CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mide Kanseri Dizin Hücrelerine Uygulanan CAPE nin Biyomarkerler Üzerindeki Etkilerinin Arastırılması

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Tuba BEKTAS (İMREN)

Anabilim Dalı : Kimya

Programı : Biyokimya

Manisa 2014

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mide Kanseri Dizin Hücrelerine Uygulanan CAPE nin Biyomarkerler Üzerindeki Etkilerinin Arastırılması

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Tuba BEKTAS (İMREN)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 30 Nisan 2014

Tezin Savunulduğu Tarih : 16 Haziran2014

Tez Danışmanı : Doç.Dr. Funda KOSOVA
Diğer Jüri Üyeleri : Prof.Dr. Zeki ARI (CBU)
: Doç.Dr. Ayşe DİNÇER (CBÜ)

MANİSA 2014

ÖNSÖZ

Son yılların en ölümcül kanserlerinden birisi de mide kanseridir. Genellikle reflü,gastrit ve ülser ağrılarıyla karıştırıldığı için çoğu zaman son evrelerine kadar teşhis edilememektedir.Sinsi ilerleyen bir kanser türü olduğundan ölüm oranı maalesef ki oldukça yüksektir. Ayrıca kanser ilaçlarının pahalılığı,kemoterapinin yan etkileri hastaları daha da zorlamaktadır. Biz doğal bir madde olan CAPE nin mide kanseri üzerindeki etkisini ölçerek yeni bir tedavi yöntemi bulmayı hedefledik. Ve bulduğumuz sonuçlar bize CAPE nin çok az miktarda uygulandığında bile son derece hızlı etki eden ve kanseri durdurabilen bir madde olduğunu gösterdi.Çalışmamızın yeni çalışmalara yön vererek daha detaylı araştırmalarla CAPE nin tüm kanser türleri için yan etkisiz,doğal ve ucuz yeni bir ilaç olmasını , ölümlerin azalmasını umut ediyoruz.

TEŞEKKÜR

Yaptığımız tez çalışmamız boyunca öncelikle benden desteklerini esirgemeyen canım ailem ve eşime,ayrıca da tez danışmanım Doç.Dr. Funda KOSOVA başta olnak üzere Hücre kültürü çalışmamızda emeğini esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. M.İbrahim TUĞLU, Doç.Dr. Feyzan ÖZDAL-KURT a ,ilacımızın seçiminde yol gösteren sayın Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ e , Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında çalışmalarımızı destekleyen sayın Prof. Dr. Zeki ARI hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Tuba İMREN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ……I

TEŞEKKÜR…… II
İÇİNDEKİLER…… . III
KISALTMA VE SEMBOLLER DİZİNİ…… …… IV
ÖZET …… V
İNGİLİZCE ÖZET ……...…... IV

1. GİRİŞ …….. 1

2. GENEL BİLGİLER …… 2

2.1.Mide ……. 2
2.2. Kanser ……5
2.3 Mide Kanseri …… 6

2.4. Anjiyojenez ……8
2.4.1.Anjiyojenik Faktörler ……...9
2.4.1.1. VEGF ……9
2.4.1.2. MMP ……11
2.4.2. Anti-anjiyojenik Faktörler……...12
2.4.2.1. Endostatin……..12
2.4.2.2. TSP-1……13
2.5. KANSER VE ANJİYOJENEZ İLİŞKİSİ…… …… …….. 15
2.6. Caffeic Acid Phenilethyl Ester (CAPE)……...……. 16

3.GEREÇ ve YÖNTEM ……...……... 18
3.1.KULLANILAN YÖNTEMLER …… ……...…….. 18
3.1.1. CAPE uygulamaları…… 18
3.1.2. Hücre Kültürü ……18
3.1.3. MTT …….. 18
3.1.4. İmmunohistokimya ……..19
3.1.5.TUNEL ……...19
3.1.6. RNA İzolasyon Protokolü ……...19
3.1.7. DNA Sentezi…….. 20
3.1.8. Real Time PCR Aşaması…….. 21
3.1.9. İstatiksel Yöntem…….. 21

4-BULGULAR …… …..…….. 21
5.TARTIŞMA/SONUÇ ……...……... 26
6. KAYNAKLAR…… ……. 31

KISALTMA VE SEMBOLLER DİZİNİ

TSP-1:Trombospondin -1

VEGF: Vaskuler Endotelyal Growth Faktör

MMP : Matrix Matelloproteinaz

CAPE: Caffeic Acid Phenilethyl Ester

Mide CA: Mide Kanseri

MİDE KANSERİ DİZİN HÜCRELERİNE UYGULANAN CAPENİN BİYOMARKERLER ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Özet

Amaç : Mide kanseri hem kadın hem de erkekler için dünyada görülme sıklığı açısından ön sıralarda yer alan bir türdür. Kanserin oluşmasının temeli ve kanser özelliği kazanmış genler olan onkogenlerin invazyonunda ve metastazında en önemli rollerden biri hiç şüphesiz anjiyojenezdir. Anjiyojenez vücutta var olan kan damarlarından yeni kapiller damarlar oluşması anlamına gelmekte olup bu damarlar yoluyla dokulara oksijen ve besin taşınarak onların beslenmesi büyümesi sağlanmaktadır. Bu olay her ne kadar yara iyileşmesi, büyüme gibi iyi etkilere sahip olsa da aynı zamanda kanserli dokularında beslenerek büyümesine olanak sağlar ve damarlar yoluyla kanserli hücrelerin yayılmasına yardım eder. Böylelikle metastaz ve invazyonu hızlandırır. Çalışmamızda, mide kanseri hücre kültürü ile farklı dozlarda CAPE uygulanmış mide kanseri hücre kültürlerinde VEGF, MMP, TSP-1 ve Endostatin gibi anjiyojenik ve anti- anjiyojenik markerların anjiyojenez ile ilişkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot: MTT testi ile CAPE uygulamasına bağlı olarak oluşan sitotoksisite kantitatif olarak ölçüldü. Hücrelerin anjiyojenik yapılanma ile ilgili davranışları immunohistokimyasal olarak VEGF, MMP, Endostatin ve TSP -1 seviyeleri LC PCR testi ile incelendi.

Sonuç: MTT testi ile mide kanseri hücre kültürüne CAPE uygulandığında 0,5 ug/ml dozda sitotoksik etki gösterdiği ve hücrelerin canlılığını yitirdiği belirlendi. Daha sonra LC PCR ile gen ekspresyonuna bakılarak, VEGF, MMP ve TSP seviyelerinin azaldığı, endostatin seviyesinin arttığı gözlendi.

Yorum: Elde ettiğimiz sonuçlara göre; MMP, VEGF,TSP ve endostatin protein miktarlarındaki değişim doğal bir madde olan CAPE'nin mide kanseri üzerinde ciddi anlamda tedavi etkisi gösteren bir ajan olduğunu bize göstermiştir. Bu bilgiler ışığında yapılacak daha kapsamlı çalışmalar sonucunda doğal ve ucuz bir madde olan CAPE nin kanser hastalarının tedavisinde daha hızlı ve yan etkisiz bir yöntem olmasını umut ediyoruz.

Anahtar Kelimeler: Anjiyogenez, Hücre Kültürü, VEGF, MMP, CAPE, Endostatin,TSP-1.

İNVESTİGATİON OF THE EFFECTS OF CAPE ON THE BİOMARKERS WHİCH APPLİCATED OF GASTRİC CANCER CELL LİNE

SUMMARY

Aim : Gastric cancer is seen ın the world mostly both in men and women. Angiogenesis plays

the most important role in spreading of oncogenes which has the feature of cancer, but also it is the main feature of the formation of cancer. antiogenesis means that they form new blood vessels from the existing vessels and by the help of these vessels oxygen and nutrition are moved to the tissues. Whilst angiogenesis have features such as wound healing and extension ,it ensure growing for cancer cells and it help to spread of the cancer cells via vessels as well. Hereby , it accelerate metastasis and invasion. İn the study, be aimed to examine the relationship between angiogenesis and angiogenic and anti-angiogenic markers such as MMP, VEGF, TSP-1 and endostatin in the gastric cancer cell cultures and gastric cancer cell cultures apllied different doses of CAPE.

Materyaland methods : Via MTT assaythecytotoxicity depending on the application of CAPE was measuredquantitatively. On thebehaviorof cellsimmunohistochemicallyrestructuringangiogenicVEGF,MMP, levels ofendostatinand TSP-1were analyzed byLCPCR test.

Conclusion :Through the MTTtest, when appliedCAPE on gastric cancer cell culture, it was observed that it shows 0.5ug/mldosesof cytotoxiceffects andthe cells loses vitality. Then,by looking atthe expression ofthe geneby PCRLC, decreasedlevels of VEGF, MMP and TSP, increased level of endostatinwere specified.

Comment : According to the results CAPE that MMP,VEGF ,TSP-1 and endostatin protein amounts are natural showed us ıt was seriously effective on the treatment of gastric cancer. İn the light of this fact, by the help of more extensive studies ,we hope ; CAPE which is natural and cheap would be fast and infective method in the treatment of cancer patients.

Keywords:Angiogenesis ,cell culture,VEGF, MMP, CAPE, Endostatin,TSP- 1.

1.GİRİŞ

Hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla meydana gelen kanser, çağımızın en önemli sağlık sorunlarının başında gelmektedir. Dünyada görülme sıklığı bakımından kadınlarda 2. erkeklerde 3. sırada yer alarak hiç küçümsenmeyecek bir yere sahip olan mide karsinomu bu ölümcül hastalığın çeşitlerinden birisidir. Kanserin meydana gelebilmesi için vücutta bulunan genlerin mutasyona uğrayarak kanser özelliği kazanması gerekmektedir ve bu genlere *onkogen* adı verilmektedir (Parkin et al.,1999). Anormal davranış sergilemeleri halinde tümorogenik aktivite sergileyen bu genler, hücre poliferasyonunu, invazyonunu, anjiyojenezi kontrol etmektedir (Saygıner,2002). Kanserin vücutta invazyonunun kan damarları ve lenf sistemi yoluyla olduğu, bunun ise anjiyojenez ile kolaylaştığı yapılan araştırmalarla saptanmıştır (Ölgen ve diğerleri.,2002). Oksijen ve besin sağlayan ve atıkları uzaklaştıran, önceden var olan damarlardan yeni kapiller kan damarları oluşması anlamına gelen anjiyojenez, büyüme, farklılaşma için temel bir faktör olmasının yanı sıra tümor yayılması ve metastazı içinde büyük önem taşımaktadır (Ölgen ve diğerleri.,2002,Adams et al.,1993,Sorokin et al.,1994). Kanser gelişimini ve metaztas oluşumunu etkileyen çok sayıda etken mevcuttur. Anjiyojenik sisitemin en önemli aktivatörlerinden biri büyüme faktörleri olarak bilinen gruptan olan *vaskuler endotelyal growth faktör* (VEGF) dür (Sağlam ve diğerleri,2008). Anjiyojenik olaylar VEGF, basit fibroblast büyüme faktörleri ve hepatosit büyüme faktörlerinin dahil olduğu büyüme faktörleri tarafından düzenlenir (İnan et al.,2006). VEGF'in kolon kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser çeşidinde varlığı gösterilmiş ve artmasının özellikle malignite ile ilgili olduğu düşünülmüştür (Basini et al.,2012).

VEGF, damar geçirgenliğini artırır ve hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan MMP salınımını uyarır böylece metaztası ve invazyonu kolaylaştırır (Başok ve diğerleri,2009). Diğer bir anjiyojenik ajan ise, *matrix metalloproteinaz* (MMP) dir. VEGF tarafından harekete geçirilen endotelial hücreler, önce MMP'leri sentezlerler. MMP'ler serbest kalırlar ve kan damarları dışındaki yapıyı bozarlar. Bu bozulma anjiyojenezi hızlandırır (Ushio et al.,2002).

Endostatin; kollajen XVIII'ün 20 kDa'luk fragmanıdır (Güllü,2002). Anjiyojenezin kuvvetli bir inhibitörüdür. Direkt olarak endotelial hücre büyümesi ve göçünü engeller; VEGF'nin anjiyojenez etkisini inhibe eder (Doğrul,2008,Şencan et al.,2007). *Trombospondin-1*; birçok hücre tarafından salgılanan heparin bağlayıcı 5 üyeli bir ekstrasellüler protein ailesinden (Doğrul,2008) olup, oldukça büyük bir proteindir. Anti-anjiyojenik etkisi proteinin N-terminal kısmında bulunmaktadır (Güllü,2002).

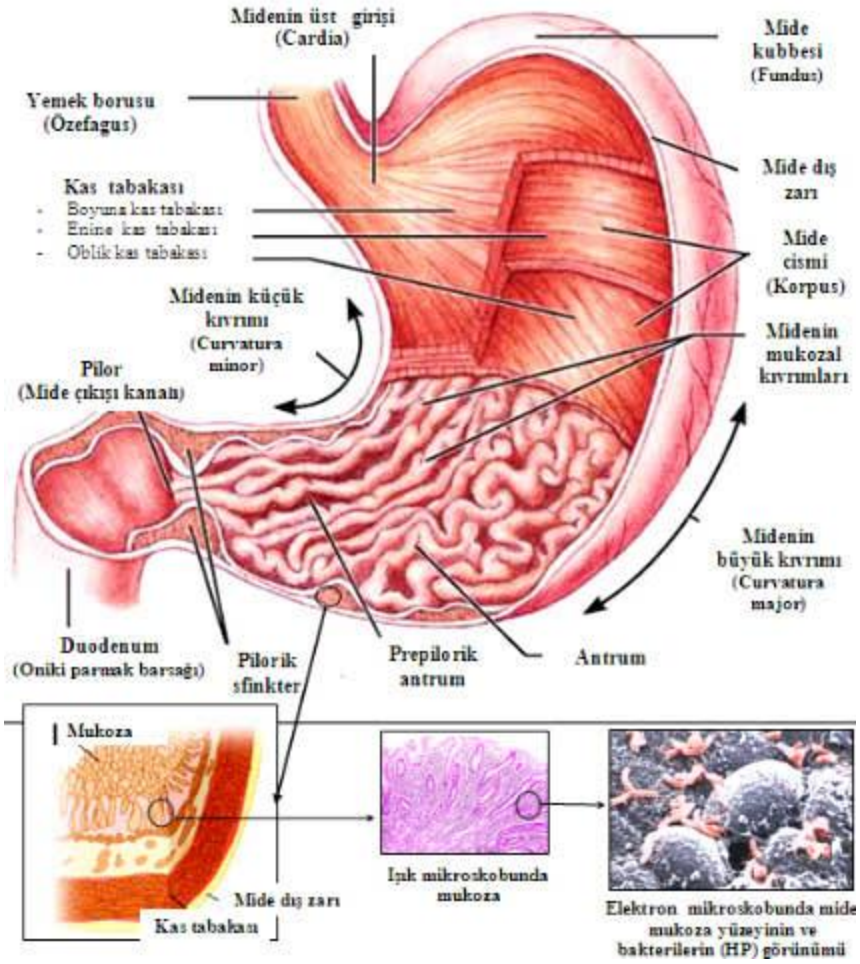
Balın bileşimdeki propolisten elde edilen CAPE, anti-inflamatuar, immunomadulatör, anti karsinojenik ve antioksidant özelikteki farmakolojik bir bileşiktir(Basini et al.,2012, Başok ve diğerleri,2009). CAPE ile yapılan tedavilerde MMP ve VEGF üretiminin inhibe olduğu görülmüş buna bağlı olarakta CAPE'nin VEGF'in expresyonunu önleyerek ve neovaskularizasyonu

azaltarak anjiyojenezi engellediği düşünülmüştür (Güllü,2002,Doğrul,2008,Abdel-Latif et al.,2005,Liao et al.,2003). CAPE'nin VEGF ve MMP salınımını azaltarak anjiyojenezi inhibe ettiği yaptığımız literatür araştırmalarında dikkatimizi çekti. Bu mekanizmayı daha ayrıntılı olarak incelemek için, CAPE ile tedavi dozu uygulanan kanser hücre kültüründe VEGF, MMP, Endostatin ve Trombospondin -1 seviyeleri arasındaki ilişkiyi incelemeyi amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Mide

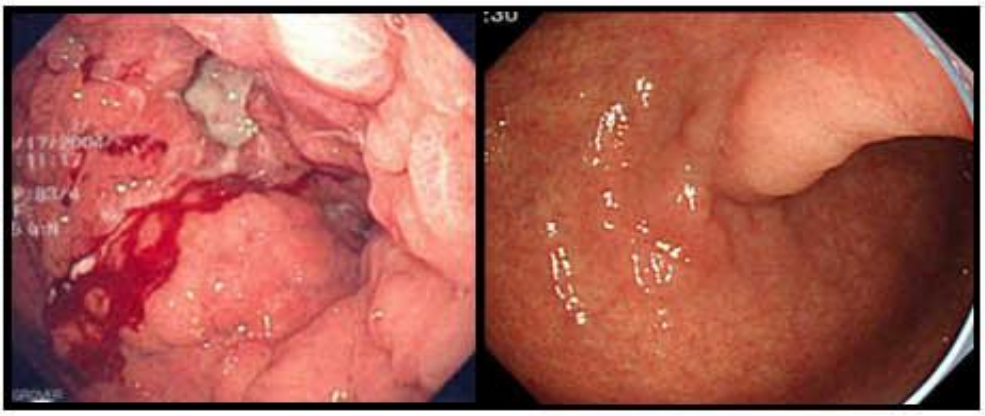
Mide embriyonik hayatta ön bağırsağın distal kısmından gelişim gösteren bir gastrointestinal sistem organıdır. Özofagus ile duodenum arasında yer alan mide; kardiya, fundus, korpus, antrum ve pilor olmak üzere beş bölgeye ayrılır. Kardiya; özofagus ile midenin birleşme yeridir. Fundus; kardiyanın solu ve üst kısmında kalan midenin en üst kısmıdır. Korpus; fundus ile incisura angularisden (midenin 1/3 alt ve orta kısmının birleştiği çentik) geçen yatay hat arasında kalan bölgedir. Bu yatay hat ile pilor arasında kalan bölüm antrumdur. Mideden duodenuma geçiş bölgesi ise pilordur (Özer,2008). Mide, kan damarları açısından zengin bir organdır. Mide sekresyonu olan asit, pepsinojen, intrensik faktör ve elektrolitler kısmen vagal sinir, kısmen antrumdaki nöroendokrin G hücrelerinden salınan gastrinin kontrolündedir. Mide duvarı içten dışa doğru mukoza, submukoza, muskularis propriya ve seroza olmak üzere dört tabakadan oluşur ve gıda sindirimi ve depo görevi yapar (Fawcett,1994). Mide mukozası histolojik olarak aralarında keskin bir sınır olmayan dört farklı bölge içerir. Bunlar kardiya, fundus, korpus ve antrumdur. Mide mukozasının yüzeyi mukuslu yüksek kolumnar epitel hücreleri ile örtülüdür (Şekil 2.1) (Whitehead.,1989).



Şekil 1.Mide anatomisi

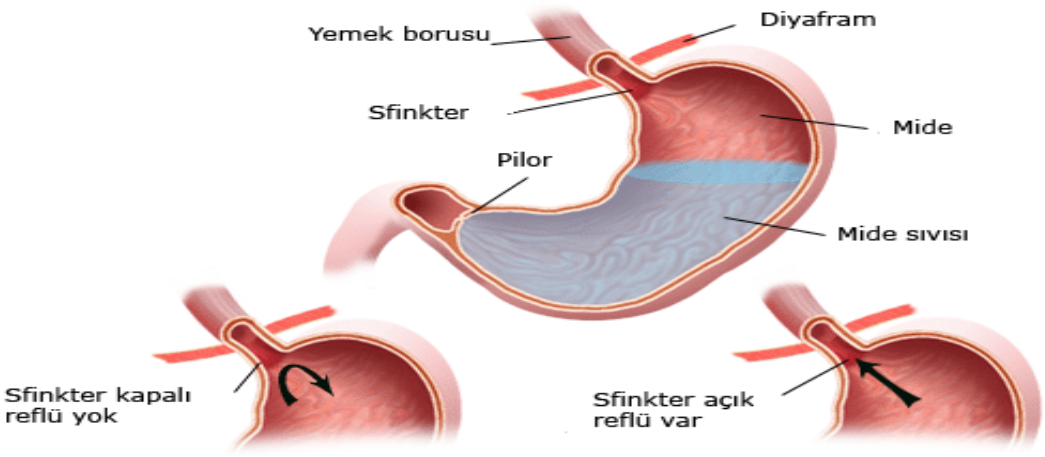
Mide mukozası histolojik olarak aralarında keskin bir sınır olmayan dört farklı bölge içerir. Bunlar kardiya, fundus, korpus ve antrumdur. Mide mukozasının yüzeyi mukuslu yüksek kolumnar epitel hücreleri ile örtülüdür (Whitehead,1989). Midede sekresyon faaliyeti lokal, otonomik (parasempatik, sempatik) ve hormonal uyarıların kontrolünde devam eder. Mide sekresyonu; mukus hücreleri, gastrik bez (oksintik) hücreleri ve pilorik (esas) bez hücreleri tarafından olur. Oksintrik (paryetal hücreler) hücreler hidroklorik asit ve intrensik faktör, peptik hücreler (esas) ise pepsinojen salgılar. Hidroklorik asit salınımı hidrojen/potasyum ATP az (proton) pompası ile olur. Lamina propriadaki plazma hücreleri kan grubu proteini ve IgA salgılar. Asit, pepsinojen ve intrensik faktör (İF), sekretin dışında aynı maddelerle stimüle edilir. Sekretin HCl salınımını azaltıp intrensek faktörü arttırır. Özelikle gastrin, asetil kolin ve histamin, asit sekresyonunu artırır. Vagal uyarı asetil kolin ile, lokal uyarı histamin reseptörleri ile, gastrin ise kan yolu ile etki yapar. Prostoglandinler ve somatostatin asit salınımını azaltır. Günlük mide sekresyonu 1500 cc civarındadır. Gastrik asit salgısı üç fazda olur; sefalik, gastrik ve intestinal fazlar. Mide periltastizmi myenterik pleksuslar ile her 3 dakikada bir tekrar eder. Mide mukozasının iki

komponenti lamina propria ve muskularis mukozadır. Lamina propria mukozanın destek doku komponentidir. Lamina propriada fibroblastlar, histiositler, plazma hücreleri ve lenfositlerin yer aldığı çok sayıda hücre vardır. Çok az sayıda polimorf nüveli lökositler ve mast hücreleri de bulunur (Özer ,2008). Mast hücreleri; mukozal (MMC(atipik)) ve bağ dokusu CTMC (tipik) olmak üzere iki grupta incelenebilirler (Erkasap,1997). Gastrointestinal sistem, mast hücrelerinin iki tipinide bulundurmaktadır. Bu sisteme ait mukozal mast hücreleri mide bezlerinde ve çekumda mukoza tabakasında bulunurken, bağ dokusu mast hücreleri ise özofagus, dil ve yanakta bulunurlar (Saavedra et al.,1984).En yaygın mide rahatsızlıklarından birisi olarak bilinen mide ülserinde mukoza tabakasında bulunan mast hücrelerinin önemli rol oynadığı yapılan araştırmalarla ortaya çıkmıştır (ŞEKİL 2.2)(Erkasap,1997, Saavedra et al.,1984).



ŞEKİL 2.2. Ülserli mide ve normal mide görüntüsü

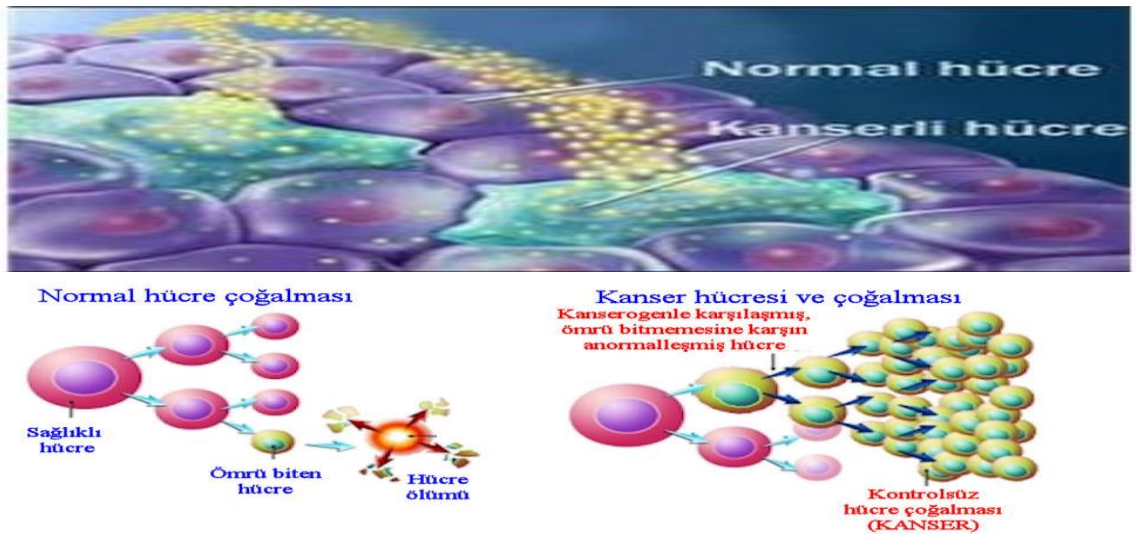
Atrofik gastritte ise, gastrik mukoza hasarı ile oluşan epitelyal hasar ve rejenerasyon mevcuttur. Akut gastritte nörofilik infiltrasyon varken, kronik gastritte lenfosit, plazma hücresi ve makrofaj gibi mononükleer hücrelerin infiltrasyonu vardır. İnflamasyon olmadan epitelyal hücre hasarı ve rejenerasyon varsa buna gastropati adı verilmektedir (Yeşillik,2009). Gastro-ösofageal reflü; mide ya da on iki parmak bağırsağı içeriğinin yemek borusuna geri akımı sonucu oluşan değişik bulgular topluluğu olarak adlandırılmıştır(ŞEKİL 2.3) (Erturan,1993).



ŞEKİL 2.3. Reflü olmus mide ve normal midedeki anatomik farklılıklar

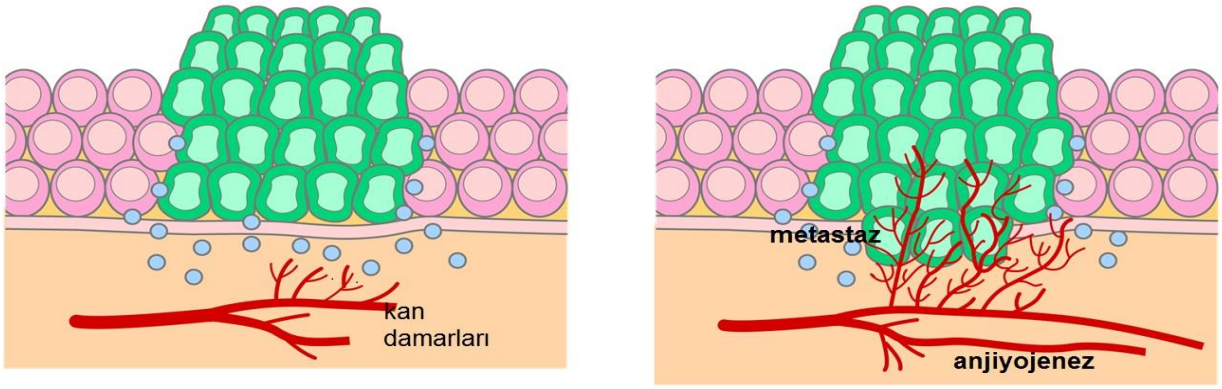
2.2. KANSER

Hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla meydana gelen kanser, çağımızın en önemli sağlık sorunlarının başında gelmektedir. Normal şartlar altında, eğer yeni hücreler gerekmiyorsa her hücrenin içinde bulunan bazı mekanizmalar hücreye bölünmesini durdurmasını söyler. Buna karşın kanser hücreleri, büyümeye ve bölünmeye devam ederler ve vücudun diğer bölgelerine yayılırlar. Kanser hücreleri birikerek tümörleri (kitleleri) oluştururlar, tümörler normal dokuları sıkıştırabilirler, içine sızabilirler ya da tahrip edebilirler (ŞEKİL 2.4).



ŞEKİL 2.4. Sağlıklı hücrelerin bölünmesinde ömrü biten hücre apoptozise uğrarken,kanserli hücreler kontrolsüz bir şeklide çoğalmaya ve tümör oluşturmaya devam etmektedir.

Eğer kanser hücreleri oluştukları tümörden ayrılırsa, kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Gittikleri yerlerde tümör kolonileri oluşturur ve büyümeye devam ederler. Kanserin bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması olayına "metastaz" adı verilir. Tümör vücudun başka bölgelerine yayılmış olsa da orijinal olarak oluştuğu organın adı ile anılır (Arı ve diğerleri,2008). Kanserli hücre, büyüme ve çoğalma davranışı açısından normal bir hücreyle kıyaslandığında pek çok farklılık gösterir. Bunlar arasında kanserli hücrenin apoptozdan kaçması, büyüme uyarılarından bağımsız olarak büyüyebilmesi, sonsuz bir bölünebilme kapasitesinin olması (ölümsüzleşme), yeni damarlar oluşturabilmesi (anjiyogenez) ve başka dokuları işgal etmesi (metastaz) en belirgin olanlardır.(Şekil 2.5)

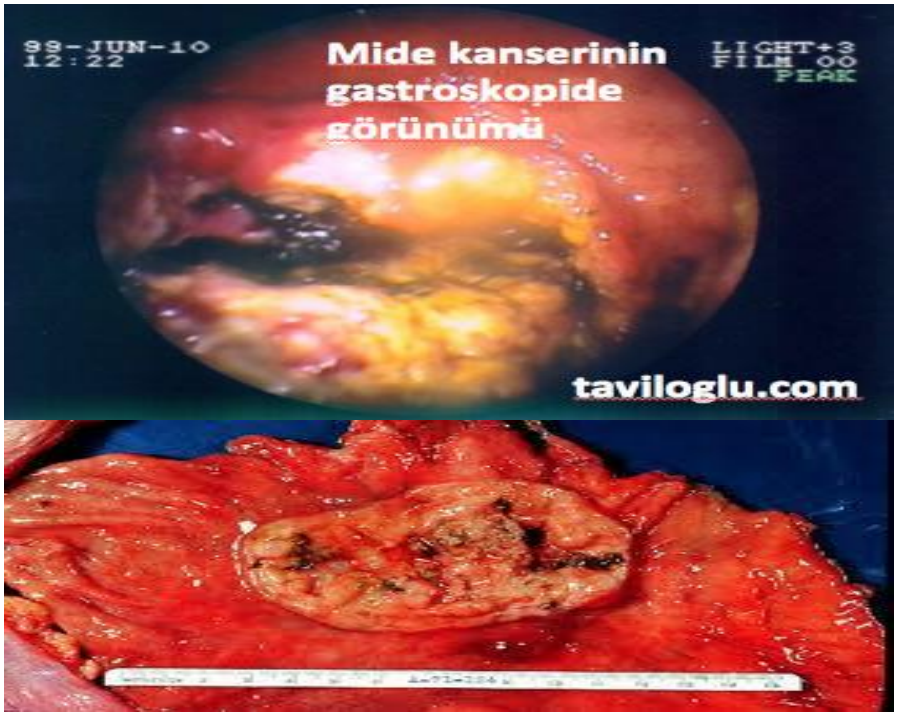


Şekil 2.5. Anjiyojenez ve metastaz oluşumu

Bütün bu farklılıkların kaynağı, kanserli hücrede normal hücredekinden farklı bir protein örüntüsünün olmasıdır. Normal hücrede bulunan bazı proteinler artık yapılmıyor olabilir, bazı proteinlerin değişikliğe uğramış (yeni proteinler olarak nitelendirilebilecek) formları bulunabilir, bazı proteinlerin ise miktarında artış olabilir (Demirpençe,2009).

2.3. MİDE KANSERİ

Mide karsinomu dünyada en yaygın kanser ölümleri arasında yer almaktadır. Erkeklerde 2. sırada kadınlarda ise üçüncü sırada en yaygın rastlanan kanser türüdür (Şekil 2.6).



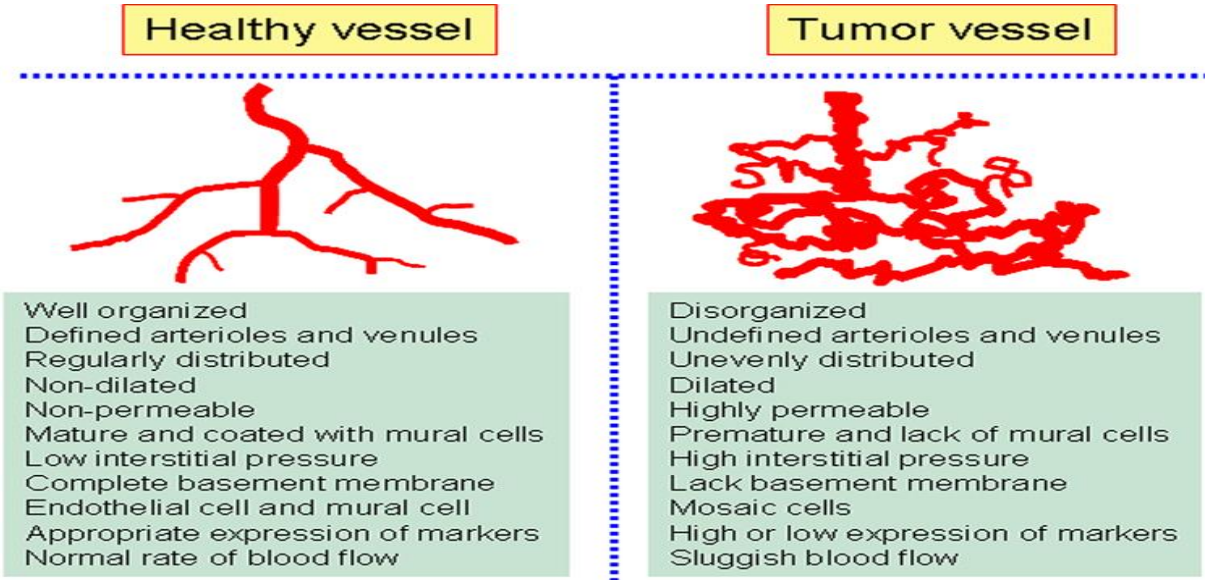
Şekil 6. Mide kanserinin çeşitli görünümleri

Son on yılda bu hastaların tanı ve tedavilerinde çok büyük ilerlemeler olmuştur. Moleküler biyoloji karsinojenik süreçte oluşan mekanizmaların bazılarını açıklamaktadır. Ancak bu hastaların prognozu hala kötüdür ve ilk 2 yıl süresinde hastaların aşağı yukarı %50'si kaybedilmektedir (Parkin,1999,Riberio at el.,2006). Mide kanseri insidansı ülkeler arasında değişiklik göstermektedir. Japonlarda hastalık epidemik boyutlardadır ve görülme sıklığı 70/100.000'dir. Buna karşılık hastalık insidansı Uganda gibi bazı Orta Afrika ülkelerinde belirgin olarak düşüktür. Birleşlik Devletler'de yaşa bağlı olarak, hastalıktan ölüm oranları, 100.000 erkekte; 1935'te 28, 1967'de 9.7 ve 1986'da 8.2 olarak saptanmıştır. Mide kanseri yaş ile sıkı ilişkilidir. Hastalığın insidansının yüksek olduğu ülkelerde hastalık daha erken yaşlarda pik yapar ve daha düşük risk alanlarında da görülür. Genel olarak erkeklerde kadınlara göre çok daha sık görülmektedir (Kapan,2001). Aynı çevre koşullarında yaşamalarının da rol oynaması büyük olasılıktır. Ancak genel yargı, çevresel faktörlerin genetik yatkınlık üzerine aktive edici olmasıdır. 1953'te Aird, A kan grubu ile mide kanseri arasındaki ilişkiyi tanımlamıştır. A grubunda, 0 grubu hastalara göre relatif risk 1-2 kat daha fazladır. Hastalığınn etyolojisinde birçok gıda maddesi rol oynamaktadır, özellikle süt, hayvansal protein ve vitaminlerden fakir, nişastadan zengin, düşük kaliteli diyetler hastalık gelişiminden sorumlu tutulmuştur (Kapan,2001). Kömür madeni işçileri, kauçuk ve asbest ile yakın temas çalışanlarında mide kanseri insıdansı normal popülâsyona göre çok küçük bir artış olduğu bildirilmiştir (Kang et

al.,1993). Soyalı gıdalar ile beslenmenin mide kanseri riskini azalttığı gösterilmiştir (Wu et al.,2009).

2.4. ANJİYOjENEZ

Anjiyojenez veya yeni kan damarlarının oluşuması; önceden var olan damarlardan yeni kan damarları ağının oluşması olarak tanımlanmıştır (Ohta et al.,2008). Anjiyojenez büyüme, gelişme, yaraların iyileşmesi gibi fizyolojik olayların oluşması için gereklidir. Ancak kontrolsüz anjiyojenez başta tümör büyümesi ve tümör metastazı olmak üzere, inflamatuvar hastalıklar, kronik inflamasyon, proliferatif retinopati gibi birçok patolojik olayda rol oynar (Şekil 2.7)(Risau ,1997,Folkman,1990).



Şekil 2.7. Sağlıklı kan damarları ve tümörlü damarlar arasındaki farklar

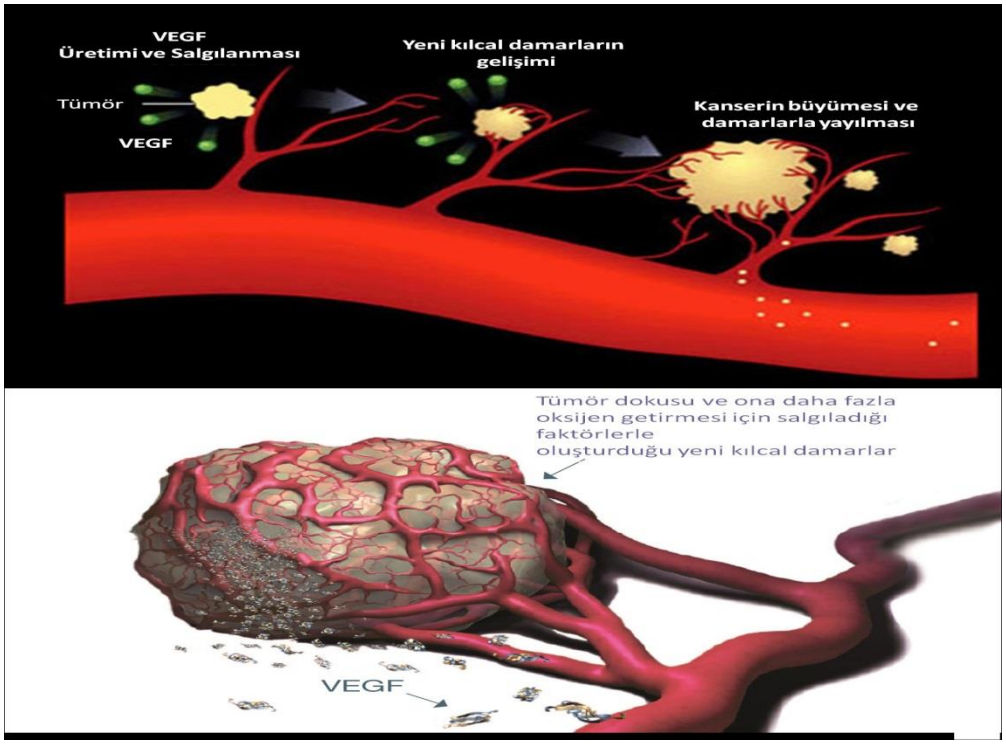
Fizyolojik anjiyojenez kontrollu ve sınırlıdır. Embriyogenez, yara iyileşmesi ve kadın üreme sisteminde görülen anjiyojenez bu gruptadır. Doku onarımı gibi fizyolojik bir olay karşısında başlar. Doku zedelenmesi veya başka bir anjiyojenik uyarı proteazları aktive ederek damar duvarındaki bazal membranın erimesine yol acar. Bu bölgeden kapiller tomurcuklanma meydana gelir ve endotel hücreleri migrasyonu başlar. Anjiyojenik uyarıya doğru yer değiştiren endotel hücreleri tüp şeklinde dizilerek lümen oluştururlar. Bazal membranın tekrar oluşması ile yeni bir damar oluşumu tamamlanmış olur. Patolojik anjiyojenez ise kontrolsuz ve ilerleyicidir. İnflamatuvar hastalıklar, çeşitli kanserlerde, neovaskuler hastalıklarda gorulen anjiyojenez bu gruptadır (Demirci,2006). Anjiyojenik ve antianjiyojenik proteinler bir denge tarafından düzenlenir. Bununla birlikte antianjiyojenik tedavilerde en çok hedef alınan proteinin VEGF olduğu yapılan araştırmalarda saptanmıştır. Bunun sebebi, hem ekstrasellülar matriks hemde

dolasımda çok sayıda Trombospondin-1, endostatinin ve tumstatin gibi endojen anjiyojenez inhibitörünün var olmasıdır (Zavlavsky et al.,2010). Tümor anjiyojenezinde çevresel ve genetik faktorler çeşitli onkogenlerin aktivasyonuna ve bazı tümor baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna neden olur. Bunun sonucunda anjiyojenez aktivatorlerinin üretimi artarken anjiyojenez inhibitorlerinin üretimi baskılanır ve tümor hücrelerinde denge anjiyojenez lehine bozularak yeni damar yapımı başlatılır. Periferik arter hastalıklarında ve gecikmiş yara iyileşmesinde ise yetersiz anjiyojenez soz konusudur (Demirci,2006). Bir yada birden fazla anjiyojenik büyüme faktörleri belirgin olarak aşırı eksprese olmadıkça tümör büyümesinin gerçekleşemeyeceği gösterilmiştir. Anjiojenezi uyarmak için yalnızca anjiyojenik faktörlerin artması yeterli olmayıp, tümörün anjiojenik özellik kazanması için anjiyojenez inhibitörlerinin de azalması gereklidir (Saavedra et al.,1984). Kanser gelişimini ve metaztas oluşumunu etkileyen çok sayıda etken mevcuttur (Sağlam,2008). Anjiyojenez, VEGF, MMP'lar gibi anjiyojenik ve endostatin, TSP-1 gibi anti- anjiyojenik faktörlerin kandaki varlığına bağlıdır. Kanda anjiyojenik faktörler dominant olduğunda anjiyojenez meydana gelirken, buna karsılık kanda antianjiyojenik faktörler dominant olduğundada anjiyojenez baskılanmaktadır (Şencan et al.,2007)

2.4.1.Anjiyojenik Faktörler

2.4.1.1. VEGF

Anjiyojenik sisitemin en önemli aktivatörlerinden biri büyüme faktörleri olarak bilinen gruptan olan vaskuler endotelyal growth faktör (VEGF)'dür (Sorokin et al.,1994). Anjiyojenik olaylar VEGF, basit fibroblast büyüme faktörleri ve hepatosit büyüme faktörlerinin dahil olduğu büyüme faktörleri tarafından düzenlenir(Şekil 2.8)(Demir,2008).



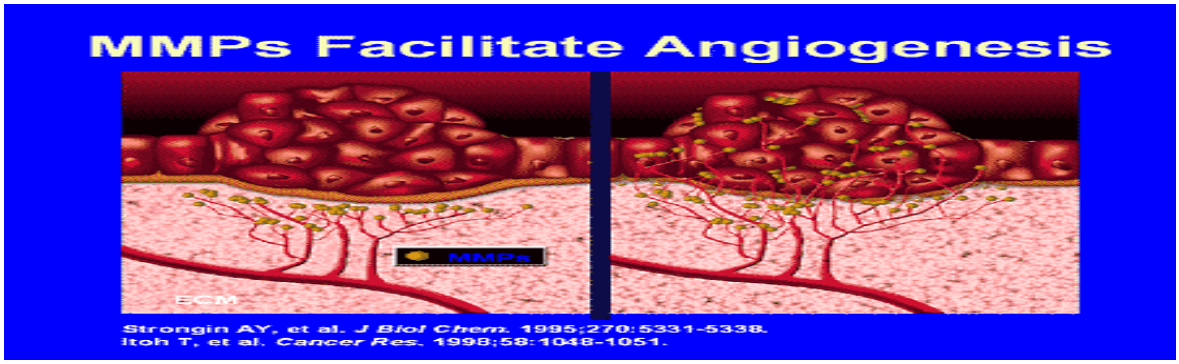
Şekil 2.8.VEGF nin anjiyojenez ve metastaz oluşumundaki rolü

VEGF'in mide kanseri de dahil olmak üzere, birçok kanser çeşidinde varlığı gösterilmiş ve artmasının özellikle malignite ile ilgili olduğu düşünülmüştür (İnan et al.,2006). Homodimerik, heparin-binding glikoprotrin yapısında bir protein olup çeşitli alt grupları tanımlanmıştır (Güllü,2002). Vaskuler endotelyal buyume faktoru (Vascular Endothelial Growth Factor- VEGF) 6. kromozomun kısa kolunda (6p12) lokalize molekul ağırlığı 45 kDA olan bir proteindir. Normal doku ve bircok tümör neovaskularizasyonunda önemli rol oynar. VEGF, damar geçirgenliğini artırır ve hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan MMP salınımını uyarır; böylece metastazı ve invazyonu kolaylaştırır (Başok ve diğerleri,2009). Önemli biyolojik aktivitesi olan multifonksiyonel bir moleküldür (Wardale et al.,1993). Vascular endotel büyüme faktörü (VEGF), vaskülarizasyonun , hem fiziksel hem de malign koşullarında teşvik edilemsinde büyük bir rol oynamaktadır (Kikuchi et al.,2011). VEGF tarafından indüklenen anjiyojenez, yenidoğanlarda patolojik önemli bir regulatördür(Yoriko et al.,2012). Artan metastaz ve yaşamda kalmanın zayıflaması ile artan VEGF ekspresyonu arasında ilişki kurulmuştur (Tombalak,2008). Zhu ve ark., mide kanseri üzerine yaptıkları çalişmada VEGF nin tümör gelişimi ve metastazını teşvik edici özellik gösterdiğini, bu sebeple anjiyojenez ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (Zhu et al.,2011). Iordache ve ark., yaptıkları çalışmada, VEGF nin anjiyogenezi destekleyici etkisine bağlı olarak mide kanserinde metastaz ve tümör büyümesini arttırıcı özelliğinin olduğunu belirtmişlerdir (Iordache et al.,2010). Lee ve ark., yaptıkları çalişmada VEGF'nin tümör

yayılması, metastazı ve anjiyojenezi destekleyen çok önemli bir ajan olduğunu belirtmişlerdir (Lee et al.,2009).

2.4.1.2. MMP

Diğer bir anjiyojenik ajan ise, matrix metalloproteinaz (MMP)'dir. Matriks metalloproteinazlar, çinko metalloproteaz ailesinin "matriksin" olarak tanımlanan alt grubunda sınıflandırılmaktadırlar. Bugüne kadar tanımlanmış 28 üyesi vardır. Sekrete edildiklerinde inaktif zimojen formda bulunan MMP'ler, çeşitli ortak özelliklere sahiptirler. Tüm MMP ler pre-, pro-, katalitik ve hemopeksin benzeri bölgeler içerirler. Pre-domain, sekretuar yolak için gerekli olup hücresel olarak MMP'lerin lokalizasyonunda rol almaktadır. Pro-domain enzim latentliğinden sorumludur ve enzimin aktivasyonu sırasında kaybolur. MMP'ler katalitik bölgelerinde Zn+2 iyonu içerirler (Çavdar,2008). MMP'lar osteoartrit, osteoskleroz ve kanser gibi patolojik görevleri ve fizyolojik etki gösterebilen endopeptitazlardır. VEGF tarafından harekete geçirilen endotelial hücreler, önce MMP'leri sentezlerler. MMP'ler serbest kalırlar ve kan damarları dışındaki yapıyı bozarlar. Bu bozulma anjiyojenezi hızlandırır (Şekil 2.9)(Ushio et al.,2002).

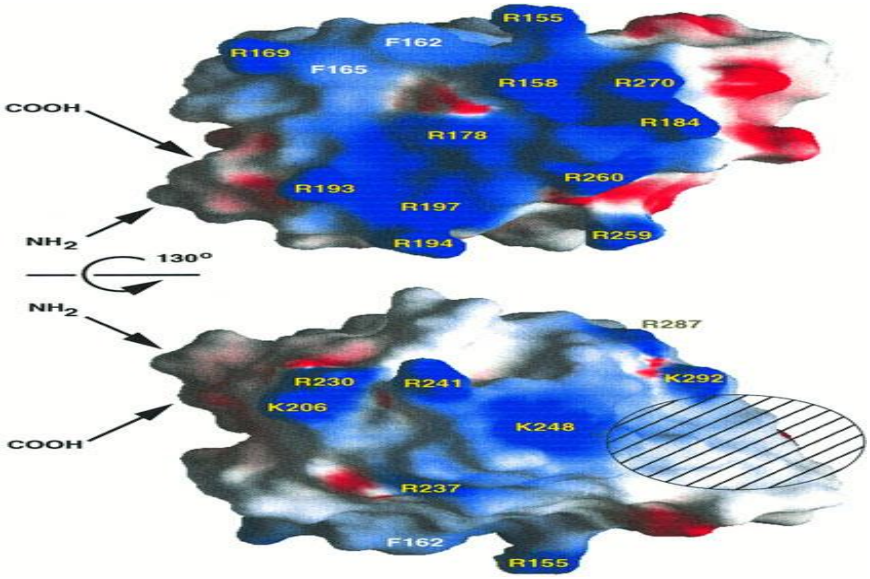


Şekil 2.9. MMP lerin anjiyojenez oluşumundaki rolü

MMP'lar hücre poliferasyonu, apoptosis, anjiyojenez ve metastaz ile ilgilidir (Krishnendu et al.,2010). Xu ve ark.,yaptıkları çalışma ile MMP'ların tümör hücreleri tarafından üretildiğini ve bu yüzden anjiyojenez, metastaz, tümörün progesyonu ile ilgili olabileceğinin üzerinde durmuşlar ve bunu yaptıkları çalişma sonucu ile desteklemişlerdir (Xu et al.,2011). Rundhaug yaptığı çalışma sonucunda önemli invazyon ve metastaz yapma özelliği olduğu bilinen MMP'ların bu etkilerini doğrulamış ve bu etkileri sonucu anjiyojenezi hızlandırdığı, buna bağlı olarakta kanser gelişimini hızlandırıcı özellik gösterdiğini belirtmişler (Rundhaug et al.,2003)

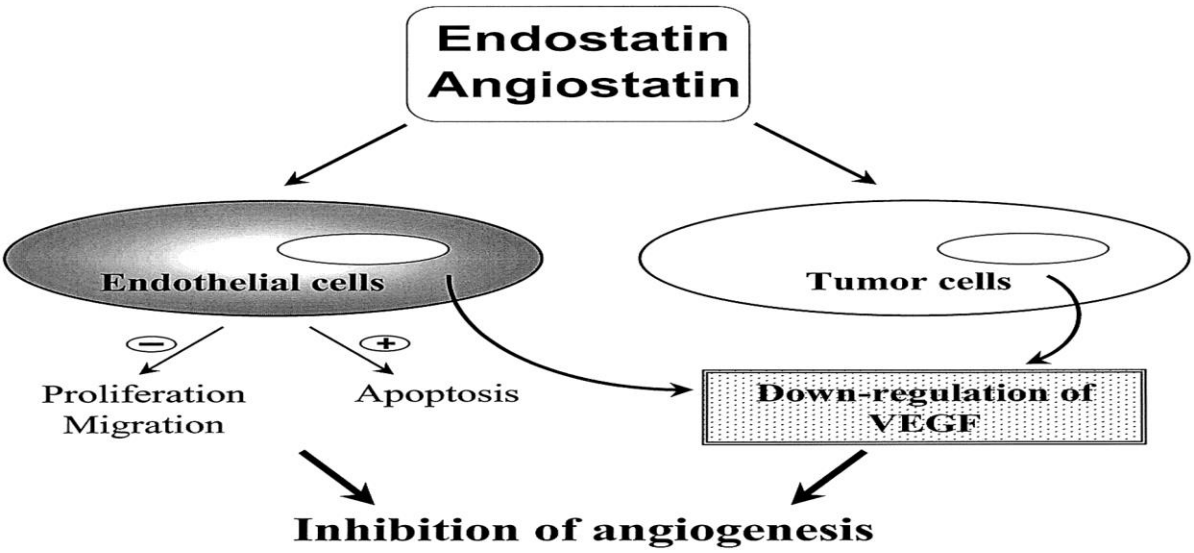
2.4.2.1. Endostatin

Kolajen XVIII karboksi terminalinde Ala-His bağının elastaz kesimiyle oluşan 184 amino grup asitlik bir peptiddir (Kılıç ve diğerleri,2005). Endostatin; heparan sülfat proteoglikan ve perlekan ile birlikte vasküler bazal membranda lokalize olmaktadır. Endostatin kompakt globüler bir yapıya sahiptir ve heparine bağlanmada fonkiyonel 11 arjinin rezidüsü ile karakterizedir. Endostatinin N terminalinde bir Zn+2 atomu yer almaktadır; bu Zn+2 atomunun endostatinin biyolojik etkisi için fonksiyonel olmadığı, fakat intramoleküler disülfid köprülerinin stabilizasyonunda gerekli olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.10)(Çavdar,2008).



Şekil 2.10. Endostatin molekül yapısı (N ve C terminalleri)

Endostatin doğal bir anjiojenez inhibitörüdür, oluşum evresindeki tümörde total gerilemeyi sağlayan en güçlü molekül gibi görünmektedir ve spesifik olarak endotel proliferasyonunu, migrasyonunu ve tüp formasyonunu inhibe ettiği ve endotel hücrelerinde apoptozu indüklediği görülmüştür. Direkt olarak hücre büyümesi ve göçünü engeller; VEGF'nin anjiyojenez etkisini inhibe eder (Şekil 2.11)(Şencan et al.,2007,Rundhaug et al.,2003).



Şekil 2.11. Endostatinin vegf ve anjiyojenez inhibisyonu ile ilişkisi

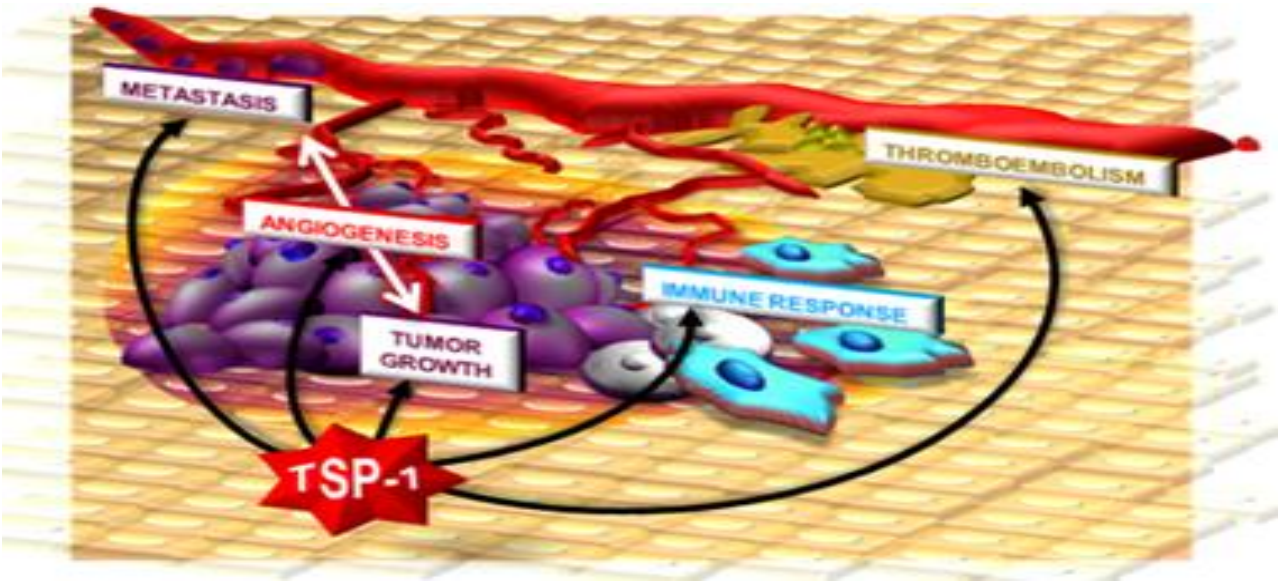
Nie ve Ark., fareler üzerinde yaptıkları arastırmada endostatinin mide kanseri büyümesini baskıladığı ve tümör anjiyogenezini inhibe edici özellik gösterdiğini kanıtlamışlardır (Nie et al.,2007). Xiea ve Ark., yaptıkları araştırma sonucunda endostatinin güçlü bir anjiyojenez inhibitörü olduğunu ve tümör yayılmasını, anjiyojenezi inhibe ettiğini göstermişlerdir (Xiea et al.,2011). Koç ve Ark., 34-83 yaş aralığında olan, mide kanseri teşhisi konulmuş 30 hasta ile yaşları 18-69 arasında değişen benign tümör bulunan 30 hasta üzerinde yaptıkları araştırma sonucunda benign tümör bulunan hastaların serum endostatin düzeyinin mide kanseri teşhisi konulmuş hastalardaki serum endostatin düzeyinden daha yüksek bulunduğunu belirtmişlerdir (Koç et al.,2006).

2.4.2.2. TSP-1

Endojen olarak üretilen bir endotel hücre inhibitörü olmakla beraber oldukça büyük bir protein olan TSP-1 in anti-anjiyojenik etkisi proteinin N- terminal kısmında bulunur (Gordom et al.,2003). Trombospondinin birçok farklı dokudaki endotel hücrelerin proliferasyonunu durdurduğu ve endotel hücreleri arasındaki ilişkiyi istikrarsızlaştırdığı görülmüştür. İlk olarak Bouck tarafından trombospondinin doğal anjiyogenez supresörü olduğu; tümör oluşumu sırasında anjiyojenik fenotipin ortaya konması için baskılandığı düşünülmüştür (Tolsma et al.,1993). TSP -1 ve TSP -2 hipoksi ve onkogenlerle modüle edilen anti-anjiyojenik proteinlerdir;

özellikle TSP-1 ekspresyonu tümör evresi ile ters orantılıdır In vitro ve in vivo olarak TSP -1 hareketsiz damarlara yakın konumludur, aktif olarak gelişen damar filizlerinde ise bulunmaz. TSP- 1 promotör bölgesi, aynı zamanda bir transkripsiyon faktörü olan p53 tümör baskılayıcı proteinin hedef bölgelerindendir (Kılıç ve diğerleri,2005). TSP ailesi 5 üyeli bir ailedir.ve Tüm beş üyeleri, tip 2 tekrarlar, tip 3 tekrarlar ve yüksek oranda korunmuş C terminali etki alanı içerir. Tip 2 tekrarlar, epidermal büyüme faktörü tekrarına benzerler, tip 3 tekrarlar hücre bağlama içeriği olan c terminal kısmı kalsiyum bağlayıcı içeriği olan kısımdır. Trombospondin (TSP) ailesi,kalsiyum bağlama fonksiyonu olan 5 proteinden oluşur.: Tsp -1, Tsp-2, Tsp-3, Tsp-4 ve Tsp-5. Tsp-1 ve Tsp-2 fizyolojik olaylarda hücre yüzeyinde benzer yapıda ifade edilirler (Zenaida et al.,2011). Normal hücreler gibi endotel hücreleri, adipozit, düz kas hücreleri, monositler, makrofajlar, ve malign gliyom hücreleri ,fibroblastlar da dahil olmak üzere, dönüştürülmüş hücreleride Tsp-1 salgılar (Lawleret al.,1998). Tsp-1 anjiyojenezi şu yollarla engeller: (1) endotel hücreye geçişi engelleme ; (2) entotel hücreyi apoptosise ikna etme ; (3) endotel hücre yüzeyini seferber ederek büyüme faktörünü engelleme (Lawler et al.,1998). Nakao ve arkadaşları, mide kanserinde TSP -1 in anjiyojenik etkisi olduğu belirtmişlerdir (Nakao et al.,2011). Ling-fang ve arkadaşları ,TSP nin anjiyojenez ve hücre büyümesini yüksek oranda bastırarak inhibe ettiğini belirtmişlerdir (Ling- Fang et al.,2011) .

TSP- 1 anjiyogenezin doğal bir inhibitörüdür ve endotelyal hücrelerde VEGF'nin etkisine ters dengededir. Bu sayede de VEGF nin etkisini inhibe edici özellik göstererek anjiyojenez oluşumunu baskılar. Dolayısıyla da kanser oluşumunu azaltıcı etki gösterir (ŞEKİL 2.12)(Tombalak,2008).

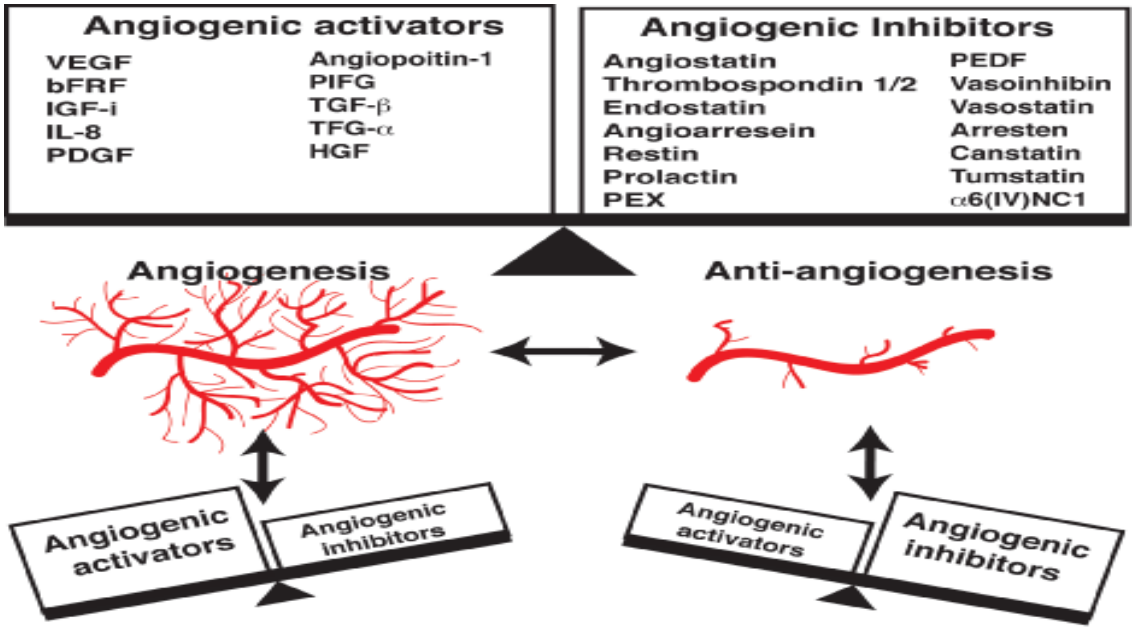


ŞEKİL 2.12. TSP ve anjiyojenez ilişkisi

Taraboletti ve Ark., yaptıkları çalışma sonucunda bir ekstrasellüler matriks protein ailesi üyesi olan TSP-1'in anjiyojenezin güçlü bir endojen inhibitörü olduğunu doğrulamışlardır (Taraboletti et al.,2010). Trapp ve Ark., yaptıkları araştırma sonucunda artan TSP-1'in VEGF miktarını azalttığını yani inhibe ettiğini görmüşler ve buna bağlı olarak ta TSP-1 in güçlü bir anjiyojenez inhibitörü olduğunu belirtmişlerdir (Trapp et al.,2010).

2.5. KANSER VE ANJİYOJENEZ İLİŞKİSİ

Anjiyojenez, tümör ilerlemesi ve metastazı için temel mekanizmalardan biridir. Ekstrasellüler matriksin (ESM) yeniden modellenmesini gerektiren bir süreçtir (Çavdar,2008). Ancak anjiyojenezin fazlalığı, kanser, romatoid artrit, retinal neovaskülarizasyon ve aterosklerozisin dahil olduğu ciddi hastalıkları oluşturmaktadır (İzuta et al.,2009). Normal anjiyojenezde var olan inhibitör / aktivatör dengesinin bozulması sonucu tümör anjiyojenezi denilen patolojik bir süreç başlar (Şekil 2.13).



ŞEKİL 2.13. Anjiyojenik ve anti anjiyojenik faktörlerin oranı hücrenin kanserleşme ihtimalini belirler.

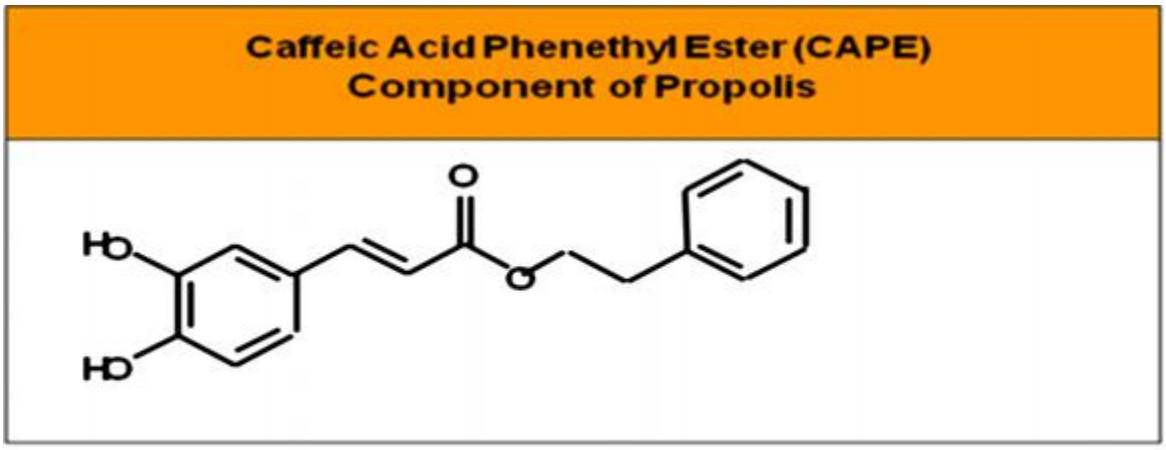
Tümör gelişiminin anjiyojeneze bağımlı olduğu hipotezinin oratya atılmasından sonra ilk olarak 1971 yılında J. Folkman tarafından anjiyojenez inhibisyonunun tedavi avantajı

sağlayabileceği düşüncesi geliştirilmiştir (Folkman,1971,Folkman,1975). Tümör anjiyojenezinde çevresel ve genetik faktörler çeşitli onkogenlerin aktivasyonuna ve bazı tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna sebep olurlar. Bunun sonucunda anjiyojenez aktivatörlerinin üretimi artarken, anjiyojenez inhibitörlerinin üretimi azalır. Ve denge anjiyojenez lehine artarken kanser olusumuna da zemin hazırlanmış olur (Demirci,2006). Kanser, metastaz ile kan damarları ve lenfatik sisteme nüfuz etme yeteneğine bağlı olarak yayılır. Bu invazyonun, anjiyojenez ile kolaylaştığı, yapılan araştırmalarla saptanmıştır. Kanserin anjiyojenez ile ilerleyip ilerlemediği konusunda yapılan bir araştırmada, aynı organın iki farklı bölgesine enjekte edilen kanserli hücrelerin 1-2 mm kadar geliştikten sonra, yakınındaki kan damarı olmayan bölgede gelişmenin durduğu, buna karşılık anjiyojenez oluştuğu bölgede gelişmenin 2 mm den çok daha fazla olduğu gözlenmiştir (Ölgen,2002).

Kanserin temel patojenik bir süreci olan anjiyogenez, kanser üzerinde potansiyel önleyici etkiye sahip bazı bileşikleri bulmak için çok önemlidir *(*Folkman,1971*).* Anjiyojenezin inhibisyonu, kanser tedavisi için umut verici bir strateji olarak ortaya çıkmaktadır ve anjiyojenez katı tümörlerin büyümesi ve metastaz için gereklidir (Folkman,1975). Mide kanserinin gelişim sürecinde, aşırı hücre çoğalması, hücrenin farklılaşması ve bozulması, apoptozdan kaçırma ve sürekli anjiyojenez görülür. (Öztürk et al.,2012).

2.6. Caffeic Acid Phenilethyl Ester (CAPE)

Doğal flavonidler arasında en umut verici olanlardan birisi kafeik asid feniletil ester (CAPE) grubudur. Bal arılarının üretip, kovanı dış enfeksiyon etkenlerinden korumak amacıyla kapladığı bir bileşik olan propolisten elde edilmiştir. Fenolik antioxidant yapısı 3,4 dihidrosinamik aside bağlıdır. CAPE, anti-inflamatuar, immunomadulatör, antikarsinojenik ve antioksidant özelikleri bulunan farmakolojik bir bileşiktir (Doğrul,2008,Abdel-Latif ,2005)(Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Caffeic Acid Phenilethyl Ester (CAPE) nin molekül yapısı

CAPE, aynı zamanda, nükleer transkripsiyon faktörlerinin (NF-κB) aktivasyonun kuvvetli ve spesifik bir inhibitörüdür. VEGF'in expresyonunu önleyerek ve neovaskularizasyonu azaltarak anjiyojenezi engellediği görülmüştür (Hishikawa et al.,2005,Natarajan et al.,1996,Liao et al.,2003).

Kafeik asit feniletil ester (CAPE) anti-inflamatuar etkileri de dahil olmak üzere çok sayıda biyolojik faaliyetleri sahip bir polifenolik doğal bir üründür (Öztürk et al.,2012). Geleneksel tıpta CAPE eski çağlardan beri kullanılmaktadır (Cheong et al.,2011). Buna ek olarak, CAPE eikosanoid sentezini önler ve hücre zarları arakidonik asit salınımını inhibe eder (Chih et al.,2012).

Chih ve ark., yaptıkları çalışmanın sonucunda, CAPE'nin MMP-2 proteininin ekspresyonunu ve MMP-2 enzimatik aktivitesini inhibe ederek, SCC-9 kanser hücrelerinin göç / invazif yeteneğini yok ettiğini belirtmişlerdir (Chih et al.,2012). Ling-fang ve ark, son zamanlarda yapılan çalışmalarda CAPE tedavisinin insan prostat kanser hücrelerinde, tümör büyümesini Akt sinyal yoluyla bastırıdığını belirtmiştir (Ling-fang et al.,2011). Avcı ve ark, son zamanlarda kafeik asit Fenetil Ester (CAPE) elde edilen bir yarı sentetik bileşik olan Fenetil caffeate benzoxanthene lignanın (PCBL), tümör hücrelerinde DNA hasarı ve apoptoza neden olduğunu bildirmişlerdir (Avcı et al.,2011). CAPE yeni anti-kanser tedavi yöntemi olarak kabul edilmiş ve in vivo ve in vitro olarak bir çok kanser ve hücre hatlarında incelenmiştir (Ling-fang et al.,2011). İzuta ve ark, CAPE, STAT-3 aracılığıyla VEGF ifadesini bloke etmek suretiyle, insan retina karsinoma hücrelerinde tümör anjiyogenezi için bilinen bir bastırıcıdır. Arı ürünlerinin çok sayıda farklı hastalıkta farmakolojik etkileri bildirilmiştir. Özellikle, propolis ve CAPE nin anti-tümör etkileri hakkında pek çok yayın vardır (İzuta et al.,2009). Wang ve ark, aktive edilmiş STAT-3 ile mide kanserinin büyük ve daha sık damar yayılması gibi daha agresif davranışlar gösterdiğini belirtmişlerdir. Artan kanıtlar cytokine/STAT-3 sinyal yolunun, tümör gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. STAT-3 bu sitokin sinyal yolları için bir birleşme noktasını temsil eder ve kanser tedavisinde müdahale için gelecek vaat eden yeni bir moleküler hedef haline gelmiştir. Anjiyojenez ve tümör büyümesini inhibe etmek için, STAT-3 sinyalizasyon yolunun bozulması amacıyla büyük çaba gösterilmiştir. Son zamanlarda, STAT-3 sinyal yolunun engellenmesi için, doğal inhibitör ürünlerini belirlemek amacıyla, farmakolojik yaklaşımlara başvurulmaktadır (Wang et al.,2005).

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.KULLANILAN YÖNTEMLER

3.1.1. CAPE uygulamaları

CAPE 0.5 mM DMSO ile sulandırılıp çözelti 9.5 mM besiyeri ile 1 mM tamamlanarak stok solüsyonu hazırlandı. Daha sonra hazırlanan bu stok solüsyondan 1, 0.50, 0.25, 0.12, 0.06 ug/ml farklı dozlarda CAPE tedavi amacıyla kanser hücre dizilerine uygulandı.

3.1.2. Hücre Kültürü

Bu çalışmada kullanılan olan mide karsinoma hücre dizisi olan NCI-N87, DMEM F–12, %10 FCS, %1 L-glutamine ve %1penisilin-streptomycine içeren kültür ortamında 37°C'de ve 5% CO2'li inkübatörde kültüre edildi. Hücrelerin üremesi her 2 günde bir morfolojik olarak faz kontrast ataçmanlı inverted mikroskopta (CK40-F200, Olympus, Japonya) incelendi ve mikrofotografi ile görüntülendi. Konfluent olan hücrelerden pasaj yapılarak hücrelerin çoğaltılması sağlandı. Hücreler daha sonra 96 gözlü platelere 45000 ml/hücre olacak şekilde aktarıldı. Hücreler yüzeye tutunup üremeleri gözlendikten sonra CAPE stok solüsyonu 1, 0.50, 0.25, 0.12, 0.06 ug/ml farklı dozlarda hücrelere ilave edildi. 48 saat sonra hücre proliferasyonu ve sitotoksisitesi, kolorimetrik bir test yöntemi olan MTT ile değerlendirildi. Aynı şekilde hazırlanmış hücreler için apoptotik hücre varlığı immunohistokimyasal boyama yöntemi ile gösterildi.

3.1.3. MTT

Bu hücrelerin mitokondriyel fonksiyonları, canlı hücre yoğunluğu kolorimetrik bir test yöntemi olan MTT testi ile belirlendi. Bu test, sarı, suda çözünebilen MTT boyasının aktif mitokondrilerdeki elektron akımı yoluyla mor formazan ürünlerine dönüşmesini ölçmektedir. Hücre kültürünün üretme vasatı boşaltıldı. Buzdolabında muhafaza edilmekte olan MTT stok solüsyonu (50g MTT+ 10ml PBS) hazırlandı. Daha sonra hazırlanan MTT stok solüsyonundan (1ml MTT stok solüsyonu + 9ml üretme vasatı) olacak şekilde MTT çalışma solüsyonu hazırlandı. MTT çalışma solüsyonundan 100µl/kuyucuk miktarda eklendi ve 4 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda MTT solüsyonu boşaltılıp, dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi. Daha sonra 570 nm'de, 690 nm referans filtreye karşılık mikroplaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüm yapıldı. DMSO eklenmesinin sebebi, oluşan formazan kristallerinin çözülmesini sağlamaktır.

3.1.4. İmmunohistokimya

Hücreler PBS'de hazırlanmış %4'lük paraformaldehid solüsyonu (pH 7,4) ile fikse edildikten sonra 3 defa 5'er dk PBS ile yıkandı. Daha sonra %0,5'lik tripsin solüsyonu ile 5 dk inkübe edildikten sonra yukarıda tarif edilen şekilde yıkama işlemi yapıldı ve %3 hidrojen peroksit (H_2O_2) ile 30 dk beklendir. 1 saat bloklama serumu ile inkübe edilen hücreler yıkanmadan sadece serumun alınmasından sonra anti- VEGF primer antikorları ile 18 saat inkübe edildi. Yıkama işleminden sonra "biotinlayted anti-mouse/antihumant" konjuge edilmiş streptavidin-horsedish peroksidaz solüsyonları ile 30'ar dk boyandı (85-9043, Zymed Histostain kit San Fransisco, A.B.D). Her bir ikincil antikor 3 defa 5'er dk PBS ile yıkandı. İmmunreaktiviteleri görünür halde saptamak amacıyla diaminobenzidin (DAB, 00-2020, Zymed, San Fransisco, A.B.D) ile 5 dk boyandı. Primer antikorun yerine PBS konarak negatif kontrolleri yapıldı. Distile su ile yıkama işleminden sonra kapatma solusyonu (00-8030, Histomount mounting solution, Sanfransisco, ABD) ile kapatıldı.

3.1.5.TUNEL

Bu teknik için DeadEnd Colorimetric TUNEL system kiti (G7130, Promega, USA) kullanıldı. Hücreler 15 dakika %4'lük paraformaldehit ile 10 dakika muamele edildikten sonra, 10 dakika 20-µg/ml proteinase K ile inkübe edilerek 3 defa 5'er dakika tampon solüsyonu ile yıkandı. İkinci kez %4'lük paraformaldehit 5 dakika uygulanıp yıkandıktan sonra, tampon solüsyonu ile 5 dakika yıkanan hücreler TdT-enzimi solüsyonu ile 37oC de 1 saat inkübe edildi. 10 dakika %22 NaCl ve % 11 sodyum sitrat içeren solüsyon ile (SSC) uygulanan hücrelere tampon solüsyonu ile yıkama yapıldıktan sonra endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H_2O_2 (TA–015-HP, Lab vision, Fremont, CA) uygulandı. Ardından tampon solüsyonu ile oda sıcaklığında 10 dakika yıkanan hücreler anti-streptavidin-peroksidaz enzimi ile 30 dakika inkübe edildi. Tampon solüsyonu ile yıkanan hücreler TUNEL reaksiyonunun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB) ile boyandı. Hücreler, 3 defa 5 dk distile su ile yıkandı. Distile su ile yıkama işleminden sonra kapatma solüsyonu (Histomount mounting solution) ile kapanarak mikroskopta incelendi.

3.1.6. RNA İzolasyon Protokolü

Hücreler flasklardan tüplere alındı. Kaldırma işlemi, Tripure isolation reagent ile yapıldı. Flasktaki hücrelere Tripure isolation reagent eklendi ve kazıma işleminden sonra tüplere konuldu. Çalışmada kontrol grubu ve CAPE uygulanmış grup olmak üzere iki tür hücre kullanıldı. Tripure reagent etkisiyle hücreler pembe renk aldı. Hücreler sonra 3000 rpmde 30 sn santrifüj edildi.

Daha sonra hücreler alt kısmında beadsler bulunan özel ependorf tüplerine alındı. MAGNA Lyser homojenizatörde 3000 rpm de 30 sn dödürüldü. Böylece tüpteki beadslerin de yardımıyla hücreler homojen görünüm alarak parçalandı.

Homojenizatörden çıkarılan tüpler soğutma bloğuna alındı ve 5 dk bekletildi. Bu işlem, homojenizatördeki hızın etkisiyle ısınan tüplerin soğutulması için yapıldı. Tüpler 5 dk oda ısısında bekletildi. Daha sonra tüplere 200 mikrolitre kloroform eklendi, 5 dk bekletildi ve 12000 rpm de 4 Cde 20 dk santrifüj edildi. Kloroform homojen hale gelen hücrede faz oluşumunu sağlamak için kullanıldı. Bu işlem sonucunda DNA, RNA ve protein kısım olmak üzere 3 faz elde edildi.

1.Faz (sulu faz) ; RNA içerir, renksizdir.

2.Faz ; DNA içerir, beyazdır.

3.Faz (organik faz) ;protein içerir, kırmızıdır.

RNA izolasyonu için 500 mikrolitre renksiz olan 1.faz tüplere alındı. Üzerine 500 mikrolitre izopropanol eklendi. İzopropanol RNA yı DNA ve diğer safsızlıklardan arındırmak için kullanıldı, nükleik asitlerin çökmesini sağladı. Oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. 12000 rpm de 4 Cde 10 dk santrifüj edildi. Oluşan çökelek üzerine 1ml % 75'lik etanol eklendi. 12000 rpm de 4 Cde 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı. 57 C' de etanol uçuruldu. Kalan çökeleğe 50–100 mikrolitre RNAaz free su eklenerek pipetaj yapıldı. Çökeleğin çözünmesi sağlandı.

3.1.7. DNA Sentezi

RNAaz free su eklendikten sonra hücrelerin absorbansı ölçüldü.

Her örnek için,

9,4 mikrolitre RNA+H2O

2 mikrolitre Random hexamer primer ile toplam 11,4 mikrolitre karışım hazırlandı. Bu karışım küçük tüplere alındı ve pipetaj yapıldı. Daha sonra tüpler thermalcycler a yerleştirildi. 65 oC'de 10 dk inkübe edildi. RNA'lar denatüre edildi, varsa sekonder yapıları açılmış oldu.

Bu arada mastermix hazırlandı. Mastermix, Reaksiyon Buffer, Protector RNase Inhibitor, Deoxynucleotide Mix, Transkriptör Reverse Transkriptaz enziminden oluşmaktadır.

Her örnek için,

4 mikrolitre reaksiyon buffer

2 mikrolitre DNTP

1 mikrolitre DTT

1,1 mikrolitre enzim

0,5mikrolitre RNAse inhibitör olmak üzere toplam 8,6 mikrolitre mastermix hazırlandı. Hazırlanan mastermix (8,6 mikrolitre) thermalcyclerdan alınan örneklere (11,4 mikrolitre) eklendi

ve pipetaj yapıldı. cDNA örneklerinin final hacimleri 20µl e tamamlandı. Sonra, tüpler thermal cycler a yerleştirildi ve aşağıdaki programa göre çalıştırıldı.

55 oC 'de 30 dk

85 oC'de 5 dk

Transkriptör Reverse Transkriptaz enzimi RNA'yı çift sarmal yani cDNA haline getirmektedir. 85 oC'de uygulama yapılmasının sebebi ise bu enzimi denatüre etmek içindir.

3.1.8. Real Time PCR Aşaması

Spesifik primer, elde edilen cDNA'lar ile reaksiyona girerek hedeflenen RNA ekspresyon düzeyini belirlemede kullanıldı. cDNA örneği, final hacmi 10 µl olacak şekilde, reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu karışım distile su, primer prob mix, enzimden oluşmaktadır.

Her örnek için,

3,5 µl dH2O

0,5 µl primer prob mix

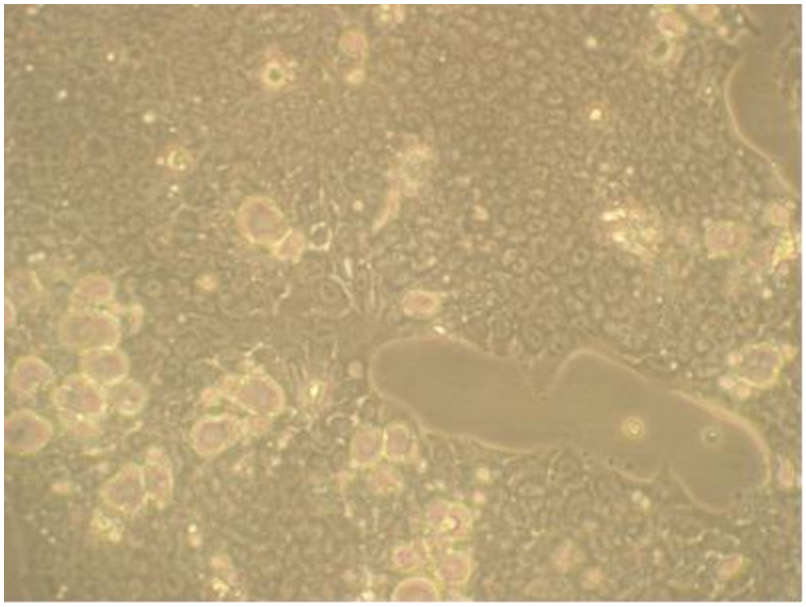
5 µl enzim olmak üzere 9 µl karışım elde edildi. Bu karışıma 1 µl cDNA örneği eklendi ve pipetaj yapıldı. Toplam karışım 10 µl ye tamamlandı. Reaksiyon karışımı, 96 kuyucuklu pleytin her bir kuyucuğuna 10µl olacak şekilde dağıtıldı ve PCR da okumaya verildi. 1 saat sonunda PCR da okuma işlemi gerçekleşti.

3.1.9. İstatiksel Yöntem

Deneylerden elde edilen verileri değerlendirmede SPSS 15.0 istatistik programı kullanıldı. Gruplar arası farkın anlamlılığı Mann Whitney-U testi ile değerlendirildi. Anlamlılık sınırı $p<0.05$ olarak kabul edildi

4-BULGULAR

Mide kanseri hücre hattımız (NCI-N87) protokole uygun şekilde çözdürülerek flasklara alındı. Pasaj yapılan hücrelerin normal şekilde üredikleri saptandı ve MTT için yönlendirildi. Hücrelerin birbirleri ile oldukça güçlü bir adhezyon içinde oldukları anlaşıldı. Tek hücre haline getirilmeye çalışılsa da genellikle üç veya beş hücrenin birbirlerine yapışık şekilde agregat kaldıkları ve bu durumun tüm alanda homojen bir şekilde olduğu anlaşıldı (Resim 1). Semi konfluent ve konflent olma sürecinde bu hücreler arası adhezyonun belirgin bir biçimde korunduğu gözlendi (Resim 1).

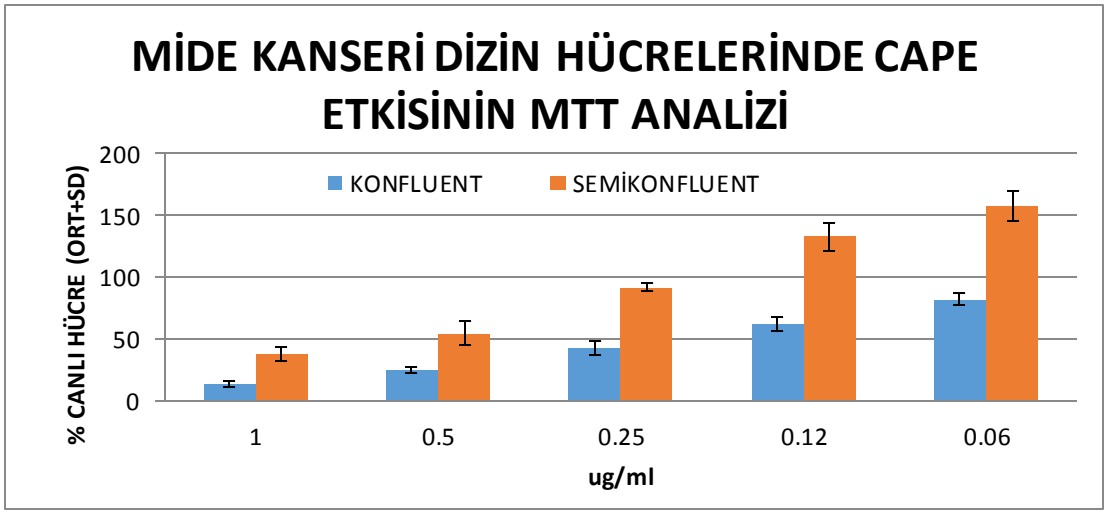


Resim 1: CAPE toksik etkisinin MTT ile gösterilen apoptotik hücre görüntüleri

Hücrelerin tek hücre yayılmasına zorlandıkları en yüksek konsantrasyonda bile üç veya beş hücreli agregatlar şeklinde yayıldıkları görüldü. Hücrelerin oldukça yavaş üredikleri ve mikroskobik gözlemlerle bile kolayca izlenen hücreler arası adhezyon gösterdikleri izlendi. Adacıların büyümesi şeklinde gerçekleşen ve yavaş ilerleyen hücre çoğalması epiteloid hücrelerin birbirlerine sıkıca yapıştıkları büyük adalara dönerek ilerledi (Resim 1).

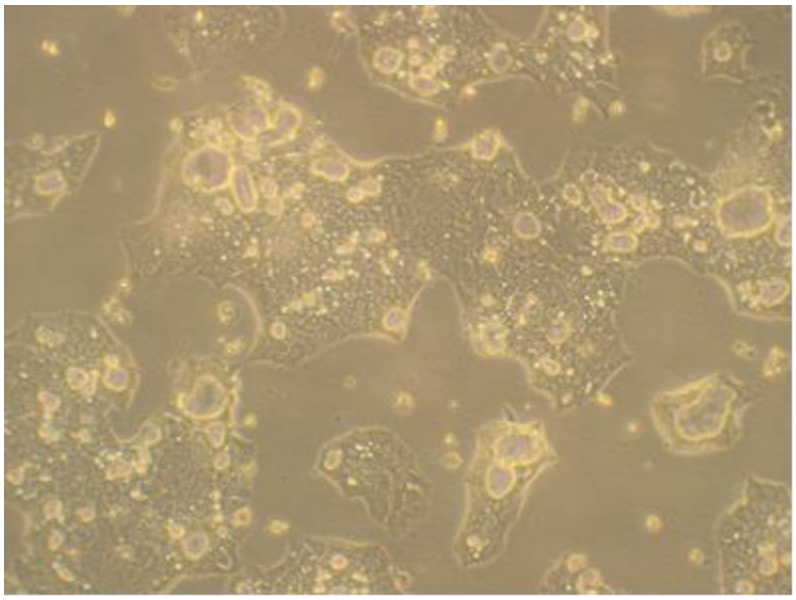
Hücrelerin üremeleri de diğer dizin hücrelerinden oldukça belirgin bir şekilde yavaş olduğu görüldü. MTT ile CAPE uygulamasının değişik dozlarında toksik etkinin varlığı saptandı. Konfluent hücrelerde hücrelerin yarısını öldüren dozun 0.25 ug/ml olduğu anlaşıldı. Semikonfleunt hücrelerde çoğalan hücrelerin yarısına 0.5 ug/ml dozda ulaşıldı (Grafik 1).

.

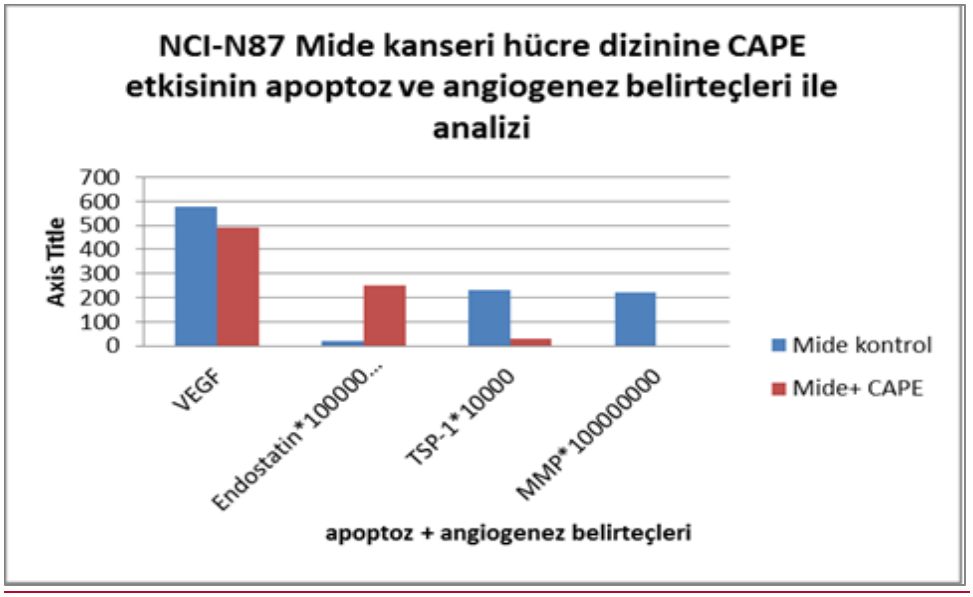


Grafik 1: Mide kanseri dizin hücrelerinde (NCI-N87, gastric carcinoma) CAPE toksik etksinin MTT analizi

Hücrelerin apoptoz için İmmunohistokimyasal boyama görüntüleri (Resim 2) ile PCR sonuçlarının morfometrisi ile oluşan değişiklikler gözlendi (Grafik 2). CAPE uygulaması ile artan apoptotik hücre sayısına parelel olarak PCR sonuçlarına göre MMP ve VEGF VE TSP için azalma endostatin için artma gerçekleştiği görüldü.



Resim 2. CAPE toksik etkisinin TUNEL İHK ile gösterilen apoptotik hücre görüntüleri



Grafik 2. Mide kanseri dizin hücrelerinde (NCI-N87, gastric carcinoma) CAPE etkisinin apoptoz ve angiogenik faktörler açısından PCR sonuçlarının morfometrisi.

Tablo 1. Anjiyojenik faktörlerin control ve capeli hücrelerdeki ekspresyon değerleri

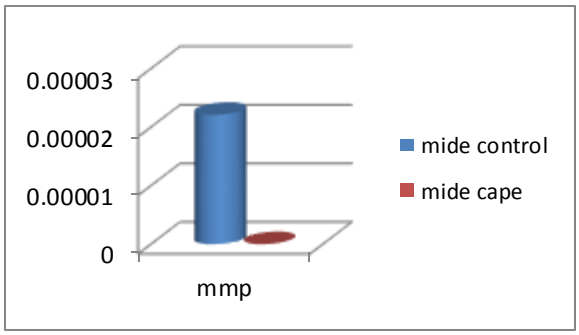
	VEGF	Endostatin	TSP-1	MMP
Mide kontrol	**577,2**	**0,00000185**	**0,0231**	**0,00000221**
Mide+ CAPE	**490**	**0,000025[a]**	**0,00320[a]**	**0[a]**

[a]: kontrole göre karsılaştırıldığında p<o.o5

Real Time PCR okuması yapılan protein değerlerinin istatistiksel analizi sonucunda kontrole göre karşılaştırıldığında endostatin anlamlı olarak artarken,TSP-1 ve MMP kontrole göre karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmıştır. VEGF artışı ise anlamlı bulunmamıştır.

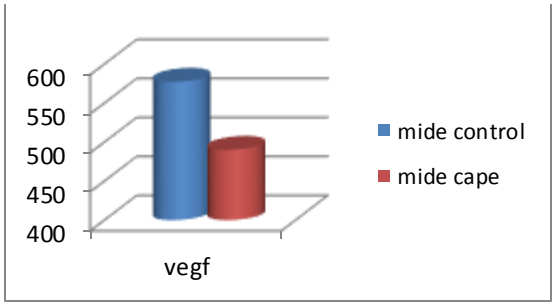
Tablo 4. Belirteçlerin kontrol ve CAPE ilave edildikten sonraki değişimleri

a)MMP Değişim grafiği



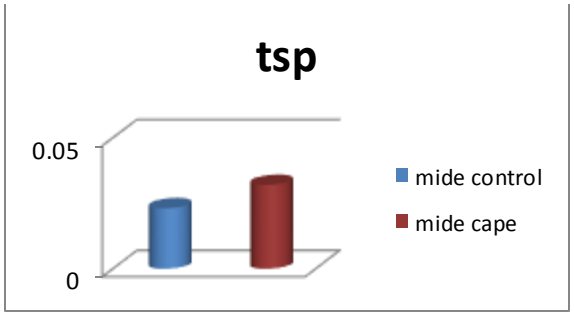
MMP, mide kanseri hücrelerinde CAPE tedavisi sonucunda ciddi anlamda azalma göstermiştir.

b) VEGF değişim grafiği



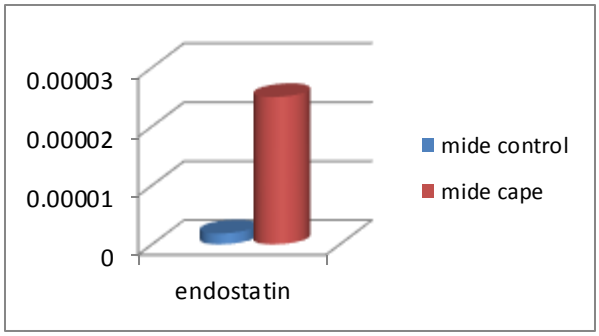
VEGF, mide kanseri hücrelerine uygulanan CAPE tedavi dozu sonucunda azalma göstermiştir.

c)TSP-1 değişim grafiği



TSP, mide kanseri hücrelerine CAPE uyglaması sonrasında artış göstermiştir.

d) Endostatin değişim grafiği



Endostatin seviyesi, mide kanseri kontrol grubuna oranla CAPE ugulanan hücrelerde artış göstermiştir.

5.TARTIŞMA/SONUÇ

Mide karsinomu dünyada en yaygın kanser ölümleri arasında yer almaktadır. Erkeklerde 2. sırada kadınlarda ise üçüncü sırada en yaygın rastlanan kanser türüdür. Son on yılda bu hastaların tanı ve tedavilerinde çok büyük ilerlemeler olmuştur. Ancak bu hastaların prognozu hala kötüdür ve ilk 2 yıl süresinde hastaların aşağı yukarı %50'si kaybedilmektedir (Parkin,1999,Ribeiro et al.,2006). Mide kanseri yaş ile sıkı ilişkilidir. Aynı çevre koşullarında yaşamalarının da rol oynaması büyük olasılıktır. Ancak genel yargı, çevresel faktörlerin genetik yatkınlık üzerine aktive edici olmasıdır. 1953'te Aird, A kan grubu ile mide kanseri arasındaki ilişkiyi tanımlamıştır. A grubunda, 0 grubu hastalara göre relatif risk 1-2 kat daha fazladır. Hastalığınn etyolojisinde birçok gıda maddesi rol oynamaktadır, özellikle süt, hayvansal protein ve vitaminlerden fakir, nişastadan zengin, düşük kaliteli diyetler hastalık gelişiminden sorumlu tutulmuştur (Kapan,2001). Gelişmiş cerrahi teknikleri ve multimodal terapi standardizasyonuna rağmen mide kanserli hastaların ameliyat sonrası hayatta kalma oranı hala çok düşüktür (Zheng et al.,2010). Mutasyona uğrayarak kanser özelliği kazanmış hücrelerin genlerine 'onkogen' adı verilmektedir. Bu genler, hücre poliferasyonunu, invazyonunu, anjiyojenez aracılığı ile kontrol etmektedir (Saygıner,2002). Kanser, metastaz ile, kan damarları ve lenfatik sisteme nüfuz etme yeteneğine bağlı olarak yayılır. Bu invazyonun, anjiyojenez ile kolaylaştığı, yapılan araştırmalarla saptanmıştır (Ölgen,2002). Genellikle tümörler anjiyojenik yetenekleri ile donatılmış kabul edilir ve onların büyüme, invasyon ve metastazları anjiyojeneze bağımlıdır (Folkman,1971). 1971'de Folkman, 60'larda geliştirmeye başladığı tümör büyümesinin anjiyogenezle ilgili olabileceği hipotezini ortaya atmış ve anjiyojenez yolları ve moleküler hedeflerle ilgili çalışmlar başlamıstır (Folkman,1975,Shigeto et al.,2010).

Doğal flavonidler arasında en umut verici olanlardan birisi kafeik asid feniletil ester (CAPE) grubudur. Bal arılarının üretip, kovanı dış enfeksiyon etkenlerinden korumak amacıyla kapladığı bir bileşik olan propolisten elde edilmiştir. CAPE, anti-inflamatuar, immunomadulatör, antikarsinojenik ve antioksidant özelikleri bulunan farmakolojik bir bileşiktir (Doğrul,2008, Abdel-Latif ,2005). Grunberger ve arkadaşları CAPE'nin çeşitli tümör hücre dizinlerine karşı önemli sitotoksik etkisinin olduğunu bildirmişlerdir (Shigeto et al.,2010). Lee ve arkadaşları çalışmalarında kimyasal ilaç olan CAPE nin SK-Hep1 hücrelerinin invaziv yeteneğini engellediği gibi MMP–9 miktarını da azalttığını kanıtlamıştır (Lee et al.,2008). Biz çalışmamızda CAPE ile tedavi dozu uygulanan kanser hücre kültüründe VEGF, MMP, Endostatin ve Trombospondin -1 seviyeleri arasındaki ilişkiyi incelemeyi amaçladık.

Yaptığımız çalışmada mide kanseri hücre hattımıza çeşitli dozlarda CAPE uygulandı. MTT testi ile CAPE uygulamasına bağlı olarak oluşan sitotoksisite kantitatif olarak ölçüldü. Ve mide kanseri hücre kültürüne CAPE uygulandığında 0,5 ug/ml dozda sitotoksik etki gösterdiği ve hücrelerin canlılığını yitirdiği belirlendi.

Tümör anjiyojenezi normal fizyolojik anjiyogenezden farklıdır. Anjiyojenik faktörler ve anti-anjiyojenik faktörlerinin arasında denge, tümör dokusunun hızla büyüdüğü ortamda anjiyojenezin lehinde bozulur (Dönmez et al.,2009).

Yüksek-moleküler ağırlıklı (450-kDa) çok fonksiyonlu bir glikoprotein olan trombospondin-1 in (TSP) anti-anjiyojenik etkisi kanıtlanmıştır. Birkaç muhalif rapor olmakla birlikte kolorektal, akciğer, mesane, meme kanserlerinde anti-anjiyojenik etkisi gösterilmiştir (Nakao et al.,2011). Nakao ve arkadaşları, mide kanserinde TSP-1'in anjiyojenik etkisi olduğu belirtmişlerdir (Nakao et al.,2011). Ling-fang ve arkadaşları, TSP'nin anjiyojenez ve hücre büyümesini yüksek oranda bastırarak inhibe ettiğini belirtmişlerdir (Ling-fang et al.,2011). Yaptığımız literatür araştırmalarında CAPE, TSP-1 ilişkisi ile ilgili yayın bulunmamakla birlikte, Akyol ve ark., ADAMTS (A Distintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin's motif) miktarının CAPE ile azaldığını belirtmişlerdir (Akyol et al.,2013). Bizim çalışmamızda ise TSP-1 miktarı CAPE ilave edildikten sonra azalma göstermiştir.

72 kDa Lık MMP-2 ve 92 kDalık MMP-9 otokrin /parakrin şekilde VEGF salınımını uyararak tümör hücrelerinin büyümesi ve anjiyojenezde anahtar rol oynadığı gösterilmiştir (Huachuan et al.,2006). Çinko bağımlı bir grup MMP, çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlar tarafından düzenlenir. Kanga ve arkadaşları tarafından, MMP-9 mide kanseri metaztazında anahtar enzimlerden biri olarak gösterilmiştir (Kanga et al.,2011). MMP-2 mide kanserinin tümör invazyon ve metastazında önemli bir rol oynar (Xiang et al.,2010). Huacman ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada MMP-2 ve MMP-9 un sadece mide kanserinin büyümesi değil aynı zamanda ekstrasellüler matriks parçalanması ve apoptosis inhibisyonu ile ilişkili olduğu belirtmişlerdir (Huachuan et al.,2006). Ayrıca MMP-2 ve MMP- 9 ile VEGF arasında yüksek oranda ilişki bulunduğu ifade etmişlerdir (Huachuan et al.,2006). Chih ve ark., yaptıkları

çalışmanın sonucunda, CAPE'nin MMP-2 proteininin ekspresyonunu ve MMP-2 enzimatik aktivitesini inhibe ederek, SCC-9 kanser hücrelerinin göç / invazif yeteneğini yok ettiğini belirtmişlerdir (Chih et al.,2012). Keshavarz ve ark.,çalışmalarında CAPE'nin MMP-9'u inhibe edici özellikte olduğunu belirtmişlerdir (Keshavarz et al.,2009). Liao ve ark., CAPE'nin hücre invazyonunu sadece %47,8 inhibe etmekle birlikte VEGF ve MMP-9 miktarını azalttığını bildirmişlerdir (Liao et al.,2003). Biz çalışmamızda CAPE ilavesi sonrasında MMP miktraında ciddi anlamda azaltma gözlemledik. Bu sonuç daha önce yapılan çalışmaları destekler niteliktedir.

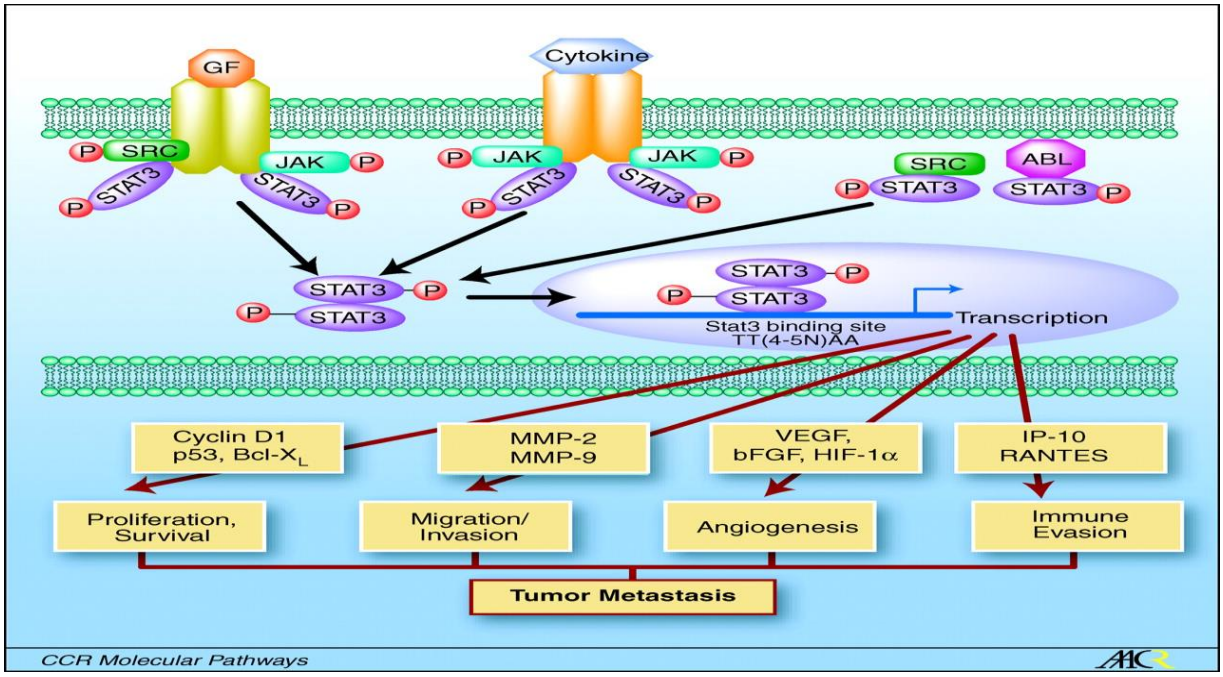
Vascular endotel büyüme faktörü (VEGF), vaskülarizasyonun, hem fiziksel hem de malign koşullarında teşvik edilemsinde büyük bir rol oynamaktadır (Kikuchi et al.,2011). VEGF tarafından indüklenen anjiyojenez, yenidoğanlarda patolojik önemli bir regulatördür (Yoriko et al.,2012). Yoriko ve arkadaşlarının yaptıkları klinik uygulamalarda VEGF kötü doku ile ilişkilendirilmiştir (Yoriko et al.,2012). Anjiyojenez metastaz ve solid tümörlerin büyüme için gerekli en güçlü anjiyojenik faktörün VEGF olduğu ifade edilmiştir (Zhu et al.,2011). Mide, akciğer, meme, tiroid, böbrek, mesane, yumurtalık, rahim ve pankreas gibi kanserlerde VEGF miktarı oldukça yüksek bulunmuştur (Yoriko et al.,2012). Zhu ve arkadaşları, STAT 3 yolunun anormal etkileşimi sonucu VEGF ve anjiyogenezin artmakta olduğunu belirtilmişlerdir (Zhu et al.,2011). Birçok çalışmada STAT3 üzerinden potansiyel bir kanser tedavisi izlenebileceği bulunmustur. STAT3, VEGF inhibisyonunda etkilidir ve tümör anjiyojenez üretimini engeller (Cheong et al.,2011). Kikuchi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, bazı malign dokularda antikorlarla yapılan boyamalarda VEGF görülmüştür (Kikuchi et al.,2011). VEGF, midede kanserli hücrelerin salınmasını ve büyümesini sağlayabilir, kanserin yayılmasını arttırabilir ancak bağırsakta az miktarda vardır ve etkisi küçüktür (Kikuchi et al.,2011). Zhu ve arkadaşları çalışmalarının ilk bölümünde, mide kanserli dokularda yüksek oranda VEGF-C oldugu ifade edildi. Ayrıca, VEGF-C ile gastrik dokuların patolojik evrelemesinin (metastaz ve infiltrasyon) ilişkili olduğu ifade edildi (Zhu et al.,2012). Yonging ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, VEGF, mide kanserli dokularda %81 olumlu artış göstermiştir (Yonging et al.,2012). Basini ve ark., CAPE nin yüksek oranda anti-anjiyojenik aktivite göstererek VEGF yi inhibe edici özellik gösterdiğini ifade etmişlerdir (Basini et al.,2011). İzuta ve ark., CAPE nin VEGF karşıtı davranış sergileyerek baskıladığını belirtmişledir (İzuta et al.,2009). Omene ve ark.,VEGF nin CAPE ilavesiyle birlikte azalma gösterdiğini kaydetmişlerdir (Omene et al.,2012). Mancielli ve ark., meme kanserli hücrelerde CAPE ilavesi sonrasında VEGF miktarının azaldığını belirtmişlerdir (Mancielli et al.,2009). Biz çalışmamızda VEGF nin CAPE ilavesi sonucu azaldığını gözlemledik. Bu daha önceki çalışmalarla paralel bir sonuçtur.

Kollagen XVIII'in C-terminal bir parçası olan 20 kDa lık endostatin özellikle, anjiyogenezi engelleyici etki göstermektedir. Endostatin ekstasellüler matrikste tümör proteazlar tarafından

üretilir (Wao et al.,2006). Kollajen XVIII, ekstraselüler matriksler ve basamakları boyunca mevcuttur (Wao et al.,2006). Pufea ve arkadaşları, Endostatinin VEGF'nin indüklediği neovaskülarizasyonu inhibe ettiğini belirtmişlerdir (Pufea et al.,2004). Endostatin mekanizmasının anjiyojenik etkileri karmasıktır. Patra ve arkadaşları, VEGF'nin bastırılması ve anti anjiyojenik pigmentlerin ifadesinde endostatinin önemini vurgulamışlardır (Patra et al.,2012). Birkaç invitro ve invivo çalışmada endostatinin tümör büyüme ve metastazını engellediği görüldü. Öte yandan, Szarvas ve arkadaşlarının çalışmasında dolaşımdaki endostatin konsantrasyonları yükseltilmiş birçok insan kanser bulunmuştur (Szarvas et al.,2012). Bazı yazarlar mide kanserli hastalarda VEGF ve endostatin düzeylerini değerlendirmişler, VEGF düzeyi kanser varlığında artarken endostatin ile mide kanseri arasında sonuç bulamamışlardır (Pufea et al.,2004). Xiea ve arkadaşları, endostatin ve Trombospondin-1'nin anjiyojenezin anahtar inhibitörleri olduğu net olarak belirtilmiştir (Xiea et al.,2011). Dönmez ve arkadaşları, anti-anjiyojenik TSP moleküleri kullanılarak, VEGF ve MMP'nin anjiyojenez faktörlerinin inhibisyonu sonucu doğal yollardan tedavi hedeflemişlerdir (Dönmez et al.,2009). El-Refaei ve ark., yaptıkları çalışmada CAPE etkisiyle endostatin miktarının arttığını ifade etmişlerdir (El-Refaei et al.,2010). Abduljawad ve arkdaşlarının çalışmasına göre; CAPE endostatin seviyesini arttırmıştır (Abduljawad et al.,2013). Bizim çalışmamızda endostatin, CAPE ilavesinden sonra artış göstermiştir.

Dönmez ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada VEGF ve TSP-1 arasında hiçbir önemli ilişkiye rastlanmadığı belirtilmiştir. Bu sonuçlar VEGF ve TSP-1 in bağımsız mekanizmalar aracılığıyla etkili olabileceğini göstermektedir (Dönmez et al.,2009).

Anti- anjiyojenik bir ajan olan TSP-1 in artması bize, VEGF ile TSP-1 in farklı mekanizmalar üzerinden etkili olabileceğini düşündürmektedir (Dönmez et al.,2009). Yapılan bazı araştırmalara göre (İzuta et al.,2009, Wang et al.,2005). CAPE, STAT 3 sinyal yolu aracılığıyla VEGF inhibisyonu ile anjiyojenezi engellemektedir (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. STAT 3 mekanizması ve VEGF ile ilişkisi

Çalışmamızın sonucunda VEGF miktarının azalması bu görüşü doğrular niteliktedir. Bununla birlikte endostatin seviyesinin artması ise, endostatinin direkt olarak hücre büyümesi ve göçünü engelleme özelliğiyle VEGF'nin anjiyojenez etkisini inhibe ettiğini (Şencan et al.,2007,Rundhaug, 2003) ispat eder niteliktedir. MMP miktarı ise VEGF ile birlikte azalma göstermiştir. VEGF ve MMP molekülleri ilişkilidir çünkü, VEGF tarafından harekete geçirilen endotelial hücreler, önce MMP'leri sentezlerler. MMP'ler serbest kalırlar ve kan damarları dışındaki yapıyı bozarlar. Bu bozulma anjiyojenezi hızlandırır (Ushio et al.,2002).

Sonuç olarak; doğal bir madde olan CAPE'nin önemli anjiyojenez aktivatörlerinden olan VEGF ve MMP'nin azalmasına yol açtığı, kuvvetli bir anjiyojenez inhibitörü olan endostatinin miktarını ise arttırdığı yaptığımız çalışma sonucunda belirlenmiştir. Anjiyojenez inhibitörü olamsına rağmen TSP-1 seviyesinin artması bize VEGF, MMP ve endostatinden farklı bir mekanizma ile etki edebileceğini düşündürmüştür. MMP, VEGF, TSP ve endostatin protein miktarlarındaki değişim doğal bir madde olan CAPE'nin mide kanseri üzerinde ciddi anlamda tedavi etkisi gösteren bir ajan olduğunu bize göstermiştir. Bu bilgiler ışığında yapılacak daha kapsamlı çalışmalar sonucunda doğal ve ucuz bir madde olan CAPE nin kanser hastalarının tedavisinde daha hızlı ve yan etkisiz bir yöntem olmasını umut ediyoruz.

KAYNAKLAR

1.Parkin DM., Pisani P., Ferlay J., Statistics are given for global patterns of cancer incidence and mortality for males and females in 23 regions of the world. CA Cancer J Clin., 1999;49:33–64.

2. Saygıner A., Kanserde anjiyojenez metastaz ve tümör hücre enzimlerine yönelik tedavi,5. İç hastalıkları kongresi,İstanbul üniversitesi onkoloji enstitüsü

3. Ölgen S., Bıçak I. ,Nebioğlu D., Angiogenesis ve kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar, Ankara Eczacılık Fakültesi dergisi,2002;31(3)193-214.

4. Adams, J.C., Watt F.M., Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. Development, 1993;117(4):1183–98.

5. Sorokin, L., Girg, W., Gopfert, T., Hallmann, R. and Deutzmann, R. Expression of novel 400-kDa laminin chains by mouse and bovine endothelial cells. Eur J Biochem., 1994. 15;223(2):603–10.

6.Sağlam D.A., Ursavaş A. ,Karadağ M., Yılmaztepe Oral A. ,Coskun F. ,Gözü R.O. ,Akciğer kanserli olgularda serum VEGF düzeylerinin metastazlar ve diğer tümör belirteçlerinde incelenmesi.Tüberküloz ve Toraks Dergisi,2008;56(1):50-55.

7.Inan S., Vatansever S., Celik-Ozenci C., Sanci M., Dicle N., Demir R., Immunolocalizations of VEGF, its receptors flt-1, KDR and TGF-beta's in epithelial ovarian tumors.Histol Histopathol. 2006 Oct;21(10):1055-64

8.Basini G., Baioni L., Bussolati S., Grasselli F., Daquino C., Spatafora C., Tringali C., Antiangiogenic properties of an unusual benzo[k,l]xanthene lignan derived from CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester), Invest New Drugs. 2012 Feb;30(1):186-90.

9.Başok E.K., Yıldırım A., Başaran A., Zemheri E., Tokuç R., Radikal prostatektomi spesmenlerindeki VEGF'in Cadherinin ve BIM'in İmmunohistokimyasal Ekspresyonlarının Prognostik Değeri, Marmara medical journal ,2009,22(3),203-216

10. Ushio-Fukai M., Tang Y., Fukai T., Dikalov SI., Ma Y., Fujimoto M., Quinn M T., Pagano P J., Johnson C., Alexander RW., Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis, Circ Res., 2002, 91(12):1160-1167.

11. Güllü İ.H., Anjiyogenez va Anti-anjiyogenik Tedaviler, 2002,5,9.

12. Doğrul A.B., Sıçanlarda %70 Hepatektomi sonrası Antiangiogenik Cevap ve Bunun Rejenerasyon ve Anjiogenez ile İlişkisi, uzmanlık tezi, Hacettepe üniv. Tıp Fakültesi, Ankara, 2008.

13. Abdel-Latif M M M., Windle H J., El Homasany B S., Caffeic acid phenethyl ester modulates Helicobacter pylori-induced nuclear factor-kappa B and activator protein-1 expression in gastric epithelial cells. Br J Pharmacol. 2005;146:1139–1147.

14.Şencan M., Güneşaçar R., Cevit Ö., Deveci D., The effect of asprin on the blood levels of angiogenic vascular endotelial growt factor and anti- angiogenic endostatin levels , C.Ü tıp fakültesi dergisi, 2007;29(2):56-61.

15.Liao H F. ,Chen Y Y. , Liu J J. , Liao H J . ,Shieh C J. ,Shiao M S. ,Chen Y J., İnhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis,tumor invasion and metastasis, J Agric Food Chem.2003;51(27):7907-12.

16.Özer K., Mide kanseri olgularında ameliyat sonrası sağkalıma etki eden prognostik faktörlerin analizi ,uzmanlık tezi, ,2008,İstanbul.

17. Fawcett DW. ,A Textbook of Histology (12 th ed). Chapman&Hall, New York, 1994; 599-615.

18. Whitehead R., Gastrointestinal and Oesaphageal Pathology, Churchill Livingstone, 1989; 714-725.

19. Erkasap N., Vasoaktif intestinal peptid (VIP) in sıçanlarda stresle olusturulmuş mide ülserleri üzerine koruyucu etkisi,doktora tezi, 1997,Eskişehir.

20. Saavedra-delgado, A.M.P., Turpin S., Medcalfe, D.D., Typical and atypical mast celles of the rat gastrointestinal sistem:distribution correlation with tissue histamine,agent and actions, 1984;14,1-7.

21. Yeşillik S., Atrofik gastrit intestinal metaplazi ve mide kanserinde COX2 VE p21 ekspresyonu ,uzmalık tezi, 2005 ,Ankara.

22. Erturan S S., Gastro-ösofageal reflü;noktürnal astımın etyopatogenezinde rol oynayan bir etken, uzmanlık tezi, 1993,İstanbul.

23. Arı Z., Kosova F., Adipositokinler ve Meme Kanseri. F.Ü. Sağ. Bil. Derg. 2008; 22 (6): 377 – 384.

24. Demirpençe E., Kanserde Moleküler Tedavi Hedefi Olarak Sinyal İletim Yolları, 21. Ulusal Biyokimya Kongresi , 2009, İstanbul.

25. Ribeiro U Jr., Safatle-Ribeiro AV., Zilberstein B., Does the intraoperative peritoneal lavage cytology add prognostic information in patients with potentially curative gastric resection?, J Gastrointest Surg., 2006;10:170–177.

26. Kapan M., Gastrointestinal Sistem Hastalıkları Sempozyumu, İstanbul ,2001;253-269.

27. Kang S K., Burnett C A., Freund E., Gastrointestinal cancer mortality of workers in occupations with high asbestos exposures, Am J Ind Med., 1997;31:713-718.

28. Wu A H.,Yang D., Pike M C., A meta analysisof soyfoods and risk of stomach cancer:The problem of potential confounders., Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2000;9:1051-1058.

29. Ohta T., Kunimasa K. , Kobayashi T., Sakamoto M., Kaji K ., Propolis suppresses tumor angiogenesis by inducing apoptosis in tube-forming endothelial cells, biosci.biotechnol.biochem., 2008;72 (9),2336-2440.

30, Risau W. ,Mechanisms of angiogenesis, CCSNature, 1997;386:671-4.

31. Folkman J. ,What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? , J Natl Cancer Inst., 1990;82:4-6.

32. Demirci U., Karaciğer hastalıklarında vasküler endotel büyüme faktörü düzeyleri,uzmanlık tezi, 2006, İstanbul.

33. Zaslavsky A.,Chen C., Grillo J., Baek K.H., Holmgren L.,. Yoon S.S., Folkman J., Ryeom S., Regional Control of Tumor Growth., NIH Public Access., 2010, 8(9): 1198–1206.

34.Demir V., İleri evre küçük hücreli dışı akciğer kanserinde plazma vaskuler endotelyal büyüme faktörleri ve trombosit faktör 4 düzeylerinin prognostik önemi ve sağkalım süreleri ile ilişkisi,Uzmanlık Tezi,2008 , Edirne.

35. Wardale R J., Duance V C., Quantification and immunolocalisation of porcine articular and growth plate cartilage collagens, J Cell Sci., 1993;105 (Pt 4):975–84.

36. Kikuchi S., Obata Y., Yagyu K., Lin Y., Nakajima T., Kobayashi O., Kikuichi M., Ushijima R., Kurosawa M., Ueda J., Reduced serum vascular endothelial growth factor receptor-2 (sVEGFR-2) and sVEGFR-1 levels in gastric cancer patients, Cancer Sci., 2011;102: 866–869.

37. Yoriko Y-K., Kaori F-O., Keigo Y., Mitsue K., Mieko Y., Hideyuki Y.,Kazushige M., Biom,arkers for antitumor activity of bevacizumab in gastric cancer models, BMC Cancer ,2012;12:37.

38. Tombalak Bilgi P., Romatoid artritli hastalarda vasküler endoteliyal büyüme faktörü düzeylerinin değerlendirilmesi ,uzmanlık tezi, İstanbul üniversitesi eğitim ve araştırma hastanesi klinik biyokimya laboratuvarı , 2008, İstanbul .

39. Zhu B., Chen H., Zhan W., Wang C., Cai S., Wang Z., Zhang C., He Y., (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits VEGF expression induced by IL-6 via Stat3 in gastric cancer,World J Gastroenterol, 2011 ;17(18): 2315-2325.

40. Iordache S., Saftoiu A., Georgescu C.V., Ramboiu S., Gheonea D., Filip M., Schenker M ., Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Microvessel Density – Two Useful Tools for the Assessment of Prognosis and Survival in Gastric Cancer Patients, JGastrointestin Liver Dis.,2010;19(2):135-9.

41 .Lee S.J., Kim J.G.,Sohn S.K.,Chae Y.S.,Moon J.H.,Kim S.N.,Bae H.I.,Chung H.Y.,Yu W.,No Association of Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) and VEGF-C Expression with Survival in Patients with Gastric Cancer, Cancer Res Treat., 2009;41(4):218223.

42.Çavdar Z., Kolon ve rektum kanserlerinde endostatinin matriks metalloproteinaz -2 üzerine gösterdiği etkinin araştırılıması ,Doktora tezi, 2008 ,İzmir.

43. Krishnendu G.,Sharma A.V.,Swarnakar R and S., Melatonin promototes angiogenesis during protection and healing of indomehacin-induced gastric ulcer: role of matrix metallopretianse-2, J.Pineal Res.,2010;49:130-140.

44. Xu H., Zhang W., Shen L., Yang L., Xu Z., Aquaporin-3 positively regulates matrix metalloproteinases via PI3K/AKT signal pathway in human gastric carcinoma SGC7901 cells, Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2011; 30:86.

45. Rundhaug1 J.E., Matrix Metalloproteinases, Angiogenesis, and Cancer., Clin. Cancer Res., 2003;9: 00–00.

46. Kılıç T., Yıldırım Ö., Pamir M. N., Beyin Tümörlerinde Anti-Anjiogenik Yaklaşımlar,Türk Nöroşirürji Dergisi, 2005;15(1):10-16.

47. Nie M M., Fang G E., Wang X H., Su C Q., Qian Q J., Anti-tumor effect of gene-viral therapeutic system CNHK300-murine endostatin on nude mouse gastric cancer, Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi, 2007 ;10(6):565-9.

48. Xiea L., Duncana M B ., Pahlerb J ., Sugimotoa H., Martinoa M., Livelya J., Mundela T., Soubasakosa M. , Rubinc K., Takedae T., Inouee M., Lawlerf J., Hynesd R O ., Hanahanb D., Kalluria R., Counterbalancing angiogenic regulatory factors control the rate of cancer progression and survival in a stage-specific manner, Proc Natl Acad Sci U S A., 2011 ;14;108(24):9939-44.

49.Koç M., Göçmen E., Kiliç M., Ozbay M., Oktem M., Tez M.,Serum endostatin levels in gastric cancer patients: correlation with clinicopathological parameters ,Hepatogastroenterology , 2006;53(70):616-8.

50. Gordon M S., Mendelson D., Guirguis M.,. ABT-510, an antiangiogenic, thrombospondin-1 (TSP-1) mimetic peptide, exhibits favorable safety profile, and early signals of activity in a randomized phase Ib trial, Proc Am Soc Clin Oncol., 2003; 22: 195.

51. Tolsma S S., Volpert O V., Good D J., Frazier W A., Polverini P J., Bouck N., Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity, J Cell Biol.,1993;122(2) :497-511.

52. Zenaida L D., Pidcock K., Gutierrez L S., Thrombospondin-1:Multiple Paths to Inflammation., Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation Volume, 2011;296069:10.

53. Lawler J ., Sunday M., Thibert V., Duquette M., George M L ., Rayburn H., Hynes R O ., Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia, Clin Invest., 1998; 101(5): 982–992.

54. Nakao T. , Kurita N., Komatsu M ., Yoshikawa K ., Iwata T ., Utsunomiya T., Shimada M., Expression of thrombospondin-1 and Ski are prognostic factors in advanced gastric cancer., Int J Clin Oncol., 2011;16:145–152.

55. Ling-fang He , Ting-ting Wang , Qian-ying Gao, Guang-feng Zhao, Ya-Hong Huang, Li-ke Yuand Ya-yi Hou., Stanniocalcin-1 promotes tumor angiogenesis through up-regulation of VEGF in gastric cancer cells, Journal of Biomedical Science,2011;18:39.

56. Taraboletti G., Rusnati M., Ragona L., Colombo G., Targeting tumor angiogenesis with TSP-1-based compounds: rational design of antiangiogenic mimetics of endogenous inhibitors, Onkotarget., 2010 Nov;1(7):662-73.

57. Trapp V.,Parmakhtiar B., Papazian V., Willmott L., Fruehauf J.P., Anti anjiyojenik effects resvaratrol mediated by decreased VEGF and increased TSP-1 expression in melanoma-endothelial cell co-culture,Angiogenesis ,2010; 13:305-315.

58. İzuta H., Shimazawa M., Tsuruma K., Araki Y., Mishima S. and Hara H.,Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells, BMC Complementary and Alternative Medicine,2009;9:45.

59. Folkman J.,Tumor angiogenesis: therapeutic implications., N Engl J Med., 1971;285:1182-1186.

60. Folkman J., Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth., Ann Intern Med., 1975;82:96-100.

61. Oztürk G., Ginis Z., Akyol S., Erden G., Gurel A., Akyol O., The anticancer mechanism of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): review of melanomas,lung and prostate cancers, European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2012; 16: 2064-2068

62 Hishikawa K., Nakaki T., Fujita T., Oral flavonoid supplementation attenuates atherosclerosis development in apolipoprotein E–deficient Mice, Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2005;25:442–446.

63. Natarajan K., Singh S., Burke TR Jr., Grunberger D., Aggarwal BB: Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B, Proc Natl Acad Sci USA, 1996;93(17):9090-9095.

64. Cheong J H., Hong S Y., Zheng Y., Noh S H., Eupatilin Inhibits Gastric Cancer Cell Growth by Blocking STAT3-Mediated VEGF Expression, J.Gastric Cancer, 2011;11(1):16-22

65. Chih-Yu Peng, Hui-Wen Yang, Yin-Hung Chu, Yu-Chao Chang, Ming-Ju Hsieh, Ming-Yung Chou, Kun-Tu Yeh, Yueh-Min Lin, Shun-Fa Yang, Chiao-Wen Lin , Caffeic Acid Phenethyl Ester Inhibits Oral Cancer Cell Metastasis by Regulating Matrix Metalloproteinase-2 and the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012; 732578:10.

66. Avcı Ç., Gündüz C., Baran Y., Şahin F., Sunde Yılmaz, Dogan Z., Saydam G., Caffeic acid phenethyl ester triggers apoptosis through induction of loss of mitochondrial membrane potential in CCRF-CEM cells , Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2011; 137: 41-47.

67. Wang D., Xiang D B., He Y J., Li Z P., Wu X H., Mou J H., Xiao H L., Zhang Q H. ,Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells in vitro, World J Gastroenterol., 2005;11:4008–4012.

68. Li-Duan Zheng, Chun-Lei Yang, Teng Qi, Meng Qi, Ling Tong, Qiang-Song Tong., Effects of resistin-like molecule β over-expression on gastric cancer cells in vitro, World J Gastroenterol., 2012;18(8): 754-766.

69. De-cai Yu, Jun Chen , Xi-tai Sun , Lin-yuan Zhuang , Chun-ping Jiang , Yi-tao Ding., Mechanism of endothelial progenitor cell recruitment into neo-vessels in adjacent non-tumor tissues in hepatocellular carcinom., BMC Cancer , 2010; 10:435.

70. Daniela L., Raica M., Sporea I., Sorina T., Goldis A., Marıoara C., Tumor angiogenesis in gastric cancer., Romanian Journal of Morphology and Embryology , 2006; 47(1):5–13.

71. Shigeto M., Ryuji I.,Yukihiko N., Xiao-Fang C.,Tatsuhiko F., Kazutata M., Sho T., Mina U.,Yusuke T. Masatatsu Y.,Yasuo T., Kentaro M., Hironori M., Tamotsu K ., Katsushi Y., Takuro K.,Shin-Ichi A., The role of thymidine phosphorylase in the induction of early growth response

protein-1 and thrombospondin-1 by 5-fluorouracil in human cancer carcinoma cells,International Journal Of Oncology., 2010; 36: 1193-1200.

72.Shashi K. Kudugunti, Nikhil M. Vad, Amanda J. Whiteside, Bhakti U. Naik, Mohd. A.Yusuf, Kalkunte S. Srivenugopal and Majid Y. M. Biochemical mechanism of Caffeic Acid Phenylethyl Ester (CAPE) selective toxicity towards melanoma cell lines. Chem Biol Interact.,2010;188(1): 1–14.

73. Ki Won Lee, Nam Joo Kang, Jong Hun Kim, Kyoung Mi Lee Æ Dong Eun Lee, Haeng Jeon Hur, Hyong Joo Lee. Caffeic acid phenethyl ester inhibits invasion and expression of matrix metalloproteinase in SK-Hep1 human hepatocellular carcinoma cells by targeting nuclear factor kappa B.Genes Nutr, 2008;2:319–322.

74. Donmez G, Sullu Y , Baris S, Yildiz L, Aydin O , Karagoz F, Kandemir B., Vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and thrombospondin-1 (TSP-1) expression in urothelial carcinomas, Pathology – Research and Practice, 2009; 205 :854–857.

75.Akyol S., Acar M., Ünal Z., Hasgül R., Erdoğan S., Demircan K., Akyol Ö., Yiğitoğlu M R., The Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE), Royal Jelly, and Curcumin on Gene Expression of ADAMTS-1, -5, and -9 in OUMS-27 Chondrosarcoma Cells: A Preliminary Study, Ann Paediatr Rheum., 2013; 2(1): 27-37.

76. Huachuan Z., Hiroyuk T., Yoshihiro M., Zhengguo C., Kazuhiro N., Hideki N., Koichi T., Yasuo T., Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are Closely Linked to Growth, Invasion, Metastasis and Angiogenesis of Gastric Carcinoma, Anticancer Reserch., 2006;26: 3579-3584.

77. Kanga M H., Ohb S C ., Lee H J., Kanga H N., Kima J L. , Kimb J S.,Yood Y A., Metastatic function of BMP-2 in gastric cancer cells: The role of PI3K/AKT, MAPK, the NF-κB pathway, and MMP-9 expression, Experimental Cell Reserch , 2011;317 : 1746 – 1762.

78. Xiang-Shu Xian, Hyeyeon Park, Yu Kyung Cho, In Seok Lee, Sang Woo Kim,Myung-Gyu Choi, In-Sik Chung, Ki-Hwan Han, and Jae Myung Park Effect of a Synthetic Cannabinoid Agonist on the Proliferation and Invasion of Gastric Cancer Cells, Journal of Cellular Biochemistry, 2010; 110:321–332 .

79. Keshavarz M., Mostafaie A., Mansouri K., Shakiba Y., Motlagh H R M., Inhibition of Corneal Neovascularization with Propolis Extract, Archives of Medical Research, 2009; 40:59–61.

80. Peng Zhu, Jianbo Zhang, Qi Chen., Jijian Wang., Yaxu Wang, Expression of vascular endothelial growth factor-C in gastric carcinoma and the effect of its antisense gene transfection on the proliferation of human gastric cancer cell line SGC-7901, The American Journal of Surgery,2012 ;204: 1.

81. Yongning Z., Gaozhong L., Jing W., Zhiyi Z., Zhengqi W., Ping F., Tianjun H., Xu Z., Min L., Fuhua Z., Qiang L., Bing L., Liang Q., Clinicopathological significance of E-cadherin, VEGF, and MMPs in gastric cancer, Tumor Biol., 2012;31:549–558.

82. Omene C O., Wu J ., Frenkel K., Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) derived from propolis,a honeybee product, inhibits growth of breast cancer stem cells, Invest New Drugs , 2012;30:1279–1288.

83. Mancinelli R, Onori P, Gaudio E, Franchitto A, Carpino G, Ueno Y, Alvaro D, Annarale L P, DeMorrow S, Francis H, Taurocholate Feeding to Bile Duct Ligated Rats Prevents Caffeic Acid-Induced Bile Duct Damage by Changes in Cholangiocyte VEGF,Expression, Exp Biol Med (Maywood).,2009 Apr;234(4):462-74.

84. In Sook Woo,Kyung-Ae Kim, Hae-Myung Jeon, Sook Hee Hong, Sang Young Rho, Su Jin Koh, Myung Ah Lee, Jae Ho Byun, Jin-Hyung Kang, Young Seon Hong, Kyung Shik Lee, Chul-Soo Cho, Myung Gyu Choi and In-Sik Chung Pretreatment serum endostatin as a prognostic indicator in metastatic gastric carcinoma., Int. J. Cancer. 2006; 119: 2901–2906 .

85. Thomas Pufea, Wolf J. Petersenb, Nicolai Miosgec, Mary B. Goldringd, Rolf Mentleina, Deike J. Varogae, Bernhard N. Tillmann Endostatin/collagen XVIII—an inhibitor of angiogenesis is expressed in cartilage and fibrocartilage Matrix Biology. 2004;23 : 267–276.

86. Patra1 D., Sandell L J., http://www.expertreviews.org/., 2012;3; 14:10.

87. Szarvas T., Vikto´ ria La´szlo´, Dorp F. , Reis H., Szendro A., Romics İ. , Tilki D., Ru¨bben H. , Ergun S ., Serum endostatin levels correlate with enhanced extracellular matrix degradation and poor patients' prognosis in bladder cancer , Int. J. Cancer, 2012;130:2922–2929 .

88. El-Refaei M F., El-Naa M M., Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on mice bearing tumor involving angiostatic and apoptotic activities, Chem Biol Interact., 2010 Jul 30;186(2):152-6.

89. Abduljawad S H., El-Refaei M F., El-Nashar N N., Protective and anti-angiopathy effects of caffeic acid phenethyl ester against induced type 1 diabetes in vivo, Int Immunopharmacol., 2013 Oct;17(2):408-14.