

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYASAL SENTEZ YOLUYLA ÜRETİLEN
FTALAZİN TÜREVLERİNİN GLİOBLASTOMA MULTİFORME
HÜCRELERİNDEKİ ETKİLERİ

AYÇA ARSLANHAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2017

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYASAL SENTEZ YOLUYLA
ÜRETİLEN FTALAZİN TÜREVLERİNİN
GLİOBLASTOMA MULTİFORME
HÜCRELERİNDEKİ ETKİLERİ

AYÇA ARSLANHAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. TAMER YAĞCI

GEBZE
2017

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**THE EFFECTS OF CHEMICALLY
SYNTHESIZED PHTHALAZINE
DERIVATIVES ON GLIOBLASTOMA
MULTIFORME CELLS**

AYÇA ARSLANHAN
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. TAMER YAĞCI

GEBZE
2017



GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..18../..01../2017. tarih ve 2017../...04... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 03/02/2017 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Ayça Arslanhan'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE

: Prof. Dr. Uygur Halis TAZEBAY

ÜYE

: Doç. Dr. Betül KARADEMİR

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Glioblastoma multiforme (GBM) beyinde en sık rastlanan primer malignite olup, GBM için mevcut tedavi yaklaşımları etkili olmaktan uzaktır. Son zamanlarda, GBM' in moleküler biyolojisi ele alınarak hastalığa yönelik daha etkin tedaviler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fizyolojik süreçlerdeki rolünün yanında, tümör patogenezi, tümör büyümesi ve yayılmasında da etkilidir. VEGF reseptörünün (VEGFR-2) etkinliğinin baskılanması gliomaların düşük dereceden yüksek dereceye geçişini engellemekte ve metastazı yavaşlatmaktadır.

Bu çalışmada, ftalazin türevlerinin bir GBM hücre hattı olan U251 hücrelerindeki VEGFR-2 etkinleşmesi üzerindeki etkilerine odaklandık. Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü' nde sentezlenen beş farklı ftalazin türevinin hücre proliferasyonu, canlılığı ve VEGFR-2 etkinleşmesi üzerindeki etkileri yine piyasada mevcut olan bir diğer ftalazin türevi vatalanib ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Ne vatalanib ne de diğer ftalazin türevleri WST-1 testi ile saptanan hücre proliferasyonu ve western blot ile belirlenen AKT, p-AKT ve VEGFR-2 protein düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamışlardır. Buna karşın, bütün bileşikler 1 μ M gibi düşük dozlarda dahi VEGFR-2 fosforilasyonunu anlamlı bir şekilde baskılamışlardır. Akt-1 ve Ak-3ep türevleri p-VEGFR-2 düzeylerinin baskılanmasında vatalanib' den daha güçlü bir etki göstermişlerdir.

Sonuçlarımız bu yeni sentezlenmiş olan ftalazin türevlerinin p-VEGFR-2' nin etkin baskılayıcısı olduklarını göstermekte ve bunların GBM tedavisinde anti-anjiyogenik ajanlar olarak kullanılabilmeleri için daha ileri pre-klinik ve klinik araştırmaların gerekliliğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Glioblastoma Multiforme (GBM), Vatalanib, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörü (VEGFR), Ftalazin.

SUMMARY

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common primary malignant brain tumor and current therapeutic modalities are far from providing an effective cure. In recent years, molecular biology of GBM has been considered to develop more effective targeted therapies for the disease. Besides its role in physiological processes, vascular endothelial growth factor (VEGF) is involved in tumor pathogenesis, tumor growth and invasion. Repressing the activation of VEGF receptor (VEGFR-2) inhibits progression of gliomas from low- to high-grade tumors and decelerate metastasis.

In this study, we focused on the effects of phthalazine derivatives on VEGFR activation in a GBM cell line, U251. Five different phthalazine derivatives, synthesized in Yıldız Technical University Department of Chemistry, were studied, and their effects on cellular proliferation, survival and VEGFR-2 activation were investigated and compared with the effects of vatalinib, a commercially available phthalazine derivative. Neither vatalanib nor other phthalazine derivatives did not cause significant effect on cellular proliferation and AKT, pAKT and VEGFR-2 levels as determined by WST1 cell proliferation assay and western blotting, respectively. However, all compounds significantly inhibited VEGFR-2 phosphorylation even at doses as little as 1 μ M. Akt-1 and Ak-3ep derivatives were more potent than vatalanib in repressing p-VEGFR-2 levels.

Our results clearly showed that these newly synthesized phthalazine derivatives are effective inhibitors of p-VEGFR-2 and further pre-clinical and clinal researches are required for their exploitation as anti-angiogenic agents in the treatment of GBM.

Keywords: Glioblastoma Multiforme (GBM), Vatalanib, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR), Phthalazine.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini esirgemeyip, bilgi ve tecrübeleriyle yolumu aydınlatan danışmanım Prof. Dr. Tamer Yağcı' ya,

Sentezlediği özgün bileşiklerle bu çalışmanın gerçekleşmesini sağlayan hocam Kadir Turhan ve ekibine,

Bütün çalışmam boyunca yanımda olan, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle tez çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren, araştırma disiplini kazanmamı sağlayan ve kendisiyle çalışma fırsatı bulmuş olmayı akademik hayatımın önemli bir dönüm noktası olarak hissettiğim değerli hocam Doç. Dr. Betül Karademir' e,

Tez çalışmam boyunca tüm sorularımı sabırla ve güleryüzle yanıtlayıp benimle bilgilerini hiç tereddütsüz paylaşan, saatlerini ve günlerini bana ayıran sevgili arkadaşım Ali Şahin' e,

Göstermiş oldukları desteklerle motivasyon kaynağım olmanın yanı sıra, tez çalışmam süresince tüm aksiliklerimi ve stresimi güleryüzle karşılayıp yanımda olan canım arkadaşlarım; Hüsnüye Hacıoğlu Bay' a, Ergül Mutlu Altundağ' a, Ayşe Mine Yılmaz' a, Semra Ünal' a, Gülce Sarı Kaplan' a, Cem Fidan' a ve Hamit Ekinci' ye,

Tez jürimde bulunan ve çok değerli geri bildirimlerini aldığım Prof. Dr. Uygar Halis Tazebay' a ve Yard. Doç. Dr. Ural Verimli' ye,

Hayatım boyunca bana verdikleri kocaman sevgi ve varlıklarından aldığım eşsiz güven duygusu ile her zaman yanımda ve desteklerini hissettiğim annem, babam ve canım ağabeyim Arda Arslanhan' a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLOLAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ TÜMÖRLERİ	4
2.1. Glioblastoma multiforme	5
2.1.1. GBM’ de Tarihçe ve Sınıflama	6
2.1.2. GBM’ in Beyin İçi Yerleşimi	7
2.1.3. GBM’ de Klinik Belirti ve Bulgular	8
2.1.4. GBM’ in Histopatolojik Özellikleri ve Tanısı	9
2.1.5. GBM’ de Tedavi Seçenekleri	10
2.1.6. GBM’ de Genetik ve Çevresel Faktörlerin Etkisi	11
3. ANJİYOGENEZ	14
3.1. GBM’ de Anjiyogenez	17
4. VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ	20
4.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü-2	24
4.2. Anti Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Stratejileri	25
5. TİROZİN KİNAZ MEKANİZMALARI	26
5.1. Tirozin Kinaz İnhibitörleri	28
6. FTALAZİN	30
7. GEREÇ VE YÖNTEMLER	33
7.1. Gereçler	33
7.1.1. Kullanılan Cihazlar	33
7.1.2. Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri	33

7.1.3. Kullanılan Hücre Hattı	34
7.1.4. Kullanılan Çözeltiler ve Çözeltilerin Hazırlanması	34
7.1.5. Kullanılan Kitler	35
7.1.6. Kullanılan Ftalazin Türevleri	36
7.2. Yöntemler	37
7.2.1. Hücre Çözme İşlemi	37
7.2.2. Hücre Kültürü	38
7.2.3. Hemositometrik Hücre Sayımı	39
7.2.4. Hücre Dondurma İşlemi	39
7.2.5. Ftalazin Türevi Konsantrasyonlarının Hazırlanması	39
7.2.5.1. Ftalazin Türevlerinin Farklı Konsantrasyonlarda Hücrelere Uygulanması	40
7.2.6. Hücre Canlılığının Belirlenmesi	40
7.2.7. SDS-PAGE Jel Elektroforezi ve İmmünblotlama	41
7.2.7.1. Hücrelerin Liziz Edilmesi	41
7.2.7.2. Protein Miktar Tayini	42
7.2.7.3. Jel Elektroforezi	42
7.2.8. Kullanılan İstatistik Yöntemler	44
8. BULGULAR	45
8.1. Hücre Canlılık Deneyi	45
8.2. Western Blotting Deneyi	47
9. TARTIŞMA	54
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	77

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
AA	: Anaplastik Astrositoma
AKT	: Protein kinaz B
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
c-Fms	: Koloni simüle faktör 1 reseptörü
c-Kit	: Kök hücre faktörü
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Media
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ECM	: Ekstrasellüler Matriks
EGF	: Endotelyal Büyüme Faktörü
EGFR	: Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
ERK	: Ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz
FBS	: Fetal Bovine Serum
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
G-CSF	: Granülosit koloni uyarıcı faktör
GBM	: Glioblastoma Multiforme
Grb2	: Büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein-2
GTPaz	: Guanozin trifosfataz
H&E	: Hemotoksilen ve Eozin
HCL	: Hidroklorik asit
HGF	: Hepotosit Büyüme Faktörü
IGF	: İnsülin Büyüme Faktörü
IL-8	: Interlökin-8
INK4a	: Siklin bağımlı kinaz 4 inhibitörü
KDR	: Kinaz insert domaini

MAPK	: Mitojen aktive edici protein kinaz
MR	: Manyetik Rezonans
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
mTOR	: Memeli Rapamycin Hedefi
NF- κ B	: Nükleer faktör kappa B
NO	: Nitrik Oksit
p-AKT	: Fosforlanmış AKT
p-VEGFR	: Fosforlanmış VEGFR
PBS	: Fosfat-tuz tamponu
PDGF	: Trombosit Türevli Büyüme Faktörü
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
PI	: Fosfatidil inositol
PI3K	: Fosfoinozitol-3 kinaz
PIGF	: Plasental Büyüme Faktörü
PIP ₁	: Fosfatidil inositol 1-fosfat
PIP ₂	: Fosfatidil inositol 2-fosfat
PIP ₃	: Fosfatidil inositol 3-fosfat
PTEN	: Fosfotaz/tensin homolog
Rb	: Retinoblastom geni
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TBS	: Tris-tuz
TBST	: Tris-tuz-tween
TGF	: Transforme Edici Büyüme Faktörü
Tie-2	: Anjiyopietin reseptör
TKI	: Tirozin Kinaz İnhibitörü
TNF- α	: Tümör nekrozu faktörü- α
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
WST-1	: Hücre Proliferasyon Belirteci Kiti
YTÜ	: Yıldız Teknik Üniversitesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: a) Kelebek gliomunun koronal açıdan MR görüntüsü, b) Kelebek gliomunun aksiyel açıdan MR görüntüsü, c) Karşı hemisfere geçmiş neoplastinin kesit görüntüsü.	8
2.2: GBM' de tipik morfolojik görünüm. a) Multinükleer dev hücreler (H&E x 400), b) GBM' de iskemik nekroz (H&E x 100).	9
2.3: GBM' de neoplastik dönüşüm ve gliomagenез sürecinde başlıca olaylar.	12
3.1: Vazgülogenez oluşum süreci.	14
3.2: Gliomalarda anjiyogenez oluşum süreci.	16
3.3: Anjiyogenez kontrol anahtarı. a) Anjiyogenez anahtarı kapalı, b) Anjiyogenez anahtarı açık.	16
4.1: Tümör hücrelerinden VEGF ekspresyonu.	21
4.2: VEGF ailesi ve reseptörleri.	22
5.1: VEGF ve tirozin kinaz olan VEGF reseptör yolağının şematize edilmiş hali.	28
5.2: Tirozin kinaz inhibitörlerinin, reseptör tirozin kinazların fosforilasyonunu inhibe etmesi.	29
6.1: Heterosiklik organik bir bileşik olan ftalazin' in genel formülü (C ₈ H ₆ N ₂).	30
6.2: Bir ftalazin türevi olan vatalanib' in (N-(4-chlorophenyl)-4-(pyridin-4-ylmethyl)phthalazin- 1-amine) genel formülü.	30
7.1: Ftalazin türevlerinin mpleküler yapıları. a) Vatalanib (PTK787), b) Ztf-1t, c) Ztf-2t, d) Ztf-3t, e) Ak-3ep, f) Akt-1.	37
7.2: Glioblastoma multiforme (U251 insan GBM hücreleri) hücreleri ışık mikroskobu görüntüsü. a) 4x, b)10x.	38
7.3: BCA kalibrasyon eğrisi.	42
8.1: Farklı doz aralıklarında U251 GBM hücre hattından oluşan kültürlerle uygulanan ftalazin türevleri, 24 ve 48 saat inkübasyon sonunda hücrelerin canlılık oranları.	46

8.2:	GBM hücrelerinde, uygulanan ftalazin türevlerine ve konsantrasyonlarına göre, VEGFR-2 değişimlerinin grafikleri ve bant yoğunlukları.	48
8.3:	GBM hücrelerinde, uygulanan ftalazin türevlerine ve konsantrasyonlarına göre, p- VEGFR-2 değişimlerinin grafikleri ve bant yoğunlukları.	49
8.4:	GBM hücrelerinde, uygulanan ftalazin türevlerine ve konsantrasyonlarına göre, AKT değişimlerinin grafikleri ve bant yoğunlukları.	51
8.5:	GBM hücrelerinde, uygulanan ftalazin türevlerine ve konsantrasyonlarına göre, p-AKT değişimlerinin grafikleri ve bant yoğunlukları.	53
9.1:	VEGFR-2' nin aktivasyonu ile hücre canlılığını, proliferasyonunu, migrasyonunu ve anjiyogenezi destekleyen PI3K, MAPK ve Ras yollarının aşağı akış sinyalizasyon yolu.	58

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: WHO Astrositom sınıflandırması.	7
3.1: Anjiyogenez aktivatörleri ve inhibitörleri.	17
6.1: Bir ftalazin türevi olan vatalanib' in hedef molekülleri ve deneme aşamaları.	31
7.1: Elektroforez jelinin hazırlanmasında gerekli malzemeler.	43

1.GİRİŞ

Çağımızın önemli ve tehlikeli hastalıklarından biri olan kanserin oluşmasında pek çok karmaşık mekanizma rol alır. Bu tehlikeli hastalığın mekanizmalarının aydınlatılması oldukça önemlidir. Beyin tümörlerinin yaklaşık %50' sini astrositomlar oluşturmaktadır. Astrositom alt grubu içinde yer alan anaplastik astrositom (AA) ve glioblastoma multiforme (GBM) ise erişkinlerde en sık görülen primer beyin tümörleridir [Black, 1991]. GBM' in kadınlara göre erkeklerde 1.6/1 oranında daha fazla görüldüğü tespit edilmiştir [Salcman, 2001], [Giles and Gonzales, 2001]. GBM beyin dokusunda hızlı yayılan ve onu yıkıma uğratan, malign (kötü huylu) bir tümör çeşididir. Erişkinlerde ve çocuklarda kanser sebebiyle meydana gelen ölüm nedenleri arasında ön sıralarda yer almaktadır. GBM' in doğal seyri sırasında ortaya çıkan ciddi klinik kötüleşme ve sonunda ölüm hastalığın seyri olarak görülmektedir [Salcman, 2001]. Bu tümörün çok hızlı yayılması ve çoğalması, hastalıkta nüksün çok hızlı görülmesine ve yaşam süresinin kısılmasına yol açmaktadır. Teknolojideki gelişmeler kullanılarak ameliyat öncesi (pre-op), ameliyat esnası (per-op) ve ameliyat sonrası (post-op) radyolojik görüntülemeler eşliğinde yapılan cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve destekleyici kemoterapiye karşın GBM' de ortalama hayat süresi halen 1 yıl civarındadır [Stupp et al., 2009]. GBM hastalarının 3 yıldan uzun süre yaşayanları (%3-5'lik bölümü) ise uzun dönem yaşayanlar olarak sınıflandırılmaktadır [Krex et al., 2007]. Beyin tümörlerinin tedavisinde görülen birtakım gelişmelere rağmen, GBM tedavisinde yaşam süresini anlamlı olarak uzatacak bir tedavi henüz mevcut değildir [Castro et al., 2003]. GBM tedavisinde kısa sürede etkin sonuç verecek ve yan etkileri az olan alternatif çalışmalar araştırmacılar tarafından devam ettirilmektedir. Bu çalışmalar genel olarak cerrahi rezeksiyon ve radyoterapiye destek olabilecek kemoterapötik ilaç çalışmalarıdır.

GBM sıklıkla subkortikal ak maddede gelişir ve lokalizasyon olarak temporal, paryetal, frontal ve oksipital loblarda görülür [Ohgaki and Kleihues, 2005]. Bu tümörler genellikle “Beyin Omurilik Sıvısı (BOS)” ile yayılım gösterir ve hücre düzeyinde, sınırlarının 2-3 cm uzağına kadar dağılmış olarak bulunabilirler [Burger, 1983], [Kelly et al., 1987]. Bu durum GBM tedavisi için cerrahi rezeksiyon ve radyoterapinin neden tek başlarına yeterli olmadığını ve tedaviye sistemik bir ajanın

eklenmesi gerekliliğini daha net bir şekilde açıklamaktadır. Radyoterapi sonrası uygulanan kemoterapi protokollerinde, ağırlıklı olarak birinci ve ikinci kuşak alkilleyici nitrözüre grubu ajanlar (radyomimetik ilaçlar) denenmiş, fakat GBM' in tedavisine yeterli olamamışlardır [Petersdorf and Livingston, 1994]. Günümüzde ise geniş cerrahi rezeksiyon (tümörün %95' inden fazlasının çıkarılması) sonrası uygulanan radyoterapi ve kemoterapi dışında etkinliği kesin olarak kanıtlanmış başka bir tedavi alternatifi mevcut değildir [Hentschel and Lang, 2003], [Muller et al., 1985], [Obwegeser et al.,1995]. Terapötik ajanların anti-kanser mekanizmalarının aydınlatılması GBM tedavisinde etkili bir stratejidir.

GBM tedavisinde kısıtlı fayda sağlanmasının nedenlerinden en önemlisinin apoptoza karşı gelişen direnç olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla yeni çalışmalarda bu direnç kırılmaya çalışılmaktadır. Apoptoz direncine karşı, apoptozla ilişkili genlerin (Bcl-2 vb.) ifadesini düzenleyen farmakolojik küçük moleküller ve gen tedavisi (p53'ün yedeklenmesi vb.) gibi tedavi yöntemleri potansiyel tedavi yöntemleri arasındadır. Hücrenin deoksiribonükleik asitinde (DNA) meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptoz yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır [Erdoğan, 2003], [Nagata, 1997]. Örneğin günümüzde tedavi etkinliği bazı araştırmacılar tarafından kabul görmüş ve aynı zamanda klinikte kullanılmakta olan GBM kemoterapi ajanı temozolamid, etkisini otofaji ve apoptozu uyarak gösterir [Lefranc, 2009].

PTEN/PI3-K/AKT/mTOR/NF- κ B ile Ras/Raf/MEK/ERK yollarının her ikisinin de hücre zarından hücre çekirdeğine sinyal taşıdıkları ve aynı zamanda gen anlatımında ve apoptozun engellenmesinde etkili rol oynadıkları bilinmektedir [Lefranc et al., 2005]. Bu yolların bazı elemanlarının GBM'de mutasyona uğradığı (Fosfotaz/tensin homolog (PTEN) inaktivasyonu vb.), bazılarının da gerektiğinden fazla uyarıldığı (artmış reseptör tirozin kinaz sentezi vb.) gösterilmiştir. Bu moleküllere yönelik monoklonal antikorlar ve kinaz inhibitörleri, kanser tedavisinde halen denenmektedir. Bugüne kadar, sinyal iletimi baskılayıcı ajanlar, prelinik ve klinik çalışmalarda farklı hedefler üzerine odaklanarak kullanılıp denenmiştir. Bunlar arasında; anjiyogenezi engelleyenler (bevacizumab, enzastaurin), endotelial büyüme faktörü reseptörü (EGFR), tirozin kinaz baskılayıcılar (gefitinib ve erlotinib), memeli rapamycin hedefi (mTOR) baskılayıcılar (temsirolimus, everolimus), integrin baskılayıcılar (cilengitide) ve topoizomera 1 baskılayıcılar (irinotecan) sayılabilir [Minniti et al., 2009]. GBM tedavisinde, molekül bazlı hedeflerin belirlenmesi,

tümör kök hücrelerinin karakterizasyonu, tümöral immunolojik cevapların gözlemlenmesi ve uzun dönem sağkalım gösteren olgularda genetik faktörlerin aydınlatılması üzerine çalışılmaktadır [Kanu et al., 2009]. Kısaca, GBM mekanizmaları hücresel ve moleküler düzeyde ne kadar detaylı anlaşılırsa bir o kadar tedaviye yakın olunacağı unutulmamalıdır.

Büyüme faktörleri hedef hücreleri üzerindeki etkilerini hücre zarında bulunan protein kinaz reseptörleri aracılığıyla gösterirler. Protein kinazlar hedef proteinleri tirozin, serin veya treonin bölgelerinden fosforilleyerek onların aktivitelerini değiştirirler. Biyolojik işlerde görevli proteinleri fosforilleyerek hücre büyümesi, bölünmesi ve ölümü gibi önemli hücresel faaliyetleri yönlendirirler [Chase and Cross, 2006]. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) biyolojik aktivitesini temel olarak tirozin kinaz yapısında olan üç reseptörü ile gerçekleştirmektedir. Bu reseptörler vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü-1 (VEGFR-1 (flt-1)), vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü-2 (VEGFR-2 (flk-1/KDR)) ve vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü-3 (VEGFR-3 (flt-4))' dır. Bunlardan VEGFR-3 lenf damarları üzerinde bulunur VEGF-R1 ve VEGF-R2 ise endotel hücreleri üzerinde bulunurlar [Stacker et al., 2001], [Kliche and Waltenberger, 2001]. Tümör gelişiminde önemli rol oynayan VEGF ve reseptörü kanser tedavisinde önemli ve üzerinde dikkatlice çalışılması gereken moleküllerdir. Kanser hastalarında, tirozin kinaz inhibitörlerinin tam olarak çözüm olamasa da sağkalımı arttırdıkları bilinmektedir. Bu tedavilerin araştırılması ve geliştirilmesi birçok kanser türünde olduğu gibi GBM için de son derece önem teşkil etmektedir.

Bu tez çalışmasında, Yıldız Teknik Üniversitesi (YTÜ) Kimya bölümünde kimyasal sentez yoluyla elde edilen ftalazin türevlerinin GBM kökenli U251 hücrelerinde VEGFR-2, p-VEGFR-2 (fosforlanmış VEGFR-2), protein kinaz B (AKT) ve p-AKT (fosforlanmış AKT) üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ftalazin türevlerinin hücre canlılığına olan etkileri WST-1 hücre canlılık testi ile, protein ifadesindeki değişiklikler ise Western Blotting yöntemi ile araştırılmıştır. Ftalazin türevlerinin biyolojik etkileri yine bir ftalazin türevi olan ve faz II, faz III çalışmaları devam eden vatalanib ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

2. MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ TÜMÖRLERİ

Kanser gelişmesinde, somatik hücrelerin bölünmesini ve çoğalmasını düzenleyen mekanizmalar bozulur ve denetimsiz olarak çoğalan bu hücreler kendilerinden uzakta bulunan normal dokuları istila ederler. Uzak organlara sıçrayan malign hücrelerin oluşması çok aşamalı bir süreçtir ve bu aşamaların başlama nedenleri arasında hücrede malign fenotipe yol açan genetik bozukluklar, hücre döngüsü esnasında oluşan DNA değişiklikleri, radyasyon gibi mutajen etkiler ve kalıtsal yatkınlık sayılabilir. Kanserli hücreler, büyüyüp dokuları istila etmeleri yani kontrolsüz çoğalmaları ve metastaz ile farklı bölgelere kolonize olmaları ile normal hücrelerden ayrılırlar.

Kanserli hücrelerin uzak bölgelere yayılma özellikleri yoksa ve dokuları istila etmiyorlarsa bu tür tümörler genellikle benign (iyi huylu) tümörler olarak isimlendirilirler. Epitelyal tabakada kalıp, destek dokuya geçemeyen tümörlere in-situ tümörler denir [Franks and Teich, 1998]. Kan damarlarında anjiyogenez oluşturan tümör hücreleri ise uzaktaki organlara taşınırlar ve vücudun başka bölgelerine metastaz yapabilirler. Bu tür tümörler aynı zamanda büyüebilmek için kan akımıyla sağlanan besinlere ihtiyaç duyarlar ve kan damarlarının tümör içinde büyüyüp dallanabilmesini sağlayan proteinler üretirler. Bu tip tümörlere ise malign tip tümörler denir [Hu et al.,1993].

Tüm hastalıklarda olduğu gibi kanserde de erken tanı çok önemlidir. Tanı konulduktan sonra amaç bireyin normal hücrelerine mümkün olan asgari zararı vererek tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını engellemek ve yok etmektir. Bu doğrultuda kanser araştırmalarındaki en önemli nokta kanserli hücrelerin normal hücrelerden farklı özelliklerinin aydınlatılması ve kanser hücrelerine selektif olacak yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesidir. Kanser hastalığının radikal bir tedavisi olmamasından dolayı bir çok araştırmaya gereksinimi vardır.

Merkezi sinir sistemi (MSS) tümörleri tek bir patolojik hücreden gelişirler ancak ek mutasyonlar sonucu hücreler heterojenite kazanabilirler. MSS tümörlerinde klinik belirtiler, tümör kitlesinin irritasyon ve bası gibi lokal etkisiyle oluşturduğu normalden fazla basınç, ödem, hemoraji (kanama) gibi etkilerine bağlı olarak ortaya çıkar. Tüm MSS tümörleri potansiyel ve biyolojik açıdan maligndir fakat nöron dışı

metastazları nadirdir [Breakfield and Stern, 1986]. MSS nörogliaları astrositler, oligodendrositler, mezoqlialar ve ependim hücreleri olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır.

MSS’ de görülen tümörler, primer beyin tümörleri ve metastatik (sekonder) beyin tümörleri olmak üzere iki grup altında toplanabilir. MSS’ deki primer beyin tümörleri genel olarak gliomalar olarak isimlendirilmektedir. Gliomaların ise yarısını astrositlerden köken alan astrositomlar oluşturmaktadır [Yaltkaya vd., 1998]. Astrositomaların boyutları beynin yarım kürelerinden birini tamamen kaplayacak kadar büyük veya bir kaç cm kadar küçük olabilir [Robbins and Kumar, 1987]. GBM, glial kökenli bir tümör olup “Dünya Sağlık Örgütü” (WHO) sınıflandırmasında astrositom grubunun içinde yer alır.

2.1. Glioblastoma Multiforme

GBM glial kökenli tümörlerin en anaplastik şekli ve astrositomların, WHO sınıflandırmasına göre, en yüksek derecesi için kullanılan isimdir [Bruner, 1994]. Burdan yola çıkarak GBM’ in gliomların en malign tipi olduğu söylenebilir. Bu tümörün biyolojik özellikleri, belirgin proliferasyon, aktif invazyon ve zengin anjiyogenez ile tanımlanmaktadır [Mitsutoshi et al., 2011]. GBM’ in genel olarak köken aldığı hücreler astrositlerdir (%80) ve astrositomların yaklaşık yarısını GBM hücreleri oluşturur [Bruner, 1994], [Jones and Steart, 1991]. Astrositomlar başlangıçta düşük dereceli olmalarına rağmen zamanla bir GBM hücreğine dönüşebilirler.

Beyin parankiminden primer olarak başlayan GBM, farklı tümörlerin (anaplastik astrositoma, oligodendroglioma, karışık tümör veya ependimoma) transformasyonları ile ortaya çıkabilir fakat daha öncede belirtildiği gibi GBM genel olarak astrositomlardan köken alır. GBM tümöründeki multiforme terimi tümörün heterojenitesinden dolayı kullanılmaktadır ve makroskobik olarak düzensiz bir yapı gösterirler. Kistik dejenerasyon, hemoraji ve nekroz tümöre alacalı bir renk verir. Mikroskobik olarak ise küçük nekrotik alanların birleşimleri tümörün merkezinde nekroz oluşturur ve endotel hücreleri arasındaki bağlantı zayıftır. Tümöral hücrelerle sarılmış nekroz alanlarında vasküler ve endotelial proliferasyon, endotelial hiperplazi (hücre sayısının artmasına bağlı büyüme) görülür [Carroll et al., 1995].

Astrositlerin, hücre büyümesi, farklılaşması ve fonksiyonu için gerekli olan p53 geni, retinoblastom geni (Rb), siklin-bağımlı kinaz 4 inhibitörü geni (INK4a) ve PTEN gibi tümör supresör genlerini kaybedip gliomagenез sürecine girdikleri tespit edilmiştir [Tremont-Lukas and Gilbert, 2003], [Holland, 2001], [Konopka and Bonni, 2003]. 10. kromozomun kısa kolundaki heterozigositenin kaybı; PTEN geninin inaktivasyonuna neden olmakta ve sonuç olarak bir serin/treonin kinaz olan AKT aktiflenmekte ve artmış hücre proliferasyonu ortaya çıkmaktadır [Kleihues and Ohgaki, 1999], [Fujisawa et al., 2000], [Tremont-Lukas and Gilbert, 2003]. Düşük dereceli astrositomların p53 proteini, mutasyona bağlı olarak inaktiftir. GBM'e ilerleme ise, Rb ve PTEN genlerinin mutasyonuna ve INK4' ün artmış üretimine bağlıdır [Reis vd., 2000].

2.1.1. GBM' de Tarihçe ve Sınıflama

1860' da Rudolph Virchow literatürde ilk kez 'gliom' sözcüğünü kullanmış ve beyin tümörleri sınıflandırmasında gliomları ayrı bir grup olarak adlandırmıştır. 25 Kasım 1884 tarihinde ise, Dr. Rickman Godlee ve Dr. Bennett intraserebral bir gliom olgusunun başarılı bir şekilde ameliyat edildiğini bildirmişlerdir [Gutin and Posner, 2000]. Tarihte ilk kez modern beyin tümörü cerrahisi gerçekleştirilmiştir. Bu gelişmeyle beraber nöro-onkoloji tarihi başlamıştır.

1926 yılında Bailey ve Cushing tarafından yapılan gliom sınıflandırması 14 ayrı grup içermektedir. 1949 yılında Kernohan tarafından yapılan bir sınıflandırmada ise MSS tümörleri astrositom, ependimom, oligodendrogliom, nöroastrositom ve medullablastom olmak üzere beş gruba ve glial tümörlerde derecelerine göre kendi içinde 4 gruba ayırmıştır. 1950 yılında gliomları, astrositom, anaplastik astrositom ve GBM şeklinde derecelerine göre ayıran araştırmacı ise Ringertz' dir. 1980 yılında ise Doumas ve Duport hücrelerin morfolojik özelliklerine dayanan 4 dereceli sistemi ileri sürmüşlerdir. Son olarak ise 1993 yılında, MSS tümörleri WHO tarafından yeniden düzenlenmiş ve bu sınıflama, 2000 yılında tekrar modifiye edilmiştir. WHO tarafından yapılan son sınıflandırmada astrositomlar 4 ayrı grupta toplanmıştır (Tablo 2.1.).

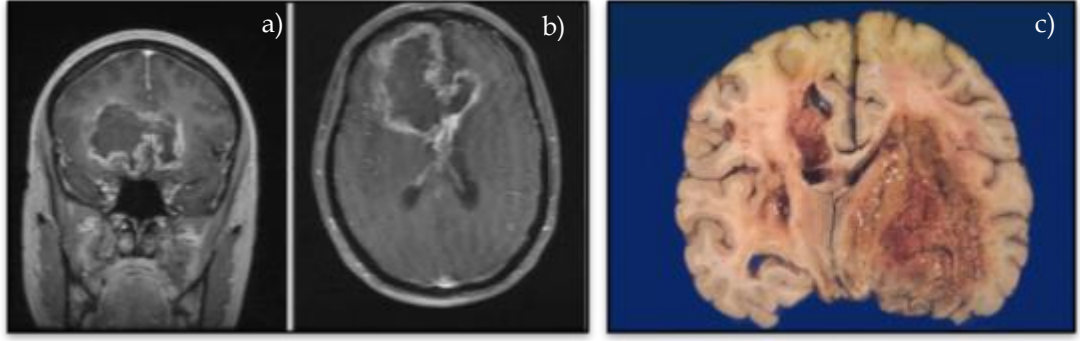
Tablo 2.1: WHO Astrositom Sınıflandırması.

ASTROSİTOMLAR	WHO DERECE	GENEL ÖZELLİKLERİ
Pilositik Astrositom	I	- Genellikle çocuklarda ve gençlerde görülürler. - Beyincikte yerleşmiş olarak bulunurlar. - Çok yavaş büyürler.
Astrositom	II	- Hücreler arasında değişik kalınlık ve yoğunluk görülmektedir. - Hücrelerin alt kısmında karakteristik olan fibriller bir zemin bulunur.
Anaplastik Astrositom	III	- Oldukça hızlı çoğalırlar. - Yakınında bulunan sağlıklı dokuları işgal ederler.
Glioblastoma Multiforme	IV	- Gliomların en malign tipidir.

2.1.2. GBM' in Beyin İçi Yerleşimi

GBM, genellikle serebral hemisferin beyaz cevherinde ortaya çıkar. Beynin temporal ve frontal lobları GBM' in en sık görüldüğü bölgelerdir fakat oksipital ve paryetal bölgelerdede GBM' e rastlanmıştır. Örneğin bazı olgularda tümoral lezyon santral paryetal bölgeyi de kapsamaktadır. GBM hücrelerinin bazal ganglia' ya ve korpus kallosumdan karşı hemisfere geçişi sık görülür. Bu tür durumlarda beyindeki yerleşimi kelebek görüntüsü aldığı için buna kelebek gliomu adı verilir [Dziurzynski et al., 2012] (Şekil 2.1.) [Web1, 2016]. Nöroradyolojik olarak ise ortasında nekrotik bir alan bulunan ve düzenli bir kontrast tutulumu göstermeyen, ödemli bir kitle görüntüsü ortaya çıkmaktadır.

GBM çok geniş alanlara kadar uzanırsa cerrahi rezeksiyon hem zorlaşır hemde total rezeksiyon imkansız hale gelir. Cerrahide, beynin birden fazla fonksiyonel alanının cerrahi işleme uğraması beyni zarara uğratabilir [Salcman, 2001]. Tümörün lokalize olduğu yer anatomik olarak riskli bölge içermiyorsa tümör mümkün olduğunca geniş bir rezeksiyon ile çıkarılmaya çalışılır.



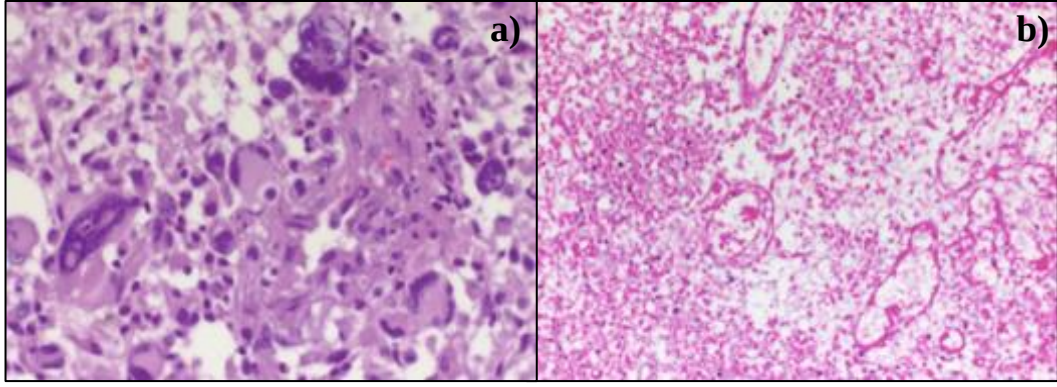
Şekil 2.1: a) Kelebek gliomunun koronal açıdan MR görüntüsü, b) Kelebek gliomunun aksiyel açıdan MR görüntüsü, c) Karşı hemisfere geçmiş neoplastinin kesit görüntüsü.

2.1.3. GBM' de Klinik Belirti ve Bulgular

GBM' de klinik belirtiler öncelikle tümörün beyin içinde bulunduğu bölgeye bağlıdır. Bunun dışında diğer hacim kaplayan lezyonlardan ayırt edilmeleri son derece güçtür. En önemli klinik belirtileri beyin içi basıncı artışına bağlı olarak; kusma, baş ağrısı, genel serebral fonksiyon bozukluğu, denge bozukluğu, ense sertliği, uykuya meyil, 3. ve 6. kranial sinir tutulumu ve jeneralize nöbetleridir [Aroichane, 1983]. Lezyon temporal lob veya frontoparyetal bölgede ise olgularda epileptik nöbet görme olasılığı yüksek olmasına rağmen olguların %30' unda hali hazırda epileptik nöbet görülür [Salcman, 2001]. Olgularda göz dibi değişiklikleri, parezi, pleji, davranış bozuklukları başta olmak üzere tümörün yerleşim yerine göre değişen bir çok bulgu karşımıza çıkabilir. Frontoparyetal ve talamik bölgeleri tutan lezyonlarda genellikle kuvvet kaybı ve duyu kaybı görülürken frontal lobu etkileyen GBM olgularında kişilik değişikliği, hafıza kaybı, muhakeme ve düşünce bozukluğu görülebilmektedir. GBM oksipital lobda nispeten daha az görülür bu nedenle olgularda görme bozukluğuna az rastlanır. GBM de baş ağrısı, nöbet ve hemiparezi üçlüsünün birlikte görülmesi hastaların yarısından daha azında ortaya çıkmaktadır [Salcman, 2001].

2.1.4. GBM' in Histopatolojik Özellikleri ve Tanısı

Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) ve Bilgisayarlı Tomografi (BT) tetkikleri, bütün MSS tümörleri ve GBM tanısında önemli olan radyolojik incelemelerdir. GBM için karakteristik olan bulgular; lezyon çevresindeki kontrast madde tutulumu, peritümöral ödem ve lezyon merkezindeki nekrozla uyumlu hipointens alanların bulunmasıdır [Gonzales, 2001]. Pozitron Emisyon Tomografisi (PET) ise nüks GBM olgularını, radyasyona bağlı nekrozdan ayırmak için kullanılır [Ishikawa et al., 1993].



Şekil 2.2: GBM' de tipik morfolojik görünüm. a) Multinükleer dev hücreler (H&E x400), b) GBM'de iskemik nekroz (H&E x100).

GBM, şekil 2.2.a) ve 2.2.b)' de olduğu gibi basit ve standart şekilde Hemotoksilen ve Eosin (H&E) boyası tekniği kullanılarak diğer lezyonlardan hücre morfolojisi ve doku yapısı açısından ayırt edilebilir [Süren, 2007]. GBM hücreleri farklı şekillere ve büyüklüklere sahip olmakla birlikte genellikle koyu renkli nükleuslara ve az miktarda pembe sitosollere sahiptirler. GBM hücrelerinin bu yapıları multiforme terimini açıklamaktadır [Bigner, 1981]. Tümör hücrelerinde genellikle yüksek bir mitotik aktivite görüldüğü için nekroz alanları çevresindeki hücreler pseudopalizadik dizilim ve vasküler yapılar etrafında ise konsantrik dizilim gösterirler. Hücrelerin bir diğer önemli özelliği ise vasküler endotelial proliferasyon göstermeleridir [Burger and Green, 1987]. Gümüş boyama tekniği kullanılarak hücre çekirdeği içindeki ribosomal DNA belirlenebilmekte ve aktif transkripsiyon ve dolayısıyla tümör proliferasyonu hakkında bilgi edinilebilmektedir [Hara et al., 1990]. Bunun dışında marker olarak kullanılan bir başka protein ise Ki-67 antijenidir. Ki-67 antijeni hücre proliferasyonu ile ilişkili bir çekirdek proteindir. Hücre

döngüsünün G0 fazı dışında bütün bölümlerinde tespit edilebilmekte ve ilgili tümörün histolojik derecesi hakkında bilgi vermektedir.

2.1.5. GBM' de Tedavi Seçenekleri

GBM tedavisinde 1970' lerden başlayarak kemoterapötik ajanlar kullanılmıştır. Kullanılan en eski ilaçlar alkilleyici nitrozüre grubu ajanlardır. 1994' de Salcman ve arkadaşlarının yayınladığı çalışmada nitrozüre kemoterapinin, beklenenden uzun süre sağ kalan olgularda orta derecede etkisi olduğu gösterilmiştir [Salcman, 1994]. Günümüzde ise temozolamid (ikinci kuşak alkilleyici ajan), GBM tedavisinde cerrahi ve radyoterapi sonrası standart tedavi protokolü içine girmiştir [Newlands et al., 2003].

Gen tedavisinde son yıllarda önem kazanmasına rağmen tedavi edici genin, tümör hücrelerine yetersiz dağılımı ve sadece tek bir geni onarabilmek gibi yetersiz yönlerinin olması bu tedavi yönteminin başlıca dezavantajlarından. Şu an için gen tedavisi GBM için kabul edilebilir bir klinik başarıya ulaşamamıştır. GBM olgularına, gen tedavisi amacıyla pek çok strateji uygulanmıştır. Bu stratejiler arasında eksik genin yerine koyulması (örn. tümör supressör genleri), intihar genlerinin tümör genomuna sokulması, onkolitik virüsler gibi ajanları tümör hücrelerine yerleştirerek tümör hücrelerinin ölümünün sağlanması ve mutasyona uğrayarak ekspresyonu artmış genlerin etkilerini kaldırabilecek diğer genlerin tümör hücrelerine yerleştirilmesi (antisense metotları) metodları sayılabilir [Kanzawa et al., 2003]. Gen terapisinin dezavantajları yanında avantajları da vardır. Bunlardan en önemlisi düşük toksisite oranına sahip olmasıdır. Günümüzde kök hücre çalışmaları, immünoterapi, gen tedavisi, biyolojik tedavi ve brakiterapi (içsel radyasyon) gibi alternatif tedaviler deneme aşamasında olup klinikte fayda sağlayacak bir tedavi yöntemi henüz bulunamamıştır.

GBM tümörünün invaziv yapısı, uzak yayılım göstermesi, radyorezistan olması ve lokal rekürrens oranına sahip olması bu tümörün tedavisinde önemli bir ilerleme kaydedilmemiş olmasına neden olmuştur [Burger and Green, 1987], [Kornblith and Welch, 1993], [Nazzaro, 1990]. Son yıllarda GBM tanısının non-invaziv yöntemlerle konulabilmesine, daha güvenli ve başarılı cerrahi işlemlere ve adjuvan olarak uygulanan radyoterapi ve kemoterapiye rağmen ortalama yaşam halen bir yıl civarındadır. Cerrahi rezeksiyon ile sağlanan hücre sayısındaki azalma tümör

hücrelerinin ortadan kalkmasına ve yardımcı tedavi yöntemlerinin etkisinin artmasına katkıda bulunduğu gibi kafa içi basıncının düşmesine ve nörolojik fonksiyonların iyileşmesine de katkıda bulunur [Hentschel and Lang, 2003], [Salcman, 2001].

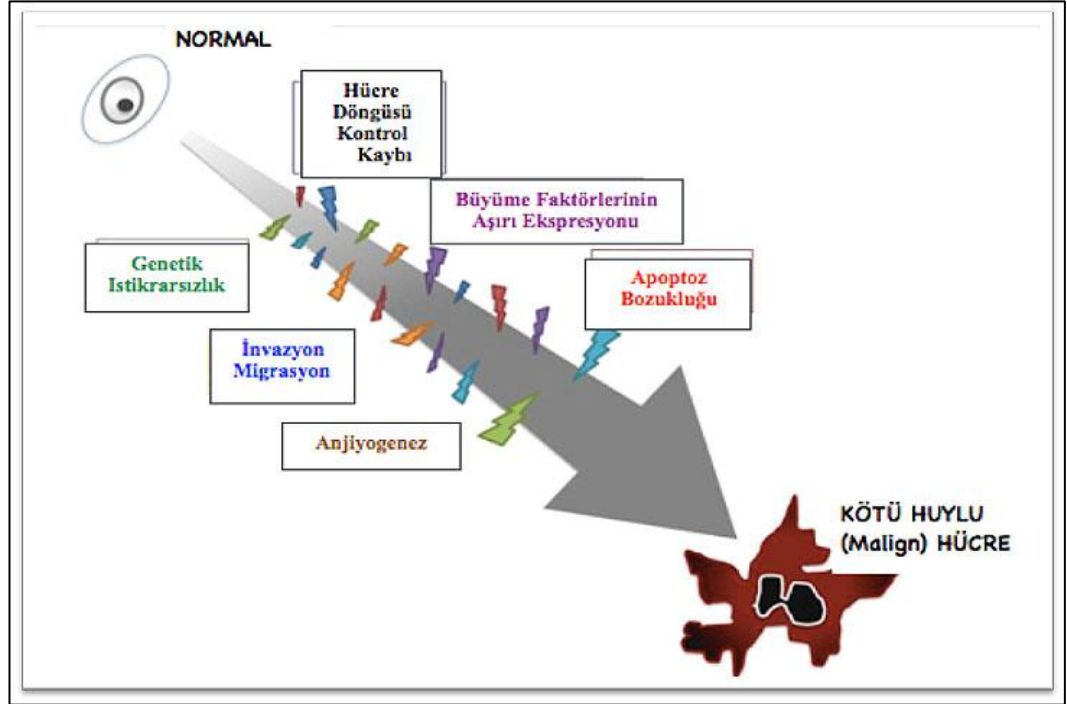
In vitro olarak hücre düzeyinde yapılan çalışmalar hücrelerin biyolojik ve metabolik özelliklerinin değerlendirilmesini sağlar. Ayrıca çok sayıda hücre varlığı araştırmaların farklı yönlerle ele alınması ve sınırsız sayıdaki tedavi ajanlarının değerlendirilmesi için önemli bir avantajdır. Kanseri tedavisindeki sorunlardan en önemlisi tümör hücrelerindeki dirençtir [Bacciocchi and Gibelli, 1992]. Dirençli kolonlar muhtemelen hastalığın progresyonundanda sorumludurlar. Bu nedenle direnç mekanizmalarını araştıran çalışmalarda tümörlerden elde edilen hücre dizilerini kullanmak daha akıllıca ve daha pratik gözükmemektedir [Kruse and Mitchell, 1992], [Paganuzzi and Marroni, 1994]. Kısacası tümör hücre dizileri hem tedavi ajanlarının geliştirilmesi için hem de moleküler genetik tedavi yaklaşımları için *in vivo* çalışmalardan daha uygun modellerdir [Bocchini and Casalone, 1991]. Bugüne kadar kemoterapötik ilaçlarla yapılan tedavilerde büyüme faktörleri (VEGF, EGF, IL-8), reseptör tirozin kinazlar (KDR, flt-1, tie-2), integrinler, hücre adezyon molekülleri, proteazlar, membran glikoproteinleri (PSMA, ED-B, FB5) enzimler, DNA ve mikrotübüller hedef alınarak çalışılmıştır.

2.1.6. GBM’ de Genetik ve Çevresel Faktörlerin Etkisi

GBM genel olarak herhangi bir çevresel risk faktörü veya ailesel yatkınlık ile ilişkili olmayan bir tümördür. Fakat Salcman tarafından 2001 yılında yapılan araştırmada Ailesel Kanseri Sendromu’nda glial tümörlerin insidansında da artış tespit edilmiştir. Onkogenlerin normalden fazla üretilmesinin ise GBM vakalarında yaşam süresiyle ters orantılı olduğu gösterilmiştir [Salcman, 2001]. Bununla beraber p53 genindeki mutasyonun, dominant olabileceği öne sürülmüştür ve p53, GBM oluşumunda önemli bir faktör olmuştur [Nozaki et al., 1999]. Primer GBM gözlenen olgular genellikle 60-70 yaş aralığındadır. Daha genç popülasyonda ise genellikle sekonder GBM gözükür. Özellikle tümör supresör genlerin mutasyona uğramasıyla düşük dereceli astrositomlardan GBM oluşmaktadır [Kleihues and Ohgaki, 1999]. Primer ve sekonder GBM’lerdeki genetik değişiklikler aynı değildir. Sekonder GBM’lerde sık olarak p53 mutasyonu gözükürken, bir tümör supresör geni olan PTEN’ in

eksikliği ve EGFR normalden fazla üretimi primer GBM lerde daha sık gözükür [Yoon et al., 2001], [Fujisawa et al., 2000], [Tohma et al., 1998]. Primer GBM' ler baştan itibaren hızla gelişir ve yüksek dereceli lezyonlar ortaya koyar. Buna karşın, sekonder GBM' ler daha yavaş gelişir [Mitsutoshi et al., 2011].

Literatürdeki çalışmalar, tek bir genetik mutasyonun değil, birden fazla mutasyonun GBM oluşumunu tetiklediğini göstermiştir. GBM aynı zamanda genetik olarak kalıtsal bir geçişe sahip değildir. Petrokimyasal maddeler ve radyasyon dışında GBM oluşumunda etkisi olan çevresel bir faktör ise henüz bilinmemektedir [Salcman, 2001]. Fakat son yirmi yılda birçok olayın kombinasyonunun GBM' e neden olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya çıkmıştır (Şekil 2.3.), [Mitsutoshi et al., 2011].



Şekil 2.3: GBM' de neoplastik dönüşüm ve gliomagenез sürecinde başlıca olaylar.

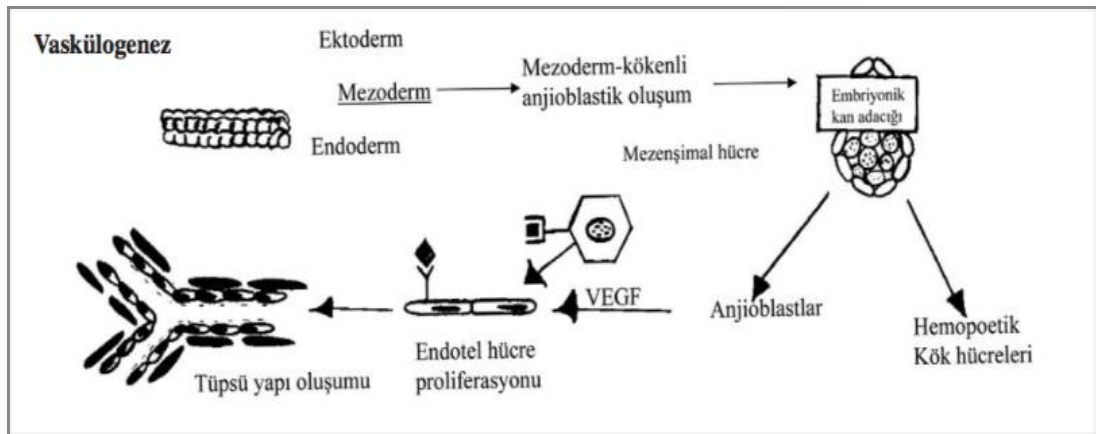
Gliomagenез sürecindeki ilk olay, hücrelerin hücre döngüsündeki kontrol noktalarının mutasyona uğramasıdır. Bunlar arasında en dikkat çeken hücre döngüsü kontrol noktası G1-S noktasıdır. Tüm yüksek dereceli tümörlerin (Anaplastik astrositoma, GBM gibi,) neredeyse hepsi G1-S kontrol noktasının mutasyonuna sahiptir. İkinci olay, büyüme faktörlerinin ve reseptörlerinin aşırı sentezlenmesidir. EGF, PDGF, bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF, FGF-2), dönüştürücü büyüme

faktörü (TGF) - α ve insülin benzeri büyüme Faktörü (IGF) -1 GBM'de aşırı eksprese edilir ve bu nedenle neoplastik hücrelere bir büyüme avantajı sağlar. Bunlardan EGF ve PDGF GBM'lerde en iyi karakterize edilen büyüme faktörleridir [Wong et al., 1987], [Westermarck et al., 1995]. Malign gliomalar vasküler tümörlerdir bu nedenle GBM' e ilerlemede anjiyogenez oluşumu da önemli bir özelliktir. Anjiyogenez oluşumu MRG' de hızla büyümekte olan tümörleri çevreleyen halka benzeri yapılar olarak görülürler [Brat and Mapstone, 2003]. En çok GBM' de olmak üzere malign gliomların hepsinde fazla miktarda anjiyogenik moleküle rastlanır [Louis, 2006]. VEGF düşük dereceli astrositomlarda rastlanmayan fakat GBM gibi malign tümörler için önemli bir endotel hücre mitojenik faktörüdür. GBM' in bir diğer önemli özelliği ise invaziv olmasıdır. ECM moleküllerinin ve hücre yüzey reseptörlerinin ekspresyonu, sinyal iletimini değiştirip GBM' deki invazivliği etkileyebilir [Rao, 2003], [Onishi et al., 2011]. Glioma hücreleri, yalnızca çoğalmayı arttırmak için değil, aynı zamanda apoptozda ortadan kaldırmak için çeşitli değişikliklere uğrar. Gliomagenез sürecinde en önemlisi p53 olmak üzere birçok gen apoptozda rol oynar [Chao et al., 2000], [Sarkar et al., 2005]. En son hücre içi olay ise genetik istikrarsızlıktır. Birçok tümörün özelliği olan genetik istikrarsızlık, daha fazla genomik hasarı teşvik eder ve böylece daha malign klonların oluşmasına izin verir [Leung et al., 2000]. Bu nedenle, "genomun koruyucusu" olarak da bilinen p53'teki mutasyonlar, genomik instabilite yoluyla tümör ilerlemesine neden olabilir (Şekil 2.3.).

3. ANJİYOGENEZ

Vaskülogenez ve anjiyogenez mekanizmalarının her ikisi de farklı yollarla kan damarı oluşumunu sağlamaktadır. Vaskülogenez mezoderm kökenli vasküler ağı oluşturulması anlamını taşımaktadır. Hemanjiyoblastların kan adacıkları olarak kümelenmesi ile vaskülogenez başlamış olur. Bu mekanizmada mezoderm kökenli endotel hücre proliferasyonu ile tüpsü yapılar oluşturulur [Coffin and Poole, 1988], [Kılıç vd., 2005], (Şekil 3.1.), [Douglas et al., 1998].

Önceleri vaskülogenezin sadece embriyogenezde rol aldığı düşünülmüştür. Daha sonra, hematopoetik progenitör hücrelerin, endotel hücreye embriyogenez sonrasında da dönüşebildikleri, yeni kapiller oluşumunda rol aldıkları ve yara iyileşmesi, iskemik dokunun tekrar damarlanması gibi süreçlerde vaskülogenezin önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Endotel hücreleri embriyoda anjiyoblastlardan, erişkinde ise kemik iliğindeki endotelyal öncül hücrelerden köken almaktadır. Buna karşılık anjiyogenez ise aldığı sinyallerle zaten var olan damarlardan yeni kapiller kan damarı oluşumudur [Hanahan and Folkman, 1996]. Embriyonik dönemde meydana gelen vaskülogenez, genetik olarak programlanmıştır. Sonraki dönemlerde ise hemodinamik değişiklikler ve çevresel faktörler vaskülogenez üzerine etkilidir. Doğum sonrası dönemde, vaskülogenez için en önemli uyarının hipoksi olduğu düşünülmektedir.

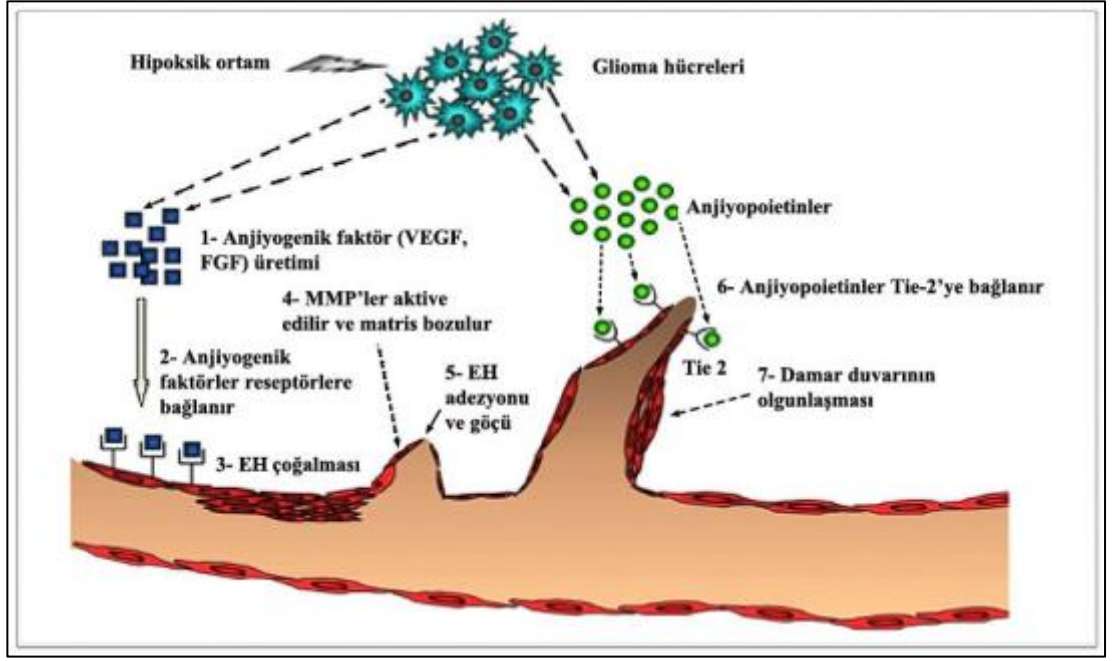


Şekil 3.1: Vaskülogenez oluşum süreci.

Anjiyogenez glioma hücreleri tarafından salınan anjiyogenik faktörler tarafından başlatılır. Bu faktörler, endotel hücre proliferasyonunu ve göçünü tetikler.

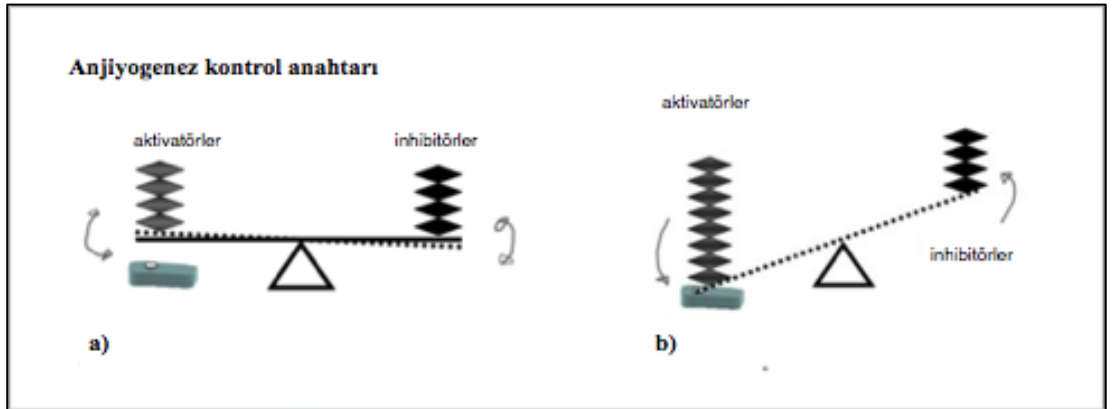
ekstrasellüler matriksin (ECM) bozulmasından sonra, endotel hücreleri tüp şeklinde bir lümene yerleştirilir ve son olarak yeni damar duvarı olgunlaşır. Anjiyogenezin sürecinde endotel hücrelerinin sinyallere karşı oluşturduğu belli başlı yanıtlar vardır. İlk olarak endotel hücrelerinin ana kapillerdeki boşlukta ilerlemesini sağlayacak olan proteazlar üretilir. Proteazlar bu aşamada bazal membran ve ECM' nin yıkımını sağlar. Bu aşamadan sonra endotel hücreleri sinyal kaynağına doğru hareket eder ve proliferasyon olurlar. Bir sonraki aşamada ise endotel hücreleri proliferasyon oldukları yerde bir lümen oluşturacak şekilde birbirlerine tutunurlar. Son olarak yeni bazal membranın oluşmasıyla anjiyogenezin tamamlanır [Kılıç vd., 2005], (Şekil 3.2.), [Mitsutoshi et al., 2011].

Anjiyogenezin vucutta fizyolojik ve kontrol altında olan bir süreç olabileceği (embriyogenezin, yara iyileşmesi vb...) gibi patolojik ve kontrolsüz gerçekleşen (göz hastalıkları, nöroblastom, melanom, glioblastom, inflamatuvar hastalıklar vb...) durumlarda da ortaya çıkabilmektedir [Carmeliet, 2003]. Anjiyogenezin oluşması pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörlerin arasındaki dengenin bozulmasıyla meydana gelir. Bunun dışında vucutta anjiyogenezin yetersiz kaldığı (periferik arter hastalıkları, gecikmiş yara iyileşmesi vb.) durumlarda söz konusudur [Issa et al., 1999], [Yin et al., 2002]. Anjiyogenezin mekanizması, hücrelerden salınan sitokinler, büyüme faktörleri ve bunların reseptörleri ile çalışmaktadır [Lawrence and Diegelmann, 1994], [Hu et al., 1993]. VEGF, fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) ve endotelial büyüme faktörü (EGF) gibi büyüme faktörleri anjiyogenezin aşamalarının ortaya konulmasında en önemli faktörlerdir.



Şekil 3.2: Gliomalarda anjiyogenez oluşum süreci.

Anjiyogenez aktivatörler ve inhibitörler arasındaki denge ile düzenlenir. Tümör boyutu 2-3 mm' yi geçtiği andan itibaren anjiyogenez uyarılır. Bununla beraber bir diğer önemli nokta ise anjiyogenik aktivatörlerin aşırı aktivitesi ve anjiyogenez inhibitörlerinin negatif regülasyonu anjiyogenezin başlaması için gerekli şartlardan biridir (Şekil 3.3 a), b)), [Nishida et al., 2006].



Şekil 3.3: Anjiyogenez kontrol anahtarı. a) Anjiyogenez anahtarı kapalı, b) Anjiyogenez anahtarı açık.

Anjiyogenez süreci mikrovasküler düzeyde pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki dengeye bağlıdır. Bu faktörler tümör hücreleri, fibroblastlar ve monositler gibi ortamdaki hücrelerden veya bazal membran ve ECM'

nin yıkımı sonrasında ortaya çıkabilirler. Anjiyogenezi inhibe eden ve aktive eden faktörlerden yaygın olarak bilinenler Tablo 3.1’ de gösterilmektedir [Erdem ve Gündoğdu, 2005].

Tablo 3.1: Anjiyogenez aktivatörleri ve inhibitörleri.

ANJİYOGENEZİ İNHİBE EDEN FAKTÖRLER	ANJİYOGENEZİ AKTİVE EDEN FAKTÖRLER
- Trombospondin	- Vasküler endotelyal büyüme faktörü
- Anjiyostatin (plasminojen kısmı)	- Ana Fibroblast büyüme faktörü
- Endostatin (kollajen XVIII kısmı)	- Asit Fibroblast büyüme faktörü
- AaAt (antithrombin III kısmı)	- Platelet kaynaklı büyüme faktörü
- Vazostatin	- Hepatosit büyüme faktörü
- Prolaktin	- Epidermal büyüme faktörü
-Troponin 1	- İnsülin-benzeri büyüme faktörü
- Alfa interferon	- Leptin
-Gamma interferon	- Tümör nekrosis faktör a
- İnterlökin 12	- Plasental büyüme faktörü
- Fibronektin	- Anjiyopoietin-1
- Metalloproteinaz doku inhibitörleri	- Anjiyogenin
- Plazminojen aktivatör inhibitör 1	- Pleotrofin
- Platelet faktör 4 (PF 4)	- İnterlökin 8
- Pigment epitelyal hücre faktörü	- Granulosit-koloni uyarıcı faktör
- Retinoik asit	- Proliferin
- Anjiyopoietin-2	

3.1. GBM’ de Anjiyogenez

Folkman 1971’de tümör gelişimini anjiyogeneze bağlayarak, anjiyogenez konusundaki asıl gelişimi başlatmıştır [Folkman, 1971]. Folkman tümörlerin 2-3 mm çapa kadar oksijen ve besin ihtiyacını difüzyon ile karşıladığını daha sonra ise olgun konakçı damarlarından kendisine doğru yeni kapiller damarların anjiyogenezi başlatabildiğini ifade etmiştir. Böylelikle tümöral kitle büyüyüp metastaz oluşturabilecektir.

Kanser hücreleri kontrolsüzce çoğalmadan önce oldukça uzun ve sessiz bir dönem geçirirler. Tümör hücreleri bulundukları dokuda yeni kan damarı oluşumuna ihtiyaç duymadan 2-3 mm büyüklüğe kadar ulaşabilirler [Folkman, 2006]. Bu büyüklükten fazla büyüklüğe ulaşabilmeleri için yeni kan damarı oluşumuna (anjiyogenez) ihtiyaçları vardır ve yeni mikrovasküler yapılar gelişmediği sürece tümör gelişiminin duracağı ifade edilmiştir. Tümörler çok sayıda anjiyogenik faktör salgılar ve bunların çoğu endotel hücrelerindeki tirozin kinaz reseptörlerine bağlanırlar. Sonuç olarak anjiyogenez meydana gelir [Folkman, 2006], [Liu and Deisseroth, 2006]. Bu anjiyogenik faktörlerin başlıcaları; FGF-1, -2, -3, -4, EGF, interlökin-8 (IL-8), granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF), transforme edici büyüme faktör-a, -b (TGF-a, -b), hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve VEGF' dir.

Anjiyogenezin sağladığı tümör büyümesi ölümcül etkilerin ana mekanizmasıdır. Yüksek dereceli gliomlarda (anaplastik astrositom, GBM gibi) neovaskülerizasyon ve vasküler endotel proliferasyon sık görülür. Gliom damarlanmasında düz kas hücrelerinin proliferasyonu önemlidir [Haddad et al., 1992]. Brem ise astrositomlarda damar proliferasyonunun tümör derecesi ile bağlantılı olduğunu; düşük yaşam süresinin yüksek skor ile ilişkili olduğunu ifade etmiştir [Brem, 1976].

GBM anjiyogenezinde esas rollerden birine VEGF sahiptir. VEGF gen ailesi 6 glikoproteinden meydana gelir bunlar; VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve plasental büyüme faktörü (PIGF)' dür. VEGF-A (VEGF olarak ta adlandırılır), iki tirozin kinaz reseptörü, VEGFR-1 ve VEGFR-2 ye bağlanır. Anjiyogenezdeki esas rol VEGFR-1 ve VEGFR-2 üzerindedir. VEGF-B ve PIGF, VEGFR-1' e; VEGF-E, VEGFR-2 ye; VEGF-C ve -D, VEGFR-3 'e bağlanır ve VEGFR-3 esas olarak lenfanjiyogenezde rol alır. [Jo et al., 2012]. VEGFR-2 endotelial hücre proliferasyonunu artırır, VEGFR-1'in aktivasyonu ise VEGFR-2 ilişkili hücre büyümesini indükler [Rahimi et al., 2000]. VEGFR-1 ve VEGFR-2, GBM tümörögenezinde Ras/MAPK ve PI3/AKT sinyal yollarında aktif rol oynarlar. VEGFR-1 endotel hücrelerinin yanı sıra bazı tümör hücrelerindende eksprese edilir. VEGFR-1' in esas aracılık ettiği durum VEGF' in uyardığı endotel migrasyonudur. VEGFR-2 endotel hücreleri, primitif hematopoietik kök hücreler ve bazı tümör hücreleri ile az sayıda erişkin hücrelerinde eksprese edilir ve VEGF ligandlarının (VEGF-A, VEGF-C ve VEGF-D) endotel hücrelerinin proliferasyonu, sağ kalımı ve damar geçirgenliği etkilerine aracılık eder. Tümör anjiyogenezinde

başlıca sorumlu VEGFR-2 dir. VEGFR-2 bloke edilirse hücre migrasyonu, proliferasyonu, sağkalımını ve damar permeabilitesi azalır. [Kaliberov et al., 2004]. VEGF ekspresyonu GBM' lerde normalden 10 kat fazla bulunmuştur. VEGF' in fazla ekspresyonu vasküler dansite ile doğru orantılıdır. Kemik iliğinden progenitör hücrelerin salınımına VEGF' in neden olması ve bu hücrelerin tümör yatağında çeşitli pro-anjiyogenik faktörleri uyarmasıyla da tümör anjiyogenezi ortaya çıkabilir [Peters et al., 2005]. Pro-anjiyogenik faktörler VEGF dışında GBM hücreleri tarafından uyarılırlar ve anjiyogeneze katkıda bulunurlar. GBM' de eksprese edilen diğer anjiyogenik faktörler ise insülin büyüme faktörü (IGF-1), integrin ve matriks metalloproteinazlardır ve bu faktörler GBM tedavisinde potansiyel hedeflerdir [Chambaut-Guerin et al., 2000].

Anjiyogenez sadece tümör büyümesinde görev almaz aynı zamanda pre-malign tümörün kansere ilerlemesinde ve metastazik lezyonların oluşmasında da görev aldığı anlaşılmıştır. Anjiyogenez kanserin malign olmayan evrelerinden, metastaz olan son evrelerine kadar her evresinde rol alır [Hanahan and Folkman, 1996], [Poon et al., 2001].

4. VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ

Trombosit kaynaklı büyüme faktör ailesinin bir üyesi olan VEGF bilinen en spesifik endotel hücresi mitojenik faktördür ve heparin-binding glikoprotein yapısında bir moleküldür. VEGF, tümör hücreleri [Boock et al., 1995], makrofajlar [Sunderkotter et al., 1994], trombositler [Verheul et al., 1997], keratinositler [Frank et al., 1995] gibi birçok hücre tipi tarafından üretilir ve vasküler endotel hücreler üzerinde etki gösterir. Hipoksiye ve pro-anjiyogenik faktörlere aracı olup, anjiyogenezin kontrolünde önemli bir role sahiptir. VEGF ayrıca damar geçirgenliğini arttırır, düz kas hücre hiperplazisini düzenler ve lenfanjiyogeneizde rol oynar [Guba et al., 2004].

VEGF ailesinin çeşitli alt grupları tanımlanmıştır. Bunlar; VEGF-A (human VEGF, sadece VEGF olarak bilinir.), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F (svVEGF) ve PlGF' dir. Amino asit sayılarına göre ise VEGF121, VEGF165, VEGF189, VEGF206 ve VEGF145 gibi izoformları bulunmaktadır [Ferrara, 2000]. Başta VEGF-A olmak üzere vücutta olan birçok fizyolojik (vaskülogenez, anjiyogeneze gibi) ve/veya patolojik olayda (kansere, neovasküler hastalıklar gibi...) rol oynarlar. VEGF' in vaskülogenez ve anjiyogeneizde oynadığı rol tümör büyümesi ve yayılmasında çok önemlidir.

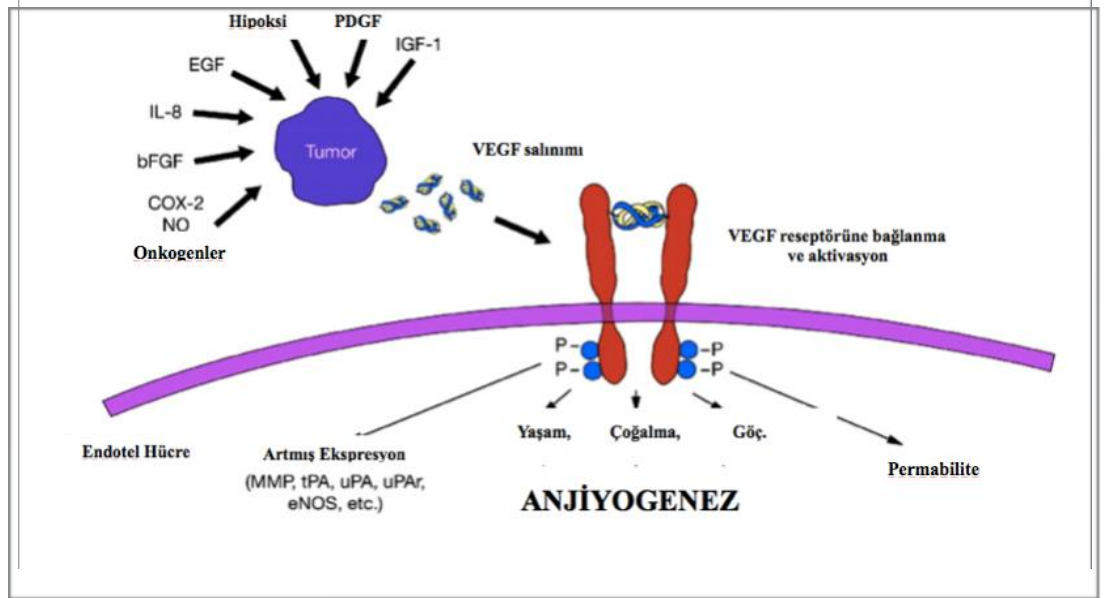
Kansere çalışmalarında anti-VEGF stratejileri, VEGF' in pro-anjiyogenik fonksiyonunu hedeflemek ve böylece anjiyogenezi inhibe etmek için tasarlanmışlardır. Tümör hücrelerinin VEGF ile doğrudan uyarılmasının, hücreleri apoptozdan koruyabileceğini ve kemoterapi ya da radyoterapiye karşı direncini arttırabileceğini ileri süren çalışmalar mevcuttur [Harmey and Bouchier-Hayes, 2002]. Bunun yanı sıra kemoterapi ve radyoterapinin tümörlerde VEGF ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle anti-VEGF terapilerinin hem pro-anjiyogenik aktiviteyi hem de VEGF' in anti-apoptotik işlevini hedeflemesi muhtemeldir. Kemoterapi ve/veya radyoterapi ile kombine kullanılan anti-VEGF tedavilerinin birçok tümör tipine karşı olumlu etkisi gösterilmiştir. Kısaca VEGF blokajı tümör hücrelerini konvaksiyonel tedaviye karşı daha duyarlı hale getirir.

VEGF spesifik olarak ilgili tirozin kinaz reseptörlerine bağlanarak, tümör anjiyogeneze, proliferasyonuna ve invazyonuna neden olur. VEGF gibi daha birçok

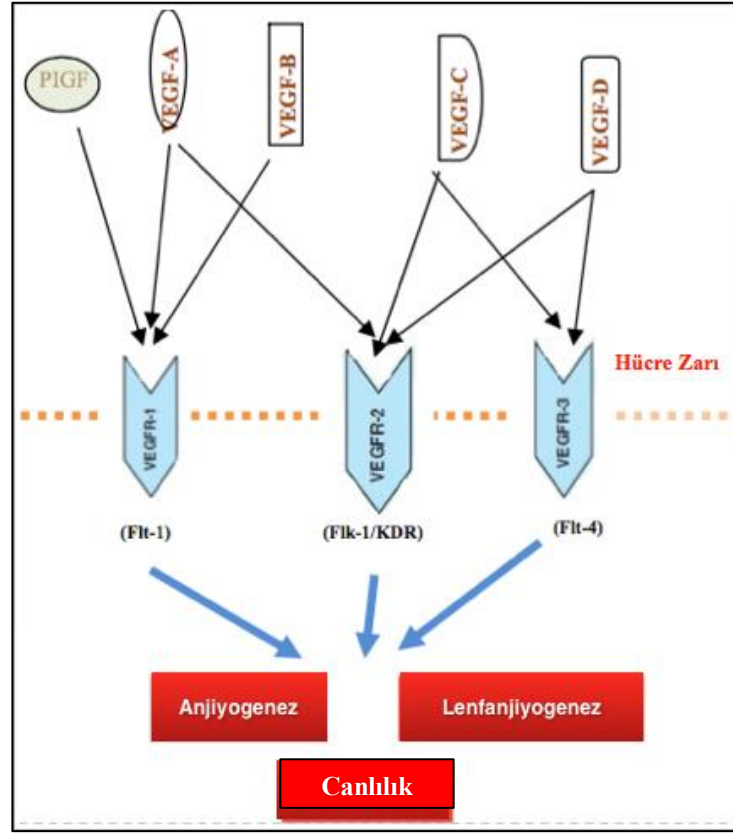
büyüme faktöründe benzer şekilde etkinlik gösterirler [Tremont-Lukas and Gilbert, 2003], [Lal et al., 2002]. Sonuç olarak VEGF tirozin kinaz inhibitörlerinin anjiyogenezi engelleyebileceği düşünülmekte ve bu konuda tedavi stratejileri üretilmektedir [Takano et al., 2003].

GBM hücreleri yüksek miktarda VEGF salgırlarlar. Anjiyogenik faktörler içinde en iyi bilinen faktör VEGF' dir [Sonoda et al., 2003], [Miyagami et al., 1998]. Tümör hücreleri tarafından salgılanan VEGF, endotel hücrelerindeki reseptörleri tanır ve bu reseptörlere bağlanarak anjiyogenezi tetikler. Bilinen reseptörler VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, nörofilin 1 ve 2 dir (Şekil 4.1.), [Tabernero, 2007].

VEGFR-1, hücre etkileşimlerini kontrol eder ve doku yapısının belirlenmesinden sorumludur. Endotel hücrelerinde proliferasyona ve migrasyona neden olan reseptör ise VEGFR-2'dir. VEGFR-3, lenfatik endotel hücrelerinden eksprese olur ve lenfangiogenезin düzenlenmesiyle ilişkilidir [Shibuya, 2006], [Angeli-Andersen et al., 2004], [Compton, 2000], [Sugarbaker, 1995], (Şekil 4.2.), [Prakash and Maulik, 2010].



Şekil 4.1: Tümör hücrelerinden VEGF ekspresyonu.



Şekil 4.2: VEGF ailesi ve reseptörleri.

VEGF' in biyolojik etkilerinin ortaya çıkması, vasküler endotel hücrelerde eksprese olan VEGFR-2 'ye bağlanmasıyla ilgilidir. Bu reseptör daha öncede bahsi geçtiği gibi tirozin kinaz aktivitesine sahip bir yapıya sahiptir [Angeli-Andersen et al., 2004], [Compton, 2000], [Sugraker, 1995]. VEGFR-2; VEGFR A, VEGFR C, VEGFR D ve VEGFR E nin reseptörüdür. VEGF (VEGF A), VEGFR-1'e VEGFR-2 den daha yüksek bir affiniteyle bağlanmasına rağmen VEGFR-1 in tirozin kinaz aktivitesi zayıf olduğu için, VEGF mitojenik ve kemotaktik aktivitelerini yalnızca VEGFR-2 yi eksprese eden hücrelerden gösterebileceği düşünülmektedir [Angeli-Andersen et al., 2004], [Compton, 2000], [Sugraker, 1995]. VEGF'in VEGFR-2 ye bağlanmasıyla beraber çeşitli hücre içi sinyal ileti yolları aktive olmaktadır [Carpelan-Holmstrom et al., 2004]. VEGF ve VEGFR-2'nin bağlanmasıyla, VEGFR-2 dimerizasyonu oluşur ve reseptör tirozin kinaz aktivitesi başlar. Tirozin kinaz aktivitesinin başlamasıyla beraber VEGFR-2'nin otofosforilasyonu indüklenir.

VEGFR' lerin aktivasyonu; Ras guanozin trifosfat (ras GTPaz) proteinleri ve fosfolipaz-C proteinleri gibi sinyal iletim proteinlerini fosforilasyona uğratarak endotel hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü sağlamaktadır [Dvorak et al., 1995]. Ras,

SRC ve HER-2 onkogenleri, p53 gen mutasyonu, tümör nekrozu faktörü- α (TNF- α), nitrik oksit (NO), oksidatif stres, düşük glikoz seviyesi ve özellikle hipoksik ortam gibi bir çok faktör VEGF ekspresyonunu arttırmaktadır [Ria et al., 2003], [Longo et al., 2002].

Anjiyogenez süreci damar endotelini döşeyen bazal membranın proteolitik yıkımı ile başlamaktadır [Mignatti and Rifkin, 1996]. Normalde endotel hücreleri yayılma ve bölünme etkisi göstermeyen tek tabakadan oluşan hücrelerdir. Endotel hücreleri anjiyogenez olacağı durumlarda bölünme ve çoğalma eğilimi gösterirler. Salgılanan anjiyogenik büyüme faktörleri, membran ve hücreler arasında bir bölünme meydana getirmektedir. Bunun nedeni anjiyogenik faktörlerin, kan damarlarının, endotel hücrelerindeki reseptörlerine bağlanmasıdır. Büyüme faktörlerinin aktive ettiği enzimler öncelikle bazal membran ve endotel hücrelerini döşeyen ECM bileşenlerini yıkıma uğratar. Bazal membranın yıkılmasıyla hücre göçü ve kapiller filizlenme oluşmakta ve bu sürecin sonunda hücre içi ve hücreler arası boşlukta damarları oluşturan lümenler gelişmektedir [Ausprunk and Folkman, 1997]. Aktive olan endotel hücrelerinin ECM' ye göç ederek çoğalmasında VEGF rol oynamaktadır [Ferrara et al., 2003].

ECM yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteazlar gibi moleküllerin salınımında VEGF' i uyarmakta ve böylelikle tümör invazyon ve metastazı da kolaylaşmaktadır [Ferrara and Davis-Smyth, 1997]. Damar oluşumundan sonra anjiyogenik faktörler azalırken, anjiyogenez inhibitörleri artar ve sessiz hale bürünen endotel hücrelerinin oluşturduğu kan damarlarından kan akımı başlamaya hazır hale gelir [Haroon et al., 1999], [Pepper et al., 1996].

Klinik veriler anjiyogenez şiddeti ve metastaz arasında doğru orantı olduğunu ve bu faktörlerin prognozu etkilediğini desteklemektedir [Weidner et al., 1991]. Anjiyogenezin şiddetini belirlemek için kullanılan yöntemler anjiyogenik proteinlerin doku düzeylerinin saptanması, anjiyogenik faktörlerin kan ve idrarda ölçülmesi, mikrodamar dansitesinin saptanmasıdır. Anjiyogenez inhibitörleri, anjiyogenez aktivatörlerinin engellenmesi, matriks yıkımının engellenmesi, endotel hücrelerinin direkt inhibisyonu, nonspesifik mekanizmalar ve integrin inhibisyonunda etkisini göstermektedir.

Anjiyogenik faktörlerin üretilmesiyle karakterize olan tümörler bu faktörlerin ekspresyonunun veya aktivasyonunun baskılanmasıyla durdurulabilirler. Bunlardan en önemli olan hedefler VEGF ve reseptörleridir.

4.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü-2

VEGFR-2 aynı zamanda kinaz insert domain reseptörü (KDR) olarak bilinen bir VEGF reseptörüdür. KDR, VEGFR-2' yi eksprese eden insan genidir ve aynı zamanda flk1 (faredeki homolog geni) diye de bilinir. KDR'nin SHC2 [Warner et al., 2000], annexin A5 [Wen et al., 1999] ve SHC1 [Zanetti et al., 2002] ile etkileşimi olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

VEGFR-2, 200–230 kDa'luk ve kinaz-insert-domaini-içeren bir VEGF reseptörüdür. Tüm endotelyal hücre cevaplarını ileten bir glikoproteindir. VEGFR-2, VEGFR-1'e göre VEGF'e daha düşük affiniteyle bağlanıyor olsada, ligandla bağlandıktan sonra tirozinle çok daha etkin bir şekilde fosforile edilir. VEGFR-2 sinyal yollarını harekete geçiren ve çeşitli biyolojik tepkileri indükleyen oldukça aktif bir kinaz reseptörüdür [Meyer et al., 2002]. VEGF ve reseptörünün bağlanması sonrası endotel hücrelerinde hücre büyümesi, farklılaşması, göçü ve tübül oluşumu gibi değişiklikler meydana gelir [Terman et al., 1992]. Endotel hücre yüzeyine lokalize olan VEGFR-2' nin hücre içi sinyal iletimini başlattığı bilinmektedir.

Reseptör tirozin kinaz aktivitelerinin düzenlenmesinde otofosforilasyon bölgeleri yer alır. Otoforsforilasyon bölgeleri sinyal iletimini başlatacak proteinler için bağlanma yeri olarak görev yaparlar. Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) sinyal iletim yolu, VEGFR-2' nin endotel hücre canlılığı ve proliferasyonunu uyarmak için kullandığı ana sinyal yollarından biridir.

Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, VEGFR-2 ile PI3K' nin aşırı aktivasyonunun endotel hücre sağkalımını, proliferasyonu ve anjiyogenezi arttırdığı gösterilmiştir. PI3K spesifik inhibitörü kullanılan bir çalışmada VEGF ile uyarılan endotel hücre sağkalımı inhibe edilmiştir [Gerber et al., 1998]. Bir diğer çalışmada ise aynı sinyal yolağında olan PTEN' in aşırı ekspresyonu ile VEGF aracılı endotel hücre proliferasyonu inhibe edilmiştir [Huang and Kontos, 2002]. Bu çalışmaların yanı sıra VEGFR-2 geni susturulmuş embriyonik farelerde bozulmuş vaskülogenezis ve hematopoez gösterilmiş ve sonuç olarak embriyo yaşamına devam edememiştir. [Dai and Rabie, 2007].

4.2. Anti-Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Stratejileri

VEGF'in etkinliği bir çok farklı yönden inhibe edilebilmektedir [Jung et al., 2002], [Kim et al., 2002]. Son on yılda spesifik olarak VEGF yolağını hedefleyen bir dizi monoklonal antikor tek başlarına veya kemoterapi ile birlikte çalışılmıştır. Örneğin Bevacizumab, VEGF' i bağlayan monoklonal bir antikordur (mAb) ve standart kemoterapötiklerle birlikte olmak üzere bir kaç farklı tümör tipinde tedavi için kullanılmaktadır [Sullivan and Brekken, 2010]. Bevacizumab ve Avastin gibi anti-anjiyogenik ve anti-tümör insan monoklonal VEGF antikorları faz I çalışmalarında kemoterapi ile birlikte kullanıldığında farklı tümörlerde büyümeyi inhibe ettikleri ve serum VEGF seviyelerini düşürdükleri tespit edilmiştir. Bu şekilde hastaların yaşam süresinin uzadığı ve tümör progresyonunda azalma olduğu gözlemlenmiştir [Margolin et al., 2001], [Hurwitz et al., 2004].

Monoklonal antikorların dışında uygulanan bir diğer inhibisyon yolu ise spesifik tirozin kinaz inhibitörleri aracılığıyla VEGF'in reseptörlerinin hedef alınmasıdır. Burada hedef alınan reseptörlerden en önemlisi endotel hücre proliferasyonu ve kemotaksisinden sorumlu olan VEGFR-2 dir [Ferrara, 1999]. Biyolojik ve prelinik çalışmalar, VEGFR-2 inhibisyonu, tümör kaynaklı anjiyogenezi durdurmak için umut vadeden bir stratejidir [Hamerlik et al., 2012]. Bu mekanizmayla VEGFR-2 nin otofosforilasyonunun baskılanması amaçlanmaktadır. Tirozin kinaz inhibitörlerinden imatinib, erlotinib, gefitinib, sorafenib ve sunitinibin şu an halihazırda kullanılmakta olan ajanlardır. Bu ajanlar RTK' lara bağlanarak otofosforilasyon mekanizmasını durdurur ve antikanser tedavisinde etkili olurlar [Faivre et al., 2006]. Bir ftalazin türevidir olan vatalanib de (PTK787/ZK22854) bu etkinliği inhibe eden ajanlar arasındadır. Vatalanib bir VEGFR-1 ve -2 reseptör inhibitörüdür. Vatalanibin, metastazı olan kolorektal kanserli hastalarda kan akımını belirgin bir şekilde azalttığı gözlemlenmiştir [Trarbach et al., 2003]. Tirozin kinaz antikanser tedavisi monoklonal antikorlardan farklı olarak hücre içi sinyal yollarını hedeflemektedir. VEGF/VEGFR yolağını daha iyi bloke etmek için mevcut ajanları kombine ederek kullanmak ayrı bir stratejidir.

5. TİROZİN KİNAZLAR ve ETKİ MEKANİZMALARI

İnsan Genom Projesinden elde edilen verilere göre, insan genomunda yaklaşık 32.000 gen vardır ve %20'si sinyal iletiminde görev alan proteinleri kodlamaktadır. Bu proteinler membran yüzey reseptörleri ve hücre içi sinyal iletimini sağlayan proteinlerdir.

Protein kinazlar protein fosforilasyonu/aktivasyonu ile sinyal iletimini sağlarlar. Kinazlar membran yerleşimli reseptör tirozin kinazlar ve stoplazmik tirozin kinazlar olmak üzere ikiye ayrılır ya da katalitik özelliklerine göre tirozin ve serin/treonin kinazlar olmak üzere gruplandırılırlar. Bir çok büyüme faktörü ve VEGF hedef hücrelerindeki etkilerini reseptör tirozin kinazlar aracılığıyla gösterir. Protein kinazların aşırı sentezlenmesi onkojenik transformasyona yol açabilir [Blume-Jensen and Hunter, 2001]. Son yıllarda yapılan araştırmalara göre 250' nin üzerinde genin kansere neden olduğu bildirilmiştir. Çeşitli mekanizmaların ise kansere neden olduğu bilinmektedir. Üzerinde en çok çalışılan mekanizmalardan ikisi ise, tirozin kinaz mekanizması olan MAPK (Mitogen-activated protein kinases) / ERK (Extracellular signal regulated kinase) ve PI3K/AKT' dır.

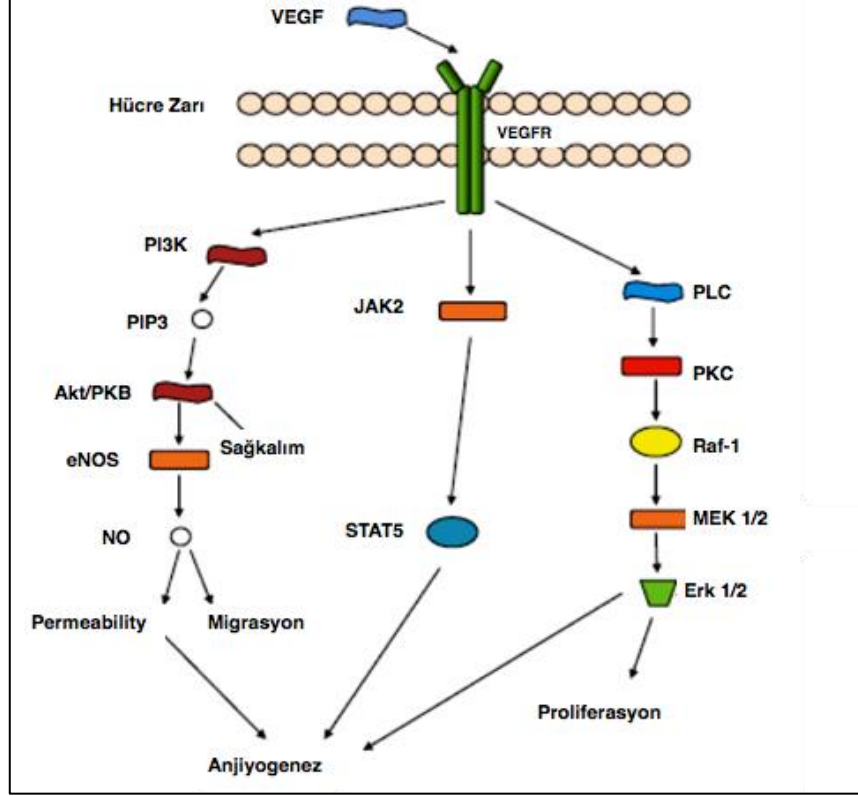
MAPK/ERK sinyal yolağında, tirozin kinaz reseptörleri; hormonlar, PDGF, VEGF, FGF, EGF gibi büyüme faktörleri ve sitokinler aracılığıyla aktive edilirler. MAPK/ERK sinyal yolağında Ras, Raf, MEK ve ERK proteinleri görev alırlar ve bu proteinler hücre göçü, çoğalması, farklılaşması, apoptozu gibi olaylara etki ederler. Bu genlerden Ras ve Raf birer proto-onkogendir. İstirahat halindeki hücrelerde Ras proteinleri inaktif (Ras-Guanin-2-fosfat) halde bulunurlar ve aktif hale gelebilmek için hücrede tirozin kinaz reseptörlerinin uyarılması ve proteinin hücre membranına yerleşmesi gerekir. SOS ve Grb2 gibi çeşitli adaptör proteinler, Ras'a guanin-2-fosfat yerine guanin-3-fosfat bağlanmasını sağlar ve Ras'ın aktif hale geçmesi tetiklenir. Aktifleşmiş Ras proteinleri, Raf kinazlara bağlanarak onlarında hücre membranına yerleşmesini ve aktif hale geçmesini sağlarlar. Aktif haldeki Raf kinazlar, ERK ve MAPK proteinlerinin aktivasyonu aracılığıyla, hücre içi sinyalleri stoplazmadan nükleusa taşıyarak ilgili genlerin ekspresyonunu sağlarlar [Yajima et al., 2011]. İnsan tümörlerinin %30'unda bu yolağın aşırı aktivasyonu görülmektedir. Mutasyona

uğramış Ras proteinleri (Ras-guanin-3-fosfat), hücrelerin kontrolsüz bölünmesinden sorumlu tutulmaktadır [Dhillon et al., 2007].

PI3K (Fosfoinozotid-3 kinaz) /AKT sinyal yolağında reseptör tirozin kinazların aktive ettiği bir diğer hücre içi sinyal yolağıdır. Bu yolak glukoz taşınması ve kullanımı, protein biyosentezi, hücre büyümesi, hücre çoğalması ve apoptozda önemlidir. PI3K, büyüme faktörü reseptör tirozin kinazlarının önemli bir sinyal bileşeni konumundadır [Cantley, 2002]. PI3K, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat (PIP3) üretimini katalize eder. PIP3 sırasıyla serin-treonin protein kinaz AKT' da dahil olmak üzere geniş bir yelpazede aşağı doğru hedeflerin toplanması ve etkinleştirilmesine katkıda bulunur. AKT protein kinazı, protein sentezini, hücre çoğalmasını ve gen anlatımını uyararak hücre canlılığını uyarmaktadır. Aktive edilen reseptör tirozin kinazlar sayesinde PI3K hücre membranına bağlanarak sinyal iletimini başlatır. PI3K membran fosfolipidlerini fosforile ederek sırasıyla PI (fosfatidil inositol)'yi PIP₁'ye, PIP₁ (fosfatidil inositol 1-fosfat)'yi PIP₂'ye ve PIP₂ (fosfatidil inositol-2-fosfat)'yi PIP₃ (fosfatidil inositol-3-fosfat)'e dönüştürür. AKT kinaz aktivitesinin yanı sıra PIP₂ ve PIP₃'teki 3-fosfata bağlanabilen bir bölgede taşır. PIP₃'ye bağlanarak aktive olan en önemli kinaz AKT'dır. AKT en üst seviyede aktive olmak için PDK1 (3-fosfatidilinositol-bağımlı protein kinaz-1) ve PDK2 (3-fosfatidilinositol-bağımlı protein kinaz-2) kinazlara ihtiyaç duyar ve bunlar tarafından fosforillenerek aktive olduğunda membrandan ayrılıp başka hedef proteinleri fosforiller [Xing, 2010], (Şekil 5.1.), [Nikos et al., 2013]. PI3K-AKT sinyal yolağı, tümörigenez için kritik olan hücre proliferasyonu, canlılığı, büyümesi ve hareketlilik süreçleri de dahil olmak üzere bir çok normal hücresel işlemi düzenler. Nitekim bu yolun onkogenezisdeki rolü kapsamlı olarak araştırılmış ve bu yolağın birçok bileşeninin değişmiş eksresyonuna veya mutasyonuna insan kanserinde karşılaşılmıştır [Vivanco and Sawyers, 2002]. PI3K-AKT' ın aşağı akışındaki moleküler yollar son yıllarda ayrıntılı olarak gözden geçirilmiştir [Cantley, 2002], [Vivanco and Sawyers, 2002]. Bu nedenle araştırmacılar kanser tedavileri için bu yolu hedeflemeye yönelmektedirler.

MAPK/ERK ve PI3K/AKT sinyal yolları apoptozu azaltmak, hücre büyümesini ve proliferasyonunu ise arttırmak için birlikte çalışırlar. Her iki yolak reseptör tirozin kinazların normalden fazla olan aktivitesi ile uyarılır [Pazarbaşı vd., 2011].

Glioma büyümesinde ve ilerlemesinde, proliferasyon sinyali büyük ölçüde proliferasyonu düzenleyen hücre içi sinyal iletim yollarını kontrol eden hücre yüzeyi membran reseptörünün aktivitesine bağlıdır; başka bir deyişle, önde gelen oyuncu tirozin kinazdır.



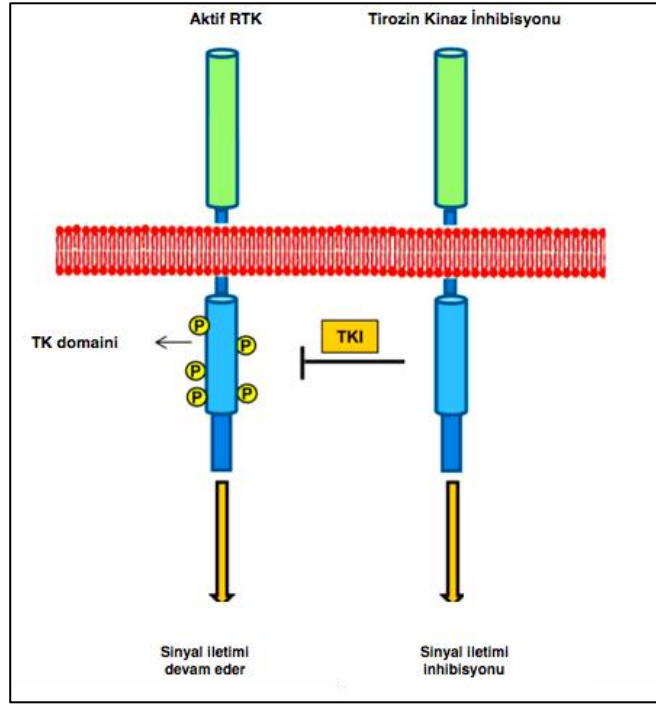
Şekil 5.1: VEGF ve tirozin kinaz olan VEGF reseptör yolağının şematize edilmiş hali.

5.1. Tirozin Kinaz inhibitörleri

Tirozin kinazlar sinyal iletim yoluyla pek çok protein ailesini aktive eden bir enzim ailesidir. VEGF ve VEGFR sentez aşamasını bloke edebilmek için tirozin kinaz inhibisyonu gereklidir. Bu tirozin kinaz inhibitörlerine örnek olarak Vatalanib, Pazopanib, Sunitinib verilebilir [Chappelow and Kaiser, 2008]. Tirozin kinaz aktivasyonundaki artışın kanserdeki rolünün ortaya çıkarılması, bu aktivasyonun bir şekilde baskılandığında hastalığın ortadan kaldırılabilirliği veya hafifletilebileceğini düşündürmüştür (Şekil 5.2.), [Hojjat-Farsangi, 2014].

Tirozin kinaz inhibitörleri (TKI) ise adı üstünde tirozin kinazların inhibisyonundan sorumlu ilaçlardır ve tirozin kinazların ATP bağlama bölgesinden

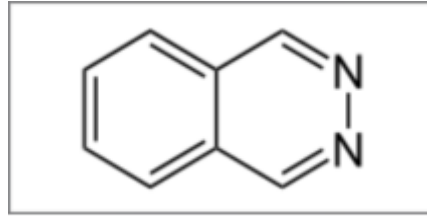
bağlanarak etkilerini gösterirler. Etkinliği gösterilen ilk TKI imatinib mesilattır. VEGF reseptörleri tirozin kinaz aktivasyonuna sahip olduğu için TKI'lar aynı zamanda anjiyogenezi engellemek içinde kullanılmıştır. TKI' lar kullanıldığı zaman anjiyogenez süreci, hücre çoğalması ve hücre iletişimi yavaşlamakta ve apoptoz uyarılmaktadır.



Şekil 5.2: Tirozin kinaz inhibitörlerinin, reseptör tirozin kinazların fosforilasyonunu inhibe etmesi.

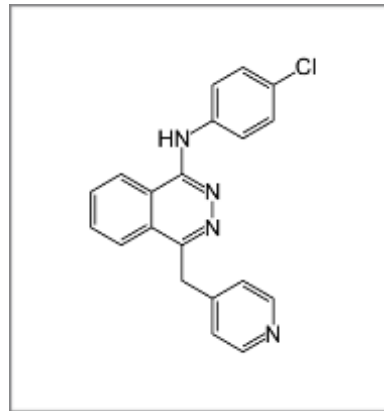
6. FTALAZİN

Ftalazin $C_8H_6N_2$ moleküler formülüne sahip heterosiklik organik bileşiktir (Şekil 6.1). Moleküler ağırlığı 130.14664 g/mol dür. Benzo-orthodiazin veya benzopyridazine olarak da adlandırılır. Ftalazin türevlerinin kimyasal yapısı dolayısıyla antimikrobiyal ve sitotoksik özelliğe sahip olduğu bilinmektedir [Easmon et al., 1997]. Genel olarak azot içeren heterosiklik bileşikler çeşitli kemoterapötik etkinliklere sahiptirler [Al-Assar et al., 2002], [Jain and Vederas, 2004]. Ftalazin türevleri anti-tümör ajanları olarak büyük ilgi çekmiştir [Miller-Moslin et al., 2009], [Eldehna et al., 2015]. Güçlü bir VEGF inhibitörü olarak ilk yayınlanan ftalazin türevi vatalanib (PTK787) ' dir [Bold et al., 2000]. Son 20 yılda ftalazin türevleri VEGFR-2 inhibitörlerinin geliştirilmesi için umut vermiştir.



Şekil 6.1: Heterosiklik organik bir bileşik olan ftalazin' in genel formülü ($C_8H_6N_2$).

Vatalanib (PTK787/ZK-222584), aminoftalazin kimyasal sınıfına ait bilinen tüm VEGF reseptörlerini inhibe eden küçük bir anti anjiyojenik moleküldür (Şekil 6.2).



Şekil 6.2: Bir ftalazin türevi olan vatalanib' in (N-(4-chlorophenyl) -4-(pyridin-4-ylmethyl) phthalazin- 1-amine) genel formülü.

Çoklu bir VEGF reseptör inhibitörü olan vatalanib bilinen tüm VEGF reseptörlerinin hücre içi tirozin kinaz aktivitesini bloke eder ve bu nedenle patolojik tümör neovaskülarizasyonunun uzun vadeli terapisi için uygundur [Brandes et al., 2010]. VEGFR-1, VEGFR-2, ve VEGFR-3' ün hepsini inhibe etmesine rağmen VEGFR-1 ve VEGFR-2' ye karşı daha kuvvetli etkisi vardır. Şu an için faz II ve faz III çalışmaları devam eden bir ajandır. Vatalanib VEGF reseptörleri dışında 3 reseptör tirozin kinazı daha inhibe eder. Bunlar; PDGF reseptör tirozin kinaz, c-Kit (kök hücre faktörü) protein tirozin kinaz ve c-Fms (koloni simüle faktör 1 reseptörünü)' dir (Tablo 6.1.), [Lorenz et al., 2006].

Tablo 6.1: Bir ftalazin türevi olan vatalanib' in hedef molekülleri ve deneme aşamaları.

AJAN	HEDEF	DENEME AŞAMASI
Vatalanib	- VEGFR-1 - VEGFR-2 - VEGFR-3 - PDGFR - c-kit - c-Fms	- Faz III (Kolon) - Faz II (Beyin, meme, akciğer, lenfoma, melanom, pankreas, prostat, nöroendokrin)

Vatalanib 1998 yılında Novartis ve Schering AG tarafından ortaya çıkarılmış bir ftalazin türevidir ve en güçlü ve seçici ilk nesil VEGFR kinaz inhibitörlerinin biri olmuştur [Bold et al., 2000].

Vatalanibin hücreler üzerinde antiproliferatif etkisi yoktur [Bold et al., 2000], [Wood et al., 2000]. Ağız yoluyla verilerek tümör büyümesini engellemesi hedeflenmiştir. Anjiyogenezi inhibe ederken metastatik potansiyelide engellemiş olur [Fan et al., 1995]. Vatalanib daha önce meme karsinomları [Scott et al., 1998], akciğer [Takahama et al., 1998], mide-bağırsak [Takahashi et al., 1995], prostat [Ferrer et al., 1998], karaciğer [Mross et al., 2005], yumurtalık [Nakanishi et al., 1997], [Sowter et al., 1997], beyin ve böbrek hücrelerinde [Nakagawa et al., 1997] denenmiştir. Jeffrey ve arkadaşları vatalanib ile yaptıkları faz II çalışmasında, vatalanib' in menenjiomlarda doza bağımlı olarak VEGF e bağlı anjiyogenezi inhibe ettiğini göstermişlerdir [Jeffrey et al., 2014]. Vatalanib radyoterapi ve anti kanser ajanlar ile kombine olarakta denenmiş ve etkisine bakılmış bir kemoteropattir.

Ftalazinin bir çok türevi vardır ve bunların farklı kanser türlerinde VEGFR-2 inhibitörü olarak potansiyellerine bakılmaktadır. Vatalanib başarılı olmuş türevlerden

biridir [Sahar et al., 2016]. Ftalazinin çeşitli türevleri halen geliştirilmektedir ve araştırmacılar tarafından denenmektedir.

7. GEREÇ VE YÖNTEMLER

7.1. Gereçler

7.1.1. Kullanılan Cihazlar

Deneyler, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan cihazlar ile yapıldı. Deneylerde kullanılan cihazların listesi aşağıdadır.

-80°C derin dondurucu (Sanyo U7386S), -152°C derin dondurucu (Sanyo), buz makinası (Scotsman), karbondioksit (CO₂) inkübatör (Sanyo), elektroforez sistemi (Bio-Rad), etüv (Mettler), hassas terazi (Denver), hücre kültürü odası hava temizleme cihazı (Uvion Air Aura), masaüstü soğutmalı eppendorf, santrifüj (Beckman Coulter Microfuge 22R), chemiDoc MP görüntüleme cihazı (Biorad), multimode plate okuyucu (Molecular Device), otoklav (Sanyo), pH metre (IKA), sınıf 2 biyolojik güvenlik kabini (Scanlaf), vorteks (IKA), su banyosu (Mettler), -20°C derin dondurucu (Beko), santrifüj (Universal 16R), mikroskop (Nüve, NF400), western 95°C (Techne DRI-BLOCK), shaker (Stuart, SSL1), +4°C buzdolabı (Beko), transblot turbo transfer sistemi (Bio-Rad).

7.1.2. Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri

Besiyeri (Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM)), fetal bovine serum (FBS), penisilin/streptomisin, l-glutamine, tripsin/EDTA, fosfat tamponu (Phosphate buffer saline (PBS)), dimetilsülfoksit (DMSO), tripan mavisi.

Plastik sarf malzemeler: T75 flask, 100 mm petri kapları, hücre kazıyıcı (cell scraper), 15 ve 50 ml'lik steril tüp, 5, 10, 25 ml'lik pipet ve pipetman, otomatik pipet ve steril pipet uçları, steril eppendorf, freezing kriotüp (dondurmak için kriotüp).

7.1.3. Kullanılan Hücre Hattı

Bu çalışmada ‘‘European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)’’ tarafından üretilip sertifikalanan ve ‘‘SIGMA-ALDRICH’’ firmasından temin edilen U251 insan GBM hücre hattı (katalog no. 09063001) kullanılmıştır.

7.1.4. Kullanılan Çözeltiler ve Çözeltilerin Hazırlanması

- Tam Besiyeri (Complete Growth Medium)
 - Hazır olarak satın alınan DMEM %10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin eklenerek hazırlandı ve bu hazırlanan tam besiyeri bir hafta içerisinde tüketilecek şekilde 4°C ‘de muhafaza edildi.
- Jel Elektroforez Tamponu (1000 ml)
 - 14.4 gr glisin, 3 gr tris baz ve 2 gr sodyum dodesil sülfat (SDS) distile su ile 1000 ml’ye tamamlanarak çözündürüldü. Tampon +4°C’de muhafaza edildi.
- Jelden Membrana Protein Aktarım Tamponu (1000 ml)
 - 6 gr tris baz, 28.8 gr glisin ve 200 ml metanol distile su ile 1000 ml ‘ye tamamlanarak çözündürülmesi ile hazırlandı.
- TBS (Tris-tuz) Çözeltisi (500 ml)
 - 0.7882 gr tris-hidroklorik asit (HCl) ve 4.383 gr sodyum klorür (NaCl) distile su ile 400 ml’ye tamamlanarak çözündürüldü. Çözelti, sodyum hidroksit ve hidroklorik asit kullanılarak pH 8’e ayarlandı ve distile su ile 500 ml’ye tamamlanarak hazırlandı.
- TBST (Tris-tuz-tween 20) Çözeltisi (300 ml)
 - TBST, 300 ml TBS çözeltisine 150 µl tween-20 eklenerek hazırlandı.
- Bloklama Solüsyonu (50 ml)
 - 2.5 gr yağsız süt tozu, 50 ml TBST çözeltisi içinde çözündürülmesi ile hazırlandı.
- PBS (Fosfat-tuz tamponu)
 - 1 PBS tableti 100 ml distile su içinde çözündürülerek hazırlandı
- Tris-HCl Çözeltisi (100 ml, 1.25M) (pH 6.4)
 - 19.7 gr Tris-HCl, 90 ml distile su içinde çözündürüldü. Çözelti, sodyum hidroksit ve hidroklorik asitle pH 6.4’e ayarlandı ve distile su ile 100 ml

tamamlanarak otoklavlandı. Çözelti oda ısısında muhafaza edildi.

- Akrilamid/Bisakrilamid Stok Çözeltisi (100 ml, %30)
 - 29 gr akrilamid ve 1 gr bisakrilamid distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak çözündürüldü ve +4°C'de cam şişe içerisinde muhafaza edildi.
- Amonyum Persülfat Stok Çözeltisi (100 ml, %10)
 - 10 gr amonyum persülfat distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak çözündürüldü ve +4°C'de muhafaza edildi.
- Sodyum Dodesil Sülfat Stok Çözeltisi (SDS) (100 ml, %10)
 - 10 gr SDS distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak çözündürüldü ve 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi. Çözelti oda ısısında muhafaza edildi.
- Tris Baz Stok Çözeltisi (100 ml, 1,5 M)
 - 18.165 gr Tris baz distile su ile 90 ml'ye tamamlanarak çözündürüldü. Çözelti, sodyum hidroksit ve hidroklorik asit kullanılarak pH 6.8'e ayarlandı ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Daha sonra çözelti otoklavlanarak oda ısısında muhafaza edildi.
- Hücre Dondurma Besiyeri
 - %90 FBS ve %10 oranında DMSO karıştırılarak hazırlandı.
- Tris-EDTA Tamponu
 - 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) ve 1mM EDTA (pH 8.0) karıştırılarak hazırlandı.
- Ponceau S. Boyası
 - 0,1 gr ponceu S boyası 500 µl asetik asit ile karıştırılarak distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.
- Örnek Tamponu
 - 1 M Tris baz (pH 6.8) 2.5 ml, 0.8 gr SDS, 4 ml Gliserol, 2 ml %100 2ß mercaptoethanol ve 3 mg bromfenolblue bidistile suda çözülerek 10 ml'ye tamamlandı. Alimünyum folyoya sarılarak (bromfenolblue ışığa duyarlı olduğu için) 4 °C'de saklandı.

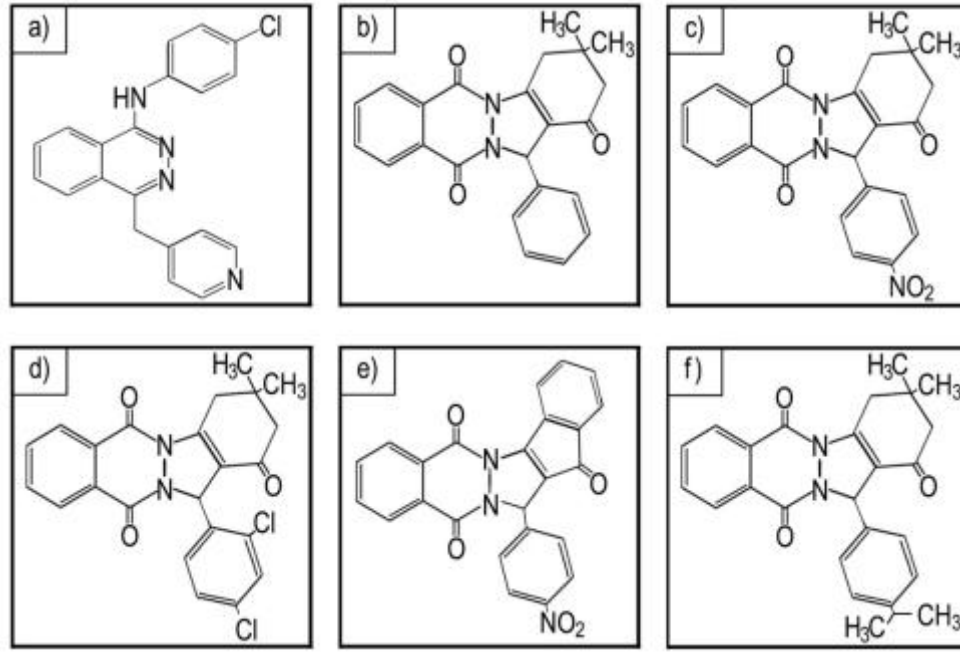
7.1.5. Kullanılan Kitler

- Phospho-AKT Pathway Antibody Sampler Kit (Cell Signaling)
- Phospho-VEGF Receptor 2 Antibody Sampler Kit (Cell Signaling)

- AKT Antibody (Cell Signaling)
- VEGF Receptor 2 Antibody Sampler Kit (Cell Signaling)
- Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling)
- GAPDH (Cell Signaling)
- Bovine Serum Albumin (BSA) (Cell Signaling)
- Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche)
- BCA protein assay kit (Thermo)

7.1.6. Kullanılan Ftalazin Türevleri

Çalışmada kullanılan ftalazin türevlerinden vatalanib (PTK787, -N-(4-chlorophenyl)-4-(pyridin-4-ylmethyl)phthalazin-1-amine) (Selleckchem)) moleküler ağırlığı 419.73 olan bir protein kinaz inhibitörüdür (Şekil 7.1.a)). Anjiyogenezi inhibe etme özelliğiyle, anti-kanser ajan olarak faz II ve faz III çalışmaları halen devam etmektedir. Çalışmada kullandığımız diğer ftalazin türevleri ise YTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümünde Kadir Turhan yönetiminde kimyasal sentez yoluyla üretilmiş bileşiklerdir. Her biri özgün moleküllerdir ve bu bileşikler ztf-1t, ztf-2t, ztf-3t, ak-3ep, akt-1 olarak isimlendirilmişlerdir (Şekil 7.1.b) ztf-1t, c) ztf-2t, d) ztf-3t, e) ak-3ep, f) akt-1. Moleküler formülleri ve ağırlıkları ise sırasıyla ztf-1t için $C_{23}H_{20}N_2O_3$ ve 372.4165, ztf-2t için $C_{23}H_{19}N_3O_5$ ve 417.41406, ztf-3t için $C_{23}H_{18}Cl_2N_2O_3$ ve 441.30662, ak-3ep $C_{24}H_{13}N_3O_5$ ve 423.37712, akt-1 için ise $C_{26}H_{28}N_2O_3$ ve 414.49624'dür.



Şekil 7.1: Ftalazin türevlerinin moleküler yapıları. a) Vatalanib, b) Ztf-1t, c) Ztf-2t, d) Ztf-3t, e) Ak-3ep, f) Akt-1.

7.2. Yöntemler

7.2.1. Hücre Çözme İşlemi

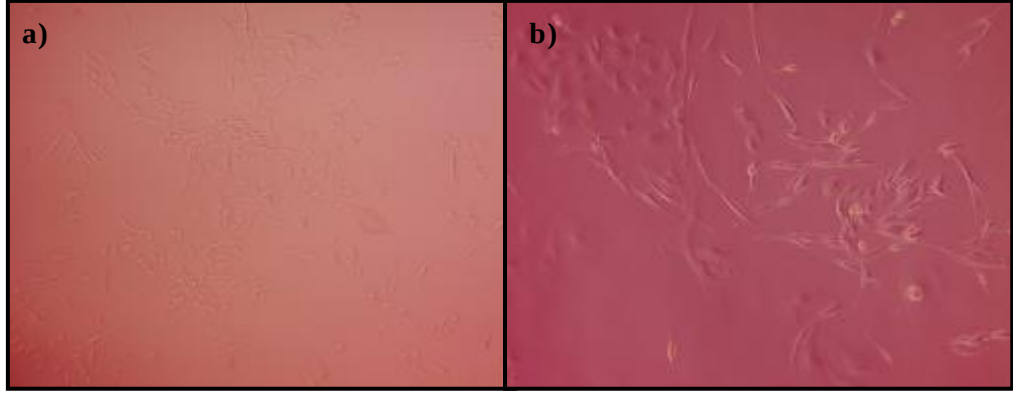
İşlemlere başlamadan önce laminar kabin içerisindeki T75 flasklar, içlerine koyduğumuz 14'er ml besiyeri (DMEM) ile 37°C, %5 CO₂ şartlarında inkübatörde bekletildi. Bu basamak besiyerinin hücreler için normal pH değeri olan 7.0-7.6 şartlarına gelmesini sağlamaktadır.

Öncelikle DMSO ile dondurulmuş hücrelerin çözündürülme işlemi gerçekleştirildi. DMSO oda sıcaklığında hücreler için yüksek derecede toksik bir maddedir. Eritme işlemi yaklaşık 2 dakikalık süre boyunca su banyosunda yapıldı.

Laminar kabin içerisinde 15 ml'lik steril tüpe 10 ml kültür besiyeri eklendi ve buzda tutulan kriotüp laminar kabin içersine dış kısmı %70'lik etanol ile temizlenerek alındı. Kriotüpte bulunan hücreleri strese uğratmamak için hücreler 10 ml'lik besiyeri içeren steril tüpe damla damla alındı ve daha sonra 1500 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra üstteki besiyeri aspire edildi. Altta kalan 1 ml besiyeri içindeki hücreler resüspanse edilerek, önceden 14 ml besiyeri eklediğimiz T75 flasklara alındı. Hazırlanan flasklar 37 °C, %5 CO₂ şartlarındaki inkübatöre koyuldu.

7.2.2. Hücre Kültürü

Bu çalışmada ‘‘SIGMA-ALDRICH’’ firmasından, donmuş hücre hattı olarak satın alınan U251 (katalog no. 09063001) isimli insan glioblastoma multiforme beyin kanseri hücre hattı kullanıldı (Şekil 7.2.).



Şekil: 7.2: Glioblastoma multiforme (U251 GBM hücreleri) hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüsü. a) 4x, b) 10x

Tüm kültürleme işlemleri steril kabinde (Class II Laminar Flow, Scanlaf) gerçekleştirildi ve hücreler 37°C’da %5 CO₂ sağlayan etüvde (Mettler) çoğaltıldı. Pasajlama işleminin ilk adımında 75 cm²’lik kültür kabı içindeki hücrelerin yüzeyini kaplayan besi yeri (15 ml) uzaklaştırıldı. Kaptaki besiyeri artıklarının, bir sonraki aşamada hücreleri çoğaldıkları yüzeyden ayırmak için kullanılacak tripsin enzimini inhibe etmemesi için, 5 ml (0.2 ml/cm²) tuzlu fosfat tamponu (PBS, pH 7.4) ile 3 kez yıkama yapıldı. Ardından kültür kabına, 1,5 ml enzim solüsyonu (% 0.2 tripsin, % 0.04 EDTA) eklenerek tüm yüzeyi kaplaması sağlandı. Hücreler, kültür kabının yüzeyinden bir film şeklinde ayrılncaya kadar (1 dakika) 37°C’da %5 CO₂ sağlayan inkübatörde tutuldu ve tekrar 5 ml (0.2 ml/cm²) besiyeri (DMEM) eklendi. Pipetaj yardımıyla süspanse edilen hücrelerin birbirlerinden ve tutundukları yüzeyden ayrılmaları sağlandı. Süspansiyondaki hücreler bir hemositometre yardımıyla bölüm 7.2.4’ te belirtildiği şekilde sayıldı ve rutin bir alt kültür için gerekli olan sayıda (1x10⁶ hücre/ml) hücre, yeni bir kültür kabına aktarıldı. Hücreler 37°C’da %5 CO₂ sağlayan inkübatörde üretildi ve 3 günde bir pasajlandı.

7.2.3. Hemositometrik Hücre Sayımı

Canlı hücre sayımı “Thoma” lamı kullanılarak gerçekleştirildi. Bu işlem için hücreler PBS içinde hazırlanmış %0.5 tripan mavisi ile 1:1 (v/v) oranında karıştırıldı. Hazırlanan karışım lam üzerindeki uygun bölgelere uygulandıktan sonra boyanmayan canlı hücreler mikroskop altında sayıldı ve kültürün bir milimetresindeki canlı hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Canlı hücre sayısı/ml} = N \times 2 \times 10^4 \quad (7.1)$$

- N=lam üzerindeki sayma alanındaki hücre sayısı.

7.2.4. Hücre Dondurma İşlemi

Hücreler tripsinleme aşaması ardından sayıldıktan sonra 1500rpmx5dk santrifüj edildi. Bekleme esnasında dondurmak için kullanılan özel kriotüpler laminar kabin içinde hazırlandı. Kriotüplerin üzerine hücre hattı adı, kodu, dondurulduğu tarih, kriotüpe koyulan hücre sayısı ve pasaj numarası yazıldı. Kriotüp başına 1×10^6 hücre olacak şekilde dondurma çözeltisi ile resüspanse edildi. Dondurma çözeltisi DMSO içerdiği için oda sıcaklığında yüksek derecede toksiktir. Bu yüzden hücrelerle dondurma çözeltisi eklendikten sonra buz üstünde çalışıldı.

Kriotüplere paylaştırılan hücreler ilk olarak ani donmayı engellemek için isopropanol içeren ve özel dondurma kabı olan Mr. Frosty içerisinde -80’e kaldırıldı. Bir gece geçtikten sonra kriotüpler stok yapmak amacıyla sıvı nitrojene aktarıldı.

7.2.5. Ftalazin Türevi Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Çalışmada kullanılan Ftalazin türevleri (vatalanib, ztf-1t, ztf-2t, ztf-3t, ak-3ep, akt-1) için en uygun çözücüyü belirlemek adına yapılan literatür taraması sonucunda dimetilsülfoksitin (DMSO), en uygun çözücü olduğu belirlendi. Kullanılan türevlerin her birinin molarite hesapları yapılarak her biri ana stok (10.000 μM), 1. Ara stok (100 μM) ve 2. Ara stok (10 μM) şeklinde seyreltilerek hazırlandı. Ftalazin türevlerinin ayrı ayrı DMSO içinde çözündürülmüş stoğu (10 μM), DMEM besiyeri ile

uygun oranlarda karıştırılarak farklı konsantrasyonlarda ftalazin türevleri içeren besiyerleri hazırlandı. Sonuç olarak; ftalazin türevleri içeren besiyerleri ile çözücü kontrolü (%0,1 DMSO içeren besiyeri) test materyallerini oluşturdu.

7.2.5.1. Ftalazin Türevlerinin Farklı Konsantrasyonlarda Hücrelere Uygulanması

Bu işlem farklı konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinde gerçekleştirildi.

İlk aşamada %10 luk FBS içeren besiyeri ile U251 GBM hücreleri toplam hacim 100 µl olacak şekilde 5000 hücre/kuyucuk olacak oranda, 96'lık plaklara, elimizdeki her kimyasal ajan için, üç tekrarlı ekildi. Ftalazin türevleri (Vatalanib, Ztf-1t, Ztf-2t, Ztf-3t, Ak-3ep, Akt-1) bir gün sonra 0.1, 1, 5, 10 µM'lık konsantrasyonlarda hücrelere uygulandı [Paesler et al., 2010]. 24 saatlik inkübasyon sonunda hücre canlılık testi (WST-1) yapıldı.

İlk dozların ardından aldığımız sonuçlara göre farklı doz aralıklarında ikinci bir WST-1 deneyi gerçekleştirildi. Tekrar %10 luk FBS içeren besiyeri ile U251 GBM hücreleri toplam hacim 100 µl olacak şekilde 5000 hücre/kuyucuk olacak oranda, 96'lık plaklara, elimizdeki her kimyasal ajan için, üç tekrarlı ekildi. Ftalazin türevleri bir gün sonra, ztf-3t ve vatalanib için 1, 5, 10, 20 µM'lık konsantrasyonlarda ve ztf-1t, ztf-2t, ak-3ep, akt-1 için 1, 10, 20, 50, 100 uM'lık konsantrasyonlarda hücrelere uygulandı. 24. saat sonunda hücre canlılık testi (WST-1) yapıldı.

24 saatlik inkübasyonlardan sonra, inkübasyon süresinin hücre canlılığına etkileri karşılaştırıldı. %10 luk FBS içeren besiyeri ile U251 GBM hücreleri toplam hacim 100 µl olacak şekilde 5000 hücre/kuyucuk olacak oranda, 96'lık plaklara, elimizdeki her kimyasal ajan için, üç tekrarlı ekildi. Ztf-3t ve vatalanib 1, 5, 10, 20 µM'lık konsantrasyonlarda ve ztf-1t, ztf-2t, ak-3ep ve akt-1 1, 10, 20, 50, 100 uM'lık konsantrasyonlarda hücrelere uygulandı. 24 ve 48 saat sonunda yapılan hücre canlılık testi (WST-1) karşılaştırıldı.

7.2.6. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Test ve kontrol gruplarına ait canlı hücre sayıları, WST-1 yöntemi ile belirlendi. Bu yöntemin temeli, sarı renkli tetrazolyum tuzunun mitokondriyal solunum zincirinde yer alan ve sadece canlı hücrelerde aktif olan mitokondriyal

dehidrogenaz enzimi aracılığıyla, koyu kırmızı renkli, suda çözünmeyen formazan kompleksine dönüşmesine dayanmaktadır. Mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesi, canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Dolayısıyla, spektrofotometrik olarak aktif (canlı) hücre sayısının bir ölçütüdür. Bu işlem için önce 96 kuyucuklu kültür kaplarında bulunan hücrelerin üzerine WST-1 solüsyonundan 10µl eklenerek inkübatörde 2 saat bekletildi. İnkübasyon işlemi sona erdiğinde çalkalayıcı etüvde (37°C, 5 dakika, 180 devir/dakika) bekletildi. Absorbanslar, dalga boyu 440 nm'ye ve referans dalga boyu 520 nm'ye ayarlanmış mikropalak okuyucuda (Molecular Device) ölçüldü. Absorbans değerleri aşağıdaki formülde yerine konularak her bir grubun hücre canlılık oranı (%) hesaplandı:

$$\text{Hücre canlılık oranı (\%)} = (A_{\text{test}} - A_{\text{blank}} / A_{\text{kontrol}} - A_{\text{blank}}) \times 100 \quad (7.2)$$

- A_{test} = Test grubunun absorbansı
- A_{kontrol} = Kontrol grubunun absorbansı
- A_{blank} = Blank grubunun absorbansı

Tüm analizler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve istatistiksel değerlendirmeler two-way ANOVA testi kullanılarak GraphPAD prism 5 programıyla yapıldı.

7.2.7. SDS-PAGE Jel Elektrofrez ve İmmünblotlama

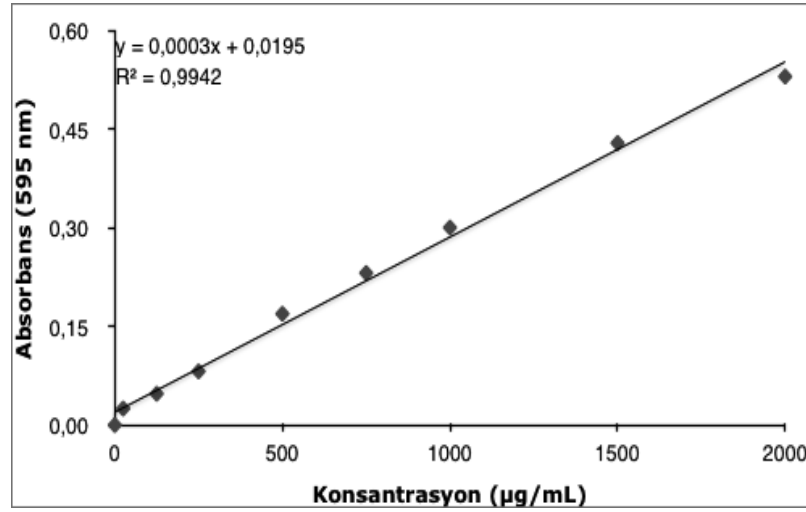
7.2.7.1. Hücrelerden Protein izolasyonu

U251 GBM hücreleri 100 lük petrilere (500.000 hücre/petri) 3 tekrarlı şekilde ekildi. Hücreler kültür kaplarında (petrilere) ftalazin türevleri (vatalanib, ztf-1t, ztf-2t, ztf-3t, ak-3ep, akt-1) ile 1-10 µM'lık dozlarda muamele edildi. 24 saat inkübe edildikten sonra hücreler 2 kez 3'er ml PBS ile yıkandı. Daha sonra 250 µl liziz tamponu (cell lysis buffer-cell signaling) ile 2-3 dakika bekletilerek parçalanıp hücre kazıyıcı (cell scraper) ile hücreler kaldırıldı ve ependorflara aktarıldı. Ependorflara alınan hücreler buzun içerisinde insülin enjektöründen 15-20 kez geçirilerek parçalandı. Süspansiyon önce -20°C derin dondurucuda 15 dakika bekletildikten sonra 37°C' de 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra +4°C' de 14000 rpm de 10 dakika

santrifüjlendi. Süpernatant kısmı ayrılarak -20°C’de saklandı. Tüm aşamalar buz üzerinde gerçekleştirildi.

7.2.7.2. Protein Miktar Tayini

Hücrelerin lizis edilmesinden sonra örneklerdeki total protein konsantrasyonu, BCA (bicinchoninic acid) protein tayin yöntemi ile ölçüldü. Öncelikle Bovine Serum Albümin (BSA) kullanılarak 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 ug/ml konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı. 96 kuyulu plaklara örneklerden ve standartlardan 10 ul konuldu ve üzerine 200 µl BCA reaktifinden eklendi. 30 dakika inkübatörde bekletildi. 30 dakika sonunda oda sıcaklığına gelmesi beklenerek 595 nm’de plak okuyucuda okutularak absorbans değerleri alındı. Oluşturulan standart eğriye göre örneklerdeki protein miktarı hesaplandı (Şekil 7.3.).



Şekil 7.3: BCA kalibrasyon eğrisi.

7.2.7.3. Jel Elektroforezi

İlk olarak %5’lik yükleme jeli ve %10’lik ayırma jeli hazırlandı (Tablo 7.1.). Jeller elektroforez tankına yerleştirildi. 40µg protein örnek tamponu ile 1’e 3 oranında sulandırıldı ve 95°C’de 5 dakika ısıtılarak proteinlerin denatüre olması sağlandı. Denatüre edilen örnekler ve protein molekül ağırlığı belirleyicisi (marker) (thermo prestained protein ladder, 10 to 250 kDa) jele yüklendi. Elektroforez tankına

elektroforez tamponu (running buffer) eklenerek 100 volt sabit akımda 10 dakika, daha sonra 120 volt sabit akımda 60 dakika proteinlerin ayrışması sağlandı.

Ayrıştırılan proteinler transfer sistemi ile nitroselüloz membrana aktarıldı. Transfer işlemi sonrası proteinler Ponceau S. boyası ile boyandı. Daha sonra membran %5 oranında süt tozu içeren TBST ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda tutuldu (bloklama). Sonrasında membran %5 süt tozu-TBST karışımı ile 1:500 oranında spesifik primer (Phospho-AKT Pathway Antibody Sampler Kit (Cell Signaling), Phospho-VEGF Receptor 2 Antibody Sampler Kit (Cell Signaling), AKT Antibody (Cell Signaling), VEGF Receptor 2 Antibody Sampler Kit (Cell Signaling), GAPDH (Cell Signaling)) antikorları hazırlanarak bir gece +4°C’de çalkalayıcıda inkübe edildi. Bağlanmamış antikorların TBST ile yıkanarak uzaklaştırılmasından sonra membran %5’lik süt tozu-TBST karışımı kullanılarak 1:500 oranında hazırlanan sekonder antikor (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling)) ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. Membran 5’er dakika 3 kez TBST ile yıkandıktan sonra kemilüminesans substrat (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate-Thermo) ile 1dk. karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda membran Chemi Doc Mp cihazında görüntülendi ve bant yoğunluklarının alanları hesaplanarak istatistiksel olarak analizi yapıldı.

Tablo 7.1: Elektroforez jelinin hazırlanmasında gerekli malzemeler.

	%5 Bisakrilamid Jel (Yürütme Jeli)	%10 Bisakrilamid Jel (Ayrırma Jeli)
Bidistile su	2,7 ml	3,970 µl
1 M Tris HCL pH 6,8	500 µl	————
%30 akrilamid/bisakrilamid	670 µl	3,33 µl
%10 SDS	40 µl	0,100 µl
%10 APS (Amonyum Persülfat)	40 µl	0,100 µl
TEMED (Tetra metilen diamin)	4 µl	4 µl
1,5 M Tris HCL pH 6,8	————	2,500 µl

7.2.8. Kullanılan İstatistik Yöntemler

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri GraphPadPrism5 yazılımı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirmelerde two-way ANOVA ve Bonferroni posttest'i kullanılarak anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak alınmıştır. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterilmiştir.

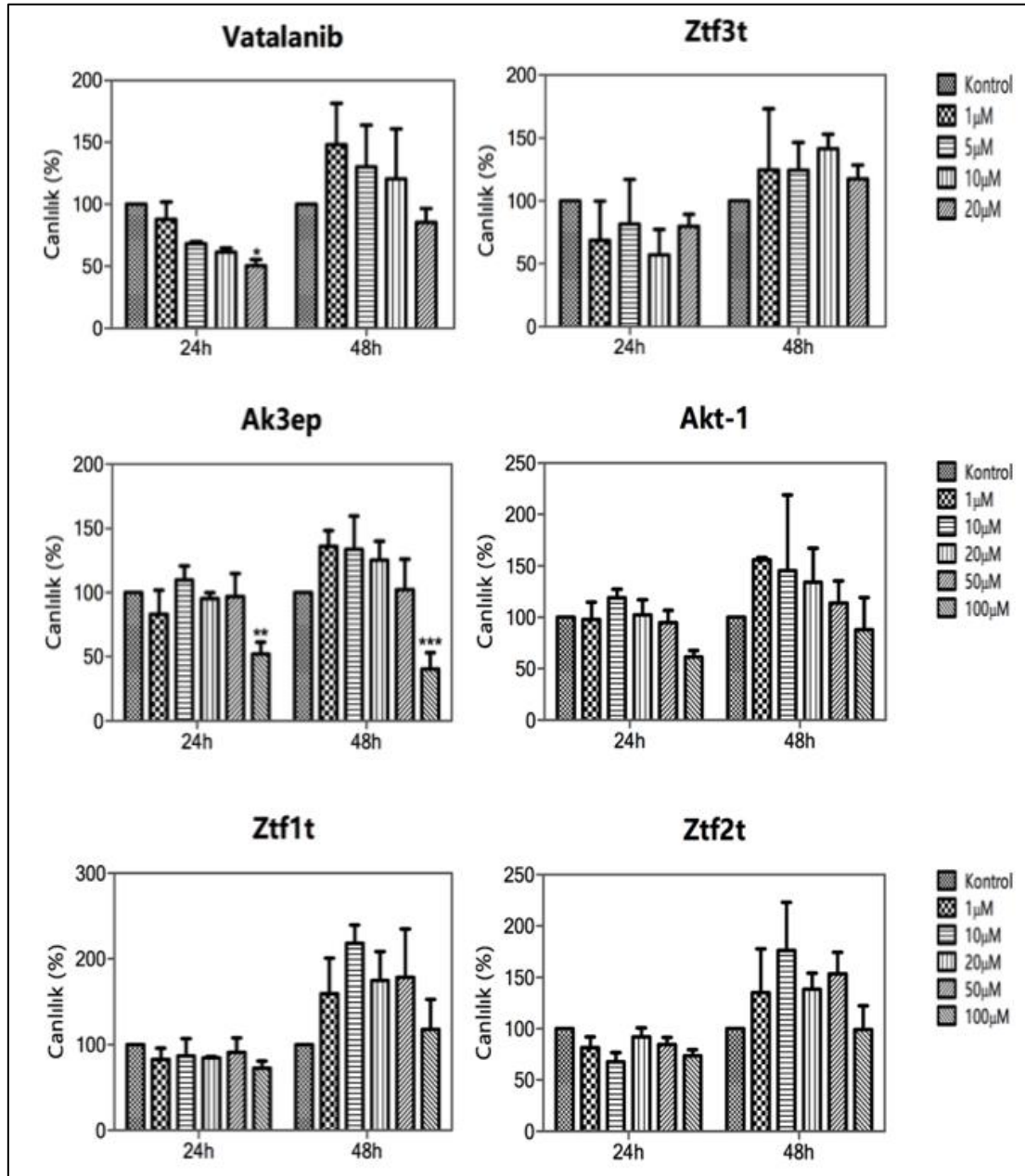
8. BULGULAR

8.1. Hücre Canlılık Deneyi

Çalışmada U251 GBM hücre hattından oluşan kültürler uygun koşullarda çoğaltıldıktan sonra, özgün ftalazin türevlerinin western blotting deneyinde uygulanacak dozlarının belirlenebilmesi ve anti-proliferatif etkilerinin değerlendirilebilmesi için hücre canlılık deneyi (WST-1) gerçekleştirildi.

Çalışmanın ilk kısmında ftalazin türevlerinin, %10 luk FBS içeren besiyerindeki U251 kökenli GBM hücrelerine (5000 hücre/kuyucuk), 0.1, 1, 5, 10 μ M'lık dozlarda 24 saat inkübasyonu sonrası hücre canlılığında meydana getirdiği değişimler incelendi. Elde edilen bulgularda, ftalazin türevlerinden ak-3ep, akt-1, ztf-1t ve ztf-2t' nin belirtilen dozlarının anlamlı bir anti-proliferatif etki yaratmadığı ($p>0,05$), buna karşın, ztf-3t grubundaki canlılığın kontrol grubuna göre sırasıyla %79, %68, %81, %57 ve vatalanib uygulanan hücrelerdeki canlılığın ise kontrol grubuna göre sırasıyla %97, %100, %80, %55 oranlarında azaldığı gözlemlendi.

Bu sonuçlara göre, %10' luk FBS içeren besiyerindeki U251 kökenli GBM hücrelerine (5000 hücre/kuyucuk) vatalanib ve ztf-3t' yi 1, 5, 10, 20 μ M ve diğer ftalazin türevleri olan ak-3ep, akt-1, ztf-1t, ztf-2t' yi ise 1, 10, 20, 50, 100 μ M'lık dozlarda uygulayarak 24 saatlik ve 48 saatlik inkübasyon sonrası hücre canlılığı değerlendirilmesi uygun bulundu (Şekil 8.1.).



Şekil 8.1: Farklı doz aralıklarında U251 GBM hücre hattından oluşan kültürlerle uygulanan ftalazin türevleri, 24 ve 48 saat inkübasyon sonunda hücrelerin canlılık oranları (Veriler ANOVA, Bonferroni posttest ile değerlendirildi, sonuçlar $\pm$ standart sapma olarak verildi, n=3; *, $p<0.05$, **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$).

%10 FBS içeren DMEM besiyerindeki U251 GBM hücrelerinin (5000 hücre/kuyucuk) 24 saatl inkübasyonu sonucunda vatalanib grubunda %88, %68, %61, %50, ztf-3t grubunda %86, %88, %95, %79, ak-3ep grubunda %83, %109, %95, %96, %52, akt-1 grubunda %97, %118, %102, %94, %61, ztf-1t grubunda %82, %86, %84, %91, %72 ve ztf-2t grubunda ise %81, %67, %91, %84, %73

oranında canlılık değişimi gözlemlendi. 48 saatlik inkübasyon sonunda ise hücre canlılığı vatalanib grubunda %148, %130, %120, %85, ztf-3t grubunda %124, %124, %141, %117, ak-3ep grubunda %136, %133, %125, %102, %40, akt-1 grubunda %155, %145, %134, %113, %88, ztf-1t grubunda %159, %218, %174, %178, %118 ve ztf-2t grubunda ise %135, %176, %138, %153, %99 oranında değişti.

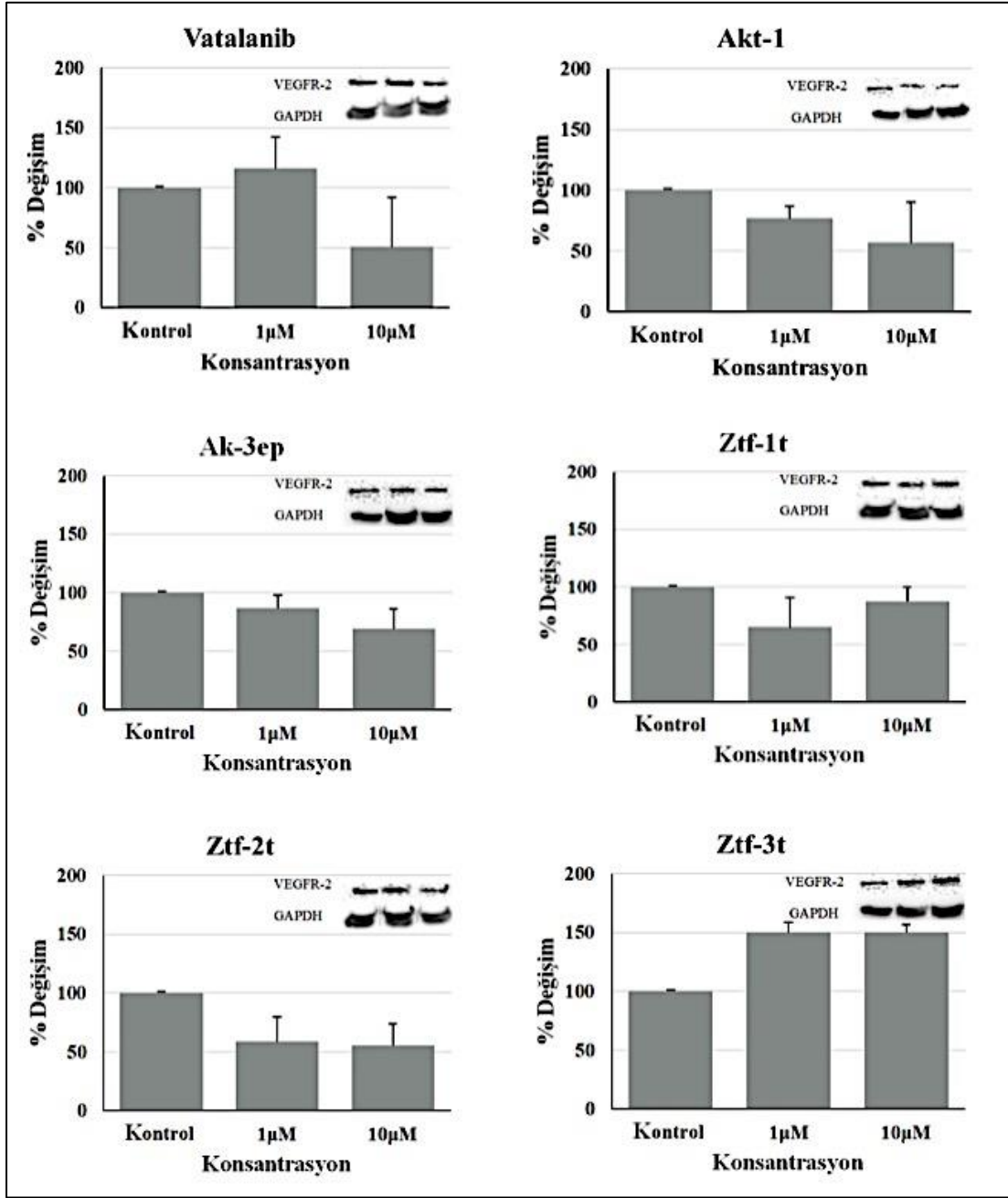
24 saatlik canlılık (WST-1) deneyinin sonunda hücre canlılığı bakımından vatalanib grubunun 20 μM 'lık dozunda ($p<0,05$) ve ak-3ep grubunun 100 μM 'lık dozunda ($p<0,01$) anlamlı bir düşüş gözlenirken, 48 saatlik canlılık deneyinin sonunda ise sadece ak-3ep grubunun 100 μM 'lık dozunda anlamlı bir anti-proliferatif etkiye rastlandı ($p<0,001$). Ztf-1t, ztf-2t, ztf-3t ve akt-1' in kendi kontrol gruplarına kıyasla her iki inkübasyon süresinde hücre canlılığı bakımından bir anlamlılık göstermedikleri gözlemlendi($p>0,05$).

Bu sonuçlar; birer tirozin kinaz inhibitörü olan özgün ftalazin türevlerinin hücre canlılığını anlamlı bir fark gösterecek kadar etkilemediğini ortaya çıkardı. Western blotting deneyleri için ise, ftalazin türevlerinin, GBM hücrelerine (U251 hücre hattı) 1 ve 10 μM 'lık konsantrasyonlarda uygulanması uygun bulundu.

8.2. Western Blotting Deneyi

Bölüm 7.2.7 de tanımlana yöntemine uygun olarak gerçekleştirilen western blott deneyi sonrası yapılan görüntülemelerde protein bant yoğunlukları ölçülerek sonuçlar analiz edildi. Burada test edilen proteinlerin bant yoğunluklarının ftalazin türevlerinin uygulanmasına bağlı olarak kontrol grubuna göre yüzdelik değişimi değerlendirildi.

İlk olarak VEGFR-2 protein bant yoğunluğu analiz edildi. Vatalanib' in 1 μM 'lık ve 10 μM 'lık dozlarında sırasıyla %116 ve %51, akt-1' in 1 μM 'lık ve 10 μM 'lık dozlarında sırasıyla %77 ve %57, ak-3ep grubunun 1 μM 'lık ve 10 μM 'lık dozlarında sırasıyla %86 ve %69, ztf-1t grubunun 1 μM 'lık ve 10 μM 'lık dozlarında sırasıyla %66 ve %87, ztf-2t grubunun 1 μM 'lık ve 10 μM 'lık dozlarında sırasıyla %59 ve %55 son olarak ztf-3t grubunun 1 μM 'lık ve 10 μM 'lık dozlarında sırasıyla %150 ve %150 oranlarında VEGFR-2 protein bant yoğunluğu analiz edilmiştir (Şekil 8.2.).

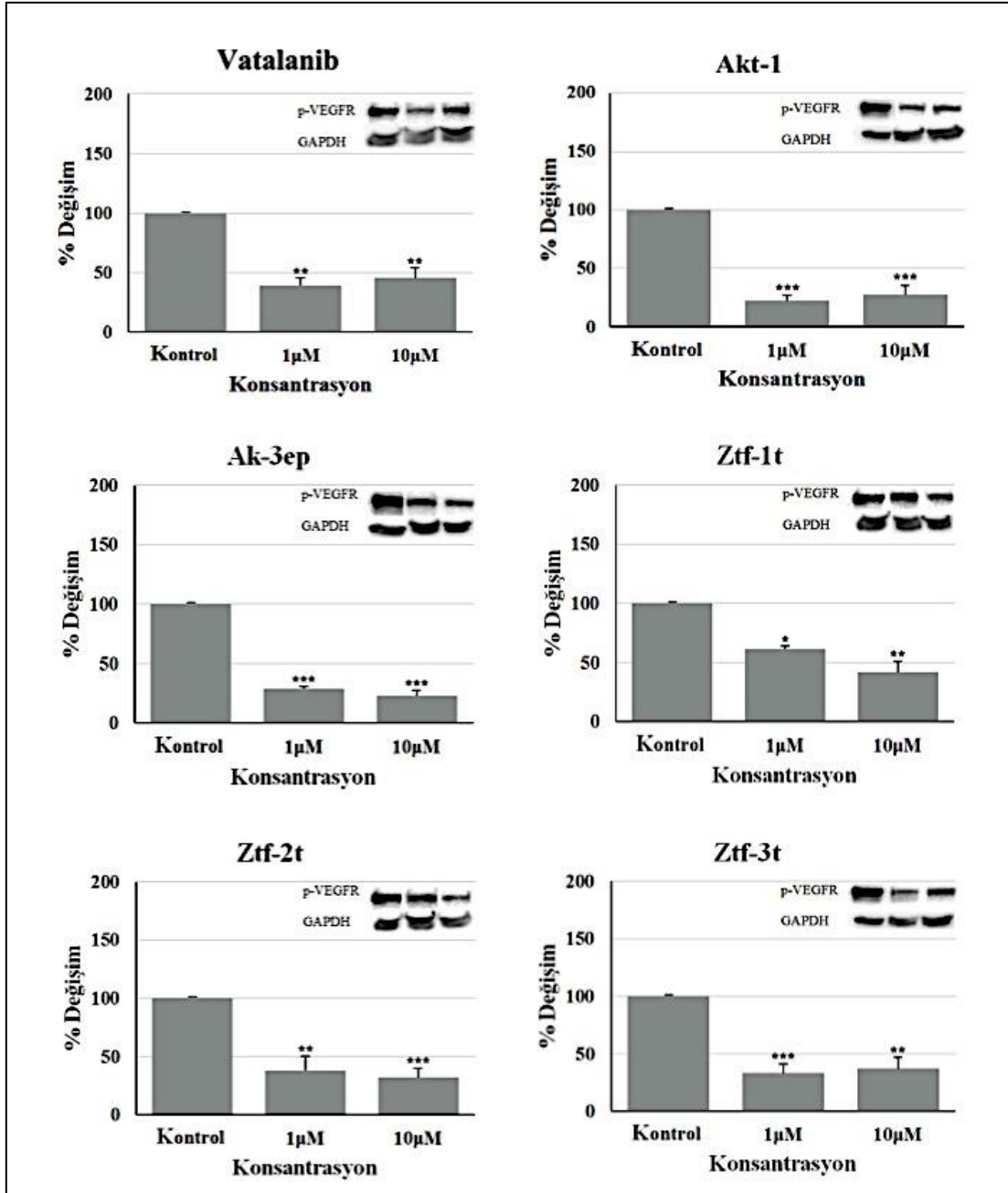


Şekil 8.2: GBM hücrelerinde, uygulanan ftalazin türevlerine ve konsantrasyonlarına göre, VEGFR-2 değişimlerinin grafikleri ve bant yoğunlukları (Veriler ANOVA, Bonferroni posttest ile değerlendirildi, sonuçlar $\pm$ standart sapma olarak verildi, $n=3$; *, $p<0.05$, **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$).

%VEGFR-2 analizleri sonucunda her bir grubun kendi içinde farklı konsantrasyonlarında ve gruplar arasında herhangi bir anlamlılık gözlenmemiştir ($p>0.05$).

p-VEGFR protein bant yoğunluğu analizinde ise sonuçlar vatalanib grubunun 1 μM 'lık ve 10 μM 'lık dozlarında sırasıyla %39 ve %46, akt-1 grubunun 1 μM 'lık ve 10 μM 'lık dozlarında sırasıyla %22 ve %27, ak-3ep grubunun 1 μM 'lık ve 10 μM '

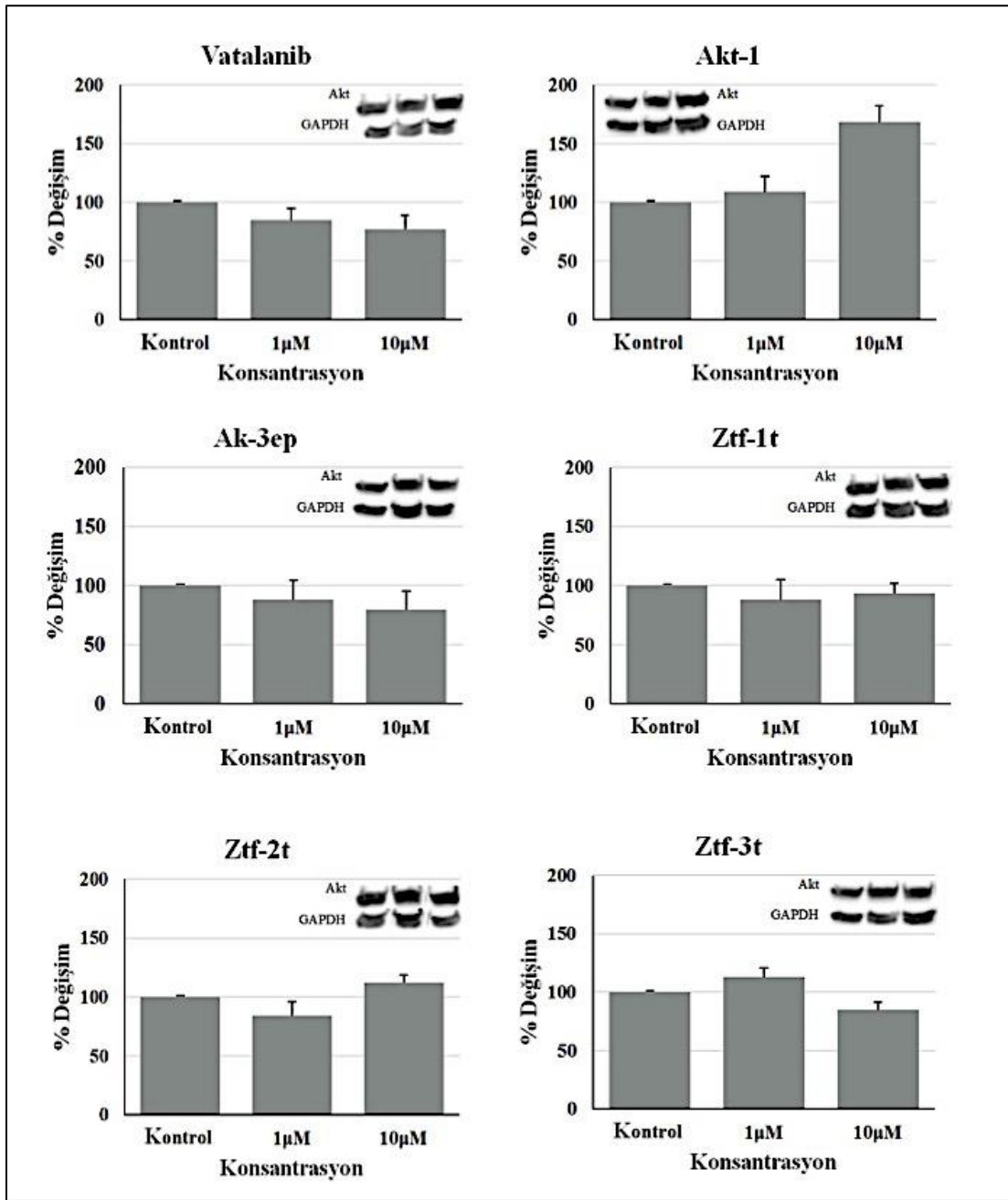
lık dozlarında sırasıyla %29 ve %23, ztf-1t grubunun 1 μ M' lık ve 10 μ M' lık dozlarında sırasıyla %61 ve %41, ztf-2t grubunun 1 μ M lık ve 10 μ M lık dozlarında sırasıyla %38 ve %32 son olarak ztf-3t grubunun 1 μ M lık ve 10 μ M lık dozlarında sırasıyla %33 ve % 37 oranlarında p-VEGFR protein bant yoğunluğu analiz edilmiştir (Şekil 8.3.).



Şekil 8.3: GBM hücrelerinde, uygulanan ftalazin türevlerine ve konsantrasyonlarına göre, p- VEGFR-2 değişimlerinin grafikleri ve bant yoğunlukları (Veriler ANOVA, Bonferroni posttest ile değerlendirildi, sonuçlar $\pm$ standart sapma olarak verildi, n=3; *, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001).

%p-VEGFR analizleri sonucunda vatalanib grubunun her iki dozundada kendi kontrol grubuna göre bir anlamlılık gözlenmiştir ($p<0.01$). Diğer ftalazin türevlerinde ise sırasıyla akt-1 ve ak-3ep' de her iki dozda kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş ($p<0.001$), ztf-1t grubunda 1 uM' lık dozda ($p<0.05$) ve 10 uM' lık dozda ($p<0.01$) anlamlı bir düşüş, ztf-2t grubunda 1 uM' lık dozda ($p<0.01$) ve 10 uM' lık dozda ($p<0.001$) anlamlı bir düşüş ve ztf-3t grubunda ise 1 uM' lık ($p<0.001$) ve 10 uM' lık dozda ($p<0.01$) anlamlı bir düşüş gözlenmiştir.

Daha sonra AKT protein bant yoğunluğu sonuçlarında vatalanib grubunun 1µM lık ve 10 µM lık alt grubunda sırasıyla %85 ve %77, akt-1 grubunun 1µM lık ve 10 µM lık alt grubunda sırasıyla %109 ve %168, ak-3ep grubunun 1µM lık ve 10 µM lık alt grubunda sırasıyla %88 ve %80, ztf-1t grubunun 1µM lık ve 10 µM lık alt grubunda sırasıyla %88 ve %93, ztf-2t grubunun 1µM lık ve 10 µM lık alt grubunda sırasıyla %84 ve %113 son olarak ztf-3t grubunun 1µM lık ve 10 µM lık alt grubunda sırasıyla %113 ve %85 oranlarında AKT protein bant yoğunluğu analiz edilmiştir (Şekil 8.4.).

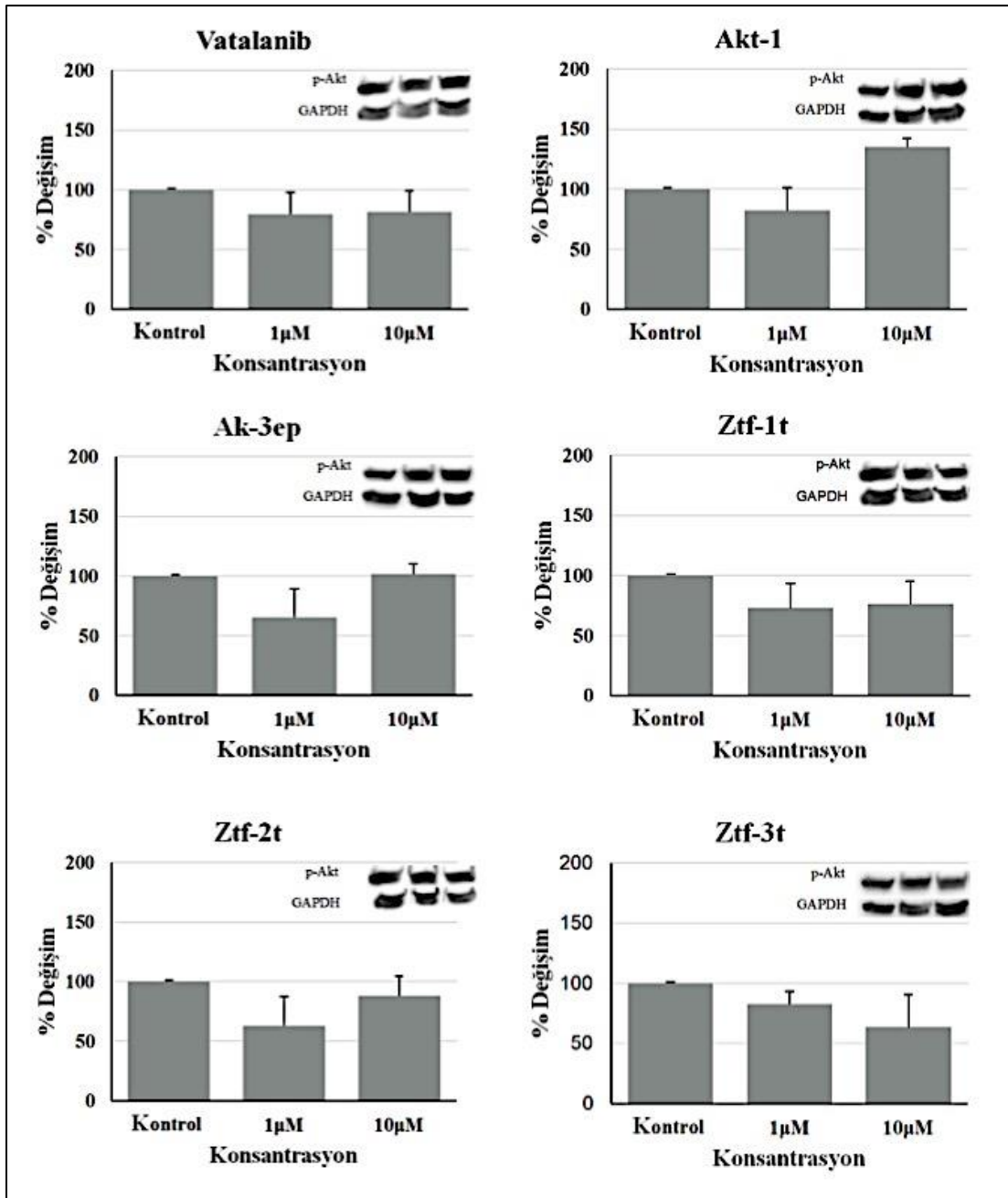


Şekil 8.4: GBM hücrelerinde, uygulanan ftalazin türevlerine ve konsantrasyonlarına göre, AKT değişimlerinin grafikleri ve bant yoğunlukları (Veriler ANOVA, Bonferroni posttest ile değerlendirildi, sonuçlar $\pm$ standart sapma olarak verildi, n=3; *, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001).

%AKT analizleri sonucunda her bir grubun kendi kontrol grubuna göre farklı konsantrasyonlarında ve gruplar arasında herhangi bir anlamlı fark gözlenmedi (p>0.05).

P-AKT protein bant yoğunluğu sonuçlarında gözlemlenen ise vatalanib grubunun 1µM lık ve 10 µM lık alt grubunda sırasıyla %80 ve %81, akt-1 grubunun

1µM lık ve 10 µM lık alt grubunda sırasıyla %82 ve %135, ak-3ep grubunun 1µM lık ve 10 µM lık alt grubunda sırasıyla %65 ve %102, ztf-1t grubunun 1µM lık ve 10 µM lık alt grubunda sırasıyla %73 ve %76, ztf-2t grubunun 1µM lık ve 10 µM lık alt grubunda sırasıyla %63 ve %88 son olarak ztf-3t grubunun 1µM lık ve 10 µM lık alt grubunda sırasıyla %83 ve %64 oranlarında p-AKT protein bant yoğunluğu analiz edilmiştir (Şekil 8.5.).



Şekil 8.5: GBM hücrelerinde, uygulanan ftalazin türevlerine ve konsantrasyonlarına göre, p-AKT değişimlerinin grafikleri ve bant yoğunlukları (Veriler ANOVA, Bonferroni posttest ile değerlendirildi, sonuçlar $\pm$ standart sapma olarak verildi, n=3; *, $p<0.05$, **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$).

% p-AKT analizleri sonucunda her bir grubun kendi kontrol grubuna göre farklı konsantrasyonlarında ve gruplar arasında herhangi bir anlamlılık gözlenmemiştir ($p>0.05$).

9. TARTIŞMA

GBM, primer merkezi sinir sistemi tümörleri içinde VEGF' in yüksek ekspresyonu ile karakterize olan oldukça malign ve kontrol edilmesi zor bir tümördür. Standart model olan cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi yaklaşımlarına rağmen GBM tedavisinde henüz tam olarak başarıya ulaşılammıştır ve bu başarısızlığın en önemli nedeni GBM' in lokal kontrolünün sağlanamamasıdır. Görüntüleme, cerrahi ve radyoterapi tekniklerinde kaydedilen ilerlemelere rağmen GBM hastalarının prognozu kötüdür. Bu nedenle daha etkili kemoterapötik ajanlar için yapılan çalışmalar hızla devam etmektedir [Tubbs et al., 2009]. GBM' in 1.6/1 oranında erkeklerde kadınlardan daha fazla görüldüğünün tespit edilmiş olması [Salcman, 2001], [Giles and Gonzales, 2001], Ponten ve arkadaşlarının 75 yaşındaki GBM' li bir erkekten geliştirdiği U251 GBM hücre hattını bu çalışmada kullanmamızda etkili olmuştur [Ponten, 1975]. Bunun yanı sıra U251 GBM hücre hattının, insanlarda görülen GBM'in histolojik ve immünohistokimyasal özelliklerini tekrarlaması, ve bu hücre hattının GBM' in göze çarpan özelliklerini taklit ettiğinin saptanmış olması [Jacobs et al., 2011], çalışmada diğer hücre hatları yerine U251 hattını tercih etmemizde etkili olmuştur.

Son yıllarda, kanser tedavisindeki gelişmeler moleküler hedef tedavilere doğru yoğunlaşmıştır. Moleküler hedef ajanları kanser hücrelerindeki genetik değişiklikleri hedefleyerek çalışırlar ve bu ajanların kanser tedavilerinin geleceğini oluşturacakları düşünülmektedir. Bu tedavilerle, özellikle tümör hücrelerinin büyümelerini sağlayan sinyalleri durdurmak ve tümörün yayılmasına veya malign dönüşümüne neden olan anjiyogenezin oluşumunu engellemek hedeflenmektedir. Kanser tedavisini geliştirmek için kanserli ve normal hücreler arasındaki farkın iyi anlaşılması gereklidir. Kanser hücreleri normal hücrelerden apoptoz mekanizmalarını kaybetmeleri, hücre bölünmelerinin sınırsız olması, anjiyogenik faktörleri aşırı ifade etmeleri, metastaz yapmaları, hücresel farklılaşmalarının bozulması, anormal sinyal iletimi ve büyüme faktörü reseptörlerinin düzensizliği gibi faktörlerle ayrılırlar.

Çalışmada U251 GBM hücreleri üzerinde etkilerine bakılan özgün ftalazin türevlerinin her biri, halihazırda faz çalışmaları devam eden ve yine bir ftalazin türevi olan vatalanib ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Vatalanib, bilinen tüm VEGF reseptörlerinin hücre içi tirozin kinaz aktivitesini bloke eden ve bu nedenle patolojik tümör neovaskülarizasyonunun uzun vadeli terapisi için uygun bir

ajandır [Brandes et al., 2010]. Novartis ve Schering AG tarafından piyasaya sürülen vatalanib (PTK787 / ZK222584), güçlü, nispeten selektif, oral yoldan verilen birinci nesil VEGFR inhibitörüdür. Vatalanib' in VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3' ün yanı sıra PDGFR ve c-Kit gibi diğer TK' ları da en az 10 kat yüksek konsantrasyonda olmak kaydıyla inhibe ettiği gösterilmiştir [Bold et al., 2000], [Wood et al., 2000]. Vatalanib VEGF odaklı GBM tedavisi için gelecek vaadeden bir ajandır.

Vatalanib daha önce meme kansinimleri [Scott et al., 1998], akciğer [Takahama et al., 1998], mide-bağırsak [Takahashi et al., 1995], prostat [Ferrer et al., 1998], karaciğer [Mross et al., 2005], yumurtalık [Nakanishi et al., 1997], [Sowter et al., 1997], beyin ve böbrek hücrelerinde [Nakagawa et al., 1997] denenmiştir. Vatalanib' in, kemirgen modellerinde deri altına implante edilen insan tümör ksenograftlarında büyümeyi ve mikro-damar yapısını azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca tümör dokularındaki damar yoğunluğunu tümör hücrelerine doğrudan etkisi olmaksızın düşürdüğü, böylelikle vatalanib' in birincil etki mekanizmasının anjiyogenezi inhibe etmek olduğu gösterilmiştir [Lin et al., 2002], [Rini and Small, 2005]. Jeffrey ve arkadaşlarının vatalanib ile yaptıkları faz II çalışmasında, vatalanib' in menenjiomlarda da VEGF' e bağlı anjiyogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir [Jeffrey et al., 2014]. Literatür taramalarımızdan edindiğimiz bu bilgiler doğrultusunda tümör hücresi proliferasyonunu ve VEGF aktivasyonunu *in vitro* olarak önleyeceğini düşündüğümüz ve daha önce literatürde bu amaçla kullanımına rastlamadığımız YTÜ kimya bölümünde sentezlenen ve karşılaştırmalı grubumuz vatalanib gibi ftalazin türevi olan, özgün ftalazin türevlerinin U251 GBM hücre hattı üzerindeki etkileri aydınlatılmaya çalışılmış ve GBM' in hipervasküler doğası nedeniyle meydana getirdiği anjiyogenez ve dolayısıyla tümör büyümesi üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Çalışmada U251 GBM hücre hattından oluşan kültürlerimizi uygun koşullarda çoğalttıktan sonra, özgün ftalazin türevlerinin anti-proliferatif etkilerinin değerlendirebilmek ve GBM hücreleri üzerindeki etkileriyle ilgili genel bir fikir edinebilmek için yaptığımız hücre canlılık deneyinde 24 saat sonunda hücre canlılığı bakımından vatalanib'in 20 μM ' lık dozunda ($p < 0,05$) ve ak-3ep'in 100 μM ' lık dozunda ($p < 0,01$) anlamlı bir anti-proliferatif etkiyle karşılaştık. 48 saat sonunda ise sadece ak-3ep'in 100 μM ' lık dozunda anlamlı bir anti-proliferatif etkiye rastladık ($p < 0,001$). Elimizdeki özgün ftalazin türevleriyle karşılaştırmalı olarak baktığımızda,

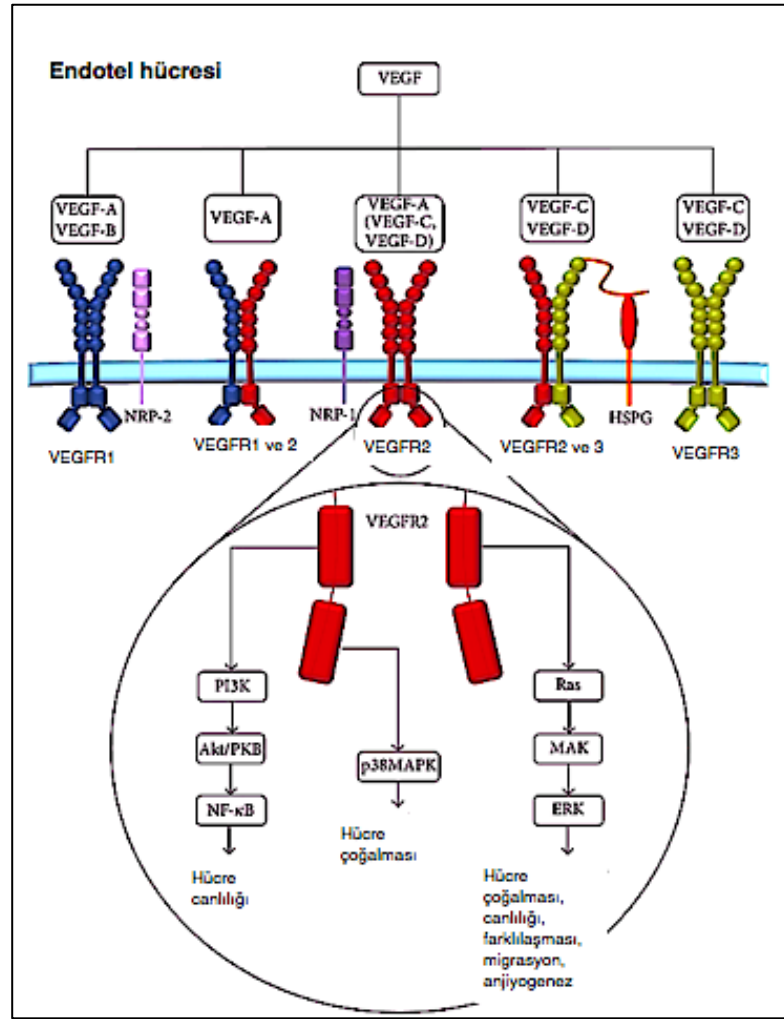
vatalanib' in 48 saat sonunda anti-proliferatif etki göstermemiş olması, Shankar ve arkadaşlarının 10 μM vatalanib' in U251 GBM hücrelerinde 24 ve 48 saat sonunda herhangi bir anti-proliferatif etki göstermediği bulgularıyla örtüşüyordu [Shankar et al., 2016]. Gauman ve arkadaşları ise vatalanib' in 0.1, 1 ve 10 μM ' lık dozlarının leyomiyosarkom hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat sonunda canlılık oranlarında bir düşüş göstermediğini ifade etmişlerdir [Gauman et al., 2014]. Çalışmada kullanılan ak-3ep' in 24 ve 48 saat sonunda 100 μM ' lık konsantrasyonda gösterdiği anti-proliferatif etki ise, bu dozun hücreler için toksik olması ve hücreler üzerinde daha düşük konsantrasyonlarda canlılık bakımından etki göstermemesi nedeniyle gözardı edildi. Diğer ftalazin türevlerinin ise her iki inkübasyon süresinde (24 ve 48 saat) ve farklı konsantrasyonlarda canlılık oranlarında anlamlı bir etki göstermedikleri görüldü. Bu sonuçlar; birer tirozin kinaz inhibitörü olan özgün ftalazin türevlerinin hücre canlılığını etkili bir şekilde değiştirmediklerini ve her birinin GBM hücreleri üzerindeki etkilerinin, farklı mekanizmalar bağlamında incelememiz gerekliliğini ortaya çıkardı.

Tümörün büyümesi ve metastaz yapması için gerekli olan anjiyogenezin rolü ilk olarak Dr. Judah Folkman tarafından 1971 de savunulmuştur. Literatürde ilk kez Folkman, neovaskülarizasyonun primer tümörün daha da büyümesine izin verdiğini ve bunun ardından gelen metastazın ise anjiyogeneze bağımlı olduğunu savunmuştur. Folkman, göç eden tümör hücrelerinin sistemik dolaşıma erişmesi, uzak metastazlar kurması için anjiyogenezin potansiyel bir yol oluşturduğunu ve solid tümörlerin çaplarının neovaskülarizasyon yokluğunda 2-3 mm ile sınırlı kalacağını ifade etmiştir. Daha sonra ise tümör büyümesinin anjiyogeneze bağlı olduğunu çeşitli çalışmalarında göstermiştir [Folkman., 1971], [Folkman., 1990]. Araştırmacılar anjiyogenezin tümörün uyku halinden malign hale geçişinde temel bir adım olduğunu ifade etmişlerdir [Klagsbrun and Moses., 1999], [Folkman., 2002], [Folkman and Klagsbrun, 1987]. Kanserde anjiyogenez, anjiyogenez aktivatörleri ve anjiyogenez inhibitörleri tarafından dengelenemez ve patolojik hale gelir [Folkman and Klagsbrun, 1987], [Tonini et al., 2003]. Bu nedenle, dışarıdan müdahale ile inhibitör konsantrasyonunun arttırılması ya da aktivatör seviyelerinin azaltılması, dengeyi değiştirebilir [Hanahan and Folkman., 1996]. Çalışmalar, anjiyogenezin tümör büyümesi ve invazyon için önemli olduğunu göstermiş olduğundan, anjiyogenezi inhibe etmek yeni kanser tedavilerinin geliştirilmesi için umut verici bir strateji oluşturmaktadır. GBM gibi agresif tümörlerde, vaskülarizasyon oldukça

fazladır ve tümörün daha malign bir hal almasını kolaylaştırır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda birçok anti-anjiyogenik ajan geliştirilmiştir. Birkaç anjiyogenez inhibitörü GBM’ de artmış klinik fayda göstermiş olmasına rağmen, bu farmakolojik ajanların birçoğu yaşam süresini uzatmada başarısız olmuştur. Dolayısıyla, yeni ve daha etkili anti-anjiyogenik ajanlara ihtiyaç vardır.

VEGF anjiyogenezdeki en önemli aktivatörlerden biridir. VEGF / VEGFR sinyal sistemi, endotel hücre proliferasyonu, migrasyon, invazyon, vasküler geçirgenlik ve vazodilatasyon da dahil olmak üzere tümör vaskülarizasyonunun düzenlenmesinde çok sayıda fonksiyonu yerine getirir. Klinik gözlemlerden ve laboratuvar araştırmalarından elde edilen önemli kanıtlar, VEGF/VEGFR ile indüklenen anormal anjiyogenez karaciğer [Litz and Krystal., 2006], mesane [Brown et al., 1993 a], böbrek [Brown et al., 1993 a], yumurtalık [Olson et al., 1994], prostat [Soultzis et al., 2006], gastrointestinal sistem kanseri [Brown et al., 1993 b], melanoma [Gille, 2006], lösemi, lenfoma ve multipl miyelomada [Bellamy et al., 1999] bildirilmiştir. Dolayısıyla VEGF/VEGFR sinyalizasyon sisteminin inhibisyonu kanser tedavisi için çekici bir yaklaşım olarak kabul edilebilir. Cameron ve Davis 2009 yılında, GBM’ de anjiyogenezin matematiksel modelini yaratmışlar ve bu modele göre VEGF’ in GBM agresifliğinin belirlenmesinde son derece etkili olduğunu göstermişlerdir [Cameron and Davis, 2009]. Bu çalışmaya göre yüksek VEGF ekspresyonu tümör büyümesine neden olurken, düşük VEGF düzeyi tümörün çapının 2 mm’ nin üzerine çıkmasına izin vermez. Çalışmaya göre anti-VEGF tedavileri klinik GBM tedavilerinin etkili bir yanını oluşturmaktadır. Literatürdeki buna benzer çalışmalar, bize bu çalışmada, GBM anjiyogenezini inhibe edebilmek için, öncelikli olarak VEGF ekspresyonu ve VEGFR aktivasyonuna odaklanmamız gerektiğini düşündürdü.

VEGFR’ ler bir ligand bağlayıcı bölge, bir transmembran ve bir tirozin kinaz bölgesi taşıyan tipik tirozin kinaz reseptörleridir. VEGF, anjiyogenez sırasında VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3’e bağlanır. Bunların arasında anjiyogenezde en önemli role sahip reseptör VEGFR-2 (KDR / Flk-1)’ dir [Shibuya and Claesson-Welsh, 2006] (Şekil 9.1.), [Roberts et al., 2013]. VEGF-A, VEGFR-1 (Flt-1) ve VEGFR-2’ye bağlanır ve bunları aktive eder. VEGFR-1, VEGFR-2’ye kıyasla VEGF’ e daha yüksek bir afiniteyle bağlanır, buna rağmen VEGFR-1’ in tirozin kinaz aktivitesi VEGFR-2’ye göre yaklaşık 10 kat daha zayıftır [Sawano et al., 1996].



Şekil 9.1: VEGFR-2'nin aktivasyonu ile hücre canlılığını, proliferasyonunu, migrasyonunu ve anjiyogenezi destekleyen PI3K, MAPK ve Ras yollarının aşağı akış sinyalizasyon yolu.

Çalışmamızda anjiyogenezi indüksiyonu açısından VEGF reseptörlerinden p-VEGFR-2 oranlarının bize GBM hücrelerindeki anjiyogenezi inhibisyonu/aktivasyonu açısından bir fikir verebileceğini düşünüp çalışmayı buna göre planladık. Canlılık deneylerimiz ve literatür araştırmalarımız ışığında immün blotlama deneyi için ftalazin türevlerini, GBM hücrelerine (U251 hücre hattı) 1 ve 10 μM 'lık konsantrasyonlarda uygulanmayı uygun bulduk. Öncelikle VEGFR-2 protein bant yoğunluklarını analiz ettik ve bu analizlerin sonucunda her bir grubun kendi içinde farklı konsantrasyonlarında ve gruplar arasında protein düzeyinde herhangi bir anlamlılık göstermediğini gördük ($p>0.05$). Anjiyogenezi inhibisyonu seviyesini görmemiz için önemli olan p-VEGFR-2 düzeylerinin analizi sonucunda ise her bir türevin kendi kontrol gruplarına göre protein seviyelerinde anlamlı bir düşüş göstermesinin yanı sıra pozitif kontrol olarak kullandığımız vatalanib grubundan, p-

VEGFR-2 inhibisyonu açısından, daha etkili türevlerimizin olduğunu gördük. Bunlardan akt-1 ve ak-3ep'in her iki dozunda (1 ve 10 μ M) ($p < 0.001$), ztf-2t' nin 10 μ M' lik dozunda ($p < 0.001$), ztf-3t' nin 1 μ M' lik dozunda ($p < 0.001$), vatalanib' den daha etkili VEGFR-2 inhibisyonu sonucu aldık. Vatalanib' in U251 GBM hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise; vatalanib' in 10 μ M' da nükleer VEGFR-2 oranını arttırırken membrana bağlı VEGFR-2 oranında anlamlı bir azalma sağladığı bildirilmiştir [Shankar et al., 2016]. Özetle, elde ettiğimiz sonuçlara göre kullandığımız ftalazin türevlerinin p-VEGFR-2 oranlarında anlamlı bir düşüş meydana getirdiğini dolayısıyla anjiyogenez inhibisyonu açısından faydalı olabileceği sonucuna vardık

Kanserde önemli olan sinyal yollarından bir diğeri ise PI3K/AKT sinyal yolağıdır. PI3K-AKT yolu hücre canlılığının kilit bir düzenleyicisidir (Şekil 9.1.). PI3K-AKT yolu, Ras / MAPK yoluna paralel olarak, özellikle G1 / S geçişinde hücre döngüsü ilerlemesinin düzenlenmesine katkıda bulunur. AKT hem normal hücreler fizyolojide hem de çeşitli hastalık hallerinde önemli olan çeşitli sinyal yollarında temel bir düğümdür. AKT yolağı birincil olarak hücre canlılığını düzenler. Çeşitli onkoproteinler ve tümör süpresörleri AKT sinyal iletim yolunda kesişir ve kanserde sırasıyla aktive veya inaktive edilirler [Li et al.,1997], [Steck et al., 1997]. Bu nedenle, PI3K-AKT yolağının hiperaktivasyonu genetik olarak tümör oluşumu sırasında seçilir ve bu yolağın bileşenleri, kanser terapötiklerinin geliştirilmesi için yeni hedefler olarak ele alınırlar. PI3K-AKT yolağının inhibitörlerinin, hem *in vitro* hem de *in vivo* tümör hücresi büyümesinin baskılanmasında etkili olduğu gösterilmiş ve bu yolağın elemanlarına karşı spesifik, yüksek afiniteli inhibitörleri geliştirme çabaları yeni terapötik ajanların ortaya çıkmasını sağlamıştır. PI3K, büyüme faktörü reseptör tirozin kinazlarının (RTKs) aşağı yönünde önemli bir sinyal bileşeni konumundadır [Cantley, 2002]. PI3K, hücre zarında lipid ikincil mesajcı fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat (PIP3) üretimini katalize eder. PIP3 sırasıyla, serin-treonin protein kinaz AKT da (protein kinaz B olarak da bilinir) dahil olmak üzere geniş bir yelpazedeki hedeflerin etkinleştirilmesine katkıda bulunur. Çalışmada p-VEGFR-2 oranlarındaki değişimleri gözlemlerken aynı zamanda aşağı akış yönündeki AKT' in aktivasyonunu da inceledik. Sonuç olarak VEGFR-2 gibi başka RTK' larında aşağı akışında bulunan AKT' in fosforilasyon oranının VEGFR-2 gibi anlamlı seviyede düşmediğini gözlemledik. İlginçtir ki vatalanib' in U251 GBM hücre hattında p-AKT oranını düşürdüğü daha önce rapor edilmiş olmasına rağmen,

yine bir GBM hücre hattı olan U87 hücreleri üzerinde p-AKT oranını arttırdığı yönünde çalışmalar mevcuttur [Shankar et al., 2016].. Daha önce yaptığımız hücre canlılık deneyindeki sonuçlarımızda da, ftalazin türevlerinin toksik olmayan dozlarda GBM hücrelerinin canlılık oranlarında anlamlı bir değişiklik ortaya çıkarmadıkları sonucu ile beraber, VEGFR-2 aşağı akış yönünde olan PI3K/AKT sinyal yolağına paralel olan Ras/Raf/MEK/ERK sinyal yolağı bileşenlerindeki değişikliklerin ayrı bir çalışmada değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Bulgularımız değerlendirildiğinde, yaptığımız hücre canlılık deneyi, ftalazin türevlerinin düşük dozlarının tümör hücrelerinde antiproliferatif etkiye sahip olmadıklarını gösterdi. Daha sonra bu maddelerin tirozin kinaz inhibitörü rolleri düşünülerek VEGFR-2, p-VEGFR-2, AKT, p-AKT düzeyinde etkilerine bakıldı. Canlılık deneyi sonuçlarımızla bağlantılı olarak p-AKT düzeylerinde anlamlı bir düşüş gözlemlenmedi. Literatürdeki bilgilere paralel olarak ftalazin türevlerinin asıl etki mekanizmaları VEGFR-2 fosforilasyonunu inhibe ederek VEGF aktivasyonunu engellemek olduğu görüldü. Yaptığımız istatistiksel değerlendirmelere göre her bir ftalazin türevinin, p-VEGFR-2 oranında anlamlı derecede azalma sağladığı görüldü. Sonuç olarak bulgularımız, ftalazin türevlerinin, VEGFR-2 fosforilasyonunun inhibisyonu yoluyla GBM hücrelerindeki anjiyogenezi inhibe ettiğini göstermektedir.

Gelecekteki çalışmalar için ftalazin türevlerinin çeşitli metodlar ile farklı aktivitelerinin incelenmesi gerektiğini önermekteyiz.

KAYNAKLAR

- Al-Assar F., Zelenin K. N., Lesiovskaya E. E., Bezhan I. P., Chakchir B. A., (2002), "Synthesis and pharmacological activity of 1-hydroxy-, 1-amino-, and 1-hydrazino-substituted 2,3-dihydro-1H-pyrazolo[1,2-A]pyridazine-5,8-diones and 2,3-dihydro-1H- pyrazolo[1,2-b]phthalazine-5,10-diones", *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 36, 598– 603.
- Angeli-Andersen E., Tretli S., Coleman M. P., Langmark F., Grotmol T., (2004), "Colorectal cancer survival trends in Norway 1958-1997", *European Journal of Cancer*, 40(5), 734-42.
- Aroichane M., (1983), "Glioblastoma Multiforme Masquerading as Pseudotumor Cerebri", *Journal of Clinical Neuro-ophthalmology*, 13(2), 105-112.
- Ausprunk D. H., Folkman J., (1997), "Migration and proiferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis", *Microvascular Research*, 14, 53–65.
- Bacciocchi G., Gibelli N., (1992), "Establishment and characterization of Two Cell Lines Derived from Human Glioblastoma Multiforme", *Anticancer Research*, 12, 853-862.
- Bellamy W. T., Richter L., Frutiger Y., Grogan T. M., (1999), "Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors in Hematopoietic Malignancies", *Cancer Research*, 59, 728-733.
- Bigner D. D., (1981), "Biology of gliomas: potential clinical implications of glioma cellular heterogeneity", *Neurosurgery*, 9(3), 320-6.
- Black P. M. C., (1991), "Brain Tumours (I)", *The New England Journal of Medicine*, 324, 1471-1466.
- Blume-Jensen P., Hunter T., (2001), "Oncogenic kinase signaling", *Nature*, 411, 355-64.
- Bocchini V., Casalone R., (1991), "Changes in glial fibrillary acidic protein and karyotype during culturing of two cell lines established from human glioblastoma multiform", *Cell and Tissue Research*, 265, 73-81.
- Bold G., Altmann K. H., Frei J., Lang M., Manley P. W., Traxler P., Wietfeld B., Bruggen J., Buchdunger E., Cozens R., et al., (2000), "New anilinophthalazines as potent and orally well absorbed inhibitors of the VEGF receptor tyrosine kinase useful as antagonists of tumor driven angiogenesis", *Journal of Medicine Chemistry*, 43, 2310–2323.

Boockock C. A., Charnock-Jones D. S., Sharkey A. M., McLaren J., Barker P. J., Wright K. A., Twentyman P. R., Smith S. K., (1995), "Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma", *Journal of the National Cancer Institute*, 87, 506–516.

Brandes A. A., Stupp R., Hau P., Lacombe D., Gorlia T., Tosoni A., Mirimanoff R. O., Kros J. M., van den Bent M. J., (2010), "EORTC study 26041-22041: phase I/II study on concomitant and adjuvant temozolomide (TMZ) and radiotherapy (RT) with PTK787/ZK222584 (PTK/ZK) in newly diagnosed glioblastoma", *European Journal of Cancer*, 46(2), 348-54.

Brat D. J., Mapstone T. B., (2003), "Malignant glioma physiology: Cellular response to hypoxia and its role in tumor progression", *Annals of Internal Medicine*, 138, 659-668.

Breakfield X. O., Stern D. S. F., (1986), "Oncogenes in neural tumours", *Trends Neuroscience*, 9, 150-155.

Brem S., (1976), "The role of vascular proliferation in the growth of brain tumors", *Clinical Neurosurgery*, 23, 440-453.

Brown L. F., Berse B., Jackman R. W., Tognhuzzi K., Manseau E. J., Dvorak H. F., Senger D. R., (1993), "Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas" *American Journal of Pathology*, 143, 1255-1262a.

Brown L. F., Berse B., Jackman R. W., Tognhuzzi K., Manseau E. J., Senger D. R., Dvorak H. F., (1993), "Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract", *Cancer Research*, 53, 4727-4735b.

Bruner J. M., (1994), "Neuropathology of Malignant Glioms", *Seminars in Oncology*, 21(2), 126-138.

Burger P. C., (1983), "Pathologic anatomy and CT correlations in the glioblastoma multiforme", *Applied Neurophysiology*, 46(1-4), 180-7.

Burger P. C., Green S. B., (1987), "Patient Age, Histologic Features, and Length of Survival in Patients With Glioblastoma Multiform", *Cancer*, 59, 1619-1625.

Cameron M. A., Davis A. L., (2009), "A Mathematical Model of Angiogenesis in Glioblastoma Multiforme", Undergraduates thesis, Arizona State University.

Cantley L. C., (2002), "The phosphoinositide 3-kinase pathway", *Science*, 296(5573), 1655-7.

Carmeliet P., (2003), "Angiogenesis in health and disease", *Nature Medicine*, 9, 653-660.

Carpelan-Holmstrom M., Louhimo J., Stenman U. H., Alfthan H., Jarvinen H., Haglund C. C. E. A., (2004), "CA 242, CA 19 9, CA 72 4 and hCGbeta in the diagnosis of recurrent Colorectal cancer", *Tumour Biology*, 25 (5 6), 228-34.

Carroll R. S., Zhang J., Dashner K., Sar M., Black P. M., (1995), "Steroid hormone receptors in astrocytic neoplasms", *Neurosurgery*, 37(3), 496-503.

Castro M. G., Cowen R., Williamson I. K., David A., Jimenez-Dalmaroni M. J., Yuan X., Bigliari A., Williams J. C., Hu J., Lowenstein P. R., (2003), "Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors", *Pharmacology&Therapeutics*, 98(1), 71-108.

Chambaut-Guerin A. M., Costa S. L., Lefrancois T., Fages C., Gauthereau X., Tardy M., (2000), "Effects of retinoic acid and tumor necrosis factor alpha on GL-15 glioblastoma cells", *Neuroreport*, 11(2), 389-93.

Chao C., Saito S., Kang J., Anderson C. W., Appella E., Xu Y., (2000), "p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage", *The European Molecular Biology Organization Journal*, 19, 4967-4975.

Chappelow A. V., Kaiser P. K., (2008), "Neovascular age-related macular degeneration: potential therapies", *Drugs*, 68, 1029-36.

Chase A., Cross N. C., (2006), "Signal transduction therapy in hematological malignancies: identification and targeting of tyrosine kinases", *Clinical Science*, 111 (4), 233-249.

Coffin J. D., Poole T. J., (1988), "Embryonic vascular development: immunohistochemical identification of the origin and subsequent morphogenesis of the major vessel primordia in quail embryos", *Development*, 102, 735-748.

Compton C. C., (2000), "Updated protocol for the examination of specimens from patients with carcinomas of the colon and rectum, excluding carcinoid tumors, lymphomas, sarcomas and tumors of the vermiform appendix. A basis for checklists", *Archives of Pathology&Laboratory Medicine*, 124, 1016-2533.

Dai J., Rabie A. B. M., (2007), "VEGF: an Essential Mediator of Both Angiogenesis and Endochondral Ossification", *Journal of Dental Research*, 86(10), 937-950.

Dhillon A. S., Hagan S., Rath O., Kolch W., (2007), "MAP kinase signalling pathways in cancer", *Oncogene*, 14;26(22), 3279-90.

Douglas B., Cines Eleanor S., Pollak Clayton A., Buck Joseph Loscalzo Guy A., Zimmerman Rodger P., McEver Jordan S., Pober Timothy M., Wick Barbara A., Konkle Bradford S., Schwartz Elliot S., Barnathan Keith R., McCrae Bruce A., Hug Ann-Marie S., David M. S., (1998), "Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders", *Blood*, 91, 3527-3561.

Dvorak H. F., Brown L. F., Detmar M., Dvorak A. M., (1995), "Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis", *The American Journal of Pathology*, 146, 1029-39.

Dziurzynski K., Blas-Boria D., Suki D., Cahill D. P., Prabhu S. S., Puduvalli V., Levine N., (2012), "Butterfly glioblastomas: a retrospective review and qualitative assessment of outcomes", *Journal of Neuro-Oncology*, 109(3), 555-63.

Easmon J., Heinisch G., Püerstinger G. et al., (1997), "Azinyl and diazinyl hydrazones derived from aryl N-heteroaryl ketones: synthesis and antiproliferative activity", *Journal of Medicinal Chemistry*, 40, 4420-25.

Eldehna W. M., Ibrahim H. S., Abdel-Aziz H. A., Farrag N. N., Youssef M. M., (2015), "Design, synthesis and in vitro antitumor activity of novel N-substituted-4-phenyl/benzylphthalazin-1-ones", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 89, 549-60.

Erdem F., Gündoğdu M., (2005), "Anjiojenesis ve anti-anjiojenik tedavi", *Atatürk Üniversitesi Tıp Dergisi*, 37(1), 1-6.

Erdoğan B. B., (2003), "Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-faslı bağımlı apoptozis", *Akciğer Arşivi*, 4, 165-174.

Faivre S., Djelloul S., Raymond E., (2006), "New paradigms in anticancer therapy: targeting multiple signaling pathways with kinase inhibitors", *Seminars in Oncology*, 33(4), 407-20.

Fan T. P., Jaggar R., Bicknell R., (1995), "Controlling the vasculature: angiogenesis, antiangiogenesis and vascular targeting of gene therapy", *Trends in Pharmacological Sciences*, 16, 57-66.

Ferrara N., Davis-Smyth T., (1997), "The biology of vascular endothelial growth factor", *Endocrin Reviews*, 18, 4-25.

Ferrara N., Gerber H. P., LeCouter J., (2003), "The biology of VEGF and its receptors", *Nature Medicine*, 9, 669- 676.

Ferrara N., (1999), "Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects", *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 237, 1-30.

Ferrara N., (2000), "VEGF: An update on biological and therapeutic aspects", *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 517-24.

Ferrer F. A., Miller L. J., Andrawis R. I., Kurtzman S. H., Albertsen P. C., Laudone V. P., Kreutzer D. L., (1998), "Angiogenesis and prostate cancer: in vivo and in vitro expression of angiogenesis factors by prostate cancer cells", *Urology*, 51, 161-167.

Folkman J., (1971), "Tumor angiogenesis therapeutic implications", *The New England Journal of Medicine*, 285, 1182-1186.

Folkman J., (1990), “What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?”, *Journal of the National Cancer Institute*, 82, 4–6.

Folkman J., (2006), “Angiogenesis”, *Annual Review of Medicine*, 57, 1-18.

Folkman, J., Klagsbrun, M., (1987) “Angiogenic factors”, *Science*, 235, 442-447.

Folkman, J., (2002), “Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis”, *Seminars in Oncology*, 29, 15-18.

Frank S., Hubner G., Breier G. et al., (1995), “Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing”, *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 12607–12613.

Franks L. M., Teich, N. M., (1998), “Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer”, 3rd Edition, Oxford University.

Fujisawa H., Reis R. M., Nakamura M., Colella S., Yonekawa Y., Kleihues P., Ohgaki H., (2000), “Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas”, *Laboratory Investigation*, 80(1), 65-72.

Gaumann A. K. A., Drexler H. C. A., Lang S. A., Stoeltzing O., Diermeire-Daucher S., Buchdunger E., Wood J., Bold G., Breier G., (2014), “The inhibition of tyrosine kinase receptor signalling in leiomyosarcoma cells using the small molecule kinase inhibitor PTK787/ZK222584”, *International Journal of Oncology*, 45(6), 2267-2277.

Gerber H. P., McMurtrey A., Kowalski J., Yan M., Keyt B. A., Dixit V., Ferrara N., (1998), “Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation”, *Journal of Biological Chemistry*, 273(46), 30336–43.

Giles G. G., Gonzales M. F., (2001), “Brain Tumors, An Encyclopedic Approach. Epidemiology of brain tumors and factors in progress”, 2th Edition, Churchill Livingstone.

Gille J., (2006), “Antiangiogenic cancer therapies get their act together: current developments and future prospects of growth factor- and growth factor receptor-targeted approaches”, *Experimental Dermatology*, 15, 175-186.

Gonzales M. F., (2001), “Brain Tumors, An Encyclopedic approach. Classification and pathogenesis of brain tumors”, 2th Edition, Churchill Livingstone.

Guba M., Seeliger H., Kleespies A., Jauch K. A., Bruns C., (2004), “Vascular endothelial growth factor in colorectal cancer”, *International Journal of Colorectal Disease*, 19, 510–517.

Gutin P. H., Posner J. B., (2000), “Neuro-oncology: diagnosis and management of cerebral gliomas-past, present, and future”, *Neurosurgery*, 47(1), 1-8.

Haddad S. F., Moore S. A., Schelper R. L., Goeken J. A., (1992), “Vascular smooth muscle hyperplasia underlies the formation of glomeruloid vascular structures of glioblastoma multiforme”, *Journal of Neuropathology&Experimental Neurology*, 51, 488-492.

Hamerlik P., Lathia J. D., Rasmussen R. et al., (2012), “Autocrine VEGF-VEGFR2-Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth”, *The Journal of Experimental Medicine*, 209, 507-20.

Hanahan D., Folkman J., (1996), “Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch During Tumorigenesis”, *Cell*, 86, 353–364.

Hara A., Hirayama H., Sakai N., Yamada H., Tanaka T., Mori H., (1990), “Correlation between nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in human gliomas”, *Surgical Neurology*, 33(5), 320-4.

Harmey J. H., Bouchier-Hayes D., (2002), “Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumor cells: Implications for anti-angiogenic therapy”, *BioEssays*, 24, 280–283.

Haroon Z. A., Hettasch J. M., Lai T. S., Dewhirst M. W., Greenberg C. S., (1999), “Tissue transglutaminase is expressed, active, and directly involved in rat dermal wound healing and angiogenesis”, *The Official Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13:1787–95.

Hentschel S. J., Lang F. F., (2003), “Current surgical management of glioblastoma”, *The Cancer Journal*, 9(2), 113-25.

Hojjat-Farsangi M., (2014), “Small-Molecule Inhibitors of the Receptor Tyrosine Kinases: Promising Tools for Targeted Cancer Therapies”, *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 13768-13801.

Holland E. C., (2001), “Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models”, *Nature Reviews Genetics*, 2(2), 120-9.

Hu D. E., Hori Y., Fan T. P., (1993), “Interleukin-8 stimulates angiogenesis in rats”, *Inflammation*, 17, 135-143.

Huang J., Kontos C. D., (2002), “PTEN modulates vascular endothelial growth factor-mediated signaling and angiogenic effects”, *Journal of Biological Chemistry*, 277(13), 10760–6.

Hurwitz H., Fehrenbacher L., Novotny W., Cartwright T., Hainsworth J., Heim W., Berlin J., Baron A., Griffing S., Holmgren E., Ferrara N., Fyfe G., Rogers B., Ross R., Kabbinavar F., (2004), “Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer”, *The New England Journal of Medicine*, 350, 2335-2342.

Ishikawa M., Kikuchi H., Miyatake S., Oda Y., Yonekura Y., Nishizawa S., (1993), “Glucose consumption in recurrent gliomas”, *Neurosurgery*, 33(1), 28-33.

Issa R., Krupinski J., Bujny T., Kumar S., Kaluza J., Kumar P., (1999), "Vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, in human brain tissue after ischemic stroke", *Laboratory Investigation*, 9, 417-425.

Jacobs V. L., Valdes P. A., Hickey W. F., A De Leo J., (2011), "Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model", *American Society for Neurochemistry*, 3(3), 171-181.

Jain R. P., Vederas J. C., (2004), "Structural variations in keto-glutamines for improved inhibition against hepatitis A virus 3C proteinase", *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, 14, 3655–3658.

Jeffrey J. R., Sean A. G., Alfred R., James P. C., Kenji M., Irene H., Laurie R., Katie McC., Sandra K. J., Maciej M. M., Marc C., (2014), "A phase II trial of PTK787/ZK 222584 in recurrent or progressive radiation and surgery refractory meningiomas", *Journal of Neuro-Oncology*, 117, 93-101.

Jo J., Schiff D., Purow B., (2012), "Angiogenic inhibition in high-grade gliomas: past, present and future", *Expert review of neurotherapeutics*, 12(6), 733-47.

Jones H., Steart P. V., (1991), "Spindle-cell glioblastoma or gliosarcoma", *Neuro Pathology and Applied Neurobiology*, 17, 177-187.

Jung Y. D., Mansfield P. F., Akagi M., Takeda A., Liu W., Bucana C. D., Hicklin D. J., Ellis L. M., (2002), "Effects of combination anti-vascular endothelial growth factor receptor and anti-epidermal growth factor receptor therapies on the growth of gastric cancer in nude mice model", *European Journal of Cancer*, 38, 1133-40.

Kaliberov S. A., Kaliberova L. N., Stockard C. R., Grizzle W. E., Buchsbaum D. J., (2004), "Adenovirus-mediated FLT1- targeted proapoptotic gene therapy of human prostate cancer", *Molecular Therapy Family of Journals*, 10(6), 1059-70.

Kanu O. O., Mehta A., Di C., Lin N., Bortoff K., Bigner D. D., Yan H., Adamson D. C., (2009), "Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets", *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 13(6), 701-18.

Kanzawa T., Kondo Y., Ito H., Kondo S., Germano I., (2003), "Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide", *Cancer Research*, 63, 2103–2108.

Kelly P. J., Dumas-Duport C., Kispert D. B., Kall B. A., Scheithauer B. W., Illig J. J., (1987), "Imaging-based stereotaxic serial biopsies in untreated intracranial glial neoplasms", *Journal of Neurosurgery*, 66(6), 865-74.

Kılıç T., Yıldırım O., Şahin S., Pamir M. N., (2005), "Glial Tümörlerin Anjiyogenezi", *Türk Nöroşirurji Dergisi*, 15, 1,1-9.

Kim E. S., Serur A., Huang J. et al., (2002), "Potent VEGF blockade causes regression of coopted vessels in a model of neuroblastoma", *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States*, 99, 11399- 11404.

Klagsbrun M., Moses M. A., (1999), "Molecular angiogenesis", *Chemistry&Biology*, 6, 217-224.

Kleihues P., Ohgaki H., (1999), "Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis", *Neuro-Oncology*, 1(1), 44-51.

Kliche S., Waltenberger J., (2001), "VEGF receptor signaling and endothelial function", *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 52(1-2), 61-6.

Konopka G., Bonni A., (2003), "Signaling pathways regulating gliomagenesis", *Current Molecular Medicine*, 3(1), 73-84.

Kornblith P. K., Welch W. C., (1993), "The Future of Therapy for Glioblastoma", *Surgical Neurology*, 39, 538-43.

Krex D., Klink B., Hartmann C., Von Deimling A., Pietsch T., Simon M., Sabel M., Steinbach J. P., Heese O., Reifenberger G., Weller M., Schackert G., (2007), "Long-term survival with glioblastoma multiforme", *German Glioma Network Brain*, 130(10), 2596-606.

Kruse C. A., Mitchell D., (1992), "Characterization of a Continuous Human Glioma Cell Line DBTRG-05MG: Growth Kinetics, Karyotype, Receptor Expression, and Tumor Suppressor Gene Analyses", *In vitro Cellular&Developmental Biology*, 28, 609-614.

Lal A., Glazer C. A., Martinson H. M., Friedman H. S., Archer G. E., Sampson J. H., Riggins G. J., (2002), "Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion", *Cancer Research*, 15;62(12), 3335-9

Lawrence W. T., Diegelmann R. F., (1994), "Growth factors in wound healing", *Clinics in Dermatology*, 12, 157-169.

Lefranc F., (2009), "Editorial: on the road to multi-modal and pluri-disciplinary treatment of glioblastomas", *Acta Neurochirurgica*, 151, 109–112.

Lefranc F., Brotschi J., Kiss R., (2005), "Possible future issues in the treatment of glioblastomas: Special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis", *Journal of Clinical Oncology*, 23, 2411–2422.

Leung S. Y., Yuen S. T., Chan T. L., Chan A. S., Ho J. W., Kwan K., Fan Y. W., Hung K. N., Chung L. P., Wyllie A. H., (2000), "Chromosomal instability and p53 inactivation are required for genesis of glioblastoma but not for colorectal cancer in patients with germline mismatch repair gene mutation", *Oncogene*, 19, 4079-4083.

Li J., Yen C., Liaw D., Podsypanina K., Bose S., Wang S.I., Puc J., Miliaresis C., Rodgers L., McCombie R. et al., (1997), "PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer", *Science*, 275, 1943–1947.

Lin B., Podar K., Gupta D., Tai Y. T., Li S., Weller E., Hideshima T., Lentzsch S., Davies F., Li C., (2002), "The vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584 inhibits growth and migration of multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment", *Cancer Research*, 62, 5019-5026.

Litz J., Krystal G. W., (2006), "Imatinib inhibits c-Kit-induced hypoxia- inducible factor-1alpha activity and vascular endothelial growth factor expression in small cell lung cancer cells", *Molecular Cancer Therapeutics*, 5, 1415-1422.

Liu Y., Deisseroth A., (2006), "Tumor vascular targeting therapy with viral vectors", *Blood*, 107(8), 3027-33.

Longo R., Sarmiento R., Fanelli M. et al., (2002), "Anti-angiogenic therapy: Rationale, challenges and clinical studies", *Angiogenesis*, 5, 237-256.

Lorenz M. J., Hans-Peter G., Tarja J., Yongyu W., Clemens G., Claire S., Antje R., Karsten D., Felix W., Gerhard G., Eric M., Dirk L., (2006), "Metabolism and Disposition of Vatalanib (PTK787/ZK-222584) in Cancer Patients", *Drug Metabolism and Disposition*, 34 (11), 1817-1828.

Louis D. N., (2006), "Molecular pathology of malignant gliomas", *Annual Review of Pathology*, 1, 97-117.

Margolin K., Gordon M. S., Holmgren E., Gaudreault J., Novotny W., Fyfe G., Adelman D., Stalter S., Breed J., (2001), "Phase 1b trial of intravenous recombinant human monoklonal antibody (Mab) to vascular endothelial growth factor (rhuMab VEGF) in combination with chemotherapy (CHrX) in patients with advanced cancer (CA): pharmacologic and long-term safety data", *Journal of Clinical Oncology*, 19(3), 851-856.

Meyer R. D., Dayanir V., Majnoun F., Rahimi N., (2002), "The presence of a single tyrosine residue at the carboxyl domain of vascular endothelial growth factor receptor-2/FLK-1 regulates its autophosphorylation and activation of signaling molecules", *Journal of Biological Chemistry*, 277, 27081–27087.

Mignatti P, Rifkin D. B., (1996), "Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis", *Enzyme Protein*, 49, 117- 137.

Miller-Moslin K., Peukert S., Jain RK., Michael A. McEwan, Rajesh K., Luis L., Naeem Y., Feng H., Yanhong L., Yingchuan S., Miao D., Lawrence P., Walter M., Tao S., Huangshu L., Rui Z., Juliet W., Aaron B., Arun R., Jing Y., Ribo G., Melissa M., Anthony V., Wieslawa M., Adam A., Marion D., Joseph F. K., (2009), "III.1-Amino-4-benzylphthalazines as Orally Bioavailable Smoothed Antagonists with Antitumor Activity", *Journal of Medicinal Chemistry*, 52, 3954–3968.

Minniti G., Muni R., Lanzetta G., Marchetti P., Enrici R. M., (2009), "Chemotherapy for glioblastoma: Current treatment and future perspectives for cytotoxic and targeted agents", *Anticancer Research*, 29(12), 5171-84.

Mitsutoshi N., Daisuke K., Takuya W., Yutaka H., Lei T., Ilya V. P., Jun-Ichiro H., (2011), “Aberrant Signaling Pathways in Glioma”, *Cancers*, 3, 3242-3278.

Miyagami M., Tazoe M., Nakamura S., (1998), “Expression of vascular endothelial growth factor and p53 protein in association with neovascularization in human malignant gliomas”, *Brain Tumor Pathology*, 15(2), 95-100.

Mross K., Dreys J., Muller M., Medinger M., Marme D., Hennig J., Morgan B., Lebwohl D., Masson E., Ho Y. Y. et al., (2005), “Phase I clinical and pharmacokinetic study of PTK/ZK, a multiple VEGF receptor inhibitor, in patients with liver metastases from solid tumours”, *European Journal of Cancer*, 41, 1291–1299.

Muller H., Brock M., Ernst H., (1985), “Long-term survival and recurrence-free interval in combined surgical, radio- and chemotherapy of malignant brain gliomas”, *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 87(3), 167-71.

Nagata S., (1997), “Apoptosis by death factor”, *Cell*, 88, 355-365.

Nakagawa M., Emoto A., Hanada T., Nasu N., Nomura Y., (1997), “Tubulogenesis by microvascular endothelial cells is mediated by vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal cell carcinoma”, *British Journal of Urology*, 79, 681–687.

Nakanishi Y., Kodama J., Yoshinouchi M., Tokumo K., Kamimura S., Okuda H., Kudo T., (1997), “The expression of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta associates with angiogenesis in epithelial ovarian cancer”, *International Journal of Gynecological Pathology*, 16, 256–262.

Nazzaro J. M., (1990), “The role of surgery in the management of supratentorial intermediate and high grade astrocytomas in adults”, *Journal of Neurosurgery*, 73, 331-344.

Newlands E. S., Foster T., Zaknoen S., (2003), “Phase I study of temozolamide (TMZ) combined with procarbazine (PCB) in patients with gliomas”, *British Journal of Cancer*, 21;89(2), 248-51.

Nikos G. G., Michalis L., Sofia-Paraskevi T., Tina B., Calliope A., Christine L., Meletios A. D., Aristotle B., (2013), “Angiogenesis-Related Pathways in the Pathogenesis of Ovarian Cancer”, *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 15885-15909.

Nishida N., Yano H., Nishida T., Kamura T., Kojiro M., (2006), “Angiogenesis in cancer”, *Vascular Health and Risk Management*, 2(3), 213-219.

Nozaki M., Tada M., Kobayashi H., Zhang C. L., Sawamura Y., Abe H., Ishii N., Van Meir E. G., (1999), “Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression”, *Neuro-Oncology*, 1(2), 124-37.

Obwegeser A., Ortler M., Seiwald M., Ulmer H., Kostron H., (1995), "Therapy of glioblastoma multiforme: a cumulative experience of 10 years", *Acta Neurochirurgica*, 137(1-2), 29-33.

Ohgaki H., Kleihues P., (2005), "Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas", *Journal of Neuropathology&Experimental Neurology*, 64(6), 479-89.

Olson T. A., Mohanraj D., Carson L. F., Ramakrishnan S., (1994), "Vascular Permeability Factor Gene Expression in Normal and Neoplastic Human Ovaries", *Cancer Research*, 54, 276-280.

Onishi M., Ichikawa T., Kurozumi K., (2011), "Date, I. Angiogenesis and invasion in glioma", *Brain Tumor Pathology*, 28, 13-24.

Paesler J., Gehrke I., Gandhirajan R. K., Filipovich A., Hertweck M., Erdfelder F., Uhrmacher S., Poll-Wolbeck S. J., Hallek M., Kreuzer K. A., (2010), "The Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors Vatalanib and Pazopanib Potently Induce Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells In vitro and In vivo", *Clinical Cancer Research*, 16(13), 3390-3398.

Paganuzzi M., Marroni P., (1994), "Genotypic, Phenotypic and Biological Characterization of a Novel Human Lung Adenocarcinoma Cell Line (LC 89)", *Oncology*, 51, 220-223.

Pazarbaşı A., Kasap M., Kasap H., (2011), "Kanser Yolakları", *ARŞİV*, 20, 187.

Pepper M. S., Montesano R., Mandriota S. J., Orci L., Vassalli J. D., (1996), "Angiogenesis: A paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis", *Enzyme Protein*, 49, 138–162.

Peters B. A., Diaz L. A., Polyak K., Meszler L., Romans K., Guinan E. C., et al., (2005), "Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature", *Nature medicine*, 11(3), 261-2.

Petersdorf S. H., Livingston R. B., (1994), "High dose chemotherapy for the treatment of malignant brain tumors", *Journal of Neuro-Oncology*, 20(2), 155-63.

Ponten J., (1975), "Neoplastic human glia cells in culture", Fogh J., Editor, "In Human Tumor Cells in Vitro" Plenum Press.

Poon R. T., Fan S. T., Wong J., (2001), "Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients", *Journal of Clinical Oncology*, 19(4), 1207-25.

Prakash S. S., Maulik P. S., (2010), "VEGF Inhibitors for Cancer Therapy", *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 2(1), 01-11.

Rahimi N., Dayanir V., Lashkari K., (2000), "Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells", *The Journal of biological chemistry*, 275(22), 16986-92.

Rao J. S., (2003), "Molecular mechanisms of glioma invasiveness: The role of proteases", *Nature Reviews Cancer*, 3, 489-501.

Reis R. M., Konu-Leblebicioğlu D., Lopes J. M., Kleihues P., Ohgaki H., (2000), "Genetic profile of gliosarcomas", *American Journal of Pathology*, 156(2), 425-32.

Ria R., Roccaro A. M., Merchionne F., Vacca A., Dammacco F., Ribatti D., (2003), "Vascular endothelial growth factor and its receptors in multiple myeloma", *Leukemia*, 17, 1961-1966.

Rini B. I., Small E. J., (2005), "Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma", *Journal of Clinical Oncology*, 23, 1028-1043.

Robbins and Kumar, (1987), "Basis Pathology", 4. Baskı, Güneş Kitapevi.

Roberts E., Cossigny D. A. F., Quan G. M. Y., (2013), "The role of vascular endothelial growth factor in metastatic prostate cancer to the skeleton", *Prostate Cancer*, 2013, 1-8.

Sahar M. AS., Wagdy M. E., Mamdouh M. A., Dalal A. AEE., (2016), "1-Piperazinylphthalazines as potential VEGFR-2 inhibitors and anticancer agents: Synthesis and in vitro biological evaluation", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 107, 165–179.

Salcman M., (1994), "The value of cytoreductive surgery", *Colin Neurosurgery*, 41, 464-88.

Salcman M., (2001), "Brain Tumours, An Encyclopedic approach", 2th Edition, Churchill Livingstone.

Sarkar C., Karak A. K., Nath N., Sharma M. C., Mahapatra A. K., Chattopadhyay P., Sinha S., (2005), "Apoptosis and proliferation: Correlation with p53 in astrocytic tumours", *Journal of Neuro-Oncology*, 73, 93-100.

Sawano A., Takahashi T., Yamaguchi S., Aonuma T., Shibuya M., (1996), "Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor (PlGF), which is related to vascular endothelial growth factor (VEGF)", *Cell Growth&Differentiation*, 7, 213-21.

Scott P. A., Smith K., Poulson R., De Benedetti A., Bicknell R., and Harris A. L., (1998), "Differential expression of vascular endothelial growth factor mRNA protein isoform expression in human breast cancer and relationship to eIF-4E", *British Journal of Cancer*, 77, 2120–2128.

Shankar A., Jain M., Lim M. J., Angara K., Zeng P., Arbab S. A., Iskander A. S. M., Ara R., Arbab A. S., Achyut B. R., (2016), "Anti-VEGFR2 driven nuclear translocation of VEGFR2 and acquired malignant hallmarks are mutation dependent in glioblastoma", *Journal of Cancer Science&Therapy*, 8(7), 172-178.

Shibuya M., (2006), "Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis", *Journal of Biochemistry and Molecular Biology Research*, 30;39(5), 469-78.

Shibuya M., Claesson-Welsh L., (2006), "Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis", *Experimental Cell Research*, 312(5), 549–560.

Sonoda Y., Kanamori M., Deen D. F., Cheng S. Y., Berger M. S., Pieper R. O., (2003), "Overexpression of vascular endothelial growth factor isoforms drives oxygenation and growth but not progression to glioblastoma multiform in a human model of gliomagenesis", *Cancer Research*, 15;63(8), 1962-8.

Soulitzis N., Karyotis I., Delakas D., Spandidos D. A., (2006), "Expression analysis of peptide growth factors VEGF, FGF2, TGF β 1, EGF and IGF1 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia", *International Journal of Oncology*, 29, 305-314.

Sowter H. M., Corps A. N., Evans A. L., Clark D. E., Charnock-Jones D. S., Smith S. K., (1997), "Expression and localization of the vascular endothelial growth factor family in ovarian epithelial tumors", *Laboratory Investigation*, 77, 607–614.

Stacker S. A., Caesar C., Baldwin M. E et al., (2001), "VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics", *Nature Medicine*, 7, 186-91.

Steck P. A., Pershouse M. A., Jasser S. A., Yung W. K., Lin H., Ligon A. H., Langford L. A., Baumgard M. L., Hattier T., Davis T. et al., (1997), "Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers", *Nature Genetics*, 15, 356–362.

Stupp R., Hegi M. E., Mason W. P., Van den Bent M. J., Taphoorn M. J., Janzer R. C., Ludwin S. K., Allgeier A., Fisher B., Belanger K., Hau P., Brandes A. A., Gijtenbeek J., Marosi C., Vecht C. J., Mokhtari K., Wesseling P., Villa S., Eisenhauer E., Gorlia T., Weller M., Lacombe D., Cairncross J. G., Mirimanoff R. O., (2009), "Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study", *The Lancet Oncology*, 10 (5), 459-66.

Sugarbaker P. H., (1995), "Surgical Management of Focally Recurrent and Metastatic Colorectal Cancer", *Atlas of surgical oncology*, Philadelphia, Saunders, 45, 671-92.

Sullivan L. A., Brekken R. A., (2010), "The VEGF family in cancer and antibody-based strategies for their inhibition", *Money Advice and Budgeting Service*, 2, 165-75.

Sunderkotter C., Steinbrink K., Goebeler M., Bhardwaj R., Sorg C., (1994), "Macrophages and angiogenesis", *Journal of Leukocyte Biology*, 55, 410–422.

Süren D., (2007), "Astrositik Tümörlerde ve Reaktif Gliosis Olgularında CDC25B Ekspresyonu ve Prognostik Önemi: (Potansiyel Bir Gradeleme Aracı Olarak Kullanılabilmesi ve Yeni Tedavi Metotlarına Işık Tutması Amacıyla)", *Uzmanlık Tezi*, Başkent Üniversitesi.

Tabernero J., (2007), "The Role of VEGF and EGFR Inhibition: Implications for Combining Anti-VEGF and Anti-EGFR Agents", *Molecular Cancer Research*, 5(3), 203–20.

Takahama M., Tsutsumi M., Tsujiuchi T., Kido A., Okajima E., Nezu K., Tojo T., Kushibe K., Kitamura S., Konishi Y., (1998), "Frequent expression of the vascular endothelial growth factor in human non-small-cell lung cancers", *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 28, 176–181.

Takahashi Y., Kitadai Y., Bucana C. D., Cleary K. R., Ellis L. M., (1995), "Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer", *Cancer Research*, 55, 3964–3968.

Takano S., Tsuboi K., Matsumura A., Nose T., (2003), "Anti-vascular endothelial growth factor antibody and nimustine as combined therapy: effects on tumor growth and angiogenesis in human glioblastoma xenografts", *Neuro-Oncology*, 5(1), 1-7.

Terman B. I., Dougher Vermazen M., Maglione D., Lassam N. J., Gasporadowicz D., Bohlen P., (1992), "Identification of the KDR tyrosine kinase a reseptor for vascular endothelial cell growth factor", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 187, 1579-86.

Tohma Y., Gratas C., Biernat W., Peraud A., Fukuda M., Yonekawa Y., Kleihues P., Ohgaki H., (1998), "PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas", *Journal of Neuropathology&Experimental Neurology*, 57(7), 684-9.

Tonini T., Rossi F., Claudio P. P., (2003), "Molecular basis of angiogenesis and cancer", *Oncogene*, 22, 6549-6556.

Trarbach T., Shleucher N., Riedel U. et al., (2003), "Phase I/II study of the oral vascula ebdothelial growth factor (VEGF) receptor inhibitor PTK787/ ZK222854 in combination with irinotecan/5-fluorouracil/leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer", *American Society of Clinical Oncology*, 22, 285.

Tremont-Lukas I. W., Gilbert M. R., (2003), "Advances in molecular therapies in patients with brain tumors", *Cancer Control*, 10(2), 125-37.

Tubbs J. L., Latypov, V., Kanagula S., Butt A., Melikishvili M., Kraehenbuehl R., Fleck O., Marriott A., Watson A. J., Verbeek B., Mcgown G., Thorncroft M., Santibanez-Koref M. F., Millington C., Arvai A. S., Kroeger M. D., Peterson L. A., Williams D. M., Fried M. G., Margison G. P., Pegg A. E., Tainer J. A., (2009), "Flipping of alkylated DNA damage bridges base and nucleotide excision repair", *Nature*, 459(7248),808-13.

Verheul H. M., Hoekman K., Luykx-de Bakker S. et al., (1997), "Platelet: Transporter of vascular endothelial growth factor", *Clinical Cancer Research*, 3, 2187–2190.

Vivanco I., Sawyers C. L., (2002), "The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer", *Nature Reviews Cancer*, 2, 489-501.

Warner, A. J., Lopez-Dee J., Knight E. L., Feramisco J. R., Prigent S. A., (2000), "The Shc-related adaptor protein, Sck, forms a complex with the vascular-endothelial-growth-factor receptor KDR in transfected cells", *Biochemical Journal* (England), 347 (Pt 2), 501–9.

Web 1, (2016), <http://library.med.utah.edu/WebPath/CNSHTML/CNS136.html> (Erişim Tarihi: 15/08/2016).

Weidner N, Semole J. P, Welch W. R, Folkman J., (1991), "Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive breast carcinoma", *The New England Journal of Medicine*, 324, 1-8.

Wen, Y., Edelman J. L., Kang T., Sachs G., (1999), "Lipocortin V may function as a signaling protein for vascular endothelial growth factor receptor-2/Flk-1", *Biochemical and Biophysical Research Communications* (UNITED STATES), 258 (3), 713–21.

Westermarck B., Heldin C. H., Nister M., (1995), "Platelet-derived growth factor in human glioma", *Glia*, 15, 257-263.

Wong A. J., Bigner S. H., Bigner D. D., Kindler K. W., Hamilton S. R., (1987), "Vogelstein, B. Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification", *Proceedings of the National Academy of Science*, 84, 6899-6903.

Wood J. M., Bold G., Buchdunger E., Cozens R., Ferrari S., Frei J., Hofmann F., Mestan J., Mett H., O'Reilly T., et al., (2000), "PTK787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration", *Cancer Research*, 60 ,2178–2189.

Xing M., (2010), "Genetic Alterations in the Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt Pathway in Thyroid Cancer", *Thyroid*, 20(7), 697-706.

Yajima I., Kumasaka M. Y., Thang N. D., Goto Y., Takeda K., Yamanoshita O., Lida M., Ohgami N., Tamura H., Kawamoto Y., Kato M., (2011), "RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in Malignant Melanoma Progression and Therapy", 2012, 1-5.

Yaltkaya K., Balkan S., Oguz Y., (1998), "Nöroloji Ders Kitabı", 2. Baskı, Palme Yayıncılık.

Yin G., Liu W., An P., Li P., Ding I., Planelles V., Schwarz E. M., Min W., (2002), "Endostatin gene transfer inhibits joint angiogenesis and pannus formation in inflammatory arthritis", *Molecular Therapy*, 5, 547- 554.

Yoon K. S., Lee M. C., Kang S. S., Kim J. H., Jung S., Kim Y. J., Lee J. H., Ahn K. Y., Lee J. S., Cheon J. Y., (2001), "p53 mutation and epidermal growth factor receptor overexpression in glioblastoma", *Journal of Korean Medical Science*, 16(4), 481-8.

Zanetti A., Lampugnani M. G., Balconi G., Breviario F., Corada M., Lanfrancone L., Dejana E., (2002), "Vascular Endothelial Growth Factor Induces Shc Association With Vascular Endothelial Catherine. A Potential Feedback Mechanism to Control Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Signaling", *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22, 617-622.

ÖZGEÇMİŞ

Ayça Arslanhan 1986 yılında Nevşehir’ de doğdu. 2004 yılında başladığı Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü 2009 yılında başarıyla tamamlayarak 2011 yılında yüksek lisans eğitimine GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında başladı. 2011 yılından bu yana Marmara Üniversitesi Nörolojik Bilimler Enstitüsü Moleküler Nöroşirürji laboratuvarında Biyolog olarak çalışmaktadır.