ml	766.62 µg/ml
	Axa D1	**Axa D1**	**Axa D3**
Saflık	2.106	2.074	2.055
Konsantrasyon	306.41 µg/ml	384.82 µg/ml	753.67 µg/ml
	VEGF D1	**VEGF D2**	**VEGF D2**
Saflık	2.074	2.025	2.093
Konsantrasyon	731.99 µg/ml	958.16 µg/ml	328.66 µg/ml
	Kontrol		
Saflık	2.016		
Konsantrasyon	580.34 µg/ml		

Çizelge 3. 5. LNCaP hücresi için belirlenen dozlar ve kontrol örnekleri için RNA İzolasyon Sonrası spektrofotometre ile saflık ve konsantrasyon olçumu.

LNCaP	**Beva D1**	**Beva D2**	**Beva D3**
Saflık	2.020	2.068	2.094
Konsantrasyon	781.40 µg/ml	1141.7 µg/ml	839.46 µg/ml
	Axa D1	**Axa D2**	**Axa D3**
Saflık	2.057	2.006	2.069
Konsantrasyon	1175.2 µg/ml	1146.9 µg/ml	1122.2µg/ml
	VEGF D1	**VEGF D2**	**VEGF D3**
Saflık	2.098	1.998	2.010
Konsantrasyon	1311.9 µg/ml	1369.5 µg/ml	1437.6 µg/ml
	Kontrol		
Saflık	1.968		
Konsantrasyon	942.4 µg/ml		

3.3. Bevacizumab, Axitinib ve VEGF' nin Tümör Hücrelerinde İmmünosupresif Genlerin İfadeleri Üzerindeki Etkileri

Hücrelerdeki gen ifade değişimleri gözlemek için referans gen olarak insan β-aktin geni kullanıldı. Olçum metodu olarak ΔΔCt metodu (yaklaşım metodu) kullanıldı. Bu tez çalışmasında in vitro canlılık deneyi için antianjiogenik ilaçlar (bevacizumab ve axitinib) ve anjiogenik faktörü (VEGF) için belirlenen 3 farklı dozlarının NOS-3, TGF-B, IDO, IL-17, IL-10, ve IL-6 genlerinin ifadeleri üzerindeki etkileri incelendi. Gen ifade değişimleri Çizelge 3.6- 3.8 ve Şekil 3.4 – 3.14`de gösterilmiştir. Bevacizumab ve axitinib içinde hücre canlılığında kontrole göre %0 ve ±%10 değişiklik yapan 2 farklı doz ve insanda kullanılan ortalama doza karşılık gelecek bir doz da gen ifade çalışmaları için seçildi. VEGF proteini için de literatürde kullanılan farklı dozlara karşılık gelecek şekilde 100 ng/µl, 50 ng/µl ve 10 ng/µl olmak üzere üç farklı doz seçildi (Çizelge 2.1).

Çizelge 3. 6. MCF-7 hücrelerinde Beva, Axa ve VEGF uygulaması sonrası ΔΔCt metodu ile kontrol gruplarına göre gen ifade düzeyleri (ortalama ± standart hata).

MCF-7	DOZ	NOS-3	TGF-B	IDO	IL-17	IL-10	IL-6
Beva	D1	0.06 ± 0.01 *	1.41 ±0.42	3.88 ± 0.27 *	-	-	-
	D2	0.01 ± 0.00 *	2.84 ± 0.34 *	0.13 ± 0.01 *	-	0.07 ± 0.00 *	-
	D3	0.04 ± 0.01 *	1.42 ± 0.51	-	-	-	-
Axa	D1	0.003 ± 0.0 *	3.16 ± 0.14 *	-	-	-	-
	D2	0.004 ± 0.0 *	2.45 ±0.10 *	0.18 ± 0.01 *	-	-	-
	D3	0.003 ± 0.0 *	2.33 ± 0.16 *	-	0.11 ± 0.00 *	-	-
VEGF	D1	0.001 ± 0.0 *	2.75 ± 0.73 *	0.05 ± 0.00	-	-	-
	D2	0.002 ± 0.0 *	1.92 ± 0.25	-	-	-	-
	D3	0.001 ± 0.0 *	2.83 ± 0.35 *	0.12 ± 0.01	-	-	-

* $p<0.05$.

Çizelge 3. 7. HT-29 hücrelerinde Beva, Axa ve VEGF uygulaması sonrası ΔΔCt metodu ile kontrol gruplarına göre gen ifade düzeyleri (ortalama ± standart hata).

HT-29	DOZ	NOS-3	TGF-B	IDO	IL-17	IL-10	IL-6
Beva	D1	5.38 ± 0.84	0.9 ± 0.14	-	-	-	-
	D2	13.9 ± 0.82 *	2.22 ± 0.22 *	-	-	-	-
	D3	2.16 ± 0.32	1.99 ± 0.2 *	-	-	-	-
Axa	D1	10.1 ± 1.18 *	0.82 ± 0.11	-	-	-	-
	D2	13.3 ± 2.27 *	1.9 ± 0.28 *	-	-	-	-
	D3	9. 39 ± 0.6 *	3.2 ± 0.71 *	-	-	-	-
VEGF	D1	15.3 ± 0.96 *	1.21 ± 0.04	-	-	-	-
	D2	18.1 ± 3.31 *	1.23 ± 0.12	40.4 ± 0.56	-	-	-
	D3	23.7 ± 3.1 *	1.81 ± 0.3	-	-	-	-

* $p<0.05$.

Çizelge 3. 8. LNCaP hücrelerinde Beva, Axa ve VEGF uygulaması sonrası ΔΔCt metodu ile kontrol gruplarına göre gen ifade düzeyleri (ortalama ± standart hata).

LNCaP	DOZ	NOS-3	TGF-B	IDO	IL-17	IL-10	IL-6
Beva	D1	1.28 ± 0.1 *	1.45 ± 0.43	2.04 ± 0.07 *	-	-	-
	D2	0.58 ± 0.04 *	-	0.74 ± 0.2	-	-	-
	D3	0.98 ± 0.00	-	0.73 ± 0.08	-	-	-
Axa	D1	0.56 ± 0.02 *	-	0.68 ± 0.02	-	-	-
	D2	0.18 ± 0.02 *	-	0.5 ± 0.17 *	-	-	-
	D3	0.42 ± 0.01 *	-	0.34 ± 0.01 *	-	-	-
VEGF	D1	0.46 ± 0.06 *	0.25 ± 0.02 *	0.59 ± 0.02 *	-	-	-
	D2	0.37 ± 0.02 *	0.28 ± 0.03 *	0.52 ± 0.02 *	-	-	-
	D3	0.25 ± 0.03 *	3.96 ± 0.11 *	1.29 ± 0.04	-	-	-

* $p<0.05$.

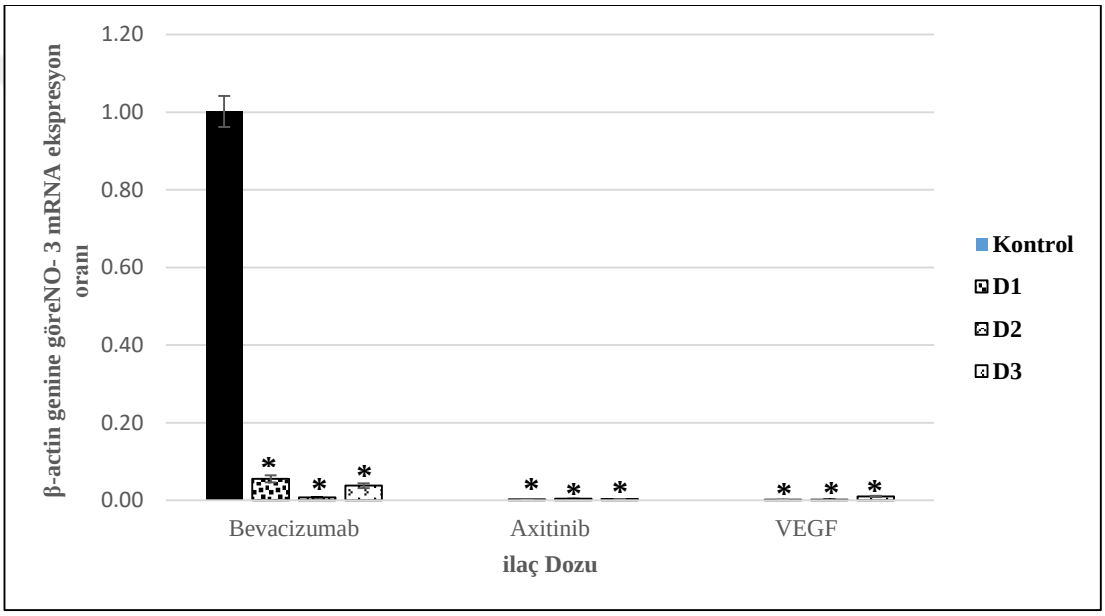
3.3.1. NOS-3 Gen İfadesi

Değişik dozlarda anti-anjiogenez ilaçlar ve anjiyogenik faktör olan VEGF uygulanmış MCF-7, HT-29 ve LNCaP hücrelerindeki NOS-3 gen ifade değişimleri Çizelge 3.6-3.8 ve Şekil 3.4 - 3.6'da gösterilmiştir.

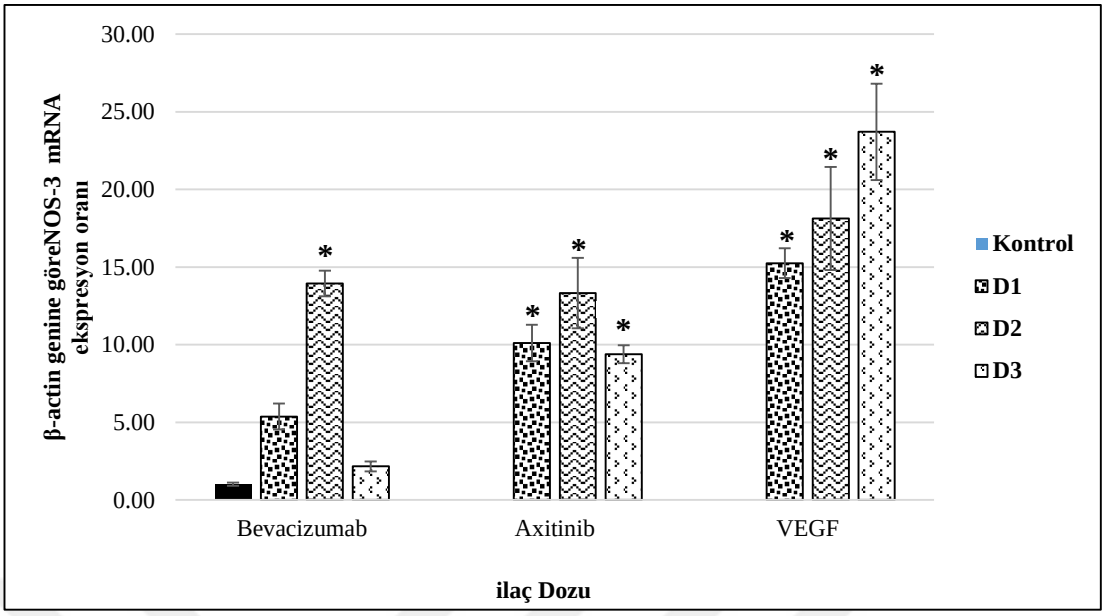
MCF-7 hücrelerinde, NOS-3 gen ifadesinde, bevacizumab, axitinib ve VEGF uygulanmış tüm dozlarda kontrole göre anlamlı düşüş gözlemlendi ($p<0,005$) (Çizelge 3.6 ve Şekil 3.4).

HT-29 hücrelerinde, NOS-3 gen ifadesinde, bevacizumabın D2. dozu, axitinibin D3 dozu ve VEGF`nin 3 dozunda da kontrole göre anlamlı artış gözlemlenmiştir ($p<0,005$) (Çizelge 3.7 ve Şekil 3.5).

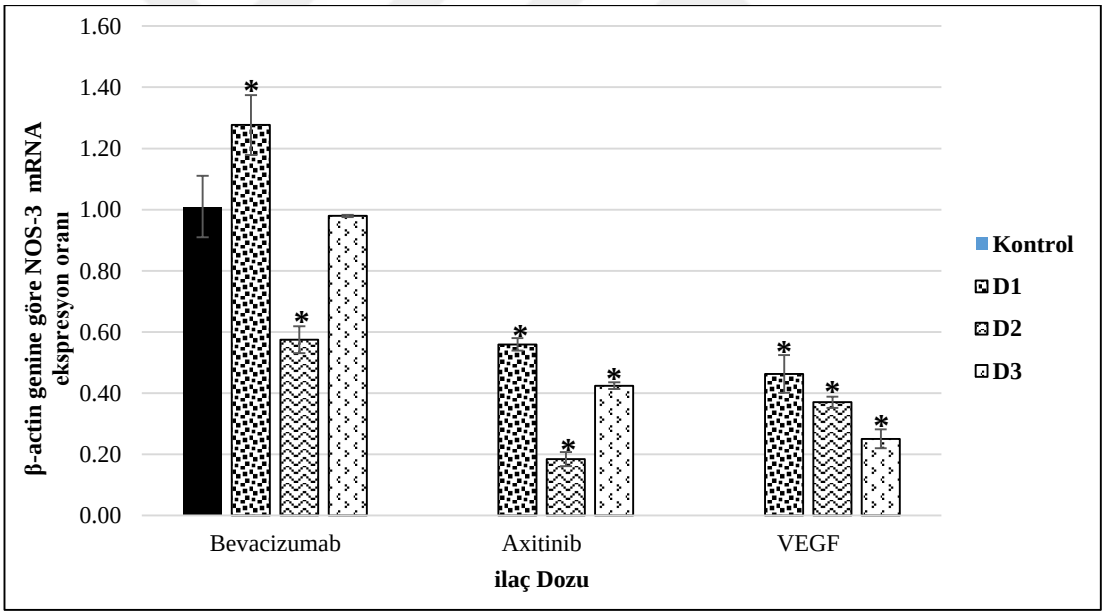
LNCaP hücrelerinde, NOS-3 gen ifadesinde, bevacizumab D1. dozunda kontrole göre anlamlı artış görülmüştür ($p<0,005$). Fakat bevacizumab 2. dozunda, axitinibin 3. dozunda ve VEGF`nin her 3 dozunda da kontrole göre NOS-3 gen ifadesinde anlamlı düşüş görülmüştür ($p<0,005$) (Çizelge 3.8. ve Şekil 3.6.). Uygulanan diğer ilaç ve protein dozlarında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.



Şekil 3. 4. MCF-7 hücrelerinde bevacizumab ve axitinib ilaç ve VEGF protein uygulaması sonrası NOS-3 gen ifade düzeyleri.



Şekil 3. 5. HT-29 hücrelerinde bevacizumab ve axitinib ilaç ve VEGF protein uygulaması sonrası NOS-3 gen ifade düzeyleri



Şekil 3. 6. LNCaP **hücrelerinde bevacizumab** ve **axitinib ilaç** ve VE**GF protein uygulaması sonrası NOS-3 gen ifade düzeyleri**

3.3.2. TGF-beta Gen İfadesi

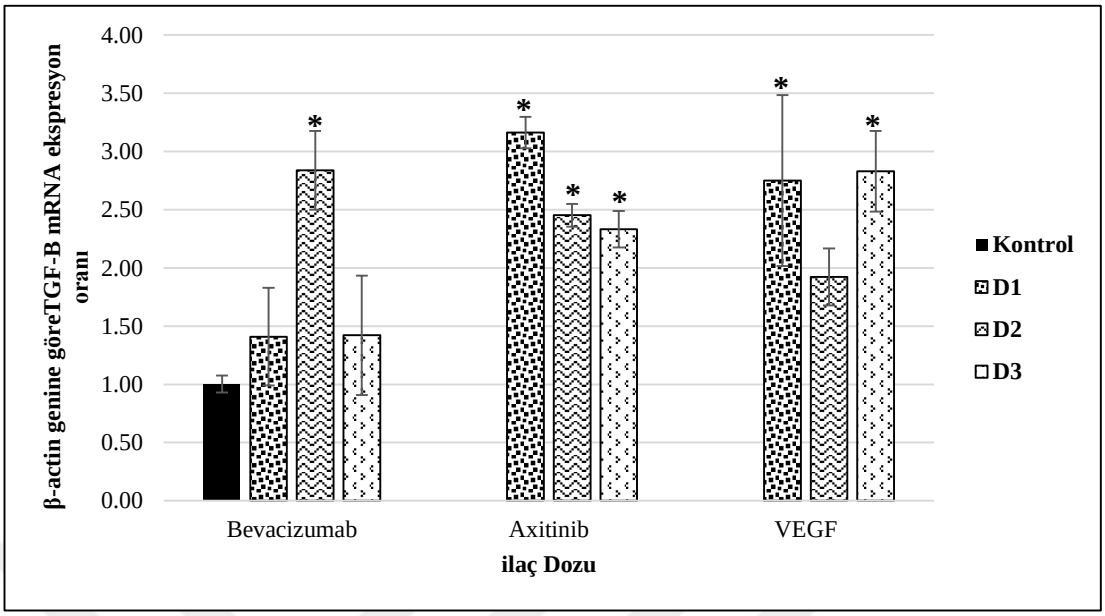
İlaç uygulanmamış kontrol ve değişik dozlarda anti-anjiyogenez ilaçları ve anjiyogenik faktör olan VEGF uygulanmış MCF-7, HT-29 ve LNCaP hücrelerindeki TGF-beta gen ifade değişimleri Çizelge 3.6.-3.8. ve Şekil 3.7. - 3.9.'da gösterilmiştir.

MCF-7 hücrelerinde, TGF-b gen ifadesinde, bevacizumab D2, axitinib tüm dozlar ve VEGF D1 Ve D2 dozlarında kontrole göre anlamlı artış gözlemlendi ($p<0,005$) (Çizelge 3.6. ve Şekil 3.7.).

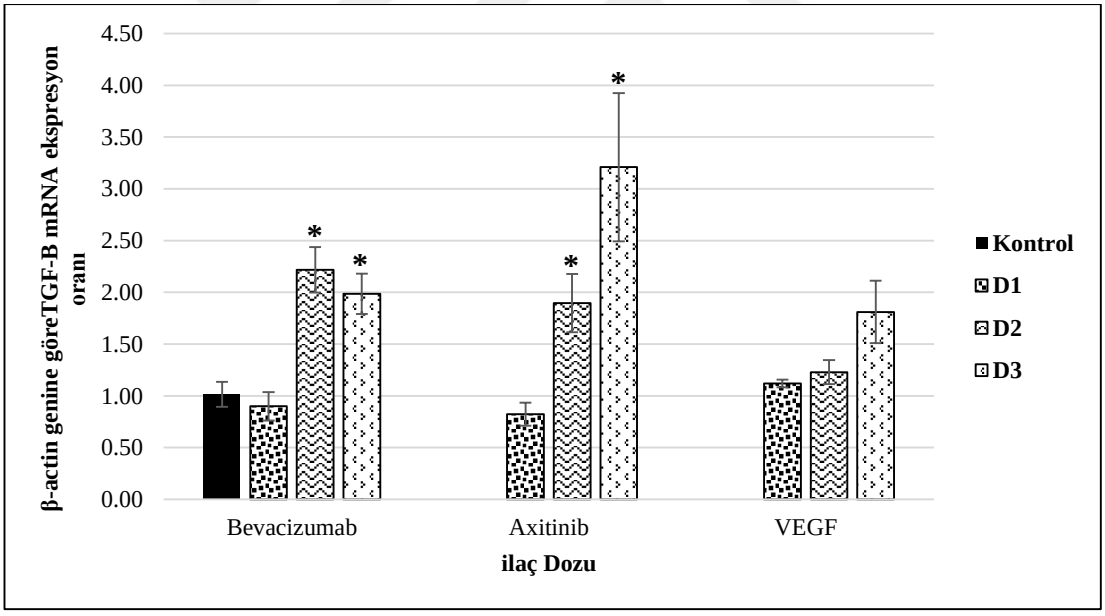
HT-29 hücrelerinde, TGF-b gen ifadesinde, bevacizumab D2 ve D3 ve axitinibde aynı şekilde 2. ve 3. dozlarında kontrole göre anlamlı artış gözlemlendi ($p<0,005$) (Çizelge 3.7. ve Şekil 3.8.).

LNCaP hücrelerinde, TGF-b gen ifadesinde, VEGF D1 ve D2 de kontrole göre anlamlı düşüş oluşmuşken, VEGF D3 dede kontrole göre anlamlı artış gözlemlendi ($p<0,005$) (Çizelge 3.8. ve Şekil 3.9). Uygulanan diğer ilaç ve protein dozlarında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

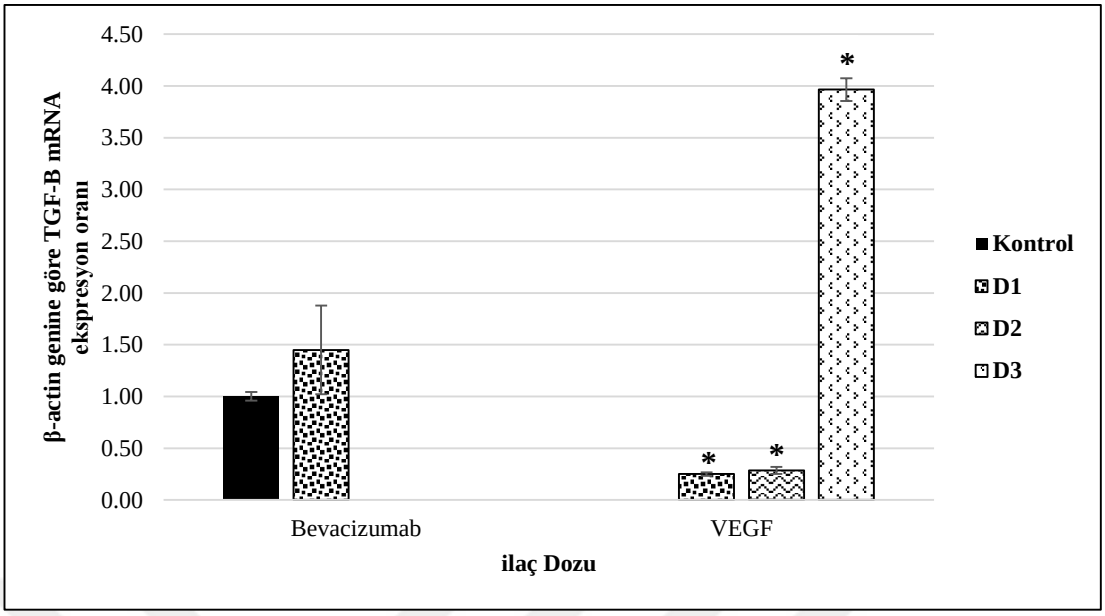
.



Şekil 3. 7. MCF-7 hücrelerinde bevacizumab ve **axitinib ilaç** ve VE**GF protein uygulaması sonrası TGF-b gen ifade düzeyleri.**



Şekil 3. 8. HT-29 hücrelerinde bevacizumab ve axitinib ilaç ve VEGF protein uygulaması sonrası TGF-b gen ifade düzeyleri.



Şekil 3. 9. LNCaP hücrelerinde bevacizumab ve axitinib ilaç ve VEGF protein uygulaması sonrası TGF-b gen ifade düzeyleri.

3.3.3. IDO Gen İfadesi

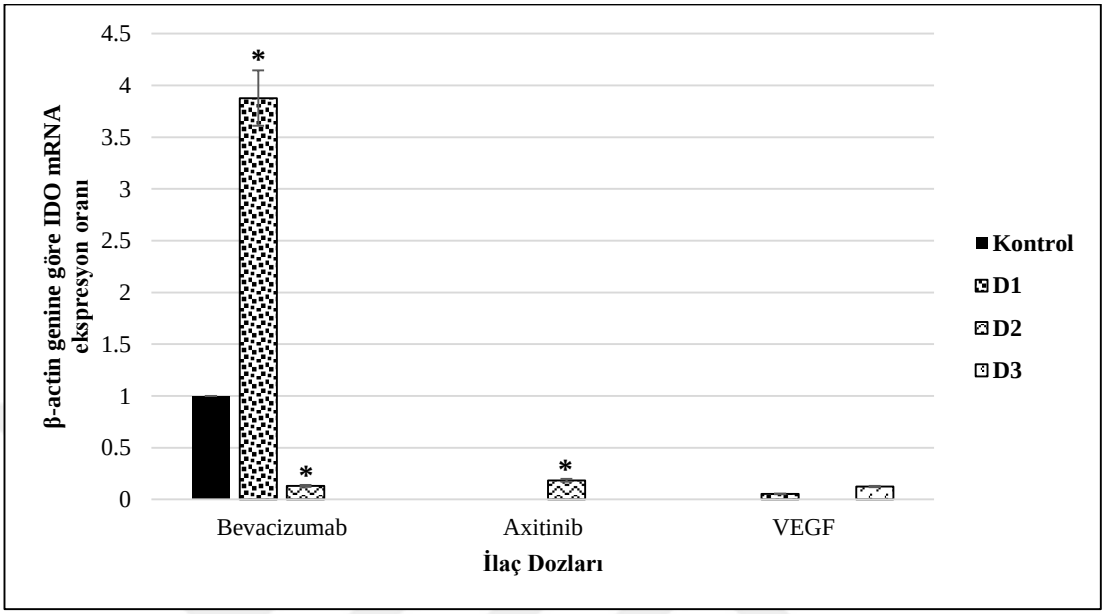
İlaç uygulanmamış kontrol ve değişik dozlarda anti-anjiyogenez ilaçları anjiyogenik faktör olan VEGF uygulanmış MCF-7, HT-29 ve LNCaP hücrelerindeki IDO gen ifade değişimleri Çizelge 3.6-3.8 ve Şekil 3.10 - 3.12'da gösterilmiştir.

MCF-7 hücrelerinde, IDO gen ifade düzeyinde, bevacizumab 2. dozu ve axitinib 2. dozunda kontrole göre anlamlı düşüş gözlemlenmiştir ($p<0,005$) (Çizelge 3.6 ve Şekil 3.10). Uygulanan diğer ilaç ve protein dozlarında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

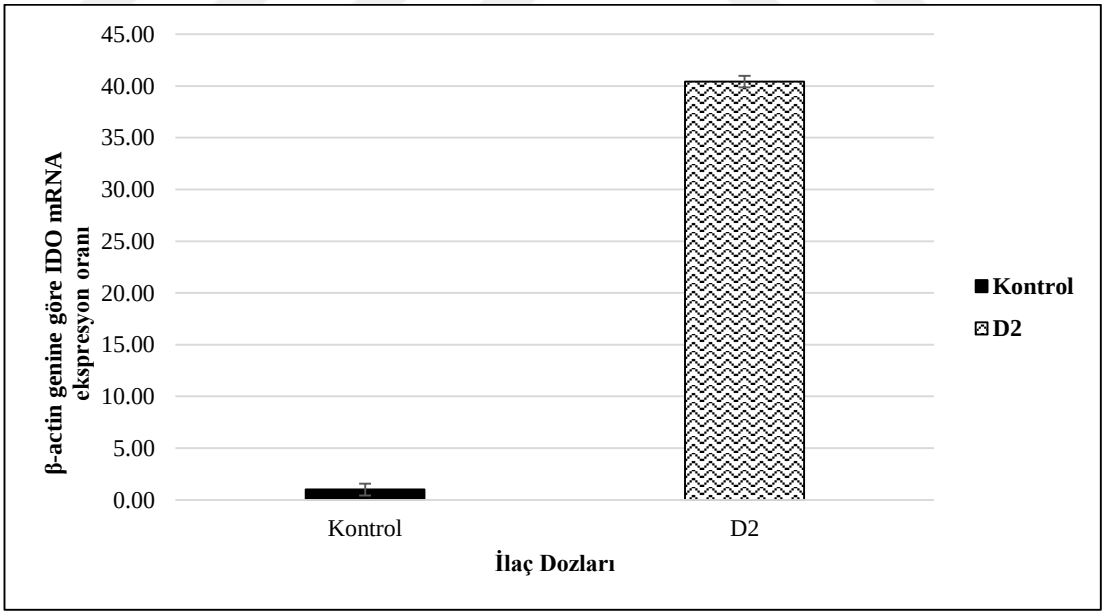
HT-29 hücrelerinde, IDO gen ifade düzeyinde, uygulanan İlaçlar ve protein sonucunda oluşan anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Çizelge 3.7 ve Şekil 3.11).

LNCaP hücrelerinde, İDO gen ifade seviyesinde, uygulanan bevacizumab D1`de kontrole göre anlamlı bir artış oluşmuş ($p<0,005$). Fakat axitinib D2, D3 ve VEGF D1,

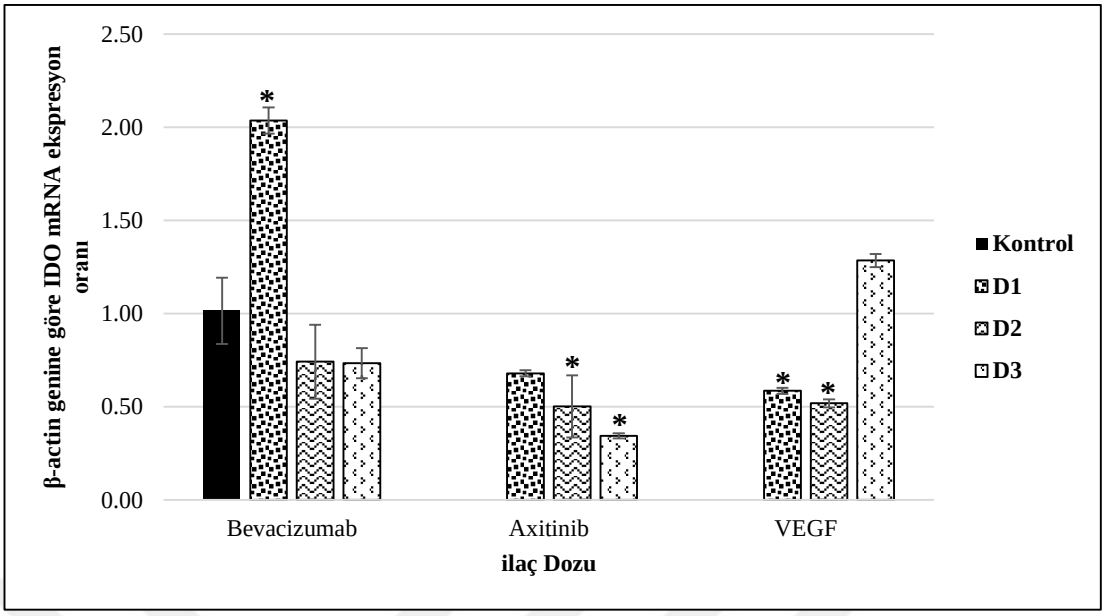
D2 de kontrole göre anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir ($p<0,005$) (Çizelge 3.8 ve Şekil 3.12). Uygulanan diğer ilaç ve protein dozlarında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.



Şekil 3. 10. Şekil 3.10. MCF-7 hücrelerinde bevacizumab ve axitinib ilaç ve VEGF protein uygulaması sonrası IDO gen ifade düzeyleri.



Şekil 3. 11. HT-29 hücrelerinde bevacizumab ve axitinib ilaç ve VEGF protein uygulaması sonrası IDO gen ifade düzeyleri.



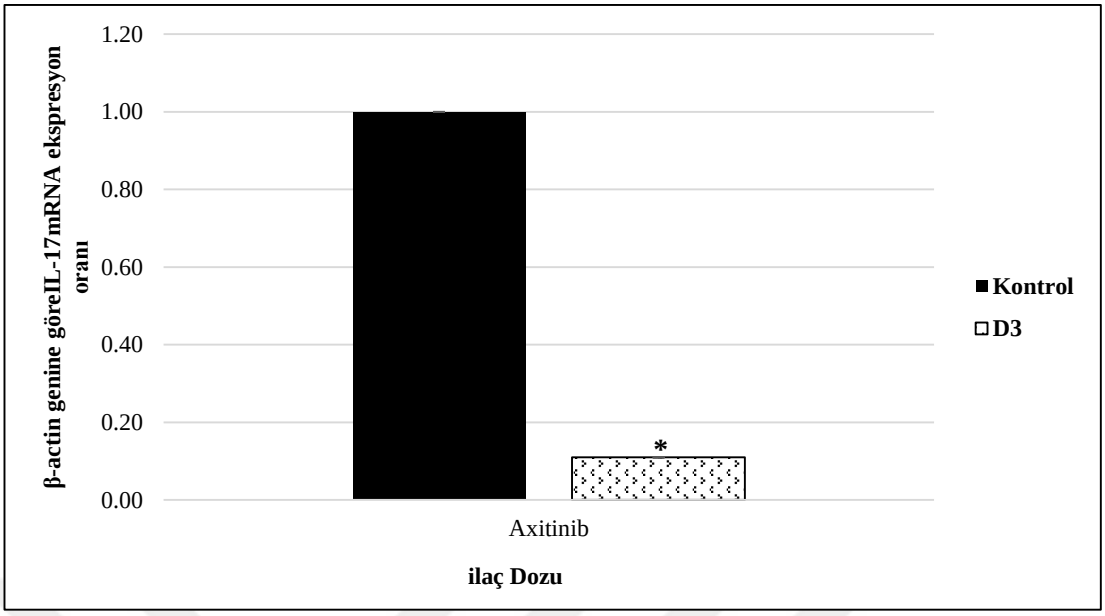
Şekil 3. 12. LNCaP hücrelerinde bevacizumab ve axitinib ilaç ve VEGF protein uygulaması sonrası IDO gen ifade düzeyi.

3.3.4. IL-17 Gen İfadesi

İlaç uygulanmamış kontrol ve anjiyogenez faktörü olan VEGF`nin D3 dozu uygulanmış MCF-7 hücresindeki IL-17 gen ifade değişimleri Çizelge 3.6. ve Şekil 3.13.`de gösterilmiştir.

MCF-7 hücrelerinde, IL-17 gen ifade düzeyinde, axitinib D3 uygulanması devamında kontrole kıyasla anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir ($p<0,005$) (Çizelge 3.6 ve Şekil 3.13). MCF-7`nin uygulanan diğer ilaç ve protein dozlarında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

IL-17 için LNCaP ve HT-29 hücrelerinde bir ifade gözlenmemiştir.



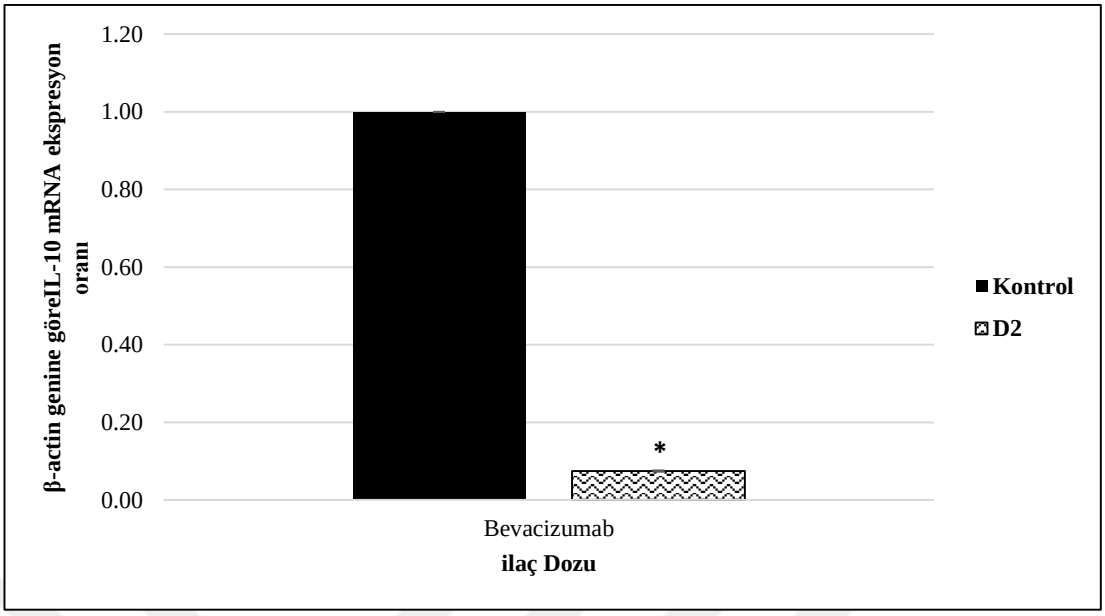
Şekil 3. 13. MCF-7 hücrelerinde bevacizumab ve axitinib ilaç ve VEGF protein uygulaması sonrası IL-17 gen ifade düzeyi.

3.3.5. IL-10 Gen İfadesi

İlaç uygulanmamış kontrol ve bevacizumabın 2. dozu uygulanmış MCF-7 hücresindeki IL-10 gen ifade değişimleri Şekil 3.14`de gösterilmiştir.

MCF-7 hücrelerinde, IL-10 gen ifade düzeyinde, bevacizumab D2 uygulanması devamında kontrole kıyasla anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir ($p<0,005$) (Çizelge 3.6 ve Şekil 3.14). MCF-7`nin uygulanan diğer ilaç ve protein dozlarında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

IL-10 için LNCaP ve HT-29 hücrelerinde bir ifade gözlenmemiştir.



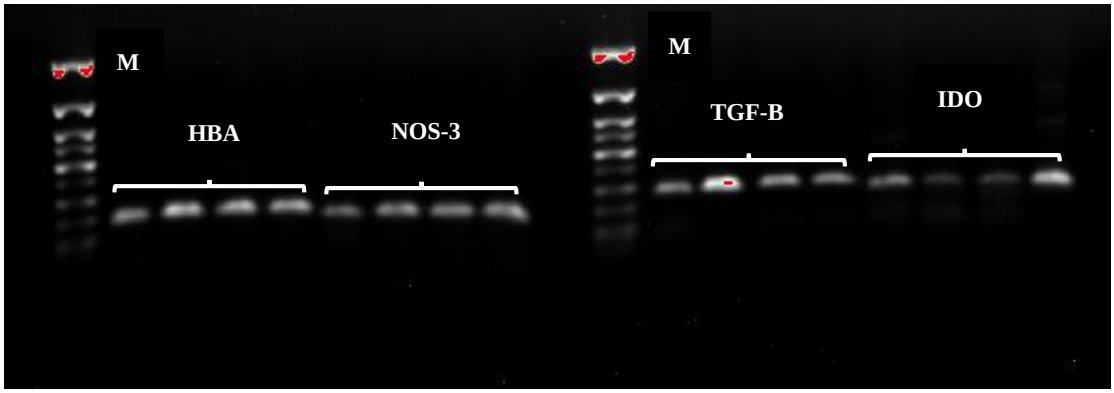
Şekil 3. 14. MCF-7 hücrelerinde bevacizumab ve axitinib ilaç ve VEGF protein uygulaması sonrası IL-10 gen ifade düzeyi.

3.3.6. IL-6 Gen İfadesi

İL-6 için hiçbir hücrede gen ifadesi görülmedi.

3.3.7. EZ-PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü

Kantitatif PZR ile amplifiye edilen ürünler %2'lik agaroz jelde doğrulama amacıyla yürütüldü ve amplifiye olan örneklerin hepsinde amplikon büyüklüğüne uygun bantlar izlendi. Şekil 3.3.1'de amplifiye olan ürünlere ait örnekler görülmektedir.



Şekil 3.3. 1. Eş zamanlı PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez ile kontrolü.

Amplikon büyükleri primer probe tasarlarken belirlenmişti. Agaroz gel elektroforez sonunda elde edilen bant büyüklükleri, yanına yüklenen marker bantları dikkate alınırsa, tasarlanan ürün büyüklüğüne uyduğu için uygundur.

3.4. Bevacizumab, Axitinib ve VEGF'nin Tümör Hücrelerinde İmmünosupresif Protein İfadeleri

Tez çalışmasının bu kısmında yöntem 2.2.3'de anlatıldığı gibi hazırlanan hücre vasatlarının NO, TGF-b, IDO, IL-17, IL-10 ve IL-6 sitokin düzeylerini belirlemek için ELİZA yöntemi kullanıldı. Hücre vasatlarındaki sitokin konsantrasyonları, her proteinin kendi standartları ile kalibrasyon eğrisi oluşturularak hesaplanmıştır. Sitokin konsantrasyonları Şekil 3.15 – 3.32 ve Çizelge 3.9 – 3.11'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 9. MCF-7 hücrelerinde Beva, Axa ve VEGF uygulaması sonrası NO ve sitokin düzeyleri (ortalama ± standart hata)

MCF-7	DOZ	NO (ng/ml)	TGF-B (ng/ml)	IDO (ng/ml)	IL-17 (ng/ml)	IL-10 (ng/ml)	IL-6
Beva	Kontrol	0.94 ± 0.05	23 ± 0.2	37.1 ± 2.11	127 ±8.76	506 ± 52.6	169 ± 2.97
	D1	0.86 ± 0.05	22.7 ± 0.11	38.3 ± 0.28	144 ± 18.4	458 ± 1.13	13 ± 0.41*
	D2	1.1 ± 0.11 *	24.2 ± 0.37	38.8 ± 2.15	133 ± 6.24	405 ± 27.4	182 ± 2.19
	D3	0.88 ± 0.01	21.3 ± 0.43	33.9 ± 1.3	127 ± 5.5	393 ± 9.13	25 ± 7.96 *
Axa	Kontrol	0.94 ± 0.05	23 ± 0.2	37.1 ± 2.11	127 ±8.76	506 ± 52.6	169 ± 2.97
	D1	0.98 ± 0.02	23.4 ± 0.55	35.7 ± 0.37	128 ± 7.06	546 ± 28.7	187 ± 3.37
	D2	0.94 ± 0.06	24.4 ± 0.96	36.8 ± 1.57	134 ± 7.33	428 ± 11.3	186 ± 4.42
	D3	0.95 ± 0.02	22.5 ± 0.03	35.9 ± 0.76	126 ± 2.85	396 ± 23.2	195 ± 15 *
VEGF	Kontrol	0.94 ± 0.05	23 ± 0.2	37.1 ± 2.11	127 ±8.76	506 ± 52.6	169 ± 2.97
	D1	0.90 ± 0.02	22.2 ± 1.15	34.9 ± 1.83	132 ± 1.52	402 ± 34.6	164 ± 3.03
	D2	0.91 ± 0.01	21.6 ± 0.53	33 ± 0.26 *	128 ± 0.86	489 ± 19.51	171 ± 0.15
	D3	0.96 ± 0.00	21 ± 0.43 *	35.3 ± 0.53	139 ± 18.1	536 ± 95. 3	158 ± 0.62

* $p<0.05$.

Çizelge 3. 10. HT-29 hücrelerinde Beva, Axa ve VEGF uygulaması sonrası NO ve sitokin düzeyleri (ortalama ± standart hata)

HT-29	DOZ	NO (ng/ml)	TGF-B (ng/ml)	IDO (ng/ml)	IL-17 (ng/ml)	IL-10 (ng/ml)	IL-6 (ng/ml)
Beva	Kontrol	0.87 ± 0.09	22.7 ± 1.09	34.9 ± 1.54	137 ± 0.63	409 ± 86.2	159 ± 0.03
	D1	1.02 ± 0.0 *	23.4 ± 1.01	41.2 ± 2.6 *	140 ± 6.31	514 ± 87.6	145 ± 2.52
	D2	0.98 ± 0.03	22.3 ± 1.39	40.6 ± 1.1 *	133 ± 0.79	460 ± 38.4	183 ± 6.62
	D3	0.91 ± 0.04	23.2 ± 1.05	37.7 ± 0.2	125 ± 10.3	383 ± 20.18	197 ± 2.22 *
Axa	Kontrol	0.87 ± 0.09	22.7 ± 1.09	34.9 ± 1.54	137 ± 0.63	409 ± 86.2	159 ± 0.03
	D1	0.96 ± 0.03	20.8 ± 0.8	33.6 ± 1.2	140 ± 0.55	413 ± 23.7	172 ± 1.31
	D2	0.88 ± 0.05	21.2 ± 0.07	35.5 ± 0.8	133 ± 3.6	387 ± 1.59	161 ± 1.64
	D3	0.98 ± 0.07	21.4 ± 1.3	31.2 ± 1.8	125 ± 0.73	362 ± 43.1	159 ± 1.34
VEGF	Kontrol	0.87 ± 0.09	22.7 ± 1.09	34.9 ± 1.54	137 ± 0.63	409 ± 86.2	159 ± 0.03
	D1	0.85 ± 0.06	21.9 ± 0.58	31.4 ± 1.8	136 ± 4.14	354 ± 20.9	167 ± 3.09
	D2	0.94 ± 0.01	21.7 ± 1.01	37.6 ± 1.2	130 ± 13	393 ± 6.29	180 ±0.98
	D3	0.85 ± 0.00	21.1 ± 2.1	33.3 ± 2.4	160 ± 26.9	369 ± 3.71	172 ± 2.04

* $p<0.05$.

Çizelge 3. 11. LNCaP hücrelerinde Beva, Axa ve VEGF uygulaması sonrası NO ve sitokin düzeyleri (ortalama ± standart hat).

LNCaP	DOZ	NO (ng/ml)	TGF-B (ng/ml)	IDO (ng/ml)	IL-17 (ng/ml)	IL-10 (ng/ml)	IL-6 (ng/ml)
Beva	Kontrol	31.1 ± 0.02	26.8 ± 0.14	37.7 ± 1.66	140 ± 12.5	434 ± 25.2	184 ± 0.08
	D1	40.1 ± 8.38	22 ± 0.24 *	34.9 ± 1.54	132 ± 10.3	436 ± 71.4	169 ± 2.13
	D2	39.9 ± 8.49	24.5 ± 2.13	44 ± 0.14 *	129± 7.99	469 ± 9.33	166 ± 3.09
	D3	31.8 ± 0.17	24.6 ± 0.63	40.6 ± 0.35	117± 2.99	506 ± 36.3	172 ± 1.5
Axa	Kontrol	31.1 ± 0.02	26.8 ± 0.14	37.7 ± 1.66	140 ± 12.5	434 ± 25.2	184 ± 0.08
	D1	31.5 ± 0.07	25.6 ± 0.78	37.7 ± 0.43	126 ± 2.89	400 ± 27.5	193 ± 23.5
	D2	39.9 ± 8.54	25.2 ± 0.09	38.9 ± 0.61	135 ± 13.7	451 ± 22.6	179 ± 4.66
	D3	31.6 ± 0.47	24.5 ± 0.85	45 ± 0.98 *	143 ± 6.29	482 ± 14.2	182 ± 0.61
VEGF	Kontrol	31.1 ± 0.02	26.8 ± 0.14	37.7 ± 1.66	140 ± 12.5	434 ± 25.2	184 ± 0.08
	D1	31.4 ± 0.4	24 ± 1.8	35.4 ± 2.49	129 ± 2.75	519 ± 20.6	207 ± 6.32
	D2	31.1 ± 0.36	23.9 ± 0.16	39.2 ± 2.74	132 ± 2.47	420 ± 32.8	0.0 ± 0.01
	D3	31.5 ± 0.04	24.3 ± 0.26	39.0 ± 0.59	136 ± 7.23	517 ± 41.8	0.00 ±0.02

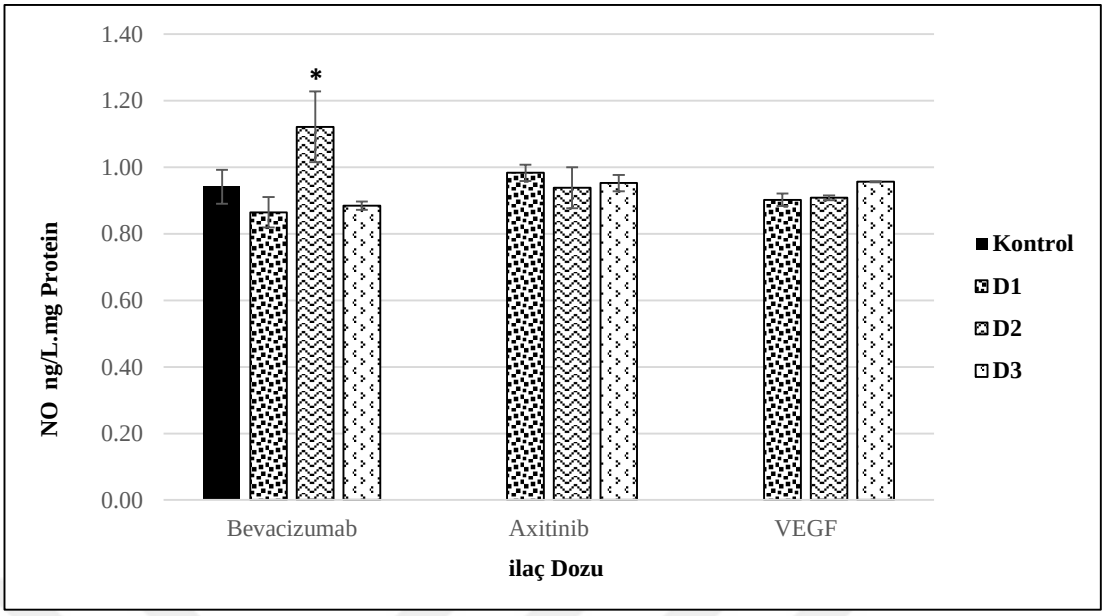
* $p<0.05$.

3.4.1. NO

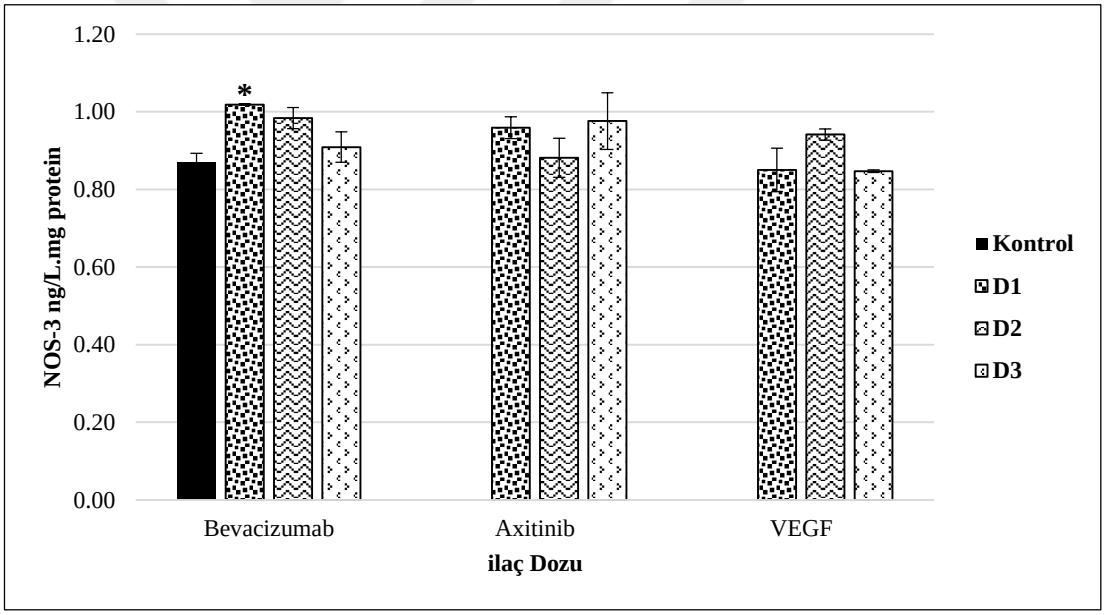
MCF-7 hücrelerinde, NO düzeyinde, bevacizumab D2 dozunda kontrole göre anlamlı bir artış gözlenmektedir ($p<0,005$) (Çizelge 3.9. ve Şekil 3.15.).

HT-29 hücrelerinde, NO düzeyinde, bevacizumab D1 dozunda kontrole göre anlamlı bir artış oluşmuştur ($p<0,005$) (Çizelge 3.10. ve Şekil 3.16.).

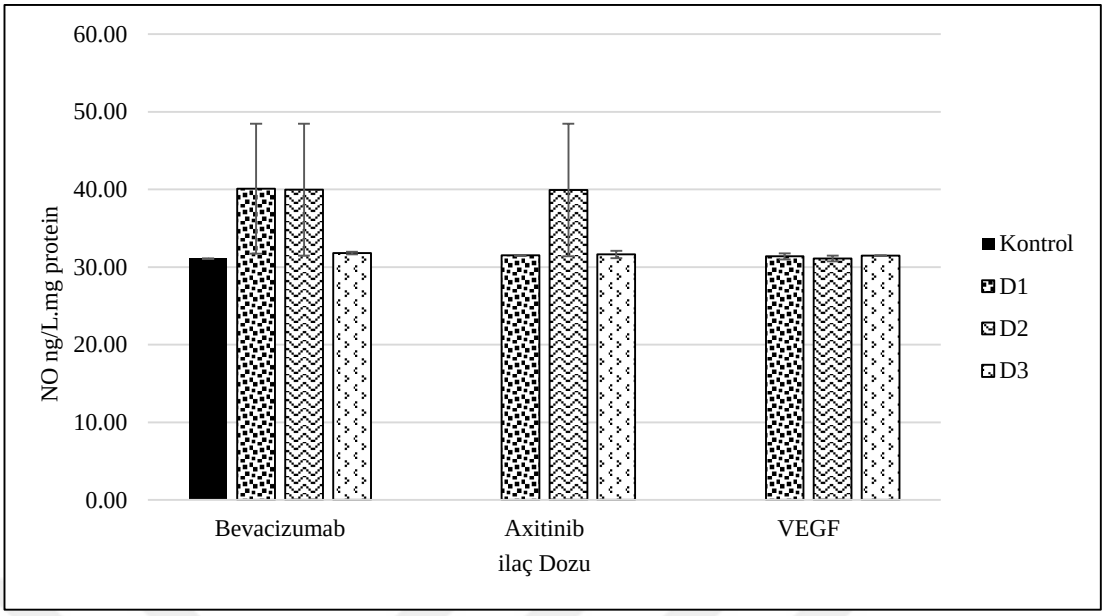
MCF-7, HT-29 hücrelerin diğer anti-anjiogenez ilaç dozları ve anjiogenez faktörü olan VEGF dozlarında, NO düzeyinde, kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca LNCaP hücrelerinde de, NO için, ilaç ve protein dozlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik oluşmamıştır (Çizelge 3.19.-3.11. ve Şekil 3.15.-3.17).



Şekil 3. 15. MCF-7 hücrelerinde bevacizumab ve axitinib ilaç ve VEGF protein dozlarının NO düzeyine etkisi.



Şekil 3. 16. HT-29 hücrelerinde bevacizumab ve axitinib ilaç ve VEGF protein dozlarının NO düzeyine etkisi.



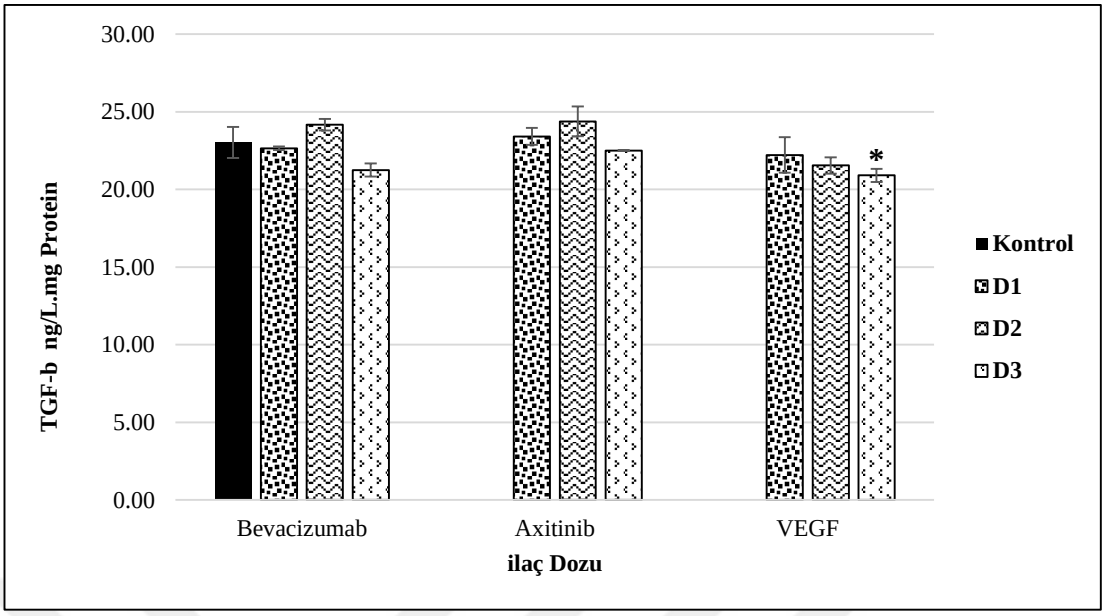
Şekil 3. 17. LNCaP hücrelerinde bevacizumab ve axitinib ilaç ve VEGF protein dozlarının NO düzeyine etkisi.

3.4.2. TGF-B Protein

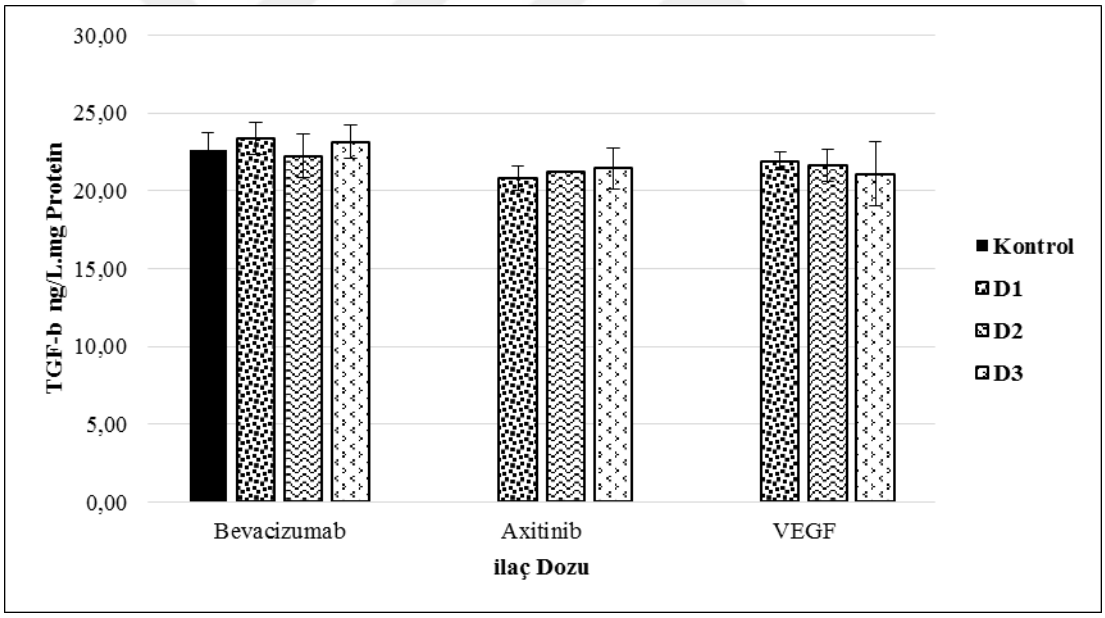
MCF-7 hücrelerinde, TGF-b protein düzeyinde, VEGF protein `in 3. dozunda kontrole göre anlamlı bir düşüş gözlenmektedir ($p<0,005$) (Çizelge 3.9. ve Şekil 3.18.).

LNCaP hücrelerinde, TGF-B protein düzeyinde, bevacizumab ilacının 1. dozunda kontrole göre anlamlı bir artış oluşmuştur ($p<0,005$) (Çizelge 3.11. ve Şekil 3.20.).

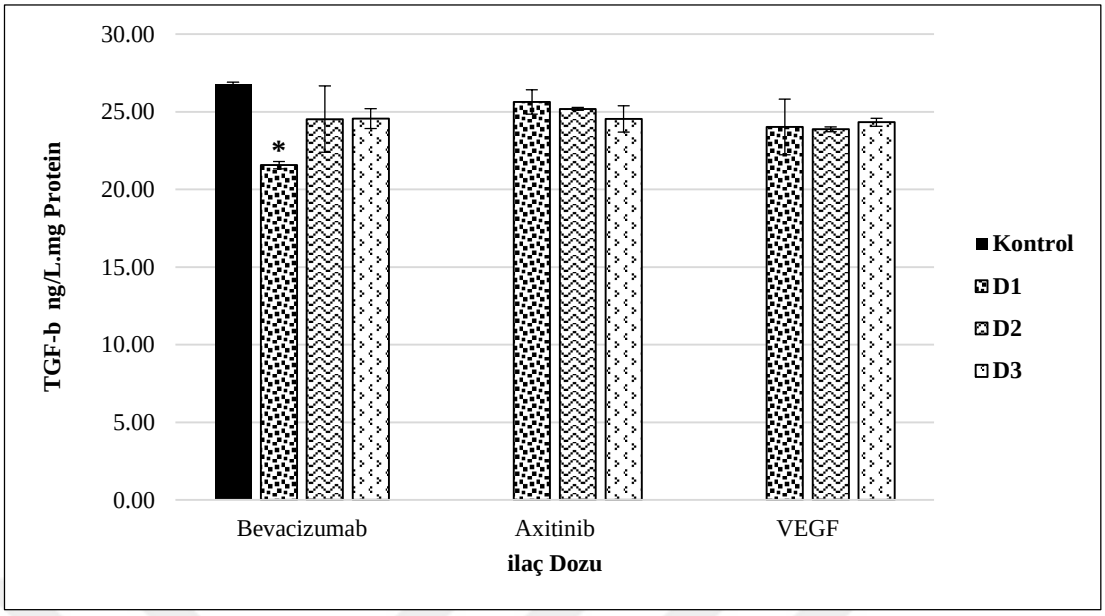
MCF-7, LNCaP hücrelerin diğer anti-anjiyogenez ilaç dozları ve anjiyogenez faktörü olan VEGF dozlarında, TGF-b protein düzeyinde, kontrol gurubuna göre anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca HT-29 hücrelerinde de, TGF-b protein seviyesinde, ilaç ve protein dozlarında kontrol gurubuna karşı anlamlı bir değişiklik oluşmamıştır (Çizelge 3.9.-3.11. ve Şekil 3.18.-3.20.).



Şekil 3. 18. MCF-7 hücrelerinde bevacizumab ve **axitinib ilaç** ve VE**GF protein dozlarının TGF-b protein düzeyine etkisi.**



Şekil 3. 19. HT-29 hücrelerinde bevacizumab ve axitinib ilaç ve VEGF protein dozlarının TGF-b protein düzeyine etkisi



Şekil 3. 20. LNCaP **hücrelerinde bevacizumab** ve VE**GF protein dozlarının TGF-b protein düzeyine etkisi.**

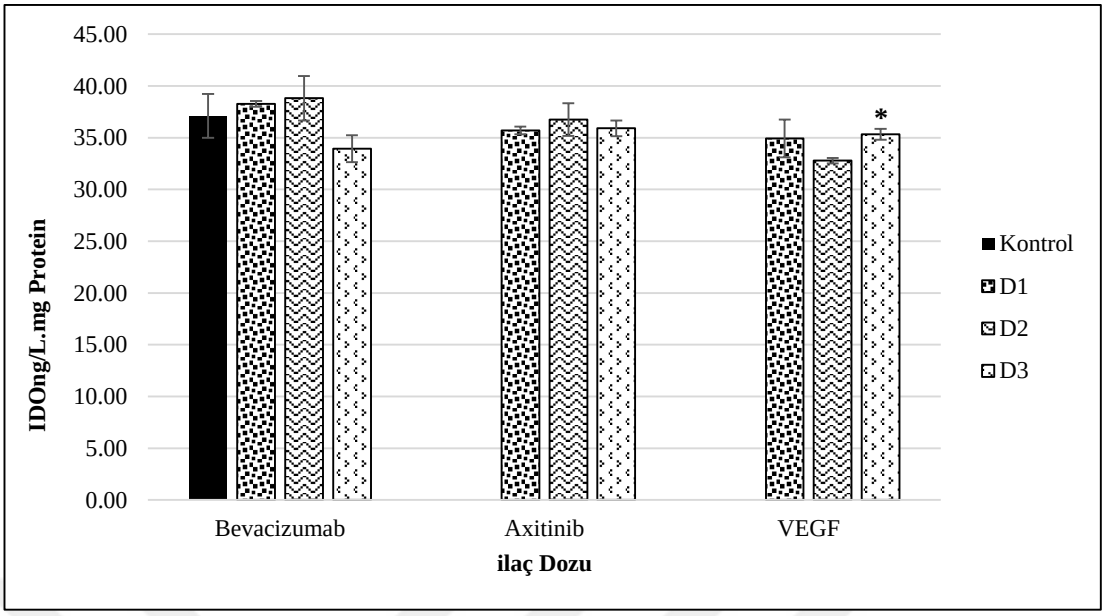
3.4.3. IDO Protein

MCF-7 hücrelerinde, IDO protein düzeyinde, VEGF protein `in 2. dozunda kontrole göre anlamlı bir düşüş oluşmuş ($p<0,005$) (Çizelge 3.9. ve Şekil 3.21.).

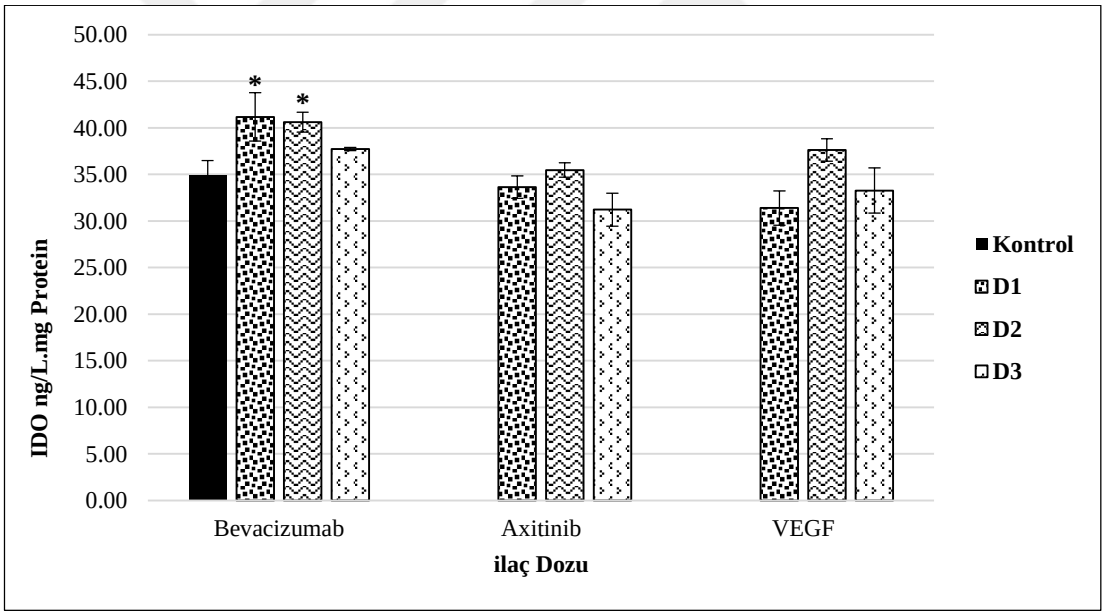
HT-29 hücrelerinde, IDO protein düzeyinde, bevacizumab D1 ve D2 dozlarında kontrole göre anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p<0,005$) (Çizelge 3.10. ve Şekil 3.22.).

LNCaP hücrelerinde, IDO protein düzeyinde, bevacizumab ilacının D2 ve axitinib D3 dozunda kontrole göre anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p<0,005$) (Çizelge 3.11. ve Şekil 3.23.).

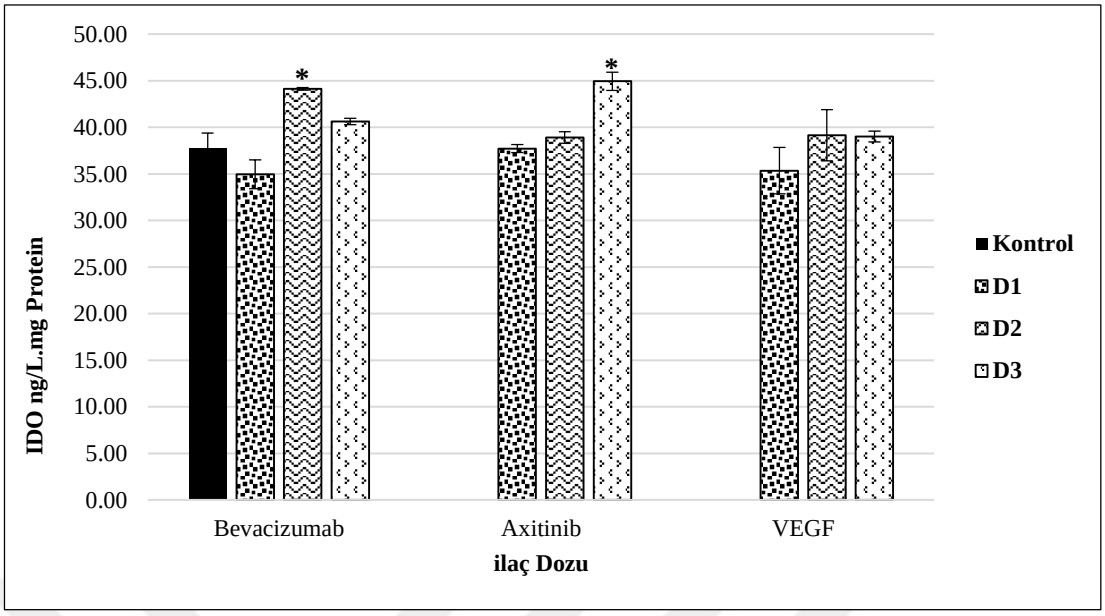
MCF-7, HT-29 ve LNCaP hücrelerin diğer anti-anjiyogenez ilaç dozları ve anjiyogenez faktörü olan VEGF dozlarında, IDO protein seviyesinde, kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Çizelge 3.9.-3.11. ve Şekil 3.21.-3.23.).



Şekil 3. 21. MCF-7 hücrelerinde bevacizumab ve **axitinib ilaç** ve VE**GF protein dozlarının IDO protein düzeyine etkisi.**



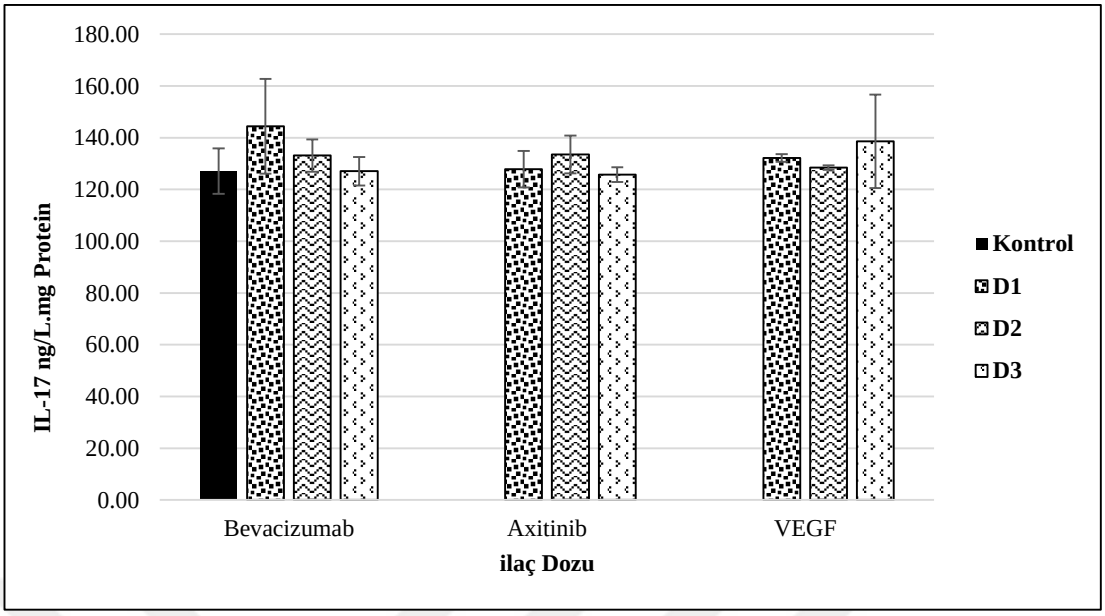
Şekil 3. 22. HT-29 hücrelerinde bevacizumab ve axitinib ilaç ve VEGF protein dozlarının IDO protein düzeyine etkisi.



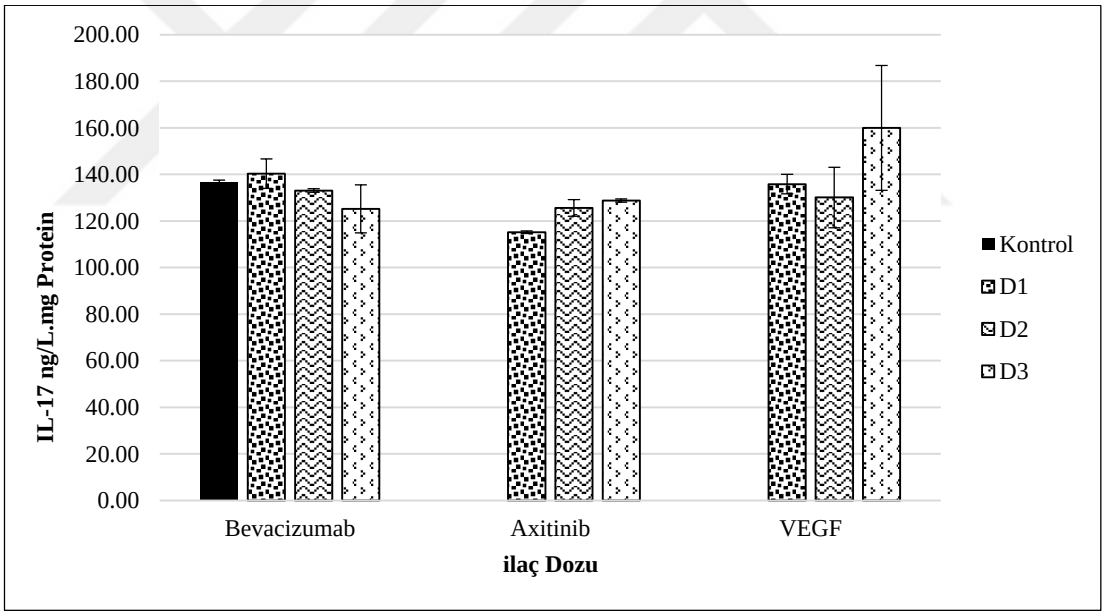
Şekil 3. 23. LNCaP *hücrelerinde bevacizumab* ve *axitinib ilaç* ve VE*GF protein dozlarının IDO protein düzeyine etkisi.*

3.4.4. IL-17 Protein

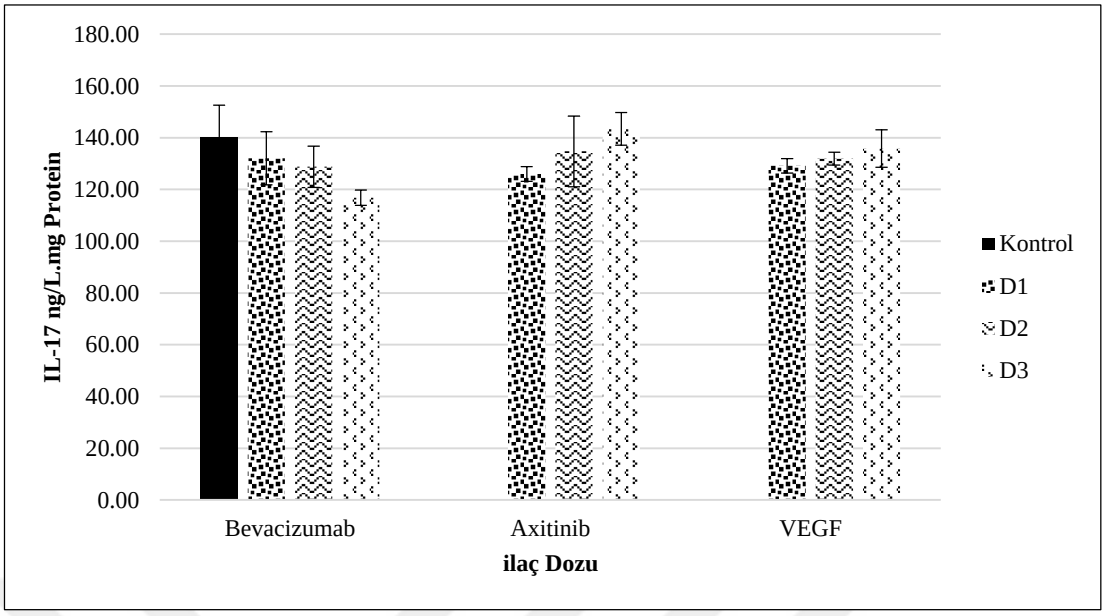
IL-17 protein düzeyinde, MCF-7, HT-29 ve LNCaP hücrelerin hiçbirinde anti-anjiyogenez ilaç dozları ve anjiyogenez faktörü olan VEGF dozları için kontrol gurubuna göre anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Çizelge 3.9.-3.11. ve Şekil 3.24.-3.26).



Şekil 3. 24. MCF-7 hücrelerinde bevacizumab ve axitinib ilaç ve VEGF protein dozlarının IL-17 protein düzeyine etkisi.



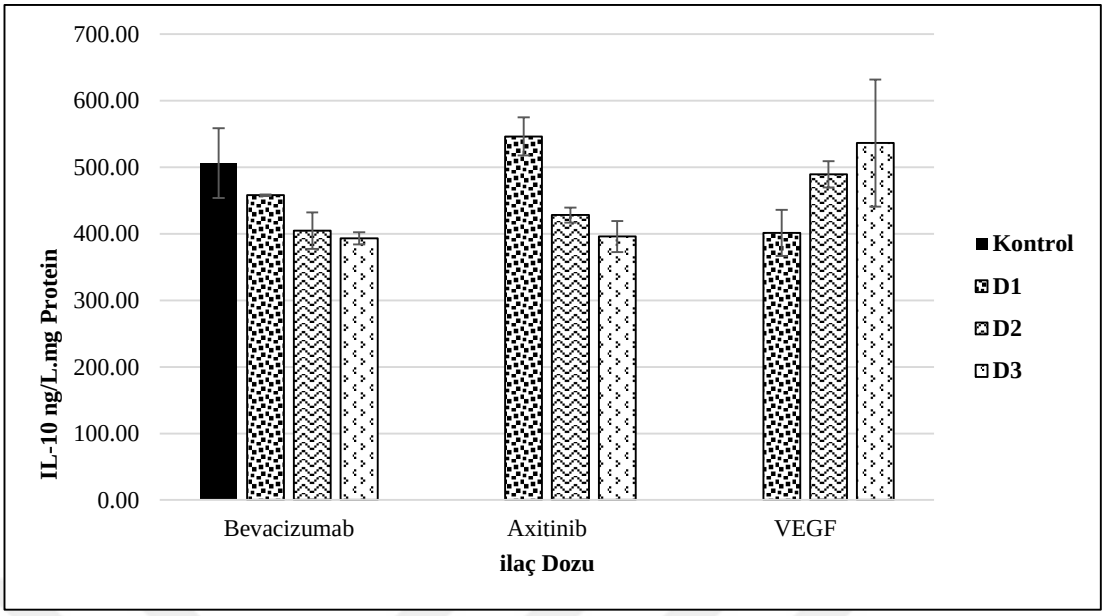
Şekil 3. 25. HT-29 hücrelerinde bevacizumab ve axitinib ilaç ve VEGF protein dozlarının IL-17 protein düzeyine etkisi.



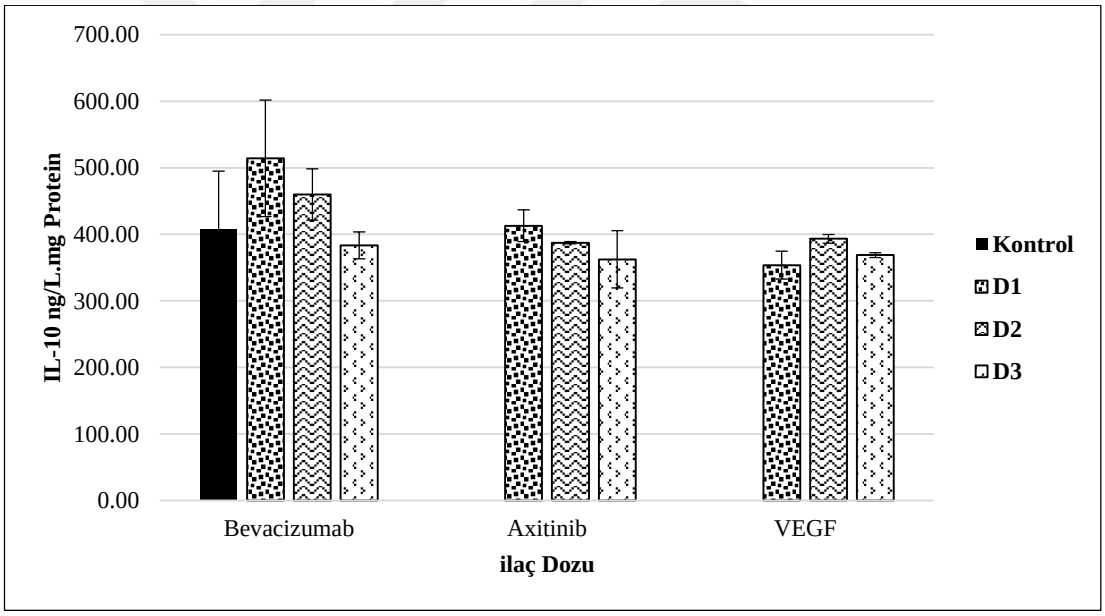
Şekil 3. 26. LNCaP **hücrelerinde bevacizumab** ve **axitinib ilaç** ve VE**GF protein dozlarının IL-17 protein düzeyine etkisi.**

3.4.5. IL-10 Protein

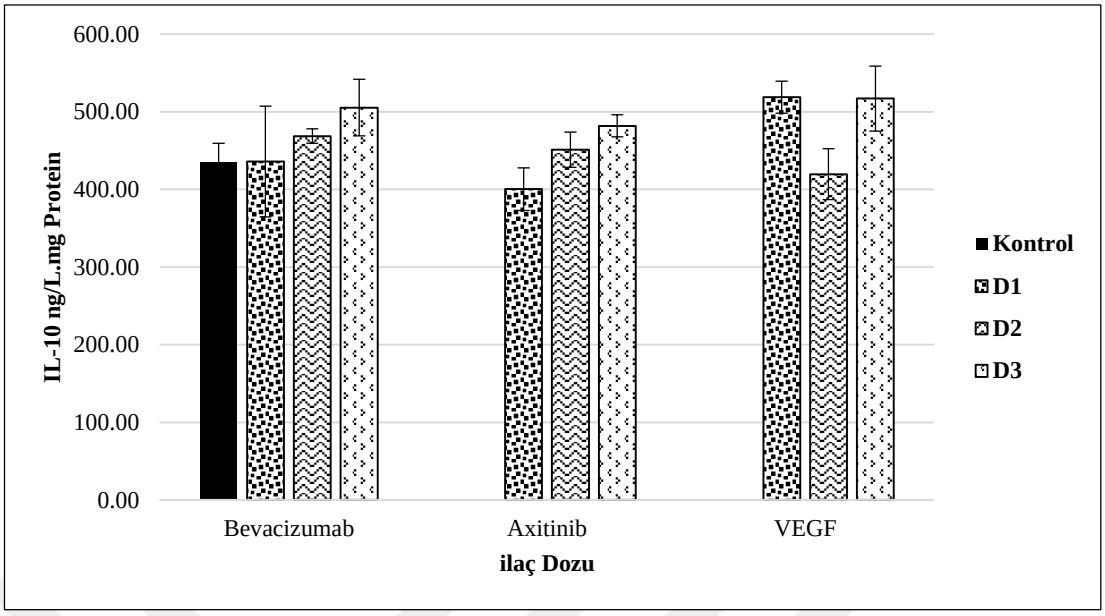
IL-10 protein düzeyinde, MCF-7, HT-29 ve LNCaP hücrelerin hiçbirinde anti-anjiyogenez ilaç dozları ve anjiyogenez faktörü olan VEGF dozları için kontrol gurubuna göre anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Çizelge 3.9.-3.11. ve Şekil 3.27.-3.29).



Şekil 3. 27. MCF-7 hücrelerinde bevacizumab ve axitinib ilaç ve VEGF protein dozlarının IL-10 protein düzeyine etkisi.



Şekil 3. 28. HT-29 Hücrelerinde bevacizumab ve axitinib ilaç ve VEGF protein dozlarının IL-10 protein düzeyine etkisi.



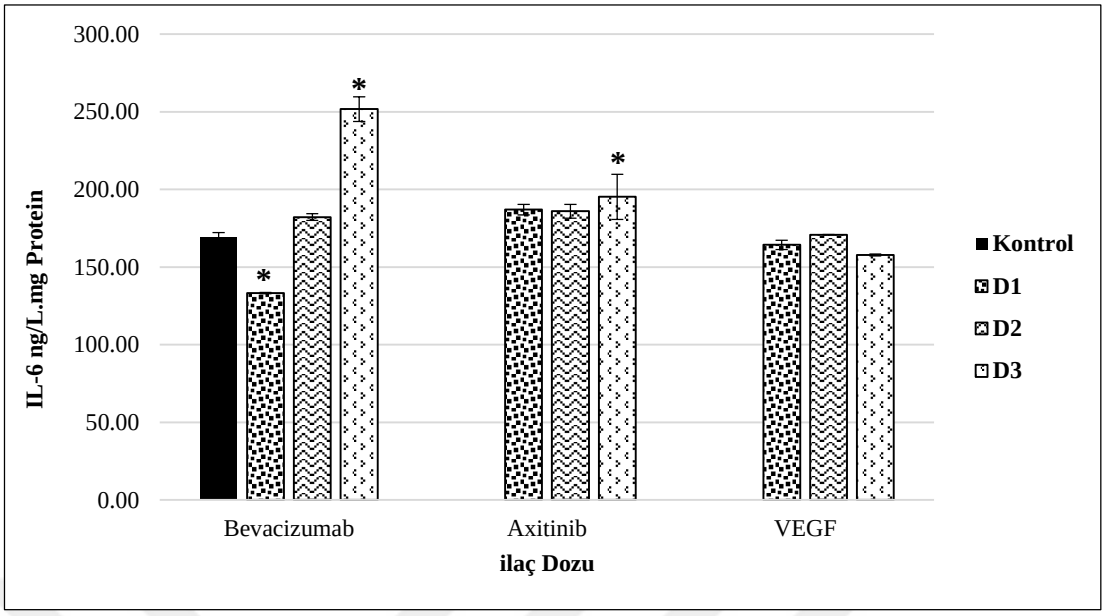
Şekil 3. 29. LNCaP **hücrelerinde bevacizumab** ve **axitinib ilaç** ve VE**GF protein dozlarının IL-10 protein düzeyine etkisi.**

3.4.6. IL-6 Protein

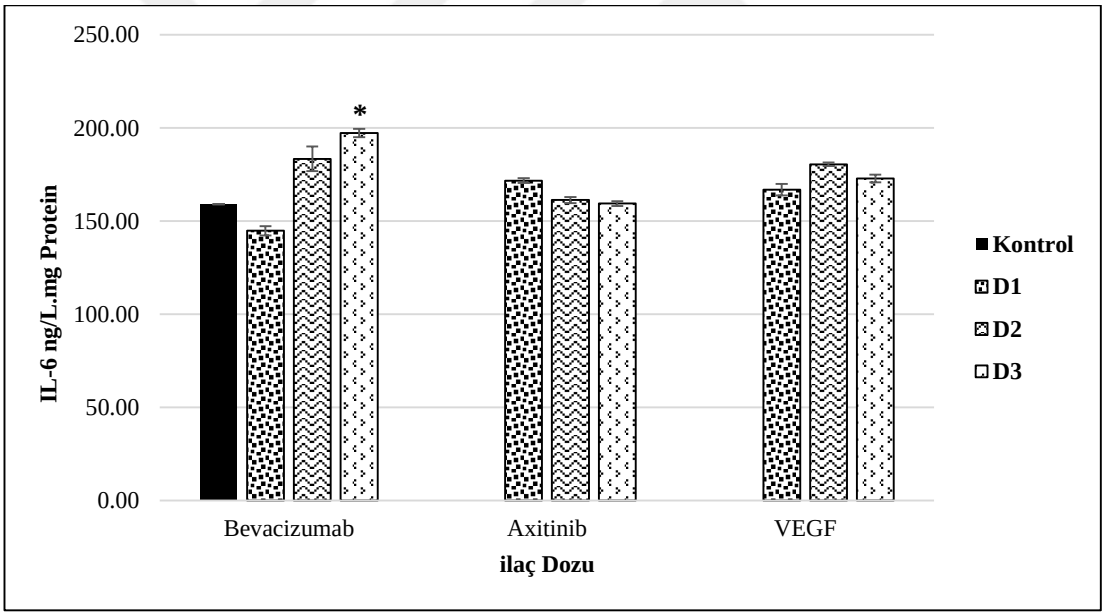
MCF-7 hücrelerinde, IL-6 protein düzeyinde, bevacizumab D1 dozunda kontrole göre anlamlı düşüş gerçekleşmiştir. Ayrıca bevacizumab D2 ve axitinib D3 dozlarında kontrole göre anlamlı bir artış oluşmuştur ($p<0,005$) (Çizelge 3.9. ve Şekil 3.11.).

HT-29 hücrelerinde, IL-6 protein düzeyinde, bevacizumab ilacının 3. dozunda kontrole göre anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p<0,005$) (Çizelge 3.10. ve Şekil 3.28.).

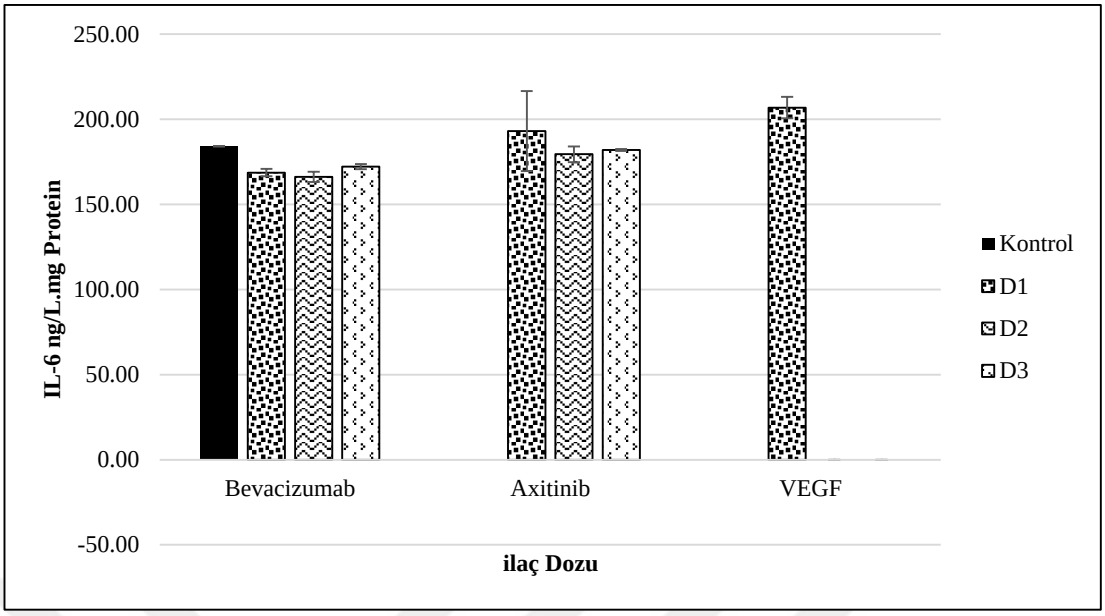
LNCaP hücrelerinde ve MCF-7 ve HT-29`un diğer anti-anjiyogenez ilaç dozları ve anjiyogenez faktörü olan VEGF dozlarında, IL-6 protein seviyesinde, kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Çizelge 3.9.-3.11. ve Şekil 3.30.-3.32).



Şekil 3. 30. MCF-7 hücrelerinde bevacizumab ve axitinib ilaç ve VEGF protein dozlarının IL-6 protein düzeyine etkisi.



Şekil 3. 31. HT-29 hücrelerinde bevacizumab ve axitinib ilaç ve VEGF protein dozlarının IL-6 protein düzeyine etkisi.



Şekil 3. 32. LNCaP **Hücrelerinde bevacizumab** ve **axitinib ilaç** ve VE**GF Protein Dozlarının IL-6 Protein düzeyine Etkisi.**

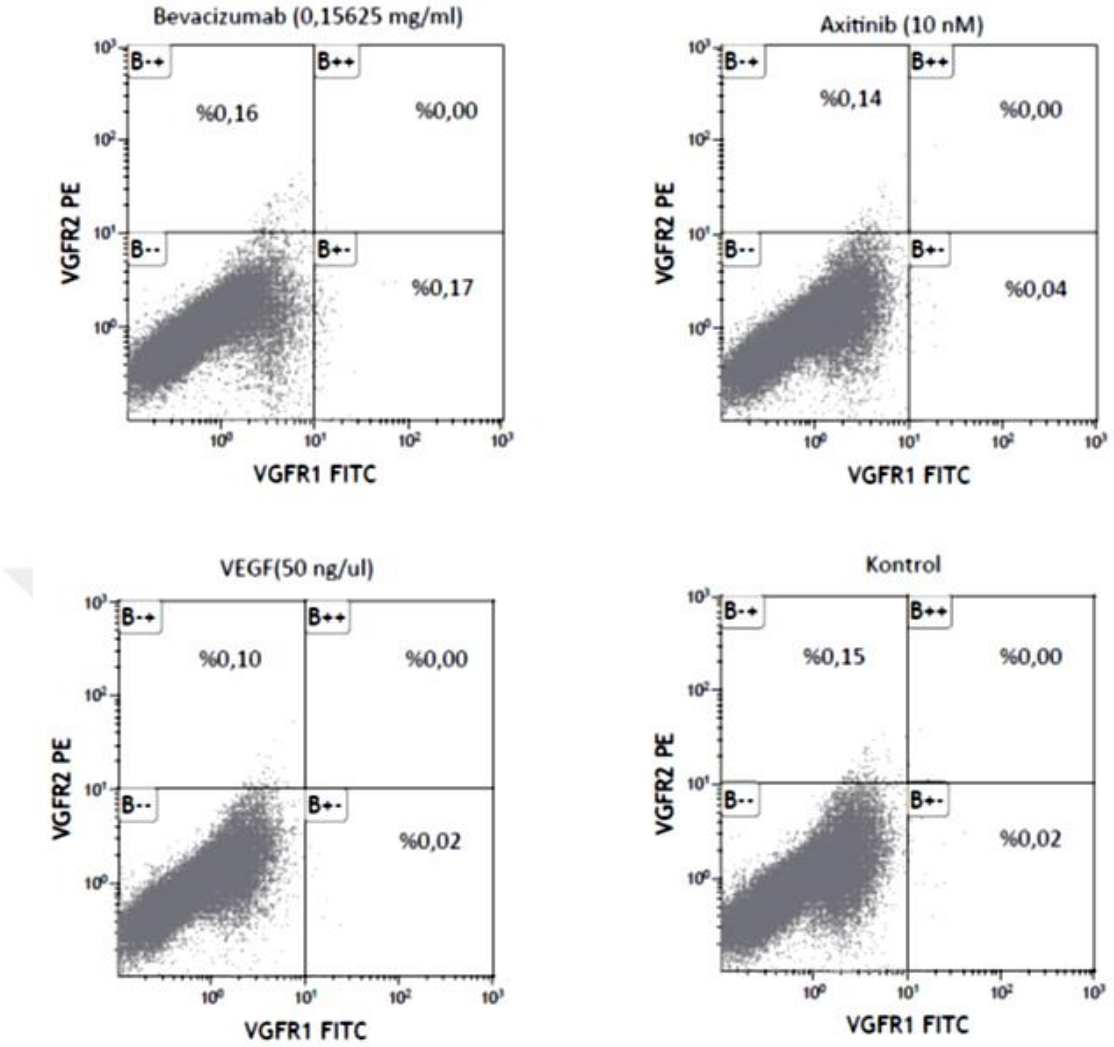
3.5. Akım Sitometrisi ile VEGFR1 ve VEGFR2 İfade Oranları

Tez çalışmamızda kullandığımız her 3 tümör hücre hattında da VEGFR1 ve VEGFR2 düzeyleri akım sitometrisi ile incelendi. Her bir hücre türü FITC işaretli anti-VEGFR1 ve PE işaretli anti-VEGFR2 antikorları ile boyandıktan sonra akım sitometrisinde minimum 50.000 hücre sayılarak bu reseptörleri ifade eden hücrelerin oranları tayin edildi.

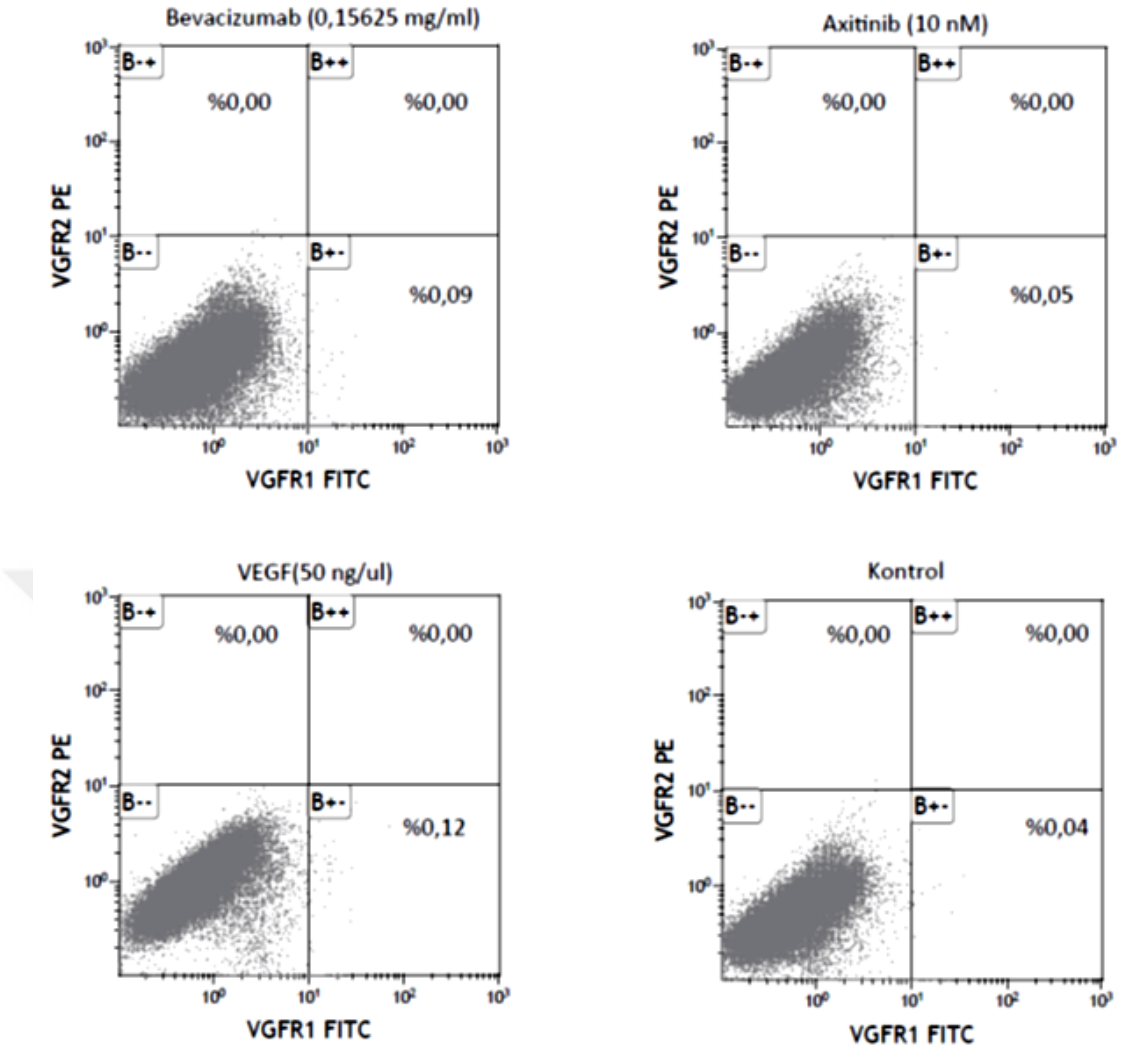
MCF-7 ve HT-29 hücrelerinde VEGFR1 ve VEGFR2 ifade eden tümör hücresi yok denecek kadar az bulundu (Çizelge 3-12). Buna karşılık LNCaP hücrelerinin yaklaşık %1'inde VEGFR1 pozitifliği saptandı. Deneylerde kullanılan ilaç ve VEGF'nin uygulanan tüm dozlarında anlamlı bir farklılık izlenmedi (Çizelge 3-12, Şekiller 3-33, 3-34 ve 3-35).

Çizelge 3. 12. MCF-7, HT-29 ve LNCaP hücrelerinde, bevacizumab, axitinib ve VEGF'nin farklı dozlarının hücre yüzeyinde VEGFR1 ve VEGFR2 ekspresyonlarına olan etkisi'nin (VEGFR1, VEGFR2 ve her iki reseptörü birlikte eksprese eden hücrelerin) yüzdeleri.

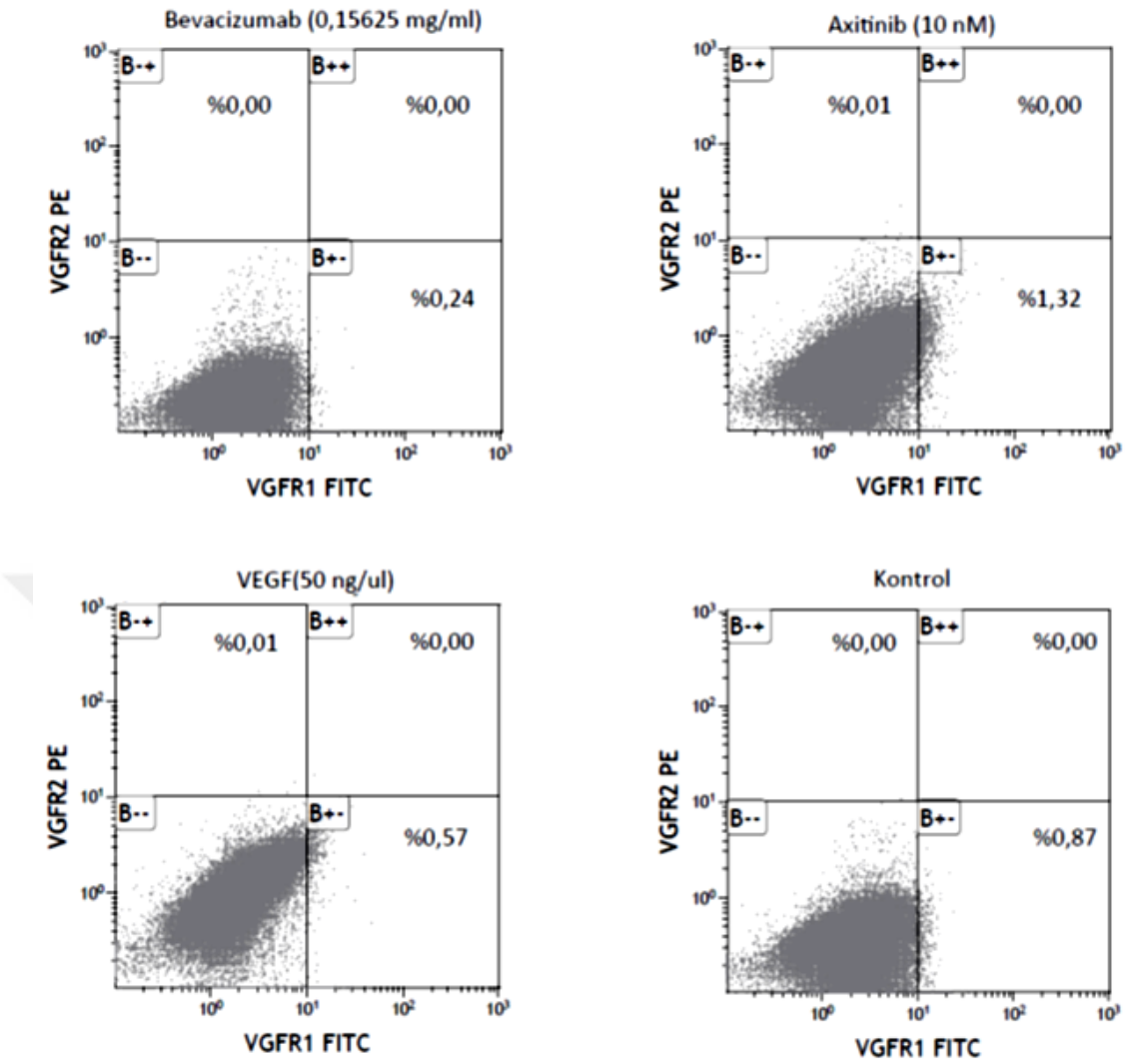
Hücre tipi	İlaç /doz	VEGFR1	VEGFR2	VEGFR1+VEGFR2
MCF-7	Bevacizumab_D1	0,13	0,06	0,00
	Bevacizumab _D2	0,17	0,16	0,00
	Bevacizumab _D3	0,11	0,25	0,00
	Axitinib_D1	0,16	0,24	0,02
	Axitinib_D2	0,04	0,14	0,00
	Axitinib_D3	0,04	0,12	0,00
	VEGF_D1	0,08	0,09	0,00
	VEGF_D2	0,02	0,10	0,00
	VEGF_D3	0,23	0,01	0,00
	Kontrol	0,02	0,15	0,00
HT-29	Bevacizumab_D1	0,07	0,00	0,00
	Bevacizumab _D2	0,09	0,00	0,00
	Bevacizumab _D3	0,06	0,00	0,00
	Axitinib_D1	0,12	0,01	0,00
	Axitinib_D2	0,05	0,00	0,00
	Axitinib_D3	0,10	0,00	0,00
	VEGF_D1	0,08	0,00	0,00
	VEGF_D2	0,12	0,00	0,00
	VEGF_D3	0,08	0,0	0,0
	Kontrol	0,04	0,00	0,00
LNCaP	Bevacizumab_D1	0,30	0,00	0,00
	Bevacizumab _D2	0,24	0,00	0,00
	Bevacizumab _D3	0,45	0,00	0,00
	Axitinib_D1	1,40	0,01	0,00
	Axitinib_D2	1,32	0,01	0,00
	Axitinib_D3	0,37	0,01	0,00
	VEGF_D1	0,03	0,09	0,00
	VEGF_D2	0,57	0,01	0,00
	VEGF_D3	0,46	0,01	0,00
	Kontrol	0,87	0,00	0,00



Şekil 3. 33. MCF-7 hücrelerinde VEGFR1 ve VEGFR2 ifade eden hücre oranları



Şekil 3. 34. HT-29 hücrelerinde VEGFR1 ve VEGFR2 ifade eden hücre oranları



Şekil 3. 35. LNCaP hücrelerinde VEGFR1 ve VEGFR2 ifade eden hücre oranları

4. TARTIŞMA

Kanser tedavisinde kullanılan monoklonal antikorların kan düzeyleri ile tedavi etkinliği arasında çelişkili sonuçlar bildirilmiştir (Nguyenve ark., 2010). 10 mg/kg dozunda uygulanan bevacizumabdan sonra alınan serum örneklerinde ilaç dozu 0.1 – 0.3 mg/ml arasında değiştiği gösterilmiştir.

Çalışmamızda bevacizumabın 0,625 mg/mL ve üzerindeki dozlarında (D1,D2,D3) meme kanseri ve prostat kanseri hücreleri üzerinde hücre proliferasyonunu uyarıcı bir etkisi saptandı (Şekil 3.1. ve Şekil3.3.). Ancak bu dozlar insanda kullanılan mutat dozlarla erişilebilen maksimum kan düzeylerinin altındadır. İnsanda kullanılan dozlarla erişilebilen kan düzeylerine karşılık gelen dozlarda ise bevacizumabın hücre proliferasyonuna anlamlı bir etkisi izlenmedi. Kolon kanseri hücrelerinde ise bevacizumabın hiç bir dozunda hücre prolferasyonuna anlamlı bir etkisi saptanmadı (Çizelge 3.2. , Şekil3.2).

Axitinib esas olarak hücrelerde VFGR1, VEGFR2, VEGFR3 ve bu yolaktaki tirozin kinaz aktivitesini bloke ederek anti-anjiyojenik etki gösteren bir ilaçtır (Centerwatch, 2017). Axitinib oral yoldan alındığında yaklaşık 3 saatte plazmada maksimum düzeyine ulaşmaktadır ve ilacın plazma yarı ömrü de yaklaşık 3.30 saat olarak hesaplanmıştır. Axitinib 5 mg'lık bir oral tabletten sonra sağlıklı bir kişide ulaşılan plazma maksimum konsantrasyonu 20-25 ng/ml arasındadır (Chenve ark., 2013). İnsanda kullanılan mutat axitinib dozlarından elde edilen maksimum plazma ilaç konsantrasyonu tez çalışmamızda test ettiğimiz axitinib dozlarından D4 - D5 aralığına karşılık gelmektedir (Chenve ark., 2013). Axitinibin yüksek dozları (D1, D2) deneyde kullandığımız tümör hücrelerinde anlamlı olarak sitotoksik etki göstermiştir (Çizelge 3.2., Şekil 3.1.-3.3). Buna karşılık çok düşük dozlarda (10^{-2}nM ve altı) ise hücre proliferasyonunu arttırmaktadır. Bu bulgu axitinibin klinikte düşük dozlarda kullanımının olası olumsuz etkileri konusunda dikkatli çalışmaların yapılması konusunda bir uyarı oluşturabilir.

Anti-anjiyogenik tedavi ajanlarının etkinliğini belirlemede çeşitli biyomarkerların etkili olabileceğine ilişkin çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Ancak bunlardan hiçbirisi bugün için klinikte kullanılması açısından genel kabul görmemiştir. Bu durum yapılan klinik çalışmalardaki hasta sayısının azlığı kadar sonuçların çelişkili olmasından da kaynaklanmaktadır. Bevacizumab ve aflibercept gibi VEGF'yi bağlayan ajanlar için en çok çalışılan parametrelerden birisi serum VEGF düzeyleridir (Stefaninive ark., 2010). Kliniğimizde yakın zamanda yapılan bir çalışmada immünolojik parametrelerin bevacizumab tedavisinde bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğine işaret etmektedir (Akbulut et al, 2016). Bu çalışmamızda bevacizumab tedavisi öncesi periferik kanda CD4/CD8 oranı 2`nin üzerinde olanlarda tedavi etkinliği belirgin olarak daha iyi bulunmuştur. Yine tedavi öncesi periferik kanda Treg hücre oranı %0.40'ın altında olanlarda bevacizumabın sağkalım üzerindeki etkisi anlamlı olarak daha iyi bulunmuştur. Bir başka çalışmada serum NO düzeyleri düşük olanlarda bevacizumab etkinliği daha fazla olarak bulunmuştur (Mutove ark., 2017). Anti-anjyogenik ilaçlarla yapılan tedavilerde hastalarda izlenen hipertansiyon yan etkisi genellikle baskılanan VEGF-VEGFR yolağının neden olduğu NO yapımının azalmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (Bergsland and Dickler, 2004). Bununla birlikte bevacizumabın tümör dokusunda özellikle tümör hücrelerinden salgılanan ve tümör mikroçevresinde immün baskılamada rol oynayan NO düzeyi üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Çalışmamızda kullanılan bevacizumab, axitinib ve VEGF LNCaP ve MCF-7 hücrelerinde genel olarak NOS3 gen ifadesini baskılarken sadece LNCaP hücrelerinde bevacizumab 1.25 mg/ml dozunda ifade düzeyini arttırmıştır (Çizelge 3.6. ve 3.8., Şekil 3.4. ve 3.6.). HT-29 hücrelerinde ise bevacizumab, axitinib ve VEGF NOS3 ifade düzeylerini belirgin olarak arttırmıştır (Çizelge 3.9.-3.11., Şekil 3.15.-3.17.).

IL-6 ve TGF-betanın hedefe yönelik tedavilerde bir direnç oluşturabileceğine dair preklinik veriler bulunmaktadır (Zhangve ark., 2005, Yaove ark., 2010). Yakın zamanlarda bevacizumab tedavisi uygulanan bir hasta grubunda yapılan ayrıntılı bir biyomarker analiz çalışmasında bazal IL-6 ve TGF-beta düzeylerinin ve tedavi sonrası bu düzeylerdeki azalmanın prognostik önemi olabileceğini gösteren bulgular bildirilmiştir (Liuve ark., 2015). Yine bevacizumab ile tedavi edilen renal hücreli

kanserli hastalarda tedavi öncesi TGF-beta düzeylerinin düşük olması daha iyi prognozla ilişkili bulunmuştur (Dorffve ark., 2016).

Yine bevacizumab ile tedavi edilen glioblastomalı hastalarda TGF-beta gen ifadesinin tedaviye cevap veren hastalarda (yaklaşık %30) azaldığı buna karşılık cevap vermeyenlerde ise azalmadığı saptanmıştır (Urupve ark., 2017). Tez çalışmamızda bevacizumab, axitinib ve VEGF`nin MCF-7 ve HT-29 hücrelerinde TGF-beta gen ifadesini arttırdığını bulduk. VEGF`nin etkisi HT29 hücrelerinde anlamlılık düzeyinde değildi. LNCaP hücrelerinde ise VEGF`nin 10 ng/µl dozu TGF-B ifadesini arttırmıştır. TGF-beta sitokin düzeylerinde ise kontrol grubuna göre ilaç uygulanan hücrelerde anlamlı değişiklikler izlenmemiştir. Bu bulgular bevacizumab ve axitinibin kanser hücrelerinde TGF-beta ifadesini arttırarak hem epitelyal mezenkimal geçişi hızlandırabileceğini ve hem de tümör mikroçevresinde immün baskılanmaya katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

M2 makrofajlar tümör mikroçevresinde immünsupresyon yaptıkları uzun zamandan beri bilinmektedir. Özellikle bu hücrelerin salgıladıkları IL-10 tümör dokusunda Treg infiltrasyonunu arttırarak immünsupresyona katkıda bulunur. Meme kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada bevacizumabın CD11b pozitif M2 tipi hücrelerden hem IL-10 mRNA transkripsiyonunu ve hem de sitokin sekresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Cattinve ark., 2016). Tümüre katkıda bulunan bu sitokinler tümör mikroçevresinde makrofajların yanı sıra tümör hücreleri tarafından salgılanabilmektedir. Kolon kanseri hücre hatlarında yapılan bir çalışmada makrofajlar tarafından salgılanan IL-6'nın özellikle STAT3 üzerinden kanser hücrelerinde IL-10 transkripsiyonunu ve sekresyonunu uyardığı gösterilmiştir (Herbeuvalve ark., 2004). Ancak bevacizumabın tümör hücrelerinden IL-10 yapılması üzerindeki direkt etkileri bilinmemektedir. Bu çalışmamızda ise IL-10 gen ifadeleri üzerinde bevacizumab ve axitinibin önemli bir etkisini bulamadık. Yani kültür ortamına salgılanan IL-10 sitokin düzeyleri açısından da test ettiğimiz ilaçların ve VEGF'nin anlamlı bir etkisini saptayamadık. Tümör hücrelerinden IL-10 salgılanması daha çok mikroçevredeki makrofaj, fibroblast gibi hücrelerin etkisiyle olduğu dikkate alındığında deneylerimizde böyle bir uyarının olmaması bir eksiklik olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bevacizumabın tümör hücrelerinden IL-10 yapımı üzerindeki etkisini daha net olarak aydınlatabilmek için uyarılmış tümör hücreleri ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç var görünmektedir.

Interlökin-6, tümör hücreleri ve tümör mikroçevresindeki fibroblastlar tarafından salgılanan ve tümör hücrelerinde epitelyal mezenkimal geçişi kolaylaştırmanın yanı sıra immün baskılanmada ve anjiyogenezde rol oynayan bir sitokindir (Esquivel-Velazquezve ark., 2015; Hongve ark., 2007; Nagasakive ark., 2014). IL-6 kan düzeylerinin yüksek olması kanserli hastalarda bevacizumab tedavisi için bir direnç göstergesi olabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır (Harave ark., 2017). Değişik kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalarda bevacizumabın 0,1 mg/ml dozlarında zamana bağlı olarak IL-6 mRNA ve salgılanan sitokin düzeyini artırabildiği gösterilmiştir (Wuve ark., 2015). Tez çalışmamızda ise 24 saatlik bevacizumab uygulaması yapılan tümör hücrelerinde IL-6 gen ifadesi saptanmazken 72 saat inkübasyon sonrası kültür vasatlarında IL-6 ölçülebilir düzeylerde saptanmıştır. Bevacizumabın MCF-7 ve HT-29 hücrelerinde, axitinibin ise MCF-7 hücrelerinde IL-6 sitokin düzeyini anlamlı olarak arttırdığını bulduk (Çizelge 3.9.-3.11., Şekil 3.30.-3.32.) .

Interlökin-17 esas olarak T hücreleri tarafından salgılanan bir sitokindir. Bununla birlikte tümör hücreleri tarafından da az da olsa yapılabilmektedir (Avadhanive ark., 2017). IL-17 VEGF yapımını uyararak tümör anjiyogenezini uyarmasının yanı sıra özellikle IL-6 yapımını uyararak tümör mikroçevresinde immün baskılanmaya aracılık ettiği düşünülmektedir (Panve ark., 2015, Heve ark., 2010). Bununla birlikte IL-17 T hücre cevabını arttırarak anti-tümöral etkinlik de gösterebilmektedir (Benchetritve ark., 2002). Çalışmamızda tümör hücrelerinde 24 saatte belirgin IL-17 gen ekspresyonu izlenmedi. Buna karşılık 72 saatlik kültür sonucunda kültür vasatında ölçülebilir düzeylerde IL-17 saptanmadı. Çalışmamızda kullanılan ilaçlar ve VEGF IL-17 sekresyonunda kontrol grubuna göre anlamlı bir değişikliğe neden olmadı (Çizelge 3.9.-3.9.11, Şekil 3.24.-3.26.).

Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) tümör ortamında triptofan eksiliğine yol açmasının yanı sıra kynurenine gibi biyoaktif maddelerin yapımını arttırarak tümör mikroçevresinde Treg birikmesini uyarabilmektedir (Nguyenve ark., 2010).Tümör mikroçevresinde immün hücreler tarafından ifade edilmekle birlikte tümör hücrelerinde de IDO ifadesinde artış izlenebilmektedir (Sadunve ark., 2007). Anti-anjiyogenik ilaçların tümör hücrelerinde IDO ekspresyonu üzerindeki etkilerini araştırma bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Çalışmamızda bevacizumabın D1 dozu (1.25 mg/ml) MCF-7 ve LNCaP hücrelerinde IDO mRNA düzeylerini anlamalı olarak arttırırken axitinibde ise tersine bir azalma izlendi (Çizelge 3.6. ve 3.8., şekil 3.10. ve 3.12.). HT-29 hücrelerinde ise 24 saatlik ilaç inkübasyonunda IDO mRNA ifadesi genel olarak saptanamadı. Buna karşılık 72 saatlik inkübasyon sonrasında kültür ortamında IDO düzeyleri bevacizumab uygulanan grupta belirgin olarak yüksek bulundu. VEGF uygulaması ise LNCaP hücrelerinde IDO gene ekspresyonunu azaltırken HT-29 hücrelerinde bazı dozlarda arttırmıştır. Bevacizumabın incelenen her 3 kanser hücresinde de IDO gen ifadesinde ve bazılarında da salgılanan IDO düzeylerinde artışa yol açması bu ilacı kullanan hastalarda tümör mikroçevresinde immün baskılanma potansiyeli açısından dikkatli olunması gerektiğini düşündürmektedir. Ancak söz konusu ilaçların immün hücrelerdeki IDO gen ifadesi ve sentezi üzerindeki etkilerinin de çalışılması ile bu konuda daha doğru bir sonuca ulaşmak mümkün olabilecektir.

Tümör hücrelerinin yüzeyinde akım sitometrik olarak VEGFR1 ve VEGFR2 ekspresyonunun çok az olması test edilen ilaçların VEGF'nin bu reseptörlerin yapımı üzerindeki etkileri konusunda değerlendirme yapmaya imkan vermemektedir. Yine bu açıdan bakıldığında çalışılan ilaçların immünsupresif gen ifadeleri üzerindeki etkilerini bu reseptörler üzerinden değerlendirmek de mümkün görünmemektedir. Bu konunun aydınlatılabilmesi için VEGFR1 ve VEGFR2 ifadesi yüksek olan hücrelerde benzer çalışmaların yapılması yararlı olacaktır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamızda kanser hastalarının tedavisinde rutin olarak kullanılan anti-anjioyegenik ilaçlar olan bevacizumab ve axitinib tümör mikroçevresinde immün baskılamada rol oynayan bazı sitokinlerin yapımı üzerindeki etkilerini MCF-7, LNCaP ve HT-29 kanser hücrelerinde araştırdık.

Bevacizumab deneylerde kullandığımız dozlarda genel olarak her 3 hücre tipinde de NOS3, TGFb ve IDO gen ifadelerini arttırmaktaydı.

Axitinib MCF-7 ve HT 29 hücrelerinde TGF-B ve HT 29 hücrelerinde NOS3 ifade düzeyini arttırmaktadır. Buna karşılık LNCaP hücrelerinde NOS3 ve IDO düzeylerini azaltmaktadır. Bevacizumab bazı dozlarda MCF-7 hücrelerinde IL-6 sitokin düzeyini arttırmaktadır.

Bu çalışma bevacizumab ve axitinibin çalışılan genler üzerindeki etkileri konusunda mekanistik bir açıklama getirmemekle birlikte bu ilaçların klinikte etkili olmadığı hasta gruplarında immünsupresif etkileri uyarma potansiyellerinin de rolü olabileceğini düşündürmektedir. Ancak tez çalışmamıza dahil ettiğimiz ve genel olarak tümör mikroçevresinde immün supresyonda rol oynayan genler sadece tümör hücrelerinde değil aynı zamanda bu evrede bulunan diğer hücreler tarafından da ifade edilebilmektedir. Sadece tümör hücrelerindeki ifade düzeylerinin çalışılmış olması daha net sonuçlara ulaşabilmek için bir kısıtlılık oluşturmaktadır.

Bir sonraki aşamada bevacizumab ve axitinibin tümör mikroçevresinde yer alan makrofajlar, fibroblastlar, dendritik hücreler ve lenfositler gibi diğer hücreler üzerindeki in vitro etkilerinin çalışılması uygun olacaktır. Yine bu ilaçlarla tedavi edilen hastalarda bu genlerin çalışılması prognoz ve tedavi etkinliğini belirleme açısından yol gösterici olabilecektir.

ÖZET

Anti-anjiyojenik İlaç Tedavisinin Tümör İmmünitesi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması

VEGF-A anjiyogenezdeki önemli rolü ile bilinirken, son zamanlarda yapılan çalışmalarda da immün sistem üzerindeki baskılayıcı etkilerinin olduğu anlaşılmış ve bu yönü ile de yoğun araştırılan bir konu haline gelmiştir. VEGF-A APC hücreleri ve T-hücrelerinin gelişimlerini engeller ve gelişmemiş APC hücrelerini immün sistemi baskılayan hücreleri (MDSC, TAM ve Tregs) ortama çekmeleri için organize eder. Diğer yandan, VEGF reseptörlerinin birçok hücre tipinin üzerinde olduğu içinde onlara bağlanarak immünsupresif sitokinleri olan NO, TGF-β, IDO, IL-17, IL-10 ve IL-6 salınımlarına sebep olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada esas olarak VEGF'nin immün sistem üzerindeki etkilerini ve kanser tedavisinde kullanılan anti-VEGF tedavilerin (bevacizumab, axitinib) tümör hücrelerinden immünsüpresif sitokin salgısını ve VEGF'nin bu sitokinler üzerindeki etkilerini nasıl değiştirdiğini bulmayı amaçladık.

Çalışmamız in-vitro olarak planlanmıştır. İnsan meme (MCF-7), kolon (HT-29) ve prostat (LNCaP) kanser hücre hatları kullanıldı. MTT testi uygulanarak hem VEGF hem de anti-VEGF ilaçlar için hücre canlılık testi yapıldı. İmmünsupresif sitokin salgısı gen düzeyinde (EZ-PZR), salgılanan protein düzeyinde (ELISA yöntemi ile) tayin edilerek anjiyogenez-immünsupresyon ilişkisi incelendi. Ayrıca hücre üzerinde VEGFR1 ve VEGFR2 düzeyi (Akım Sitometresi ile) tayin edildi.

Çalışmamızda bevacizumab kullandığımız dozlarda genel olarak her 3 hücre tipinde de NOS3, TGFb ve IDO gen ifadelerini arttırdı. Axitinib MCF-7 ve HT 29 hücrelerinde TGF-b ve HT 29 hücrelerinde NOS3 ifade düzeyini arttırmaktadır. Buna karşılık LNCaP hücrelerinde NOS3 ve IDO düzeylerini azaltmaktadır. Bevacizumab bazı dozlarda MCF-7 hücrelerinde IL-6 sitokin düzeyini arttırdı.

Sonuçlarımız anti-anjiyogenik tedavi modalitelerinin (bevacizumab ve axitinib) tümör mikroçevresinde immünsupresyona zemin hazırlayacak gen ifadelerinde artışa neden olabilmektedir. İmmün supresif mikroçevrenin de anti-anjiyogenik ilaçlara bir direnç oluşturabileceği, dolayısıyla anti-anjiyojenik ilaçların klinikte kombine olarak kullanılmasının daha rasyonel olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: İmmünsupresyon, VEGFA, VEGFR1, VEGFR2

SUMMARY

Investigation of the effects of anti-angiogenic drugs on tumor immunity

The VEGF-A was already known for its important role in angiogenesis; however, recently it becomes the hot topic of research with regard to immunosuppressive effects of it. VEGF-A activity results in impaired maturation of APC and T-cells. Then this immature APC results in recruitment of immunosuppressive cells such as MDSC, TAM, and Tregs. On the other hand, because of the presence of the VEGF receptors on different kinds of cells, this growth factor can easily result in the release of immunosuppressive cytokines (NO, TGF-β, IDO , IL-17, IL-10, and IL-6) into the tumor microenvironment.

The main aim of this research was to find out the effect of VEGF on the immune system. Also, detection of the role of VEGF on the release of immunosuppressive cytokines and how anti-VEGF therapy (Bevacizumab, Axitinib) could change this process were on the basis of this project.

Our research is planned as in-vitro. Human cell lines such as breast (MCF-7), colon (HT-29), and prostate (LNCaP) were used. Then, the cellular viability was tested against VEGF and anti-VEGF drug dosages by means of MTT test. In order to determine the relationship between tumor angiogenesis and immunosuppression, the release of immunosuppressive cytokines were investigated in gene level (qPCR) and protein level (ELISA technique) itself, also VEGFR1 and VEGFR2 level were investigated (Flow Cytometry) as well.

As a result of the study, it is considered that there may be a resistance developed in patients which do not have a good prognosis upon using Bevacizumab and Axitinib. However, the experiments were based on tumor cells only which is not clinically acceptable to ignore the effect of the tumor microenvironment. For this reason, it is necessary to take the results of this study one step further and try it in an environment similar to the tumor microenvironment.

Keywords: İmmunosuppression, VEGFA, VEGFR1, VEGFR2

KAYNAKLAR

ALFARO, C., SUAREZ, N., GONZALEZ, A., SOLANO, S., ERRO, L., DUBROT, J., PALAZON, A., HERVAS-STUBBS, S., GURPIDE, A., LOPEZ-PICAZO, J. M., GRANDE-PULIDO, E., MELERO, I. & PEREZ-GRACIA, J. L. 2009. Influence of bevacizumab, sunitinib and sorafenib as single agents or in combination on the inhibitory effects of VEGF on human dendritic cell differentiation from monocytes. *British Journal of Cancer,* 100**,** 1111-1119.

AMERICANCANCERSOCIETY 2012. Cancer Facts & Figures.

ARTICLES4HEALTH 2017. The most popular answers for the topic of what causes cancer.

AVADHANI, A. V., PARACHURU, V. P. B., MILNE, T., SEYMOUR, G. J. & RICH, A. M. 2017. Multiple cells express interleukin 17 in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine,* 46**,** 39-45.

BENCHETRIT, F., CIREE, A., VIVES, V., WARNIER, G., GEY, A., SAUTES-FRIDMAN, C., FOSSIEZ, F., HAICHEUR, N., FRIDMAN, W. H. & TARTOUR, E. 2002. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood,* 99**,** 2114-2121.

BERGSLAND, E. & DICKLER, M. N. 2004. Maximizing the potential of bevacizumab in cancer treatment. *Oncologist,* 9**,** 36-42.

BUELL, J. F., GROSS, T. G. & WOODLE, E. S. 2005. Malignancy after transplantation. *Transplantation,* 80**,** S254-64.

CANCERRESEARCHUK. 2014. *Types of Cancer* [Online]. Available: http://WWW/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer [Accessed].

CATTIN, S., FELLAY, B., PRADERVAND, S., TROJAN, A., RUHSTALLER, T., RUEGG, C. & FURSTENBERGER, G. 2016. Bevacizumab specifically decreases elevated levels of circulating KIT+CD11b+ cells and IL-10 in metastatic breast cancer patients. *Oncotarget,* 7**,** 11137-50.

CENTERWATCH 2017. Inlyta (axitinib).

CHEN, Y., TORTORICI, M. A., GARRETT, M., HEE, B., KLAMERUS, K. J. & PITHAVALA, Y. K. 2013. Clinical pharmacology of axitinib. *Clin Pharmacokinet,* 52**,** 713-25.

COCA, S., PEREZ-PIQUERAS, J., MARTINEZ, D., COLMENAREJO, A., SAEZ, M. A., VALLEJO, C., MARTOS, J. A. & MORENO, M. 1997. The prognostic significance of

intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer,* 79**,** 2320-8.

DORFF, T. B., LONGMATE, J., GROSHEN, S. G., STADLER, W. M., FISHMAN, M. N., VAISHAMPAYAN, U. N., PINSKI, J. K., PAL, S. K., HU, J., QUINN, D. I. & LARA, P. 2016. Angiogenic markers during bevacizumab-based treatment in metastatic renal cell carcinoma (RCC). *Journal of Clinical Oncology,* 34.

ESQUIVEL-VELAZQUEZ, M., OSTOA-SALOMA, P., PALACIOS-ARREOLA, M. I., NAVA-CASTRO, K. E., CASTRO, J. I. & MORALES-MONTOR, J. 2015. The Role of Cytokines in Breast Cancer Development and Progression. *Journal of Interferon and Cytokine Research,* 35**,** 1-16.

FAN, X. H., HAN, B. H., DONG, Q. G., SHA, H. F., BAO, G. L. & LIAO, M. L. 2003. [Vascular endothelial growth factor inhibits dendritic cells from patients with non-small cell lung carcinoma]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi,* 26**,** 539-43.

FERRARA, N., GERBER, H. P. & LECOUTER, J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med,* 9**,** 669-76.

FRISCH, M., BIGGAR, R. J., ENGELS, E. A., GOEDERT, J. J. & GROUP, A. I.-C. M. R. S. 2001. Association of cancer with AIDS-related immunosuppression in adults. *JAMA,* 285**,** 1736-45.

GALON, J., COSTES, A., SANCHEZ-CABO, F., KIRILOVSKY, A., MLECNIK, B., LAGORCE-PAGES, C., TOSOLINI, M., CAMUS, M., BERGER, A., WIND, P., ZINZINDOHOUE, F., BRUNEVAL, P., CUGNENC, P. H., TRAJANOSKI, Z., FRIDMAN, W. H. & PAGES, F. 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science,* 313**,** 1960-4.

GHIRINGHELLI, F., PUIG, P. E., ROUX, S., PARCELLIER, A., SCHMITT, E., SOLARY, E., KROEMER, G., MARTIN, F., CHAUFFERT, B. & ZITVOGEL, L. 2005. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4(+)CD25(+) regulatory T cell proliferation. *Journal of Experimental Medicine,* 202**,** 919-929.

AKBULUT H., OCAL M., SONUGUR G., BABAHAN B., ABDI ABGARMI S., ICLI F., 2017. The effects of very low doses of chemotherapeutic drugs on endothelial cells.

AKBULUT D., OCAL M., AKAY B. Sonugur G., BabahanB., Abdi Abgarmi S., Demirkazik A., Icli F. The role of immune system on the efficacy of bevacizumab in patients with metastatic colorectalcancer (mCRC). ESMO Congress 2016, Copenhagen, Denmark, October 7-11, 2016. Annals of Oncology;11 (Suppl 4):70-71:1553P

HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell,* 100**,** 57-70.

HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell,* 144**,** 646-674.

HARA, M., NAGASAKI, T., SHIGA, K., TAKAHASHI, H. & TAKEYAMA, H. 2017. High serum levels of interleukin-6 in patients with advanced or metastatic colorectal cancer: the effect on the outcome and the response to chemotherapy plus bevacizumab. *Surgery Today,* 47**,** 483-489.

HE, D. G., LI, H., YUSUF, N., ELMETS, C. A., LI, J., MOUNTZ, J. D. & XU, H. 2010. IL-17 Promotes Tumor Development through the Induction of Tumor Promoting Microenvironments at Tumor Sites and Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Journal of Immunology,* 184**,** 2281-2288.

HERBEUVAL, J. P., LELIEVRE, E., LAMBERT, C., DY, M. & GENIN, C. 2004. Recruitment of STAT3 for production of IL-10 by colon carcinoma cells induced by macrophage-derived IL-6. *J Immunol,* 172**,** 4630-6.

HONG, D. S., ANGELO, L. S. & KURZROCK, R. 2007. Interleukin-6 and its receptor in cancer - Implications for translational therapeutics. *Cancer,* 110**,** 1911-1928.

HUANG, B., PAN, P. Y., LI, Q. S., SATO, A. I., LEVY, D. E., BROMBERG, J., DIVINO, C. M. & CHEN, S. H. 2006. Gr-1(+)CD115(+) immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Research,* 66**,** 1123-1131.

KANSERGOVTR 2017. Kanserİstatistikleri.

KRAMER, I. & LIPP, H. P. 2007. Bevacizumab, a humanized anti-angiogenic monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics,* 32**,** 1-14.

KUSMARTSEV, S., NEFEDOVA, Y., YODER, D. & GABRILOVICH, D. I. 2004. Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol,* 172**,** 989-99.

LAXMANAN, S., ROBERTSON, S. W., WANG, E., LAU, J. S., BRISCOE, D. M. & MUKHOPADHYAY, D. 2005. Vascular endothelial growth factor impairs the functional ability of dendritic cells through Id pathways. *Biochem Biophys Res Commun,* 334**,** 193-198.

LIU, Y. M., STARR, M. D., BRADY, J. C., RUSHING, C., BULUSU, A., PANG, H., HONEYCUTT, W., AMARA, A., ALTOMARE, I., URONIS, H. E., HURWITZ, H. I. & NIXON, A. B. 2015. Biomarker Signatures Correlate with Clinical Outcome in

Refractory Metastatic Colorectal Cancer Patients Receiving Bevacizumab and Everolimus. *Molecular Cancer Therapeutics,* 14**,** 1048-1056.

LOGSDON, E. A., FINLEY, S. D., POPEL, A. S. & MAC GABHANN, F. 2014. A systems biology view of blood vessel growth and remodelling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine,* 18**,** 1491-1508.

LYNN, K. D., ROLAND, C. L. & BREKKEN, R. A. 2010. VEGF and pleiotrophin modulate the immune profile of breast cancer. *Cancers (Basel),* 2**,** 970-88.

MANDAL, A. 2017. What Causes Cancer?

MEDINGER, M. & PASSWEG, J. 2014. Role of tumour angiogenesis in haematological malignancies. *Swiss Medical Weekly,* 144.

MUTO, S., TAKAGI, H., OWADA, Y., INOUE, T., WATANABE, Y., YAMAURA, T., FUKUHARA, M., OKABE, N., MATSUMURA, Y., HASEGAWA, T., OSUGI, J., HOSHINO, M., HIGUCHI, M., SHIO, Y. & SUZUKI, H. 2017. Serum Nitric Oxide as a Predictive Biomarker for Bevacizumab in Non-small Cell Lung Cancer Patients. *Anticancer Research,* 37**,** 3169-3174.

NAGASAKI, T., HARA, M., NAKANISHI, H., TAKAHASHI, H., SATO, M. & TAKEYAMA, H. 2014. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *British Journal of Cancer,* 110**,** 469-478.

NGUYEN, N. T., KIMURA, A., NAKAHAMA, T., CHINEN, I., MASUDA, K., NOHARA, K., FUJII-KURIYAMA, Y. & KISHIMOTO, T. 2010. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 107**,** 19961-19966.

NOMAN, M. Z., BUART, S., VAN PELT, J., RICHON, C., HASMIM, M., LELEU, N., SUCHORSKA, W. M., JALIL, A., LECLUSE, Y., EL HAGE, F., GIULIANI, M., PICHON, C., AZZARONE, B., MAZURE, N., ROMERO, P., MAMI-CHOUAIB, F. & CHOUAIB, S. 2009. The Cooperative Induction of Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha and STAT3 during Hypoxia Induced an Impairment of Tumor Susceptibility to CTL-Mediated Cell Lysis. *Journal of Immunology,* 182**,** 3510-3521.

NOVITSKIY, S. V., PICKUP, M. W., GORSKA, A. E., OWENS, P., CHYTIL, A., AAKRE, M., WU, H., SHYR, Y. & MOSES, H. L. 2011a. TGF-beta receptor II loss promotes mammary carcinoma progression by Th17 dependent mechanisms. *Cancer Discov,* 1**,** 430-41.

NOVITSKIY, S. V., PICKUP, M. W., GORSKA, A. E., OWENS, P., CHYTIL, A., AAKRE, M., WU, H. Y., SHYR, Y. & MOSES, H. L. 2011b. TGF-beta Receptor II Loss Promotes Mammary Carcinoma Progression by Th17-Dependent Mechanisms. *Cancer Discovery,* 1**,** 430-441.

OHM, J. E., GABRILOVICH, D. I., SEMPOWSKI, G. D., KISSELEVA, E., PARMAN, K. S., NADAF, S. & CARBONE, D. P. 2003. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood,* 101**,** 4878-4886.

PAN, B., SHEN, J., CAO, J. Y., ZHOU, Y. X., SHANG, L. H., JIN, S., CAO, S. B., CHE, D. H., LIU, F. & YU, Y. 2015. Interleukin-17 promotes angiogenesis by stimulating VEGF production of cancer cells via the STAT3/GIV signaling pathway in non-small-cell lung cancer. *Scientific Reports,* 5.

PRAGER, G. W., POETTLER, M., UNSELD, M. & ZIELINSKI, C. C. 2012. Angiogenesis in cancer: Anti-VEGF escape mechanisms. *Transl Lung Cancer Res,* 1**,** 14-25.

SADUN, R. E., SACHSMAN, S. M., CHEN, X. Y., CHRISTENSON, K. W., MORRIS, W. Z., HU, P. H. & EPSTEIN, A. L. 2007. Immune signatures off murine and human cancers reveal unique mechanisms of tumor escape and new targets for cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research,* 13**,** 4016-4025.

SERAFINI, P., MGEBROFF, S., NOONAN, K. & BORRELLO, I. 2008. Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Research,* 68**,** 5439-5449.

SHANKARAN, V., IKEDA, H., BRUCE, A. T., WHITE, J. M., SWANSON, P. E., OLD, L. J. & SCHREIBER, R. D. 2001. IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature,* 410**,** 1107-11.

SHIBUYA, M. 2001. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct,* 26**,** 25-35.

STEFANINI, M. O., WU, F. T. H., MAC GABHANN, F. & POPEL, A. S. 2010. Increase of Plasma VEGF after Intravenous Administration of Bevacizumab Is Predicted by a Pharmacokinetic Model. *Cancer Research,* 70**,** 9886-9894.

TERME, M., PERNOT, S., MARCHETEAU, E., SANDOVAL, F., BENHAMOUDA, N., COLUSSI, O., DUBREUIL, O., CARPENTIER, A. F., TARTOUR, E. & TAIEB, J. 2013. VEGFA-VEGFR Pathway Blockade Inhibits Tumor-Induced Regulatory T-cell Proliferation in Colorectal Cancer. *Cancer Research,* 73**,** 539-549.

TOI, M., MATSUMOTO, T. & BANDO, H. 2001. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol,* 2**,** 667-73.

URUP, T., STAUNSTRUP, L. M., MICHAELSEN, S. R., VITTING-SEERUP, K., BENNEDBAEK, M., TOFT, A., OLSEN, L. R., JONSON, L., ISSAZADEH-NAVIKAS, S., BROHOLM, H., HAMERLIK, P., POULSEN, H. S. & LASSEN, U. 2017. Transcriptional changes induced by bevacizumab combination therapy in responding and non-responding recurrent glioblastoma patients. *BMC Cancer,* 17**,** 278.

VORON, T., MARCHETEAU, E., PERNOT, S., COLUSSI, O., TARTOUR, E., TAIEB, J. & TERME, M. 2014. Control of the immune response by pro-angiogenic factors. *Front Oncol,* 4**,** 70.

WARRINGTON, R., WATSON, W., KIM, H. L. & ANTONETTI, F. R. 2011. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol,* 7 Suppl 1**,** S1.

WU, H. H., ZHANG, S., BIAN, H., LI, X. X., WANG, L., PU, Y. F., WANG, Y. X. & GUO, C. B. 2015. Bevacizumab Regulates Cancer Cell Migration by Activation of STAT3. *Asian Pac J Cancer Prev,* 16**,** 6501-6.

YAO, Z., FENOGLIO, S., GAO, D. C., CAMIOLO, M., STILES, B., LINDSTED, T., SCHLEDERER, M., JOHNS, C., ALTORKI, N., MITTAL, V., KENNER, L. & SORDELLA, R. 2010. TGF-beta IL-6 axis mediates selective and adaptive mechanisms of resistance to molecular targeted therapy in lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 107**,** 15535-15540.

ZHANG, X. L., TOPLEY, N., ITO, T. & PHILLIPS, A. 2005. Interleukin-6 regulation of transforming growth factor (TGF)-beta receptor compartmentalization and turnover enhances TGF-beta1 signaling. *J Biol Chem,* 280**,** 12239-45.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler



Ad: Samira
Soya : Abdi Abgarmi
Doğum Tarihi: 20 Haziran 1988
Doğum Yeri: Urumiye, Batı Azerbaycan, İran
Vatandaşlık: İranlı
Medeni Durum: Bekar
Bulunduğu Yer: Ankara, Türkiye
Adres: Cumhuriyet kiz oğrenci evi, No: 406, Ankara Üniversitesi tıp fakültesi, Cebeci Hastanesi, Mamak, Ankara, Türkiye
Telefon: (506) 1739243
E-posta: sannirabdi@gmail.com

EĞİTİM

- **Tümör Biyolojisi Yüksek Lisans**
  Tıbbi Onkoloji Anabilim Dalı
  Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
  Ankara, Türkiye
  Eylül 2015 - Ağustos 2017
- **Moleküler Biyoloji ve Genetikte lisans**
  Orta Doğu Teknik Üniversitesi
  Ankara, Türkiye
- **İngilizce Hazırlık**
  Orta Doğu Teknik Üniversitesi
  Ankara, Türkiye
  Ekim 2007- Haziran 2008
- **Biyoloji bilimi**
  Eram Lisesi
  Urumiye, Batı Azerbaycan, İran
  Ekim 2003-Haziran 2006

ÜNVANI

Moleküler Biolog

SERTİFİKALAR

- Seventh Framework programmer and Koranet summer school
  Novel approach in Non-Thermal Processing of Materials: Plasma, Gliding Arc & Electron Beam Irradiation Techniques & Their Applications, Haziran 2014
- ISAC Live Education Cytometry Workshops
  5th Turkish-US Cytometry Workshop (Flow cytometry), Ekim 2015
- Symposium of Current Therapies in Oncology
  Ankara University Medical School, Aralık 2015
- Molecular Medicine and Immunology Days
  Bilkent University, Nisan 2016
- Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası
  ANKÜSEM, September 26- October 05

ARAŞTIRMA İLGİ ALANLARI

- Kanserin Moleküler Biyolojisi
- Kanser Gen Terapisi
- Kanser Epigenetiği
- Kök Hücre İle İlgili Kanser Tedavisi

YAZ STAJI

- **ODTÜ Tıp Merkezi, Ankara**
  01 Temmuz 2013 - 15 Ağustos 2013
  Tıbbi Laboratuar
  - İdrar ve dışkı analizi
  - Hematoloji analizi
  - Hormon analizi
  - Biyokimya analizi

- **Rentech Şirketi, Ankara**
  1 Temmuz 2014 - 31 Eylül 2014
  - Çevre Bilimi
  - Laboratuvar koşullarında su döngüsü
  - Su kalitesi
  - Uzun vadeli su izleme

- Fotosentez

ÖZEL PROJE

Doç.Dr. Çağdaş D. Son laboratuarı / ODTÜ

15 Şubat 2015 - 30 Haziran 2015

Araştırma başlığı: FRET ve BiFC tahlilleri kullanılarak Adenosin A2A, Dopamin D2 reseptörleri arasındaki Homo / Hetero dimerizasyonunun tespiti.

- Agar plak, LB, TAE tamponu ve benzeri hazırlama gibi birçok temel teknik.
- Agaroz Jelden DNA ekstraksiyonu
- DNA ligasyonu
- Bakteri transformasyonu
- Plazmid izolasyonu
- Alkali fosfataz uygulaması

BECERİLER

Bildiğim Laboratuvar teknikleri:

- Agaroz Jel Elektroforez
- Gen çıkarma işlemi
- Plazmid izolasyonu
- Jel ekstraksiyonu
- Hücre kültürü
- Sitotoksisite Testi ve MTT
- Hücre ve Parafinden RNA ve DNA izolasyonu
- Tek çekirdekli hücrelerin izolasyonu
- Ez-PZR
- Flow-Cytometry
- Bradford
- ELISA

BİLGİSAYAR YETENEKLERİ:

- Microsoft Office (Word, Powerpoint, Excel)
- Chimera
- Jmol
- SPDBV

DİL

- Farsça
- Azerice
- İngilizce
- Türkçe
- Arapça

UZMAN

Tercüme

- İngilizce: Türkçe
- İngilizce: Farsça
- Türkçe: Farsça