



Araştırma Makalesi /Research Article

**Matriks Proteinlerinin Varlığında AAG'nin Mide Kanseri Üzerindeki Etkisinin
LC-PCR ile Araştırılması**

**The Effect of Investigation of AAG on Stomach Cancer in The Presence of Matrix
Proteins by LC-PCR**

Funda Kosova¹, Tuba İmren², Feyzan ÖZDAL KURT³, İbrahim TUĞLU⁴

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

²Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa, Türkiye

³Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Manisa, Türkiye

⁴Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Manisa, Türkiye

ÖZ

Amaç: Mide kanseri hem kadın hem de erkekler için dünyada görülme sıklığı açısından ön sıralarda yer alan bir patolojidir. 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, geldanamisin derivesi olan 17-AAG'nin, kollajen ve laminin varlığında mide kanseri hücre dizininde anjiogenetik biyobelirteçlerinin anjiyojenez ile ilişkilerinin light cycler real-time PCR (LC-PCR) ile incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Geldanamisin türevi olan 17-AAG'nin, kollajen ve laminin varlığında mide kanseri hücre dizininde vasküler endotelial growth faktör (VEGF), matriks metalloproteinaz (MMP), Endostatin ve TSP -1 seviyeleri LC-PCR testi ile incelendi.

Bulgular: AAG+Laminin, MMP ve VEGF seviyelerinin azaldığını, TSP-1 ve endostatin seviyelerinin istatistiksel olarak arttığı görülmüştür.

Sonuç: 17-AAG uygulaması mide kanseri tedavisinde katkı sağlayabileceği gözlemlenmiştir. Bu konuyla ilgili daha fazla çalışmalarla da bu bulguların desteklenmesi yararlı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Anjiyojenez, Mide Kanseri, VEGF, MMP, AAG, Endostatin, TSP-1

Abstract

Objectives: Gastric cancer is a leading pathology in terms of its prevalence in the world for both women and men. Undoubtedly, angiogenesis is one of the most important roles in invasion and metastasis of oncogenes, which are the basis of cancer formation and genes that have acquired cancer characteristics. Angiogenesis means the formation of new capillary vessels from the blood vessels that exist in the body, and oxygen and nutrients are transported to the tissues through these vessels and their nutrition is grown. Although this event has good effects such as wound healing and growth, it also allows the cancerous tissues to grow by feeding and helps the spread of cancerous cells through the vessels. Thus, it accelerates metastasis and invasion. In our study, we aimed to examine the relationship between angiogenesis and angiogenetic markers in the gastric cancer cell line in the presence of 17-AAG, which is a geldanamycin circuit, collagen and laminin.

Material and Methods: VEGF, MMP, Endostatin and TSP -1 levels of 17-AAG with geldanamycin circuit in the presence of collagen and laminin in the gastric cancer cell line were examined by LC PCR test.

Results: In our study, we observed that AAG + Laminin, MMP and VEGF levels decreased, TSP-1 and endostatin levels increased statistically.

Conclusion: As a result, 17AAG application appears to be an agent that can contribute to the treatment of stomach cancer. It will be useful to support these findings with further studies on this subject.

Keywords: Angiogenesis, Gastric Cancer, VEGF, MMP, AAG, Endostatin, TSP-1

İletişim adresi/Address for Correspondence:

Funda Kosova <http://orcid.org/0000-0001-8070-5067>

Sağlık Bilimleri Fakültesi, Tıbbi Biyokimya, Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Kampüsü, Manisa, Türkiye

Tel: +9053355736

E-mail: fundakosova@gmail.com

Tuba İmren <http://orcid.org/0000-000>

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 kanserini bu ölümcül hastalığın çeşitlerinden birisidir¹. Kanser meydana gelebilmesi için vücutta bulunan genlerin mutasyona uğrayarak kanser özelliği kazanması gerekmektedir ve bu genlere *onkogen* adı verilmektedir¹. Kanser gelişimini ve metastaz oluşumunu etkileyen çok sayıda etken mevcuttur². Anjiyogenez, VEGF, MMP'lar gibi anjiyojenik ve endostatin, TSP-1 gibi anti-anjiyojenik faktörlerin kandaki varlığına bağlıdır. Kanda anjiyojenik faktörler dominant olduğunda anjiyogenez meydana gelirken, buna karşılık kanda antianjiyojenik faktörler dominant olduğunda da anjiyogenez baskılanmaktadır³. Anjiyojenik sistemin en önemli aktivatörlerinden biri büyüme faktörleri olarak bilinen gruptan olan vasküler endotelial growth faktör (VEGF)'dür. Anjiyojenik olaylar VEGF, basit fibroblast büyüme faktörleri ve hepatosit büyüme faktörlerinin dahil olduğu büyüme faktörleri tarafından düzenlenir⁴. VEGF'in kolon kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser çeşidinde varlığı gösterilmiş ve artmasının özellikle malignite ile ilgili olduğu düşünülmüştür⁵.

VEGF, damar geçirgenliğini artırır ve hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteinaz (MMP) salınımını uyarır böylece metastaz ve invazyonu kolaylaştırır⁵. MMP Diğer bir anjiyojenik ajandır. VEGF tarafından harekete geçirilen endotelial hücreler, önce MMP'leri sentezlerler. MMP'ler serbest kalırlar ve kan damarları dışındaki yapıyı bozarlar. Bu bozulma anjiyogenez hızlandırır³. Endostatin, kollajen XVIII'ün 20 kDa'luk fragmanıdır⁶. Anjiyogenezin kuvvetli bir inhibitördür. Direkt olarak endotelial hücre büyümesi ve göçünü engeller; VEGF'nin anjiyogenez etkisini inhibe eder⁷. Trombospondin-1 ise birçok hücre tarafından salgılanan heparin bağlayıcı 5 üyeli bir ekstrasellüler protein ailesinden olup, oldukça büyük bir proteindir. Anti-anjiyojenik etkisi proteinin N-terminal kısmında bulunmaktadır⁶. Bir ısı şok proteini olan HSP-90, apoptozisin ve

anjiyogenezin kritik kontrol noktalarında farklı proteinlerle etkileşerek düzenleyici rol oynar ve hücre koruyucu özelliğinden dolayı apoptozisi önler⁸. HSP-90'ın çeşitli ajanlarla inhibisyonu, mitokondri membranında depolarizasyona yol açarak apoptozisin başlatılmasında önemli rol oynayan sitokrom-c'nin sitozole salınımına neden olur. HSP-90 inhibitörlerinden geldanamisin ve türevleri, apoptozisi indükleyici etkiye sahiptirler. Yeni kılcak damarların büyümesi olan anjiyogenez, kanser büyümesinin bir düzenleyicisi ve kanser tedavisi için yararlı bir hedeftir. Geldanamisin etkisi mide kanserinde anjiyogenez üzerindeki etkisi tam olarak bilinmemektedir.

VEGF ile aktive edilen endotel hücreleri, ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü¹⁰ ve MMP gibi proteolitik enzimler üreterek ve ayrıca anjiyojenik uyarıcı faktörleri indükleyerek hücre dışı matriksi (ECM) bozar¹¹. Endotel hücreleri daha sonra destekleyici hücrelerin (laminin ve kollajen) işe alınmasıyla yeni oluşan damarlar haline gelen tübüler yapılar oluşturur.

Çalışmamızda, geldanamisin derivesi olan 17-AAG'nin, kollajen ve laminin varlığında mide kanseri hücre dizisinde anjiyogenetik biyobelirteçlerin anjiyogenez ile ilişkilerinin LC-PCR ile incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Geldanamisin derivesi olan 17-AAG mide karsinoma hücre dizisi NCI-N87'e kollajen ve laminin eklenerek uygulamalar yapıldı.

RNA izolasyon protokolü

Çalışmada kontrol grubu ve 17 AAG uygulanmış grup olmak üzere iki tür hücre kullanıldı. Hücreler (NCI-N87) flasklardan tüplere alındı takip eden izolasyon protokolü Kosova ve ark. (2017)¹⁵, bahsedildiği şekilde uygulandı.

cDNA Sentezi

Vural ve ark. (2017)⁹, İmren ve ark (2020)¹² Kosova ve ark. (2017)¹⁵ ve Ribeiro ve ark. (2006)¹⁸ makalelerinde tanımlandığı şekilde gerçekleştirildi.

Real Time PCR Aşaması

Özgül primer, elde edilen cDNA'lar ile reaksiyona girerek hedeflenen RNA ekspresyon düzeyini belirlemede daha önceki çalışmalarda uygulanan yöntem kullanılarak belirlendi^{9,12,15,18}.

Deneylemlerden 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.

BULGULAR

Real Time PCR okuması yapılan protein değerlerinin istatistiksel analizi sonucunda kontrole göre AAG ve AAG+Kollajen karşılaştırıldığında endostatin, TSP-1 ve VEGF istatistiksel olarak azalırken MMP ise istatistiksel olarak anlamsız kabul bulundu. Kontrole göre AAG+Laminin karşılaştırıldığında endostatin, MMP, TSP-1 ve VEGF istatistiksel olarak azaldığı görüldü. AAG göre AAG+Kollajen karşılaştırıldığında ise TSP-1 istatistiksel olarak azalırken, endostatin, MMP ve VEGF seviyelerinde istatistiksel bir anlam bulunamadı ($p < 0.05$). AAG+Laminin ile karşılaştırıldığında ise endostatin artarken, TSP-1, MMP ve VEGF istatistiksel olarak azaldığı görüldü. AAG+Kollajen AAG+Laminin ile karşılaştırıldığında MMP, ve VEGF azaldığını, TSP-1 ve endostatin seviyelerinin istatistiksel olarak arttığı grlmştir.

Tablo 1. Anjiyojenik faktörlerin kontrol ve AAG, AAG+kollajen, AAG+laminin içeren hücrelerdeki ekspresyon değerleri

^a kontrole göre karşılaştırıldığında $p < 0.05$

^b AAG göre karşılaştırıldığında $p < 0.05$

^c AAG+Kollajen göre karşılaştırıldığında $p < 0.05$

Grup (mide dokusu)	Endostatin	MMP-9	TSP-1	VEGF
Kontrol	0	0	1.23E-03	757 ^a
AAG	2.50E-05 ^a	0	3.20E-03 ^a	490 ^a
AAG+Kollajen	2.93E-05 ^a	0	6.78E-03 ^{a,b}	400.6 ^a
AAG+Laminin	1.05E-06 ^{a,b,c}	1.02E-06 ^{a,b,c}	5.74E-03 ^{a,b,c}	193.6 ^{a,b,c}

TARTIşMA

Mide karsinomu dünyada en yaygın kanser ölümleri arasında yer almaktadır. Erkeklerde 2. sırada kadınlarda ise 3. sırada en yaygın rastlanan kanser türüdür. Hastaların prognozu kötüdür ve ilk 2 yıl sresinde hastaların yaklaşık %50'si kaybedilmektedir¹³. Hastalığın etyolojisinde birçok besin maddesi rol oynamaktadır, özellikle süt, hayvansal protein ve vitaminlerden fakir, nişastadan zengin, düşük kaliteli diyetler hastalık gelişiminden sorumlu tutulmuřtur¹⁴. Mutasyona uğrayarak kanser

zelliği kazanmış hücrelerin genlerine ‘onkogen’ adı verilmektedir. Bu genler, hücre poliferasyonunu, invazyonunu, anjiyojenizasyonunu, invazyonunu, anjiyojenizasyonunu aracılığı ile kontrol etmektedir¹⁶. Kanser, metastaz ile, kan damarları ve lenfatik sisteme nüfuz etme yeteneğine bağlı olarak yayılır. Bu invazyonun, anjiyojenizasyon ile kolaylaştığı, yapılan araştırmalarla saptanmıřtır¹⁷. 1971’de Folkman, 60’larda geliştirmeye başladığı tümör büyümesinin anjiyojenizasyonla ilgili olabileceği hipotezini ortaya atmış ve anjiyojenizasyon yolları ve moleküler hedeflerle ilgili çalışmalar başlamıştır^{19,20}.

Isı şok proteinleri, ısı stresine yanıt olarak sentezlenen, hüresel homeostazi ve hücrenin sağ kalımını düzenleyen moleküler řaperonlardır²¹. Birçok kanser hresi yüksek dozda şaperon üretir; hücre dışına salınan ısı şok proteinleri kanser hücrelerinin evre ve uzak dokulara yayılmasında rol oynarlar. Bu proteinler kanser hücrelerinde çok fazla olup, apoptozisi engellerler ve sinyal proteinlerini anormal stabilize ederek tümör hücrelerinin yaşamına katkıda bulunmaktadırlar²². Bir ısı şok proteini olan HSP-90, hüresel koruyucu özelliklerinden dolayı apoptotik yanıtı inhibe etmektedir. HSP-90, kanser hücrelerinde genellikle yüksek seviyelerde bulunur ve sinyal iletiminde, hücrelerinin büyümesinde ve apoptozis düzenlemesinde görevli onkogenik proteinlerin stabilize edilmesinde fonksiyon grr²³. Mitokondride bulunan HSP-90, membran geçirgenliğini ve sitokrom-c salınımını kontrol eder. HSP-90’ın çeşitli ajanlarla inhibisyonu, mitokondri membranında depolarizasyona neden olur ve doza bağımlı sitokrom-c salınımı gözlenir. Bu durum HSP-90’nın, tümör hücrelerindeki mitokondrilerde şaperon işlevinin inhibisyonuyla kanser tedavisinde kullanılması açısından nemlidir²⁴. HSP-90 inhibitörleri ile onkogenik sinyallerin bloke edilmesinin kolon kanser hücrelerinin metastatik davranışlarını azalttığı gsterilmiřtir²⁵. Kanser hresi davranışı, ECM’nin laminin ve kollajen I gibi proteinlerinden etkilenebilir ve bu da tümör hücrelerinin östrojen tepkisini etkileyebilir. Lamininler, bazal membranların yapısal bileşenleri ve hücre yaşışması, g, farklılaşması ve çoğalmasının dzenleyicileridir²⁶. Kollajen I, hücre dışı boşlukta bulunur ve çeşitli makromoleküllerin

yapışması için biyomekanik bir yüzey sağlar. Yeniden modellenabilir, Fizikokimyasal özellikleri nedeniyle, dinamik hücresel süreçleri incelemek için yararlı bir substrattır^{26,27}.

Tümör anjiyogenez normal fizyolojik anjiyogenezden farklıdır. Anjiyojenik faktörler ve anti-anjiyojenik faktörlerinin arasında denge, tümör dokusunun hızla büyüdüğü ortamda anjiyogenezin lehinde bozulur²⁸.

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 gösterilmiştir²⁸. Nakao ve ark. mide kanserinde TSP-1'in anjiyojenik etkisi olduğu belirtmişlerdir²⁹. Ling-fang ve ark. TSP'nin anjiyogenez ve hücre büyümesini yüksek oranda bastırarak inhibe ettiğini belirtmişlerdir³⁰.

72 kDa'lık MMP-2 ve 92 kDa'lık MMP-9 otokrin/parakrin şekilde VEGF salınımını uyurarak tümör hücrelerinin büyümesi ve anjiyogenezde anahtar rol oynadığı gösterilmiştir³¹. Çinko bağımlı bir grup MMP, çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlar tarafından düzenlenir. Kanga ve ark. tarafından, MMP-9 mide kanseri metastazında anahtar enzimlerden biri olarak gösterilmiştir³². MMP-2 mide kanserinin tümör invazyon ve metastazında önemli bir rol oynar³². Huacman ve ark., yaptıkları çalışmada MMP-2 ve MMP-9 un sadece mide kanserinin büyümesi değil aynı zamanda ekstrasellüler matriks parçalanması ve apoptosis inhibisyonu ile ilişkili olduğu belirtmişlerdir³¹.

Ayrıca MMP-2 ve MMP-9 ile VEGF arasında yüksek oranda ilişki bulunduğu ifade etmişlerdir³³.

Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), vaskülarizasyonun, hem fiziksel hem de malign koşullarında teşvik edilmesinde büyük bir rol oynamaktadır³⁴. VEGF tarafından indüklenen anjiyogenez, yenidoğanlarda patolojik önemli bir regülatördür³⁵. Yoriko ve ark. yaptıkları klinik uygulamalarda VEGF kötü doku ile ilişkilendirilmiştir³⁵. Anjiyogenez metastaz ve solid tümörlerin büyüme için gerekli en güçlü anjiyojenik faktörün VEGF olduğu ifade

edilmiştir³⁶. Mide, akciğer, meme, tiroit, böbrek, mesane, yumurtalık, rahim ve pankreas gibi kanserlerde VEGF miktarı oldukça yüksek bulunmuştur³⁵. Zhu ve ark., STAT3 yolunun anormal etkileşimi sonucu VEGF ve anjiyogenezin artmakta olduğunu belirtmişlerdir³⁶. STAT3, VEGF inhibisyonunda etkilidir ve tümör anjiyogenez üretimini engeller³⁷. Kikuchi ve ark.'ın yaptıkları çalışmada, bazı malign dokularda antikörlerle yapılan boyamalarda VEGF görülmüştür³⁴. VEGF, midede kanserli hücrelerin salınmasını ve büyümesini sağlayabilir, kanserin yayılmasını arttırabilir ancak bağırsakta az miktarda vardır ve etkisi küçüktür³⁴. VEGF-C ile gastrik dokuların patolojik evrelemesinin (metastaz ve infiltrasyon) ilişkili olduğu ifade edilmiştir³⁸. Yonging ve ark. yaptıkları çalışmada, VEGF, mide kanserli dokularda %81 olumlu artış göstermiştir³⁹.

Kollajen XVIII'in C-terminal bir parçası olan 20 kDa lık endostatin özellikle, anjiyogenez engelleyici etki göstermektedir. Endostatin ekstrasellüler matrikste tümör proteazlar tarafından üretilir⁴⁰. Kollajen XVIII, ekstrasellüler matriksler ve basamakları boyunca mevcuttur⁴⁰. Pufea ve ark. endostatinin VEGF'nin indüklediği neovaskülarizasyonu inhibe ettiğini belirtmişlerdir⁴¹. Patra ve ark. VEGF'nin bastırılması ve anti anjiyojenik pigmentlerin ifadesinde endostatinin önemini vurgulamışlardır⁴². Birkaç invitro ve invivo çalışmada endostatinin tümör büyüme ve metastazını engellediği görüldü. Öte yandan, Bazı yazarlar mide kanserli hastalarda VEGF ve endostatin düzeylerini değerlendirmişler, VEGF düzeyi kanser varlığında artarken endostatin ile mide kanseri arasında sonuç bulamamışlardır⁴¹. Çalışmamızda AAG+Laminin varlığında MMP ve VEGF seviyelerinin azaldığını, TSP-1 ve endostatin seviyelerinin ise istatistiksel olarak arttığını gözlemledik. Anti-anjiyojenik bir ajan olan TSP-1 in artması bize, VEGF ile TSP-1 in farklı mekanizmalar üzerinden etkili olabileceğini düşündürmektedir²⁸. 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 ispat eder niteliktedir⁴³. 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 anjiyojenez hızlandırır²⁸. Çalışmamızda LC-PCR ile bulmuş olduğumuz sonuçlar daha önce ELISA testi kullanarak yapmış olduğumuz çalışma analizleri ile de desteklemektedir⁴⁴.

SONUÇ

Laminin varlığında AAG'nin önemli anjiyojenez aktivatörlerinden olan VEGF ve MMP'nin azalmasına yol açtığı, kuvvetli bir anjiyojenez inhibitörü olan endostatinin ve TSP-1'nin seviyesini arttırdığını yaptığımız çalışma sonucunda belirledik. MMP, VEGF, TSP ve endostatin protein miktarlarındaki değişim laminin varlığında AAG'nin mide kanseri üzerinde ciddi anlamda tedavi etkisi gösteren bir ajan olduğunu bize göstermiştir. Daha öncede Elisa analizi uygulayarak yapmış olduğumuz çalışmanın LC-PCR analizleri ile aynı doğrultuda çıkmış olması sonuçlarımızı desteklemektedir. Bu bilgiler ışığında yapılacak daha kapsamlı çalışmalar sonucunda Laminin varlığında AAG'nin kanser hastalarının tedavisinde daha hızlı ve yan etkisiz bir yöntem olduğunu düşünmekteyiz.

Etik Onay:-

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemektedir.

Finansal Destek.-

Ethical Approval: -

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Support:-

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. 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.

3. 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
4. Inan S., Vatansver S., Celik-Ozenci C., Sancı 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.
5. 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 Caffeic Acid Phenethyl Ester. *Invest New Drugs.* 2012 Feb;30(1):186-90.
6. Güllü İ.H., Anjiyojenez ve Anti-anjiyojenik Tedaviler, 2002,5,9.
7. Doğrul A.B., Sıçanlarda %70 Hepatektomi sonrası Antiangiogenik Cevap ve Bunun Rejenerasyon ve Anjiyojenez ile İlişkisi, uzmanlık tezi, Hacettepe Üniv. Tıp Fakültesi, Ankara, 2008.
8. Parcellier A., Gurbuxani, S. Schmitt, E. Solary, E. Garrido, C. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003;304:505–512.
9. Vural K., Kosova F., Özdal Kurt F., Tuğlu İ. In vitro investigation of the effect of matrix öolecules onthe behaviour of colon cancer cells under the effect of geldanamycin derivative. *Tunor Biologu*, 2017;1-8
10. Rakic JM, Maillard C, Jost M, Bajou K, Masson V, Devy L, Lambert V, Foidart JM, Noël A (2003) Role of plasminogen activator-plasmin system in tumor angiogenesis, *Cell Mol. Life. Sci.* 60:463-473.
11. Rundhaug JE (2005) Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J. Cell Mol. Med.* 9:267-285.
12. İmren T., Kosova f., Özdal Kurt F., Ölmez E., Tuğlu İ., Arı Z., Kasar Z. Gastrik Kanser Hücre Hattına Uygulanan Kafeik Asit Fenetil Ester'in Biyomarkerleri Üzerine Etkileri. *Journal of Health Services and Education*, 2021;4(1):24-31.
13. Çolakoğulları M.,BCL-2 Proteinin apoptoz yolları üzerine etkisinin incelenmesi, Bursa, Uludağ Üniversitesi,2007
14. Gültekin N., Karaoğlu K.,Küçükates E. Hücrede apoptoz ve sağkalm mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri, *Türk Kardiyol Dern Arş*, 2008; 36:20-30.
15. Kosova F., Kasar Z., Tuğlu İ., Ozdal Kurt. F., Gok S., Ari Z., İmren T. Apoptosis of colon cancer cells under the effect of geldanamycin derivate. *Bratisl Med J.* 2017;118(5): 288-291.
16. Tisdale Mj. Cachexia in cancer patients, *Nat. Rev. Cancer*, 2002, 2; 862–71.
17. Wei Q, Kazimierz S, Kadiiska M. Mechanism of arsenic-induced cross tolerance to nickel cytotoxicity, genotoxicit and apoptosis in rat liver epithelial cells. *Toxicological Science* 2001; 63:189-195.
18. 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.
19. Martin, S. J., Reutlingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., & Green, D. R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidyserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, 1995; 182:1545– 1556.
20. Saleh H.A.,Jacks H. Correlation of bcl-2 Oncoprotein Immunohistochemical Expressionwith Proliferation Index and Histopathologic Parameters in Colorectal Neoplasia. *Pathology Oncology Research*,1999; 5: 4.

21. Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S.M., Kumar, V., Weichselbaum, R., Nalin, C., Alnemri, E.S., Kufe, D., Kharbanda, S., Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *The EMBO Journal*, 2000;19: 4310–4322.
22. Richardson P.G., Mitsiades C.S., Laubach J.P., Lonial S., Chanan-Khan A.A., Anderson KC. Inhibition of heat shock protein 90 (HSP90) as a therapeutic strategy for the treatment of myeloma and other cancers. *J Haematol*. 2011 Feb;152(4):67–79.
23. Shelton S.N., Shawgo M.E., Matthews S.B., Lu Y., Donnelly A.C., Szabla K., Tanol M., Vielhauer G.A., Rajewski R.A., Matts R.L., Blagg B.S., and Robertson J.D. KU135, a Novel Novobiocin-Derived C-Terminal Inhibitor of the 90-kDa Heat Shock Protein, Exerts Potent Antiproliferative Effects in Human Leukemic Cells. *Mol Pharmacol*, 2009;76:1314–1322.
24. Kang B.H., Plescia J., Dohi T., Rosa J., Doxsey S.J., Altieri D.C., Regulation of tumor cell mitochondrial homeostasis by an organellespecific hsp90 chaperone network. *Cell*, 2007;131:57–70.
25. Moser C., Lang S.A., Kainz S., Gaumann A., Fichtner-Feigl S., Koehl G.E., Schlitt H.J., Geissler E.K., Stoeltzing O. Blocking heat shock protein-90 inhibits the invasive properties and hepatic growth of human colon cancer cells and improves the efficacy of oxaliplatin in p53-deficient colon cancer tumors in vivo. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(11):68–78.
26. Kosova F, Kurt FO, Olmez E, Tuğlu I, Arı Z (2016) Effects of caffeic acid phenethyl ester on matrix molecules and angiogenic and anti-angiogenic factors in gastric cancer cells cultured on different substrates. *Biotech Histochem*. 91:38-47.
27. Cross VL, Zheng Y, Choi NW, Verbridge SS, Sutermaister BA, Bonassar LJ, Fischbach C, Stroock AD (2010) Dense type I collagen matrices that support cellular remodeling and microfabrication for studies of tumor angiogenesis and vasculogenesis in vitro. *Biomaterials* 31:8596-8607.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Kanga M H., Ohb SC, 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, NF-κB pathway, and MMP-9 expression, *Experimental Cell Reserch* 2011;317:1746–1762.
33. 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 .
34. 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.
35. Yoriko Y-K., Kaori F-O., Keigo Y., Mitsue K., Mieko Y., Hideyuki Y., Kazushige M., Biomarkers for antitumor activity of bevacizumab in gastric cancer models, *BMC Cancer* ,2012;12:37.
36. 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.
37. Jae-Ho Cheong , Sung Yi Hong, Yanjun Zheng, Sung Hoon Noh., Eupatilin Inhibits Gastric Cancer Cell Growth by Blocking STAT3-Mediated VEGF Expression *J.Gastric Cancer*, 2011;11:1:16-22.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. Patral D., Sandell L J., <http://www.expertreviews.org/>, 2012;3; 14:10.
43. Şencan M., Güneşçar R., Cevit Ö., Deveci D., The effect of aspirin on the blood levels of angiogenic vascular endothelial growth factor and anti-angiogenic endostatin levels , *C.Ü tıp fakültesi dergisi*, 2007;29(2):56-61.
44. T. Gürpınar, F. Kosova, F. O. Kurt, S. U. Cambaz, A. T. Yücel, N. Umur & M. I. Tuğlu, Effect of geldanamycin on the expression of the matrix molecules and angiogenic factors in a gastric cancer cell line, *Biotechnic & Histochemistry*, <https://doi.org/10.1080/10520295.2020.1772>