

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. İdris MEHMETOĞLU

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİNDE
MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR VE İNHİBİTÖRLERİ

Dr. Müfide Öncel

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Mehmet Aköz

KONYA
2009

1. GİRİŞ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. KANSERDE METASTAZ VE İNVAZYON	7
2.1. 1. Ekstra sellüler matriks invazyonu	9
2.1.1.1. Tümör hücrelerinin birbirinden ayrılması	10
2.1.1.2. Matriks komponentlerine tutunma	10
2.1.1.3. Ekstrasellüler matriks yıkımı	11
2.1.1.4. Tümör hücrelerinin göçü	12
2.1.2. Vasküler yayılım ve sekonder odağa yerleşim	13
2. 2. EKSTRASELLÜLER MATRİKS	14
2.3. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLARI	16
2. 3. 1. Matriks Metelloproteinazların Yapısı	18
2. 3. 1. 1. İnterstisyel kollajenaz (MMP -1, Fibroblast kollajenaz)	21
2.3.1.2. Nötrofil kollajenaz (MMP -8)	21
2.3.1.3. Kollajenaz 3 (MMP -13)	22
2.3.1.4. Jelatinaz A (MMP -2)	22
2.3.1.5. Jelatinaz B (MMP -9, 92kDa kollajenaz)	22
2.3.1.6. Stromelysin 1 (MMP -3, Transin)	22
2.3.1.7. Stromelysin 2 (MMP -10)	22
2.3.1.8. Stromelysin 3 (MMP -11)	22
2.3.1.9. Matrilysin (MMP -7, Putative matrix metalloproteinase1, PUMP 1)	23
2.3.1.10. Metalloelastaz (MMP -12)	23
2.3.2. Kanser gelişiminde MMP'lerin rolü	23
2.3.3. Rekürrens ve metastazlarda MMP'lerin rolü	24
2.4. METALLOPROTEİNAZ DOKU İNHİBİTÖRLERİ (TIMPs)	25
2.4.1. TIMP'lerin Yapısı	25
2.4.1.1. TIMP-1	25
2.4.1.2. TIMP-2	26
2.4.1.3. TIMP-3	26
2. 5. AKCİĞER KANSERİ	27
2.5.1. Epidemiyoloji	27
2.5.2. Histolojik tipler	28
2.5.2.1. Yassı hücreli karsinom (Squamöz karsinoma, Epidermoid Karsinom)	31
2.5.2.2. Adenokarsinoma	31

2.5.2.3. Küçük hücreli karsinoma	31
2.5.2.4. Büyük hücreli karsinoma	31
2.5.3. Akciğer Kanseri ve Matriks Metalloproteinazlar	32
3. MATERYAL METOD	33
3. 1. Çalışmanın planlanma aşaması	33
3. 2. Olgu Seçimi	33
3. 3. Örneklerin toplanması ve saklanması	33
3. 4. Biyokimyasal Analizler	34
3. 4. 1. Matriks Metalloproteinaz–2 (MMP–2) Düzeylerinin Ölçülmesi	34
3.4. 2. Matriks Metalloproteinaz–2 Doku İnhibitörü Düzeylerinin Ölçülmesi	36
3.4. 3. MMP–2/TIMP–2 Kompleks Düzeylerinin Ölçülmesi	38
3. 5. İstatistiksel analizler	40
4. BULGULAR	41
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	43
6. ÖZET	48
7. ABSTRACT	49
8. KAYNAKLAR	50

KISALTMALAR

AP-1: Aktive protein

BSA: Bovin Serum Albümini

EGF: Epidermal Growth Factor

ELISA: Enzim Linked Immuno Assay

EMMPRINE: Extracellular matrix metalloproteinase inducer

ESM: Ekstrasellüler Matriks

FN: Fibronektin

HRP: Horseradish peroksidase

IL-4: İnterlökin-4

IL-10: İnterlökin -10

IMP: Inhibitors of metalloproteinases

kDa: Kilo dalton

KHAK: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

KHDAK: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

MA: Molekül ağırlığı

MAPK: Mitojen activating protein kinase

MMP: Matrix Metalloproteinase

MT-MMP: Membrane type matrix metalloproteinase

PAI-1: Plazminojen aktivatör inhibitör-1

PBS: Fosfat Buffer saline

PDGF: platelet-derived growth factor

PG: Proteoglikan

RT-PCR :Reverse transcriptase –polimerase chain reaction

TGF- α : Transforming Growth Factor - α

TGF- β 1: Transforming Growth Factor - β 1

TIMP: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase

TNF- α : Tümör nekroz faktör – α

TNM: Tumor Node Metastasis

TMB: Tetramethylbenzidine

SBKSD: Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Dairesi

UPA: Ürokinaz tip plazminojen aktivatör

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VN: Vitronektin

WHO : World Health Organization

1. GİRİŞ

Her yaş grubunda oranı artmaya devam eden akciğer kanserinin ABD’de erkeklerde prostat kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci sıklıkta görüldüğü ve her iki cinsiyette de kansere bağlı ölümlerin başında yer aldığı bilinmektedir. Ülkemizde ise 1997 yılında Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Dairesi’nin yayınladığı raporda, akciğer kanserinin, tüm kanserler içinde %17,6 oranıyla birinci sırayı aldığı saptanmıştır. Akciğer kanseri her yıl yeni kanser olgularının %15’ini tüm kanserden ölümlerin %18’ini oluşturmaktadır (1).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)’nın 1997’deki sınıflamasına göre akciğer kanseri histolojik olarak küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere iki tiptedir (2). KHDAK de skuamöz (epidermoid) karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinomu içeren geniş bir gruptur (3). Diğer tüm maligniteler gibi akciğer kanserine bağlı ölüm nedenlerinin başında da metastaz gelmektedir (4).

Ekstrasellüler matriks (ESM), proteinleri ve proteoglikanları içeren, organizmalara sadece yapısal destek sağlamakla kalmayıp aynı zamanda hücre proliferasyonu, farklılaşması ve migrasyonu ile yapışma, doku morfogenezisi gibi pekçok biyolojik aktivitede etkisi olan karmaşık ve dinamik bir oluşumdur. Kanserde ESM tümör dokusunun büyümesi ve tümör hücresinin yayılımını önlemek için primer bir bariyer olarak görev yapar. Malign tümörler bu bariyeri aşmak için metalloproteinazları kullanırlar (5–8).

Kanserin invazyon ve metastaz yapması için ekstrasellüler matriksin yıkılması gereklidir. Matriks metalloproteinazlar (MMP), yaklaşık 28 enzimden oluşan, fizyolojik ve patolojik doku yıkımında önemli rol oynayan ekstrasellüler proteazlardır. Matriks metalloproteinazlar, lökositler keratinositler, fibroblastlar, makrofajlar, kondrositler, düz

kas hücreleri gibi epitelyal ve mezenkimal kökenli hücreler tarafından sentezlenirler. Kanser dışında artrit, inflamasyon, multipl skleroz, kronik yaralar, kronik akciğer hasarı, bronşiyal astım, pulmoner hipertansiyon MMP'lerin rol aldığı başlıca hastalıklardır (2). Malign dokularda en fazla belirlenen, tümör saldırganlığı ve metastatik potansiyelle ilişkili olduğu saptanan matriks metalloproteinazlar MMP-9 (jelatinaz B) ve MMP-2 (jelatinaz A) 'dir (9,10).

MMP aktivitesinin kontrolünde spesifik doku inhibitörleri olan TIMP'ler (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase) anahtar rol oynarlar. Bundan başka α 2-makroglobulin, heparin, tetrasiklinler ve sentetik inhibitörler de aktif MMP inhibitörleri arasında yer alırlar (11). İnsanlarda TIMP-1, TIMP -2, TIMP -3 ve TIMP -4 olmak üzere bugüne dek tanımlanmış 4 TIMP türü bulunmaktadır (12,13). TIMP'ler MMP aktivitesini inhibe etme yönünden benzerlik göstermekle beraber matriksteki lokalizasyonları ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi yönünden aralarında farklar vardır. Ayrıca değişik MMP türlerine göre de özgüllük gösterirler. Örneğin; Jelatinaz A (MMP-2) tercihen TIMP-2 ile Jelatinaz B (MMP-9) ise TIMP-1 ile inhibe edilir. Son yıllarda peptid ve non-peptid yapıda sentetik MMP inhibitörleri de üretilmiştir (14-19). Bu inhibitörler en çok kanser tedavisinde olmak üzere kardiyovasküler hastalıklar, artrit psöriyazis, periodontal hastalık ve makula dejenerasyonu gibi farklı hastalıkların tedavisinde denenmiştir (18,19,20).

Matriks metalloproteinazlar ve matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri birçok kanserde olduğu gibi akciğer kanserinde de teşhis, prognoz ve tedavi açısından araştırılmıştır. Biz bu çalışmada serum MMP-2, TIMP-2, MMP-2*TIMP-2 kompleksi düzeylerini belirleyerek; bu parametrelerle küçük hücreli dışı akciğer kanseri arasında nasıl bir ilişki olduğunu ve ilişki varsa bu ilişkinin hangi parametre için daha kuvvetli olduğunu ortaya koymayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KANSERDE METASTAZ VE İNVAZYON

İnvazyon ve metastaz kansere bağlı morbidite ve mortalitenin en önemli nedenidir. Kanser tanısı konan hastaların %30'unda tanı anında kritik olarak belirtilen bir metastaz bulunur, geriye kalan hastalar da henüz klinik bir belirti vermemiş gizli metastazlara sahiptirler (21). Metastaz oluşturma potansiyeli primer tümör gelişiminin erken evrelerinde başlayıp, zamanla artış gösterir. Hatta oluşan metastazlar da primer tümör gibi davranıp metastaz oluşturma potansiyeline sahip olabilirler. Metastatik potansiyel, tümörün lokal çevresi ve özellikle de sahip olduğu moleküler fenotipe bağlı olarak değişkenlik gösterir. Ayrıca, aynı tümöre sahip farklı hastalar arasında, hatta primer tümörle onun metastazı arasında bile değişkenlik izlenebilir (21).

Metastaz, normal hücreden başlayıp tam anlamıyla malign karaktere sahip bir hücreyle sonlanan tümör progresyonun son aşamasıdır. Fakat heterojen yapıdaki tümörün, sadece uygun kombinasyonlarda özellikler taşıyan hücreleri tüm basamakları geçerek metastaz yapmayı başarabilirler (21,22,23).

Malign tümör metastazları ile ilgili olarak iki teori öne sürülmüştür (24). Bunlar;

1. Ewing'in Mekanik Teorisi: Tümör metastazları tamamen metastaz görülen organın hemodinamiği ve vasküler anatomik yapısına bağlıdır. Yani, tümör hücreleri mekanik olarak kan damarlarını ve özellikle de kapillerleri tıkararak organa yerleşir ve çoğalmaya başlar.

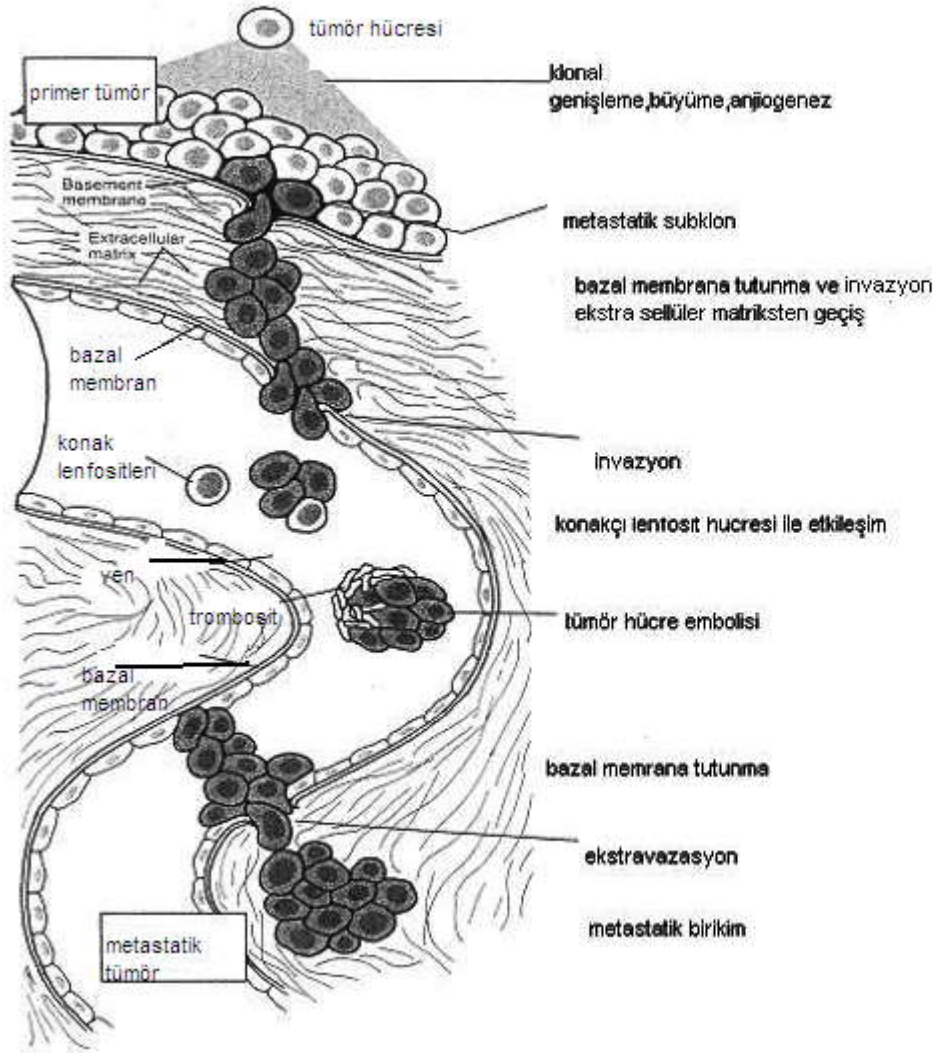
2. Paget'in Soil and Seed (Toprak ve Tohum)Teorisi: Metastazların oluşması tamamen organın yapısal özelliğine bağlıdır. Yani tümör hücresi eğer bulunduğu organda beslenmesine ve bölünüp çoğalmasına uygun bir ortam bulmuşsa bu organda yerleşir, yani metastaz yapar (24).

Tümör hücrelerinin kan dolaşımına ulaşması metastazın oluşması için gerekli fakat yeterli değildir. Hiç metastaz görülmeyen birçok kanser hastasında dolaşımda tümör

hücrelerine rastlamak mümkündür. Bu klinik gözlem deneylerle de ispat edilmiş olup dolaşımdaki malign hücrelerin metastaz yapma olasılığı %0.05'ten az olarak bulunmuştur (25). Kontrol edilemeyen hücre bölünmesi neoplazik büyüme olarak adlandırılır ancak bu neoplazinin malign kabul edilmesi için bölünen hücrelerin etrafa invazyon göstermesi ve metastaz yapması şarttır (24).

Metastatik kaskad şekil 1’de gösterildiği gibi iki ana fazda incelenebilir :

- Ekstrasellüler matriksin invazyonu,
- Vasküler yayılım ve sekonder odağa yerleşim

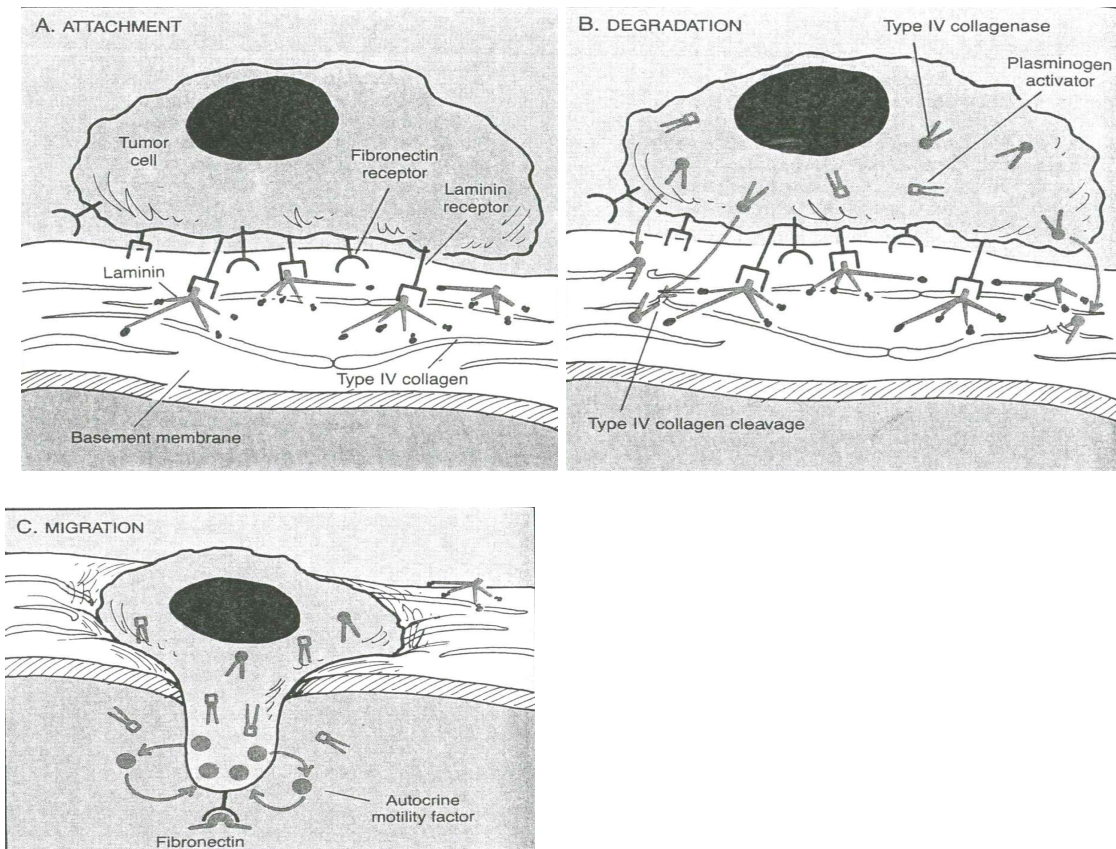


Şekil 1. Metastatik kaskad (23)

2.1. 1. Ekstra sellüler matriks invazyonu

Ekstra sellüler matriks, bazal membran ve interstisyel bağ dokusu olmak üzere iki farklı yapıdan oluşmaktadır. Ekstra sellüler matriks invazyonu kendi içinde dört basamakta gerçekleşir; 1-Tümör hücrelerinin birbirinden ayrılması, 2-Matriks komponentlerine tutunma, 3-Ekstra sellüler matriksin yıkımı ve tümörün büyümesi, 4-Tümör hücrelerinin göçü (21,23).

Metastatik kaskadın başlangıcında, tümör hücreleri öncelikle epitelyal bazal membranı deler ve ardından interstisyel bağ dokusuna ulaşır. Daha sonra vasküler bazal membrandan geçip dolaşıma katılır. Aynı olayın tersi sekonder odakdaki ekstrasvazasyon sırasında da oluşur. (Şekil-2)



Şekil-2. Epitelyal bazal membranın tümör hücreleri tarafından invazyonu. A- Tümör hücresinin bazal mambrana yerleşmesi. B- Bazal membranın parçalanması. C-Tümör hücresinin göçü.

2.1.1.1. Tümör hücrelerinin birbirinden ayrılması

Tümör hücreleri önce hareket etmeyen ve ana kitleden ayrılabilmek için yapışma özelliğini kaybeden hücrelere döner ve daha sonra hareket edebilen ve yapışabilen hücre özelliğini tekrar kazanır (24).

Normal hücreler adhezyon molekülleri aracılığı ile birbirine ve çevre dokuya sıkıca tutunmuşlardır. Hücre –hücre bağlanmasında "kaderin "adı verilen transmembran, Ca^{+2} bağımlı glikoproteinlerin önemli rolleri vardır. Epitelyal kadherinler (E-kaderin), epitelyal birleşme bölgelerinde lokalizedir ve epitelyal organizasyon, devamlılık ve morfogenezden sorumludur. E-kaderinler plazma membranı altında bulunan ve "katenin" adı verilen protein ailesi aracılığıyla hücre iskeletine bağlanırlar. Kateninler, kaderinlerin fonksiyon görebilmesi için kesinlikle gerekli moleküllerdir. Birçok epitelyal tümörde E-kaderin ekspresyonunun tümörün invaziv ve metastatik davranışıyla ters korelasyon gösterdiği izlenmiştir. E-kaderinin azalmasıyla hücrelerin birbirine yapışma özelliği azalır ve hücreler primer tümörden kolaylıkla ayrılabilirler (21,23, 26, 227).

2.1.1.2.Matriks komponentlerine tutunma

Tümör hücrelerinin kendilerini çevreleyen ekstrasellüler matrikse penetre olabilmeleri için öncelikle matriks komponentlerine tutunmaları gereklidir.

Laminin, bazal membranın majör glikoprotein komponentlerinden biridir ve tümör hücrelerinin laminin reseptörleri aracılığı ile bazal membrana tutunmaları invazyon ve metastazda önemli bir yer tutar. Normal epitelyum hücreleri de laminin reseptörlerini ekprese ederler, fakat bu reseptörler yüksek bir afinite ile bazal membrandaki laminine bağlandıkları için hücrenin bazal membran yüzeyinde yoğunlaşmışlardır.

Tümör hücrelerinde ise reseptör sayısı artmakla beraber reseptörler hücrenin her tarafına dağılmışlardır. Meme, kolon, prostat, akciğer, over gibi birçok kanser türünde

laminin reseptörlerinin yoğunluğu ile invaziflik arasında korelasyon bulunmuştur (21,23,28,29,30).

İntegrinler, tümör hücrelerinin matrikse tutunmasında önem taşıyan bir başka reseptör grubudur. Tümör hücreleri integrinler aracılığı ile fibonektin, vitronektin, laminin, kollajen, trombospondin, von Willebrand faktör gibi çeşitli ekstrasellüler matriks komponentlerine bağlanabilirler. İntegrinler α ve β transmembran subünitelerinden oluşan heterodimer yapılardır. 16 α ve 8 β subünitesi, farklı spesifik ligandlara bağlanan, 20 farklı integrini oluşturmak üzere heterodimerize olurlar. İntegrinler, tümör progresyonu, invazyon ve metastazın birçok basamağında rol almaktadır ve malignitelerle olan ilişkileri oldukça karmaşıktır. Farklı türde tümörlerde, farklı tür integrinlerin ekspresyonu ve fonksiyonu değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle, integrinlerle ilgili yapılan çalışmaların bir kısmı metastazla pozitif korelasyonu, bir kısmı da negatif korelasyonu desteklemektedir (21,23,31,32,33).

2.1.1.3.Ekstrasellüler matriks yıkımı

Tümör hücreleri bazal membrana ve interstisyel ekstrasellüler matrikse bağlandıktan sonra migrasyon için kendilerine yol açmak zorundadırlar. Bu basamakta hızla büyüyen tümörün mekanik bası etkisi ile beraber, daha baskın olarak, etkili olan mekanizma, matriks bileşenlerinin enzimatik yıkımıdır. Proteolitik enzimler, ya tümör hücresinin kendisi tarafından, ya da tümör hücrelerinin indüksiyonu sonucunda konakçı dokunun stromal fibroblastları ve tümörü infiltre eden immün hücreleri tarafından sentezlenir. Bu proteazların aktivitesi antiproteazlar tarafından sıkıca düzenlenir. Tümörün invazyon yapan ucunda ve hemen komşuluğundaki dokuda proteazlar ile antiproteazlar arasındaki denge proteazlar lehine kaymaktadır (21,23).

Matriks yıkımında ilk aşılması gereken bariyer bazal membrandır. Bazal membran tip IV kollajen, laminin ve fibronektin gibi glikoproteinler ve proteoglikanlardan oluşan bir ağ yapısındadır. Tümör hücreleri normalde bu ağ yapısının porlarından geçemezler. Bu yüzden membranın hasara uğraması gerekmektedir. Bazal membran yıkılımında en önemli hedef tüm diğer bazal membran bileşenlerine bağlı olarak iskelet işlevi gören tip IV kollajendir. Bu yüzden, invazyon ve metastazda matriks yıkımıyla ilgili yapılan çalışmalar çoğunlukla tip IV kollajen yıkımı üzerine yoğunlaşmıştır. Matriks metalloproteinazları bu basamakta oldukça büyük önem taşırlar (23).

2.1.1.4. Tümör hücrelerinin göçü

İnvazyonun en son basamağı tümör hücrelerinin yıkıma uğramış bazal membran boyunca ve proteolize uğramış matriks içinde ilerlemesidir. Hücre göçünde önem taşıyan moleküller iki kategoriye ayrılmaktadır: Birinci grup, tümör hücresinden köken alan motilite faktörleri; ikinci grup ise parçalanmış matriks bileşenleridir.

Birinci grupta birçok otokrin motilite faktörü ve timozin $\beta 15$ yer almaktadır. "Ototaksin" ilk izole edilen otokrin motilite faktörüdür. Bu motilite faktörü tümör hücrelerini primer tümörden uzaklaşmaları için uyarmaktadır. Bunun dışında, trombositten türeyen büyüme faktörü, hepatosit büyüme faktörü, scatter faktör, insülin benzeri büyüme faktörü ve epidermal büyüme faktörü de bu grup içinde yer almaktadır (23,34,35,36,37). Timozin $\beta 15$, normal prostat epiteli ve benign prostat hiperplazisinde eksprese olmazken, prostat kanserli hücrelerde artmaktadır. Bunun da metastatik potansiyelle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Timozin $\beta 15$ meme kanseri ve akciğer kanserinde de metastatik potansiyelle ilgili bulunmuştur (38,39,40).

Matriks yıkımının en önemli etkisi tümör hücreleri için bir geçiş yolu açmış olmasıdır. Matriks bileşenlerinin yıkılım ürünlerinin başka etkileri de (büyümeyi,

anjyogenezi ve kemotaktik aktiviteyi arttırmak, vb.) söz konusudur. Özellikle tip I kollajen, tip IV kollajen, laminin, fibronektin ve proteoglikanlar gibi matriks bileşenlerinin yıkılım ürünleri, tümör hücrelerini bütünlüğü bozulmuş matriks bölgesine doğru hareket ettiren moleküllerdir. Bir başka bakış açısıyla; matriks metalloproteinazlar, bu ürünlerin oluşumunu arttırarak, tümör hücrelerinin motilitesine bunun sonucunda da invazyon ve metastaza indirek olarak katkıda bulunmaktadır (21).

2.1.2. Vasküler yayılım ve sekonder odağa yerleşim

Tümör hücreleri, dolaşıma girdikten sonra doğal ve adaptif immun defans sonucu hasar görmeye oldukça yatkındırlar. Özellikle "natural killer" hücreler tümörün hematojen yayılımının kontrolünde önem taşırlar.

Dolaşımda bulunan tümör hücre sayısının fazlalığı klinik olarak metastazın belirlenmesinde bir anlam taşımaktadır. Çünkü dolaşıma geçen birçok tümör hücresi ikincil odağa ulaşmadan uzaklaştırılır. Öncelikle dolaşıma geçen tümör hücreleri birbirlerine ve trombositlere yapışarak agregatlar oluştururlar. Bu agregatlar tümör hücrelerini mekanik travmalardan korur ve dolaşımda kalmalarını kolaylaştırır. Ayrıca konak immünitesine karşı da korur. Dolaşımdaki tümör hücreleri uzak metastaz yapacakları dokuya geldiklerinde adhezyon molekülleri aracılığı ile buradaki endotele tutunurlar. Bu adhezyon mekanizmasında CD44 molekülü özel bir önem taşımaktadır. CD44 normalde T hücreleri üzerinde eksprese edilmektedir ve bu hücrelerin lenfoid dokudaki özel bölgelere yerleşmelerinde rol alır. Metastazda ise CD44 tümör hücrelerinin endotel hücrelerine adhezyonunda ve transendotelial migrasyonda rol alır. Metastatik potansiyeli yüksek olan tümörlerde CD44 molekülünün ekspresyonunun artmış olduğu görülmüş, bunun da bu molekülün ekstravasküler yayımda önem taşıdığını ortaya koyduğu bildirilmiştir (41).

Dolaşımdaki tümör hücrelerinin ikincil odağı oluşturmak üzere kapillerleri terk etmesinde anatomik yapının etkisi vardır. Tümör hücreleri kan akımına geçtikten sonra damar dışına çıkma için en uygun olan ilk organı seçerler (21).

Sonuçta tümör, ikincil odağa yerleştikten sonra olaylar primer tümörün gelişimindekine benzer şekilde tekrar gelişir. Hatta bu ikincil odaklar, potansiyel yeni metastaz kaynakları oluştururlar. İkincil odak seçiminde anatomik yapı dışında etkili olabilen başka mekanizmalar da bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, ikincil odaktaki endotel hücreleri tümör tarafından eksprese edilen adhezyon moleküllerinin ligandlarının artmış ekspresyonuna sahip olabilir. Ya da, ikincil odak tarafından tümör hücrelerini kendine doğru çeken moleküller salgılıyor olabilir. Sonuçta tümör, ikincil odağa yerleştikten sonra olaylar primer tümörün gelişimindekine benzer şekilde tekrar gelişir. Hatta bu ikincil odaklar, potansiyel yeni metastaz kaynaklarını oluştururlar (21).

2.2. EKSTRASELLÜLER MATRİKS

Tümör hücrelerinin invazyon sırasında penetre olduğu ve parçaladığı ekstrasellüler matriks (ESM) bileşenleri yapı, yerleşim ve fonksiyon yönüyle iki ana gruba ayrılabilir. Şekil 4’de ekstrasellüler matriks yapısı özetlenmiştir.

1-Bazal membran

2- İnterstisyel bağ dokusu

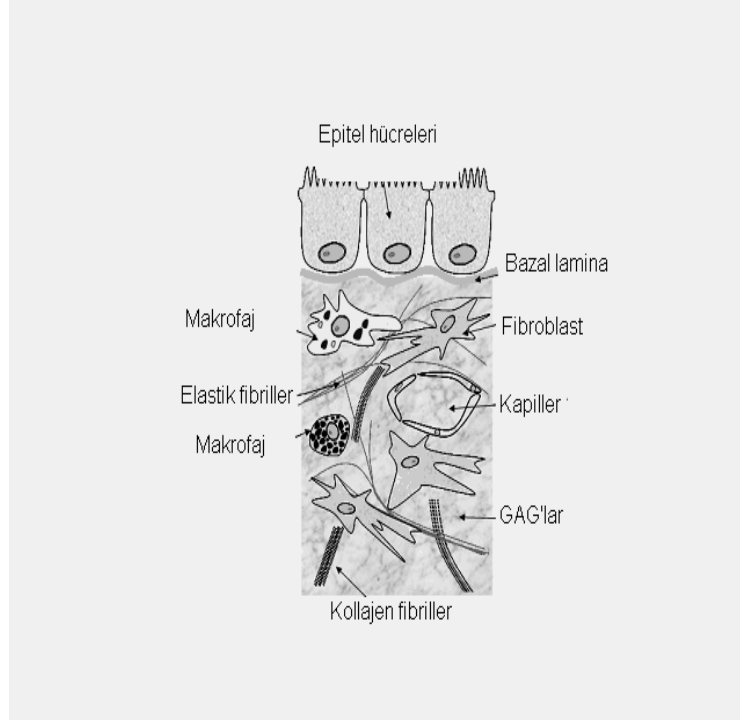
Bazal membranlar, hücresel olmayan tek tip yapı özelliği gösterirken, interstisyel bağ doku kollajen fibrillerden, glikoprotein ve proteoglikanlardan oluşan bir matrikse yerleşmiş durumdadır ve doku tipine göre fibroblast, osteoblast, kondrosit ve makrofaj gibi hücreleri içerir. Bazal membranlar, epitelyum ve endotel hücrelerini interstisyel bağ dokudan ayıran ve pratik olarak vücudun her yerinde bulunan ince ekstrasellüler yapılardır. Doku mimarisinin sürekliliğinden sorumludurlar. Bazal

membranlar matrikse çapraz bağ formunda tip IV dışında Tip I' den tip XIII'e kadar sınıflandırılmış kollajenler, fibronektin, elastin, osteonektin, kondroitin sülfat, heparin ve hiyalüronik asidi içerir. İnterstisyel bağ dokusu vücutta mekanik destek fonksiyonu görür (42).

Hücre yüzeyi ve ESM'nin proteolitik modifikasyonunun hem fizyolojik (trofoblast implantasyonu, embriyo morfogenez, meme ve uterus involusyonu, yara iyileşmesi, dokuların yeniden yapılanması, anjiyogenez vb.) hem patolojik (artritler, iyileşmeyen yaralar, aort anevrizması, konjestif kalp yetmezliğin vb.) (43) hem de neoplastik invazyonun ana bileşeni olduğuna inanılır (23). Hem subendotelyal bazal membran hem de interstisyel bağ doku matriksi tümör hücrelerinin doku parankimine invazyonuna engel olabilmektedir. Bu nedenle matriks moleküllerinin parçalanması invaziv ve metastatik prosesin önemli bir aşamasıdır. Tümör hücreleri malign potansiyel kazandıkça ESM yavaş yavaş parçalanmaya başlar ve tümör hücreleri arasındaki bağlantılar azalır. Ekstrasellüler matriksin enzimatik parçalanması sürdükçe göç halindeki tümör hücreleri doku engellerini aşar ve böylece invazyon başlamış olur (42).

Ekstrasellüler matriksin parçalanması, sınırlı bir mikro çevrede sürdüğü için fizyolojik olaylarda proteolitik parçalanmanın bazı proteinaz aktivasyon ve inhibisyon mekanizmalarıyla kontrol edilmesi gerekir. Malignansilerde bu hassas kontrol, dengenin katabolizma artışına yönelmesiyle bozulmaktadır. Malign transformasyonda genellikle hem tümör dokusunun hem de tümör kültür hücrelerinin proteinaz aktivitesi yükselmektedir. Bir invazyon bölgesinde, tümör hücrelerinin pseudopodlarından hücre çevresindeki boşluğa proteolitik enzimler salındığı, aynı zamanda da çevre konakçı hücrelerinin de proteolitik enzim salgıladığı bilinmektedir. Böylece bazı proteinazların yükselmiş aktiviteleri tümör invazyonunun moleküler mekanizmalarının anlaşılabilmesini sağlayacaktır. Bilindiği kadarıyla proteinazların düzenlenmesi; hücre içi enzimlerin sentez

ve sekresyonlarının düzenlenmesi, hücre dışı latent enzimlerin aktivasyonu ve proteinaz inhibitörleri gibi faktörlerle kontrol edilip düzenlenmektedir (42).



Şekil 4. Ekstrasellüler matriks (www.steve.gb.com / extracellular matrix.)

2.3. MATRİKS METALLOPROTEİNAZLARI

Ekstrasellüler matriks (ESM) yıkımı pek çok fizyolojik ve patolojik durumun önemli bir özelliğidir. ESM ve bazal memebran yıkımı dört grup enzim tarafından gerçekleştirilir:

- 1- Sistein proteazlar
- 2- Aspartik proteazlar
- 3- Serin proteazlar
- 4- Metalloproteazlar.

Bütün gruptaki proteolitik enzimler tümör invazyonu ve metastaz süreçlerinde görev alabilirler; ancak yapılan çalışmalarda en çok serin proteazlardan matriks

metalloproteinazın invazyon ve metastaz süreçlerinde daha aktif rol oynayabilecekleri ortaya konmuştur (44).

Matriks metalloproteinazlar (MMP), çinko içeren nötral endopeptidaz enzim ailesi olup, ESM'nin tüm elemanlarını yıkma özelliğine sahiptirler. MMP'ler fetal gelişim, postnatal doku tamiri gibi fizyolojik durumlarda "ESM yeniden yapılanması "de önemli bir rol üstlenirler. Periodontit, derinin otoimmün olayları, dermal foto-yaşlanma, romatoid artrit, osteoartrit ve kronik ülserasyonlar gibi patolojik durumlarda da ESM'nin MMP'ler tarafından artmış yıkımı söz konusudur ve serum MMP seviyelerinde artışa yol açan en önemli hastalıklardan biri de kanserlerdir (45,46,47,48,49).

MMP'ler ilk defa 1962 yılında Jerome Gross ve Charles Lapiere tarafından tanımlanmıştır (50). Yapılarına ve substrat özgüllüklerine göre 5 alt grupta incelenebilirler:

- 1-Kollajenazlar
- 2- Jelatinazlar
- 3- Stromelisinler
- 4-Membran tipi MMP'ler (MT-MMP)
- 5-Sınıflandırılmayan MMP'ler (45)

Bu sınıflama ile ilgili bilgiler Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. MMP enzimlerinin substrat özgüllüğüne göre sınıflandırılması (14)

Grup adı	Tanımlayıcı isim	Numara	Temel substrat
Kollajenazlar	İnterstisyel kollajenaz	MMP-1	Kollajen Tip 1, 2, 3, 7 ve 10, jelatin, PG
	Nötrofil kollajenaz	MMP-8	Kollajen Tip 1, 2, 3, PG
	Kollajenaz 3	MMP-13	Kollajen Tip 1, 2, 3
	Kollajenaz-4	MMP-18	Kollajen I
Jelatinazlar	Jelatinaz A	MMP-2	Jelatin, kollajen IV, V, VII; X, XI, elastin
	Jelatinaz B	MMP-9	Jelatin, kollajen IV, V, XIV, elastin, PG
Stromelisinler	Stromelisin 1	MMP-3	PG, laminin, FN, jelatin, kollajen III, IV, IX ve X
	Stromelisin 2	MMP-10	PG, laminin, FN, jelatin, kollajen III, IV, IX ve X
	Stromelisin 3	MMP-11	PG, laminin, elastin, entaktin, tenaskin, versikan, jelatin, kollajen III, IV, IX, X
Membran tipi MMP'ler (MT-MMP'ler)	MT1-MMP	MMP-14	Kollajen I, II, III, FN, laminin, VN
	MT2-MMP	MMP-15	Agrekan, FN, laminin, tenaskin
	MT3-MMP	MMP-16	Kollajen III, FN, jelatin
	MT4-MMP	MMP-17	Jelatin
	MT5-MMP	MMP-24	PG
	MT6-MMP	MMP-25	Kollajen IV, fibrin, FN, jelatin
Diğerleri	Matrilisin 1	MMP-7	Serin proteaz inhibitörleri
	Metaloelastaz	MMP-12	Kollajen I, IV, elastin, FN, jelatin, laminin, VN
	RASI-1	MMP-19	Kollajen IV, entaktin, FN, jelatin, laminin, tenaskin
	Enamelisin	MMP-20	Agrekan, amelogenin
	X-MMP	MMP-21	Tanımlanmamıştır
	CA-MMP	MMP-23	Tanımlanmamıştır
	Matrilisin 2	MMP-26	Kollajen IV, FN, jelatin, VN
	CMMP (Horoz)	MMP-27	Tanımlanmamıştır
	Epilisin	MMP-28	Tanımlanmamıştır

PG: Proteoglikan, FN: Fibronektin, VN: Vitronektin.

2.3.1. Matriks Metelloproteinazların Yapısı

Yapısal olarak incelendiğinde MMP'ler 5 ana kısımdan oluşur ve bu kısımlar şekil 5'te gösterilmeye çalışılmıştır (45).

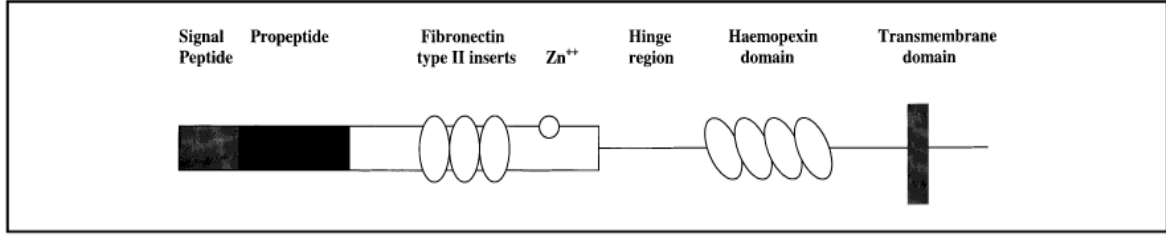
1-Sinyal peptit,

2-Propeptid

3-Zn bağlayıcı bölge içeren katalizör kısım (Fibronectin type II inserts Zn^{++})

4-Hemopeksin benzeri kısım (Haemopexin domain) (substrat spesifitesini belirler),

5-Katalizör kısmı hemopeksin benzeri kısma bağlayan prolinden zengin bölge (Hinge Region) (45).

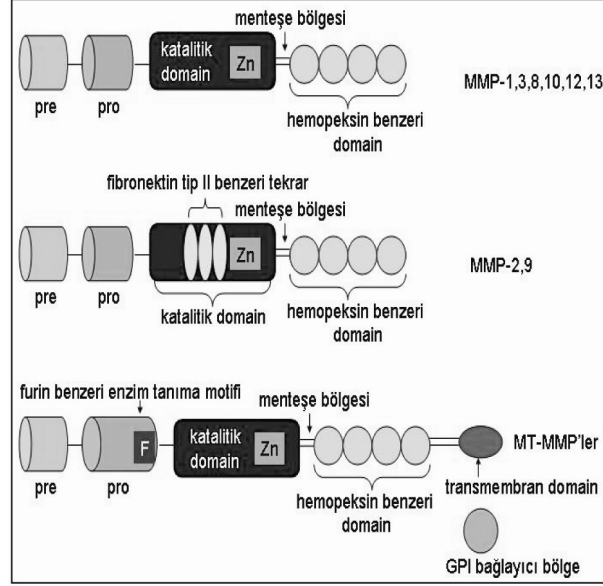


Şekil 5. MMP'lerin genel yapısı (45)

MMP'ler çeşitli yapısal ortak özelliklere sahiptirler. MMP'lerin tümü tipik olarak N- terminalinde enzimin lider dizilimi olan pre-domen içerir. Bu lider dizilim enzimin salgılanması sonrası kaybolur. İkinci bölge olan pro-domen enzimin latent formda kalmasından sorumludur ve enzim aktivasyonunu takiben kaybolur. Bir sonraki kısım Zn^{++} bağlayan bölgeyi içeren katalitik domaindir. Katalitik bölge ek olarak yapısal bir çinko iyonu ve 2–3 Ca^{++} iyonu içerir. Bu bölge stabilite ve enzimatik aktivitenin oluşması için gereklidir. MMP–7 ve MMP–26 dışındaki diğer MMP'ler C terminalinde hemopeksin/fibronektin benzeri bölge içerirler. Bu bölge aslında "hem" bağlayan bir peptiddir ve endojen doku inhibitörleri olan TIMP'lerin jelatinaz grubu MMP'lere (MMP–2, MMP–9) ve MMP-13'e bağlanması ile ilişkilidir (14).

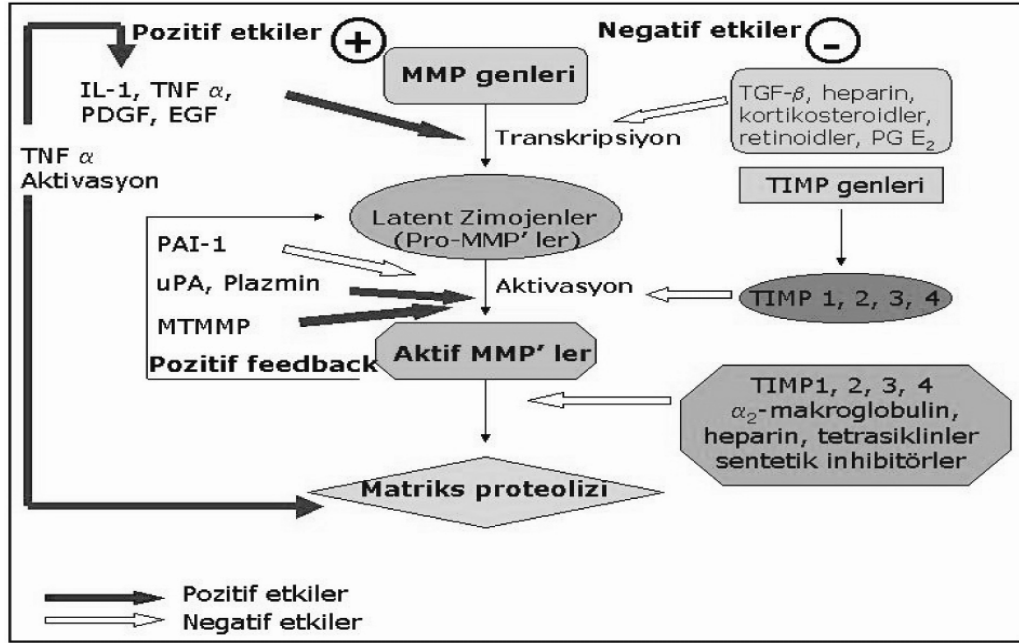
Şekil. 6'da görüldüğü gibi; katalitik bölge hemopeksin benzeri bölgeye bağlayan peptit prolinden zengin olup, menteşe bölgesi adını alır. MMP–7 ve MMP-26'da hemopeksin benzeri bölge ve menteşe bölgesi bulunmaz. Jelatinaz enzimleri katalitik bölümünde 3 adet fibronektin Tip II benzeri ilave bir bölge bulundururlar. Bu kısım jelatinazların jelâtin ve kollajene yüksek afinite ile bağlanmalarını sağlar. Böylece proteolitik aktivitelerini artırır ve elastolitik aktivite için de temeldir. Bu yapısal özelliklere ek olarak MT-MMP'ler MMP–11, MMP- 23, MMP–28 pro-domen ile katalitik bölge arasında yer alan ve enzimin hücre içi furin benzeri proteazlar tarafından tanınmasını sağlayan "furin benzeri enzim tanıma motifi " içerirler. MT-MMP'ler salgılanma öncesi bu motifi tanıyan proteazlar ile aktive edilirler. Ayrıca MT-MMP'lerden bazıları (MT1-MMP,

MT2-MMP, MT3-MMP ve MT5-MMP) şekil 6'da görüldüğü gibi C terminalinde transmembran domain içerirken bazıları da (MT4-MMP ve MT6-MMP) glikozil fosfatidilinositol (GPI) bağlayıcı bölge içerir (23).



Şekil 6. MMP enzimlerinin moleküler yapısı (14)

MMP fonksiyonları, şekil. 7'de görüldüğü gibi hem gen aktivasyonu hem de protein aktivasyonu aşamalarında düzenlenir. MMP'lerin transkripsiyonel regülasyonu, proksimal protomer bölgelerinde yer alan AP-1 düzenleyici eleman ile sağlanır. MMP gen transkripsiyonu ekstrasellüler yerleşimli pek çok madde ile uyarılabilir; örneğin stokinler (IL-4 ve IL-10), büyüme faktörleri (EGF, TGF- α , TGF- β 1, TNF- α , "basic fibroblast growth factor ") hücre - hücre etkileşimleri ve hücre- matriks etkileşimleri gibi. Bu aktivatörlerin reseptörlere bağlanması ile en az 3 değişik sınıf mitojen aktive edilmiş protein kinazlar (MAPK) tarafından sağlanan intrasellüler olaylar zinciri ile hücre AP-1 cis elemanına bağlanarak MMP geninin transkripsiyonunu sağlar (7, 45, 48).



Şekil 7. MMP enzim aktivitesinin düzenlenmesi (14)

2.3.1.1. İnterstisyel kollajenaz (MMP- 1, Fibroblast kollajenaz):

MMP ailesinin prototipik üyesidir, 1962 de ilk kez kurbağa yavrusunun kuyruk kısmının çözünmesini sağlayan bir proteaz olarak tanımlanmıştır. Latent formu 55 kDa ağırlığında, aktif formu 43 kDa ağırlığındadır. TipI, TipII, TipIII interstisyel kollajeni sindirir. İnterstisyel kollajenler bazal membranda bulunan Tip IV kollajenden ve perisellüler olarak bulunan TipV kollajenden farklıdır. MMP-1 ayrıca tip V, tip II ve tip X kollajenin yıkılmasında rol oynar (5).

2.3.1.2. Nötrofil kollajenaz (MMP -8):

75 kDa büyüklüğünde proenzimdir ve aktif formu 58 kDa büyüklüğündedir. Tip I, tip II, tip III interstisyel kollajeni yıkar, nötrofillerce üretilir ve diğer interstisyel kollajenazdan farklı bir genden derive edilir. Nötrofil kollajenazda, fibroblast kollajenazda bulunmayan altı glikozilasyon sahası vardır ve bu nedenle nötrofil kollajenaz artmış glikozilasyondan sorumludur (5).

2.3.1.3. Kollajenaz 3 (MMP -13):

Tip I kollajeni yıkar. Proenzim 60 kDa ağırlığında aktif formu 48 kDa ağırlığındadır (5).

2.3.1.4. Jelatinaz A (MMP- 2):

Latent formu 72 kDa, aktif formu 66 kDa ağırlığındadır. Tip IV kollajeni, jelâtini, ek olarak tip V, tip VII, tip X, kollajeni, elastin ve fibronektini, laminini parçalar (5).

2.3.1.5. Jelatinaz B (MMP -9, 92kDa kollajenaz):

Jelâtin ve tip IV bazal membran kollajeni için substrat spesifiktir. Latent formu 92 kDa, aktif formu 84 kDa ağırlığındadır. Diğer substratları tip I, tip III, tip V kollajen, elastin ve fibronektindir (5).

2.3.1.6. Stromelisin 1 (MMP- 3, Transin):

Latent formu 57 kDa, aktif formu 46 kDa ağırlığındadır. Substratı; proteoglikanlar, laminin, fibronektin, tip III, tip IV, tip V, tip IX kollajen ve jelâtinlerdir. Stromelysin üretimi fibroblast ve kondrositlerde growth faktörler, sitokinler ve tümör promoterleri ile indüklenir (5).

2.3.1.7. Stromelisin 2 (MMP -10):

Latent formu 57 kDa, aktif formu 46 kDa ağırlığındadır. Substratı fibronektin, Jelâtinler, tip III, tip IV ve tip V kollajendir. Transin 2 olarak da bilinen ve insan tümörlerinden kopyalanan bu molekülün, aminoasit dizilimi, büyüklüğü ve substrat spesifitesi stromelysin 1 ile benzer özellikler taşımakla birlikte, aralarında gen ayrılığı vardır (5).

2.3.1.8. Stromelisin 3 (MMP -11):

Stromelysin 1 ve stromelysin 2 ile aminoasit dizin benzerliği vardır ve α 1-proteaz inhibitörleridir. İnsanlarda görülen stromal hücre kaynaklı çeşitli kanser dokularında

varlığı onaylanmış, ancak epitelyal hücre ile ilişkili kanserlerde saptanamamıştır. Ek olarak uterus, plasenta ve insan embriyosunda bulunur (5).

2.3.1.9. Matrilisin (MMP -7, Putative matrix metalloproteinase 1; PUMP 1):

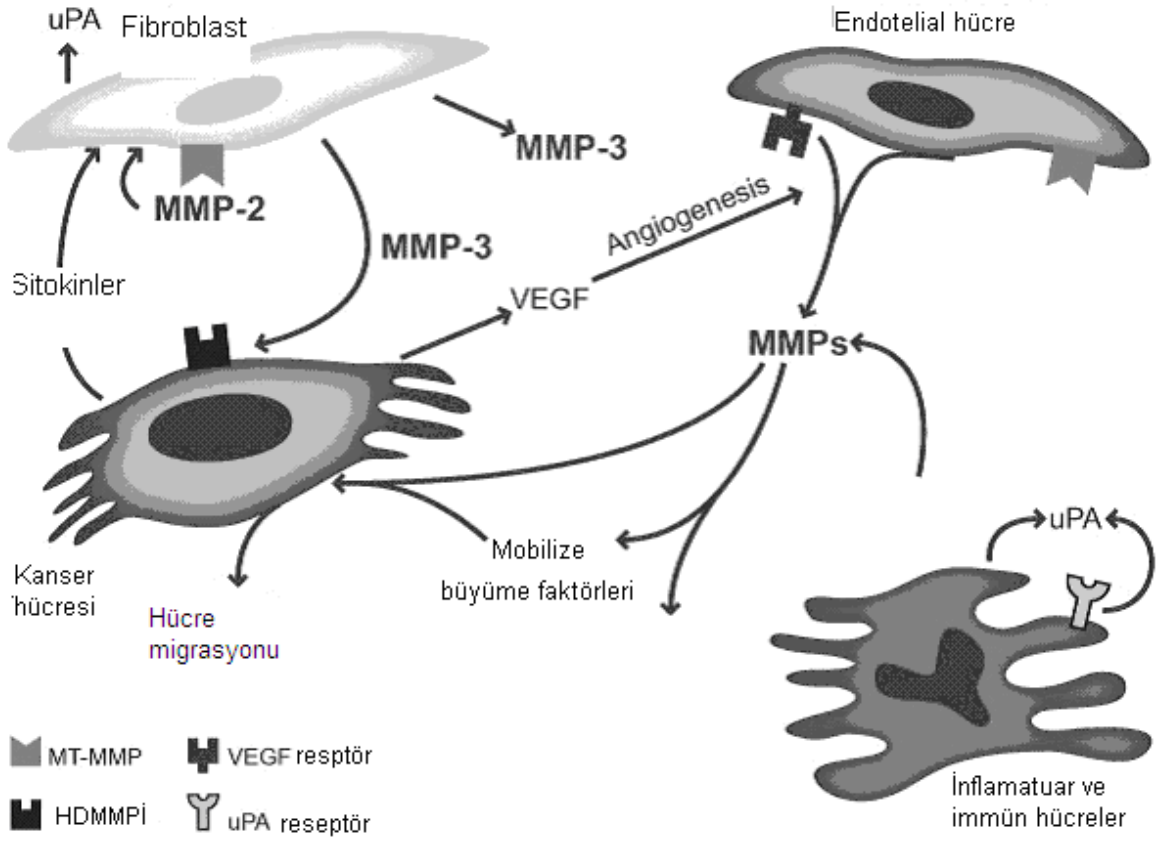
Ek metalloproteinaz olarak da bilinen bu molekülün latent formu 28 kDa, aktif formu 19 kDa ağırlığındadır. Metalloproteinaz ailesinde stromelysinlerin bir alt grubu olarak bilinir; jelâtin, elastin, fibronektin, laminin ve entaktini parçalama özelliği nedeni ile stromelisinlere benzer geniş substrat spesifisitesi gösterir (5).

2.3.1.10. Metalloelastaz (MMP-12):

Elastin, fibronektin ve kazeini parçalar. Murin makrofajlarından klonlanır (5).

2.3.2. Kanser gelişiminde MMP'lerin rolü

MMP düzeyi ve klinikopatolojik ilişki konusunda pek çok çalışma yapılmış ve bu çalışmalar sonucunda MMP düzeyi ve tümör grade ve agresifliği arasında ve MMP ekspresyonu ve aktivitesi ile rekürrens ve metastaz riski arasında bağlantı olduğu gösterilmiştir. Tümör invazyonu; hücre ve ekstrasellüler matriks arasındaki etkileşim ile ilgili multisept bir süreçtir. Şekil 8'de görüldüğü gibi invazyon sırasında malign hücre primer tümörden ayrılarak bazal membran ve stromal ekstrasellüler matrikse doğru invaze olur. İnvaziv primer tümör veya metastazında MMP'lerin artmış ekspresyonu bildirilmiştir (49). Çoğu malign tümörde stromal fibroblastlar MMP'lerin primer kaynağıdır. Birçok tümörde belirgin bir özellik olan inflamatuvar hücre infiltrasyonu da MMP üretimine neden olur. İnvaziv hücreler aynı zamanda tümör hücreleri ve stromal hücrelerde MMP'leri arttıran sitokinleri de üretirler. Tümör hücreleri ise fibroblastlar tarafından MMP üretimini arttıran faktörleri üretirler (50).



Şekil 8. Kanser hücresi, stromal hücreler ve MMP'ler arasındaki ilişki (www.abcam.co.jp/index.)

2.3.3.Rekürrens ve metastazlarda MMP'lerin rolü

Birçok kanserde MMP'ler tümör rekürrensini belirleyen marker olarak kullanılabilirler. Yüksek preoperatif serum MMP-2 düzeyi ile ileri evre ürotelyal karsinomda rekürrens arasında korelasyon gösterilmiştir. Benzer olarak ovaryan karsinomda tümör hücresindeki MMP-2 düzeyi ile tümör rekürrensi arasında ilişki bulunmuştur (51).

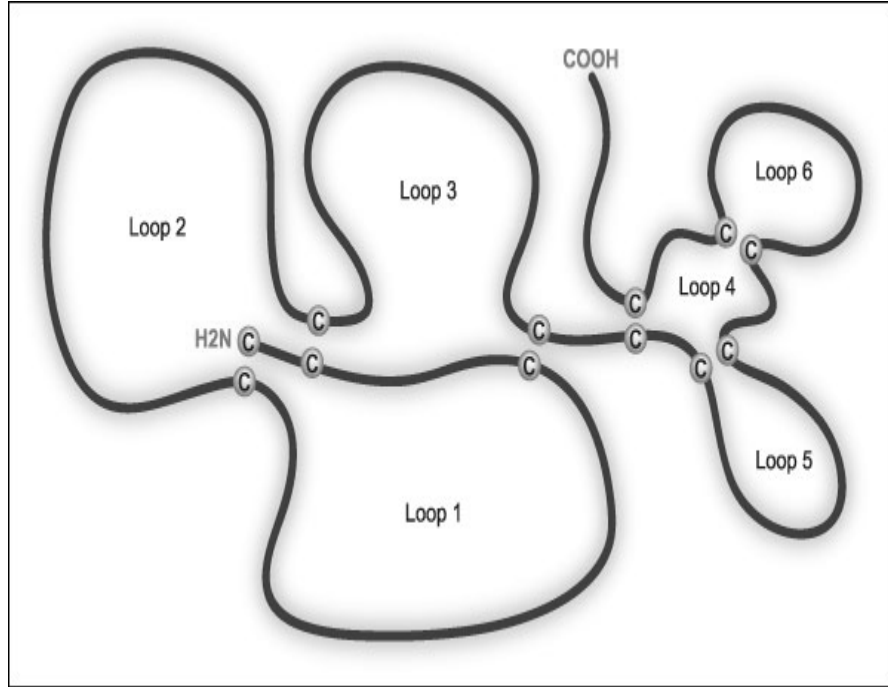
2.4. METALLOPROTEİNAZ DOKU İNHİBİTÖRLERİ (TIMPs)

MMP'lerin proteolitik aktiviteleri hem non spesifik (α -2 makroglobilin, α -1 antiproteaz gibi) hem de spesifik inhibitörler (doku metalloproteinaz inhibitörleri –TIMPs) ile engellenebilir (45,52). TIMP'ler bağ dokusu metabolizmasının düzenlenmesinde temel olan proteinlerdir. Pek çok dokuda ve vücut sıvılarında bulunurlar. MMP'lere irreversibl ve non-kovalent biçimde bağlanarak latent enzim formunun aktivasyonunu ve katalitik aktivitenin sürdürülmesini de inhibe ederler. Böylece TIMP'ler MMP enzim aktivitesini ve MMP/TIMP dengesini sıkı kontrol altında tutarlar. İnsanlarda TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4 olmak üzere bugüne dek tanımlanmış 4 TIMP türü bulunmaktadır. TIMP'ler de MMP'ler gibi vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, kan hücreleri, bağ dokusu hücreleri ve makrofajlar tarafından sentez edilirler. TIMP'ler MMP aktivitesini inhibe etme yönünden benzerlik göstermekle beraber matriksteki lokalizasyonları ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi yönünden aralarında farklar vardır. Ayrıca değişik MMP türlerine göre de özgüllük gösterirler. Örneğin; Jelatinaz A (MMP-2) tercihen TIMP-2 ile Jelatinaz B (MMP-9) ise TIMP-1 ile inhibe edilirler (14).

2.4.1. TIMP'lerin Yapısı

2.4.1.1. TIMP-1: Primer gen ürünü, X kromozomu üzerinde tanımlanmıştır, 20 kDa ağırlığında proteindir ve yapısında konformasyonel mobilitayı sağlayan altı adet disülfid bağı vardır. TIMP-1'in şematik yapısı şekil 9'da gösterilmiştir. Glikozilasyon ile aktive olur. Aktif formu 28 kDa ağırlığında bir siyaloglikoproteindir. Özellikle makrofajlar olmak üzere pekçok hücrede üretilir ve salgılanır, trombositlerde rezidü olarak bulunur ve

çeşitli dokular ile amnion sıvısı, sinovyal sıvı gibi vücut sıvılarında yer alır. TIMP1 spesifik olarak metalloproteinazlara karşı aktivite gösterir, diğer metalloendopeptidazlar üzerine inhibitör etkisi yoktur. TIMP-1 MMP'nin aktif formuna yüksek afinite ile nonkovalant bağlarla, bire bir oranında, irreversibl olarak bağlanır. Bu oranda küçük bir değişiklik olduğunda sonuç MMP aktivitesi lehinedir. Ek olarak jelatinaz B'nin proformuna bağlanabilir ve MMP-9 ile ilişkili olarak salgılanır TIMP-1'in eritrosit üretimini arttırıcı etkisi vardır. Ayrıca hücre yüzey reseptörlerine bağlanması ile ortaya çıkan direkt sellüler etkisi ile çeşitli hücre tiplerinde replikasyonu uyarır (5).



Şekil 10. TIMP-1'in şematik yapısı (www.abcam.co.jp/index.)

2.4.1.2. TIMP-2: 21 kDa ağırlığında glikozile olmamış bir proteindir. TIMP-1 ile homolog özellik gösteren 12 sistein rezidüsü vardır. TIMP-2, TIMP-1'den farklı bir şekilde regüle edilir, forbol esterleri ile üretimi uyarılmaz, TGF- β ile inhibe olmaz. TIMP-2'nin kan beyin bariyerinin proteolitik sızıntısını azalttığı saptanmıştır. Dağılımı iyi bilinmemekle birlikte eklem kıkırdaklarından izole edilmiştir. TIMP-1 ve TIMP-2 nin %40

oranında aminoasit dizin benzerliği vardır. Aktive olmuş MMP'lere bağlanma yönünden TIMP-1 ile benzerdir, ek olarak MMP-2'nin proformu ile birebir kompleks yapar (5).

2.4.1.3. TIMP-3: 21 kDa ağırlığında nonglikozile MMP inhibitörüdür. TIMP-1 ve TIMP-2 den farklı olmakla birlikte, yapısal olarak benzerliği vardır. TIMP-3 ekstrasellüler matriksten transforme olmuş hücrelerin ayrılmasını kolaylaştırır ve morfolojik değişiklikleri başlatır. Son zamanlarda insan glioma hücrelerinin kültür ortamında üç yeni MMP inhibitörü daha tanımlanmıştır. Bunlar da; IMP-1 (MA:22 kDa), IMP-2 (MA:19 kDa), IMP-3 (MA:16.5 kDa) olarak adlandırılmıştır (5).

2. 5. AKCİĞER KANSERİ

2.5.1. Epidemiyoloji

Akciğer kanseri, yirminci yüzyılın başlarında ender olmasına karşın günümüzde sıklığı artan önemli bir sağlık problemidir. Genel ölüm nedenleri arasında kalp hastalıklarından sonra ikinci sırayı alan akciğer kanseri, kanser ölümlerinin %28'ini oluşturmaktadır. Akciğer kanseriyle ilgili epidemiyolojik çalışmalar ilk kez kırklı yıllarda Amerika ve Avrupa ülkelerinde yapılmıştır. Ellili yılların başlarında gerek sitogenetik gerekse olgu-kontrol çalışmalarıyla akciğer kanserinde etyoloji belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmaların ışığında akciğer kanserinde en başta gelen nedenin sigara içiciliği olduğu kesinlik kazanmıştır. Akciğer kanseri, insidansı yaşla artan bir hastalık olup, en sık 50-70 yaşlarında görölmektedir (%95). Akciğer kanseri hem dünyada hem de ülkemizde kansere bağlı ölümlerde kadınlarda ve erkeklerde birinci sırada yer almaktadır (57).

Amerika Birleşik Devletleri'nde 1994 yılında toplam 170 000 yeni akciğer kanseri olgusu saptanmış olup, bunun 100 000'i erkek, 70 000'i kadındır. Aynı yıl içinde 153 000 akciğer kanseri ölümü görölmüştür. Son 15 yıl içinde Amerika Birleşik Devletleri'nde akciğer kanseri insidansı, %51, mortalitesi ise %57 artış göstermiştir. Aynı dönemde

kadınlarda ölüm hızı %144 artmıştır. Beş yıllık sağkalım süresi %10-13'tür. Ülkemizde akciğer kanseri, yetmişli yıllarda nedeni bilinen ölümler arasında dördüncü sıradayken, günümüzde kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sıraya yükselmiştir. Sağlık Bakanlığı Kanseri Savaş Dairesi'nin (SBKSD) 1997 yılında yayımlanan raporunda, akciğer kanserleri 1994 yılında tüm kanserler içinde %17.6 oranıyla birinci sırada yer almaktaydı. Türkiye'de 1994 yılında genel kanser insidansı SBKSD raporuna göre 33.1/100 000'dir. Akciğer kanseri insidansı Türkiye genelinde 5.9/100 000'dir. Olguların çoğunda sigara öyküsü olması ve sigara içme oranlarında artış nedeniyle Türkiye'de akciğer kanseri epidemisi yaşandığını söylemek gerçekçi bir yaklaşımdır(53).

2.5.2. Histolojik tipler

Akciğer kanseri, bronş epitel, salgı hücreleri, nöroendokrin hücreler ve alveollerin tip I, tipII pnömositleri gibi birçok hücreye farklılaşabilen epitelyal kök hücrelerden gelişmektedir. Bölünme yeteneği olan hücreler hiperplastik veya neoplastik değişiklikler gösterebilirler (54). Klinik ve tedavi açısından, primer akciğer kanserleri, küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (55).

Son WHO sınıflamasında akciğer ve plevranın tümör ve tümör benzeri lezyonlarını 8 ayrı ana başlık altında sınıflamaktadır (Tablo 2).

Tablo 2. Akciğer ve plevra tümörlerinin histolojik klasifikasyonu WHO 1999. (56)

1. Epitelial Tümörler
a. Benign
b. Preinvaziv
c. Malign
2. Yumşak Doku Tümörleri
3. Mezotelyal Tümörler
4. Çeşitli Tümörler
5. Lenfoproliferatif Hastalıklar
6. Sekonder Tümörler
7. Sınıflandırılmayan Tümörler
8. Tümör Benzeri Lezyonlar

Bu sınıflamada akciğerin ensık görülen tümörleri olan akciğer kanserleri malign epitelyal tümör başlığı altında yer almaktadır (Tablo 3). Bu başlık altında 9 ayrı alt başlık ve çok sayıda farklılık bulunmakla birlikte tedavi için en temel nokta küçük hücreli karsinoma ile küçük hücreli dışı karsinomanın birbirinden ayrılmasıdır. Dolayısıyla tümör dokusunun kısıtlı olduğu ve spesifik bir diferansiasyonun görülmediği durumlarda "küçük hücreli dışı karsinoma"tanısı güvenilir ve klinik açıdan yararlı bir tanı olacaktır. Akciğer kanserinin en sık görülen tipleri yassı hücreli karsinom, adenokarsinom, küçük hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinomdur (56).

Tablo 3. Akciğer ve plevra tümörlerinin histolojik klasifikasyonu WHO 1999:Epitelyal Malign Tümörler (56)

1. Yassı Hücreli Karsinoma

Varyantlar

- a. Papiller
- b. Şeffaf (berrak hücreli)
- c. Küçük Hücreli
- d. Bazaloid

2. Küçük Hücreli Karsinoma

Varyant

Kombine Küçük Hücreli Karsinom

3. Adeno Karsinoma

- a. Asiner
- b. Papiller
- c. Bronkoalveolar karsinom
 - a. müsinöz
 - b. Non- müsinöz
- c. Karışık Müsinöz non-müsinöz ya da hücre tipi belirlenemeyen
- d. Müsin bulunduran solid adenokarsinoma
- e. Mikst adenokarsinoma
- f. Varyantlar
 - a. İyi diferansiye fetal adenokarsinoma
 - b. Müsinöz kolloid adenokarsinoma
 - c. Müsinöz kistadenokarsinoma
 - d. Taşlı yüzük hücreli adeno karsinoma
 - e. Şeffaf (berrak) hücreli adenokarsinoma

4. Büyük Hücreli Karsinoma

Varyantlar

- a. Büyük hücreli nöroendokrin karsinoma
 - a. Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinoma
- b. Bazaloid karsinom
- c. Lenfoepitelyoma benzeri karsinom
- d. Şeffaf(berrak) hücreli karsinoma
- e. Rabdoid fenotipli büyük hücreli karsinoma

5. Adenoskuamöz Karsinoma

6. Pleomorfik, sarkomatoid ya da sarkomatöz elemanlar içeren karsinomalar

- a. İğsi ve/veya dev hücreli karsinomlar
 - a. Pleomorfik karsinoma
 - b. İğsi hücreli karsinoma
 - c. Dev hücreli karsinoma
- b. Karsinosarkoma
- c. Pulmoner blastoma
- d. Diğerleri

7. Karsinoid tümör

- a. Tipik karsinoid
- b. Atipik karsinoid

8. Tükrük bezi tipi karsinomalar

- a. Mukoepidermoid karsinoma
- b. Adenoid kistik karsinoma
- c. Diğerleri

9. Sınıflandırılmayan karsinoma

2.5.2.1. Yassı hücreli karsinom (Squamöz karsinoma, Epidermoid Karsinom)

Pek çok ülkede yassı hücreli kanser en sık görülen kanser türüdür. Amerika Birleşik devletleri'nde bütün akciğer kanserlerinin yaklaşık % 30 kadarını oluşturur. Ancak son yıllarda bazı serilerde insidansının değiştiği ve ilk sıradaki yerini adenokarsinomaya bırakmaya başladığı izlenmektedir (56).

2.5.2.2. Adenokarsinoma

Adenokarsinoma insidansı giderek artmakta ve bazı ülkelerde akciğer kanserinin yarısını oluşturmaktadır. Pulmoner adenokarsinomların çoğu periferiktir ve lokal semptomlar nisbeten geç gelişir. Bu yüzden önemli bir kısmı tesadüfen ortaya çıkar ya da metastazlara bağlı semptomlarla tanı alır (56).

2.5.2.3. Küçük hücreli karsinoma

Küçük hücreli karsinoma, nöroendokrin özellikler gösteren endodermal kök hücrelerinden kaynaklandığı düşünülen, Avrupa ve ABD'de, tüm akciğer kanserlerinin % 25'inden fazlasını oluşturduğu bilinmekle birlikte uzakdoğudaki insidansının daha düşük olduğu bilinmektedir. Erkek kadın oranının da yaklaşık 4/1 olduğu ve sigara içimi ile kuvvetli bir ilişkisinin olduğu bilinmektedir (56).

2.5.2.4. Büyük hücreli karsinoma

Büyük hücreli karsinom ancak diğer tanıları dışlayarak ulaşılabilecek bir tanıdır. Bir akciğer kanseri küçük hücreli karsinoma özelliklerini göstermiyorsa, glandüler ve squamöz yönde diferansiasyon da saptanmıyorsa büyük hücreli karsinoma olarak değerlendirilir. Bu karsinomlarda erkek kadın oranı ise 4/1, 5/1 kadardır ve bunlar daha çok periferik yerleşimli tümörlerdir (56).

2.5.3. AKCİĞER KANSERİ VE MATRİKS METELLOPROTEİNAZLAR

Matriks metalloproteinazlar ve matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri birçok kanserde olduğu gibi akciğer kanserinde de teşhis, prognoz ve tedavi ile ilişkilidir (5,9,10).

Akciğer kanserinde ileri evrelerde, yeni geliştirilen kemoterapetik ilaçlara rağmen tedavide yaşam süresinin uzatılmasına ve şifaya yönelik büyük adımların halen atılamaması, akciğer kanseri tedavisinde bilim adamlarını kemoterapide yeni tedavi arayışlarına yöneltmektedir. Bu yeni kemoterapetik arayışlar arasında ekstrasellüler matriks yıkımını engelleyen metalloproteinaz inhibitörleri de yer almaktadır (81).

3. MATERİYAL METOD

3.1. Çalışmanın Planlama Aşaması

Çalışmamız, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Komisyonu tarafından 30 Mayıs 2008 tarih ve 2008/23 numaralı kararı ile tez projesi olarak onaylandı. Daha sonra 08102020 numarası ile Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinatörlüğü tarafından desteklenmesine karar verildikten sonra çalışmaya başlandı.

3.2. Olgu Seçimi

Bu çalışmaya Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi kliniği ile Konya Numune Hastanesi Göğüs Cerrahisi Kliniğine müracaat eden; anamnez, klinik muayene, radyolojik, bronkoskobik ve patolojik inceleme sonucu küçük hücreli dışı akciğer kanseri tanısı konmuş 28 hasta ile 21 sağlıklı kişi dahil edildi. Hastaların yaş ortalaması 53,75, kontrol grubunun yaş ortalaması 51, 19'du. Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylere projenin amacı ve kapsamını açıklayıcı bilgiler verildi ve kendilerinden yazılı aydınlatılmış onam belgesi alındı.

3.3. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Bronkoskopi sonuçları KHDAA olan hastalardan ve sağlıklı bireylerden 8 saatlik açlığı takiben sabah venöz kan örnekleri herhangi bir koruyucu ve antikoagülan madde içermeyen tüplere alındı. Bu kan örnekleri 4000 rpm'de 5 dk santrüfuj edilerek serumları ayrıldı ve analiz süresine kadar -60 °C' de çalışma gününe kadar saklandı.

3.4. Biyokimyasal Analizler

3.4.1. Matriks Metalloproteinaz–2 Düzeylerinin Ölçümü

Bu parametrenin ölçülmesi Quantikine human MMP–2 kiti (R&D Systems, USA&Canada, Cat No; DMP200) kullanılarak sandviç tip ELISA yöntemi ile gerçekleştirildi. Yöntemin çalışma içi % CV değerleri 5.94 ng/ml 17.4 ng/ml ve 35.5 ng/ml konsantrasyonlarda sırasıyla %5.7, %3.4 ve %5.3 şeklindedir. Çalışmalar arası % CV değerleri ise 5.29 ng/ml, 16.4 ng/ml ve 33.7 ng/ml konsantrasyonlarda sırasıyla %8.2, %7.4 ve %7.4 olarak belirlenmiştir. Yöntemin saptayabildiği en düşük MMP–2 konsantrasyonu ise 0.16ng/ml dir.

Prensip

Bu ölçüm tekniğinde sandviç ELISA metodu baz alınmaktadır. Serum örneği daha önceden MMP–2 antikorları ile kaplanmış kuyucuklara pipetlenir ve inkübe edilir. Bu inkübasyon sırasında serum örneği içindeki MMP-2'nin kuyucuklardaki anti MMP–2 antikorlarına bağlanması sağlanır. Kuyucuktaki diğer moleküller yıkama işlemi ile uzaklaştırılır. Her kuyucuktaki antikor miktarı TMB substratı eklenerek belirlenir. Oluşan renkli çözeltinin absobansı 450 nm dalga boyunda okunur. Standart eğrisi kullanılarak MMP–2 konsantrasyonları hesaplanır.

Reaktiflerin Hazırlanması

1. Yıkama solüsyonu: Kit içindeki 20 ml yıkama solüsyonu 480 ml deiyonize su ile dilüe edildi.

2. Substrat solüsyonu: Renk reaktifi A ve B kiti kulanımdan 15 dakika öncesinde eşit hacimlerde karıştırıldı.

3. MMP–2 standardı: 100 ng/ vial standart 1 ml deiyonize su ile dilüe edilerek stok standart çözeltisi hazırlandı. Seri standart örneklerini hazırlamak için 7 adet tüp alındı

ve 1'den 7'ye kadar numaralandı. Her tüpe 200µl kalibratör dilüent RD5–32 pipetlendi. Hazırlanan stok kalibratör solüsyonundan 200 µl ilk tüpe eklendi. Bu tüpten 2. tüpe 200 µl eklendi ve bu şekilde son tüpe kadar dilüsyonlar yapıldı. Elde edilen standart konsantrasyonları şu şekildeydi: 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12.5 ng/ml, 6.25 ng/ml, 3.12ng/ml, 1.56ng/ml, 0,78 ng/ml.

Çalışma Prosedürü

1. Her kuyucuğa ölçüm dilüenti RD1-74'ten 100 µl koyuldu.
2. Daha önce hazırladığımız standart ve kalibrator diluent RD–32 ile 10 kez dilüe edilen serumlar 50'şer µl antikor kaplı kuyucuklara pipetlendi. Plate parafilm ile kaplandı ve oda sıcaklığında 500 rpm'de çalışan çalkalayıcıda 2 saat enkübe edildi.
3. İnkübasyondan sonra kuyucukların içeriği boşaltıldı ve 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
4. Her kuyucuğa 200 µl MMP–2 karışımı eklendi. Üzeri tekrar parafilmle kaplandı ve oda sıcaklığında çalkalayıcıda iki saat inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrası kuyucukların içeriği boşaltıldı ve 3 kez yıkandı.
6. Tüm kuyucuklara 200 µl substrat solüsyonu eklendi. Işıktan korunarak oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.
7. Tüm kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklendi.
8. Oluşan renk 30 dk içinde 450 nm dalga boyunda okundu.
9. Çalıştığımız standart absorbanslarından elde ettiğimiz standart eğrisinden yararlanılarak MMP–2 konsantrasyonları **ng/ml** cinsinden belirlendi.

3.4.2. Metalloproteinaz Doku İnhibitörü -2 (TIMP-2) Düzeylerinin Ölçümü

Bu parametre de human TIMP-2 kiti (RayBio, USA, Cat no; ELH-TIMP-001) kullanılarak ELISA yöntemi ile belirlendi. Yöntemin çalışma içi % CV değerleri <%10 çalışmaları arası % CV değerleri ise <%12 olarak belirlenmiştir. Saptayabildiği en düşük TIMP-2 konsantrasyonu ise 10 pg/ml dir.

Prensip

Bu ölçüm de sandviç ELISA metodunu baz almaktadır. Serum örnekleri daha önceden anti TIMP-2 antikorları ile kaplanmış kuyucuklara inkübe edilir. Serum örneği içinde bulunan TIMP-2 molekülleri kuyucuklardaki antikorlara bağlanır, diğer bileşenler aspirasyon ve yıkama işlemi ile uzaklaştırılır. Kuyucuklara biyotinize TIMP-2 antikorları eklenir. Yıkanmadan sonra bağlanmayan biyotinize antikorlar uzaklaştırılır ve HRP-streptavidin konjugatı eklenir. Kuyucukta bulunan TIMP-2 konsantrasyonuna bağlı olarak renk değişimi meydana gelir. Kuyucuklara stop solüsyonu eklenir oluşan renk 450 nm dalga boyunda okunur. Standart eğrisinden faydalanılarak serum örneği içinde bulunan TIMP-2 konsantrasyonu hesaplanır.

Reaktiflerin Hazırlanması

1. TIMP-2 Standardı: Kit içindeki standartta 200 µl dilüent A eklenerek standart solüsyonu elde edildi. Hazırlanan standardın 40 µl'sine 626,7 µl dilüent A eklendi. Böylece 6000 pg/ml stok standart solüsyonu hazırlandı. Seri standart örneklerini hazırlamak için 7 adet tüp alındı ve 1'den 7'ye kadar numaralandı. Her tüpe 400 µl dilüent A'dan koyuldu. Stok standart solüsyonundan 200 µl alınarak birinci tüpe eklendi. Her biri aynı şekilde dilüe edilerek son tübe kadar dilüsyon işlemine devam edildi. Bu standartların

konsantrasyonları şu şekildeydi: 2000 pg/ml, 666.7 pg/ml, 222.2 pg/ml, 74.07 pg/ml, 24.69 pg/ml, 8.23 pg/ml, 0 pg/ml (dilüent A).

2. Yıkama tamponu: 20 ml yıkama solüsyonu 400 ml deiyonize su ile dilüe edildi.

3. TIMP–2 antikoru: TIMP–2 antikor şişesine 100 µl 5 kez dilüe edilmiş dilüent B eklendi, böylece konsantre antikor solüsyonu elde edildi. Bu konsantre antikor solüsyonu yine dilüent B ile 80 kez dilüe edildi.

4. HRP-Streptavidin: HRP-Streptavidin, dilüent B ile 25 000 kez dilüe edildi. Bunun için 2 µl konsantre HRP-Streptavidin solüsyonu bir tüpe alındı. 198 µl dilüent B ile dilüe edildi. Böylece 100 kez dilüe edilmiş bir HRP-Streptavidin elde edilmiş oldu. Bu hazırladığımız 100 kez dilüe HRP-Streptavidin'den 60 µl başka bir tüpe alındı 15 ml dilüent B ilave edildi. Bu şekilde 25 000 kez dilüe HRP-Streptavidin elde edilmiş oldu.

Çalışma Prosedürü

1. Standart ve numunelerden 100'er µl kendileri için ayrılmış kuyucuklara konuldu. Üzerleri parafilmle kapatılarak oda ısısında 2.5 saat inkübe edildi.

2. Inkübasyon sonrası kuyucukların içeriği boşaltılarak daha önce hazırladığımız yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.

3. Yıkamanın ardından kuyucuklara 100'er µl hazırlamış olduğumuz biyotinize TIMP–2 antikoru eklendi ve oda ısısında bir saat inkübasyona bırakıldı.

4. Yıkama tamponu ile 4 kez yıkandı.

5. Her bir kuyucuğa 100'er µl daha önce hazırladığımız HRP-streptavidin eklendi. Oda ısısında 45 dakika enkübe edildi.

6. Kuyucukların içeriği boşaltılarak yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.

7. Kuyucuklara 100'er µl TMB ilave edildi. Oda ısısında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.

8. İnkübasyonun ardından 50'şer µl stop solüsyonu eklendi ve oluşan renk vakit kaybedilmeden 450 nm dalga boyunda okundu.

9. Çalıştığımız standart absorbanlarından elde ettiğimiz standart eğrisinden faydalanılarak örneklerdeki TIMP-2 konsantrasyonları **pg/ml** cinsinden hesaplandı.

3.4.3. MMP-2*TIMP-2 Kompleks Düzeylerinin Ölçümü

Bu parametrenin ölçümü için Human MMP-2*TIMP-2 kompleks ELISA kiti (R&D SYSTEMS, USA&Canada Cat No: DY 1497) kullanılarak reaktifler hazırlanıp, boş plate antikorla kaplanarak ELISA yöntemi ile ölçüldü.

Kitin içinden çıkan reaktifler:

1. Yakalama antikoru
2. Tesbit antikoru
3. Standart
4. HRP-streptavidin

Kitte bulunmayıp plate hazırlanması için temin edilen reaktifler:

1. Yıkama tamponu
2. Substrat solüsyonu
3. Stop solüsyonu: 2 N H₂SO₄

Reaktiflerin Hazırlanması

1. Fosfat tamponu (PBS): 137 mM, NaCl, 2,7 mM, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2–7,4

2. Blok Tamponu: %0.05 NaN₃ ile PBS'de %1 BSA

3. Reaktif Dilüenti: 50 mM Tris, 10 mM CaCl₂, 0,15 M NaCl, %0.05 Brij 35, pH 7,45–7,55

4. MMP-2*TIMP-2 Kompleks Standardı: Standart vialinden reaktif dilüentle 130 ng/ml konsantrasyonda stok solüsyonu hazırlandı. Bundan seri dilüsyonlarla 1300 ng/ml, 650 ng/ml, 325 ng/ml, 130 ng/ml, 65 ng/ml, 0 ng/ml konsantrasyonlarda 6 farklı standart çözeltisi hazırlandı.

Plate'in Hazırlanması

1. Son konsantrasyon 0.8 µg/ml olacak şekilde PBS ile dilüe edilen yakalama antikorundan her kuyucuğa 100 µl pipetlendi ve gece boyunca inkübasyona bırakıldı.

2. Inkübasyon sonrası kuyucukların içeriği aspire edilerek yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı.

3. Her kuyucuğa 300 µl blok tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı.

4. Kuyucukların içeriği tekrar aspire edilip 3 kez yıkandı ve bu şekilde plate MMP-2*TIMP-2 kompleks ölçümü için hazırlanmış oldu.

Çalışma Prosedürü

1. Standart ve 1/200 oranında dilüe edilen numunelerden kuyucuklara 100'er µl pipetlendi ve oda ısısında 2 saat inkubasyona bırakıldı.

2. Kuyucukların içeriği aspire edilip 3 kez yıkandı.

3. Her kuyucuğa 100 µl tesbit antikorı pipetlendi ve oda ısısında 2 saat inkübe edildi.

4. Kuyucukların içeriği aspire edilip 3 kez yıkandı.

5. Her kuyucuğa 100 µl streptavidin-HRP pipetlendi ve direk ışıktan korunarak 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

6. Kuyucukların içeriği aspire edildi ve 3 kez yıkandı.

7. Her kuyucuğa 100 µl substrat solüsyonu eklendi ve direk ışıktan korunarak 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

8. Her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu ilave edilerek oluşan renk ELISA cihazında 450 nm’de okutuldu ve Çalıştığımız standart absorbanslarından elde ettiğimiz standart eğrisinden faydalanılarak numunelerdeki MMP-2*TIMP-2 kompleks konsantrasyonları **pg/ml olarak** hesaplandı.

3. 5. İstatistiksel Analizler

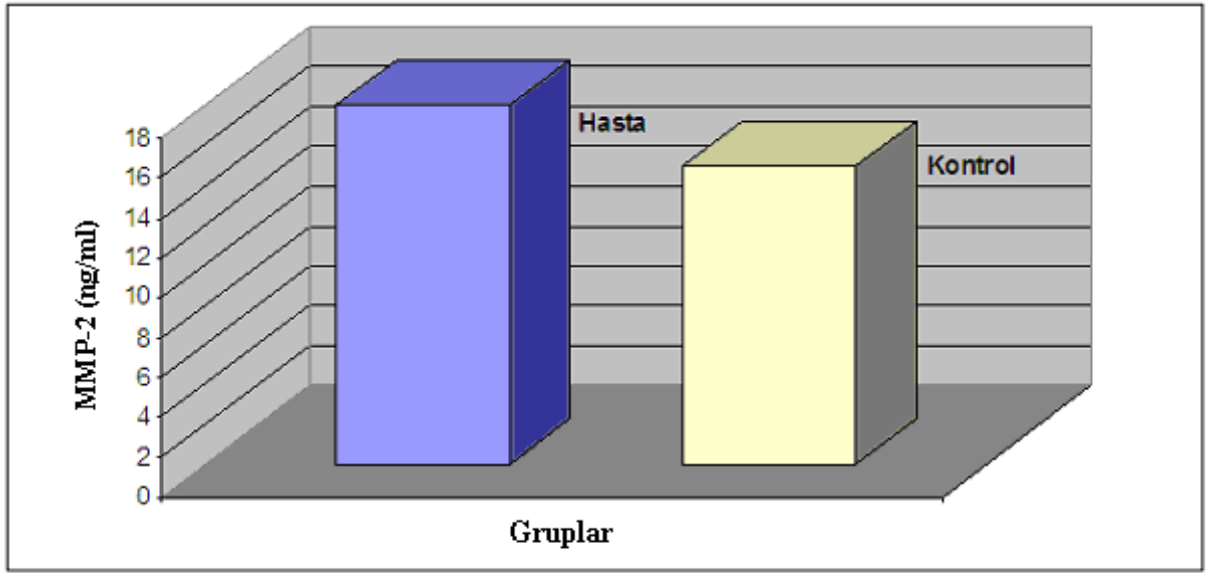
İstatistiksel analizler için " SPSS 13 for Windows " paket programından yararlanıldı. Hasta ve kontrol grubunda ölçülen parametelerin dağılım analizi için Shapiro Wilk testi kullanıldı. Parametrelerin üçü de nonparametrik dağılım gösterdiği için iki grubun karşılaştırılmasında nonparametrik testlerden " Mann-Whitney U testi " kullanıldı. Sonuçlar Ortalama $\pm$ SD olarak verildi. Tüm istatistiksel analizler için anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

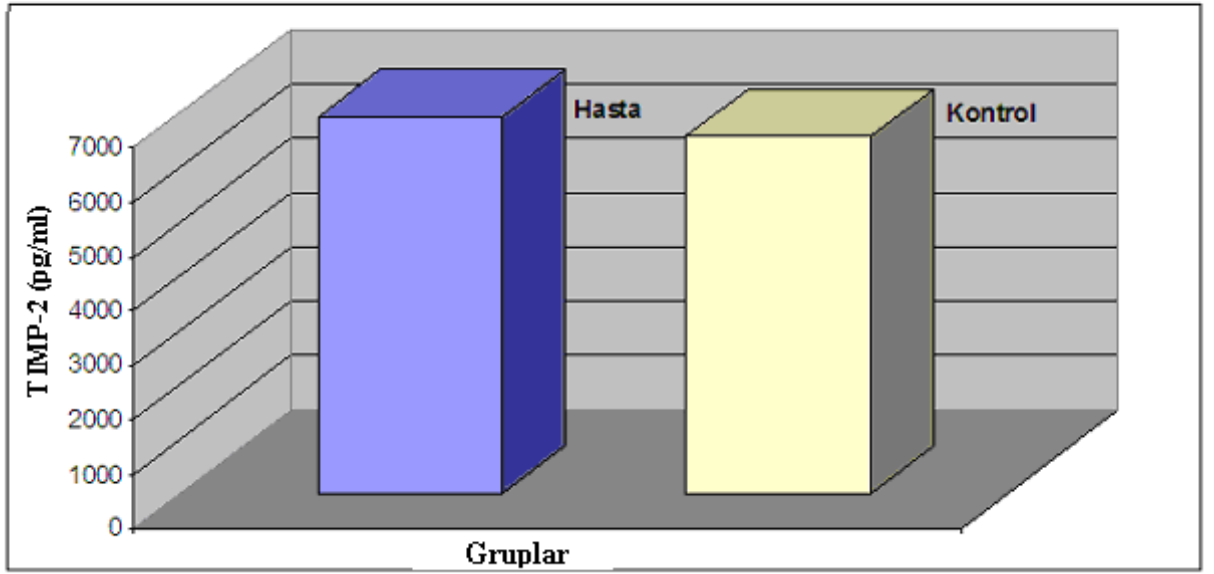
KHDAK ile kontrol grubu karşılaştırıldığında MMP-2, TIMP-2 ve MMP-2*TIMP-2 kompleks düzeyleri hasta grubunda belirgin olarak artmış bulundu ($p<0.05$). Hasta grubunun MMP-2, TIMP-2, MMP-2*TIMP-2 kompleks değerleri sırasıyla 17.99 ± 0.68 ng/ml, 6926.89 ± 108.42 pg/ml, 773.01 ± 40.94 pg/ml, kontrol grubunun MMP-2, TIMP-2, MMP-2*TIMP-2 kompleks değerleri sırasıyla 14.96 ± 0.76 ng/ml, 6574.44 ± 181.69 pg/ml, 773.01 ± 40.94 pg/ml olarak ölçüldü. Bu verilere ilişkin sonuçlar Tablo 5'te özetlenmiştir. Hasta ve kontrol gruplarının serum MMP-2, TIMP-2 ve MMP-2*TIMP-2 kompleks düzeyleri ayrı ayrı Grafik 1, 2 ve 3'te gösterilmiştir.

Tablo 5. Serum MMP-2, TIMP-2, MMP-2* TIMP-2 kompleks düzeyleri

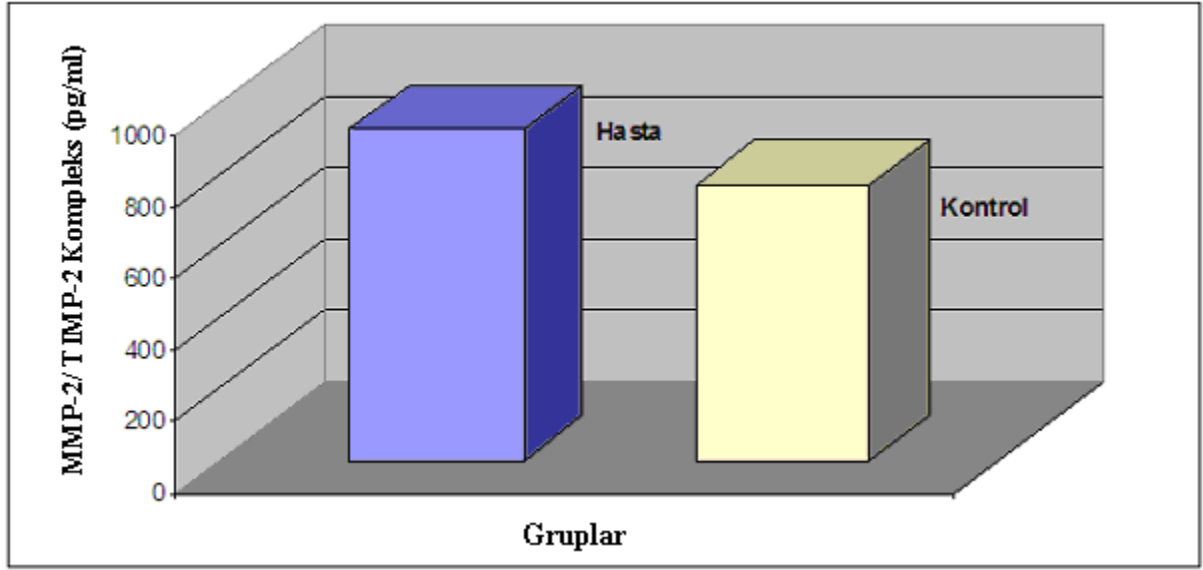
Test Adı	n (Hasta/Kontrol)	Hasta (Ort $\pm$ SD)	Kontrol (Ort $\pm$ SD)	p
MMP-2 (ng/ml)	28/21	17.99 ± 0.68	14.96 ± 0.76	0.018
TIMP-2 (pg/ml)	28/21	6926.89 ± 108.42	6574.44 ± 181.69	0.041
MMP-2* TIMP-2 Kompleks (pg/ml)	28/21	926.86 ± 57.23	773.01 ± 40.94	0.034



Grafik 1. Hasta ve kontrol gruplarının serum MMP-2 düzeyleri



Grafik 2. Hasta ve kontrol gruplarının serum TIMP-2 düzeyleri



Grafik 3. Hasta ve kontrol gruplarının serum MMP-2*TIMP-2 kompleks düzeyleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda serum MMP-2, TIMP-2 ve MMP-2*TIMP-2 kompleks düzeylerinin KHDAK'li hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığını gördük. Bu çalışma küçük hücreli dışı akciğer kanserinde MMP-2, TIMP-2 ve MMP-2*TIMP-2 kompleks serum düzeylerinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Bulgularımızda hastaların, kontrole göre hem serbest hem de doku inhibitörü ile kompleks yapmış MMP-2, hem de onun doku inhibitörü olan TIMP-2 düzeylerindeki artma bu kanser türünde tümör hücrelerinin ekstraselüler matriksi parçalayarak, invazyon ve metastaz yaptıkları yönündeki bilgilerimizle (5,9,10) uyumludur.

Kanser hücrelerinde invazyon ve metastaz yeteneğinin birçok faktöre bağlı olduğu ve ekstrasellüler matriks parçalanmasının bu olaylarda ilk ve en önemli basamak olduğu ortaya konmuştur. Matriks metalloproteinazlar da bu aşamalarda sorumlu en önemli enzim grubunu oluşturur (49). Bunların proteolitik aktiviteleri spesifik doku inhibitörleri tarafından kontrol altında tutulmaktadır. Matriks metalloproteinaz enzim ailesinin üyesi olan MMP-2, özellikle bazal membran bileşiminde yer alan tip IV kollajene ilgi duymakta ve dolayısı ile bazal membran yıkımını gerektiren patolojik olaylarda önemli bir yer tutmaktadır. Nitekim yapılan bazı çalışmalarda bu enzimin bazal membran hasarı olan bölgelerde lokalize olduğu gösterilmiştir (58,59). Birçok çalışmada, bazal hücreli karsinom, baş- boyun, kolon, akciğer, meme, tiroid, prostat, mide, serviks, endometrium ve over gibi organların malign tümörlerinin invaziv ve metastatik potansiyelleri ile MMP'lerin ekspresyonu arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir (60-67). İmmünohistokimyasal, insitu hibridizasyon, RT-PCR (Reverse transcriptase –polimerase chain reaction) ve zimografi gibi yöntemler kullanılarak tümöral dokularda ve ELISA yöntemi kullanılarak da periferik kan örneklerinde tümörü olan hasta gruplarında artmış MMP düzeyleri tesbit edilmiştir (60,61).

Biz çalışmamızda "Enzyme- linked immunosorbent assay" (ELISA) metodunu kullandık. ELISA metodunu seçmemizin amacı, bu yöntemin diğer yöntemlere göre daha ucuz, daha kolay, daha kısa sürede sonuç veren, daha basit teknik alt yapı gerektiren ve rutin analizlerler olarak gerçekleştirebilme imkânına sahip olan bir yöntem olmasıdır.

Literatürde akciğer kanserinde MMP ve doku inhibitörleri ile ilgili yapılmış az sayıda çalışma vardır. Bunlardan Michael ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (68) 46 küçük hücreli akciğer kanseri hastasında MMP-1, MMP -2, MMP -3, MMP -9, MMP -11, MMP -13, MMP -14 ve TIMP-1, TIMP -2, TIMP -3 ve TIMP -4 ekspresyonları immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiş ve üretimlerinin değişen oranlarda tümör dokusunda arttığı gösterilmiştir. Ayrıca TIMP-1 ile tümör evresi arasında anlamlı bir korelasyon bulunmuştur. Hayatta kalma süresine MMP-3, MMP-11 ve MMP-14'ün ekspresyonlarının etkisinin olduğu görülmüştür.

Garbisa ve arkadaşları da (69) MMP-2 düzeylerini 87 akciğer kanseri hastasının serumlarında ölçmüşler ve tümör evresi ilerledikçe serum düzeylerinin arttığını ve Evre 4'teki hastalarda ise kontrol hastalarına göre çok daha anlamlı bir artış olduğunu belirtmişlerdir. Ishihara ve arkadaşları ise (70) deneysel olarak silikozis oluşturulan farelerde metastatik odak sayısının arttığını ve akciğer tümörü gelişmiş silikotik farelerde, tümör gelişmiş normal fareler ve silikaya maruz bırakılmış normal farelerde MMP-9 düzeylerinin anlamlı olarak yüksek olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada da RT-PCR tekniği kullanılmıştır.

Eren ve arkadaşları (71) 33 küçük hücreli dışı akciğer kanserli hasta üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada ise MMP-2 ve TIMP-2' nin dokudaki ekspresyonlarını immünohistokimyasal olarak incelemişler ve tümör dokusunda düzeylerinin artmış olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuç da bizim bulgularımızı desteklemektedir.

Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde Suemitsu ve arkadaşlarının (72) yapmış oldukları bir başka çalışmada ise 54 küçük hücreli dışı akciğer kanserli hasta ve 25 sağlıklı bireyin serumlarında TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyleri ölçülmüş ve TIMP-1 düzeylerinin kanserli hastalarda kontrole göre artmış, TIMP-2 düzeylerinin ise azalmış olduğu belirtilmiştir.

Suzuki ve arkadaşlarının (73) yaptığı çalışmada ise TIMP-2 ekspresyonunun akciğer kanserli hastalarda artmış olduğu bulunmuştur.

TIMP-2 düzeyleri ile ilgili bulgularımız bu konudaki yapılan çalışmalar ile (68,71,73) uyumludur. Sadece bunlardan Suemitsu ve arkadaşları (72) TIMP-2 düzeylerinin kanserde kontrole göre azalmış olduğunu belirtmiştir. Bu çalışma ile benzer bir sonuç da Iniesta ve arkadaşlarının çalışmasından elde edilmiştir. Iniesta P. ve ark. (74) küçük hücreli dışı akciğer kanserli hastaların tümör dokuları ile normal doku örneklerinde MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyleri ELISA ve jelâtin zimografi metodu ile ölçmüşlerdir. Bu çalışmalarında MMP-2, MMP-9 ve TIMP-1 düzeyleri hasta grubunda kontrol grubuna göre artmış olarak bulunurken; TIMP-2 düzeylerinin ise hasta grupta kontrol grubundan daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Akciğer kanserlerinde MMP-2 ve TIMP-2 düzeyleri ile ilgili yapılan araştırmaların çoğu doku düzeylerine ait bulgular verilmektedir (68,70,71). Literatürde akciğer kanserli hastaların serumlarında MMP-2 ve TIMP-2 düzeylerinin ölçüldüğü sadece bir çalışma vardır. Bu da Ylisirniö ve arkadaşlarının (75) gerçekleştirdiği çalışma olup, çalışmalarında serum MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyleri özellikle prognostik açıdan incelenmiş ve MMP-2 *TIMP-2 kompleks düzeyi de ölçülerek MMP-2'nin hem serbest hem de doku inhibitörü ile yaptığı kompleks düzeyleri belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda kanserli hastaların serumlarında hem TIMP-2 hem de MMP-2*TIMP-2 kompleks düzeyleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur (75). Bu çalışma bizim

çalışmamıza çalışma grupları, ölçülen parametreler ve kullanılan ölçüm yöntemi yönünden en yakın çalışmadır. Ancak MMP-2 ile ilgili sonuçları bizim çalışmamızın sonuçları ile uyumlu değildir. Ancak literatürdeki birçok çalışmanın sonuçları (69,71,73,74) bizim sonuçlarımız ile uyumludur ve teorik değerlendirmede beklenen sonuçlardır. Strongin ve arkadaşları 1995 yılında yaptıkları deneysel araştırmada az miktardaki TIMP-2'nin membran aracılı proMMP aktivasyonunu kolaylaştırırken yüksek miktarların aktivasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (76). Bunun sonucunda TIMP-2'nin membran aracılı proMMP aktivasyonunda bifonksiyonel rol aldığını açıklamışlardır. Bizim çalışmamızda bulduğumuz TIMP-2'nin yüksek değerleri Strogin ve ark.'larının yaptığı çalışma ile desteklenmektedir. Daha sonra yapılan birçok çalışma da proMMP aktivasyonundaki TIMP-2'nin rolünü açıklayan bu çalışmaları desteklemektedir (77,78,80,81). Çünkü, metastatik olaylar dizisi ancak bu şekilde gerçekleşebilir. Dolayısı ile bulgularımızı savunup bundan sonraki çalışmalarla destekleneceğini düşünüyoruz.

Bizim çalışmamızda akciğer kanserli hastada yüksek bulduğumuz MMP-2 değerleri bu molekülün ekspresyonunun buna bağlı olarak da üretiminin artmış olduğunu dolaylı olarak göstermektedir. Çalışmamızda TIMP-2'nin de kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını gördük. Fakat TIMP-2'nin doza bağlı olarak bifonksiyonel rol oynaması göz önünde bulundurulacak olursa, yani düşük miktardaki TIMP-2'nin MMP-2 aktivasyonunu kolaylaştırırken yüksek miktarlarının inhibitör etki göstermesini göz önünde bulundurduğumuzda bu bulgular oldukça anlamlıdır. Buna bağlı olarak akciğer kanserli hastalarda az miktarda yükselmiş olarak bulduğumuz TIMP-2 değerlerinin MMP-2 aktivasyonunu kolaylaştırdığı düşünüyoruz.

Çalışmamızda değerini yüksek bulduğumuz MMP-2'nin; kanserli hücrelerin çoğalabilmesi ve çevre dokulara yayılabilmesi için ekstra sellüler matriks elemanlarını parçaladığını göstermektedir. TIMP-2, MMP-2'yi inhibe ederek kanser hücrelerinin

çoğalması ve yayılmasını engellemektedir. MMP-2'ye göre daha az oranda artmış olarak bulduğumuz TIMP-2 değerleri MMP-2'nin kanser gelişimindeki etkisini önlemede yetersiz kalıyor olabilir. MMP-2 ile kompleks halindeki TIMP-2 ise aktif MMP-2'yi inhibe eden TIMP-2'yi yansıtmaktadır. Bu fraksiyonun da yüksek olarak bulunması TIMP-2'nin anlamlı miktarda artmış olan MMP-2 düzeylerini inhibe etmek için yetersiz kaldığını düşündürmektedir. Bu bulgular dengenin proteoliz yönünde kaydığını gösterir.

Akciğer kanserinde moleküler onkolojik hedefe yönelmiş tedaviler adlı bir derlemede akciğer kanserinde ileri evrelerde, yeni geliştirilen kemoterapetik ilaçlara rağmen tedavide yaşam uzatılmasına ve şifaya yönelik büyük adımların halen atılmadığını bu olumsuz görünümün akciğer kanseri tedavisinde bilim adamlarını kemoterapide yeni tedavi arayışlarına yöneliğini ifade etmektedir. Bu yeni kemoterapetik arayışları arasında immunoterapi, antisens tedavi, antianjiogenik tedavi ve ekstrasellüler matriks yıkımını engelleyen metalloproteinaz inhibitörleri yer almaktadır (79).

Biz de çalışmamızda akciğer kanserinin patogenezinde rol alan MMP-2, TIMP-2 ve bunların kompleksi olan MMP-2*TIMP-2 kompleks düzeylerini değerlendirdik. Bu bulgularımız ışığında akciğer kanserinde MMP-2 düzeyleri artarken; MMP-2*TIMP-2 kompleks düzeyleri de artmakta, bu da MMP-2'yi inhibe etmeye yönelik doku savunma mekanizmasından MMP-2*TIMP-2 kompleks oluşumunun arttığını göstermektedir.

Sonuç olarak; bulgularımıza dayanarak küçük hücreli dışı akciğer kanserinde hastaların sadece akciğer dokularında değil hasta serumlarında da MMP-2, TIMP-2 ve MMP-2*TIMP-2 kompleks düzeylerinin arttığını söyleyebiliriz. Bu parametrelerin bir ya da birden fazlasının serumda ölçümünün bu hastalığın tanısında ve izleminde kullanılabileceğini düşünüyoruz.

6. ÖZET

Kanserler yüksek mortalite riski ve hastanın tetkik ve tedavi maliyetinin yüksekliği nedeni ile önemli bir sağlık problemidir. Akciğer kanseri ise her iki cinsten de kanserden ölüm nedenleri arasında ilk sıradadır. Matriks metalloproteinazlar ve matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri birçok kanserde olduğu gibi akciğer kanserinde de teşhis, prognoz ve tedavi açısından araştırılmıştır. Biz bu çalışmada serum MMP-2, TIMP-2, MMP-2*TIMP-2 kompleksi düzeylerini belirleyerek; akciğer kanserli hastaların teşhis, takip ve tedavisinde hastalara faydalı olabileceğini düşündük.

Bu çalışmaya 28 küçük hücreli dışı akciğer kanserli hasta ile yaş ortalamaları hasta grubu ile benzer sağlıklı 21 kişi dahil edildi. Hasta ve kontrol grubunun serum örneklerinde MMP-2, TIMP-2 ve MMP-2* TIMP-2 kompleks düzeyleri ELISA metodu kullanılarak ölçüldü.

KHDAK hastalarında kontrol grubu karşılaştırıldığında MMP-2, TIMP-2 ve MMP-2*TIMP-2 kompleks düzeylerinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulundu ($p<0.05$). Hasta grubunun MMP-2, TIMP-2, MMP-2*TIMP-2 kompleks değerleri sırasıyla 17.99 ± 0.68 ng/ml, 6926.89 ± 108.42 pg/ml, 773.01 ± 40.94 pg/ml, kontrol grubunun MMP-2, TIMP-2, MMP-2*TIMP-2 kompleks değerleri sırasıyla 14.96 ± 0.76 ng/ml, 6574.44 ± 181.69 pg/ml, 773.01 ± 40 pg/ml olarak ölçüldü.

Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde hastaların sadece akciğer dokularında değil, hasta serumlarında da MMP-2, TIMP-2 ve MMP-2*TIMP-2 kompleks düzeyleri artmaktadır. Bunlardan bir ya da birden fazlasının serumda ölçümü bu hastalığın tanısında ve izleminde kullanılabilir kanaatindeyiz.

7. ABSTRACT

Cancers are important health problems because of high mortality rates and high costs of diagnosis and therapy modalities of the disease. Lung cancer is the major cause of cancer associated deaths in both sexes. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors were investigated in lung cancer as well as some of the other cancer types for diagnostic, prognostic and therapeutic purposes. In this study by determination of serum levels of MMP-2, TIMP-2 and MMP-2*TIMP-2 complex we thought that these tests will be helpful in diagnosis and investigation of lung cancer patients

28 patients with non small cell lung cancer and 21 healthy individuals age matched with the patient group were contributed to this study. MMP-2, TIMP-2 and MMP-2*TIMP-2 complex levels were measured in sera of the patient and control groups with ELISA technique.

MMP-2, TIMP-2 and MMP-2*TIMP-2 complex levels were significantly increased in patients with non small cell lung cancer compared with the control group ($p<0.05$). MMP-2, TIMP-2 and MMP-2/TIMP-2 complex levels were respectively 17.99 ± 0.68 ng/ml, 6926.89 ± 108.42 pg/ml, 773.01 ± 40.94 pg/ml in lung cancer patient and MMP-2, TIMP-2, MMP-2*TIMP-2 complex levels were respectively 14.96 ± 0.76 ng/ml, 6574.44 ± 181.69 pg/ml, 773.01 ± 40 pg/ml in control groups.

MMP-2, TIMP-2 and MMP-2*TIMP-2 complex levels increase in sera of the patients with non small cell lung cancer as well as their lung tissues. Measurement of one or more of these parameters in sera of the patients will be used for diagnosis and management of the disease.

8. KAYNAKLAR

1. Kırıl G, Deveci F, Turgut T, Muz H.M, Kaçar C. Akciğer kanserinin epidemiyolojik özelliklerinin retrospektif olarak karşılaştırmalı değerlendirilmesi. F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi 2005; 19(3): 165–169
2. Oğuz Soydu H, Çamlıca H, Duranyılmaz D, Kaytan Sağlam E, Taş F, Yasasever V, Dalay N, Matriks metalloproteinazlar ve akciğer kanseri. Türk Onkoloji Dergisi 2006;21(2):53–56
3. Chia M. M, . Gazdar A, F,. Carbone D. P, Minna J. D, Neoplasms of The Lungs 1994; 46: 1485–1503
4. Jin-Yuan S, Meng-Feng Tzu-Hua C, Yih-Leong C, Ang Y, Chong-Jen Yu, Shin BeyLin, Geou-Yarh L, Meng-Larn L, Jeremy J. W. C, Tse-Ming H, Shuenn-Chen Y, Jen-Liang S, Yung-Chie L, and Pan-Chyr Y, Transcription Repressor Slug Promotes Carcinoma Invasion and Predicts Outcome of Patients with Lung Adenocarcinoma. Clin Cancer Res 2005;11(22) : 8070–8078
5. Apakkan Aksun S, Bayındır O, Özmen D, Metalloproteinazlar, inhibitörleri ve ilişkili Fizyolojik ve Patolojik Durumlar. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri 2001; 21: 332–342
6. Hewitt R, Dan K. Stromal cell expression of components of matrixdegrading protease systems in human cancer. Enzyme Protein 1996; 49: 163–173
7. Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. Trends Genet 1990; 6(4):121–125
8. Sethi CS, Bailey TA, Luthert PJ, Chong NHV. Matrix metalloproteinase biology applied to vitreoretinal disorders. Br J Ophthalmol 2000; 84: 654–664
9. Laack E, Kohler A, Kugler C, Dierlamm T, Knuffmann C, Vohwinkel G, et al. Pretreatment serum levels of matrix metalloproteinase–9 and vascular endothelial growth factor in non-small-cell lung cancer. Annals of Oncology 2002; 13: 1550–1557
10. Yang SF, Hsieh YS, Lin CL, Hsu NY, Chiou HL, Chou FP, et al. Increased plasma levels of urokinase plasminogen activator and matrix metalloproteinase–9 in nonsmall cell lung cancer patients. Clin Chim Acta 2005; 354(1–2): 91–99
11. Clare M. Dollery, Jean R. McEwan, Adriano M. Henney. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. Circulation Research 1995; 77: 863–868
12. Nagase H, Woessner J.F.Jr, Matrix metalloproteinases. Journal of Biological Chemistry 1999; 274:21491–21494

13. Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2004;49: 187–198
14. Reel B. Matriks Metalloproteinaz Enzimleri ve Ateroskleroz. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2006; 26: 527–537
15. Beaudoux JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: Therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 121–131
16. Hoekstra R, Eskens FA, Verweij J. Matrix metalloproteinase inhibitors: Current developments and future perspectives. *Oncologist* 2001; 6: 415–427
17. Vihinen P, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in cancer: Prognostic markers and therapeutic targets. *Int. J. Cancer* 2002; 99: 157–166
18. Borkakoti N. Matrix metalloprotease inhibitors: Design from structure. *Biochemical Society Transactions* 2004; 32(Pt 1): 17–20
19. Peterson JT. Matrix metalloproteinase inhibitor development and the remodeling of drug discovery. *Heart Failure Reviews* 2004; 9: 63–79
20. Axisa B, Loftus IM, Naylor AR, et al. Prospective, randomized, double-blind trial investigating the effect of doxycycline on matrix metalloproteinase expression within atherosclerotic carotid plaques. *Stroke* 2002; 33: 2858–2864
21. Fidler IJ. Principles of molecular cell biology of cancer: cancer metastasis. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: principles and practice of oncology*, 5th.ed. Philadelphia: Lippincot, 1993:134–149
22. Chambers AF, Matrisian LM, Changing Views of the Role of Matrix Metalloproteinases in Metastasis. *Journal of the National Cancer Institute*, 1997; 89: 1260–1267
23. Cotran RS, Kumar V, Collins T, eds. *Pathologic Basis of disease*. W.B. Saunders Company, 1994:272–280.
24. Taşdemiroğlu E. Tümör-Metastaz İlişkisi; 154 *Pediyatrik Solid Maliğn Tümör Olgusunun Analizi. Türk Nöroşirürji Dergisi* 2003; 13: 8 – 11
25. Elise C. Kohn and Lance A. Liotta *Molecular Insights into Cancer Invasion: Strategies for Prevention and Intervention*. *Cancer Research* 1995; 55: 1856–1862
26. Behrens J. Cadherins and catenins: Role in signal transduction and tumor progression *Cancer and Metastasis* 1999; 18: 15–30
27. Jiang WG. E-cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis. *Br J Surg*. 1996 Apr; 83(4): 437–46.

28. Castronovo V. Laminin receptors and laminin-binding proteins during tumor invasion and metastasis. *Invasion Metastasis* 1993;13(1):1–30
29. Alessandra Magnifico A. Tagliabue E. Buto S. et al. Peptide G, Containing the Binding Site of the 67-kDa Laminin Receptor, Increases and Stabilizes Laminin Binding to Cancer Cells *J Biol Chem* 1996; 271(49) :31179–31184
30. Menard S. Tagliabue E. Colnagi MI. The 67kDa laminin receptor as prognostic factor in human cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 1998; 2: 137–145
31. Holzmann B. Gossler U. Bittner M. $\alpha 4$ integrins and tumor metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1998; 231: 125–41.
32. Mizejevski GJ. Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999; 222(2):124–38.
33. Tomas GJ. Jones J. Speight PM. Integrins and oral cancer. *Oral Oncol*. 1997; 33(6): 381–8.
34. Anand Apte B. Zetter B. Signaling Mechanisms in Growth Factor-Stimulated Cell Motility *Stem Cells* 1997; 15; 259–267
35. M. Liotta LA. Schiffmann E. The Role of autotaxin and other motility stimulating factors in the regulation of tumor cell motility *Stracke Symp Soc Exp Biol* 1993; 47: 197–214.
36. Wells A. Tumor Invasion: Role of Growth Factor Induced Cell Motility *Adv Cancer Res*; 2000; 78; 31–101
37. Yang Y. Mou LJ. Liu N. and Tsao MS. Autotaxin Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 1999; 21: 216–222.
38. Bao L. Loda M. and Zetter BR. Thymosin $\beta 15$ expression in tumor cell lines with varying metastatic potential *Clin. Exp. Metastasis*, 1998; 16: 227–233
39. Eadie JS. Kim SW. Allen PG. Hutchinson LM. Kantor DJ. And Zetter BR. C-Terminal Variations in β -Thymosin Family Members Specify Functional Differences in Actin-Binding Properties *J Cell Biochem* 2000; 77: 277–287
40. Gold JS. Bao L. Ghoussoub RAD. Zetter BR. Rhim DL. Localization and quantitation of expression of the cell motility-related protein thymosin $\beta 15$ in human breast tissue *Mod Pathol* 1997;10(11):1106–1112
41. R J S Sneath, D C Mangham The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1998; 51: 191–200
42. Ekmekçi A. Erbaş D. Metastaz ve onkogenler Bölüm V:Kanserin Moleküler Mekanizması *Onkogenler ve Büyüme Faktörleri*, Ankara 1991: 201–222.

43. Zucker S. Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer Cancer and Metastasis Reviews 2004; 23: 101–117
44. Barret AJ. Rawlings ND. Clasification of peptidases Biol Chem 1992; 244: 353–373
45. Manuel Hidalgo, S. Gail Eckhardt Development of Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy J. of Nation Cancer Ins. 2001; 93(3): 178–184.
46. Kugler A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. Review Anticancer Research;1999; 19: 1589–1592.
47. Ray JM. Stetler-Stevenson WG. The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. Eur Respir J. 1994; 7: 2062–2072.
48. Overall CM. Otin CL. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations fort pense he post –trial era. Nat Reviews 2002; 2: 657 672.
49. Curan S. Murray GI. Matrix Metalloproteinases in Tumour İnvation and Metastasis J. Pathol.1999; 189: 300–308.
50. Biswas C. Zhang Y. DeCastro R. Guo H. Nakamura T. Kataoka H. Nabeshima K. The Human Tumor Cell-derived Collagenase Stimulatory Factor (Renamed emmprin) Is a Member of the Immunoglobulin Superfamily Cancer Res.1995; 55: 434 439.
51. Vihinen P. Kahari VM. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets Int. J. Cancer 2002; 99: 157–166.
52. Wosner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. Fabes J. 1991; 5: 2145–2154.
53. Bozkurt B, Selçuk Z.T, Fırat P, Kalyoncu A.F, Artvinli M, 1972–2002 Döneminde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi’nde Akciğer Kanseri Tanısı Konulan Hastaların Histolojik ve Epidemiyolojik Değerlendirmesi Toraks Dergisi, 2004;5(3):148–
54. Gisenberg R.J, Krisp M.G, Armrstrong J.G. Non small cell lung cancer In DeVita Jr. Hellman S. Steven A. Rosenberg S.A. Cancer: Principles and practice of oncology(4thed) Philedelphia Lippincot 1993; 23: 673- 723.
55. Çetinkaya E, Yıldız P, Turna A, Dodurgalı R, Ürer N, Gürses A, Yılmaz V. Akciğer Tümörlerinde Ameliyat Öncesi İnvazif Tanı Yöntemlerinin Hücre Tipini Belirlemedeki Doğruluğu Toraks Dergisi, 2002;3(3):284–288.
56. Öztütük S, Dizbay Sak S. Akciğer Karsinomlarının Patolojisi. Ökten İ. Göğüs cerrahisi cilt II. Türk Göğüs Cerrahisi Derneği 1998; 1077–1097.
57. Cangır A.K. Akciğer kanseri epidemiyoloji ve etyolojisi. Ökten İ. Göğüs cerrahisi cilt II. Türk Göğüs Cerrahisi Derneği 1998; 1061–1073.

- 58.** Hayashi T, William G, Stetler Stevenson, Marian V, Fleming, Immunohistochemical Study of Metalloproteinases and their Tissue inhibitors in the Lungs of Patients with Diffuse Alveolar Damage and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Pathology*. 1996; 149(4): 1241–1256.
- 59.** Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramirez D, Barrios R, Pardo A. TIMP–1, -2, -3 and -4 in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. A Prevailing non Degenerative Lung Microenvironment *Am J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 2000; 279: 562–574.
- 60.** J. Varrani, Y. Hattori, Y. Chi, T. Schmidt, P. Perone, ME. Zeigler, DJ Fader, TM. Johnson, Collagolytic and jelatinolytic matrix metalloproteinases and their inhibitors in basal cell carcinoma of Skin: comparison with normal skin. *British Journal of Cancer* 2000; 82(3): 657–665.
- 61.** Gonzalez LO, Corte MD, Vazquez J, Junquera S, Sanchez R, Viña A, Rodriguez JC, Lamelas ML, Vizoso F. Study of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in ductal in situ carcinomas of the breast. *Histopathology*. 2008; 53(4): 403–15.
- 62.** Hilska M, Roberts PJ, Collan YU, Laine VJ, Kössi J, Hirsimäki P, Rahkonen O, Laato M. Prognostic significance of matrix metalloproteinases–1, -2, -7 and -13 and tissue inhibitors of metalloproteinases–1, -2, -3 and -4 in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2007; 15; 121(4): 714–23.
- 63.** Brehmer B, Biesterfeld S, Jakse G. Expression of matrix metalloproteinases (MMP–2 and -9) and their inhibitors (TIMP–1 and -2) in prostate cancer tissue. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2003; 6(3): 217–22.
- 64.** Okamoto T, Niu R, Yamada S. Increased expression of tissue inhibitor of MMP–2 in clear cell carcinoma of the ovary. *Mol Hum Reprod*. 2003; 9(10): 569–75.
- 65.** Ueno H, Yamashita K, Azumano I, Inoue M, Okada Y. Enhanced production and activation of matrix metalloproteinase–7 (matrilysin) in human endometrial carcinomas. *Int J Cancer*. 1999 Oct 22; 84(5): 470–7.
- 66.** Kubben FJ, Sier CF, van Duijn W, Griffioen G, Hanemaaijer R, van de Velde CJ, van Krieken JH, Lamers CB, Verspaget HW. Matrix metalloproteinase–2 is a consistent prognostic factor in gastric cancer. *Br J Cancer*. 2006 Apr 10; 94(7): 1035–40.
- 67.** O-Charoenrat P, Rhys-Evans PH, Eccles SA. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001 Jul; 127(7): 813–20.

68. Michael M, Babic B, Khokha R, Tsao M, Ho J, Pintilie M, Leco K, Chamberlain D, Shepherd FA. Expression and prognostic significance of metalloproteinases and their tissue inhibitors in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 1999 Jun; 17(6): 1802–8.
69. Garbisa S, Scagliotti G, Masiero L, Di Francesco C, Caenazzo C, Onisto M, Micela M, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. Correlation of serum metalloproteinase levels with lung cancer metastasis and response to therapy. *Cancer Res*. 1992 Aug 15; 52(16): 4548–9.
70. Ishihara Y, Nishikawa T, Iijima H, Matsunaga K. Expression of matrix metalloproteinase, tissue inhibitors of metalloproteinase and adhesion molecules in silicotic mice with lung tumor metastasis. *Toxicol Lett*. 2003 Apr 30; 142(1–2): 71–5
71. Eren B, Sar M, Oz B, Dincbas F. MMP–2, TIMP–2 and CD44v6 in non -small -cell Lung Carcinomas *Ann Acad Med Singapore* 2008; 37: 32–9
72. Suemitsu R, Yoshino I, Tomiyasu M, Fukuyama S, Okamoto T, Maehara Y. Serum tissue inhibitors of metalloproteinase–1 and -2 in patients with non-small cell lung cancer. *Surg Today*. 2004; 34(11): 896–901.
73. Suzuki M, Iizasa T, Fujisawa T, Baba M, Yamaguchi Y, Kimura H, Suzuki H. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in non-small-cell lung cancer. *Invasion Metastasis* 1998–1999; 18(3): 134–41.
74. Iniesta P, Morán A, De Juan C, Gómez A, Hernando F, García-Aranda C, Frías C, Díaz-López A, Rodríguez-Jiménez FJ, Balibrea JL, Benito M. Biological and clinical significance of MMP–2, MMP–9, TIMP–1 and TIMP–2 in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 2007 Jan;17(1):217–23.
75. Ylisirniö S, Höyhty M, Turpeenniemi-Hujanen T. Serum matrix metalloproteinases -2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinases -1, -2 in lung cancer-TIMP–1 as a prognostic marker. *Anticancer Res*. 2000 Mar-Apr; 20(2B): 1311–6.
76. Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem*. 1995 Mar 10; 270(10): 5331–8.
77. Caterina JJ, Yamada S, Caterina NC, Longenecker G, Holmbäck K, Shi J, Yermovsky AE, Engler JA, Birkedal-Hansen H. Inactivating mutation of the mouse tissue inhibitor of metalloproteinases–2(TIMP–2) gene alters proMMP–2 activation. *J Biol Chem*. 2000 Aug 25; 275(34): 26416–22.

- 78.** Zucker S, Drews M, Conner C, Foda HD, DeClerck YA, Langley KE, Bahou WF, Docherty AJ, Cao J. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binds to the catalytic domain of the cell surface receptor, membrane type 1-matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP). *Biol Chem.* 1998 an 9; 273(2): 1216–22.
- 79.** Üner A. Akciğer Kanserinde Moleküler onkolojik Hedefe Yöneltilmiş Tedaviler. *Solunum* 2003; 5(3): 167–172.
- 80.** Higashi S, Miyazaki K. Reactive site-modified tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits the cell-mediated activation of proelastinase A. *J Biol Chem.* 1999 Apr 9;274(15):10497–504.
- 81.** Kurschat P, Zigrino P, Nischt R, Bretkopf K, Steurer P, Klein CE, Krieg T, Mauch C. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 regulates matrix metalloproteinase-2 activation by modulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity in high and low invasive melanoma cell lines. *J Biol Chem.* 1999 Jul 23;274(30):21056–62.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık tezi çalışmamam boyunca desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr.Mehmet Aköz'e , deneysel çalışmalarda yardımını esirgemeyen asistan arkadaşlarım Dr.Seval Akbulut ve Dr. Ayşe Özcan'a,

Hasta grubunun oluşturulması aşamasında yardımcı olan, Prof. Dr.Olgun Arıbaş, Prof. Dr.Kürşat Uzun'a teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren, maddi manevi desteklerini esirgemeyen sevgili anneme, babama ve hep yanımda olan kardeşlerime,

Asistanlık eğitimim boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen başta Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. İdris Mehmetoğlu olmak üzere anabilim dalında görev yapan tüm öğretim üyelerine, diğer asistan arkadaşlarıma ve Merkez Biyokimya Labratuvarı çalışanlarına ,

Çocuklarım, Fatih, Emirhan ve Zeynep'e ve asistanlık eğitiminin her aşamasında maddi manevi yardımını esirgemeyen, ayrıca hasta grubunun oluşturulmasında da yardımcı olan eşim Opr. Dr. Murat Öncel'e

Teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Müfide Öncel