



Araştırma Makalesi / Research Article

Kolon Kanserli Hastalarda AAG'nin Matriks Proteinlerinin Varlığında Angiogenetik Biyobelirteçlerin Etkileri

Effects of Angio-Genetic Biomarkers in the Presence of Matrix Proteins of AAG in Patients with Colon Cancer

Funda KOSOVA¹, Zeynep KASAR²

¹ Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Biyokimya, Manisa, Türkiye

² Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Manisa, Türkiye

Öz

Amaç: Kanser; hücrenin çoğalmasını, farklılaşmasını, sağ kalımını denetleyen kritik genlerde meydana gelen değişikliklerden kaynaklanan hastalıktır. Kanser ilerlemesini ve metastazını etkileyen çok sayıda etken vardır. Bu etkenlerden birisi olan angienez sisteminin aktivatör ve inhibitörleri bulunmakta olup bunlar arasındaki dengeye bağlı olarak kanserin ilerlemesi ve yayılması inhibe ya da aktive olmaktadır. Geldanamisin, anti-kanserojen etki gösteren, benzokinon ansamisin antibiyotiktir. Isı şok proteinleri, ısı stresine yanıt olarak sentezlenen, hücre homeostaziyi düzenleyen, hücrenin sağ kalımını artıran, moleküler şaperonlardır ve tümör hücrelerinde yapısal olarak aşırı eksprese edilir ve kanser tedavisi için bir hedef olarak değerlendirilmektedir. Çalışmamızda, geldanamisin derivativesi olan 17-allylamino-17-demetoksi-geldanamisin (17-AAG)'nin, kolon kanseri hücre dizini Colo-205 kültüründe matriks proteinlerinin varlığında vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), matriks metalloproteinaz (MMP) ve anti-angiogenik ajanlardan olan endostatin (ES) ve trombospodin (TSP) etkilerini ELISA yöntemiyle araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Geldanamisin derivativesi olan 17-AAG stok solüsyondan tedavi amacıyla kolon kanser hücre dizilerine uygulandı. 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 toplandı ve hücreler analize kadar -80°C'de tutuldu. VEGF, MMP, ES ve TSP-1, ELISA kiti (Millipore mCorp., Billerica, MA) kullanılarak ölçüldü.

Bulgular: AAG'ye göre kollajene VEGF seviyesi, AAG+ Kollajene ise VEGF, Endostatin, TSP seviyesi istatistiksel olarak artarken (p<0.05), AAG+Lamininde ise ES, MMP, TSP seviyesi istatistiksel olarak azalmıştır (p<0.05). Kollajene göre AAG+ Kollajen ise VEGF, MMP, TSP, ES istatistiksel olarak arttığı görülmüştür (p<0.05). AAG+ Kollajen'e göre ise AAG+Laminin'de VEGF, MMP, TSP, ES seviyeleri istatistiksel olarak azalmıştır (p<0.05).

Sonuç: Dolayısıyla, 17-AAG uygulaması kolon kanseri tedavisinde katkı sağlayabilecek ajan olarak gözükmektedir. Bu konuyla ilgili daha fazla çalışmalarla da bu bulguların desteklenmesi yararlı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Angienez, Hücre kültürü, VEGF, MMP, TSP, Endostatin

Abstract

Objective: Cancer; It is a disease caused by changes in critical genes that control cell proliferation, differentiation and survival. There are many factors that affect the progression and metastasis of cancer. There are activators and inhibitors of the angiogenesis system, which is one of these factors, and depending on the balance between them, the progression and spread of cancer are inhibited or activated. Geldanamycin is a benzoquinone ansamycin antibiotic with anti-carcinogenic effects. Heat shock proteins are molecular chaperones that are synthesized in response to heat stress, regulate cellular homeostasis and increase cell survival. 90 kDa Hsp (Hsp-90) accounts for 1-2% of total intracellular protein in normal eukaryotic cells, is constitutively overexpressed in tumor cells and is considered a target for cancer therapy. In our study, we aimed to investigate the effects of 17-AAG, a geldanamycin cycle, in the presence of matrix proteins in the colon cancer cell line Colo-205 culture, using the ELISA method.

Material and Methods: The 17-AAG stock solution, which is a geldanamycin derivative, was applied to colon cancer cell lines for treatment. Cell growth was morphologically examined every 2 days under an inverted microscope with phase contrast attachment (CK40-F200, Olympus, Japan) and visualized by microphotography. Cells were reproduced by passage from confluent cells. Cells were harvested and cells were kept at 80°C until analysis. VEGF, MMP, ES and TSP-1 were measured using ELISA kits (Millipore mCorp., Billerica, MA).

Result: According to AAG, VEGF level in Collagen, VEGF, Endostatin, and TSP levels in AAG+ Collagen statistically increased (p <0.05), while ES, MMP, TSP levels decreased statistically in AAG+Lamine (p <0.05). It was observed that VEGF, MMP, TSP, Endostatin increased statistically (p <0.05) if AAG+ Collagen compared to collagen. Compared to AAG+ Collagen, VEGF, MMP, TSP, ES levels were statistically (p <0.05) decreased in AAG+Laminin.

Conclusion: Therefore, 17-AAG application seems to be an agent that can contribute to the treatment of colon cancer. It would be useful to support these findings with further studies on this subject.

Keywords: Angiogenesis, Cell culture, VEGF, MMP, TSP, Endostatin

İletişim adresi/Address for Correspondence:

Prof.Dr.Funda Kosova  <https://orcid.org/0000-0001-8070-5067>

Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Biyokimya, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Kampüsü, Manisa, Türkiye

Tel: +905335573629

E-mail: fundakosova@gmail.com

Geliş Tarihi/Received: 25 Nisan 2022. Kabul Tarihi/Accepted: 10 Temmuz 2022. Çevrimiçi Yayın: Published Online: 30 Aralık 2022

GİRİŞ

Kolorektal kanser her yıl yaklaşık 150.000 Amerikalı bireyi etkiler ve bunların yaklaşık üçte biri ölür¹. Avrupa'da yılda yaklaşık 250.000² ve dünya çapında yaklaşık 1 milyon insanı³ etkilemektedir. Kolon kanserinin patofizyolojisi, klinik prezentasyonu ve tanısının gözden geçirilmesi önemlidir. Bu alan, karsinogenezin moleküler temelindeki ve kolon kanseri tespiti ve tedavisi teknolojisindeki atılımlar nedeniyle hızla değişmektedir.

Kanser, kan damarları ve lenfatik sistem ile yayılır. Bu invazyonun anjiyogenez ile kolaylaştırıldığı yapılan araştırmalarla saptanmıştır. Anjiyogenez; önceden var olan damarlardan yeni kapiller kan damarları oluşması olayıdır. Yaraların iyileşmesi, büyüme ve gelişme gibi yararlı olaylarda yer alan fizyolojik bir süreç olan anjiyogenez, aynı zamanda tümör büyümesi ve metastazına da yol açmada rol oynar². Kanser ilerlemesini ve metastazını etkileyen çok sayıda etken vardır. Bu etkenlerden birisi olan anjiyogenez sisteminin aktivatör ve inhibitörleri bulunmakta olup bunlar arasındaki dengeye bağlı olarak kanserin ilerlemesi ve yayılması inhibe ya da aktive olmaktadır. Anjiyogenik sistemin en önemli aktivatörlerinden biri vasküler endotelial büyüme faktörüdür (VEGF). Önemli biyolojik aktivitesi olan çok fonksiyonlu bir moleküldür. VEGF, damar geçirgenliğini artırır ve hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteinaz (MMP) salınımını uyararak metastazı kolaylaştırır. VEGF tarafından harekete geçirilen endotelial hücreler önce MMP'leri sentezlerler. MMP'lar serbest kalırlar ve kan damarları dışındaki yapıyı bozarak anjiyogeneze zemin hazırlarlar. Anti-anjiyogenik ajanlardan en önemlileri endostatin (ES) ve trombospondindir (TSP)⁴.

HSP-90, ısıyla ilgili yaygın bir proteindir. "90" ağırlığını (90 kilo Dalton) temsil eder. Stres sırasında ekspresyon gösteren ve diğer birçok proteinle birlikte mükemmel katlanmada yer alan, proteinlerin ısı stresine karşı stabilizasyonunu sağlayan ve protein yıkımında rol oynayan bir şaperon proteinidir⁵. Geldanamisin türevi, 17-allilamino-17-demetoksigeldanamisin (17-AAG), 90 kDa ısı şoku proteininin (HSP-90) amino-terminal ATP bağlama cebine bağlanır ve bu şaperonun malignite ile ilgili proteinlerini stabilize etmesini engeller⁶. Isı şoku proteini ailesi, moleküler şaperonlar olarak işlev görür ve

hücre büyümesi, farklılaşması ve hayatta kalmasının kilit düzenleyicilerinin katlanması, hücre içi lokalizasyonu ve proteolitik etkisine öncülük eder. HSP-90 normal ökaryotik hücrelerde toplam hücre içi proteinin %1-2'sini oluşturur, tümör hücrelerinde yapısal olarak aşırı eksprese edilir ve kanser tedavisi için bir hedef olarak değerlendirilmektedir⁷.

Bu bilgiler ışığında bizde, AAG ile tedavi dozu uygulanan kolon kanseri hücre kültürlerinde, matriks proteinlerinin etkilerini ilgili faktörler açısından araştırdık. Çalışmamızda AAG ile tedavi dozu uygulanan kolon kanseri hücrelerinde VEGF, MMP ve anti-anjiyogenik ajanlardan olan ES ve TSP matriks protein varlığındaki etkilerini araştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Geldanamisin derivativesinin uygulanması

Geldanamisin derivativesi olan 17-AAG stok solüsyonda 10 mM olacak şekilde DMSO içinde çözülerek stok solüsyonu hazırlandı. Daha sonra hazırlanan bu stok solüsyondan 1, 0.25, 0.06, 0.015, 0.007 µL farklı dozlarda 17-AAG tedavi amacıyla kolon kanser hücre dizilerine uygulandı.

Hücre Kültürü

Bu çalışmada kullanılan kolon karsinoma hücre dizisi Colo 205, DMEM F-12, %10 FCS, %1 L-glutamine ve %1 penisilin-streptomisin 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.

ELISA Analizi

Hücre lizatlarındaki VEGF, MMP, ES ve TSP1 konsantrasyonlarını ölçmek için hücreler, 12 saat boyunca 6 oyuklu doku kültürü plakalarında 3x10⁵ hücre/3 mL ortam/oyukta kültürlendi, ardından 48 saat AAG ile işleme tabi tutuldu. Hücreler toplandı ve analize kadar -80°C'de tutuldu. VEGF, MMP, ES ve TSP-1, ELISA kitleri (Millipore mCorp., Billerica, MA) kullanılarak ölçüldü. Analiz 3 tekrarlı olarak yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Deneylerden elde edilen verileri değerlendirmede SPSS 15.0 istatistik programı kullanıldı. Gruplar arası farkın anlamlılığı

Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

BULGULAR

Kolon kanseri hücre hattımız Colo-205 ATNT firmasından getirildi ve protokole uygun şekilde çözdürülerek flasklara alındı. Pasaj yapılan hücrelerin normal şekilde üredikleri saptandı. Colo-205, kolon adenokarsinomunu taklit eden bir hücre dizinidir. Bu hücre dizininde hücreler küçük ve yuvarlak olarak gözlemlendi. Hücrelerin kültür tabağına yapışması geç ve değişik düzeylerde gerçekleşti.

Tablo 1: AAG, kollajen ve laminine göre VEGF, MMP, TSP ve ES düzeyleri arasındaki ilişki

	VEGF (ng/mL)	MMP (ng/mL)	TSP (ng/mL)	Endostatin (ng/mL)
AAG	19,17±2.2	0,105±0.5	25,97±7.5	1,572±0.5
Kollajen	20,83 [±] 2.5	0,061 [±] 0.01	24,3 [±] 5.4	1,572±0.4
AAG+ Kollajen	29,17 ^{**} ±3.0	0,1 [±] 0.01	30,97 ^{**} ±8.3	1,905 ^{**} ±0.6
AAG+ Laminin	19,17 ^{**} ±2.3	0,077 ^{**} ±0.02	24,3 ^{**} ±3.2	1,405 ^{**} ±0.3

^{*}AAG'ye göre anlamlı (p <0.05)

^{**}Kollajene göre anlamlı (p <0.05)

[±]AAG+ Kollajen göre anlamlı (p <0.05)

AAG'ye göre Kollajende VEGF seviyesi, AAG+Kollajende ise VEGF, Endostatin, TSP seviyesi istatistiksel olarak artarken, AAG+Lamininde ise Endostatin, MMP, TSP seviyesi istatistiksel olarak azalmıştır. Kollajene göre AAG+Kollajen ise VEGF, MMP, TSP, Endostatin istatistiksel olarak arttığı görülmüştür. AAG+ Kollajen'e göre ise AAG+Laminin'de VEGF, MMP, TSP, Endostatin seviyeleri istatistiksel olarak azalmıştır (Tablo 1).

TARTIŞMA

Kolon kanseri, en sık rastlanan malignitelerden biridir, yıllık 1 milyon yeni vaka ve 600.000'den fazla ölüm tahminiyle dünya çapında kansere bağlı ölümlerin üçüncü sebebidir⁸. Kolon kanseri gelişimi pek çok faktörle ilişkili olduğu bilinen çok basamaklı bir süreçtir⁹. Tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonlarındaki kayıplar, aşırı hücre proliferasyonu, angiogenez, azalmış apoptozis kolon kanseri gelişimine yol açan değişiklikler olarak kabul edilmektedir¹⁰.

Angiogenez, tümör ilerlemesi ve metastazı için temel mekanizmalardan biridir. Ekstrasellüler matriksin (ESM) yeniden modellenmesini

gerektiren bir süreçtir¹¹. Ancak angiogenezin fazlalığı, kanser, romatoid artrit, retinal neovaskülarizasyon ve aterosklerozisin dahil olduğu ciddi hastalıkları oluşturmaktadır¹². Normal angiogenezde var olan inhibitör/aktivatör dengesinin bozulması sonucu tümör angiogenezini denilen patolojik bir süreç başlar. Angiogenezin inhibisyonu, kanser tedavisi için umut verici bir strateji olarak ortaya çıkmaktadır ve angiogenez katı tümörlerin büyümesi ve metastaz için gereklidir¹³. Angiogenik ve antiangiogenik proteinler bir denge tarafından düzenlenir. Bununla birlikte anti-angiogenik tedavilerde en çok hedef alınan proteinin VEGF olduğu yapılan araştırmalarda saptanmıştır. Bunun sebebi hem ekstrasellüler matriks hem de dolaşımda çok sayıda trombospondin-1, ES ve tumstatin gibi endojen angiogenez inhibitörünün var olmasıdır¹⁵. Tümör angiogenezinde çevresel ve genetik faktörler çeşitli onkogenlerin aktivasyonuna ve bazı tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna neden olur. Bunun sonucunda angiogenez aktivatörlerinin üretimi artarken angiogenez inhibitörlerinin üretimi baskılanır ve tümör hücrelerinde denge angiogenez lehine bozularak yeni damar yapımı başlatılır¹⁶. Angiogenez, VEGF, MMP'ler gibi angiogenik ve endostatin, TSP-1 gibi anti-angiogenik faktörlerin kandaki varlığına bağlıdır. Kanda angiogenik faktörler baskın olduğunda angiogenez meydana gelirken, buna karşılık kanda antiangiogenik faktörler baskın olduğunda da angiogenez baskılanmaktadır¹⁷.

VEGF, damar geçirgenliğini artırır ve ESM yıkımından sorumlu olan MMP salınımını uyarır böylece metastazı ve invazyonu kolaylaştırır¹⁸. Diğer bir angiogenik ajan ise MMP'dir. VEGF tarafından harekete geçirilen endotelial hücreler, önce MMP'leri sentezlerler. MMP'ler serbest kalırlar ve kan damarları dışındaki yapıyı bozarlar. Bu bozulma angiogenezini hızlandırır¹⁹.

Endostatin; kollajen XVIII'ün 20 kDa'luk kısmıdır²⁰. Angiogenezin kuvvetli bir inhibitördür. Direkt olarak endotelial hücre büyümesi ve göçünü engeller; VEGF'nin angiogenez etkisini inhibe eder^{17,21}. Trombospondin-1; birçok hücre tarafından salgılanan heparin bağlayıcı 5 üyeli bir ekstrasellüler protein ailesinden olup, oldukça büyük bir proteindir. Anti-angiogenik etkisi proteinin N-terminal kısmında bulunmaktadır^{20,21}. Angiogenez, proangiogenik faktörler ve onların inhibitörleri arasında ve

ESM arasında etkileşim sonucunda oluşur²². Anjiogenez oluşan dokularda, ESM'de değişiklik yapmak, endotelial hücrelerin göçü için ortam yaratan bu bileşiklerin yeni sentezi ve proteolizi tarafından olmaktadır. Anjiogenez böylece endotelde ve ESM'de oluşan birçok basamakta oluşur²³. Bu olay endotelial hücreler ve vasküler sızıntı arasındaki bağlantının azalması, vazodilatasyon ile başlar. Böylece, ESM bileşikleri olan plazma adezyon moleküllerinin (laminin, fibronektin, fibrin) endotelin yapısını bozması sonucu damar dışına çıkmaları anjiogenezin başlangıcını oluşturur²⁴.

HSP-90, proteinlerin katlanması/olgunlaşması ve proteazomal bozunması arasındaki dengeyi kontrol eder ve malign tümör hücrelerinin büyümesini ve hayatta kalmasını teşvik etmede rol oynar. Geldanamisin ve klinik olarak ilgili türev 17-AAG, HSP-90'ın amino-terminal ATP bağlama cebine bağlanır ve bu şaperon proteinlerin uygun şekilde katlama veya kararlı hale getirme yeteneğini bloke eder. 17-AAG, normal hücrelerden elde edilen HSP-90'a kıyasla tümör hücrelerinden türetilen HSP-90'a daha yüksek afinite gösterir. HSP-90 inhibitörleri kemoterapötik ajanlar ve radyasyon ile sinerji oluşturur ve hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfanın (HIF-1 α) kararsızlaşmasına ve bozulmasına neden olur⁶. Ferrario ve ark. yaptıkları çalışmalarında fare karsinoma hücrelerinde tümör dokusunda survivin, Akt, HIF-1 α , MMP-2 ve VEGF'in anti-apoptotik ve pro-anjiyogenik proteinlerin ekspresyonunu arttırdığını ve tedavi rejimine 17-AAG dahil edildiğinde bu ekspresyonların önemli ölçüde azaldığını gösterdiler⁶.

Kosova ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, mide kanseri hücreleri kollajen I üzerinde kafeik asit fenil ester (CAPE) ile tedavi dozu uygulandığında VEGF, MMP ve ES protein seviyelerinin azaldığı, TSP protein seviyelerinin ise arttığını gösterdiler. Mide kanseri hücreleri Laminin üstünde CAPE ile tedavi dozu uygulandığında ise VEGF, MMP ve Es protein seviyelerinin arttığını, TSP protein seviyelerinde ise herhangi bir değişiklik olmadığını gösterdiler¹⁴. Bu grubun yapmış olduğu başka bir çalışmada ise, mesane kanseri hastalarında yapılan tedavinin anjiyogenez aktivatörlerinden olan VEGF ve MMP'nin azalmasına yol açtığı, kuvvetli bir anjiyogenez inhibitörü olan ES ve TSP-1 seviyelerinde ise anlamlı bir değişiklik oluşturmadığını

gözlemlemişlerdir. Antianjiyogenik faktörler olan ES ve TSP-1'in seviyelerinde artış olmamasının nedenin uygulanan adjuvan tedavinin süresi ile ilgili olduğunu ve adjuvan tedavinin süresine bağlı olarak ES ve TSP-1 artacağı düşünülmektedirler.

Bizim bu çalışmamızda, AAG'ye göre kollajende VEGF seviyesi, AAG+ Kollajende ise VEGF, ES, TSP seviyesi istatistiksel olarak artarken, AAG+Lamininde ise ES, MMP, TSP seviyesi istatistiksel olarak azalmıştır. Kollajene göre AAG+Kollajen grubunda ise VEGF, MMP, TSP, ES'in istatistiksel olarak arttığı görülmüştür. AAG+Kollajen'e göre ise AAG+Laminin'de VEGF, MMP, TSP, ES seviyeleri istatistiksel olarak azalmıştır.

Sonuç olarak, matriks proteinlerinin varlığında kolon kanseri hücrelerinde angiogenik ve anti-angiogenik proteinlerin seviyelerinde bir artış görülürken, AAG ile verilen matriks proteinlerinden özellikle kollajen varlığında TSP ve ES seviyelerini arttırarak anti-anjiyogenik etki gösterdiğini gözlemledik. Buda bize matriks proteinlerinden kollajenin varlığında AAG'nin daha iyi etki göstererek tümör hücrelerinin büyümesini ve gelişmesini engellediğini düşündürmektedir. Dolayısıyla, 17-AAG uygulaması kolon kanseri tedavisinde katkı sağlayabilecek bir ajan olarak gözükmemektedir. Daha çok hasta toplulukları üzerinde denemesi sonucunda bu ilacın kullanımının artırılarak kanser tedavisinde umut olabileceğini düşünmekteyiz. İlaven hayvan kanser modellerinde de bu bulguların desteklenmesi yararlı olacaktır.

Etik Onay: Etik onay gerekmemektedir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemektedir.

Finansal Destek:-

Ethical Approval: Not applicable

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Support: None

KAYNAKLAR

1. Jamal A., Siegel R., Ward E., et. al.: Cancer statistics, CA Cancer J Clin 2007, 57: pp. 43-66. <https://doi.org/10.3322/canjclin.57.1.43>.
2. Hassan C., Zullo A., Laghi A., et. al.: Colon cancer prevention in Italy: cost-effectiveness analysis with CT colonography and endoscopy. Dig Liver Dis 2007, 39: pp. 242-250. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2006.09.016>.
3. Shibuya K., Mathers C.D., Boschi-Pinto C., et. al. : Global and regional estimates of cancer

- mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of disease 2000. *BMC Cancer* 2002, 2: pp. 37. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-2-37>.
4. Funda Kosova, Tuba Imren, The Possible Relationship between Gastric Cancer and Angiogenesis [Mide Kanseri ve Anjiyogenez Arasındaki Olasi İlişki], *Medicine Science*, 2015, 4(2), 2318-35.
 5. Wasan Abdul-ilah Bakir1, Hiba Ahmed Gaidan2, Methaq Mueen Al-kaabi2 Immunohistochemical expression of interleukin10 (IL10) and heat shock protein-90 (HSP-90) in prostatic carcinoma, *Indian J Pathol Microbiol*, Apr-Jun 2020, 63(2):230-234. doi: 10.4103/IJPM.IJPM_460_19.
 6. Angela Ferrarioa, Charles J.Gomerab, Targeting the 90 kDa heat shock protein improves photodynamic therapy, *Cancer Letters*, Volume 289, Issue 2, 28 March 2010, Pages 188-194. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.08.015>
 7. Chaudhury S, Welch TR, Blagg BSJ. Hsp90 as a target for drug development. *Chem. Med. Chem.* 2006, 1:1331–1340. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200600112>.
 8. He X., Dong Y., Wah Wu C., Zhao Z., Simon S.M., Chan F.K.L., Sung J., and Yu J. MicroRNA–218 Inhibits Cell Cycle Progression and Promotes Apoptosis in Colon Cancer by Downregulating BMI1 Polycomb Ring Finger *Oncogene. Molecular Medicine*, 2012, 18: 1491–1498. <https://doi.org/10.2119/2Fmolmed.2012.00304>.
 9. Durhan E., Kolon kanser tanılı olgularda PCR RFLP metodu ile p53 gen mutasyonlarının saptanması. Afyon, Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2006.
 10. Hostein I., Robertson D., DiStefano F., Workman P., and Clarke P.A. Inhibition of Signal Transduction by the Hsp90 Inhibitor 17-Allylamino–17-demethoxygeldanamycin Results in Cytostasis and Apoptosis. *Cancer Research*, 2001, 61: 4003–4009.
 11. Çavdar Z., Kolon ve rektum kanserlerinde endostatinin matriks metalloproteinaz -2 üzerine gösterdiği etkinin araştırılması, Doktora tezi, İzmir, 2008.
 12. 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. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-9-45>.
 13. Folkman J., Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth., *Ann Intern Med.*, 1975, 82:96-100. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-82-1-96>.
 14. Kosova, FO Kurt, E Olmez, I Tuğlu, Z Arı. Effects of caffeic acid phenethyl ester on matrix molecules and angiogenetic and anti-angiogenetic factors in gastric cancer cells cultured on different substrates. *Biotechnic & Histochemistry*, 2015, 2:1-10. DOI: 10.3109/10520295.2015.1072769
 15. 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. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-10-0047>.
 16. Demirci U., Karaciğer hastalıklarında vasküler endotel büyüme faktörü düzeyleri, uzmanlık tezi, İstanbul, 2006.
 17. Şencan M., Güneşçar R., Cevit Ö., Deveci D., The effect of aspirin on the blood levels of angiogenic vascular endotelial growth factor and anti-angiogenic endostatin levels, *C.Ü tıp fakültesi dergisi*, 2007, 29(2):56-61. <https://doi.org/10.35333/JOHSE.2020.192>.
 18. 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. DOI 10.1007/s10637-010-9550-z.
 19. Ölgün S., Bıçak I. Nebioğlu D., Angiogenesis ve kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar, *Ankara Eczacılık Fakültesi dergisi*, 2002;31(3)193-214.
 20. Güllü İ.H., Anjiyogenez ve Anti-anjiyogenik Tedaviler, 2002, 5,9.
 21. Doğrul A.B., Sıçanlarda %70 Hepatektomi sonrası Antiangiogenik Cevap ve Bunun Rejenerasyon ve Anjiogenez ile İlişkisi, uzmanlık tezi, Hacettepe üniv. Tıp Fakültesi, Ankara, 2008.
 22. Yeşillik S., Atrofik gastrit intestinal metaplazi ve mide kanserinde COX2 VE p21 ekspresyonu, uzmanlık tezi, Ankara, 2005.
 23. Erturan S S., Gastro-ösofageal reflü; noktürnal astımın etyopatogenezinde rol oynayan bir etken, uzmanlık tezi, İstanbul, 1993.
 24. 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. doi: 10.1016/j.gassur.2005.11.001